

ISSN 0044-4677

Том 74, Номер 3

Май - Июнь 2024



ЖУРНАЛ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

имени И.П. Павлова



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 74, номер 3, 2024

Обзоры и теоретические статьи

Гены белков миелина, экспрессия которых связана с болезнью Паркинсона
М. В. Шульская, П. А. Сломинский, М. И. Шадрина, А. Х. Алиева 259

Глимфатическая система, сон, нейродегенерация
А. В. Горбачевский, О. А. Кичерова, Л. И. Рейхерт 269

Физиология высшей нервной (когнитивной) деятельности человека

Паттерны межполушарных взаимодействий при пробуждении от коротких эпизодов
дневного сна
А. Е. Манаенков, Н. В. Лигун, Д. С. Свешников, Е. Б. Якунина, В. И. Торшин, В. Б. Дорохов 285

Выявление нейрофизиологических маркеров обработки интрацептивных сигналов
с помощью метода связанных с событиями потенциалов
Е. Д. Словенко, О. В. Сысоева 297

Вызванные потенциалы на движение звуковых стимулов при межушных различиях
по интенсивности
Л. Б. Шестопалова, Е. А. Петропавловская 311

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

Влияет ли длительный отбор по реакциям на человека на особенности процесса
принятия решения у лисиц при обучении?
И. А. Мухамедицина, А. В. Харламова 324

Hypoxic preconditioning in rats with low and high prepulse inhibition of acoustic startle
is implemented through topographically different sensory inputs. Working hypothesis
E. I. Zakharova, Z. I. Storozheva, A. T. Proshin, M. Yu. Monakov, A. M. Dudchenko 336

Влияние содержания крыс в условиях повышенной скученности на тревожность
и условно-рефлекторный страх
И. В. Павлова, Н. Д. Брошевицкая 353

Методика

AVRAWRA — application for video raw record acquisition for neuroimaging and videoregistration
research
*D. S. Suchkov, V. V. Shumkova, V. R. Sitdikova, V. M. Silaeva, A. E. Logashkin, A. R. Mamleev,
Y. V. Popova, L. S. Sharipzyanova, M. G. Minlebaev* 369

Contents

Vol. 74, No 3, 2024

Reviews and theoretical articles

- Role of individual structural and functional elements of myelin in Parkinson's disease
M. V. Shulskaya, P. A. Slominsky, M. I. Shadrina, A. Kh. Alieva 259

- Glymphatic system, sleep, neurodegeneration
A. V. Gorbachevskii, O. A. Kicherova, L. I. Reikhert 269

Physiology of higher nervous (mental) activity in humans

- Patterns of interhemispheric interactions in the short day sleep episodes
A. E. Manaenkov, N. V. Ligun, D. S. Sveshnikov, E. B. Yakunina, V. I. Torshin, V. B. Dorokhov 285

- Identification of neurophysiological markers of interoceptive signals using the event-related potential technique
E. D. Slovenko, O. V. Sysoeva 297

- Motion onset responses elicited by sound stimuli with interaural level differences
L. B. Shestopalova, E. A. Petropavlovskaya 311

Physiology of behavior: perception, locomotion, learning and memory

- Does the selection of fox for their reactions to humans affect the decision-making during learning?
I. A. Mukhamedshina, A. V. Kharlamova 324

- Hypoxic preconditioning in rats with low and high prepulse inhibition of acoustic startle is implemented through topographically different sensory inputs. Working hypothesis
E. I. Zakharova, Z. I. Storozheva, A. T. Proshin, M. Yu. Monakov, A. M. Dudchenko 336

- The effect of overcrowding on anxiety and conditioned fear in rats
I. V. Pavlova, N. D. Broshevitskaya 353

Methods

- AVRAWRA – application for video raw record acquisition for neuroimaging and videoregistration research
D. S. Suchkov, V. V. Shumkova, V. R. Sitdikova, V. M. Silaeva, A. E. Logashkin, A. R. Mamleev, Y. V. Popova, L. S. Sharipzyanova, M. G. Minlebaev 369

УДК 57.023

ГЕНЫ БЕЛКОВ МИЕЛИНА, ЭКСПРЕССИЯ КОТОРЫХ СВЯЗАНА С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

© 2024 г. М. В. Шульская*, П. А. Сломинский, М. И. Шадрина, А. Х. Алиева

Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*e-mail: shulskaya.m@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.02.2024 г.

После доработки 26.03.2024 г.

Принята к публикации 12.07.2024 г.

Миелин представляет собой высокоспециализированную форму плазматической мембраны. Постепенная потеря миелина является одним из характерных признаков как возрастных, так и патологических изменений мозга. В данном обзоре мы попытались охарактеризовать спектр генов, чьи продукты принимают участие в формировании и функционировании миелина ЦНС, а также оценить их возможный вклад в патогенез БП. Анализ опубликованных в настоящее время данных, полученных на модельных объектах и пациентах с БП, позволил выявить несколько генов белков миелина, которые могут быть связаны с развитием БП. Гены RPLP1, MOBP, FA2H и HSPA8 являются наиболее перспективными для исследования их вклада в патогенез БП.

Ключевые слова: миелин, аксон, миелинизация, болезнь Паркинсона

DOI: 10.31857/S0044467724030011

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИЕЛИНА НЕЙРОНОВ ЦНС И ЕГО РОЛЬ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

Миелин представляет собой высокоспециализированную форму плазматической мембраны. Многослойная (250–300 слоев в центральной нервной системе) оболочка образуется в результате разрастания и последующего спирального закручивания плазматической мембраны вокруг фрагментов аксонов проекционных нейронов при помощи особых глиальных клеток. В центральной нервной системе такими клетками являются олигодендроциты. Известно, что один олигодендроцит участвует в процессе миелинизации 40–60 аксонов, ограничиваясь притом лишь одним миелиновым сегментом; таким образом, один аксон миелинизируется сразу несколькими олигодендроцитами (Nave, 2010; Saab, Nave, 2017).

Главная функция миелина как в центральной, так и в периферической нервной системе — обеспечение электроизоляции аксонов, что позволяет регулировать скорость передачи нервного импульса. Компактность и многослойность (до 100 слоев) миелина позволяет увеличить скорость распространения нервного импульса от 1 до 50–100 м/с (Zalc, 2006; Simons, Nave, 2015). Другим

характерным свойством миелина является его высокая пластичность, обусловленная сложными молекулярными механизмами, такими как синтез компонентов миелина, их метаболизм и деградация. Предполагается, что процесс формирования миелина зависит от подтипа нейронов, области мозга и пространственно-временной передачи сигналов нейромедиаторов, высвобождаемых из разных клеток (Saab, Nave, 2017). Еще одна важная особенность миелина заключается в его способности изменяться структурно в течение онтогенеза (Cermenati et al., 2015). Изменениям подвержены такие параметры, как толщина миелина, длина междоузлия и перинодальная организация, регулируемые при помощи везикулярного экзоцитоза (Ford et al., 2015; Etcheberry et al., 2016; Schneider et al., 2016; Dutta et al., 2018). Довольно интенсивное и сложное взаимодействие между миелином и аксоном, осуществляемое при помощи целого ряда белков и липидов, а также межлипидные взаимодействия в слоях самого миелина помогают поддерживать правильность его структуры и стабильность (Olsen, Faergeman, 2017).

Миелин в пересчете на сухую массу состоит на 70–85% из липидов и на 15–30% из белков (Pierre Morell, 1999). Высокое содержание липидов способствует лучшей электроизоляции

(Harayama, Riezman, 2018). Основными липидными компонентами миелина ЦНС являются холестерин, сфингогликолипиды (в основном галактоцереброзид), различные фосфолипиды и сфингомиелин. Основными белковыми компонентами являются основной белок миелина (MBP), протеолипидный белок (PLP) и миелиновый олигодендроцитарный гликопротеин (MOG) (Clements et al., 2003).

Постепенная потеря миелина является одним из характерных признаков возрастных изменений мозга (Kohama et al., 2012). При патологии происходит нарушение формирования миелина или же его деградация под влиянием как генетических факторов, так и факторов внешней среды (например, дефицит питательных веществ, терапевтические вмешательства, химические и биологические токсины) (рис. 1). Биохимические изменения, связанные с демиелинизацией нейронов ЦНС, как правило, сходны независимо от этиологии (Saab, Nave, 2017), однако сама демиелинизация может быть как причиной, так и следствием патологического процесса. Так, при одних демиелинизирующих заболеваниях сначала происходит избирательная дегенерация миелина или миелинизирующих олигодендроцитов, а затем деградации подвергаются и аксоны. Как правило, данные заболевания имеют иммуноопосредованный или инфекционный патогенез; среди них наиболее распространенным является рассеянный склероз, также встречаются лейкоэнцефалопатии, периферические невропатии и

др. В других случаях (лейкодистрофии, болезни лизосомального накопления, наследственные невропатии и т.д.) происходит дегенерация нейронов, приводящая в конечном итоге к их демиелинизации (Garcia-Gil, Albi, 2017). Например, при болезни Альцгеймера потеря миелина аксонами происходит уже на ранних клинических стадиях заболевания задолго до появления первых симптомов (Altevogt et al., 2002; Dean et al., 2017; Papuc, Rejdak, 2020).

ПРОЦЕССЫ МИЕЛИНИЗАЦИИ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний и обусловлена медленной неуклонно прогрессирующей дегенерацией дофаминергических нейронов среднего мозга. Известно, что характерные для БП двигательные симптомы, такие как тремор, постуральная неустойчивость, гипокинезия и пластический гипертенус, появляются при гибели примерно 50–60% дофаминергических нейронов в черной субстанции и снижении дофамина в стриатуме на 70–80% (Bernheimer et al., 1973; Fowler, 2007; Cookson et al., 2008). На сегодняшний день известен целый ряд молекулярных клеточных процессов, лежащих в основе патогенеза БП, начиная с классических (аутофагия, митохондриальная дисфункция и др.) (Shimura et al., 2001; Youle, Narendra, 2011; Ding, Yin, 2012; Lin, Farrer, 2014; Beilina, Cookson, 2016; Bose, Beal, 2016; Voigt et

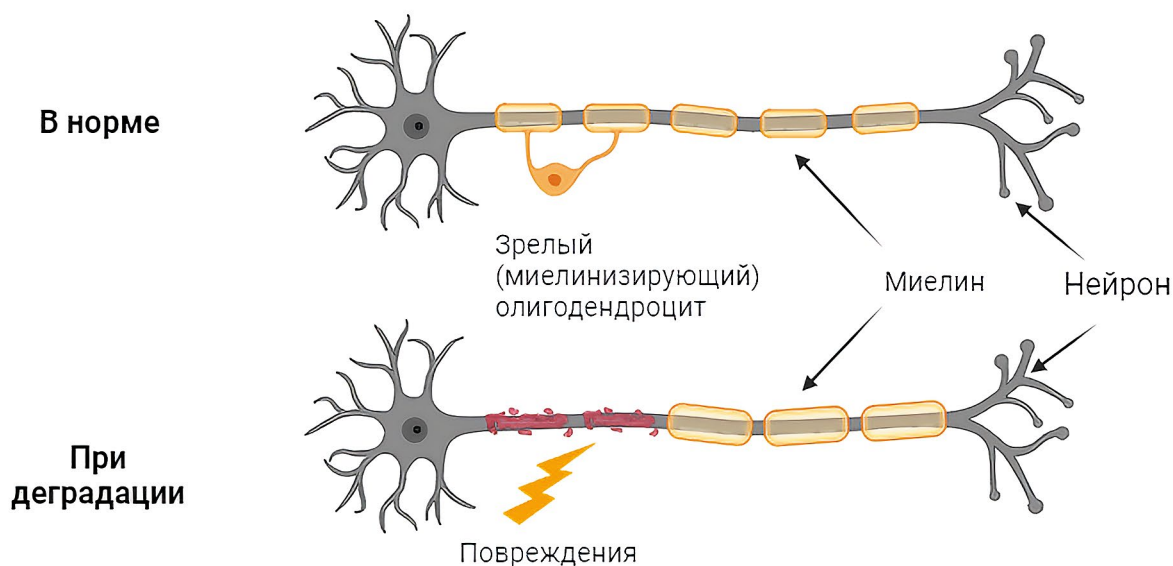


Рис. 1. Схематическое изображение миелина ЦНС в норме и в процессе деградации.
Fig. 1. Schematic representation of normal and degradating CNS myelin.

al., 2016) и заканчивая такими недавно выявленными процессами, как нарушение везикулярного транспорта, окислительный стресс и апоптоз (Dong-Chen et al., 2023; Ye et al., 2023). Однако поиск молекулярно-генетических механизмов развития БП активно продолжается, поскольку известны далеко не все механизмы, связанные с патогенезом БП, а процессы, инициирующие развитие процесса нейродегенерации при БП, и вовсе остаются малоизученными.

Изучая патологические изменения в мозге больных БП, известный немецкий патологоанатом Х. Браак впервые отметил нейропротекторную роль миелина при данном заболевании. Им было отмечено, что сильнее всего деградации подвержены проекционные нейроны, имеющие разветвленные и тонкие аксоны, которые начинают миелинизироваться в последнюю очередь. В то же время нейроны с сильно миелинизованными аксонами (как правило, такая миелинизация начинается еще пренатально) оказываются невосприимчивы к нейродегенерации. Интересно, что данная закономерность была выявлена для всех типов нейронов и областей мозга (Braak, Del Tredici, 2009). Таким образом, им был сделан вывод о том, что развитие нейродегенеративного процесса в коре головного мозга при БП в обратном порядке повторяет последовательность миелинизации нейронов данной области (Braak, Del Tredici, 2004). На сегодняшний день имеются данные о том, что толщина миелина имеет решающее значение для эффективной передачи сигналов, а его повреждение или истончение приводит к десинхронизации передачи электрического импульса, который со временем затухает на коротком расстоянии, несмотря на его более высокую скорость, что, несомненно, может иметь значение при изучении патогенеза заболеваний, связанных с демиелинизацией (Jacak, Jacak, 2022).

Роль липидов миелина при БП

Тесная связь сфинголипидов с нейродегенеративными заболеваниями обусловлена их функцией основного структурного компонента плазматической мембраны олигодендроцитов и миелина (Cermenati et al., 2015). В последние годы активно расширяются знания о роли сфинголипидов в патогенезе БП, при этом наибольшее внимание уделяется церамидам, являющимся предшественниками сложных сфинголипидов (Custodia et al., 2021, Vos et al., 2023), а влияние сфингомиелина, играющего ключевую роль в нормальной и патологической физиологии го-

ловного мозга, на развитие БП изучено недостаточно (Signorelli et al., 2021).

В результате исследований, проведенных *in vitro*, с использованием животных моделей БП, а также образцов периферической крови и тканей пациентов с БП было показано, что прогрессирование БП и тяжесть ее течения напрямую связаны с изменением метаболизма сфингомиелина. Тем не менее его молекулярные механизмы остаются не до конца изученными. Предполагается, что сфингомиелин участвует в развитии БП за счет обеспечения передачи нервных импульсов, пресинаптической пластичности и влияния на локализацию рецепторов нейромедиаторов (Signorelli et al., 2021). Анализ ферментов, метаболизирующих сфингомиелин, позволил частично прояснить его роль в патогенезе БП.

Известно, что гидролиз сфингомиелина осуществляется в плазматической мембране (с получением церамида и фосфохолина) при помощи сфингомиелиназ. У человека имеется пять сфингомиелиназ, которые отличаются N-концевым участком и кодируются генами *SMPD1-SMPD5* (Hofmann et al., 2000; Airola, Hannun, 2013). Для двух из них (*SMPD1* и *SMPD3*) существуют данные о роли в патогенезе БП.

Было показано, что мутации в гене *SMPD1* приводят к существенному снижению активности сфингомиелиназы, что в свою очередь приводит к накоплению сфингомиелина и нарушению процесса аутофагии (Bernardo et al., 2021). На сегодняшний день уже несколькими группами исследователей на различных этнических выборках было показано, что мутации с.996delC (p.fsP330), p.L302P, p.P332R, p.Y500H, p.P533L и p.R591C в гене *SMPD1* достоверно чаще встречаются у больных БП по сравнению с контрольными выборками. Гомозиготность по мутациям в данном гене приводит к развитию болезни Немана–Пика, в то время как гетерозиготные мутации в *SMPD1* являются новым генетическим фактором риска развития БП (Dagan et al., 2015; Gan-Or et al., 2015; Schuchman, Wasserstein, 2015; Mao et al., 2017).

Никаких различий в уровне экспрессии генов *SMPD1* и *SMPD2* в клетках стриатума и черной субстанции мышей с МПТР-индуцированной моделью БП выявлено не было (Blokchin et al., 2022). В то же время было обнаружено снижение уровня экспрессии гена *SMPD3* в стриатуме и гиппокампе мышей с МПТР-индуцированной моделью БП, что подчеркивает важность дальнейшего изучения вклада сфингомиелиназ в па-

тогенез БП (Cataldi et al., 2017; Signorelli et al., 2021).

Роль структурных белков миелина в БП

Белки составляют около 15–30% от общего количества вещества миелина. Их отличительной особенностью является небольшой размер (до 30 кДа). Наиболее представленными являются: основной белок миелина (myelin basic protein (MBP)), миелиновый протеолипидный белок (myelin proteolipid protein (PLP)) и основной олигодендроцитный белок миелина (myelin oligodendrocyte basic protein (MOBP)) (Yamamoto et al., 1994; Baron, Hoekstra, 2010; Frid et al., 2015).

Основной белок миелина представляет собой мембранный полупогружной белок. MBP кодируется одним геном и имеет множество изоформ, возникающих в результате альтернативного сплайсинга или посттрансляционных модификаций. Основной его особенностью является способность к многочисленным поверхностным взаимодействиям, причем данное свойство MBP уникально среди всех белков миелина (Harausz et al., 2009). При демиелинизации MBP довольно быстро деградирует с формированием агрегатов, что было показано при хроническом рассеянном склерозе. Авторами также была высказана гипотеза о возможном существовании подобных агрегатов при БП (Frid et al., 2015).

Миелиновый протеолипидный белок (PLP) кодируется геном *PLP1* и является вторым основным белковым компонентом миелина, обеспечивающим его стабильность и компактизацию (Greer, Lees, 2002). Полнотранскриптомный анализ образцов лобной коры пациентов с БП (post mortem) и трансгенных крыс со сверхэкспрессией альфа-синуклеина показал повышенную экспрессию гена *PLP1* в обоих случаях (Hentrich et al., 2020).

Основной олигодендроцитный белок миелина, кодируемый геном *MOBP*, является третьим по распространенности миелиновым белком, а его основная роль состоит в поддержании уплотненной структуры миелина (Montague et al., 2006). Было показано, что полиморфизм rs616147 в гене *MOBP* является фактором риска развития БП (Siokas et al., 2022). Кроме того, MOBP был выявлен в качестве компонента кортикальных телец Леви в образцах мозга, полученных от пациентов с БП (Kon et al., 2019).

Таким образом, полученные на сегодняшний день данные косвенно подтверждают участие ос-

новных белковых компонентов миелина в патогенезе БП.

Роль везикулярного транспорта миелина при БП

Везикулярный транспорт является одним из базовых клеточных процессов. Нарушения путей транспортировки, сортировки или правильной доставки везикул могут быть вовлечены в развитие БП (Ebanks et al., 2019). Миелинизирующие олигодендроциты образуют самые маленькие внеклеточные везикулы, экзосомы, которые переносят ряд необходимых для формирования миелина белков (прежде всего PLP) (Kramer-Albers et al., 2007; Jin et al., 2021). Было показано, что нарушение процесса транспорта PLP приводит к нехватке данного белка в местах синтеза миелина, а следовательно, к остановке его роста (Hines et al., 2015; Koudelka et al., 2016; Almeida et al., 2021) и невозможности повторной миелинизации (Bakhti et al., 2011; Domingues et al., 2016). Снижение миелинизации нейронов вследствие нарушения везикулярного транспорта может быть одной из причин развития БП (Braak, Del Tredici, 2004; Braak, Del Tredici, 2009).

Другие связанные с функционированием миелина гены, которые могут вносить вклад в развитие БП

Помимо генов, чьи продукты напрямую участвуют в формировании миелина, существует ряд белков, опосредованно влияющих на дифференцировку олигодендроцитов, утилизацию поврежденного миелина и повторную миелинизацию аксона. При помощи анализа основных белковых продуктов миелина в базе данных STRING, а также анализа опубликованных данных нами был выявлен ряд генов, чьи белковые продукты могут быть связаны с развитием БП (табл. 1).

Так, была показана повышенная экспрессия мРНК-генов, входящих в кластер “миелин” (*Atp1b1*, *Tspan2*, *Hspa8*) в стриатуме и черной субстанции мышей с МФТП-индуцированной моделью БП (ранняя симптомная и поздняя досимптомная стадии) (Alieva et al., 2018). Интересно отметить, что схожие данные были получены для генов *ATP1B1* и *HSPA8* в черной субстанции пациентов с БП, в то время как ген *TSPAN2* практически не экспрессируется в миелине головного мозга человека (Hauser et al., 2005; Jayakrishna et al., 2020).

Другой исследовательской группой было выявлено изменение экспрессии ряда генов, кодирующих ферменты миелина (*Asah1*, *Asah2*, *Gba1*,

Таблица 1. Гены, продукты которых связаны с функционированием миелина и развитием БП
Table 1. Genes encoding products that are associated with myelin functioning and the development of PD

Ген	Белок	Связь с миелином	Связь с БП	GO Ontology term
<i>FA2H</i>	Гидроксилаза жирных кислот	Участвует в поддержании структурной целостности миелина.	Один из субстратов убиквитина. Повышенная экспрессия у пациентов с БП и трансгенных крыс. Гомозиготная точковая мутация выявлена у пациента с гомозиготной делецией одного экзона в гене <i>PARK2</i> (Krueger et al., 2010; Bengner et al., 2019; Hentrich et al., 2020)	GO:0006682 Galactosylceramide biosynthetic process GO:0022010 Central nervous system myelination GO:0048709 Oligodendrocyte differentiation GO:0021782 Glial cell development GO:0042552 Myelination
<i>GPR37</i>	Рецептор, связанный с G-белком	Негативный регулятор дифференцировки олигодендроцитов и миелинизации. Мембранный полипептид, связанный с G-белком и названный рецептором Pael, является субстратом паркина, накопление Pael-R может привести к гибели дофаминергических нейронов при AR-JP	Повышенная экспрессия у пациентов с БП и трансгенных крыс. Мыши с выключенным <i>Gpr37</i> демонстрируют пониженную экспрессию миелин-ассоциированного гликопротеина MAG и повышенную восприимчивость к демиелинизации (Imai et al., 2001; Yang et al., 2016; Smith et al., 2017; Hentrich et al., 2020)	GO:0031175 Neuron projection development GO:0022008 Neurogenesis GO:0048468 Cell development GO:0007399 Nervous system development GO:0016043 Cellular component organization
<i>MAG</i>	Миелин-ассоциированный гликопротеин	Активно экспрессируется при инициации миелинизации, опосредует взаимодействие между олигодендроцитами и близлежащими аксонами	Повышенная экспрессия у пациентов с БП и трансгенных крыс (Quarles, 2007; Hentrich et al., 2020), (Lopez, 2014)	GO:0032289 Central nervous system myelin formation GO:0032288 Myelin assembly GO:0022010 Central nervous system myelination GO:0048709 Oligodendrocyte differentiation GO:0021782 Glial cell development
<i>MOG</i>	Миелиновый олигодендроцитный гликопротеин	“Молекула адгезии”, необходимая для обеспечения структурной целостности миелина, синтезируется олигодендроцитами на поздних этапах миелинизации.	Повышенная экспрессия у пациентов с БП и трансгенных крыс, MOG-индуцированная нейтропротекция поврежденной нигростриарной системы в мышцах с МРТР-индуцированной моделью БП (Kurkowska-Jastrzebska et al., 2009; Hentrich et al., 2020)	GO:0007417 Central nervous system development GO:0007399 Nervous system development GO:0016043 Cellular component organization
<i>UGT8</i>	Церамидгалактозилтрансфераза	Обеспечивает перенос церамида непосредственно в аппарат Гольджи, где дальнейшее добавление к нему фосфохолина приводит к образованию сфингомиелина.	Повышенная экспрессия у пациентов с БП и трансгенных крыс (Hentrich et al., 2020; Bouscary et al., 2021)	GO:0006682 galactosylceramide biosynthetic process GO:0032288 Myelin assembly GO:0042552 Myelination GO:0031175 Neuron projection development GO:0007417 Central nervous system development
<i>ATP1B1</i>	Субъединица бета-1 АТФазы, транспортирующая натрий/калий	Компонент Na/K канала мембран в миелинизированных аксонах спирального ганглия улитки человека	Изменение экспрессии у мышей с МФТП-индуцированной моделью БП через 6ч после введения токсина, а также у пациентов с БП (<i>post mortem</i> черная субстанция) (Hauser et al., 2005; Alieva et al., 2018)	GO:0016043 Cellular component organization

Продолжение Таблицы 1

Ген	Белок	Связь с миелином	Связь с БП	GO Ontology term
<i>TSPAN2</i>	Тетраспанин 2	Синтезируется олигодендроцитами для облегчения процесса передачи сигнала от нейрона, возможно участвует в поддержании его стабильности миелина	Изменение экспрессии у мышей с МФТП-индуцированной моделью БП через 6 ч после введения токсина (Biriling et al., 1999; Yaseen et al., 2017; Alieva et al., 2018; Gargareta et al., 2022)	GO:0048709 Oligodendrocyte differentiation GO:0021782 Glial cell development GO:0042552 Myelination GO:0031175 Neuron projection development GO:0007417 Central nervous system development
<i>HSPA8</i>	Белок теплового шока 70	Является шапероном для основного белка миелина (МВР), может принимать участие в дисагрегации токсичных олигомеров α-синуклеина	Изменение экспрессии у мышей с МФТП-индуцированной моделью БП через 6 ч после введения токсина. Снижение уровня мРНК и его белка в периферической крови пациентов с БП (Redeker et al., 2012; Papagiannakis et al., 2015; Alieva et al., 2018; Bonam et al., 2019; Jayakrishna et al., 2020)	GO:0016043 Cellular component organization
<i>CNTN1</i>	Контактин 1	Белок клеточной адгезии участвует в регулировании процессов миелинизации и формирования перехватов Ранвье	Количество белка контактина в спинномозговой жидкости снижено у пациентов с БП накапливаясь в то же время в тельцах Леви. Связь rs1442190 в <i>CNTN1</i> с мутацией G2019S в гене <i>LRRK2</i> у пациентов с БП (Çolakoglu et al., 2014; Vacic et al., 2014; Chatterjee et al., 2020)	GO:0032289 Central nervous system myelin formation GO:0032288 Myelin assembly GO:0022010 Central nervous system myelination GO:0048709 Oligodendrocyte differentiation GO:0021782 Glial cell development

Cers1, *Cers5*), в черной субстанции мышей с МФТП-индуцированной моделью ранней симптомной и досимптомной стадий БП (Blokhnin et al., 2022).

В одной из работ было показано достоверное изменение экспрессии гена *MAG*, а также еще четырех генов, связанных с функционированием миелина (*FA2H*, *MOG*, *GPR37*, *UGT8*), в образцах лобной коры как пациентов с БП, так и трансгенных крыс со сверхэкспрессией альфа-синуклеина (Hentrich et al., 2020).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре мы попытались охарактеризовать спектр генов, чьи продукты принимают участие в формировании и функционировании миелина ЦНС, а также оценить их возможный вклад в патогенез болезни Паркинсона.

Анализ работ, связанных с изменением экспрессии генов миелина, позволяет утверждать, что любые изменения экспрессии (как повышение, так и снижение) генов, чьи продукты явля-

ются непосредственными компонентами миелина, участвуют в молекулярных взаимодействиях миелина и окружающей его среды (табл. 1), приводят к нарушению миелинизации аксонов и усилению процессов нейродегенерации, что косвенно подтверждает исследования Браака по наличию большого числа слабомиелинизированных или же вовсе лишенных миелина нейронов при БП (Braak, Del Tredici, 2004; Braak, Del Tredici, 2009). Резкое снижение экспрессии генов может говорить о том, что компенсаторные возможности клеток иссякают, приводя к развитию процесса демиелинизации и дальнейшей нейродегенерации. При этом повышение экспрессии какого-либо гена также приводит к клеточной гибели. Например, при БП наблюдается накопление сфингомиелина (Signorelli et al., 2021), а также агрегатов белков МВР и МОВР (Frid et al., 2015; Kon et al., 2019), что приводит к гибели клеток из-за цитотоксичности данных веществ.

Изменение миелинизации нейронов начинается на самых ранних клинических стадиях БП. На сегодняшний день мы не можем однозначно утверждать, являются ли эти изменения причи-

ной или же результатом нейродегенеративных процессов. Кроме того, необходимо отметить, что все исследования, связанные с изменением экспрессии в тех или иных отделах головного мозга, проводятся с использованием постмортальных образцов пациентов либо животных моделей БП и имеют ряд ограничений (технических, морфологических, генетических и др.).

Поскольку на сегодняшний день невозможно проводить прижизненные исследования экспрессии генов в тканях головного мозга пациентов с БП, необходимо производить сопоставление всех получаемых данных: результатов анализа как постмортальных образцов мозга или периферической крови пациентов, так и данных, получаемых на различных моделях БП, что позволит в дальнейшем выявить ряд новых генов-кандидатов БП. На данный момент хотелось бы выделить гены *PLP1*, *MOBP*, *FA2H* и *HSPA8* как наиболее перспективные для дальнейшего изучения их вклада в патогенез БП.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа Марины Шульской, Петра Сломинского проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт” (ГЗ - 5Ф - ИМГ.9). Работа Марии Шадринной, Анели Алиевой проведена при частичной финансовой поддержке Российским научным фондом (РНФ) (соглашение № 20-15-00262).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ КАЖДОГО АВТОРА

М.В. Шульская — написание текста статьи, П.А. Сломинский, М.И. Шадринна — редактирование текста статьи, А.Х. Алиева — разработка концепции.

УКАЗАНИЕ НА ДОСТУПНОСТЬ ПЕРВИЧНЫХ ДАННЫХ

Данный обзор не содержит каких-либо первичных данных и основан на литературных

данных, доступных по ссылкам из списка литературы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Airola M.V., Hannun Y.A.* Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2013. 215: 57–76.
- Alieva A.K., Zyrin V.S., Rudenok M.M., Kolacheva A.A., Shulskaya M.V., Ugryumov M.V. et al.* Whole-transcriptome analysis of mouse models with MPTP-induced early stages of Parkinson’s disease reveals stage-specific response of transcriptome and a possible role of myelin-linked genes in neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 2018. 55 (9): 7229–7241.
- Almeida R.G., Williamson J.M., Madden M.E., Early J.J., Voas M.G., Talbot W.S. et al.* Myelination induces axonal hotspots of synaptic vesicle fusion that promote sheath growth. *Curr. Biol.* 2021. 31 (17): 3743–3754.
- Altevogt B.M., Kleopa K.A., Postma F.R., Scherer S.S., Paul D.L.* Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci.* 2002. 22 (15): 6458–6470.
- Bakhti M., Winter C., Simons M.* Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J. Biol. Chem.* 2011. 286 (1): 787–796.
- Bandres-Ciga S., Cookson M.R., Saez-Atienzar S., Bonet-Ponce L., Billingsley K., Vitale D., Blauwendraat C., Gibbs J.R. et al.* International Parkinson’s Disease Genomics Consortium (IPDGC).
- Baron W., Hoekstra D.* On the biogenesis of myelin membranes: sorting, trafficking and cell polarity. *FEBS Lett.* 584 (9): 1760–1770.
- Beilina A.* Genes associated with Parkinson’s disease: regulation of autophagy and beyond. *J. Neurochem.* 2016. 139, Suppl 1: 91–107.
- Benger M., Mankad K., Proukakis C., Mazarakis N.D., Kinali M.* The Interaction of Genetic Mutations in PARK2 and FA2H Causes a Novel Phenotype in a Case of Childhood-Onset Movement Disorder. 2019. *Front. Neurol.* 10: 555.
- Bernardo A., De Nuccio C., Visentin S., Martire A., Minghetti L., Popoli P., Ferrante A.* Myelin Defects in Niemann-Pick Type C Disease: Mechanisms and Possible Therapeutic Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22 (16).
- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F.* Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.* 1973. 20: 415–455.
- Birling M.C., Tait S., Hardy R.J., Brophy J.* A novel rat tetraspan protein in cells of the oligodendrocyte lineage. *J. Neurochem.* 1999. 73 (6): 2600–2608.
- Blokhin V., Shupik M., Gutner U., Pavlova E., Lebedev A.T., Maloshitskaya O. et al.* The Sphingolipid Asset Is

- Altered in the Nigrostriatal System of Mice Models of Parkinson's Disease. *Biomolecules*. 2022. 12 (1): 93.
- Bonam S.R., Ruff M., Muller S. HSPA8/HSC70 in Immune Disorders: A Molecular Rheostat that Adjusts Chaperone-Mediated Autophagy Substrates. *Cells*. 2019. 8 (8).
- Bose A., Beal M.F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2016. 139 Suppl 1: 216–231.
- Bouscary A., Quessada C., Rene F., Spedding M., Turner B.J., Henriques A. et al. Sphingolipids metabolism alteration in the central nervous system: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and other neurodegenerative diseases. *Semin Cell. Dev. Biol*. 2021. 112: 82–91.
- Braak H., Del Tredici K. Poor and protracted myelination as a contributory factor to neurodegenerative disorders. *Neurobiol. Aging*. 2004. 25 (1): 19–23.
- Braak H., Del Tredici K. Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol*. 2009. 201: 1–119.
- Cataldi S., Arcuri C., Hunot S., Légeron F.-P., Mecca C., Garcia-Gil M. et al. Neutral Sphingomyelinase Behaviour in Hippocampus Neuroinflammation of MPTP-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease and in Embryonic Hippocampal Cells. *Mediators of Inflammation*. 2017. 2017: 2470950.
- Cermenati G., Mitro N., Audano M., Melcangi R.C., Crestani M., De Fabiani E., Caruso D. Lipids in the nervous system: from biochemistry and molecular biology to patho-physiology. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. 1851 (1): 51–60.
- Chatterjee M., van Steenoven I., Huisman E., Oosterveld L., Berendse H., van der Flier W.M. et al. Contactin-1 Is Reduced in Cerebrospinal Fluid of Parkinson's Disease Patients and Is Present within Lewy Bodies. *Biomolecules*. 2020. 10 (8).
- Clements C.S., Reid H.H., Beddoe T., Tynan F.E., Perugini M.A., Johns T.G. et al. The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. 100 (19): 11059–11064.
- Çolakoğlu G., Bergstrom-Tyrberg U., Berglund E.O., Ranscht B. Contactin-1 regulates myelination and nodal/paranodal domain organization in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. 111 (3): E394–403.
- Cookson M.R., Hardy J., Lewis P.A. Genetic neuropathology of Parkinson's disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2008. 1: 217–231.
- Custodia A., Aramburu-Núñez M., Correa-Paz C., Posado-Fernández A., Gómez-Larrauri A., Castillo J. et al. Ceramide Metabolism and Parkinson's Disease- Therapeutic Targets. *Biomolecules*. 2021. 11 (7).
- Dagan E., Adir V., Schlesinger I., Borochowitz Z., Ayoub M., Mory A. et al. SMPD1 mutations and Parkinson disease. *Parkinsonism Relat. Disord*. 2015. 21 (10): 1296–1297.
- Dean D.C. 3rd, Hurley S.A., Kecskemeti S.R., O'Grady J.P., Canda C., Davenport-Sis N.J. et al. Association of Amyloid Pathology With Myelin Alteration in Preclinical Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 2017. 74 (1): 41–49.
- Ding W.X., Yin X.M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem*. 2012. 393 (7): 547–564.
- Domingues H.S., Portugal C.C., Socodato R., Relvas J.B. Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Front. Cell Dev. Biol*. 2016. 4.
- Dong-Chen X., Yong C., Yang X., Chen-Yu .S., Li-Hua P. Signaling pathways in Parkinson's disease: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023. 8 (1): 73.
- Dutta D.J., Woo D.H., Lee P.R., Pajevic S., Bukalo O., Huffman W.C. et al. Regulation of myelin structure and conduction velocity by perinodal astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. 115 (46): 11832–11837.
- Ebanks K., Lewis P.A., Bandopadhyay R. Vesicular Dysfunction and the Pathogenesis of Parkinson's Disease: Clues From Genetic Studies. *Front. Neurosci*. 2019. 13: 1381.
- Etxeberria A., Hokanson K.C., Dao D.Q., Mayoral S.R., Mei F., Redmond S.A., et al. Dynamic Modulation of Myelination in Response to Visual Stimuli Alters Optic Nerve Conduction Velocity. *J. Neurosci*. 2016. 36 (26): 6937–6948.
- Ford M.C., Alexandrova O., Cossell L., Stange-Marten A., Sinclair J., Kopp-Scheinflug C. et al. Tuning of Ranvier node and internode properties in myelinated axons to adjust action potential timing. *Nat. Commun*. 2015. 6: 8073.
- Fowler C.J. Update on the neurology of Parkinson's disease. *Neurolog. Urol. Neurodyn*. 2007. 26 (1): 103–109.
- Frid K., Einstein O., Friedman-Levi Y., Binyamin O., Ben-Hur T., Gabizon R. Aggregation of MBP in chronic demyelination. *Ann. Clin. Transl. Neurol*. 2015. 2 (7): 711–721.
- Gan-Or .Z., Orr-Urtreger A., Alcalay R.N., Bressman S., Giladi N., Rouleau G.A. The emerging role of SMPD1 mutations in Parkinson's disease: Implications for future studies. *Parkinsonism Relat. Disord*. 2015. 21 (10): 1294–1295.
- Garcia-Gil M., Albi E. Nuclear Lipids in the Nervous System: What they do in Health and Disease. *Neurochem. Res*. 2017. 42 (2): 321–336.
- Gargareta V.I., Reuschenbach J., Siems S.B., Sun T., Piepkorn L., Mangana C. et al. H.B. Conservation and divergence of myelin proteome and oligodendrocyte transcriptome profiles between humans and mice. *Elife*. 2022. 11.
- Greer J.M., Lees M.B. Myelin proteolipid protein – the first 50 years. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2002. 34 (3): 211–215.

- Harauz G., Ladizhansky V., Boggs J.M. Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein. *Biochem.* 2009. 48 (34): 8094–8104.
- Harayama T., Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. 19 (5): 281–296.
- Hauser M.A., Li Y.J., Xu H., Noureddine M.A., Shao Y.S., Gullans S.R. *et al.* Expression profiling of substantia nigra in Parkinson disease, progressive supranuclear palsy, and frontotemporal dementia with parkinsonism. *Arch. Neurol.* 2005. 62 (6): 917–921.
- Hentrich T., Wassouf Z., Ehrhardt C., Haas E., Mills J.D., Aronica E. *et al.* Increased expression of myelin-associated genes in frontal cortex of SNCA overexpressing rats and Parkinson's disease patients. *Aging (Albany NY).* 2020. 12 (19): 18889–18906.
- Hines J.H., Ravanelli A.M., Schwindt R., Scott E.K., Appel B. Neuronal activity biases axon selection for myelination in vivo. *Nat. Neurosci.* 2015. 18 (5): 683–689.
- Hofmann K., Tomiuk S., Wolff G., Stoffel W. Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. 97 (11): 5895–5900.
- Imai Y., Soda M., Inoue H., Hattori N., Mizuno Y., Takahashi R. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell.* 2001. 105 (7): 891–902.
- Jacak J.E., Jacak W.A. The Role of Myelin in Malfunctions of Neuron Transmittance. *Neurosci.* 2022. 505: 125–156.
- Jayakrishna T., Nellore J., Veerappan V. Gender specific mRNA expression of HSPA8 in Parkinson's disease. 2020. 3391–3395.
- Jin T., Gu J., Li Z., Xu Z., Gui Y. Recent Advances on Extracellular Vesicles in Central Nervous System Diseases. *Clin. Interv. Aging.* 2021. 16: 257–274.
- Kohama S.G., Rosene D.L., Sherman L.S. Age-related changes in human and non-human primate white matter: from myelination disturbances to cognitive decline. *Age (Dordr).* 2012. 34 (5): 1093–1110.
- Kon T., Tanji K., Mori F., Kimura A., Kakita A., Wakabayashi K. Immunoreactivity of myelin-associated oligodendrocytic basic protein in Lewy bodies. *Neuropat.* 2019. 39 (4): 279–285.
- Koudelka S., Voas M.G., Almeida R.G., Baraban M., Soetaert J., Meyer M.P. *et al.* Individual Neuronal Subtypes Exhibit Diversity in CNS Myelination Mediated by Synaptic Vesicle Release. *Curr. Biol.* 2016. 26 (11): 1447–1455.
- Kramer-Albers E.M., Bretz N., Tenzer S., Winterstein C., Mobius W., Berger H. *et al.* Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clin. Appl.* 2007. 1 (11): 1446–1461.
- Kruer M.C., Paisan-Ruiz C., Boddaert N., Yoon M.Y., Hama H., Gregory A. *et al.* Defective FA2H leads to a novel form of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). *Ann. Neurol.* 2010. 68 (5): 611–618.
- Kurkowska-Jastrzebska I., Bałkowiec-Iskra E., Ciesielska A., Joniec I., Cudna A., Zaremba M.M. *et al.* Decreased inflammation and augmented expression of trophic factors correlate with MOG-induced neuroprotection of the injured nigrostriatal system in the murine MPTP model of Parkinson's disease. *Int. Immunopharmacol.* 2009. 9 (6): 781–791.
- Lin M.K., Farrer M.J. Genetics and genomics of Parkinson's disease. *Genome Med.* 2014. 6 (6): 48.
- Lopez P.H. Role of myelin-associated glycoprotein (siglec-4a) in the nervous system. *Adv. Neurobiol.* 2014. 9: 245–262.
- Mao C.Y., Yang J., Wang H., Zhang S.Y., Yang Z.H. *et al.* SMPD1 variants in Chinese Han patients with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2017. 34: 59–61.
- Montague P., McCallion A.S., Davies R.W., Griffiths I.R. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: a family of abundant CNS myelin proteins in search of a function. *Dev. Neurosci.* 2006. 28 (6): 479–487.
- Nave K.A. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature.* 2010. 468 (7321): 244–252.
- Olsen A.S.B., Faergeman N.J. Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases. *Open Biol.* 2017. 7 (5).
- Papagiannakis N., Xilouri M., Koros C., Stamelou M., Antonelou R., Maniati M. *et al.* Lysosomal alterations in peripheral blood mononuclear cells of Parkinson's disease patients. *Mov. Disord.* 2015. 30 (13): 1830–1834.
- Papuc E., Rejdak K. The role of myelin damage in Alzheimer's disease pathology. *Arch. Med. Sci.* 2020. 16 (2): 345–351.
- Pierre Morell R.H.Q. Characteristic Composition of Myelin. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* 6th edition, Siegel, GJ, Albers, RW, *et al.*, Eds., Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.
- Quarles R.H. Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J. Neurochem.* 2007. 100 (6): 1431–1448.
- Redeker V., Pemberton S., Bienvenut W., Bousset L., Melki R. Identification of protein interfaces between alpha-synuclein, the principal component of Lewy bodies in Parkinson disease, and the molecular chaperones human Hsc70 and the yeast Ssa1p. *J. Biol. Chem.* 2012. 287 (39): 32630–32639.
- Saab A.S., Nave K.A. Myelin dynamics: protecting and shaping neuronal functions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2017. 47: 104–112.
- Schneider S., Gruart A., Grade S., Zhang Y., Kroger S., Kirchhoff F. *et al.* Decrease in newly generated oligodendrocytes leads to motor dysfunctions and changed myelin structures that can be rescued by transplanted cells. *Glia.* 2016. 64 (12): 2201–2218.

- Schuchman E.H., Wasserstein M.P.* Types A and B Niemann-Pick disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015. 29 (2): 237–247.
- Shimura H., Schlossmacher M.G., Hattori N., Frosch M.P., Trockenbacher A., Schneider R. et al.* Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science.* 2001. 293 (5528): 263–269.
- Signorelli P., Conte C., Albi E.* The Multiple Roles of Sphingomyelin in Parkinson's Disease. *Biomolecules.* 2021. 11 (9).
- Simons M., Nave K.A.* Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015. 8 (1): a020479.
- Siokas V., Aloizou A.-M., Liampas I., Bakirtzis C., Tsouris Z., Sgantzios M. et al.* Myelin-associated oligodendrocyte basic protein rs616147 polymorphism as a risk factor for Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 2022. 145 (2): 223–228.
- Smith B.M., Giddens M.M., Neil J., Owino S., Nguyen T.T., Duong D. et al.* Mice lacking Gpr37 exhibit decreased expression of the myelin-associated glycoprotein MAG and increased susceptibility to demyelination. *Neurosci.* 2017. 358: 49–57.
- Vacic V., Ozelius L.J., Clark L.N., Bar-Shira A., Gana-Weisz M., Gurevich T. et al.* Genome-wide mapping of IBD segments in an Ashkenazi PD cohort identifies associated haplotypes. *Hum. Mol. Genet.* 2014. 23 (17): 4693–4702.
- Voigt A., Berlemann L.A., Winklhofer K.F.* The mitochondrial kinase PINK1: functions beyond mitophagy. *J Neurochem.* 2016. 139 Suppl 1: 232–239.
- Vos M., Klein C., Hicks A.A.* Role of Ceramides and Sphingolipids in Parkinson's Disease. *J. Mol. Biol.* 2023. 435 (12): 168000.
- Yamamoto Y., Mizuno R., Nishimura T., Ogawa Y., Yoshikawa H., Fujimura H. et al.* Cloning and expression of myelin-associated oligodendrocytic basic protein. A novel basic protein constituting the central nervous system myelin. *J. Biol. Chem.* 1994. 269 (50): 31725–31730.
- Yang H.-J., Vainshtein A., Maik-Rachline G., Peles E.* G protein-coupled receptor 37 is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Nat. Commun.* 2016. 7 (1): 10884.
- Yaseen I.H., Monk P.N., Partridge L.J.* Tspan2: a tetraspanin protein involved in oligodendrogenesis and cancer metastasis. *Biochem. Soc. Trans.* 2017. 45 (2): 465–475.
- Ye. H., Robak L.A., Yu. M., Cykowski M., Shulman J.M.* Genetics and Pathogenesis of Parkinson's Syndrome. *Annu Rev Pathol* 2023. 18: 95–121.
- Youle R.J., Narendra D.P.* Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011. 12 (1): 9–14.
- Zalc B.* The acquisition of myelin: a success story. *Novartis Found Symp.* 2006. 276: 15–21.

ROLE OF INDIVIDUAL STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ELEMENTS OF MYELIN IN PARKINSON'S DISEASE

M. V. Shulskaya[#], P. A. Slominsky, M. I. Shadrina, A. Kh. Alieva

National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

#e-mail: shulskaya.m@yandex.ru

Myelin is a highly specialized form of the plasma membrane. The gradual loss of myelin is typical for both age-related and pathological changes in the brain. In this review, we attempted to characterize the spectrum of genes which products are involved in the formation and functioning of CNS myelin, as well as to assess their possible contribution to the pathogenesis of PD. Analysis of currently published data obtained from model objects and patients with PD has identified several myelin protein genes that may be associated with the development of PD. The *PLP1*, *MOBP*, *FA2H*, and *HSPA8* genes are the most promising for studying their contribution to the pathogenesis of PD.

Keywords: myelin, axon, myelination, Parkinson's disease

УДК 616.8-091.945

ГЛИМФАТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА, СОН, НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЯ

© 2024 г. А. В. Горбачевский*, О. А. Кичерова, Л. И. Рейхерт

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Тюменский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Тюмень, Россия

*e-mail: gorbachevskyalex@mail.ru

Поступила в редакцию 11.12.2023 г.

После доработки 26.02.2024 г.

Принята к публикации 11.03.2024 г.

Распространенность нейродегенеративных заболеваний и сложность их лечения в поздних стадиях делает актуальным выявление ранних маркеров и симптомов данной группы заболеваний с целью оптимизации диагностики, лечения и профилактики.

Материалы и методы. Был проведен анализ базы данных PubMed по запросам: периваскулярное пространство, пространство Вирхова–Робина, глимфатическая система, нарушения сна, болезнь Альцгеймера.

Заключение: расширение периваскулярных пространств (Вирхова–Робина) можно считать ранним структурным маркером как глимфатической дисфункции, так и нейродегенеративных заболеваний, тогда как нарушение сна можно рассматривать как функциональный маркер (симптом) данных нарушений.

Ключевые слова: периваскулярное пространство, пространство Вирхова–Робина, глимфатическая система, инсомния, болезнь Альцгеймера, астроцит, норадреналин, МРТ, полисомнография

DOI: 10.31857/S0044467724030024

ВВЕДЕНИЕ

Головной мозг — орган с высокой скоростью метаболизма, синаптическая передача между нейронами которого чувствительна к гомеостатическим изменениям. Человеческий мозг использует 25% всей энергии организма и генерирует около 7 г потенциально токсичных белковых отходов ежедневно (Naganawa Taoka, 2022; Nedergaard, Goldman, 2016). Вследствие этого надлежащее регулирование среды ЦНС жизненно важно для ее здорового функционирования, а дисбаланс концентраций критических ионов и отходов метаболизма является одновременно результатом и причиной потенциально тяжелой дисфункции. Таким образом, структуры и системы, отвечающие за выведение продуктов метаболизма, являются критическим компонентом гомеостаза тканей головного мозга (Voumvourakis et al., 2023). К основным системам, отвечающим за данный гомеостаз, относятся система циркуляции жидкостей головного мозга и гематоэнцефалический барьер.

Головной мозг включает четыре жидкостных отсека (компартамента):

1. Спинномозговую жидкость (ликвор) — 10% от общего объема, — которая продуцируется сосудистыми сплетениями в количестве 500 см³ в день, при максимальной вместимости головного

мозга 150 см³, что свидетельствует о важной роли циркуляции ликвора (Johanson et al., 2008).

2. Интерстициальную (внеклеточную) жидкость — 12–20%.

3. Внутриклеточную жидкость — 60–68%.

4. Кровь в составе кровеносной сосудистой системы — 10% (Plog, Nedergaard, 2018).

Кровь отделена от паренхимы головного мозга и ликвора гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ), который образован преимущественно эндотелиальными клетками кровеносных сосудов головного мозга и концевыми ножками клеточек-астроцитов, экспрессирующими водный канал аквапорин-4 (AQP4), который регулирует транспорт жидкости (Jessen et al., 2015). Пространство между кровеносными сосудами и астроцитами называется периваскулярным пространством (Mestre et al., 2017).

Клетки эндотелия и астроциты совместно с перицитами, нейронами и гладкомышечными клетками составляют “нервно-сосудистую единицу”, которая служит анатомо-функциональным компонентом функционирования головного мозга, а связь между функционированием “нервно-сосудистой единицы”, гематоэнцефалическим барьером и периваскулярным пространством является настолько тесной, что это

дало основание Troili F. ввести понятие “периваскулярной единицы” для описания процессов, происходящих в периваскулярном пространстве (Troili et al., 2020).

История открытия глимфатической системы

Более ста лет назад Льюис Уид, нейрохирург из Гарвардской медицинской школы в Бостоне, продемонстрировал, что краситель, введенный в спинномозговую жидкость, вскоре появлялся в лимфатических узлах шеи, подтверждая тот факт, что отток ликвора происходит не только в венозную систему головного мозга, но и в лимфатическую систему (Weed 1914a, 1914b).

В 1851 г. Рудольфом Вирховым и в 1859 г. Шарлем Филиппом Робинотом были описаны периваскулярные пространства (ПВП, или пространства Вирхова—Робина) в виде полостей, заполненных ликвором, вокруг церебральных артерий и вен как вариант нормы гистологической картины головного мозга (Virchow, 1851; Robin, 1859).

На протяжении более сотни лет связь между двумя данными открытиями, равно как и связь между периваскулярными пространствами и циркуляцией ликвора в головном мозге, не была установлена и оценена по достоинству до тех пор, когда в 2012 г. и в последующие годы в лаборатории Nedergaard M., Iliff J. (Iliff et al., 2013) были получены и опубликованы результаты исследования движения ликвора из субарахноидального пространства непосредственно через периваскулярные пространства с помощью двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии с введением индикатора в большую цистерну мозга мышей (Iliff et al., 2012). В дальнейшем данный путь прохождения ликвора был подтвержден этим же автором с помощью МРТ-диагностики в режиме T1w FLASH с контрастным усилением гадолинием (Iliff et al., 2013). Поскольку основу интерстиция головного мозга составляют клетки глии, то данную систему транспорта ликвора в тканях головного мозга было предложено назвать “глиа-лимфатической” или (сокращенно) “глимфатической” (Iliff et al., 2012, 2013).

Несмотря на то, что данные, полученные Nedergaard M., Iliff J., привлекли к данному вопросу внимание многих исследователей, глимфатическая гипотеза на данный момент не является однозначно подтвержденной, поскольку существует ряд противоречивых моментов, ко-

торые требуют дальнейших исследований (Naganawa, Taoka, 2022; Семячкина-Глушкова, Постнов, и др., 2023; Hladky, Barrand, 2020), а именно:

- Какова роль и соотношение механизмов конвекции и диффузии в циркуляции интерстициальной жидкости?
- Какова роль пульсации артерий, ритма дыхания и образования ликвора в циркуляции интерстициальной жидкости?
- Действительно ли движение интерстициальной жидкости связано с выведением продуктов жизнедеятельности головного мозга, тогда как каналы AQP4 пропускают только воду?

В последние годы глимфатическая гипотеза подвергается серьезной критике со стороны ряда исследователей (Hladky, Barrand, 2020) и, возможно, будет дополнена либо пересмотрена по мере получения новых научных данных, однако, несмотря на ряд существенных замечаний, Hladky S.B. отмечает, что интерес к глимфатической системе не ослабевает, а растет.

Также считаем необходимым сразу разделить понятия “глимфатической гипотезы”, которая является результатом исследований научной школы Nedergaard M., и “глимфатической системы” (Buccellato et al., 2022), которая на данный момент является обобщающим термином, включающим всю совокупность современных научных данных о клиренсе ликвора и интерстициальной жидкости головного мозга. Возможно, более адекватным было бы использование термина “система удаления отходов головного мозга” (англ. Brain Waste Removal System) (Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2022) либо “лимфатическая дренажная система головного мозга” (Семячкина-Глушкова и др., 2023), однако поскольку единого мнения, как называть данную систему, нет, а PubMed по запросу “glymphatic system” выдает более 200 ссылок на обзоры и систематические обзоры, то термин “глимфатическая система” следует считать достаточно часто употребляемым в качестве общего названия дренажных систем головного мозга.

Понимание значения глимфатической системы в функционировании головного мозга еще более возросло после проведения исследований, интерстициального пространства головного мозга у спящих мышей. Данный факт был объяснен тем, что увеличение интерстициального

пространства снижает общее сопротивление тканей головного мозга потокам ликвора, облегчая лимфодренаж во время сна. На примере болезни Альцгеймера также было показано, что клиренс растворимого бета-амилоида (Аβ) увеличивался в 2 раза во время медленного сна по сравнению с бодрствованием (Xie et al., 2013), но детальный механизм данного явления оставался неясным.

Постепенно сформировалась относительно целостная картина функционирования глимфатической системы и периваскулярных пространств, изложенная в 2015 г. Jessen N.A. (Jessen et al., 2015) в обзоре “Глимфатическая система: руководство для начинающих”, содержащая следующие положения:

1. Артерии с поверхности коры головного мозга переходят в пиальные артерии, проходящие через субарахноидальное пространство, содержащее ликвор.

2. Пиальные артерии погружаются в паренхиму головного мозга совместно с элементами мягкой оболочки головного мозга, где переходят в проникающие артериолы, создавая периваскулярные пространства Вирхова–Робина, заполненные ликвором и окаймленные слоем лептоменингеальных клеток как на внутренней стенке, обращенной к сосуду, так и на наружной стенке, обращенной к периваскулярным астроцитарным концевым ножкам.

3. По мере того как проникающие артериолы сужаются глубже в паренхиме головного мозга, пространство Вирхова–Робина исчезает перед капиллярным уровнем, где ПВП состоит исключительно из базальной пластинки сосуда.

4. Из церебральных капилляров кровь поступает в посткапиллярные венулы и магистральные вены, где базальные мембраны эндотелиальных клеток и астроцитов увеличиваются, снова обеспечивая образование ПВП, наполненное ликвором.

5. Ликвор и интерстициальная жидкость постоянно взаимодействуют между собой на границе ПВП и интерстиция головного мозга и являются взаимозаменяемыми за счет следующих механизмов:

- артериальной пульсации;
- дыхания;
- градиентов давления ликвора.

6. Рыхлый волокнистый матрикс ПВП рассматривается как магистраль с низким сопротивлением для притока ликвора.

7. Движение ликвора приводит к конвективным потокам жидкости по направлению к перивенозным пространствам, окружающим крупные глубокие вены (Jessen et al., 2015).

Из перивенозного пространства головного мозга жидкость выводится в шейную лимфатическую систему, как бы завершая путь циркуляции ликвора в головном мозге. Одна из ведущих ролей в регуляции циркуляции ликвора принадлежит клеткам-астроцитам и белку аквапори-ну-4 (AQP4) в ножках данных астроцитов, т.к. инактивация аквапорина-4 приводит к снижению потока ликвора через паренхиму головного мозга на ~70% по сравнению с контролем (Iliff et al., 2012, 2013).

В обзоре Gędek A. (Gędek et al., 2023) указаны основные пути дальнейшего дренирования периваскулярного пространства:

1. Абсорбция спинномозговой жидкости в назальные лимфатические сосуды через решетчатую пластинку является характерной особенностью всех млекопитающих, включая человека (Johnston et al., 2004).

2. Дренаж через пространства вдоль черепных нервов, таких как тройничный нерв, лицевой или языкоглоточный нервы.

3. Недавно обнаруженные лимфатические сосуды в твердой мозговой оболочке, расположенные вокруг дуральных венозных синусов.

4. В исследовании (Chang et al., 2023) показано наличие глубоких лимфатических сосудов головного мозга.

Таким образом, дренажная система головного мозга не ограничивается собственно глимфатической системой, а является суммарным результатом функционирования периваскулярных пространств (ПВП) (возможно, также и параваскулярных) и менингеальной лимфатической системы (Николенко и др., 2018), а также глубоких лимфатических сосудов головного мозга (Chang et al., 2023), характер взаимодействия которых требует дальнейшего изучения.

Согласно современным данным (Okar et al., 2023), в случае локального нарушения циркуляции интерстициальной жидкости и ее недостаточного клиренса через ПВП возникает увеличе-

ние периваскулярного пространства. В обзоре Ocar S.V. приводятся четыре основных гипотезы увеличения ПВП:

1. Гипотеза отложения амилоида в сосудах, связанная с тем, что у пациентов с церебральной амилоидной ангиопатией отмечается большее увеличение ПВП по сравнению с контролем.

2. Гипотеза нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера, связанная с заболеванием мелких сосудов, как причины увеличения ПВП, когда сосудистые факторы риска, такие как артериальная гипертензия, приводят к эндотелиальной дисфункции и баротравме пораженных сосудов как основной причине нарушения проницаемости ГЭБ.

3. Гипотеза венозного рефлюкса связывает увеличение ПВП с нарушением функционирования глубоких медуллярных вен и церебральным венозным рефлюксом.

4. Гипотеза нарушения сна как критического фактора гемодинамики ЦНС.

В обзоре Mestre H. (Mestre et al., 2017) функционирование лимфатической системы сводится к трем основным процессам (но не исчерпывается ими), которые следует рассмотреть более подробно:

1. Цереброваскулярная пульсация, которая является движущей силой потока ликвора в ПВП.

2. Клиренс из ЦНС растворенных токсических веществ и продуктов метаболизма.

3. Структурная и функциональная целостность периваскулярных пространств (пространств Вирхова–Робина).

ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНАЯ ПУЛЬСАЦИЯ. РЕГУЛЯЦИЯ РАБОТЫ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Изначально периваскулярное пространство считалось пассивной анатомической структурой, которая изменяла свой объем вторично по отношению к транзиторной вазоконстрикции и вазодилатации сосуда, находящегося внутри ПВП. Подобное предположение высказал еще Pliff J.J. (Pliff et al., 2012, 2013), который показал, что перемещение ликвора по ПВП осуществляется за счет пульсации артерий внутри ПВП, путем эксперимента по односторонней перевязке сонных артерий у крыс, которая достоверно снижала пульсацию артерий на 50%, в то время как

системное введение адренергического агониста добутамина увеличивало пульсацию проникающих артерий на ~60%. В ходе параллельного исследования ликвородинамики в режиме реального времени с помощью флуоресцентной визуализации было установлено, что перевязка внутренней сонной артерии замедляла скорость параваккулярного обмена между ликвором и интерстициальной жидкостью, в то время как введенный добутамин скорость параваккулярного обмена увеличивал. Тогда же было высказано предположение о связи нарушений артериальной пульсации со скоростью накопления в ЦНС продуктов метаболизма.

Позднее исследование Barisano G. (Barisano et al., 2021) показало, что пространства Вирхова–Робина не являются абсолютно статичными анатомическими образованиями, поскольку для ПВП характерны суточные вариации калибра у одних и тех же субъектов, когда ПВП уменьшаются во время сна и увеличиваются в течение дня. Способность к изменению калибра ПВП уменьшается по мере снижения эластичности сосудистой стенки, поэтому с возрастом ПВП теряют способность изменения калибра и остаются постоянно расширенными.

В исследовании Hughes T.M. (Hughes et al., 2013) была подтверждена связь между увеличением ригидности стенок артерии и ускорением отложения бета-амилоида в тканях головного мозга.

В дальнейшем было высказано предположение, что сердечные импульсы не могут быть единственным механизмом лимфатической стимуляции, и были проведены исследования с применением сверхбыстрой магнитно-резонансной энцефалографии с целью найти дополнительные источники пульсации спинномозговой жидкости в головном мозге человека. Так, в исследовании Kiviniemi V. (Kiviniemi et al., 2015) было показано, что помимо сердечных механизмов пульсации ликвора существуют еще дыхательные и низкочастотные механизмы.

1. Дыхательные пульсации ≈ 0.3 Гц представляют собой центростремительные периодические импульсы, возникающие преимущественно в околоунозных областях.

2. Третий тип пульсаций — это волны очень низкой частоты (ОНЧ 0.001–0.023 Гц) и низкой частоты (НЧ 0.023–0.73 Гц).

Результатом данного исследования стало понимание, что кардиогенные пульсации, связанные с зубцом R сердечного цикла, приводят к движению жидкости в периартериальных пространствах, в то время как колебания, вызванные дыхательным циклом, приводят к перивенозным потокам. Во время вдоха внутригрудное давление становится отрицательным, уменьшая объем крови в венах головного мозга, что, как предполагается, повышает ПВП. Выдох вызывает обратный эффект: он повышает внутригрудное давление, увеличивает объем церебральной венозной крови и закрывает ПВП, выводя интерстициальную жидкость обратно в ликвор (Kiviniemi et al., 2015).

В исследовании (Yamada et al., 2013) была показана синхронизация ритма работы сердца и дыхания с движением спинномозговой жидкости по данным MPT-диагностики с использованием метода Time-SLIP, при которой краниальное движение ликвора отмечается во время глубокого вдоха, а каудальное — во время выдоха, что визуально подтверждает принцип Монро—Келли.

Помимо различных пульсаций на работу глимфатической системы влияют также нейромедиаторы. Норадреналин является ключевым регулятором глимфатической активности, и именно он ответственен за подавление глимфатической активности во время бодрствования. Реализация эффектов норадреналина осуществляется через астроциты (O'Donnell et al., 2012), которые экспрессируют α_1 -, α_2 - и β_1 -адренергические рецепторы, поэтому норадреналин можно рассматривать как усилитель функций астроцитов, а его высвобождение приводит к уменьшению интерстициального пространства и увеличению сопротивления обмену ликвора и интерстициальной жидкости, подавлению глимфатических потоков во время бодрствования (Plog, Nedergaard 2018). Еще одним механизмом влияния норадреналина на глимфатическую систему является то, что норадреналин подавляет выработку ликвора сосудистыми сплетениями. Также норадреналин может вызывать застой в глимфатической системе посредством активации микроглии (Sugama, Kakinuma, 2021). Местное применение коктейля антагонистов рецепторов норадреналина у бодрствующих мышей приводило к увеличению притока индикаторов ликвора, почти сопоставимому с тем, что наблюдалось во время сна или анестезии (Plog, Nedergaard, 2018).

Во время сна уровень норадреналина снижается (из-за уменьшения норадренергического тонуса, обусловленного *locus coeruleus*), что приводит к расширению внеклеточного пространства, снижению резистентности и, следовательно, увеличению притока ликвора и оттока интерстициальной жидкости. Таким образом, естественный сон связан с улучшением микроциркуляции в ПВП и повышенным клиренсом интерстициальных растворенных веществ, в том числе таких как бета-амилоид (Plog, Nedergaard, 2018; Reddy, van der Werf, 2020). Также было показано, что развитие болезни Альцгеймера связано с развитием патологических изменений в *locus coeruleus* (LC), основном источнике норадреналина (NA) в головном мозге (Lancini et al., 2023).

Несмотря на полученные данные, были необходимы дополнительные исследования, чтобы полностью описать роль, которую эти физиологические переменные играют в циркуляции глимфатической системы, однако это стало основой для понимания того, как нарушение функционирования глимфатической системы может способствовать риску развития нейродегенеративных заболеваний (Rasmussen et al., 2018).

НАРУШЕНИЕ КЛИРЕНСА ИЗ ЦНС ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ И НАРУШЕНИИ СНА

По данным Nedergaard M. (Nedergaard, Goldman, 2016), практически сразу после открытия глимфатической системы ученых заинтересовал вопрос, могут ли белки, которые накапливаются в мозге при нейродегенеративных заболеваниях, успешно вымываться в общий кровоток вместе с другими метаболитами. Было обнаружено, что в здоровом мозге бета-амилоид, а также синуклеиновые белки успешно выводятся глимфатической системой. В норме А β обычно существует в форме растворимого секретируемого пептида, который образуется в результате протеолитического расщепления белка-предшественника амилоида (Boespflug, Iliff, 2018). Согласно исследованию Bateman R.J. (Bateman et al., 2006), у здоровых молодых людей 8.3% общего β -амилоида свободно выводится через спинномозговую жидкость каждый час, т.е. в среднем весь β -амилоид в норме должен выводиться из головного мозга полностью примерно за 12 ч.

При этом необходимо отметить, что существуют различные механизмы клиренса амилоида из головного мозга, которые не сводятся исключительно к функционированию лимфатической системы, (van der Thiel et al., 2022), а именно:

1. Система удаления Аβ с участием периваскулярных пространств.
2. Трансваскулярный клиренс Аβ через кровь.
3. ферментативная деградация Аβ.

Однако, если бета-амилоид меняет конфигурацию, он становится нерастворимым и агрегирует во внеклеточном пространстве в олигомеры и амилоидные бляшки (Verghese et al., 2022). Таким образом, формируется петля положительной обратной связи, при которой плохой сон способствует отложению амилоида, а образование амилоидных бляшек нарушает сон, воздействуя на области мозга, способствующие сну (Ju et al., 2014).

Поскольку выведение бета-амилоида максимально во время сна, были проведены исследования функционирования мозга во сне, в т.ч. изучение медленной осцилляторной нейронной активности — явления, когда большие группы нейронов координируют свою электрическую активность, ритмично деполяризуясь. Согласно распространенной гипотезе, медленный сон (сон стадии N3) выполняет множество функций, включая обучение, память и выведение метаболитов. Согласно исследованию Fultz N.E. (Fultz et al., 2019), было обнаружено, что во время сна медленная осциллирующая активность предшествует сопряженным волнам потока крови и спинномозговой жидкости в головном мозге, поэтому вполне закономерно, что (Reddy, van der Werf, 2020) лимфатический клиренс в основном происходит при медленном сне, для которого характерны высоковольтные синхронизированные волны на ЭЭГ. Медленные волны обычно лежат в диапазоне от 0.5 до 4.5 Гц на ЭЭГ. Эти пульсации варьируют от 20 до 30 с и отражают важное физиологическое восстановление мозга и насыщение крови кислородом, точно совпадая со временем, ритмом и электрической активностью стадии N3, подтверждая, что лимфатическая система очищения головного мозга от отходов в основном активна во время медленного сна. Во время медленной фазы сна нейроны демонстрируют синхронную активность и бездействие, которые (Semyachkina-Glushkovskaya, Postnov et al., 2020), периодически сменяя друг друга, способствуют усилению циркуляции мозговых жидкостей и, по образно-

му выражению Semyachkina-Glushkovskaya O., приводят к т.н. “промыванию мозга” подобно тому, как морские волны перемещают (и перемешивают? — прим. авт.) соль и воду. Также высказано предположение, что параметры ЭЭГ могут отражать характер функционирования дренажа головного мозга (Semyachkina-Glushkovskaya, Karavaev et al., 2022), причем связь параметров ЭЭГ и сна может быть использована не только как диагностическая, но и как терапевтическая технология (Lee, Gerashchenko et al., 2020).

Высказана гипотеза о взаимосвязи продукции бета-амилоида в зависимости от режима сна и бодрствования. Так, возбуждение нейронов и синаптическая активность в процессе интенсивной деятельности во время бодрствования высвобождает Аβ, что приводит к увеличению концентрации Аβ в интерстициальной жидкости. Если качество сна низкое и человек бодрствует, или спит плохо и не может достичь и поддерживать фазу медленного сна, то длительность, в течение которого корковые нейроны будут деполяризоваться, вероятно, будет увеличена по сравнению с периодом сна хорошего качества. Это увеличение возбуждения нейронов во время некачественного сна приведет к большему высвобождению Аβ и более высоким уровням Аβ в интерстициальной жидкости по сравнению с тем, что происходит во время полноценного сна (Boespflug, Iliff, 2017; Verghese et al., 2022; Ju et al., 2014; Insel et al., 2021), что будет способствовать его накоплению и последующему отложению в виде амилоидных бляшек, поскольку, по данным Tarasoff-Conway J.M. (Tarasoff-Conway et al., 2015), избыточная агрегация Аβ является результатом дисбаланса между его образованием и клиренсом. Keable A. (Keable et al., 2016) была показана прямая связь между лимфатической дисфункцией, развитием церебральной амилоидной ангиопатии и старением:

1. Периваскулярный лимфодренаж ухудшается с возрастом и по мере развития атеросклероза сосудов головного мозга.
2. Нарушение периваскулярного дренажа связано с возрастным уплотнением стенок артерий и изменениями базальных мембран сосудов.
3. Бета-амилоид откладывается в периваскулярных дренажных путях лептоменингеальных артерий в виде церебральной амилоидной ангиопатии.

4. Улучшение периваскулярного дренажа способно предотвратить раннее развитие церебральной амилоидной ангиопатии и замедлить развитие болезни Альцгеймера.

За десятилетие исследований было накоплено много фактов о связи глимфатической дисфункции, сна, старения и нейродегенерации.

В исследовании Peng W. (Peng et al., 2016) с введением мышам флуоресцентно меченого бета-амилоида было достоверно показано угнетение глимфатической системы, а глимфатическая недостаточность была признана ранним достоверным маркером болезни Альцгеймера.

В исследованиях Eide P.K., Shokri-Kojori E. (Eide et al., 2021; Shokri-Kojori et al., 2018) была показана связь между депривацией сна и ухудшением глимфатического клиренса, а в исследовании Del Brutto O.H. (Del Brutto et al., 2018) показана связь нарушения сна с расширением периваскулярных пространств. По данным Xu Z., Rainey-Smith S.R., Silva I. показана связь между накоплением бета-амилоида и дисфункцией AQP4 (Xu et al., 2015, Rainey-Smith et al., 2018, Silva et al., 2021) и связь между болезнью Альцгеймера и аполипопротеином E4 (Liao et al., 2017). В публикациях Zhang Y., Berezuk C. была установлена зависимость между нарушениями сна, болезнью Альцгеймера и увеличением ПВП, по данным полисомнографии (Zhang et al. 2022; Berezuk et al., 2015) либо актиграфии (Winer et al., 2021).

Интересным представляется также исследование Hablitz L.M. (Hablitz et al., 2021) о том, что циркуляция ликвора находится под циркадианным контролем и что этот ритм поддерживается аквапином-4.

По данным Cordone S. (Cordone et al., 2019, 2021), такие нарушения сна, как фрагментация сна со снижением медленноволнового сна, ухудшение качества сна, инсомния, диагностируются уже на ранней стадии болезни Альцгеймера примерно у 60% пациентов и сохраняются на всех стадиях развития данной патологии, усугубляясь по мере ее прогрессирования.

В исследовании Ju Y.E. было показано, что лишение сна увеличивает концентрацию растворимого Аβ и приводит к его хроническому накоплению. В свою очередь, как только Аβ накапливается, развивается повышенное бодрствование и измененный режим сна. Люди с ранним отложением Аβ сообщают об аномалиях сна при еще

сохраненной когнитивной функции. Изменения во сне предшествуют появлению когнитивных симптомов у пациентов с болезнью Альцгеймера, а качество сна и/или циркадианная функция снижаются дальше параллельно как с когнитивной дисфункцией, так и с прогрессированием болезни Альцгеймера. Причем доклиническая стадия болезни Альцгеймера проявляется за 10–15 лет до начала развития симптоматической (Ju et al., 2014). Boespflug было показано, что старение, нарушение сна и глимфатического клиренса могут представлять собой цикл прямой связи, способствующий отложению бляшек Аβ в стареющем мозге (Boespflug, Iliff, 2017).

Все это позволило Ju Y.E., Mander B.A., Wang C. (Ju et al., 2014; Mander et al., 2015, 2016, 2020; Wang, Holtzman 2020) установить наличие двусторонней связи для нарушений сна и болезни Альцгеймера, когда инсомния является не только симптомом, но и информативным ранним маркером болезни Альцгеймера.

В свою очередь, Lynch M. (Lynch et al., 2022) было высказано предположение, что увеличение ПВП за счет снижения глимфатического клиренса и накопления в данных ПВП бета-амилоида и белка тау также является индикатором прогрессирования болезни Альцгеймера, что может быть использовано в качестве второго раннего диагностического маркера данного заболевания.

Необходимо отметить, что поиски диагностических маркеров болезни Альцгеймера предпринимались ранее (Parnetti et al., 2019). Так, согласно работам Jack C.R. (Jack et al., 2010, 2016, 2018), были предложены биомаркеры развития болезни Альцгеймера, исследования которых показали, что у лиц с аномальными амилоидными биомаркерами наблюдается более быстрое прогрессирование когнитивных нарушений, чем у лиц без биомаркеров. Данные биомаркеры были систематизированы в виде схемы ATN, где А – это агрегированный бета-амилоид, Т – агрегированный тау-белок, N – показатели нейродегенерации.

Данный подход позволил Dubois B. (Dubois et al., 2016) рассматривать болезнь Альцгеймера как континуум, в котором раннее выявление диагностических биомаркеров в доклинической стадии позволяет осуществлять раннее терапевтическое вмешательство с максимальными шансами на успех, поскольку наилучшим временным окном для того, чтобы терапевтическое средство было эффективным в замедлении или остановке прогрессирования болезни Альцгей-

мера, вероятно, является доклиническая стадия. Поскольку в дебюте болезнь Альцгеймера протекает без когнитивных нарушений, то качество сна и его нарушение, а также увеличение периваскулярных пространств потенциально могут быть использованы в качестве ранних биомаркеров у пациентов с доклинической стадией болезни Альцгеймера.

Однако проблема агрегации и отложения в тканях головного мозга “неправильных” белков не сводится только к бета-амилоиду и болезни Альцгеймера и является фактором, общим для нескольких нейродегенеративных заболеваний, включая, помимо болезни Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (БАС), болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона и хроническую травматическую энцефалопатию (ХТЭ) (Frost, Diamond, 2010), что, наряду с разными механизмами патогенеза заболеваний, делает данную проблему более сложной.

НАРУШЕНИЕ СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ЦЕЛОСТНОСТИ ПЕРИВАСКУЛЯРНЫХ ПРОСТРАНСТВ (ПРОСТРАНСТВ ВИРХОВА–РОБИНА)

Согласно мнению Troili F. (Troili et al., 2020), большинство неврологических расстройств имеют гетерогенный патогенез с различным и перекрывающимся вкладом нейрональных, иммунных и сосудистых механизмов повреждения головного мозга. Периваскулярное пространство (пространство Вирхова–Робина) в головном мозге представляет собой ключевой анатомический компонент лимфатической системы и одновременно своеобразный перекресток, где эти механизмы интенсивно взаимодействуют.

По данным Yu X., Soto-Rojas L.O. (Yu et al., 2020; Soto-Rojas et al., 2021), ключевым патофизиологическим явлением при развитии болезни Альцгеймера является нарушение регуляции нейро(пери)васкулярной единицы (НВЕ) и ГЭБ, причем данная связь является двунаправленной — как дисфункция НВЕ/ГЭБ может вызывать отложение патологического белка, так и отложение белка вызывает изменение функционирования НВЕ/ГЭБ.

В физиологических условиях клетки микроглии находятся в “состоянии покоя”, а при патологии переходят в “активированное состояние”, связанное с фагоцитарной активностью и высвобождением провоспалительных цитокинов (Soto-Rojas et al., 2021; Edler et al., 2021; Arcuri et al., 2017; Heneka et al., 2015). Накопление вне-

клеточного бета-амилоида индуцирует активацию астроцитов и микроглии с последующим высвобождением медиаторов воспаления, которые способствуют дальнейшему прогрессированию заболевания.

В публикации Postnov D. (Postnov et al., 2023) также убедительно показано, что астроциты активно участвуют в регуляции функционирования нейронов головного мозга, в том числе за счет аденозина как нейротрансмиттера, когда выделение АТФ астроцитами и воздействие аденозина на рецепторы A1 приводит к изменению скорости синаптической передачи. В контексте функционирования астроцитов и нейронов в рамках нейроваскулярной единицы важно также упомянуть концепцию трехстороннего синапса, согласно которой тонкие отростки астроцитов, плотно охватывающие синапс, перехватывают вытекающий из синаптической щели нейромедиатор глутамат и поддерживают рециркуляцию глутамата и ГАМК посредством циклов глутамат/ГАМК-глутамин и таким образом контролируют уровень нейрональной активности и реагируют на нее (Newman 2003; Lee, Gerashchenko et al., 2020) путем регуляции синаптической передачи через астроцитарную кальциевую сигнализацию.

По данным Meraz-Ríos M.A. (Meraz-Ríos et al., 2013), активированная микроглия стимулирует нейроны к повышенному производству бета-амилоида, а дисфункция астроцитов при прогрессировании болезни Альцгеймера, в свою очередь, усугубляет внеклеточное и сосудистое накопление бета-амилоида за счет нарушения клиренса интерстициальной жидкости при дисфункции лимфатической системы, причем активация астроцитов модулируется астроцитарным AQP4, белком, который играет ключевую роль в лимфатическом клиренсе. Таким образом, патогенез болезни Альцгеймера связан не только с механической задержкой выведения бета-амилоида из тканей головного мозга, но и с иммунологическими механизмами реактивного астроглиоза и микроглиальной активации (Soto-Rojas et al., 2022; Rodríguez-Giraldo et al., 2022).

Помимо астроцитарной и нейронной дисфункции, в патогенезе болезни Альцгеймера играет роль дисфункция и других компонентов нейроваскулярной единицы — перицитов и клеток эндотелия. Взаимодействие между Аβ и рецепторами перицитов запускает высвобождение эндотелина-1 из перицитов, что приводит к сокращению перицитов и последующему сужению капилляров (Alcendor, 2020). Нарушение мик-

роциркуляции может вызвать дисфункцию нейронов, способствуя анаэробному метаболизму мозга и снижению выработки АТФ, что в свою очередь приводит к нейрональной эксайтотоксичности и последующей гибели нейронов (Shabir et al., 2018). Все это подтверждает тесную связь между глимфатическими, сосудистыми и иммуноопосредованными механизмами повреждения головного мозга.

Вторым доказательством связи глимфатической и иммунной систем является то, что, по данным Kirpnis J. (Kirpnis, 2016), глимфатическая система как периваскулярно-лимфатический путь представляет собой основной путь дренирования антигенов из головного мозга в шейные лимфатические узлы, а Т-клетки иммунной системы способны проникать в дренированные ликвором субарахноидальное и периваскулярное пространства. Данный факт был подтвержден иммуногистохимическими методами в исследовании Mezey É. с использованием антител LYVE1 и PDPN для визуализации лимфатических маркер-положительных клеток, по результатам которого в периваскулярных пространствах головного мозга были обнаружены Т-лимфоциты, а также показана их связь с периферическими лимфатическими сосудами полости носа, зрительного нерва и основания черепа (Mezey et al., 2021).

Следовательно, иммунный надзор за ЦНС ограничен пространствами, в которых циркулирует ликвор, к которым относится и пространство Вирхова—Робина, что, по образному выражению Engelhardt B. (Engelhardt et al., 2011, 2016), напоминает замковый ров, ограниченный внешней и внутренней стенами и патрулируемый охранниками — периваскулярными антигенпрезентирующими клетками. Именно поэтому анатомическое нарушение целостности ПВП может быть опасным не только с метаболической и нейродегенеративной, но и с иммунологической точки зрения.

Третьим доказательством связи между нервной и иммунной системой в головном мозге (в том числе с участием ПВП), а также с психикой человека является феномен стресс-индуцированной нейроиммунномодуляции, который связан с выработкой глюкокортикоидов и норадреналина. Как уже было указано выше, норадреналин вырабатывается в основном в *locus coeruleus* (LC), высвобождается из синаптических окончаний аксонов и является ключевым нейромедиатором в модуляции клеток мик-

роглии, тем самым определяя различные клеточные состояния и реакции, начиная от состояния покоя и заканчивая состоянием активации, в зависимости от уровня стресса или от того, бодрствует организм или спит (Sugama, Kakinuma 2020).

Таким образом, патологическое взаимодействие между нейронными, иммунными и сосудистыми факторами может создавать сложные механизмы повреждения головного мозга, но роль периваскулярного пространства и глимфатической системы в их развитии на начальном этапе может оказаться общей, а лечебное воздействие — наиболее эффективным. Тем не менее, несмотря на приведенные данные, необходимы дополнительные инструментальные исследования, чтобы полностью описать и подтвердить патологию глимфатической системы.

МРТ-ДИАГНОСТИКА ПАТОЛОГИИ ПЕРИВАСКУЛЯРНЫХ ПРОСТРАНСТВ И ГЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Несмотря на то, что ряд фундаментальных данных о механизмах функционирования глимфатической системы был получен с использованием МРТ-контрастных исследований с введением гадолиния, в работе Provenzano D.A. (Provenzano, Pellis et al., 2019) был описан клинический случай фатальной гадолиний-индуцированной энцефалопатии после интратекального введения препарата с последующей смертью исследуемого, что делает данный метод потенциально опасным для широкого применения, тогда как неинвазивный метод диффузно-тензорной МРТ (DTI-ALPS) (Taoka et al., 2017; Harrison et al., 2018), позволяющий оценивать диффузию жидкости по периваскулярному пространству, недостаточно внедрен в практику. Это вынуждает оценивать глимфатическую дисфункцию по косвенным данным, к которым можно отнести изменения периваскулярных пространств (Вирхова—Робина) по результатам бесконтрастных МРТ-исследований головного мозга человека, что вызвано в первую очередь требованиями безопасности исследований.

Расширение периваскулярного пространства, ранее считавшееся доброкачественным нейрорадиологическим признаком или артефактом фиксации тканей, становится клинически значимым, поскольку увеличение размеров ПВП связано с заболеванием мелких сосудов головного мозга и церебральной амилоидной ангиопатией и болезнью Альцгеймера (Boespflug et al., 2017, 2018).

Интерес к ПВП в качестве диагностического маркера заболеваний нервной системы также связан с тем, что по мере увеличения напряженности поля МРТ (Barisano et al., 2020), используемого для диагностики, периваскулярные пространства также стали более легко распознаваемыми на МРТ-снимках, чем десятилетие назад. Небольшое количество ПВП по данным МРТ-диагностики встречается во всех возрастных группах, но с возрастом ПВП выявляются чаще и имеют большие размеры (Kwee, Kwee, 2007). Увеличение пространств Вирхова—Робина происходит в результате застоя жидкости вследствие лимфатической дисфункции, когда поток ликвора через ПВП недостаточен, в результате чего ПВП расширяются и становятся видимыми на МРТ. Хотя увеличение ПВП является признаком старения, распространенность увеличенных ПВП возрастает при нейродегенеративных процессах. Поскольку неврологические (нейродегенеративные) заболевания часто требуют проведения МРТ головного мозга, как части клинического обследования с целью подтверждения диагноза, метод оценки расширения ПВП стал достаточно доступен в клинических условиях.

Золотым стандартом диагностики патологии периваскулярных пространств остается прямой подсчет ПВП, однако в связи с трудоемкостью этого процесса были разработаны визуальные оценочные шкалы, основной из которых является шкала Wardlaw J.M. STRIVE (Wardlaw et al., 2013), включающая ручной подсчет ПВП на срезах полуовального окна, базальных ганглиев и среднего мозга по данным МРТ-диагностики. Согласно данному исследованию, ПВП описываются как заполненные жидкостью пространства, которые следуют по ходу соответствующего сосуда, имеют интенсивность сигнала, аналогичную интерстициальной жидкости на всех последовательностях, диаметром обычно менее 3 мм. При высоком разрешении в центре ПВП иногда можно увидеть центральный сосуд, который может отличать эти пространства от лакун. Также в отличие от лакун, диаметр ПВП обычно не превышает 3 мм и пространства не имеют T2-гиперинтенсивного края вокруг заполненного жидкостью пространства на T2-взвешенных изображениях или изображениях FLAIR.

Минимально допустимое МРТ-обследование должно включать, по мнению Wardlaw J.M., аксиально-диффузионно-взвешенную визуализацию, карту коэффициента диффузии, FLAIR, T2-взвешенную и T2*-взвешенную GRE- или

T1-взвешенную визуализацию с предпочтительным использованием МРТ с напряженностью поля 3.0 Тл (Wardlaw et al., 2013).

В исследовании Banerjee G. (Banerjee et al., 2017) продемонстрировано, что увеличение ПВП по данным МРТ-диагностики в режимах T1/2/2* МРТ и FLAIR является ранним нейровизуализирующим маркером заболеваний головного мозга, причем локализация ПВП в полуовальном центре связана с церебральной амилоидной ангиопатией, тогда как локализация в базальных ганглиях ассоциирована с артериосклерозом глубоких перфорантных артерий. Данное исследование позволяет расценивать наличие увеличенных ПВП в полуовальном центре в качестве визуализирующего маркера болезни Альцгеймера.

Согласно мнению Rowsthorn E., для более полной оценки лимфатической функции предлагается оценивать при МРТ-диагностике не только периваскулярные пространства, но и ряд других показателей, которые группируются в два кластера:

1. Кластеры, связанные с “сосудистой” дисфункцией.
2. Кластеры, связанные с дисфункцией транспорта жидкостей.

Данное исследование дополнительно подтверждает взаимосвязь периваскулярных пространств и лимфатической дисфункции, причем обращает на себя внимание то, что периваскулярные пространства базальных ганглиев присутствуют как в “сосудистом” кластере как маркер нозологий (Banerjee et al., 2017), так и в “жидкостном”, где их увеличение вызвано нарушением дренажа (Rowsthorn et al., 2023).

По данным обзора Gędek A. (Gędek et al., 2023), была показана связь между объемом ПВП и продолжительностью сна у пациентов с цереброваскулярными заболеваниями, с использованием полисомнографии и 3D-МРТ, где общий объем ПВП и объем ПВП базальных ганглиев отрицательно коррелировали с продолжительностью эффективного сна (время сна, разделенное на время, проведенное в постели) и с продолжительностью фазы сна N3, что свидетельствует о том, что более короткое время сна связано с неэффективным дренажом мозга, что может привести к расширению ПВП (Gędek et al., 2023).

Таблица 1. Кластеры глимфатической дисфункции
Table 1. Clusters of glymphatic dysfunction

“Сосудистый” кластер	“Жидкостный” кластер
проницаемость ГЭБ	увеличенные ПВП
перфузия	свободная вода
ПВП базальных ганглиев	гиперинтенсивность белого вещества (WMH, white matter hyperintensities)

Поскольку визуальная оценка изображений МРТ — это весьма трудозатратный и длительный процесс, рядом исследователей было разработано большое количество автоматизированных алгоритмов для повышения надежности измерения ПВП и его полезности в качестве биомаркера для глимфатической системы, таких как исследование Voesspflug E.L. (Voesspflug et al., 2017, 2018), согласно которому автоматизированная оценка морфологических особенностей расширенных ПВП может быть успешно достигнута с помощью МР-визуализации с напряженностью поля 3.0 Т, причем увеличенные ПВП, идентифицированные с помощью автоматизированного метода, достоверно коррелируют с эталонными стандартными оценочными шкалами.

ВЫВОДЫ

За десять лет с момента повторного открытия глимфатической системы было проведено много исследований, которые доказали ее роль в развитии заболеваний нервной системы, однако данные знания еще не вполне нашли практическое применение. Одним из ранних неспецифических симптомов глимфатической дисфункции является нарушение сна, а частым спутником — расширение периваскулярных пространств (Вирхова—Робина) как анатомической основы глимфатической дисфункции. Представляется перспективным рассмотреть их одновременно и как симптомы, и как возможные ранние предикторы развития нейродегенеративных заболеваний с перспективой ранней диагностики, профилактики и лечения, начиная с доклинического этапа.

В связи с этим, помимо существующих биомаркеров нейродегенерации, данный перечень целесообразно расширить, дополнив его показателями ранней (возможно, донозологической) диагностики болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний:

- Наличие инсомнии по данным сбора анамнеза и тестирования пациента с использованием стандартных шкал и опросников.

- Наличие/локализация/количество увеличенных периваскулярных пространств (Вирхова—Робина) по данным МРТ головного мозга.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ КАЖДОГО АВТОРА

А.В. Горбачевский - поиск аналитических материалов в отечественных и зарубежных источниках, проведение анализа и подготовка первоначальных выводов, подготовка литературного обзора, подготовка текста статьи. О.А. Кичерова - научное руководство, проведение критического анализа материалов и формирование выводов, подготовка текста статьи, осуществление критического анализа и доработка текста, совместное осуществление анализа научной литературы по проблеме исследования, решение организационных вопросов по подготовке текста. Л.И. Рейхерт - осуществление критического анализа и доработка текста, совместное осуществление анализа научной литературы по проблеме исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящий обзор не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

УКАЗАНИЕ НА ДОСТУПНОСТЬ ПЕРВИЧНЫХ ДАННЫХ

Первичными данными являются научные обзоры и статьи, доступные в базах данных PubMed и E-library.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Семячкина-Глушковская О.В., Постнов Д.Э., Хороводов А.П., Наволокин Н.А., Куртц Ю.Г.Г. Лимфодренажная система мозга: новый игрок в нейронауке. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2023. 59 (1): 3—19.
<https://doi.org/10.31857/S0044452923010084>

- Николенко В.Н., Оганесян М.В., Яхно Н.Н., Орлов Е.А., Порубаева Е.Е., Попова Е.Ю. Глимфатическая система головного мозга: физиологическая анатомия и клинические перспективы. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2018. 10 (4): 94–100. <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2018-4-94-100>
- Alcendor D.J. Interactions between Amyloid-B Proteins and Human Brain Pericytes: Implications for the Pathobiology of Alzheimer's Disease. J Clin Med. 2020 May 15. 9 (5): 1490. <https://doi.org/10.3390/jcm9051490>
- Arcuri C., Mecca C., Bianchi R., Giambanco I., Donato R. The Pathophysiological Role of Microglia in Dynamic Surveillance, Phagocytosis and Structural Remodeling of the Developing CNS. Front Mol Neurosci. 2017 Jun 19; 10: 191. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00191>
- Banerjee G., Kim H.J., Fox Z., Jäger H., Wilson D., Charidimou A. et al. MRI-visible perivascular space location is associated with Alzheimer's disease independently of amyloid burden. Brain. 2017 Apr 1; 140 (4): 1107–1116. <https://doi.org/10.1093/brain/awx003>
- Barisano G., Sheikh-Bahaei N., Law M., Toga A.W., Sepehrband F. Body mass index, time of day and genetics affect perivascular spaces in the white matter. J Cereb Blood Flow Metab. 2021 Jul; 41 (7): 1563–1578. <https://doi.org/10.1177/0271678X20972856>
- Barisano G., Law M., Custer R.M., Toga A.W., Sepehrband F. Perivascular Space Imaging at Ultrahigh Field MR Imaging. Magn Reson Imaging Clin N Am. 2021 Feb; 29 (1): 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.mric.2020.09.005>
- Bateman R.J., Munsell L.Y., Morris J.C., Swarm R., Yarasheski K.E., Holtzman D.M. Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. Nat Med. 2006 Jul; 12 (7): 856–861. <https://doi.org/10.1038/nm1438>
- Berezuk C., Ramirez J., Gao F., Scott C.J., Huroy M., Swartz R.H., Murray B.J., Black S.E., Boulous M.I. Virchow-Robin Spaces: Correlations with Polysomnography-Derived Sleep Parameters. Sleep. 2015 Jun 1; 38 (6): 853–858. <https://doi.org/10.5665/sleep.4726>
- Boespflug E.L., Iliff J.J. The Emerging Relationship Between Interstitial Fluid-Cerebrospinal Fluid Exchange, Amyloid- β , and Sleep. Biol Psychiatry. 2018 Feb 15; 83 (4): 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.11.031>
- Boespflug E.L., Schwartz D.L., Lahna D., Pollock J., Iliff J.J., Kaye J.A., et al. MR Imaging-based Multimodal Autoidentification of Perivascular Spaces (mMAPS): Automated Morphologic Segmentation of Enlarged Perivascular Spaces at Clinical Field Strength. Radiology. 2018 Feb; 286 (2): 632–642. <https://doi.org/10.1148/radiol.2017170205>
- Boespflug E.L., Simon M.J., Leonard E., Grafe M., Woltjer R., Silbert L.C. et al. Targeted Assessment of Enlargement of the Perivascular Space in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia Subtypes Implicates Astroglial Involvement Specific to Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. 2018; 66 (4): 1587–1597. <https://doi.org/10.3233/JAD-180367>
- Buccellato F.R., D'Anca M., Serpente M., Arighi A., Galimberti D. The Role of Glymphatic System in Alzheimer's and Parkinson's Disease Pathogenesis. Biomedicines. 2022 Sep 13; 10 (9): 2261. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092261>
- Cordone S., Scarpelli S., Alfonsi V., De Gennaro L., Gorgoni M. Sleep-Based Interventions in Alzheimer's Disease: Promising Approaches from Prevention to Treatment along the Disease Trajectory. Pharmaceuticals (Basel). 2021 Apr 19; 14 (4): 383. <https://doi.org/10.3390/ph14040383>
- Cordone S., Annarumma L., Rossini P.M., De Gennaro L. Sleep and β -Amyloid Deposition in Alzheimer Disease: Insights on Mechanisms and Possible Innovative Treatments. Front Pharmacol. 2019 Jun 20; 10: 695. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00695>
- Del Brutto O.H., Mera R.M., Del Brutto V.J., Castillo P.R. Enlarged basal ganglia perivascular spaces and sleep parameters. A population-based study. Clin Neurol Neurosurg. 2019; 182:53–57. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2019.05.002>. Epub 2019 May 6. PMID: 31078956.
- Dubois B., Hampel H., Feldman H.H., Scheltens P., Aisen P., Andrieu S. et al. Proceedings of the Meeting of the International Working Group (IWG) and the American Alzheimer's Association on "The Preclinical State of AD"; July 23, 2015; Washington DC, USA. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. Alzheimers Dement. 2016
- Elder M.K., Mhatre-Winters I., Richardson J.R. Microglia in Aging and Alzheimer's Disease: A Comparative Species Review. Cells. 2021 May 8; 10 (5): 1138. <https://doi.org/10.3390/cells10051138>
- Eide P.K., Vinje V., Pripp A.H., Mardal K.A., Ringstad G. Sleep deprivation impairs molecular clearance from the human brain. Brain. 2021 Apr 12; 144 (3): 863–874. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa443>
- Engelhardt B., Coisne C. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. Fluids Barriers CNS. 2011 Jan 18; 8 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-8-4>
- Engelhardt B., Carare R.O., Bechmann I., Flügel A., Laman J.D., Weller R.O. Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. Acta Neuropathol. 2016 Sep; 132 (3): 317–338. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1606-5>
- Frost B., Diamond M.I. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. Nat Rev Neurosci. 2010 Mar; 11 (3): 155–159. <https://doi.org/10.1038/nrn2786>

- Fultz N.E., Bonmassar G., Setsompop K., Stickgold R.A., Rosen B.R., Polimeni J.R., Lewis L.D. Coupled electrophysiological, hemodynamic, and cerebrospinal fluid oscillations in human sleep. *Science*. 2019. Nov 1; 366 (6465): 628–631.
<https://doi.org/10.1126/science.aax5440>.
- Chang J.Guo B.Gao Y.Li .W.Tong X.Feng Y.Abumaria N. Characteristic Features of Deep Brain Lymphatic Vessels and Their Regulation by Chronic Stress. *Research (Wash D C)*. 2023 Apr 13; 6:0120.
<https://doi.org/10.34133/research.0120>.
- Gędek A., Koziorowski D., Szlufik S. Assessment of factors influencing glymphatic activity and implications for clinical medicine. *Front Neurol*. 2023 Sep 7; 14:1232304.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1232304>.
- Hablit L.M., Plá V., Giannetto M., Vinitsky H.S., Stæger F.F., Metcalfe T. et al. Circadian control of brain glymphatic and lymphatic fluid flow. *Nat Commun*. 2020 Sep 2; 11 (1): 4411.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18115-2>.
- Harrison I.F., Siow B., Akilo A.B., Evans P.G., Ismail O., Ohene Y. et al. Non-invasive imaging of CSF-mediated brain clearance pathways via assessment of perivascular fluid movement with diffusion tensor MRI. *Elife*. 2018 Jul 31; 7:e34028.
<https://doi.org/10.7554/eLife.34028>.
- Heneka M.T., Carson M.J., El .Khoury J., Landreth G.E., Brosseron F., Feinstein D.L., et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2015 Apr; 14 (4): 388–405.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5).
- Hladky S.B., Barrand M.A. The glymphatic hypothesis: the theory and the evidence. *Fluids Barriers CNS*. 2022 Feb 3; 19 (1): 9.
<https://doi.org/10.1186/s12987-021-00282-z>.
- Hughes T.M., Kuller L.H., Barinas-Mitchell E.J., Mackey R.H., McDade E.M. et al. Pulse wave velocity is associated with β -amyloid deposition in the brains of very elderly adults. *Neurology*. 2013 Nov 5; 81 (19): 1711–1718.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000435301.64776.37>.
- Iliff J.J., Wang M., Liao Y., Plogg B.A., Peng W., Gundersen G.A., et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med*. 2012 Aug 15; 4 (147): 147ra111.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>.
- Iliff J.J., Lee H., Yu .M., Feng T., Logan J., Nedergaard M., Benveniste H. Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J Clin Invest*. 2013 Mar; 123 (3):1299–1309.
<https://doi.org/10.1172/JCI67677>.
- Insel P.S., Mohlenhoff B.S., Neylan T.C., Krystal A.D., Mackin R.S. Association of Sleep and β -Amyloid Pathology Among Older Cognitively Unimpaired Adults. *JAMA Netw Open*. 2021 Jul 1; 4 (7): e2117573.
<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.17573>.
- Jack C.R.Jr., Wiste H.J., Vemuri P., Weigand S.D., Senjem M.L., Zeng G. et al. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Brain beta-amyloid measures and magnetic resonance imaging atrophy both predict time-to-progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain*. 2010 Nov; 133 (11): 3336–48.
<https://doi.org/10.1093/brain/awq277>.
- Jack C.R.Jr., Bennett D.A., Blennow K., Carrillo M.C., Feldman H.H., Frisoni G.B. et al. A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology*. 2016 Aug 2; 87 (5): 539–547.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002923>.
- Jack C.R. Jr., Bennett D.A., Blennow K., Carrillo M.C., Dunn B., Haeblerlein S.B. et al. Contributors. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018 Apr; 14 (4): 535–562.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>.
- Jessen N.A., Munk A.S., Lundgaard I., Nedergaard M. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res*. 2015 Dec; 40 (12): 2583–2599.
<https://doi.org/10.1007/s11064-015-1581-6>.
- Johanson C.E., Duncan J.A. 3rd. Klinge P.M., Brinker T., Stopa E.G. Silverberg G.D. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2008 May 14; 5:10.
<https://doi.org/10.1186/1743-8454-5-10>.
- Johnston M., Zakharov A., Papaiconomou C., Salmasi G., Armstrong D. Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2004 Dec 10; 1 (1): 2.
<https://doi.org/10.1186/1743-8454-1-2>.
- Ju .Y.E., Lucey B.P., Holtzman D.M. Sleep and Alzheimer disease pathology—a bidirectional relationship. *Nat Rev Neurol*. 2014 Feb; 10 (2): 115–119.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.269>.
- Keable A., Fenna K., Yuen H.M., Johnston D.A., Smyth N.R., Smith C. et al. Deposition of amyloid β in the walls of human leptomeningeal arteries in relation to perivascular drainage pathways in cerebral amyloid angiopathy. *Biochim Biophys Acta*. 2016 May; 1862 (5): 1037–1046.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.08.024>.
- Kipnis J. Multifaceted interactions between adaptive immunity and the central nervous system. *Science*. 2016 Aug 19; 353 (6301): 766–71.
<https://doi.org/10.1126/science.aag2638>.
- Kiviniemi V., Wang X., Korhonen V., Keinänen T., Tuovinen T., Autio J., et al. Ultra-fast magnetic resonance encephalography of physiological brain activity – Glymphatic pulsation mechanisms? *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016 Jun; 36 (6): 1033–1045.
<https://doi.org/10.1177/0271678X15622047>.
- Kwee R.M., Kwee T.C. Virchow-Robin spaces at MR imaging. *Radiographics*. 2007 Jul-Aug; 27 (4):1071–86.
<https://doi.org/10.1148/rg.274065722>.
- Lancini E., Haag L., Bartl F., Rühling M., Ashton N.J., Zetterberg H. et al. Cerebrospinal fluid and positron-emission tomography biomarkers for noradrenergic

- dysfunction in neurodegenerative diseases: a systematic review and meta-analysis. *Brain Commun.* 2023 Mar 29; 5 (3): fcad085.
<https://doi.org/10.1093/braincomms/fcad085>.
- Lee Y.F., Gerashchenko D., Timofeev I., Bacskai B.J., Kastanenka K.V. Slow Wave Sleep Is a Promising Intervention Target for Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2020 Jun 30; 14: 705.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00705>.
- Liao F., Yoon H., Kim J. Apolipoprotein E metabolism and functions in brain and its role in Alzheimer's disease. *Curr Opin Lipidol.* 2017 Feb; 28 (1): 60–67.
<https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000383>.
- Lynch M., Pham W., Sinclair B., O'Brien T.J., Law M., Vivash L. Perivascular spaces as a potential biomarker of Alzheimer's disease. *Front Neurosci.* 2022 Oct 18; 16: 1021131.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1021131>.
- Mander B.A., Marks S.M., Vogel J.W., Rao V., Lu B., Saletin J.M. et al. β -amyloid disrupts human NREM slow waves and related hippocampus-dependent memory consolidation. *Nat Neurosci.* 2015 Jul; 18 (7): 1051–1057.
<https://doi.org/10.1038/nn.4035>.
- Mander B.A., Winer J.R., Jagust W.J., Walker M.P. Sleep: A Novel Mechanistic Pathway, Biomarker, and Treatment Target in the Pathology of Alzheimer's Disease? *Trends Neurosci.* 2016 Aug; 39 (8): 552–566.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.05.002>.
- Mander B.A. Local Sleep and Alzheimer's Disease Pathophysiology. *Front Neurosci.* 2020 Sep 23; 14: 525970.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.525970>.
- Meraz-Ríos M.A., Toral-Ríos D., Franco-Bocanegra D., Villeda-Hernández J., Campos-Peña V. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Front Integr Neurosci.* 2013 Aug 13; 7: 59.
<https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00059>.
- Mestre H., Kostrikov S., Mehta R.I., Nedergaard M. Perivascular spaces, glymphatic dysfunction, and small vessel disease. *Clin Sci (Lond).* 2017 Aug 10; 131 (17): 2257–2274.
<https://doi.org/10.1042/CS20160381>.
- Mezey É., Szalayova I., Hogden C.T., Brady A., Dósa Á., Sótónyi P., Palkovits M. An immunohistochemical study of lymphatic elements in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Jan 19; 118 (3): e2002574118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2002574118>.
- Naganawa S., Taoka T. The Glymphatic System: A Review of the Challenges in Visualizing its Structure and Function with MR Imaging. *Magn Reson Med Sci.* 2022 Mar 1; 21 (1): 182–194.
<https://doi.org/10.2463/mrms.rev.2020-0122>.
- Nedergaard M., Goldman S.A. BRAIN DRAIN. *Sci Am.* 2016 Mar; 314 (3): 44–49.
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0316-44>.
- Newman E.A. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 2003 Oct; 26 (10): 536–542.
[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00237-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00237-6).
- O'Donnell J., Zeppenfeld D., McConnell E., Pena S., Nedergaard M. Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem Res.* 2012 Nov; 37 (11): 2496–2512.
<https://doi.org/10.1007/s11064-012-0818-x>. Epub 2012 Jun 21.
- Okar S.V., Hu F., Shinohara R.T., Beck E.S., Reich D.S., Ineichen B.V. The etiology and evolution of magnetic resonance imaging-visible perivascular spaces: Systematic review and meta-analysis. *Front Neurosci.* 2023 Mar 30; 17: 1038011.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1038011>.
- Parnetti L., Chipi E., Salvadori N., D'Andrea K., Eusebi P. Prevalence and risk of progression of preclinical Alzheimer's disease stages: a systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Res Ther.* 2019 Jan 15; 11 (1): 7.
<https://doi.org/10.1186/s13195-018-0459-7>.
- Peng W., Achariyar T.M., Li B., Liao Y., Mestre H., Hitomi E., et al. Suppression of glymphatic fluid transport in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2016 Sep; 93: 215–225.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.05.015>.
- Plog B.A., Nedergaard M. The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annu Rev Pathol.* 2018 Jan 24; 13: 379–394.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-051217-111018>.
- Postnov D., Semyachkina-Glushkovskaya O., Litvinenko E., Kurths J., Penzel T. Mechanisms of Activation of Brain's Drainage during Sleep: The Nightlife of Astrocytes. *Cells.* 2023 Nov 20; 12 (22): 2667.
<https://doi.org/10.3390/cells12222667>.
- Provenzano D.A., Pellis Z., DeRiggi L. Fatal gadolinium-induced encephalopathy following accidental intrathecal administration: a case report and a comprehensive evidence-based review. *Reg Anesth Pain Med.* 2019 Apr 25: rapm-2019–100422.
<https://doi.org/10.1136/rapm-2019-100422>.
- Rainey-Smith S.R., Mazzucchelli G.N., Villemagne V.L., Brown B.M., Porter T., Weinborn M. et al. AIBL Research Group. Genetic variation in Aquaporin-4 moderates the relationship between sleep and brain A β -amyloid burden. *Transl Psychiatry.* 2018 Feb 26; 8 (1): 47.
<https://doi.org/10.1038/s41398-018-0094-x>.
- Rasmussen M.K., Mestre H., Nedergaard M. The glymphatic pathway in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2018 Nov; 17 (11): 1016–1024.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30318-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30318-1).
- Reddy O.C., van der Werf Y.D. The Sleeping Brain: Harnessing the Power of the Glymphatic System through Lifestyle Choices. *Brain Sci.* 2020 Nov 17; 10 (11): 868.
<https://doi.org/10.3390/brainsci10110868>.

- Robin C. Recherches sur quelques particularites de la structure des capillaires de l'encephale. *J. Physiol. Homme. Anim.* 1859. 2: 537–548.
- Rodríguez-Giraldo M., González-Reyes R.E., Ramírez-Guerrero S., Bonilla-Trilleras C.E., Guardo-Maya S., Nava-Mesa M.O. Astrocytes as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease-Comprehensive Review and Recent Developments. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 7; 23 (21): 13630. <https://doi.org/10.3390/ijms232113630>.
- Rowsthorn E., Pham W., Nazem-Zadeh M.R., Law M., Pase M.P., Harding I.H. Imaging the neurovascular unit in health and neurodegeneration: a scoping review of interdependencies between MRI measures. *Fluids Barriers CNS.* 2023 Dec 21; 20 (1): 97. <https://doi.org/10.1186/s12987-023-00499-0>.
- Semyachkina-Glushkovskaya O., Postnov D., Penzel T., Kurths J. Sleep as a Novel Biomarker and a Promising Therapeutic Target for Cerebral Small Vessel Disease: A Review Focusing on Alzheimer's Disease and the Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 31; 21 (17): 6293. <https://doi.org/10.3390/ijms21176293>.
- Semyachkina-Glushkovskaya O.V., Karavaev A.S., Prokhorov M.D., Runnova A.E., Borovkova E.I., Yu M.I. et al. EEG biomarkers of activation of the lymphatic drainage system of the brain during sleep and opening of the blood-brain barrier. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022 Dec 15; 21: 758–768. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.12.019>.
- Semyachkina-Glushkovskaya O., Fedosov I., Penzel T., Li D., Yu T., Telnova V. et al. Brain Waste Removal System and Sleep: Photobiomodulation as an Innovative Strategy for Night Therapy of Brain Diseases. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 6; 24 (4): 3221. <https://doi.org/10.3390/ijms24043221>.
- Shabir O., Berwick J., Francis S.E. Neurovascular dysfunction in vascular dementia, Alzheimer's and atherosclerosis. *BMC Neurosci.* 2018 Oct 17; 19 (1): 62. <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0465-5>.
- Shokri-Kojori E., Wang G.J., Wiers C.E., Demiral S.B., Guo M., Kim S.W. et al. β -Amyloid accumulation in the human brain after one night of sleep deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Apr 24; 115 (17): 4483–4488. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721694115>.
- Silva I., Silva J., Ferreira R., Trigo D. Glymphatic system, AQP4, and their implications in Alzheimer's disease. *Neurol Res Pract.* 2021 Jan 19; 3 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/s42466-021-00102-7>.
- Soto-Rojas L.O., Pacheco-Herrero M., Martínez-Gómez P.A., Campa-Córdoba B.B., Apátiga-Pérez R., Villegas-Rojas M.M., et al. The Neurovascular Unit Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 18; 22 (4): 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms22042022>.
- Sugama S., Kakinuma Y. Noradrenaline as a key neurotransmitter in modulating microglial activation in stress response. *Neurochem Int.* 2021 Feb; 143: 104943. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104943>.
- Taoka T., Masutani Y., Kawai H., Nakane T., Matsuoka K., Yasuno F. et al. Evaluation of glymphatic system activity with the diffusion MR technique: diffusion tensor image analysis along the perivascular space (DTI-ALPS) in Alzheimer's disease cases. *Jpn J Radiol.* 2017 Apr; 35 (4): 172–178. <https://doi.org/10.1007/s11604-017-0617-z>.
- Tarasoff-Conway J.M., Carare R.O., Osorio R.S., Glodzik L., Butler T., Fieremans E. et al. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2015 Aug; 11 (8): 457–70. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.119>.
- Troili F., Cipollini V., Moci M., Morena E., Palotai M., Rinaldi V. et al. Perivascular Unit: This Must Be the Place. The Anatomical Crossroad Between the Immune, Vascular and Nervous System. *Front Neuroanat.* 2020 Apr 16; 14: 17. <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00017>. Erratum in: *Front Neuroanat.* 2020 Sep 15; 14: 51.
- van der Thiel M.M., Backes W.H., Ramakers I.H.G.B., Jansen J.F.A. Novel developments in non-contrast enhanced MRI of the perivascular clearance system: What are the possibilities for Alzheimer's disease research? *Neurosci Biobehav Rev.* 2023 Jan; 144: 104999. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104999>.
- Verghese J.P., Terry A., de Natale E.R., Politis M. Research Evidence of the Role of the Glymphatic System and Its Potential Pharmacological Modulation in Neurodegenerative Diseases. *J Clin Med.* 2022 Nov 25; 11 (23): 6964. <https://doi.org/10.3390/jcm11236964>.
- Virchow R. Ueber die erweiterung kleinerer gefäße. *Virchows Archiv.* 1851. 3: 427–462.
- Voumavourakis K.I., Sideri E., Papadimitropoulos G.N., Tsantzali I., Hewlett P., Kitsos D. et al. The Dynamic Relationship between the Glymphatic System, Aging, Memory, and Sleep. *Biomedicines.* 2023 Jul 25; 11 (8): 2092. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082092>.
- Xie L., Kang H., Xu Q., Chen M.J., Liao Y., Thiagarajan M., et al. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science.* 2013 Oct 18; 342 (6156): 373–377. <https://doi.org/10.1126/science.1241224>.
- Xu Z., Xiao N., Chen Y., Huang H., Marshall C., Gao J. et al. Deletion of aquaporin-4 in APP/PS1 mice exacerbates brain A β accumulation and memory deficits. *Mol Neurodegener.* 2015 Nov 2; 10: 58. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0056-1>.
- Yu X., Ji C., Shao A. Neurovascular Unit Dysfunction and Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci.* 2020 Apr 29; 14: 334. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00334>.
- Wang C., Holtzman D.M. Bidirectional relationship between sleep and Alzheimer's disease: role of amyloid, tau, and other factors. *Neuropsychopharmacology.* 2020 Jan; 45 (1): 104–120. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0478-5>.

- Wardlaw J.M., Smith E.E., Biessels G.J., Cordonnier C., Fazekas F., Frayne R. *et al.* Standards for reporting vascular changes on neuroimaging (STRIVE v1). Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* 2013 Aug; 12 (8): 822–838.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70124-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70124-8).
- Weed L.H. Studies on Cerebro-Spinal Fluid. No. II: The Theories of Drainage of Cerebro-Spinal Fluid with an Analysis of the Methods of Investigation. *J Med Res.* 1914a Sep; 31 (1): 21–49.
- Weed L.H. Studies on Cerebro-Spinal Fluid. No. IV: The dual Source of Cerebro-Spinal Fluid. *J Med Res.* 1914b Sep; 31 (1): 93–118.
- Winer J.R., Morehouse A., Fenton L., Harrison T.M., Ayangma L., Reed M. *et al.* Tau and β -Amyloid Burden Predict Actigraphy-Measured and Self-Reported Impairment and Misperception of Human Sleep. *J Neurosci.* 2021 Sep 8; 41 (36): 7687–7696.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0353-21.2021>.
- Yamada S., Miyazaki M., Yamashita Y., Ouyang C., Yui M., Nakahashi M. *et al.* Influence of respiration on cerebrospinal fluid movement using magnetic resonance spin labeling. *Fluids Barriers CNS.* 2013 Dec 27; 10 (1): 36.
<https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-36>.
- Zhang Y., Ren R., Yang L., Zhang H., Shi Y., Okhravi H.R. *et al.* Sleep in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of polysomnographic findings. *Transl Psychiatry.* 2022 Apr 1; 12 (1): 136.
<https://doi.org/10.1038/s41398-022-01897-y>.

GLYMPHATIC SYSTEM, SLEEP, NEURODEGENERATION

A. V. Gorbachevskii[#], O. A. Kicherova, L. I. Reikhert

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Tyumen State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tyumen, Russia
[#]*e-mail: gorbachevskyalex@mail.ru*

The prevalence of neurodegenerative diseases and the complexity of their treatment in late stages make it urgent to identify early markers and symptoms of this group of diseases in order to optimize diagnosis, treatment and prevention. Materials and methods. The PubMed database was analyzed for the following queries: perivascular space, Virchow–Robin space, glymphatic system, sleep disorders, Alzheimer's disease.

Conclusion: enlargement of perivascular spaces (Virchow–Robin) can be considered an early structural marker of both glymphatic dysfunction and neurodegenerative diseases, while sleep disturbance can be considered as a functional marker (symptom) of these disorders.

Keywords: perivascular space, Virchow–Robin space, glymphatic system, insomnia, Alzheimer's disease, astrocyte, norepinephrine, MRI, polysomnography

УДК 159.91

ПАТТЕРНЫ МЕЖПОЛУШАРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ ПРОБУЖДЕНИИ ОТ КОРОТКИХ ЭПИЗОДОВ ДНЕВНОГО СНА

© 2024 г. А. Е. Манаенков^{1, 2, *}, Н. В. Лигун¹, Д. С. Свешников³, Е. Б. Якунина³,
В. И. Торшин³, В. Б. Дорохов¹

¹ Лаборатория нейробиологии сна и бодрствования,

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

² Кафедра психофизиологии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Кафедра нормальной физиологии, Медицинский институт ФГАОУ ВО “Российский университет дружбы народов”,
Москва, Россия

*e-mail: allomulder@gmail.com

Поступила в редакцию 26.02.2024 г.

После доработки 23.03.2024 г.

Принята к публикации 12.07.2024 г.

Ранее на материале множественных засыпаний при выполнении бимануального психомоторного теста с использованием мобильного приложения на смартфоне мы выделили и проинтерпретировали 4 качественно различных паттерна поведенческой активности межполушарных взаимодействий при засыпании. На этих же 73 студентах с 191-часовым экспериментом мы провели анализ данных, чтобы увидеть, как изменяются межполушарные взаимодействия при пробуждении ото сна. С помощью метода иерархической кластеризации по Уорду были выделены 4 кластера. Оценены средние значения поведенческих показателей в кластерах, с помощью критерия хи-квадрат Пирсона сравнили два набора кластеров.

Показано, что выраженный паттерн асимметрии между руками является наиболее редким; для наименее “сонливого” кластера характерно чередование рук при пробуждениях, для наиболее “сонливого” — меньшая предсказуемость паттернов во времени. Также показано, что “асимметричный” и “сонливый” кластер никогда не сменяют друг друга между засыпаниями и пробуждениями и чаще сменяются на оставшиеся два кластера, чем наоборот.

Полученные результаты могут отражать динамику межполушарных взаимодействий при переходах между сном и бодрствованием. Предполагается, что различия между кластерами обусловлены особенностями перестройки функциональной связности мозга в различных диапазонах ЭЭГ-активности.

Ключевые слова: психомоторный тест, мобильное приложение, асимметричный сон, гистерезис

DOI: 10.31857/S0044467724030032

Согласно современным исследованиям, сон и бодрствование не являются только унитарными состояниями, а регулируются локально (Kueger et al., 2019). Подобная регуляция может также участвовать в виде феноменов асимметричного сна (различная активность полушарий мозга во время сна) и однополушарного сна, при котором одно полушарие демонстрирует признаки сна, а второе — признаки бодрствования либо промежуточного между сном и бодрствованием состояния (Mascetti, 2016).

Однополушарный сон встречается в литературе как феномен, наблюдающийся у некоторых животных. Так, хорошо известен сон у китообразных, и в частности дельфинов, среди прочего проявляющийся в выраженной низкочастотной активности в одном полушарии и малоамплитудной высокочастотной активности в другом, а также соответствующих вариаци-

ях в температуре мозга (Lyamin et al., 2013; Lyamin, Siegel, 2019; Mukhametov et al., 1977). Также однополушарный сон описан у ластоногих (Lyamin et al., 2017; Lyamin & Siegel, 2019) и ряда птиц (Rattenborg et al., 2019).

Также существует ряд свидетельств об асимметрии мозговой активности во время биполушарного сна у людей (Nobili et al., 2011). Так, в ряде исследований наблюдалась асимметрия осцилляторной активности мозга в разных полосах частот, зависящая от текущей стадии сна (Benca et al., 1999; Roth et al., 1999; Sekimoto et al., 2000). В работе Шеповальникова (Шеповальников и др., 2012) это показано на основе кросс-корреляций биопотенциалов без разделения на конкретные полосы частот — с особо выраженными различиями во второй стадии сна (увеличение силы корреляций в левом полушарии). Тем не менее в недавней статье Tashakori

(Tashakori et al., 2024) оспаривается практическая значимость этих различий.

Большой интерес представляют исследования, свидетельствующие о различной роли полушарий при регуляции сна и бодрствования; так, в работе Tamaki (Tamaki et al., 2016) показана повышенная активность левого полушария в первую ночь исследования, что трактуется авторами как защитный механизм, поддерживающий бдительность в незнакомой среде (эффект первой ночи). Более поздние исследования (Ma et al., 2023; Mayeli et al., 2022) также обнаруживают подобный асимметричный “эффект первой ночи”, однако в правом полушарии.

Отдельно стоит отметить исследование Casagrande, где описывается более раннее “засыпание” левого полушария по сравнению с правым, зафиксированное при помощи бимануального тэппинг-теста (Casagrande, Bertini, 2008). Авторы трактуют результат как смену паттерна латерализации при переходе ото сна к бодрствованию, где левое полушарие доминирует при бодрствовании, а правое — при засыпании, причем без эффекта первой ночи.

Наша лаборатория проводит исследования многократных эпизодов засыпания, вызванных монотонной деятельностью; в этих целях мы используем свою модификацию тэппинг-теста (Dorokhov et al., 2019, 2021), предполагающую многократные нажатия на кнопку одной рукой с повторяющимися сменами одной руки на другую в течение 1 ч исследования. Подобная структура исследования хорошо подходит для исследования динамики активности различных полушарий, позволяя ответить на вопрос “наблюдается ли функциональная асимметрия полушарий на материале множественных засыпаний?”. В этих целях было проведено исследование в домашних условиях с использованием нашего тэппинг-теста, адаптированного для мобильных устройств на платформе Android (Manaenkov et al., 2023); такой дизайн исследования позволил собрать большую выборку испытуемых, подходящую для адекватного статистического анализа.

Исследование базировалось на двух основных гипотезах: 1) выраженность межполушарной асимметрии при засыпаниях гетерогенна и зависит как от индивидуальных особенностей конкретного испытуемого, так и от его текущего функционального состояния; 2) она проявляется в степени разнообразия паттернов, связанных со сменой рук в течение исследования. В этих целях

мы рассчитывали показатели информационной сложности (Lau et al., 2022) для каждого 1-часового исследования, основанные на последних нажатиях перед каждым эпизодом засыпания (“какая рука уснула последней”); полученные результаты подвергались иерархической кластеризации по методу Уорда (Ward, 1963).

По результатам исследования выделились 4 кластера. Примечательно, что кластер с ярко выраженной асимметрией (чаще всего последней “засыпала” правая либо левая рука) обладал наименьшим размером и был ассоциирован с кратковременными засыпаниями ≈ 10 с. В свою очередь, в наиболее “сонливом” кластере обе руки “засыпали” с равновероятной частотой, но паттерны “переключения” с одной руки на другую оказались менее предсказуемыми, чем в двух оставшихся кластерах.

Мы предполагаем, что подобные различия могут быть объяснены различными пространственно-временными паттернами активности в альфа-диапазоне; так, в работе Kalauzi и соавт. (Kalauzi et al., 2012) описывается динамика фазовой синхронизации альфа-ритма между электродами ЭЭГ во время засыпания — среди прочего, авторы описали четыре типа изменений в синхронизации альфа-ритма, что перекликается с нашими 4 кластерами. Их поздняя работа (Kalauzi et al., 2018) описывает более сложную и дезорганизованную природу паттернов синхронизации альфа-активности в состоянии дремоты по сравнению с бодрствованием.

Однако наша работа была посвящена именно эпизодам засыпания и непосредственно не затрагивала эпизоды пробуждения; учитывая, что механизмы поддержания сна и бодрствования как минимум отчасти различны (Sulaman et al., 2023), нельзя утверждать, что динамика рук, которые “засыпали последними”, будет такой же, как и динамика рук, которые “просыпались первыми”. Поэтому в текущей работе, используя похожий протокол анализа, мы проверяем следующие гипотезы относительно процедуры пробуждения:

1. Кластеры, выделенные на основе пробуждений, будут иметь такие же характеристики информационной сложности, как и на основе засыпаний.

2. Интерпретация этих кластеров с точки зрения показателей сонливости испытуемыми также не будет отличаться.

3. Между двумя типами кластеров будет наблюдаться взаимосвязь, т.е. представители одного кластера на основе засыпаний будут систематически попадать в конкретный кластер на основе пробуждений.

МЕТОДИКА

Все процедуры, выполненные в этом исследовании, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и более поздних поправок к ней. Исследование было одобрено этическим комитетом Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук (протокол № 2 от 3 июня 2019 г.). Участники исследования были подробно проинформированы обо всех процедурах, и от каждого участника было получено информированное письменное согласие.

В исследовании приняли участие 73 студента-медика (58 женщин и 15 мужчин, средний возраст = 19.5 лет, $sd = 1.5$). Участники не сообщали о присутствии в анамнезе психиатрических/неврологических заболеваний и диагностированных расстройств сна в период исследования.

Каждый испытуемый заполнял опросник Аннетт для оценки функциональной асимметрии (Annett, 1970). Он состоит из 12 пунктов, описывающих ситуации использования разных рук (например, «Какой рукой вы держите зубную щетку?»), которые оцениваются по 5-балльной шкале Лайкерта в диапазоне от -2 («Всегда левой») до 2 («Всегда правой»). Баллы суммируются, в результате чего получается шкала от -24 до 24, где значения от -8 до 8 указывают на отсутствие явного предпочтения руки (амбидекстрия), более низкие отрицательные значения указывают на предпочтение левой руки, более высокие положительные значения указывают на предпочтение правой руки. Для этого исследования мы отобрали только участников с предпочтением правой руки, чтобы исключить возможную побочную переменную (тестовый балл ≥ 9).

Каждый участник установил мобильное приложение на свой смартфон и получил две Bluetooth-кнопки. В приложении участник вводил основную информацию о себе (имя, пол, дату рождения, город и университет). Испытуемых инструктировали проводить исследование в тихом изолированном помещении, принять удобное горизонтальное положение, надеть наушники либо включить телефон на максималь-

ную громкость для лучшей слышимости пробуждающего сигнала.

Испытуемые проходили исследование от 3 до 7 раз; далее по тексту мы будем называть прохождение исследования «пробой». Каждая проба длилась 60 мин, в течение которых участник должен был держать глаза закрытыми и считать «про себя» от 1 до 10 с частотой примерно 1 раз в секунду, одновременно нажимая на кнопку 10 раз поочередно правой и левой рукой. Если участник не нажимал на кнопки в течение 2 мин, приложение генерировало звуковой сигнал, чтобы испытуемый проснулся и продолжил тест. Если участник не возобновлял нажатия, сигнал повторялся каждые 10 с. Через час исследование автоматически завершалось, и отчет с результатами отправлялся на удаленный сервер.

Для каждой пробы определялись эпизоды кратковременных засыпаний и их длительность (критерием засыпания являлось отсутствие нажатий в течение 10 с и более), а также определялась рука, с которой возобновлялась активность испытуемого («рука, которая проснулась первой»). Для дальнейшего анализа отбирались только пробы, в которых было как минимум 10 эпизодов засыпаний; суммарное количество проб составило 191. Распределение количества проб по испытуемым показано на рис. 1.

Для каждой пробы извлекались все эпизоды кратковременных засыпаний, после чего определялась рука, с которой испытуемый начинал свою активность после пробуждения («рука, которая проснулась первой»). Последовательности таких пробуждений были закодированы в двоичном виде (0 — левая рука, 1 — правая рука), и для них считались следующие показатели информационной сложности:

- Энтропия Шеннона (Shannon, 1948) — рассчитывается по формуле:

$$H(X) = -\sum_x P(x) \log_2(P(x)),$$

где x — событие, $P(x)$ — вероятность события, X — множество всех событий. Для бинарной последовательности этот показатель стремится к 0, если какое-то значение появляется чаще другого, и стремится к 1, если оба значения равновероятны. Например, последовательности 00000000 и 11111111, соответствующие нажатиям только левой или только правой рукой, имеют нулевую энтропию Шеннона, а последовательность 01000111 имеет энтропию Шеннона,

равную единицу (так как и левая, и правая рука встречаются одинаково часто). Таким образом, энтропия Шеннона может рассматриваться как показатель симметрии.

- Сложность Лемпеля–Зива (Lempel, Ziv, 1976) — отражает число уникальных паттернов внутри общей последовательности, если отслеживать ее от начала до конца. Так, последовательность 01000111 содержит в себе 5 паттернов: 0, 1, 00, 01, 11. Сложность Лемпеля–Зива крайне зависима от длины анализируемой последовательности, поэтому мы также рассчитали нормированную сложность Лемпеля–Зива (Zhang et al., 2009) по следующей формуле:

$$LZn = \frac{LZ}{n \div \log_2(n)},$$

где — обычная сложность Лемпеля–Зива, — длина последовательности. Таким образом, оба показателя отражают степень разнообразия паттернов рук в засыпании и пробуждении.

- Перестановочная энтропия (Bandt, Pompe, 2002) рассчитывается практически по той же формуле, что и “обычная” энтропия Шеннона, но с одним важным отличием:

$$H(X) = - \sum_{\pi} P(\pi) \log_2(P(\pi)),$$

где π — порядковый паттерн последовательности из трех символов. Перестановочная энтропия работает следующим образом: каждые три следующие друг за другом значения сортируются по возрастанию, после чего определяется их порядок в исходной последовательности. Так, в последовательности 01000111 содержатся паттерны 010, 100, 000, 001, 011, 111, которые при сортировке превращаются в паттерны 021, 201, 012, 012, 012, 012. Соответственно, чем выше разнообразие этих динамических паттернов — тем выше значение энтропии. Также мы считали условную перестановочную энтропию (Unakafov, Keller, 2014), которая показывает разнообразие порядковых паттернов, следующих после других порядковых паттернов. Таким образом, эти показатели отражают разнообразие и сложность динамики рук в засыпании и пробуждении.

- Фрактальная размерность Петросяна (Petrosian, 1995) считается по следующей формуле:

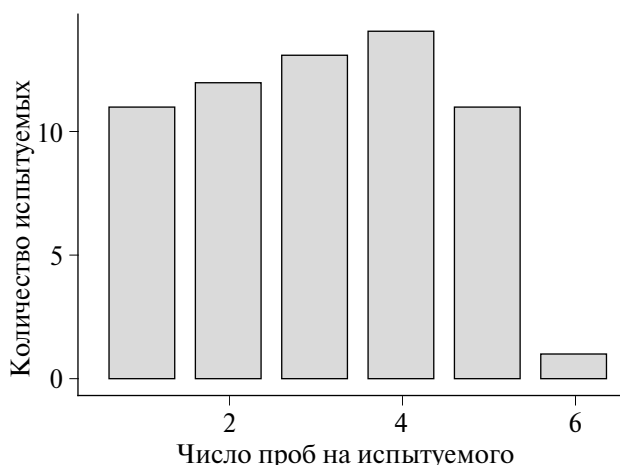


Рис. 1. Распределение количества проб по испытуемым. По оси X представлено число проб, по оси Y — количество испытуемых с таким количеством проб.

Fig. 1. Distribution of the trial number by subjects. The X-axis represents the number of trials, the Y-axis represents the number of subjects with that number of trials.

$$P = \frac{\log_{10}(N)}{\log_{10}(N) + \log_{10}\left(\frac{N}{N + 0.4N_8}\right)},$$

где N — длина последовательности, а N_8 — количество раз, когда одно состояние сменяется другим (0 на 1 или 1 на 0). Фактически этот показатель измеряет частоту смены рук в засыпании/пробуждении относительно длины всей последовательности, и он растет с увеличением этой частоты.

Статистический анализ данных проводился с помощью языка программирования R v4.3.3. Показатели информационной сложности были z-стандартизованы по выборке и подвергнуты иерархическому кластерному анализу по алгоритму Уорда (Ward, 1963), различия между наблюдениями оценивались по евклидовой норме. Для сопоставления с прошлой работой мы извлекали то же число кластеров — 4.

Полученные кластеры были сравнены по показателям психомоторного теста, отражающим сонливость испытуемого (общее число нажатий, общее число засыпаний, суммарная длительность сна, средний интервал между нажатиями). Так как кластеризации подвергались не испытуемые, а пробы, то фактически в данных у нас существует два типа изменчивости — межгрупповая (различия между двумя различными

испытуемыми, принадлежащими разным кластерам) и внутригрупповая (различия для одного испытуемого, попавшего в разные кластеры в зависимости от пробы). Чтобы разделить эти два типа изменчивости и более честно оценить получившиеся различия, мы использовали модель within-between mixed model (McNeish, Kelley, 2019), реализованную и автоматизированную в пакете panelr (Long, 2023).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Как и в случае с засыпаниями, анализ всех проб добровольцев позволил выделить 4 основных кластера, по своим характеристикам похожих на кластеры засыпаний:

- Кластер 1 — 72 наблюдения. Асимметрия слегка выражена — некоторые значения энтропии Шеннона значительно ниже 1. По сравнению с другими группами показатели сложности относительно низкие, но не самые низкие из всего набора.

- Кластер 2 — 74 наблюдения. Асимметрия не выражена — энтропия Шеннона близка к 1. Кроме того, наблюдаются самые высокие значения всех показателей сложности, за исключением “обычной” сложности Лемпеля—Зива и условной перестановочной энтропии.

- Кластер 3 — 35 наблюдений. Асимметрия не выражена. Обладает самой высокой “обычной” сложностью Лемпеля—Зива и условной перестановочной энтропией, отражающими меньшую “стабильность” паттернов во времени.

- Кластер 4 — 10 наблюдений. Наиболее выраженная асимметрия и самые низкие показатели сложности.

Визуально полученные результаты представлены на рис. 2.

По показателям психомоторного теста в среднем группы показали следующие различия:

- Кластер 1 сыграл роль референтной категории в модели: 2466 нажатий, 26 эпизодов микросна, 17 мин сна, средний интервал между нажатиями составляет 1125 мс.

- Кластер 2 — статистически значимо больше число нажатий (внутригрупповое $\beta = 430.07$, $t = 2.13$, $p = 0.04$), меньше число засыпаний (внутригрупповое $\beta = -8.3$, $t = -4.29$, $p < 0.001$, межгрупповое $\beta = -10.71$, $t = -4.17$, $p < 0.001$) и короче

общая длительность сна (внутригрупповое $\beta = -6.04$, $t = -3.29$, $p < 0.001$).

- Кластер 3 — статистически значимо меньше число нажатий (внутригрупповое $\beta = -541.99$, $t = -2.26$, $p = 0.03$) и больше число засыпаний (внутригрупповое $\beta = 11.48$, $t = 5.01$, $p < 0.001$, межгрупповое $\beta = 16.17$, $t = -4.72$, $p < 0.001$). Также в кластере наблюдался наибольший интервал между нажатиями, но различие не является статистически значимым (внутригрупповое $\beta = 141.78$, $t = 1.88$, $p = 0.06$).

- Кластер 4 — статистически значимо больше засыпаний (внутригрупповое $\beta = 12.44$, $t = 3.89$, $p < 0.001$).

Целиком коэффициенты, их статистическая значимость и псевдо- R^2 всех четырех моделей приведены в табл. 1.

Также мы сравнили размеры полученных кластеров с размерами тех же кластеров, полученных на засыпаниях. Было обнаружено уменьшение доли 3-го и 4-го кластеров с одновременным увеличением доли 2-го кластера, являющееся статистически значимым по критерию согласия Пирсона ($\chi^2 = 31.917$, $df = 3$, $p < 0.001$).

Наконец, мы проверили, совпадают ли кластеры одного и того же испытуемого, полученные на засыпаниях и пробуждениях (т.е. если на засыпаниях испытуемый попал в 1-й кластер, попадет ли он в 1-й кластер на пробуждениях, или нет). Для каждой пары “кластер засыпаний — кластер пробуждений” была посчитана абсолютная частота встречаемости, которая была нормирована относительно кластера засыпаний для большей наглядности результата (так лучше видно, какая доля испытуемых “сохранила” свой кластер, а какая оказалась в другом). Эти результаты представлены на рис. 3.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Следуя протоколу анализа, использованному в нашей предыдущей работе (Manaenkov et al., 2023), мы получили 4 кластера, которые по своим качественным характеристикам практически идентичны кластерам, полученным на материалах засыпаний. Однако различия по психомоторным характеристикам на этих кластерах оказались не настолько выраженными, как в нашей прошлой работе. Примечательно, что на основе этого несколько изменилась интерпретация кластеров; если в прошлой работе кластер 4 (“предсказуемый”) мог быть интерпретирован как

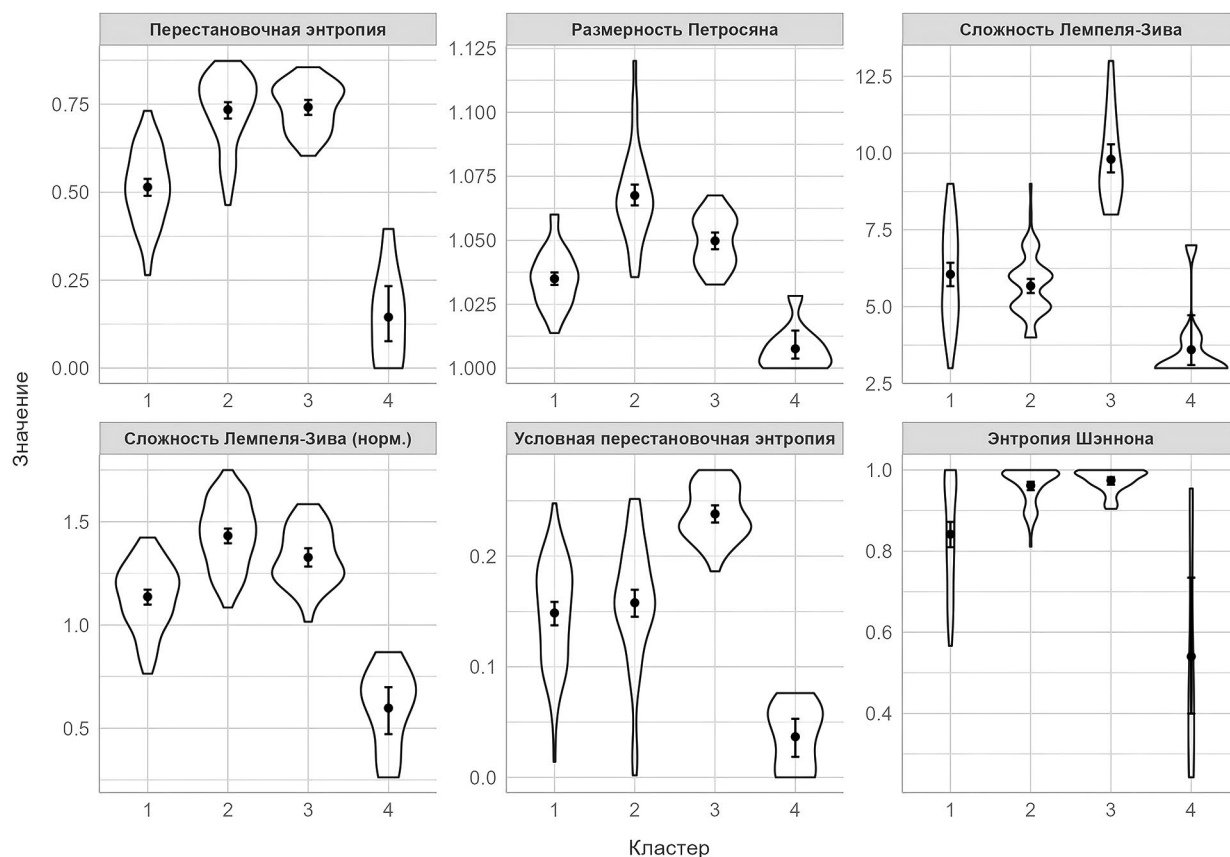


Рис. 2. Распределения показателей сложности в каждом из четырех кластеров (представлены в виде усеченных скрипичных графиков), а также их средние значения с 95%-ми доверительными интервалами (представлены в виде точек с усиками). Номера кластеров представлены по осям X, а значения конкретного показателя представлены по осям Y. Доверительные интервалы были построены с использованием алгоритма BCA-bootstrap (Efron, 1987).

Fig. 2. Distributions of complexity measures in each of the four clusters (represented as truncated violin plots), as well as their mean values with 95% confidence intervals (represented as dots with whiskers). Cluster numbers are represented along the x-axes, and the values of a specific measure are represented along the y-axes. Confidence intervals were constructed using the bias-corrected and accelerated bootstrap (Efron, 1987).

“бодрствующий” кластер, то на этих данных такого вывода сделать нельзя. В свою очередь, 1-й и 2-й кластеры на этих данных отражают более высокий уровень бодрствования — особенно это касается второго кластера, в котором наблюдается более четкое чередование “пробуждающихся” рук (отраженное в размерности Петросьяна). 3-й кластер (“сонливый”) — единственный, который не утратил свою изначальную интерпретацию.

Также стоит заметить, что использование within-between-модели позволило дополнительно разграничить характер этой изменчивости — в основном это внутригрупповая изменчивость (т.е. изменения кластеров у одного и того же испытуемого во время разных проб), за исключением количества эпизодов засыпаний, которые также демонстрируют выраженную межгруппо-

вую изменчивость (т.е. различия между разными испытуемыми, попавшими в разные кластеры). Это может говорить о том, что наши кластеры в большей степени отражают именно процессы, связанные со сменой функциональных состояний, нежели какие-то глобальные характеристики, отражающие отличия между испытуемыми.

Подобный результат может быть объяснен “перераспределением” кластеров: одна и та же запись одного испытуемого могла попасть в разные кластеры в зависимости от того, выделялся ли кластер на основе засыпаний (как в прошлой работе) или на основе пробуждений (как в текущей работе). Это перераспределение хорошо видно на рис. 3 — доля 3-го и 4-го кластеров уменьшилась в пользу доли 2-го. Поэтому мы решили дополнительно проанализировать доли

Таблица 1. Коэффициенты within-between-моделей, сравнивающих показатели психомоторных тестов между 4 кластерами. Столбцы содержат названия показателей: общее количество нажатий (Taps), общее количество эпизодов сна (Sleeps), общая продолжительность сна (Sl. len) и средний интервал между нажатиями (ITT). Intercept отражает свободный член модели – в данном случае это средние значения показателей по кластеру 1. cluster2, cluster3 и cluster4 обозначают внутригрупповые различия между соответствующим кластером и кластером 1; их аналоги с припиской imean обозначают межгрупповые различия. SD (Intercept) означает дисперсию случайных свободных членов регрессии, SD (Observations) означает остаточную, необъясненную дисперсию. pR2 обозначает псевдо-коэффициент детерминации – отражающий только фиксированные эффекты (_fe) и фиксированные + случайные (_total). В круглых скобках указаны p-значения соответствующих коэффициентов, в квадратных – 95%-ные доверительные интервалы. Звездочки обозначают уровень значимости: * – < 0.05, ** – < 0.01, *** – < 0.001.

Table 1. Coefficients of within-between models comparing psychomotor indicators between 4 clusters. The columns contain the names of the indicators: total number of taps (Taps), total number of sleep episodes (Sleeps), total sleep duration (Sl. len) and the average inter-tap interval (ITT). Intercept represents the average values of indicators for cluster 1. cluster2, cluster3 and cluster4 indicate within-group differences between the corresponding cluster and cluster 1; their analogues with the imean annotation indicate between-group differences. SD (Intercept) represents the random intercept variance, SD (Observations) represents residual variance. pR2 stands for a pseudo-coefficient of determination – reflecting only fixed effects (_fe) and fixed + random (_total). The p-values of the corresponding coefficients are shown in round parentheses, and the 95% confidence intervals are shown in square parentheses. Asterisks indicate the level of significance: * – < 0.05, ** – < 0.01, *** – < 0.001.

	Taps	Sleeps	Sl. len	ITI
(Intercept)	2466.020 (< 0.001)***	25.801 (< 0.001)***	16.855 (< 0.001)***	1215.084 (< 0.001)***
	[1687.802, 3244.237]	[22.319, 29.283]	[11.522, 22.188]	[994.447, 1435.720]
cluster2	430.073 (0.035)*	-8.299 (< 0.001)***	-6.036 (0.001)**	31.884 (0.617)
	[31.086, 829.060]	[-12.112, -4.486]	[-9.654, -2.418]	[-93.619, 157.386]
cluster3	-541.988 (0.026)*	11.485 (< 0.001)***	2.884 (0.187)	141.775 (0.062)+
	[-1015.107, -68.870]	[6.963, 16.006]	[-1.406, 7.174]	[-7.046, 290.596]
cluster4	38.660 (0.908)	12.442 (< 0.001)***	2.486 (0.414)	72.090 (0.495)
	[-621.462, 698.782]	[6.134, 18.750]	[-3.500, 8.472]	[-135.553, 279.733]
imean(cluster2)	316.809 (0.595)	-10.706 (< 0.001)***	2.634 (0.516)	-34.064 (0.840)
	[-851.978, 1485.595]	[-15.767, -5.646]	[-5.316, 10.584]	[-364.664, 296.536]
imean(cluster3)	-69.820 (0.932)	16.174 (< 0.001)***	8.663 (0.118)	-240.635 (0.296)
	[-1667.212, 1527.572]	[9.417, 22.931]	[-2.137, 19.464]	[-691.613, 210.343]
imean(cluster4)	-667.932 (0.717)	0.184 (0.980)	9.338 (0.449)	-139.560 (0.788)
	[-4284.458, 2948.594]	[-14.459, 14.827]	[-14.837, 33.513]	[-1156.856, 877.737]
SD (Intercept)	1429.777	3.863	9.020	395.484
SD (Observations)	851.898	8.141	7.725	267.967
pR2_fe	0.03	0.49	0.07	0.02
pR2_total	0.75	0.58	0.61	0.69

возможных сочетаний между этими двумя парами кластеров; они представлены на рис. 3 (правая часть).

По визуализации видно, что, хотя выраженная доля представителей каждого кластера сохраняет его вне зависимости от того, на каких данных эти кластеры выделялись, определенная доля испытуемых все-таки “меняет” свой кластер. Однако эта смена кластера не является случайной — на графике хорошо видны два необычных паттерна:

1. Кластеры 3 и 4 взаимоисключают друг друга — нет ни одного наблюдения, где испытуемый попадал бы в оба кластера одновременно. Это может свидетельствовать о том, что эти два кластера отражают в некоторой степени взаимоисключающие, качественно различные состояния,

в то время как 1-й и 2-й кластеры обозначают некоторые переходные состояния, являющиеся мостиком между двумя.

2. При этом наблюдается неожиданная асимметрия: 3–4-й кластеры сменяются на 1–2-й гораздо чаще, чем наоборот. Гипотеза о том, что это может означать, приведена ниже.

Какие процессы могут стоять за этими поведенческими изменениями? В наших прошлых работах (Dorokhov et al., 2019, 2021) было показано существование двух типов “фазических активационных паттернов”, предшествующих пробуждению и возобновлению активности: альфа-активность при пробуждении от 1-й стадии сна и медленноволновые осцилляции (К-комплексы) при пробуждении от 2-й стадии сна. Учитывая среднюю частоту засыпаний в те-

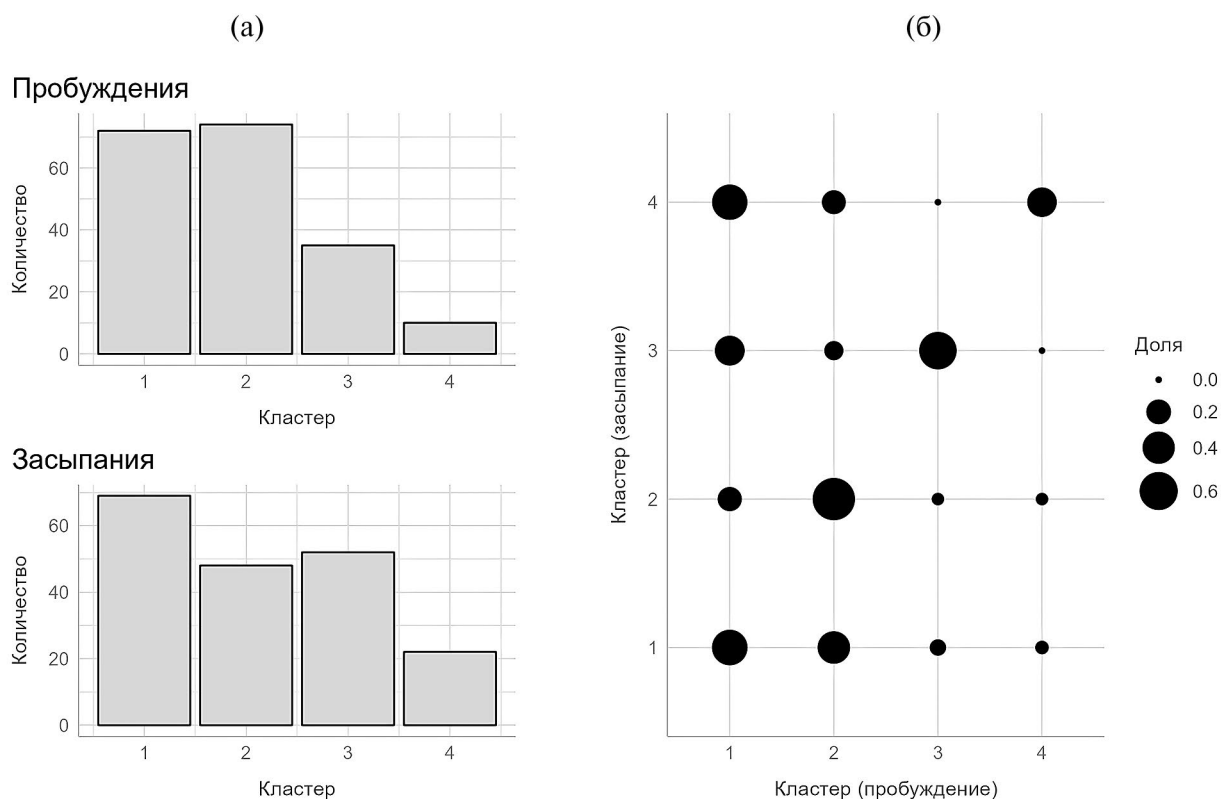


Рис. 3. (а) — размеры кластеров, полученных на основе пробуждений (верхняя часть графика) и размеры аналогичных им кластеров, полученных на основе засыпаний (нижняя часть графика). По оси X представлен номер кластера, по оси Y — количество наблюдений в каждом кластере. (б) — диаграмма, показывающая доли каждого сочетания “кластер засыпания — кластер пробуждения” относительно всех вариантов для каждого кластера засыпания по отдельности. По оси X представлены “кластеры пробуждений”, по оси Y — “кластеры засыпаний”. Диаметр точки кодируется доля — чем больше точка, тем большую долю составляет такое сочетание кластеров.

Fig. 3. (a) — the sizes of clusters obtained on the basis of sleep-wake transitions (upper part of the graph) and the sizes of similar clusters obtained on the basis of wake-sleep transitions (lower part of the graph). The cluster number is shown on the X-axis, and the number of observations in each cluster is shown on the Y-axis. (b) — a diagram showing the proportions of each combination of “wake-sleep cluster — sleep-wake cluster” relative to all variants for each wake-sleep cluster separately. “Sleep-wake clusters” are represented on the X-axis, and “wake-sleep clusters” on the Y-axis. The diameter of the point encodes the proportion — the larger the point, the greater the proportion of such a cluster combination.

чение проб исследования, можно предположить, что в нашем случае доминирует именно паттерн 1-го типа; мы предлагали эту гипотезу в нашем прошлом исследовании (Manaenkov et al., 2023), опираясь на работы Kalauzi и описанные в них паттерны фазовой рассинхронизации альфа-активности между разными электродами ЭЭГ при наступлении дремотного состояния (Kalauzi et al., 2012, 2018).

Однако в текущей работе появляется дополнительное наблюдение: если предположить, что “переходы” между кластерами сна и бодрствования отражают переходы между разными состояниями системы, то описанная выше асимметрия в переходе между 3–4-м и 1–2-м кластерами похожа на гистерезис. Гистерезис — это феномен, наблюдающийся в сложных динамических системах и отражающий зависимость текущего состояния системы от ее прошлого; он может выражаться в относительной легкости перехода системы из состояния 1 в состояние 2, но при этом более сложным переходом из состояния 2 в состояние 1 (Korfová, 2006).

Подобный результат очень интересен в свете исследования Nyoungkyu Kim: авторы исследовали феномен гистерезиса при смене уровней бодрствования на фоне анестезии, а также сравнивали полученные результаты с формальной моделью (Kim et al., 2018). Авторы показывают, что наиболее выраженный гистерезис наблюдается именно в альфа-диапазоне, причем выражается он не в изменении мощности ритмической активности, а в изменениях функциональной связности. В таком случае не исключено, что разнообразие полученных нами кластеров и их сочетаний между сном и бодрствованием отображает функциональные перестройки альфа-активности в процессе выполнения поведенческого теста.

Нельзя при этом упускать и вклад активности, связанной с пробуждением из более глубоких стадий сна. В этом плане интересны работы Яковенко, в которых испытуемые достигали 2-й стадии сна при выполнении психомоторного теста (Yakovenko, Petrenko, Cheremushkin et al., 2023; Yakovenko, Petrenko, Tkachenko et al., 2023). В них описана асимметрия, связанная с амплитудной синхронизацией между ритмами — в первую очередь альфа и тета в левом полушарии, наблюдаемая до пробуждения. Притом количество асимметричных связей уменьшается по мере приближения испытуемого к моменту пробуждения; это может говорить о большей синхронизации

между полушариями в момент пробуждения, что может объяснять отсутствие “глобальной” асимметрии в большинстве проб нашего исследования. Тем не менее взаимосвязь между альфа- и тета-активностью и ее роль в формировании наших поведенческих кластеров все еще может быть интересным направлением дальнейших исследований.

Для дальнейших исследований предполагается построение классификатора, который позволит нам присваивать номер кластера лабораторным данным. Таким образом мы сможем узнать, какие поведенческие кластеры чаще всего формируются в лабораторных условиях, насколько они похожи на получившиеся у нас кластеры (не являются ли они результатом экстраполяции), — и получить ответы на вопросы, связанные с возможными физиологическими механизмами формирования этих кластеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На 73 испытуемых в 191 исследовании были выделены 4 качественно и количественно различных кластера, основанные на том, с какой руки возобновлялась активность испытуемого после пробуждения от короткого сна. Кластеры демонстрируют корреляции с показателями психомоторного теста, отражающими уровень сонливости — для наименее “сонливого” кластера характерно более стереотипное чередование “пробуждений разными руками”, для наиболее “сонливого” — меньшая предсказуемость паттернов во времени. Показано, что 3-й и 4-й кластеры никогда не сменяют друг друга между засыпаниями и пробуждениями и чаще сменяются на 1–2-й кластер, чем наоборот. Предполагается, что за результатами стоит динамика функциональной связности в разных ЭЭГ-диапазонах.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.Е. Манаенков, В.Б. Дорохов, — концепция и руководство работой; Д.С. Свешников, Е.Б. Якунина, В.И. Торшин — проведение экспериментов; А.Е. Манаенков — анализ и визуализация данных; А.Е. Манаенков — написание текста статьи; В.Б. Дорохов, Н.В. Лигун — редактирование текста статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было одобрено этическим комитетом Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук (протокол № 2 от 3 июня 2019 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Шеповальников А.Н., Цицеришин М.Н., Зайцева Л.Г., Гальперина Е. И. Особенности системного взаимодействия разных областей коры левого и правого полушарий мозга в различных стадиях сна у человека. *Российский Физиологический Журнал им. И.М. Сеченова*. 2012. 98 (10): 1228–1241.

Annett M. A classification of hand preference by association analysis. *British Journal of Psychology* (London, England: 1953). 1970. 61 (3): 303–321.
<https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1970.tb01248.x>

Bandt C., Pompe B. Permutation entropy: A natural complexity measure for time series. *Physical Review Letters*. 2002. 88 (17): 174102.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.88.174102>

Benca R.M., Obermeyer W.H., Larson C.L., Yun B., Dolski I., Kleist K.D. et al. EEG alpha power and alpha power asymmetry in sleep and wakefulness. *Psychophysiology*. 1999. 36 (4): 430–436.

Casagrande M., Bertini M. Night-time right hemisphere superiority and daytime left hemisphere superiority: A repatterning of laterality across wake-sleep-wake states. *Biological Psychology*. 2008. 77 (3): 337–342.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2007.11.007>

Dorokhov V.B., Malakhov D.G., Orlov V.A., Ushakov V.L. Experimental Model of Study of Consciousness at the Awakening: FMRI, EEG and Behavioral Methods. *Biologically Inspired Cognitive Architectures* 2018. Ed. Samsonovich A.V. Springer International Publishing. 2019. 82–87 pp.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-99316-4_11

Dorokhov V.B., Tkachenko O.N., Ushakov V.L., Chernorizov A.M. Neuronal Correlates of Spontaneous Awakening and Recovery of Psychomotor Performance. *Advances in Cognitive Research, Artificial Intelligence and Neuroinformatics*. Eds. Velichkovsky B.M., Balaban P.M., Ushakov V.L. Springer International Publishing. 2021. 429–435.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-71637-0_49

Efron B. Better Bootstrap Confidence Intervals. *Journal of the American Statistical Association*. 1987. 82 (397): 171–185.
<https://doi.org/10.2307/2289144>

Kalauzi A., Vuckovic A., Bojić T. EEG alpha phase shifts during transition from wakefulness to drowsiness.

International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology. 2012. 86 (3): 195–205.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2012.04.012>

Kalauzi A., Vuckovic A., Bojić T. New complexity measures reveal that topographic loops of human alpha phase potentials are more complex in drowsy than in wake. *Medical & Biological Engineering & Computing*. 2018. 56 (6): 967–978.
<https://doi.org/10.1007/s11517-017-1746-3>

Kim H., Moon J.-Y., Mashour G.A., Lee U. Mechanisms of hysteresis in human brain networks during transitions of consciousness and unconsciousness: Theoretical principles and empirical evidence. *PLOS Computational Biology*. 2018. 14 (8): e1006424.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006424>

Kopfová J. Hysteresis in biological models. *Journal of Physics: Conference Series*. 2006. 55: 130–134.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/55/1/012>

Krueger J.M., Nguyen J.T., Dykstra-Aiello C.J., Taishi P. Local sleep. *Sleep Medicine Reviews*. 2019. 43: 14–21.
<https://doi.org/10.1016/j.smrv.2018.10.001>

Lau Z.J., Pham T., Chen S.H.A., Makowski D. Brain entropy, fractal dimensions and predictability: A review of complexity measures for EEG in healthy and neuropsychiatric populations. *European Journal of Neuroscience*. 2022. 56 (7): 5047–5069.
<https://doi.org/10.1111/ejn.15800>

Lempel A., Ziv J. On the Complexity of Finite Sequences. *IEEE Transactions on Information Theory*. 1976. 22 (1): 75–81.
<https://doi.org/10.1109/TIT.1976.1055501>

Long J.A. panelr: Regression Models and Utilities for Repeated Measures and Panel Data (0.7.8) [Computer software]. 2023.
<https://cran.r-project.org/web/packages/panelr/index.html>

Lyamin O.I., Lapierre J.L., Mukhametov L.M. Sleep in Aquatic Species. *Encyclopedia of Sleep*. Ed. Kushida C. Waltham, MA: Elsevier, 2013. 57–62 pp.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378610-4.00013-9>

Lyamin O.I., Mukhametov L.M., Siegel J.M. Sleep in the northern fur seal. *Current Opinion in Neurobiology*. 2017. 44: 144–151.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.04.009>

Lyamin O.I., Siegel J.M. Sleep in Aquatic Mammals. *Handbook of Behavioral Neuroscience*. 2019. 30: 375–393.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813743-7.00025-6>

Ma N., Ning Q., Li M., Hao C. The First-Night Effect on the Instability of Stage N2: Evidence from the Activity of the Central and Autonomic Nervous Systems. *Brain Sciences*. 2023. 13 (4): 4.
<https://doi.org/10.3390/brainsci13040667>

Manaenkov A.E., Prokhorenko N.O., Sveshnikov D.S., Yakunina E.B., Bakayeva Z.V., Torshin V.I. et al. Behavioral measurement of interhemispheric

- interactions during multiple episodes of falling asleep. *The European Physical Journal Special Topics*. 2023. <https://doi.org/10.1140/epjs/s11734-023-01054-6>
- Mascetti G.G.* Unihemispheric sleep and asymmetrical sleep: Behavioral, neurophysiological, and functional perspectives. *Nature and Science of Sleep*. 2016. 8: 221–238. <https://doi.org/10.2147/NSS.S71970>
- Mayeli A., Janssen S.A., Sharma K., Ferrarelli F.* Examining First Night Effect on Sleep Parameters with hd-EEG in Healthy Individuals. *Brain Sciences*. 2022. 12 (2): 233. <https://doi.org/10.3390/brainsci12020233>
- McNeish D., Kelley K.* Fixed effects models versus mixed effects models for clustered data: Reviewing the approaches, disentangling the differences, and making recommendations. *Psychological Methods*. 2019. 24 (1): 20–35. <https://doi.org/10.1037/met0000182>
- Mukhametov L.M., Supin A.Y., Polyakova I.G.* Inter-hemispheric asymmetry of the electroencephalographic sleep patterns in dolphins. *Brain Research*. 1977. 134 (3): 581–584. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90835-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90835-6)
- Nobili L., Ferrara M., Moroni F., De Gennaro L., Russo G.L., et al.* Dissociated wake-like and sleep-like electrocortical activity during sleep. *NeuroImage*. 2011. 58 (2): 612–619. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.06.032>
- Petrosian A.* Kolmogorov complexity of finite sequences and recognition of different preictal EEG patterns. *Proceedings Eighth IEEE Symposium on Computer-Based Medical Systems*. 1995. 212–217 pp. <https://doi.org/10.1109/CBMS.1995.465426>
- Rattenborg N.C., van der Meij J., Beckers G.J.L., Lesku J.A.* Local Aspects of Avian Non-REM and REM Sleep. *Frontiers in Neuroscience*. 2019. 13: 567. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00567>
- Roth C., Achermann P., Borbely A.A.* Frequency and state specific hemispheric asymmetries in the human sleep EEG. *Neuroscience Letters*. 1999. 271 (3): 139–142. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00048-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00048-8)
- Sekimoto M., Kato M., Kajimura N., Watanabe T., Takahashi K., Okuma T.* Asymmetric interhemispheric delta waves during all-night sleep in humans. *Clinical Neurophysiology*. 2000. 111 (5): 924–928. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(00\)00258-3](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(00)00258-3)
- Shannon C.E.* A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*. 1948. 27 (3): 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Sulaman B.A., Wang S., Tyan J., Eban-Rothschild A.* Neuro-orchestration of sleep and wakefulness. *Nature Neuroscience*. 2023. 26 (2): 2. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01236-w>
- Tamaki M., Bang J.W., Watanabe T., Sasaki Y.* Night Watch in One Brain Hemisphere during Sleep Associated with the First-Night Effect in Humans. *Current Biology: CB*. 2016. 26 (9): 1190–1194. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.063>
- Tashakori M., Rusanen M., Karhu T., Grote L., Nath R.K., Leppänen T., Nikkonen S.* Interhemispheric differences of electroencephalography signal characteristics in different sleep stages. *Sleep Medicine*. 2024. 117: 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2024.03.024>
- Unakafov A.M., Keller K.* Conditional entropy of ordinal patterns. *Physica D: Nonlinear Phenomena*. 2014. 269: 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.physd.2013.11.015>
- Ward J.H.* Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association*. 1963. 58 (301): 236–244. <https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845>
- Yakovenko I.A., Petrenko N.E., Cheremushkin E.A., Tkachenko O.N., Dorokhov V.B.* Interhemispheric Asymmetry of Connections of EEG Rhythms on Spontaneous Waking after Transient Episodes of Sleep while Performing a Monotonous Psychomotor Test. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2023. 53 (1): 12–15. <https://doi.org/10.1007/s11055-023-01384-x>
- Yakovenko I.A., Petrenko N.E., Tkachenko O.N., Gandina E.O., Puchkova A.N., Dorokhov V.B.* Interhemispheric asymmetry of the EEG rhythms coupling accompanies cognitive awakening during bimanual performance of a psychomotor test. *The European Physical Journal Special Topics*. 2023. <https://doi.org/10.1140/epjs/s11734-023-01060-8>
- Zhang Y., Hao J., Zhou C., Chang K.* Normalized Lempel-Ziv complexity and its application in bio-sequence analysis. *Journal of Mathematical Chemistry*. 2009. 46 (4): 1203–1212. <https://doi.org/10.1007/s10910-008-9512-2>

PATTERNS OF INTERHEMISPHERIC INTERACTIONS IN THE SHORT DAY SLEEP EPISODES

**A. E. Manaenkov^{a, b, #}, N. V. Ligun^a, D. S. Sveshnikov^c, E. B. Yakunina^c, V. I. Torshin^c,
V. B. Dorokhov^a**

^a *Laboratory of Neurobiology of Sleep and Wakefulness, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b *Department of Psychophysiology, Lomonosov Moscow State University. Moscow, Russia*

^c *Department of Normal Physiology, Medical Institute of the Federal State Educational Institution of Higher Education "Peoples' Friendship University of Russia", Moscow, Russia*

[#]*e-mail: allomulder@gmail.com*

Previously, based on the material of multiple wake-sleep transitions when performing a bimanual psychomotor test based on a mobile app, we identified and interpreted 4 qualitatively different patterns of behavioral activity. In the same 191 1-hour experiments within 73 students we analyzed the data to see how interhemispheric interactions change when waking up from sleep. Using the Ward hierarchical clustering method, 4 clusters were identified. The average values of behavioral indicators in clusters were estimated, two sets of clusters were compared using Pearson's chi-square test. It is shown that the pronounced pattern of asymmetry between the hands is the rarest; for the least "sleepy" cluster, alternating awakenings with different hands is characteristic, for the most "sleepy" – the least predictability of patterns over time. It is also shown that the "asymmetric" and "sleepy" clusters never switched each other between falling asleep and waking up, and are more often switched by the remaining two clusters than vice versa. The results obtained can reflect the dynamics of interhemispheric interactions during sleep-wake transitions. It is argued that the differences between the clusters are due to the restructuring of functional connectivity in different ranges of EEG activity.

Keywords: psychomotor test, mobile app, asymmetrical sleep, hysteresis

УДК 159.91

ВЫЯВЛЕНИЕ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОБРАБОТКИ ИНТРАЦЕПТИВНЫХ СИГНАЛОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА СВЯЗАННЫХ С СОБЫТИЯМИ ПОТЕНЦИАЛОВ

© 2024 г. Е. Д. Словенко^{1,*}, О. В. Сысоева^{1,2}

¹ ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

² Научно-технологический университет “Сириус”, Сочи, Россия

*e-mail: ekaterinaslovenko@gmail.com

Поступила в редакцию 03.11.2023 г.

После доработки 29.12.2023 г.

Принята к публикации: 11.03.2024 г.

Работа посвящена представлению и оценке работы алгоритма выделения мозгового вызванного потенциала, связанного с сердцебиением (ВПС), с помощью метода независимых компонент. Алгоритм включает одновременную регистрацию электроэнцефалограммы (ЭЭГ) и фотоплетизмограммы (ФПГ), выделение из ЭЭГ фрагментов, соответствующих пику пульсовой волны ФПГ, удаление из полученных фрагментов кардиогенной активности с помощью метода независимых компонент (МНК), синхронизацию фрагментов с R-зубцом кардиограммы. Для уточнения локализации источника полученного потенциала применен пространственный фильтр “current source density” (CSD). Алгоритм был апробирован на 21 участнике эксперимента и выявил характерное повышение амплитуды потенциала в промежутке от 0 до 400 мс после удара сердца — ВПС.

Таким образом, применение методов независимых компонент и пространственной фильтрации к ЭЭГ-фрагментам, синхронизированным с ФПГ, позволяет выделить мозговой вызванный потенциал, связанный с ударом сердца, независимый от собственно сердечной активности, регистрируемой скальповыми отведениями.

Ключевые слова: вызванный потенциал, связанный с сердцебиением; метод независимых компонент, ЭЭГ, ФПГ

DOI: 10.31857/S0044467724030049

ВВЕДЕНИЕ

Вызванный потенциал на удар сердца (ВПС) — электрический потенциал, возникающий в головном мозге в течение нескольких сотен миллисекунд после удара сердца. Чаще всего ВПС характеризуется повышением амплитуды сигнала во фронтально-центральных отведениях в интервале 200–550 мс после R-зубца кардиограммы (Montoya, 1963, Schandry, 1986). Интерес к этому ответу в последние годы увеличился прежде всего потому, что в этом ответе нашли связи как с базовыми нейрофизиологическими процессами, так и с высшими психическими функциями. В настоящее время физиологические механизмы ВПС не изучены до конца, а путь сигнала от удара сердца в высшие корковые центры рассматривается в общем виде: сердечное сокращение воспринимается интерцепторами, по проводящим путям возбуждение доходит до таламуса, а затем передается в корковые и лимбические центры головного мозга.

В роли первичных интерорецепторов рассматриваются барорецепторы, сигнал от которых поступает через блуждающий нерв в ствол мозга, а затем в таламус (Zaccaro, 2022). Также есть теория о поступлении сигнала о сердцебиении в таламус от механорецепторов стенки сердца через спиноталамокортикальный тракт и структуры ствола мозга (Park, Blanke, 2019). Из таламуса сигнал поступает в структуры лимбической системы и в корковые центры — островковую, соматосенсорную и, по некоторым данным, поясную кору (Park, Blanke, 2019; Salameh et al., 2024). Также есть сведения, что помимо ядра одиночного пути и спиноталамокортикального тракта существует более короткий и прямой путь поступления интероцептивной информации в центральную нервную систему. Этот путь обеспечивается механочувствительными ионными каналами, в частности пьезо-белками, в митральных клетках обонятельной луковицы (Salameh et al., 2024).

Считается, что ВПС в первую очередь отражает процесс interoцепции – восприятия внутренних сигналов организма. При этом характеристики потенциала зависят не только от активности интерорецепторов, но и от текущих одновременно психических процессов (Azzalini, 2019). Так, было показано, что амплитуда потенциала меняется в зависимости от того, направлено ли внимание на само сердцебиение или на внешние события. Имеются также сведения о связи амплитуды ВПС с точностью восприятия сердцебиения, однако в нескольких исследованиях воспроизвести эти результаты не удалось, так что вопрос о связи коркового потенциала с перцептивной точностью остается спорным (Schandry, 1986; Azzalini, 2019).

Экспериментально было показано, что амплитуда ВПС больше при наблюдении лиц, выражающих злость, чем при наблюдении грустных лиц, то есть восприятие эмоций также влияет на нейрофизиологическую обработку телесных сигналов (Azzalini, 2019). С помощью виртуальной реальности была выявлена прямая связь между амплитудой ВПС и выраженностью иллюзии переноса тела: большая выраженность ВПС сопровождалась ощущением переноса в виртуальное тело. Также было выявлено, что увеличенная амплитуда потенциала связана с более точным восприятием стимулов, близких к порогу различения (Azzalini, 2019).

Кроме того, локализация и амплитудно-временные характеристики потенциала варьируются в зависимости от экспериментального задания и состава выборки. Так, связь амплитуды ВПС с точностью восприятия сердцебиения или с уровнем возбуждения обычно находится в интервале 200–300 мс (Coll, 2021). Когда варьируется направление внимания, то амплитуда ВПС больше всего изменяется в интервале 350–500 мс. Различия по амплитудным характеристикам ВПС также обнаруживались при сравнении участников с психическими или соматическими заболеваниями (диабет, рассеянный склероз, депрессия, пограничное расстройство личности, анорексия, тревожное расстройство, аддикции) с группой, не имеющей соответствующего заболевания. В этих исследованиях различия амплитуды ВПС чаще обнаруживаются в более поздних компонентах ВПС 450–500 мс (Coll, 2021).

Эти данные показывают, что ВПС не только отражает отклик корковых нейронов на сигнал от внутренних рецепторов, но связан с широким пластом когнитивных процессов. Данный по-

тенциал представляет интерес как нейрофизиологический маркер interoцептивной чувствительности и может быть использован при изучении связи между восприятием телесных сигналов и высшими психическими функциями. Одновременная регистрация физиологического процесса, связанной с ним нейрофизиологической активности и поведенческих показателей дает возможность сопоставить роль биологических, личностных и культурных факторов формирования interoцепции.

Сердцебиение может быть зарегистрировано напрямую с помощью неинвазивных методов, что позволяет записывать этот показатель в различных экспериментальных условиях, не снижая экологической валидности исследования. Сложность при изучении данного потенциала с помощью электроэнцефалографии представляет отделение собственно мозгового сигнала от кардиогенной активности, которая записывается электродами со скальпа и по отношению к ЭЭГ является артефактом биологического происхождения.

В настоящее время разработаны различные методы распознавания и удаления кардиогенных артефактов из ЭЭГ: вычитание из сигнала усредненного сигнала электрокардиограммы (ЭКГ), вейвлет-преобразование сигнала, выделение и удаление из сигнала независимых компонент, содержащих ЭКГ-активность (МНК), пространственная фильтрация (Coll, 2021; Terhaar, 2012; Dai et al., 2019). Каждый из этих методов обладает своими преимуществами и предъявляет определенные требования к условиям записи данных. Так, есть подход, предполагающий вычитание усредненной ЭКГ-волны из ЭЭГ-фрагментов, синхронизированных с ЭКГ по R-зубцу (Abtahi, 2014). Эта процедура позволяет сохранить в очищенной записи высокое соотношение сигнала и шума, однако требует установки ЭКГ-электрода и может снизить экологическую валидность эксперимента. Обойтись без регистрации ЭКГ позволяет вейвлет-преобразование, предполагающее умножение сигнала на коэффициенты, подобранные таким образом, чтобы ЭКГ-компоненты получили минимальный вес в сигнале, а мозговая активность – максимальные. Сравнение этих двух методов показало, что оба дают высокое соотношение сигнала и шума, однако вычитание ЭКГ-волны сохраняет больше высокочастотных компонентов ЭЭГ-сигнала, а вейвлет-преобразование лучше сохраняет низкочастотные компоненты, а следовательно, и общую структуру сигнала (Abtahi, 2014). Оба

подхода предполагают наложение на сигнал определенного шаблона без учета вариабельности сигнала во времени, что может привести к потере неартефактной составляющей сигнала.

Для разделения мозговой и сердечной активности в энцефалограмме успешно применяется метод независимых компонент (МНК), предполагающий разложение многомерного сигнала на статистически независимые друг от друга компоненты. Этот метод обладает высокой надежностью в определении физических артефактов и высокоамплитудных физиологических, в первую очередь глазодвигательных. С помощью МНК в ЭЭГ возможно обнаружить и низкоамплитудные артефакты — кардиогенные и мышечные, однако такой анализ возможен при соблюдении определенных условий записи и обработки сигнала. Преимуществом МНК является возможность выборочного удаления части сигнала без сравнения с шаблоном, таким образом сохранив мозговую активность, диапазон которой перекрывается с кардиогенными артефактами. Недостатком данного метода является отсутствие объективных критериев отнесения выделенных компонент к сердечной или мозговой активности: невозможность узнать, по каким принципам те или иные компоненты были удалены из сигнала, затрудняет сопоставление результатов независимых исследователей.

Выделенная с помощью МНК из ЭЭГ электрокардиограмма позволила проанализировать показатели частоты сердечных сокращений и вариабельности сердечного ритма у пациентов с нарушениями сознания (Raimondo et al., 2017). Для этого исследователи регистрировали 256-канальную ЭЭГ и применяли к ней МНК в сочетании с высокочастотным и низкочастотным фильтрами Баттерворта. Таким образом, более чем у половины участников (132 из 259) удалось выделить кардиограмму, которую было возможно проанализировать автоматизированными алгоритмами обработки ЭКГ. С одной стороны, это говорит о хорошей способности МНК к выделению из ЭЭГ сигналов не мозгового происхождения. С другой стороны, невозможность выделить ЭКГ-компоненты из половины записей показывает ограниченность применения метода и его зависимость от особенностей анатомии участника эксперимента и установки электродов. Таким образом, для разработки алгоритма выделения сердечной активности из ЭЭГ, универсального для всех записей, МНК необходимо дополнить регистрацией собственно кардиограммы.

Для решения задачи выделения ВПС из ЭЭГ необходимо сочетание электроэнцефалографии с методами регистрации сердечной активности. В данной работе будет представлен один из возможных способов выделения кардиогенного сигнала из электроэнцефалограммы методом независимых компонент с помощью синхронизации с ФПГ.

МЕТОДИКА

В данной работе на примере энцефалограммы одного репрезентативного участника эксперимента ХХ033 (Ж, 35 лет) будут рассмотрены все этапы выделения из ЭЭГ кардиогенной активности путем синхронизации с фотоплетизмограммой, начиная с предварительной обработки записи (рис. 1). Помимо задачи описания алгоритма применения МНК, будут рассмотрены задачи поиска компонент, содержащих ЭКГ-артефакты, определения минимального необходимого количества ЭЭГ-фрагментов и обоснования необходимости синхронизации ЭЭГ с ударами сердца для успешного применения МНК. На примере записи DM017 (М, 21 год) будет рассмотрена возможность применения МНК для выделения кардиогенной активности без синхронизации с ФПГ. Далее будет показано, каким образом с помощью метода независимых компонент из электроэнцефалограммы можно выделить электрический сигнал сердца и с точностью до миллисекунд определить время возникновения R-зубца кардиограммы с учетом межиндивидуальной вариабельности соотношения R-зубца и пика пульсовой волны. На примере записи DM024 (Ж, 25) с помощью параллельной регистрации электрокардиограммы (ЭКГ) и ФПГ будет показано, что временной интервал между R-зубцом и пиком пульсовой волны ФПГ является постоянной величиной с маленькой дисперсией значений. Будет представлен вызванный потенциал, полученный после удаления из записи кардиогенной активности. С помощью пространственного фильтра Лапласа будет показано, что полученный вызванный потенциал имеет мозговое происхождение.

Для апробации алгоритма были использованы записи 21 участников (17 женщин, средний возраст 30.7 ± 13.5) без психических и неврологических заболеваний в анамнезе. Для каждого участника эксперимента были использованы записи двух различных экспериментальных парадигм, выбранных для иллюстрации работы алгоритма. Для выделения независимых компонент были использованы записи во время выполнения задания

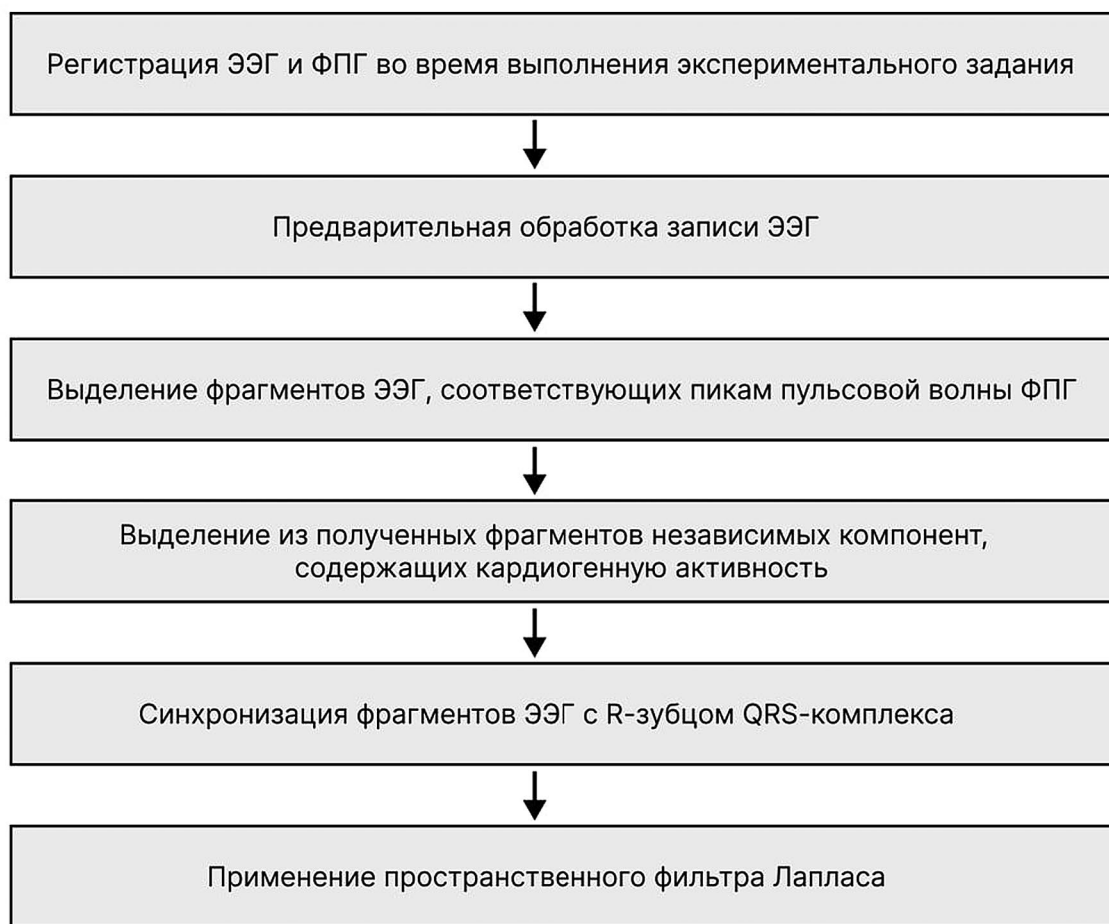


Рис.1. Схема алгоритма.
Fig. 1. Block diagram of the algorithm.

на сравнение продолжительности визуальных стимулов. Задание предполагало сравнение предъявленных поочередно пар стимулов и определение более продолжительного из них. Записи в условиях классификации стимулов были использованы только для построения модели независимых компонент и выбора источников не мозгового происхождения. Решение использовать эти записи для МНК связано с тем, что они имеют большую длительность (не менее 15 мин), что позволяет проследить изменение работы предложенного алгоритма в зависимости от количества данных, берущихся для анализа (см. Задача 2. Определение влияния количества фрагментов на модель независимых компонент). На этом этапе обработки интерес представляли только кардиогенные артефакты — компоненты сигнала, не связанные с мозговой активностью и не совпадающие с ней по амплитудно-пространственным характеристикам. При этом стимулы сопутствующей задачи имеют различные случайные интерва-

лы повторения. Следовательно, можно считать, что распределение стимулов в отношении разных фаз сердечного цикла является случайным. В таком случае сердцебиения, по фазе совпадающие с той или иной стимуляцией, представлены в записи в равном соотношении и можно исключить влияние мозговой активности, синхронизированной с обработкой других экспериментальных стимулов, на характеристики ВПС.

Для демонстрации результата выделения ВПС и применения пространственного фильтра Лапласа использованы записи во время выполнения задания на отсчет сердцебиения, поскольку, согласно литературным данным, ВПС более выражен при направлении внимания на interoceptивные ощущения ВПС (Petzschner, 2019). При выполнении этого задания участнику эксперимента предлагалось считать количество ударов сердца, не щупая пульс, пока не прозвучит звуковой сигнал, и после записать отмеренное количество сердцебиений. Поскольку при вы-

полнении этой задачи участникам не предъявлялась внешняя стимуляция, можно считать, что все удары сердца записаны в одинаковых условиях. Сердцебиение отсчитывалось в течение трех фиксированных временных интервалов: 15, 70 и 40 с.

Все этапы обработки проведены в программной среде MNE на языке Python.

1. Регистрация электроэнцефалограммы и фотоплетизмограммы

Регистрация мозговой активности проводилась в шумоизолированной и электрически экранированной камере при помощи аппаратуры и программного обеспечения BrainVision (actiCHamp Plus (Brain Products GmbH)).

Для записи электроэнцефалограммы использовалось 64 отведения, расположенных в соответствии с системой 10–10, референтный электрод — FCz. Исходная частота дискретизации 500 Гц, частотный диапазон 0–250 Гц. Одновременно проводилась регистрация частоты сердечных сокращений с помощью фотоплетизмографии. Пример записи представлен на рис. 2.

2. Предварительная обработка энцефалограммы

Обработка данных энцефалограммы была проведена с помощью пакета MNE (Gramfort et al., 2013), разработанного на языке программирования Python. Предварительная обработка записей включала фильтрацию в диапазоне 0.5–40 Гц и интерполяцию зашумленных отведений. При обработке использована исходная частота дискретизации — 500 Гц.

3. Выделение фрагментов ЭЭГ, связанных с сердцебиением

Фотоплетизмограмма не регистрирует отдельные компоненты сердечного комплекса, она позволяет определить только пик пульсовой волны, который зависит и от момента удара сердца, и от скорости распространения крови по сосудам. Тем не менее вариабельность интервала между ударом сердца и пиком пульсовой волны у отдельного человека невелика. За счет этого при усреднении достаточного количества фрагментов ЭЭГ, синхронизированных по времени с пиком пульсовой волны на ФПГ, можно увидеть характерные компоненты QRS-комплекса, в частности R- и T-зубцы (рис. 3 (а)). Для анализа были использованы двухсекундные фрагменты

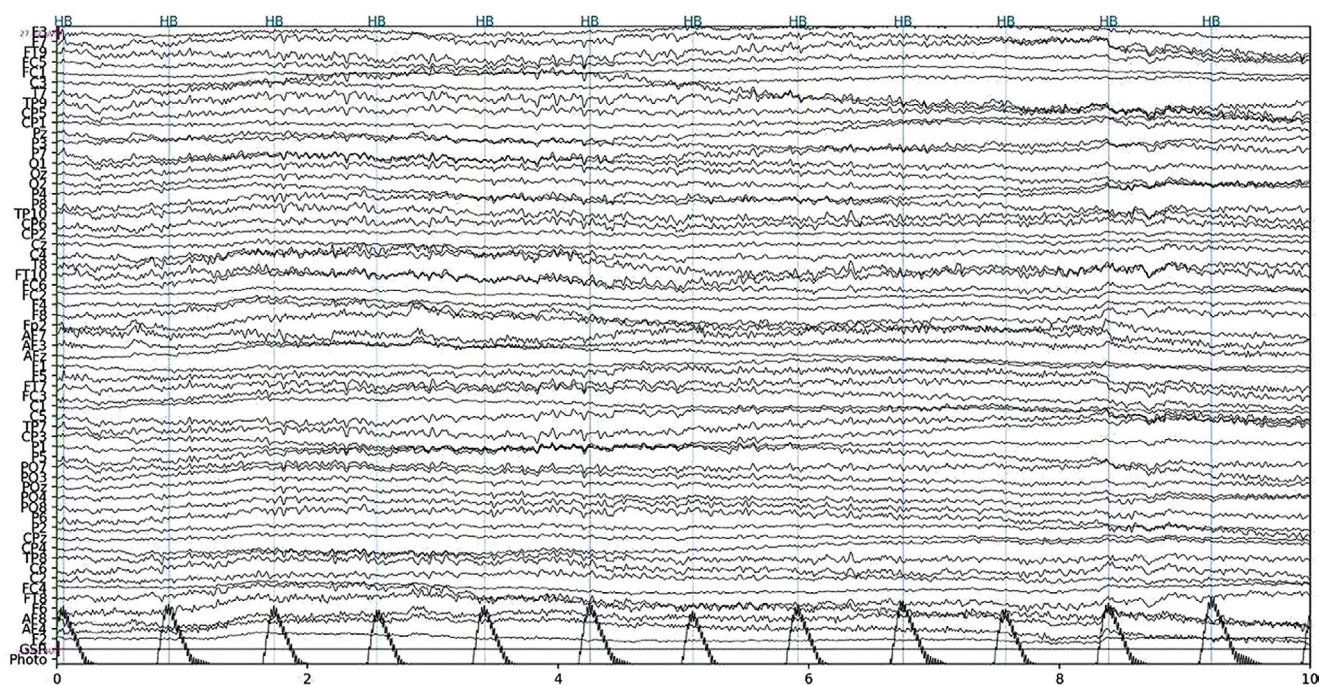


Рис. 2. Пример одновременной записи ФПГ (на нижнем канале) и ЭЭГ. Вертикальными линиями выделены пики ФПГ, по которым были выбраны ЭЭГ фрагменты.

Fig. 2. The example of simultaneously recorded PPG (the lowest channel) and EEG. Vertical lines correspond to pulse wave peaks used for EEG segmentation.

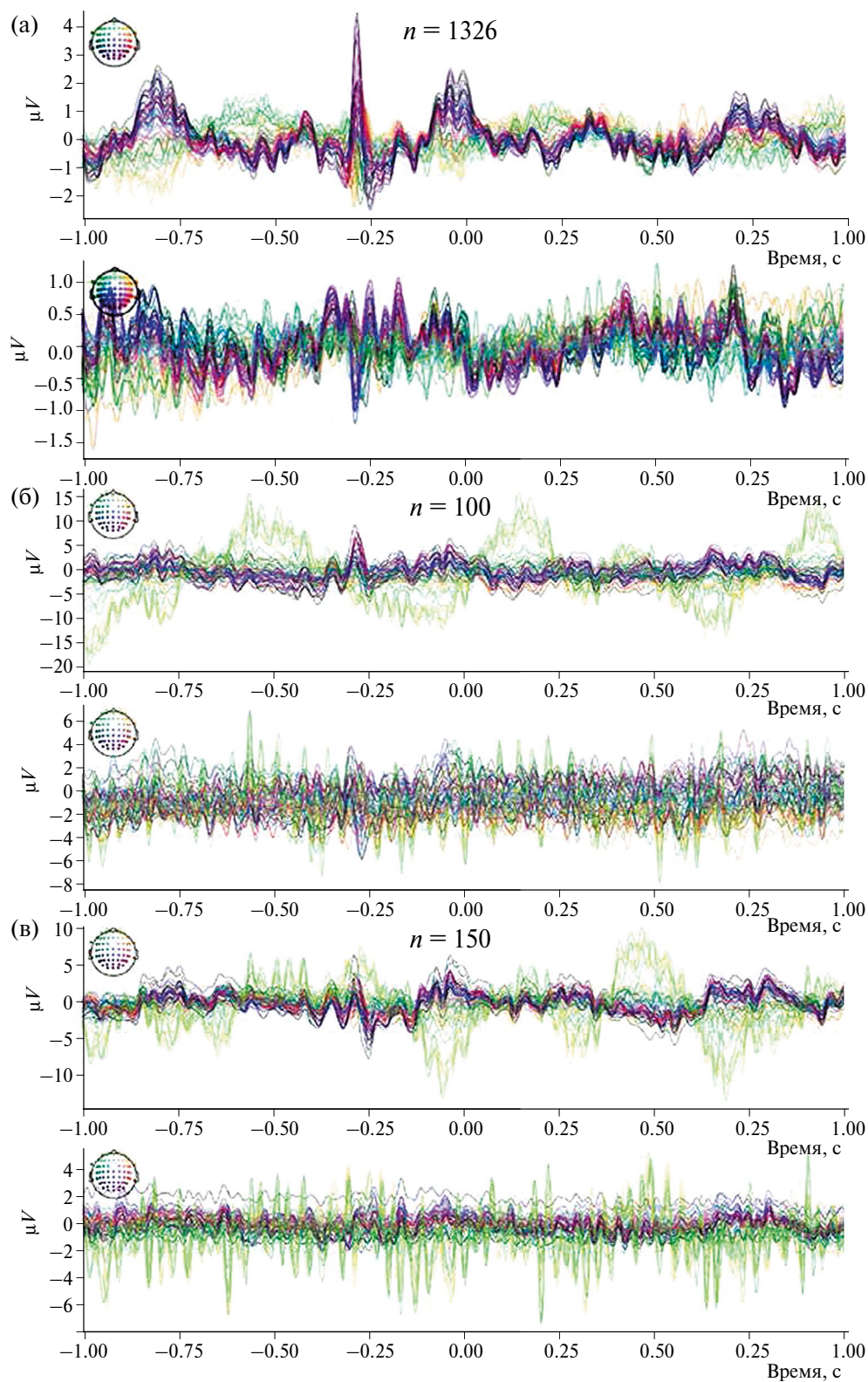


Рис. 3. Вызванный потенциал, синхронизированный с ударами сердца, полученный в результате усреднения разного количества индивидуальных эпох: 1326 (а), 100 (б) и 150 (в). Для каждого усреднения представлено по два рисунка. Верхний рисунок отражает результат, полученный до удаления независимых компонент (НК), содержащих кардиогенные артефакты, а нижний — после.

Fig. 3. ERP synchronized with heartbeat including different amounts of averaged epochs: 1326 (a), 100 (б), 150 (в). For each average two pictures are presented. The upper picture shows the average before extraction of independent components (IC) with ECG artifacts, the lower picture shows the result of extraction.

ЭЭГ, включающие секунду до пика пульсовой волны и секунду после.

Для добавления меток, соответствующих пикам пульсовой волны на фотоплетизмограмме, были использованы функции для работы с оцифрованным сигналом из библиотеки `scipy` на языке Python (см. приложение 1). Для определения пиков пульсовой волны использована функция поиска локальных экстремумов. При этом свойствами локальных максимумов обладают пики прямой и отраженной пульсовой волны, а также случайные колебания, не связанные с ударом сердца. Поскольку интерес для исследования представляют только наиболее выраженные пики, отражающие прямую пульсовую волну, необходимо определить порог для отсеечения незначимых колебаний. Для этой задачи был использован показатель выпуклости (*prominence*), определяемый как вертикальное расстояние от высочайшей точки пика до уровня соседнего локального минимума с большим абсолютным значением.

Выбор порога был сделан на основании распределения показателя выпуклости всех пиков в пределах одной записи. Распределение оказалось бимодальным с большой группой пиков низкой выпуклости, меньшей группой максимально выпуклых пиков и отсутствием промежуточных значений. Эмпирически было выявлено, что значение, превышающее среднее значение на 1 стандартное отклонение, позволяет отделить пики, по выпуклости существенно превосходящие большинство. При таком пороге могут быть упущены единичные пики прямой пульсовой волны со сниженной амплитудой, однако в соотношении с верно определенными колебаниями число ошибок невелико. Преимуществом такого порога является его независимость от абсолютных значений ФПГ, существенно варьирующихся между участниками эксперимента.

4. Выделение кардиогенной активности с помощью метода независимых компонент

Анализ был проведен с помощью алгоритма быстрого разложения на независимые компоненты FastICA с сохранением всех параметров, установленных по умолчанию, за исключением количества компонент, которые должны быть выделены (сайт <https://mne.tools/stable/generated/mne.preprocessing.ICA.html>). Для разложения на независимые компоненты были использованы двухсекундные фрагменты ЭЭГ, включающие секунду до пика пульсовой волны и секунду после. Из анализа были удалены фраг-

менты, по амплитуде отличающиеся от среднего более чем на 4 стандартных отклонения. Для повышения качества модели независимых компонент записи были дополнительно отфильтрованы в диапазоне 3–40 Гц. Полученная модель применялась к записям, отфильтрованным в диапазоне 0.5–40 Гц. Для коротких записей были построены модели с подбором оптимального количества компонент для объяснения 99% дисперсии сигнала. Для записей, включающих большое количество фрагментов, были построены модели с фиксированным количеством независимых компонент, позволяющие сократить время обработки. Сравнение моделей с фиксированным количеством компонент показало, что модели с 40 и с 60 компонентами дают одинаково хороший результат при удалении артефактов. Тем не менее считается, что соотношение сигнала и шума лучше в моделях, где количество независимых компонент меньше количества отведенных записей, поэтому в анализе будет рассмотрена модель с 40 независимыми источниками, выделенными из 63-канальной энцефалограммы (рис. 4 (а)). Для каждого участника эксперимента компоненты, содержащие артефакты, выбирались вручную. Помимо компонент с кардиогенной активностью на этом этапе также удалялись компоненты, содержащие глазодвигательную активность.

Задача 1. Выбор независимых компонент, содержащих кардиогенную активность

При принятии решения об отнесении компонент к ЭКГ-артефактам оценивалась ее пространственная локализация, частотный спектр и форма потенциала, полученного при усреднении данной компоненты по всем фрагментам записи. Для ЭКГ-артефактов характерна периферическая локализация (при этом на топографии источник может быть вынесен за пределы головы), а также сходство усредненного потенциала с QRS-комплексом и наличие выраженного пика амплитуды, соответствующего R-зубцу (MNE/tutorials/Repairing artifacts with ICA, сайт URL: <https://mne.tools/stable/index.html>). Примеры таких компонент приведены на рис. 4 (б), 5 (а, в)).

Задача 2. Определение влияния количества фрагментов на модель независимых компонент

Для ответа на вопрос о минимальном количестве фрагментов, необходимом для выделения кардиогенных артефактов, рассмотрим результаты усреднения 1326, 150 и 100 фрагментов записи XX033. Можно увидеть, что по мере умень-

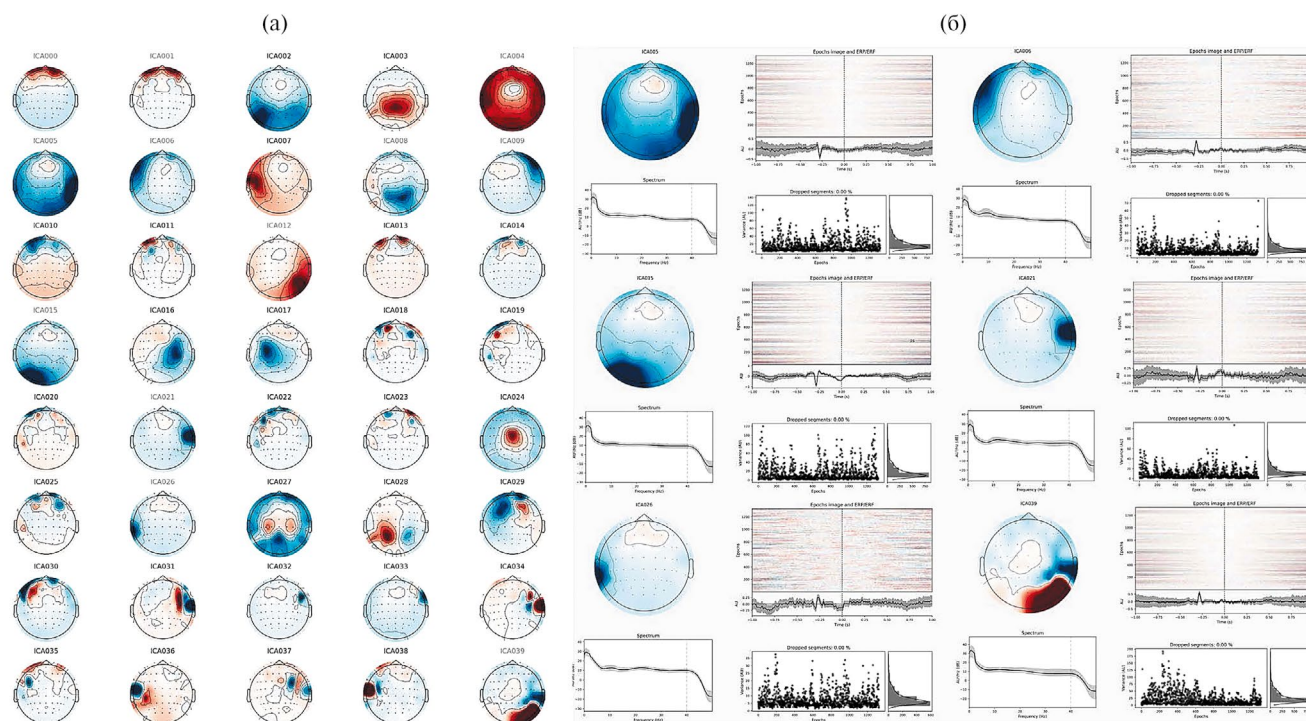


Рис. 4. 40 независимых компонент (НК), выделенных из энцефалограммы XX033 (а). Серым цветом выделены названия компонент, содержащих глазодвигательную (0 и 1) и кардиогенную (4, 5, 6, 8, 9, 12, 21, 26, 39) активность. Топография, усредненный потенциал, частотный спектр и вариабельность сигнала в разных сегментах для компонент, содержащих кардиогенную активность (б).

Fig. 4. 40 ICs extracted from encephalogram XX033 (a). ID numbers of ICs with eye movement (0 and 1) and ECG (4, 5, 6, 8, 9, 12, 21, 26, 39) artifacts are grayed out. Topography, averaged epochs, frequency spectrum and signal variability among epochs of ICs with ECG artifacts (b).

шения количества фрагментов уменьшается отношение амплитуды R-зубца к амплитуде мозгового сигнала, хотя он различим даже при усреднении 100 фрагментов (рис. 3 (а–в)).

Для записи, включающей 100 ЭЭГ-фрагментов, была построена модель с количеством независимых компонент, объясняющим 99% дисперсии сигнала. Такая модель занимает больше времени, чем модели с фиксированным количеством компонент, однако обладает меньшей размерностью и лучшим соотношением сигнала и шума. Среди выделенных независимых компонент нашлись компоненты с характерными для ЭКГ локализацией, спектром и формой потенциала (рис. 5 (а)). Тем не менее после удаления этих компонент в записи остается выраженный R-зубец, по локализации не совпадающий ни с одной из компонент (рис. 3 (б), 5 (б)). Этот результат показывает, что 100 фрагментов недостаточно для выделения из электроэнцефалограммы сердечной активности в полном объеме.

При увеличении количества фрагментов до 150 количество компонент с сердечной активностью

сократилось до 6 (рис. 5 (в)). В результате удаления этих компонент R-зубец стал неразличимым на усреднении фрагментов (рис. 3 (в)). Таким образом, визуальный анализ усреднения фрагментов показывает, что 150 фрагментов достаточно для разделения сердечной и мозговой активности на ЭЭГ.

Задача 3. Обоснование необходимости регистрации ФПГ для выделения кардиогенной активности из ЭЭГ с помощью метода независимых компонент

Для отделения мозговой активности от сердечной с помощью метода независимых компонент большое значение имеет выбор именно синхронизированных с пульсовой волной фрагментов ЭЭГ. При выделении независимых компонент из не сегментированной энцефалограммы или из двухсекундных фрагментов, следующих друг за другом и не связанных с ФПГ, независимые компоненты могут иметь характерную периферическую локализацию и низкочастотный диапазон, однако при отсутствии точки отсчета, связанной с сердечной деятельностью,

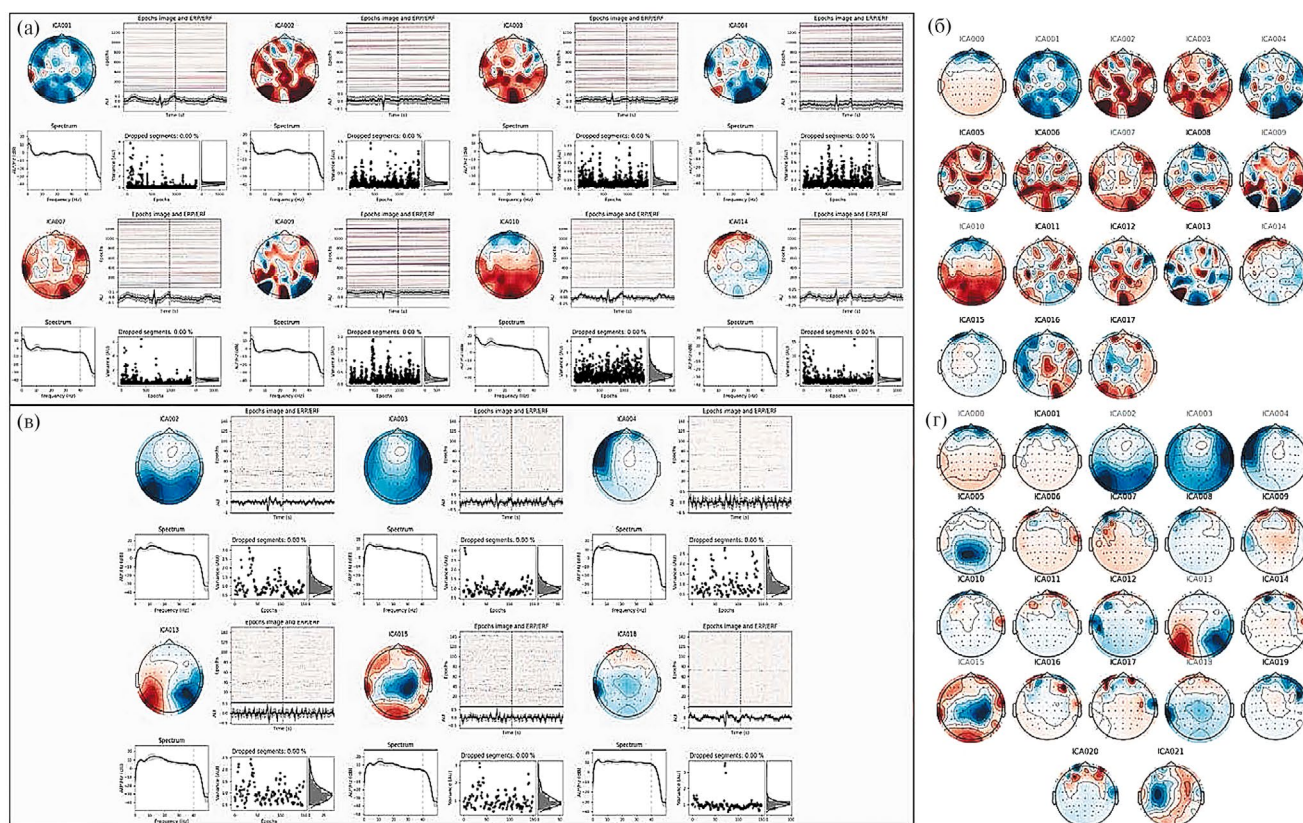


Рис. 5. Все НК, выделенные на основе 100 (б) и 150 (г) фрагментов ЭЭГ XX033. Серым цветом выделены названия НК, предположительно содержащих глазодвигательную и сердечную активность. НК, предположительно содержащие сердечную активность, выделенные на основе 100 (а) и 150 (в) фрагментов энцефалограммы XX033, синхронизированных с ФПГ.

Fig. 5. All ICs, extracted from 100 (б) and 150 (г) epochs of encephalogram XX033. ID numbers of ICs, supposed to contain eye movement and cardiac artifacts are grayed out. ICs, supposed to contain cardiac activity, extracted from 100 (а) and 150 (в) epochs, synchronized with PPG in encephalogram XX033.

мы не имеем возможности получить усредненный сигнал и оценить его форму (см. приложение 2, 3).

При применении МНК к нефрагментированной ЭЭГ среди независимых компонент также не выделяется источников с выраженным сердцебиением, что не позволяет применить алгоритм выставления меток для поиска ВПС.

Отметить удары сердца без фотоплетизмограммы возможно только в записях, где кардиогенная активность выражена на ЭЭГ-отведениях. В качестве примера приведена запись DM017, сделанная во время выполнения задания на оценку времени. В таком случае с помощью алгоритма поиска пиков можно отметить удары сердца по выделенной независимой компоненте с сердечной активностью (см. приложение 4). Однако метод, предполагающий выбор наиболее выраженных колебаний в сигнале на основе оценки дисперсии амплитуды пиков, чувствитель-

лен к артефактам на ЭЭГ. Мышечные артефакты содержат пики с увеличенной амплитудой, из-за чего порог, соответствующий одному стандартному отклонению от среднего, повышается так, что его не проходят удары сердца с относительно низкой амплитудой. Метки при этом ставятся на сигнал, не включающий удар сердца, и не попадают на настоящий удар (см. приложение 5). Поскольку мышечные артефакты многократно встречаются в записях и существенно различаются по интенсивности, устранить их можно только с помощью разметки вручную, что не позволяет полностью автоматизировать обработку. Кроме того, физические и мышечные артефакты отражаются и на независимых компонентах, поэтому при применении алгоритма к источникам, выделенным с помощью МНК, также происходит ошибочное выделение ударов сердца. Таким образом, выделение сердцебиения для усреднения ВПС возможно без ФПГ, но только для немногочисленных записей, где удары сердца от-

четливо видны при визуальной оценке. При этом результаты применения алгоритма менее точны из-за ЭЭГ-артефактов, которых существенно меньше на ФПГ.

5. Синхронизация фрагментов ЭЭГ с R-зубцом ЭКГ с учетом межиндивидуальной variability

Наиболее распространенным вариантом изучения ВПС является синхронизация ЭЭГ с R-зубцом кардиограммы. Чтобы синхронизировать полученные фрагменты именно с R-зубцом, нужно измерить промежуток между R-зубцом и пиком пульсовой волны. Усреднение фрагментов ЭЭГ, связанных с пиком пульсовой волны, позволяет определить латентность R-зубца с точностью до миллисекунд: зубец на усредненном потенциале отчетливо виден как выраженный пик нехарактерной для ЭЭГ амплитуды. Вычисленный промежуток вычитается из латентности пика ФПГ. Поскольку длительность интервала имеет индивидуальную variability (0.315 ± 0.027 , минимум 0.28 с, максимум 0.37 с), для каждого участника этот интервал был вычислен отдельно (см. приложение 6). При этом одновременная регистрация ЭКГ и ФПГ у участника DM024 показала, что у отдельного человека интервал между R-зубцом и пиком пульсовой волны ФПГ является постоянной величиной с маленькой дисперсией (ср. 0.3 ± 0.012 , медиана 0.3) (см. приложение 7).

6. Усреднение ВПС по группе и пространственная фильтрация методом “плотность источника тока”

Одним из способов повышения точности локализации сигнала является пространственная фильтрация. Эта процедура позволяет уменьшить искажение сигнала, возникающее при прохождении через ткани головы (“эффект объемной проводимости”), а также оценить интенсивность сигнала независимо от референтного электрода. Восстановление источника сигнала происходит на основе данных об интенсивности сигнала, его распределения между соседними отведениями, заданных параметрах модели формы головы и проводимости твердых и мягких тканей. В более подробных моделях может быть включена информация об индивидуальной локализации электродов каждого участника. С определенными допущениями пространственная фильтрация используется для различения собственно мозговой активности и артефактов на ЭЭГ.

В данном исследовании был использован фильтр “плотность источника тока” (current source density, CSD), реализованный в программ-

ной среде MNE с сохранением всех параметров, установленных по умолчанию (сайт: https://mne.tools/dev/generated/mne.preprocessing.compute_current_source_density.html). Этот фильтр позволяет определить по пространственным характеристикам сигнала, расположен ли его источник внутри головы или на поверхности. Предполагается, что широкое пространственное распределение имеет сигнал, искаженный объемной проводимостью или расположенный вне головы, в то время как истинно мозговая активность регистрируется в небольшой группе отведений. В данной работе был использован пространственный фильтр CSD на основе оператора Лапласа, в котором рассчитывается расстояние между электродами на сферической голове без учета проводимости тканей. Процедура фильтрации была проведена для каждой записи после выделения ВПС по описанному выше алгоритму.

В каждой из записей, включенных в анализ, были обнаружены компоненты с характерными признаками сердечных артефактов, хотя их количество варьировалось (от 5 до 11, среднее 7.3 ± 2.4).

При усреднении вызванных потенциалов 21 участника было выявлено повышение амплитуды сигнала в париетальных, затылочных и центральных отведениях на 0.5 микровольт, достигающее максимума в промежутке 100–250 мс после R-зубца (рис. 6 (а)).

Применение фильтра CSD показало, что наиболее узкую пространственную локализацию имеет активность центральных отведений: Cz, C1, C2, CPz, CP1, CP2 (рис. 6 (б–в)). Статистический анализ с помощью одновыборочного Т-критерия показал, что в этих отведениях значимое понижение амплитуды наблюдается в интервале 0–200 мс после удара сердца, а значимое повышение — в интервале 250–500 мс после удара сердца, что согласуется с данными, описанными в литературе (рис. 6 (г)).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате применения представленного алгоритма был получен потенциал, который по амплитудно-временным характеристикам соответствует мозговому потенциалу, связанному с сердцебиением (ВПС), описанному в предыдущих исследованиях: максимальный подъем амплитуды зарегистрирован в центральных отведениях в пределах 400 мс после R-зубца (Coll, 2021). В отличие от кардиогенных артефактов, для кото-

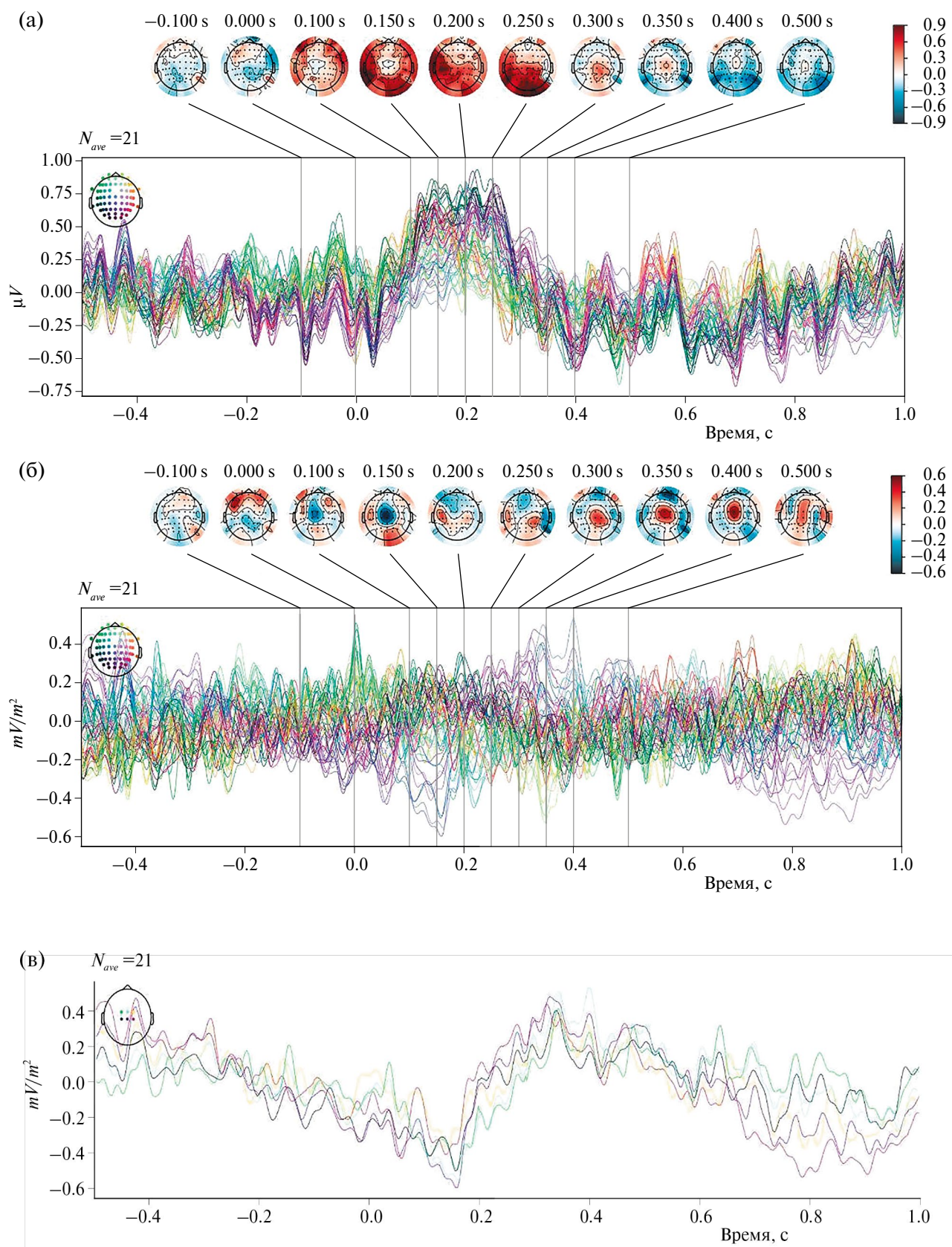


Рис. 6 (начало).

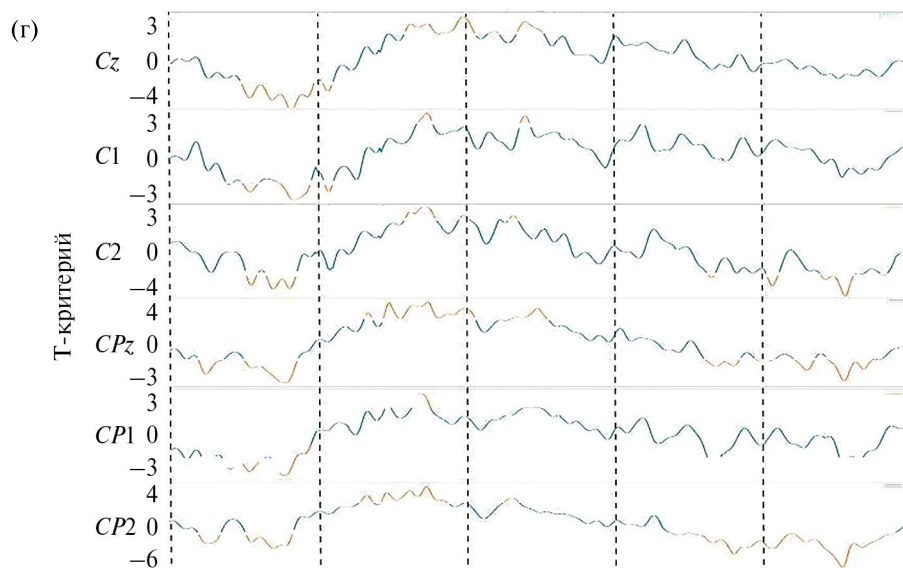


Рис. 6 (продолжение). Потенциал, связанный с R-зубцом кардиоцикла, усредненный по группе до (а) и после (б) применения CSD. Потенциал, связанный с R-зубцом кардиоцикла (в), и графики Т-критерия различий амплитуды в отведениях Cz, C1, C2, CPz, CP1, CP2 после применения CSD (г). Оранжевым цветом выделены интервалы, где различия по сравнению с 0 значимы на уровне 0.05.

Fig. 6. Group average of evoked potential associated with R-peak before (a) and after (б) CSD transformation. Group average of evoked potential associated with R-peak (в) and plots of T-value of amplitude increase in electrodes Cz, C1, C2, CPz, CP1, CP2 after CSD transformation (г). Time intervals, where p-value < 0.05 are orange-coloured.

рых характерна широкая пространственная локализация, этот сигнал регистрируется в небольшой группе отведений, а значит, с большой вероятностью его источником является мозг. Кроме того, локализация сигнала в центральных отведениях не характерна для сердечных артефактов, которые обычно регистрируются в затылочных и височных отведениях. Таким образом, обнаруженное повышение амплитуды в фрагментах ЭЭГ, синхронизированных с R-зубцом, можно считать мозговым ответом на сердцебиение. Возможность выделения ВПС из записи, в которой присутствуют кардиогенные артефакты, показывает, что метод независимых компонент подходит для задач удаления кардиогенных артефактов.

Для успешного применения МНК необходимо одновременное с ЭЭГ измерение пульса, поскольку без сопоставления с сердцебиением из большинства записей не выделяются независимые компоненты с кардиогенной активностью (Raimondo, 2017). Синхронизация с ФПГ позволила выделить компоненты с артефактами из всех записей, независимо от того, прослеживалось ли сердцебиение на энцефалограмме. При этом временного разрешения ФПГ оказалось достаточно для обнаружения R-пика с точностью до десятков миллисекунд, но для усреднения

ВПС необходима дополнительная корректировка латентности. Более простая и точная процедура синхронизации с сердцебиением и поиска артефактной активности возможна при регистрации непосредственно ЭКГ, однако для участника такая организация эксперимента связана с ограничениями движений. Таким образом, выбор оптимального метода регистрации сердцебиения зависит от технических возможностей и целей эксперимента: ФПГ позволяет повысить экологическую валидность, но усложняет этап обработки сигнала, в то время как регистрация ЭКГ более сложна технически, но допускает более точный анализ сигнала.

Регистрации 63-канальной ЭЭГ достаточно для выделения компонент, однозначно содержащих сердечную активность. Качество модели зависит от количества усреднений: для удаления всей визуально заметной сердечной активности стоит использовать записи по меньшей мере со 150 фрагментами с ударом сердца. Для точной синхронизации с R-зубцом важно учитывать индивидуальную вариабельность скорости распространения пульсовой волны. При соблюдении этих условий метод независимых компонент позволяет удалить из записи кардиогенную актив-

ность, сохранив сигнал, отражающий корковый отклик на удар сердца.

Одним из недостатков МНК является потеря существенной части мозгового сигнала при удалении большого количества компонент. Однако эта проблема неизбежна для всех подходов к разделению сигнала: при применении вейвлет-преобразования теряется высокочастотная составляющая сигнала, а при вычитании источников по усредненному шаблону ЭКГ-волны хуже сохраняются низкочастотные (Abtahi, 2014). При использовании МНК улучшение соотношения сигнала и шума возможно за счет предварительной фильтрации записей, удаления зашумленных отведений и артефактов.

К недостаткам метода независимых компонент также относится отсутствие однозначного определения компонент, содержащих артефакты. В связи с этим результат очищения записи всегда зависит от субъективных критериев исследователя, что усложняет сопоставление результатов независимых экспериментов. Вероятно, это затруднение будет преодолено с помощью автоматических алгоритмов классификации независимых компонент. В частности, не так давно начала работу онлайн-платформа автоматической разметки независимых компонент в ЭЭГ (Automatic Labeling of Independent Components in Electroencephalography, ALICE), одной из целей которой является распознавание различных ЭЭГ-артефактов с помощью машинного обучения на основе данных, обработанных экспертами (Soghoian et al., 2021). При этом базу данных для обучения алгоритма составляют компоненты, выбранные вручную из настоящих записей. Хотя в настоящее время классификация компонент независимыми исследователями не является объективной, она играет важную роль для обучения объективных алгоритмов. Таким образом, разногласия между оценками независимых исследователей могут быть снижены благодаря систематизированному накоплению и сопоставлению результатов обработки ЭЭГ-сигнала.

Пространственная фильтрация сигнала может быть использована как самостоятельный способ удаления кардиогенных артефактов из ЭЭГ (Terhaar, 2012). Однако она приводит к исключению из анализа любого сигнала с широкой локализацией, существенную часть которого составляет собственная мозговая активность. Фильтр Лапласа дает возможность предположить источник сигнала на основе его простран-

ственной локализации, однако для анализа характеристик мозгового потенциала более информативен неотфильтрованный сигнал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере записи одного репрезентативного участника эксперимента представлен алгоритм выделения кардиогенных артефактов из энцефалограммы с помощью синхронизации с фотоплетизмограммой и применения метода независимых компонент. Эмпирически показано, что для корректного применения алгоритма желательно включить в анализ более 150 фрагментов с ударами сердца. При анализе 21 участника эксперимента с помощью разработанного алгоритма выявлена межиндивидуальная вариативность интервала между R-зубцом и пиком пульсовой волны на ФПГ, что обуславливает необходимость корректировки латентности ВПС индивидуально для каждой записи. С помощью пространственного фильтра Лапласа показано, что выделенный сигнал имеет мозговую локализацию и не является кардиогенным артефактом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 22-18-00676.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Дополнительные материалы см. <https://jvnd.ru/supplemental-materials/>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abtahi F., Seoane F., Lindecrantz K., Löfgren N. Elimination of ECG Artefacts in Fetal EEG Using Ensemble Average Subtraction and Wavelet Denoising Methods: A Simulation. XIII Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing 2013. 2014. 41: 551–554.
- Azzalini D., Rebollo I., Tallon-Baudry C. Visceral Signals Shape Brain Dynamics and Cognition. Trends in Cognitive Sciences. 2019. 23 (6): 488–509.
- Coll M., Hobson H., Bird G., Murphy J. Systematic review and meta-analysis of the relationship between the heartbeat-evoked potential and interoception. Neurosci Biobehav Rev. 2020. 122: 190–200.
- Dai C., Wang J., Xie J., Li W., Gong Y., Li Y. Removal of ECG Artifacts from EEG using an Effective Recursive Least Square Notch Filter. IEEE Access. 2019. 7: 158872–158880.
- MNE/tutorials/RepairingartifactswithICA[сайт]. URL: https://mne.tools/stable/auto_tutorials/preprocessing

- /40_artifact_correction_ica.html (дата обращения: 17.10.23).
MNE/tools/preprocessing/ICA [сайт]. URL: <https://mne.tools/stable/generated/mne.preprocessing.ICA.html>
MNE/tools/preprocessing/Compute_current_source_density https://mne.tools/dev/generated/mne.preprocessing.compute_current_source_density.html
- Montoya P., Schandry R., Müller A. Heartbeat evoked potentials (HEP): topography and influence of cardiac awareness and focus of attention. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1993. 88 (3): 163–172.
- Park H.D., Blanke O. Heartbeat-evoked cortical responses: Underlying mechanisms, functional roles, and methodological considerations. *NeuroImage*. 2019. 197: 502–511.
- Petzschner F.H., Weber L.A., Wellstein K.V., Paolini G., Do C.T. et al. Focus of attention modulates the heartbeat evoked potential. *NeuroImage*. 2019. 186: 595–606.
- Pollatos O., Schandry R. Accuracy of heartbeat perception is reflected in the amplitude of the heartbeat-evoked brain potential. *Psychophysiology*. 2004. 41 (3): 476–482.
- Raimondo F., Rohaut B., Demertzi A., Valente M., Engemann D.A., Salti M. et al. Brain-heart interactions reveal consciousness in noncommunicating patients. *Annals of neurology*. 2017. 82 (4): 578–591.
- Jammal Salameh L., Bitzenhofer S.H., Hanganu-Opatz I.L., Dutschmann M., Egger V. Blood pressure pulsations modulate central neuronal activity via mechanosensitive ion channels. *Science*. 2024. 383 (6682).
- Soghoyan G., Ledovsky A., Nekrashevich, Martynova M., Polikanova O., Portnova I., et al. A Toolbox and Crowdsourcing Platform for Automatic Labeling of Independent Components in Electroencephalography. *Frontiers in neuroinformatics*. 2021. 15: 720229.
- Terhaar J., Viola F.C., Bär K.J., Debener S. Heartbeat evoked potentials mirror altered body perception in depressed patients. *Clinical neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*. 2012. 123 (10): 1950–1957.
- Zaccaro A., Perrucci M.G., Parrotta E., Costantini M., Ferri F. Brain-heart interactions are modulated across the respiratory cycle via interoceptive attention. *NeuroImage*. 2022. 262: 119548.

IDENTIFICATION OF NEUROPHYSIOLOGICAL MARKERS OF INTEROCEPTIVE SIGNALS USING THE EVENT-RELATED POTENTIAL TECHNIQUE

E. D. Slovenko^{a, #}, O. V. Sysoeva^{a, b}

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

^b Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

[#]e-mail: ekaterinaslovenko@gmail.com

The paper is devoted to presentation and assessment of the algorithm for extraction of heartbeat evoked potential (HEP) using the independent component analysis (ICA). The algorithm includes simultaneous recording of electroencephalogram (EEG) and photoplethysmogram (PPG), selection the EEG-epochs, related to the peak of the PPG pulse wave, separation of cardiac and brain activity in the epochs using the independent component analysis (ICA), synchronization the epochs with the R-wave of the cardiogram. Current source density (CSD) transformation was applied to establish the localization of the extracted potential. The algorithm was tested on 21 subjects and revealed a characteristic increase in evoked potential amplitude between 0 and 400 ms after a heartbeat.

Application of independent component analysis and spatial filtering to EEG epochs, synchronized with PPG recording of heartbeat, allows to extract the heartbeat evoked potential, separately from cardiac field artifact.

Keywords: heartbeat evoked potential, independent component analysis, EEG, PPG

УДК 612.821

ВЫЗВАННЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ НА ДВИЖЕНИЕ ЗВУКОВЫХ СТИМУЛОВ ПРИ МЕЖУШНЫХ РАЗЛИЧИЯХ ПО ИНТЕНСИВНОСТИ

© 2024 г. Л. Б. Шестопалова*, Е. А. Петропавловская

ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: shestopalovalb@infran.ru; shestolido@mail.ru

Поступила в редакцию 16.01.2024 г.

После доработки 15.02.2024 г.

Принята к публикации 11.03.2024 г.

Исследованы вызванные потенциалы мозга человека в ответ на начало движения звукового стимула (motion-onset response, MOR), созданного за счет линейных изменений межушных различий по интенсивности (ΔI). Структура MOR при изменении ΔI совпадала с описанными в литературе ответами, полученными при изменении межушных различий по времени. Амплитуда компонента cN1 увеличивалась со скоростью движения, независимо от его направления, а компонента cP2 — только при движении от центра к периферии. Амплитуда компонентов cP1 и cN2 не зависела от скорости движения. Центробежное движение вызывало больший ответ, чем центростремительное, что соответствует полусферной модели латерализации (модели оппонентных каналов). В характеристиках потенциала MOR информация о направлении движения (к центру или к периферии) отражалась в более широком временном интервале, чем информация о скорости.

Ключевые слова: пространственный слух, межушные различия по интенсивности, вызванные потенциалы, ответ на начало движения

DOI: 10.31857/S0044467724030056

Электрофизиологическая реакция мозга человека на движение источника звука наиболее корректно выделяется из вызванного потенциала при стимуляции в парадигме отсроченного движения, предполагающей разнесение во времени момента включения сигнала и момента начала движения. Первые попытки исследовать отдельно суммарный потенциал, вызванный изменением пространственных признаков, отставленным во времени относительно включения стимула, были сделаны Sams и соавт. (Sams et al., 1993) и Mäkelä, McEvoy (1996). Движение звуковых образов моделировалось при помощи мгновенного изменения межушных различий по времени (ΔT) в середине стимула (Sams et al., 1993) либо путем введения в середину стимула амплитудно-модулированных участков разной длительности (Mäkelä, McEvoy, 1996). Регистрация суммарных магнитоэнцефалографических потенциалов (МЭГ) позволила обоим группам авторов получить четко выраженные ответы на начало движения или изменение положения, которые не перекрывались с ответами на включение и имели латентность 100–130 мс от начала движения.

Впоследствии парадигма отсроченного движения, созданного за счет ΔT , была усовершен-

ствована при регистрации ЭЭГ (Варфоломеев, Старостина, 2006; Krumbholz et al., 2007). Реакция на начало движения получила название motion-onset response (MOR) и была неоднократно зарегистрирована при разных видах пространственных признаков. Помимо варьирования межушных различий по времени ΔT , субъективное ощущение движения формировали в условиях свободного поля (за счет последовательного переключения динамиков) или с применением передаточных функций головы (head-related transfer functions, HRTF), т.е. частотных характеристик сигнала при разных угловых положениях источника (ΔT : Shestopalova et al., 2021a,b; Шестопалова и др., 2020; свободное звуковое поле: Getzmann, 2011; Getzmann, Lewald, 2011, 2012; Kreitewolf et al., 2011; Grzeschik et al., 2016; Sarrou et al., 2018; передаточные функции головы: Getzmann, 2009; Grzeschik et al., 2010, 2013).

Основными компонентами потенциала MOR считаются раннее негативное и позднее позитивное колебание (“change”-N1, cN1, и “change”-P2, cP2 соответственно). Ответ на начало движения имеет большую латентность, чем ответ на включение стимула. Амплитуда и ла-

тентность этой реакции тесно коррелируют с уровнем субъективного различения и зависят от различных свойств стимула, таких как скорость и направление движения (Getzmann, 2009, 2011; Getzmann, Lewald, 2010). Зависимость характеристик MOR от скорости движения изучена при создании пространственных эффектов при помощи передаточных функций головы (Getzmann, 2009). Потенциал MOR был тем более выраженным и ранним, чем выше была скорость стимула, причем значимый эффект скорости был обнаружен и для амплитуды, и для латентности обоих его основных компонентов (сN1 и сP2). Ранний позитивный компонент сP1 от скорости не зависел. Аналогичные зависимости MOR от скорости движения получены при движении стимулов за счет линейных изменений ΔT (Shestopalova et al., 2021a, b; Шестопалова и др., 2020). Исследование взаимосвязи MOR и направления движения в условиях свободного звукового поля показало, что MOR локализован преимущественно в полушарии, контралатеральной стимуляции, но контралатеральное преобладание компонента сN1 зависело от положения начальной точки, а компонента сP2 — от направления движения (Getzmann, 2011). Аналогичных данных относительно потенциала MOR, вызванного движением, созданным за счет межушных различий по интенсивности (ΔI), в литературе нет. Настоящее исследование направлено на восполнение этого пробела.

Сравнение реакций на движение к центру и к периферии имеет важный теоретический аспект: оно традиционно применяется в экспериментах, направленных на изучение нейронального кодирования слухового пространства. Существуют две основные модели кодирования латерализации: топографическая модель (place code model), предполагающая упорядоченную узкую настройку нейронных популяций на определенные положения источника звука (Joris et al., 1998), и “полусферная модель” (hemifield model), которая основывается на соотношении активности двух противоположных популяций, имеющих широкую настройку на левое и правое акустическое полупространство (Salminen et al., 2009). Полусферная модель также носит название opponent-channel model (модель оппонентных каналов). Согласно этой модели, смещение звукового образа от центра к периферии (т.е. по направлению к рецептивному полю) вызывает больший ответ, чем смещение к центру. Экспериментальные подтверждения полусферной модели получены при записи ВП (Magezi, Krumbholz, 2010; Briley et al., 2013).

В литературе продолжается дискуссия по поводу того, справедлива ли полусферная модель в равной степени для разных видов локализационных признаков. Истоки этой дискуссии связаны с вопросом о том, в каких отделах слуховой системы кодирование положения за счет ΔI или ΔT является параллельным (независимым), а в каких — интегрированным. С одной стороны, имеются свидетельства в пользу интеграции признаков уже на уровне ствола мозга (Riedel, Kollmeier, 2002). С другой стороны, накоплены данные о независимой обработке ΔI и ΔT вплоть до слуховой коры (Ungan et al., 2001; Tardif et al., 2006). Более позднее исследование (Edmonds, Krumbholz, 2014) показало, что слуховая кора осуществляет интегрированное кодирование латерализации звукового образа, но в то же время сохраняет и независимую информацию относительно ΔI и ΔT . Наконец, в работе Salminen и соавт. (Salminen et al., 2015) методом избирательной пространственной адаптации было подтверждено наличие кортикальных популяций нейронов, чувствительных одновременно к обоим признакам — как к ΔI , так и к ΔT . Эти результаты стали аргументом в пользу интегрированного представления обоих признаков в слуховой коре, но все же не дали определенного вывода относительно справедливости полусферной модели для стимулов с ΔI и ΔT .

Таким образом, изучение реакции на движение к центру и к периферии за счет ΔI может дать новую информацию относительно нейронального кодирования акустического пространства. Кроме того, стимулы с движением, созданным за счет ΔI , представляют особый интерес при моделировании акустических сцен с несколькими конкурирующими источниками звука, поскольку при наложении сигналов с разными паттернами ΔI не возникают изменения их взаимной корреляции. Перед настоящим исследованием была поставлена задача создать стимулы с линейными изменениями ΔI и изучить свойства потенциала MOR, вызванного движением с разной скоростью и в разных направлениях в левой и правой половине акустического пространства. Впервые будут получены данные о зависимости MOR от скорости при движении к центру и к периферии. Если в результате будет наблюдаться более выраженный MOR при движении от центра к периферии, чем в обратном направлении, это будет свидетельствовать о справедливости полусферной модели латерализации (модели оппонентных каналов) для отсроченного движения стимулов, созданного за счет ΔI .

МЕТОДИКА

Этические нормы. 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.

Условия эксперимента и испытуемые. До участия в экспериментах все испытуемые проходили предварительное тестирование — опрос о состоянии здоровья, стандартную процедуру тональной аудиометрии и тест для определения коэффициента праворукости (Доброхотова, Брагина, 1994). Был установлен следующий критерий нормального слуха: отклонение монауральных порогов слышимости от популяционной кривой менее чем на 10 дБ в диапазоне частот от 125 Гц до 10 кГц, при разнице порогов левого и правого уха не более 10 дБ в частотном диапазоне ниже 500 Гц, 5 дБ от 500 до 1500 Гц и 10 дБ выше 2 кГц. 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 и без истории неврологических заболеваний (по отчетам испытуемых).

Во время экспериментов испытуемые располагались в кресле внутри экранированной звукоизолированной камеры. Испытуемым дихотическим способом предъявлялись звуковые сигналы, и при этом велась запись электроэнцефалограммы (ЭЭГ). Во время звуковой стимуляции испытуемые читали книгу по своему выбору. Подробное описание синтеза сигналов и процедуры эксперимента изложено в нашей предыдущей работе (Шестопалова и др., 2022). Ниже приведены только наиболее важные сведения.

Стимулы. Исходными сигналами служили отрезки белого шума, синтезированные с частотой дискретизации 96 кГц и фильтрованные в полосе 200–10 000 Гц. Звуковые стимулы 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). Звуководы излучателей фиксировались в слуховых проходах с помощью

ушных вставок, которые обеспечивали подавление внешних шумов на 30 дБ.

Пространственное положение стимулов задавалось величиной межушных различий по интенсивности (ΔI). Стимулы состояли из трех фрагментов, следующих друг за другом без паузы: 1) начального стационарного участка длительностью 1000 мс с постоянной величиной ΔI , равной 0 или ± 10 дБ; 2) участка движения длительностью 200 или 400 мс с линейным изменением ΔI от 0 до ± 10 дБ или от ± 10 до 0 дБ, которое создавалось за счет синхронного нарастания и убывания уровня сигнала на 5 дБ в левом и правом каналах; 3) конечного стационарного участка длительностью 800 или 600 мс соответственно, с постоянной конечной величиной ΔI , равной ± 10 дБ или 0 дБ. Полная длительность стимулов составляла 2000 мс. Они вызывали у слушателей сначала ощущение неподвижного звукового образа, а затем его плавного движения. Расчетные угловые скорости движения стимулов на втором участке, вычисленные на основе соотношения “10 дБ = 90 град”, составили 450 град/с (быстрый) и 225 град/с (медленный) для длительностей участка движения 200 или 400 мс соответственно.

Временная структура эпохи стимуляции показана на рис. 1. Длительность эпохи составляла 9070 мс. В течение каждой эпохи стимул повторялся три раза. Интервал между концом одного стимула и началом следующего составлял 770 мс.

Процедура эксперимента. Стимулы, реакции на которые рассматриваются в настоящей работе, представляли собой контрольные условия (“условия тишины”, т.е. предъявления стимулов в отсутствие акустических помех) в проекте по исследованию маскировки. Измерение монауральных порогов и центрирование звукового образа описаны в предыдущих работах из этого проекта (Шестопалова и др., 2022, 2023). Интенсивность сигнала на обоих каналах устанавливали на уровне 45 дБ над монауральными порогоми слышимости.

Тип экспериментальной серии определялся скоростью движения стимула (медленный, быстрый), т.е. следовал принципу “одна серия — одна скорость”. Чередование серий было рандомизировано индивидуально и по всей группе. Каждая серия включала в себя 4 вида стимулов, в соответствии с направлением движения в его среднем фрагменте (центростремительное — от центра влево или вправо, либо центростремительное — слева или справа к центру). Эпохи с каждым ви-

дом стимулов, звучащих в тишине (без фоновой помехи), повторялись по 3 раза в пределах одной серии, чередуясь в квазислучайном порядке между собой и с другими стимулами (звучавшими на фоне помехи). В течение всей серии опытов каждому из испытуемых предъявляли каждый из видов контрольных эпох 36–39 раз, что соответствовало (с учетом трехкратного повторения стимула внутри эпохи) предъявлению 108–117 сигналов каждого вида.

Межстимульный интервал от начала эпохи до начала следующей был фиксирован и составлял 10 000 мс, включая паузу 930 мс между окончанием одной эпохи и началом следующей. Запись одной серии продолжалась около 8 мин. Каждый испытуемый проходил эксперимент в течение 3 дней с интервалом 1–2 недели.

Регистрация и обработка ЭЭГ. Регистрацию ЭЭГ проводили при помощи хлорсеребряных электродов, в 32 точках по международной системе 10–20, с заменой точек отведения РО3/РО4 на С5/С6. Дополнительные электроды располагали на мочках ушей. Горизонтальную и вертикальную электроокулограммы записывали при помощи электродов, установленных над правым глазом и под левым глазом, ближе к их внешнему краю. Активность регистрировалась с помощью энцефалографа ActiveTwo (BIOSEMI, Голландия) и специально разработанной программы, обеспечивающей фильтрацию сигналов и запись

на жесткий диск компьютера. ЭЭГ оцифровывалась в полосе 0–102 Гц с частотой дискретизации 2048 Гц с последующим понижением до частоты 512 Гц.

Непрерывную запись ЭЭГ разбивали на эпохи длительностью 10 000 мс. Эпохи, содержащие нестереотипные артефакты, удаляли вручную на основе визуального поиска избыточных изменений потенциала в большинстве каналов (не более 2% эпох). После этого вычисляли потенциал в каждом канале относительно усредненного потенциала всех электродов и фильтровали в диапазоне 0.5–45 Гц. Оставшиеся артефакты удаляли при помощи метода анализа независимых компонент (ICA), основанного на алгоритме infomax и реализованного в модуле EEGLab среды MATLAB (Delorme et al., 2007). После устранения артефактов ЭЭГ восстанавливали, и в качестве референса принимали усредненный потенциал электродов на мочках ушей. Затем проводили коррекцию ЭЭГ относительно базовой линии по предстимульному участку длительностью 930 мс перед началом маскера.

Анализ данных. Для получения вызванных потенциалов (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. Формирование выборок для анализа ответов на начало движения (MOR) в каждом отведении происхо-

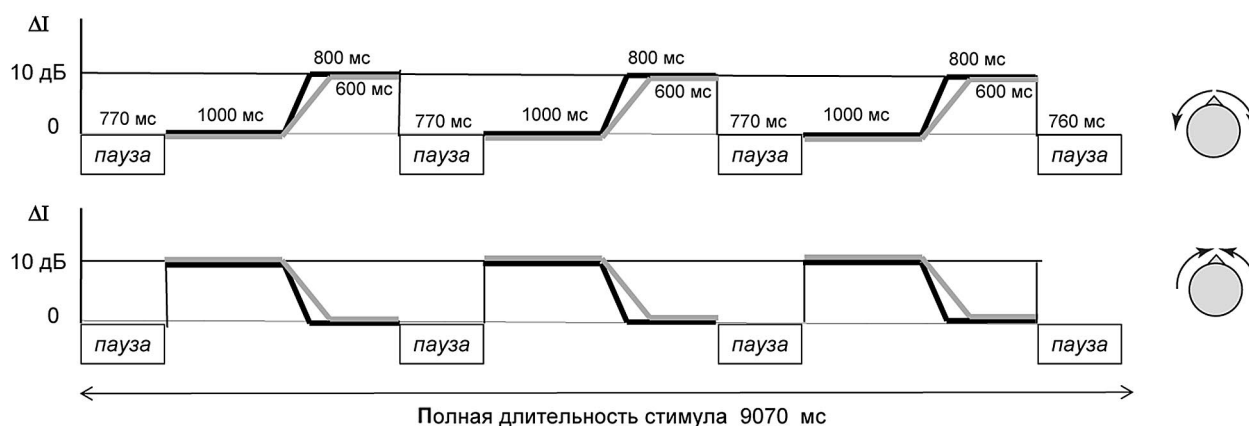


Рис.1. Временная структура эпохи стимуляции в парадигме отсроченного движения. Вверху — движение стимулов влево и вправо от средней линии головы (от центра), внизу — движение слева и справа к центру. Черные линии — быстрое движение, серые — медленное. По оси X — время. По оси Y — межушные различия по интенсивности. Направление движения задается за счет синхронного нарастания и убывания уровня сигнала в левом и правом каналах.

Fig.1. Temporal structure of a single stimulation epoch employed in the delayed motion paradigm. Top row: leftward and rightward sound motion from the head midline (from center). Bottom row: sound motion from left and right to center. Black and grey lines show fast and slow motion, respectively. The X axis is time. The Y axis is interaural level differences (ILDs). The direction of motion is set by synchronously increasing and decreasing the signal level in the left and right channel.

дило следующим образом. Вначале в пределах каждой эпохи выделяли участки, соответствующие реакции на каждое из трех повторений стимула, и усредняли их между собой. Затем усредняли реакции на одинаковые стимулы, предъявляемые в разных сериях. Таким образом были сформированы выборки участков ЭЭГ, содержащих ВП на начало движения, отдельно для каждой скорости и направления движения. Для каждого условия у каждого испытуемого в среднем было отобрано и усреднено 108 ± 1 (среднее $\pm$ ст. ошибка) участков ЭЭГ.

Для анализа эффектов скорости и направления движения индивидуальные записи ЭЭГ усредняли по группе 24 фронтально-центральных 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). Для получения гранд-усредненных потенциалов проводили усреднение по группе в целом. Измеряли индивидуальные амплитуды компонентов cP1, cN1, cP2 и cN2, усредненные в окне шириной 50 мс, центрированном на соответствующем пике гранд-усредненного потенциала, а также величину потенциала на участках длительностью 200 мс перед началом движения, получая потенциал базовой линии. Достоверность выделения каждого из компонентов MOR проверяли при помощи одностороннего парного t-теста, в ходе которого усредненные в окне амплитуды каждого компонента (по индивидуальным данным, $n = 18$) сравнивали со средними значениями потенциала базовой линии (также $n = 18$).

Величины амплитуд подвергали 3-факторному дисперсионному анализу (repeated measures ANOVA, rmANOVA) с факторами Скорость (медленно, быстро), Направление (от центра, к центру) и Сторона (слева, справа). 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

Начало движения стимула вызывало небольшой по амплитуде, но стабильный суммарный ответ во всех экспериментальных условиях (рис. 2).

Помимо основных компонентов MOR (cN1 и cP2), наблюдались также ранний позитивный компонент cP1 и поздний негативный компонент cN2. Достоверность идентификации компонентов MOR при сравнении с базовой линией приведена в табл. 1. Позитивные отклонения cP1 и cP2 достоверно обнаруживались во всех условиях ($p < 0.05$). Негативный компонент cN1 значимо отличался от базовой линии только при быстром движении, а cN2 надежнее обнаруживался при движении от центра, чем к центру.

Влияние скорости и направления движения, а также стороны звучания стимула на амплитуду компонентов MOR оценивали при помощи дисперсионного анализа с повторными измерениями

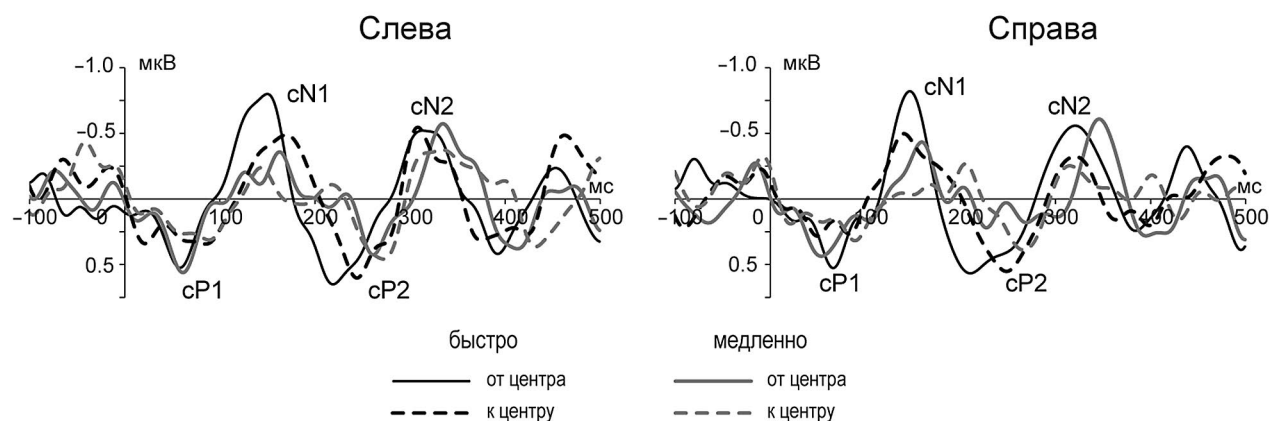


Рис. 2. Реакции на начало движения (MOR) для левосторонних и правосторонних стимулов. Усреднение по группе 24 фронтально-центральных электродов и по всей выборке ($n = 18$). Черные линии – быстрое движение, серые – медленное, сплошные – движение от центра, пунктирные – движение к центру.

Fig. 2. Motion-onset responses (MORs) for the left-side and right-side stimuli. MORs were averaged over 24 frontocentral electrodes and over the whole group of subjects ($n = 18$). Black and gray lines show fast and slow motion, respectively. Solid and dashed lines represent motion from center and to center.

Таблица 1. Временные интервалы, в которых проводилось измерение средних амплитуд компонентов MOR (мс). Звездочками показана значимость отличия средних амплитуд от базовой линии по результатам одностороннего парного t-критерия (17 степеней свободы). Усреднение по 24 фронто-центральных отведениям
Table 1. Time windows used to measure mean amplitudes of the MOR deflections (in ms). Asterisks indicate whether these mean amplitudes differed significantly from the baseline, according to the one-tailed paired t-tests (17 degrees of freedom). The responses were averaged over 24 frontocentral recording sites

Скорость	Траектория	Компонент MOR			
		cP1	cN1	cP2	cN2
Быстро	от Центра Влево	31–81 ***	123–173 ***	193–243 ***	287–337 **
Быстро	от Центра Вправо	39–89 ***	121–171 ***	184–234 ***	295–345 ***
Быстро	Слева к Центру	59–109 ***	143–193 *	217–267 ***	281–331
Быстро	Справа к Центру	24–74 *	113–163 *	223–273 ***	293–343
Медленно	от Центра Влево	35–85 ***	137–187	234–284 **	309–359 *
Медленно	от Центра Вправо	27–77 ***	133–183	201–251 *	318–368 **
Медленно	Слева к Центру	63–113 **	119–169	246–296 ***	307–357 *
Медленно	Справа к Центру	63–113 *	180–230	240–290 ***	289–339

Примечание. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.
Note. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(repeated measures ANOVA, gmANOVA, табл. 2). Факторами анализа были Скорость (медленно, быстро), Направление (от центра, к центру) и Сторона (слева, справа). Сторона звучания стимула (слева или справа от средней линии головы) не оказывала достоверного влияния ни на один из компонентов MOR ($p > 0.05$), поэтому для иллюстрации результатов статистического анализа данные для левой и правой стороны были усреднены (рис. 3, 4). На рис. 4 представлены средние амплитуды компонентов MOR для быстрого и медленного движения (черные и серые столбики) по направлению к центру и периферии. Статистически значимые различия по фактору скорости показаны сплошными линиями со стрелками, а по фактору направления – горизонтальным пунктиром.

Амплитуда компонента cP1 не зависела ни от скорости, ни от направления, ни от стороны звучания стимула ($p > 0.05$). Для амплитуды cN1 выявлены главные эффекты Скорости и Направления ($F(1, 17) = 22.07, p < 0.001$ и $F(1, 17) = 9.97, p < 0.01$), в отсутствие значимых взаимодействий ($p > 0.05$). Главные эффекты были связаны с тем, что быстрое движение вызывало больший ответ

cN1, чем медленное, а движение от центра – больший ответ, чем к центру. Последующий анализ проводили на основе попарных сравнений по каждому фактору в отдельности, т.к. стояла задача подтвердить эффект направления при разных скоростях. Попарные сравнения показали, что эффект Направления достигал значимости только за счет ответов на быстрое движение, так как в случае медленного движения реакции на движение от центра и к центру не различались ($p > 0.05$). Эффект Скорости был значимым для обоих направлений движения ($p < 0.001$ при движении от центра и $p < 0.05$ при движении к центру).

Для амплитуды cP2 был выявлен единственный главный эффект Скорости ($F(1, 17) = 17.52, p < 0.001$), также связанный с большим ответом на быстрое движение, в отсутствие значимых взаимодействий ($p > 0.05$). Согласно попарным сравнениям, эффект Скорости достигал значимости только для ответов на движение от центра ($p < 0.001$).

Для амплитуды cN2 обнаружен единственный главный эффект Направления ($F(1, 17) = 5.94,$

Таблица 2. Результаты (F и η^2) 3-факторной rmANOVA средних амплитуд компонентов cP1, cN1, cP2 и cN2 потенциала MOR. Факторами ANOVA были Скорость (медленно, быстро), Направление (от центра, к центру) и Сторона (слева, справа). Степени свободы $df = (1, 17)$ (df эффекта и df ошибки). Все поправки Гринхауза–Гайссера были равны единице.

Звездочками обозначены уровни значимости: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

Table 2. The results (F and η^2) of 3-ways rmANOVA for mean amplitudes of cP1, cN1, cP2 and cN2 MOR components. The ANOVA factors were Velocity (slow, fast), Direction (from center, to center) and Side (left, right). Degrees of freedom $df = (1, 17)$ (df of effect and df of error). Greenhouse–Geisser epsilons were equal to 1 in all the comparisons. Asterisks indicate the levels of significance: *** – $p < 0.001$, ** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$

Факторы ANOVA	cP1	cN1	cP2	cN2
Скорость	$F = 0.02$ $\eta^2 = 0.001$	$F = 22.07^{***}$ $\eta^2 = 0.565$	$F = 17.52^{***}$ $\eta^2 = 0.508$	$F = 0.60$ $\eta^2 = 0.016$
Направление	$F = 2.59$ $\eta^2 = 0.132$	$F = 9.97^{**}$ $\eta^2 = 0.370$	$F = 0.23$ $\eta^2 = 0.014$	$F = 5.94^*$ $\eta^2 = 0.259$
Сторона	$F = 0.65$ $\eta^2 = 0.037$	$F = 0.039$ $\eta^2 = 0.002$	$F = 0.69$ $\eta^2 = 0.039$	$F = 0.58$ $\eta^2 = 0.033$
Скорость * Направление	$F = 0.01$ $\eta^2 = 0.000$	$F = 0.86$ $\eta^2 = 0.048$	$F = 3.46$ $\eta^2 = 0.169$	$F = 0.07$ $\eta^2 = 0.004$
Скорость * Сторона	$F = 0.04$ $\eta^2 = 0.002$	$F = 0.16$ $\eta^2 = 0.009$	$F = 0.35$ $\eta^2 = 0.020$	$F = 0.64$ $\eta^2 = 0.013$
Направление * Сторона	$F = 0.16$ $\eta^2 = 0.009$	$F = 0.04$ $\eta^2 = 0.002$	$F = 0.39$ $\eta^2 = 0.022$	$F = 0.84$ $\eta^2 = 0.047$
Скорость * Направление * Сторона	$F = 0.24$ $\eta^2 = 0.014$	$F = 0.05$ $\eta^2 = 0.003$	$F = 0.05$ $\eta^2 = 0.003$	$F = 0.12$ $\eta^2 = 0.007$

$p < 0.05$), связанный с большей величиной ответа на движение от центра, чем к центру. Эффект скорости, значимый для компонентов cN1 и cP2, для волны cN2 оказался незначимым ($p > 0.05$). Взаимодействия также отсутствовали ($p > 0.05$).

Для уточнения связи описанных выше эффектов с возможной межполушарной асимметрией был проведен дополнительный статистический анализ rmANOVA, в который был введен фактор Полушарие (левое, правое). Выборки для этого анализа формировались следующим образом. Были выделены симметричные электродные кластеры в левом (FC1, Fp1, AF3, F3, C3, FC5, C5, F7, T7) и правом полушариях (FC2, Fp2, AF4, F4, C4, FC6, C6, F8, T8). Индивидуальные записи ЭЭГ этих отведений усредняли в левом и правом кластерах для каждого из экспериментальных условий. В левом и правом кластерах индивидуальные значения средних амплитуд компонентов cP1, cN1, cP2 и cN2 определяли в окне шириной 50 мс, центрированном на соответствующем пике потенциала, усредненного по всей выборке ($n = 18$) и по группе 24 электродов. Таким образом, дополнительный анализ включал факторы Скорость (медленно, быстро), Направление (от центра, к центру), Сторона звучания (слева, справа), Полушарие

(левое, правое). Результаты попарных сравнений этого анализа приведены ниже.

Для компонента cP1 в попарных сравнениях обнаружены эффекты на грани значимости: взаимодействие Направление*Сторона*Полушарие ($F(1, 17) = 3.34$, $p = 0.085$). Эффект направления, связанный с большей величиной ответа на движение от центра, чем к центру, проявился в правом полушарии при левосторонней (контралатеральной) стимуляции ($p = 0.06$). Кроме того, ответ был сильнее справа при движении от центра влево (контралатерально, $p = 0.06$).

Для компонента cN1 взаимодействие Направление*Сторона*Полушарие было значимым ($F(1, 17) = 13.76$, $p < 0.01$). Получено уточнение локализации описанного выше эффекта Направления (ответ сильнее при движении от центра): он достигал значимости только в полушариях, контралатеральных стимуляции ($p < 0.05$). Как и в случае cP1, ответ cN1 был сильнее справа при движении от центра влево ($p < 0.001$).

Для компонента cP2 получены значимые взаимодействия Скорость*Направление*Полушарие ($F(1, 17) = 4.80$, $p < 0.05$) и Направление*Сторона*Полушарие ($F(1, 17) = 5.07$, $p < 0.05$). Описанный выше эффект Скорости (ответ сильнее

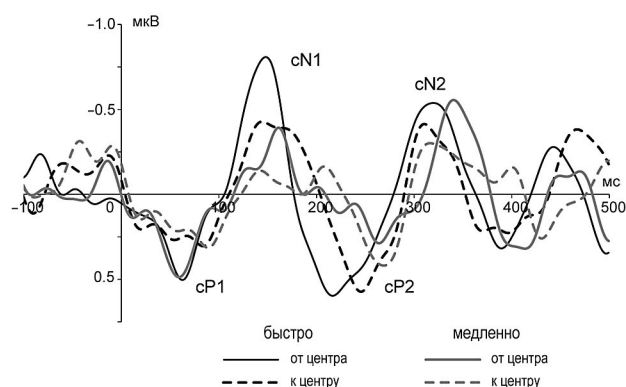


Рис. 3. Реакции на начало движения (MOR), усредненные по всей выборке ($n = 18$) и по сторонам звучания стимулов (слева и справа). Обозначения как на рис. 2.

Fig. 3. Motion-onset responses (MORs) averaged over the whole group of subjects ($n = 18$) and over the left and right side of acoustic space. Other designations are the same as in Fig. 2.

при быстром движении) проявился в обоих полушариях, но только при движении от центра ($p < 0.001$). Кроме того, была выявлена межполушарная асимметрия: как и для cP1 и cN1, ответ cP2 был сильнее справа при движении от центра влево ($p < 0.05$).

Для компонента cN2 выявлено значимое взаимодействие $\text{Скорость} \times \text{Направление} \times \text{Сторона} \times \text{Полушарие}$ ($F(1, 17) = 7.13$, $p < 0.05$). Различия между направлениями были значимы только в правом полушарии при правосторонней (ипсилатеральной) стимуляции ($p < 0.05$). Межполушарная асимметрия cN2 зависела от скорости: при медленном движении от центра влево или справа к центру ответ был значимо сильнее слева ($p < 0.05$), а при быстром движении от центра вправо ответ был сильнее справа ($p < 0.05$), то есть в обоих случаях ипсилатерально направлению, а не стороне стимуляции.

Скальповое распределение амплитуд компонентов MOR в реакции на быстрое движение приведено на рис. 5. При построении топограмм использовали амплитуды ответа в каждом отведении, усредненные в окне шириной 25 мс, центрированном на пике соответствующего ответа, усредненного по группе 24 фронтально-центральных электродов. Пунктирными линиями показаны значимые попарные сравнения, выявленные при 4-факторном анализе.

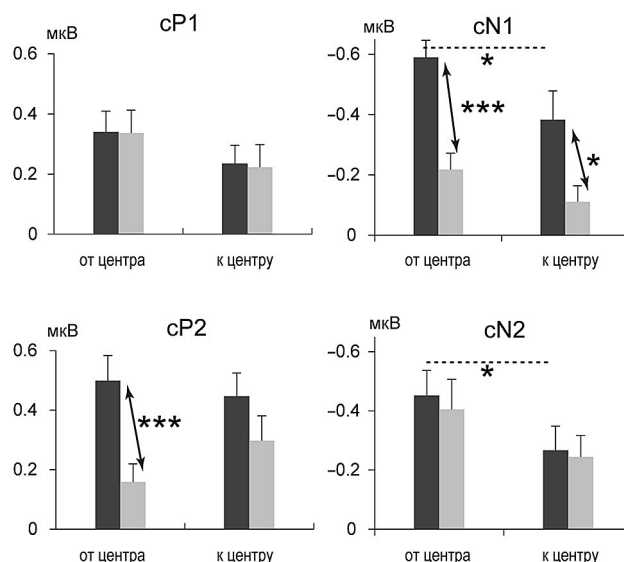


Рис. 4. Влияние скорости и направления движения на амплитуду компонентов MOR ($n = 18$). Черные столбики — быстрое движение, серые — медленное. Статистически значимые различия по фактору скорости показаны сплошными линиями со стрелками, а по фактору направления — горизонтальным пунктиром. Уровень значимости обозначен звездочками: *** — $p < 0.001$, * — $p < 0.05$. Вертикальные черточки показывают стандартную ошибку среднего.

Fig. 4. Effects of motion velocity and direction on the magnitude of MOR components ($n = 18$). Black and grey bars show fast and slow motion, respectively. Statistically significant differences in velocity and direction are shown by solid arrowed lines and horizontal dashed lines, respectively. Asterisks indicate the significance level: *** — $p < 0.001$, * — $p < 0.05$. Vertical bars show the standard errors of means.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе исследовали влияние скорости и направления движения стимулов, созданного за счет линейных изменений ΔI , на характеристики потенциала MOR. Согласно литературным данным, в самом общем виде структура ответа на начало движения одинакова при применении разных пространственных признаков и состоит из трех устойчиво генерируемых волн: cP1, cN1 и cP2 (Getzmann, Lewald, 2010). По данным этих авторов, при стимуляции в свободном звуковом поле или при использовании передаточных функций головы (HRTF), включающих спектральные признаки, компоненты cN1 и cP2 развиваются на 30–50 мс раньше и достигают большей величины, чем при создании пространственных эффектов только за счет межушных различий по времени или интенсивности (ΔT или ΔI). В нашей работе эффект

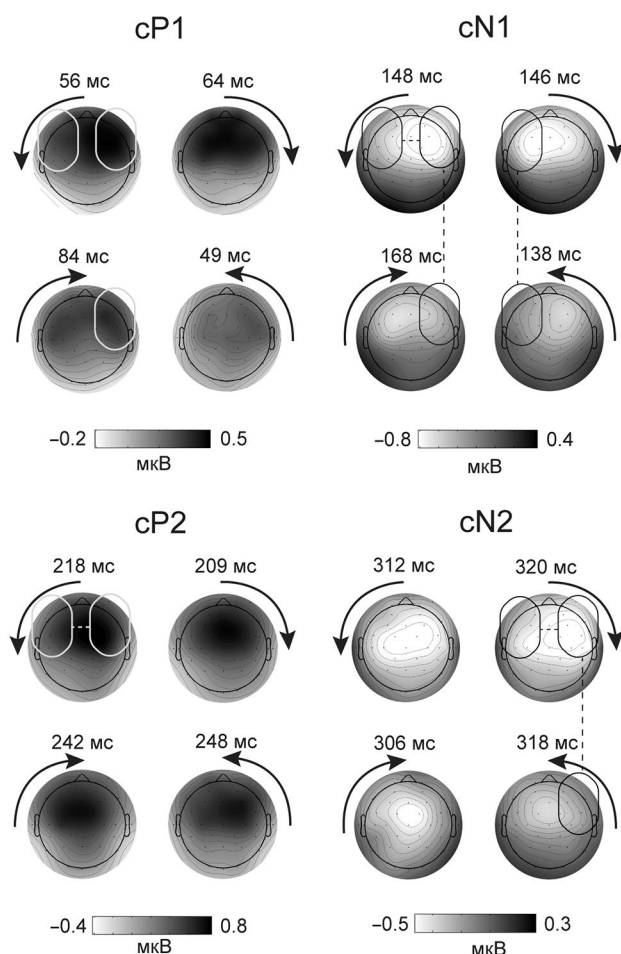


Рис.5. Топограммы амплитуды компонентов MOR ($n = 18$). Для построения топограмм амплитуда ответа в каждом отведении была усреднена в окне шириной ± 25 мс, центрированном на пике соответствующего ответа, усредненного по группе 24 фронтально-центральных электродов. Латентности соответствующих пиков в каждом условии указаны над топограммами. Направления движения стимулов показаны стрелками. Пунктирными линиями показаны значимые попарные сравнения, выявленные при 4-факторном анализе *rmANOVA* (Скорость (медленно, быстро), Направление (от центра, к центру), Сторона звучания (слева, справа), Полушарие (левое, правое)).

Fig. 5. Topography of the MOR components ($n = 18$). To calculate the topograms, the mean response amplitude at each electrode was measured in the 50-ms wide window centered at the corresponding peak of the response averaged over 24 frontocentral electrodes. Peak latencies used in each condition are given above the topograms. The directions of sound motion are shown by arrowed lines. Dashed lines indicate the significant post-hocs ($p < 0.05$) revealed by *rmANOVA* (Velocity (slow, fast)*Direction (from center, to center)*Side (left, right)*Hemisphere (left, right)).

движения создавали за счет межзвучных различий по интенсивности ΔI . Как и следовало ожидать, наблюдались компоненты cP1, cN1 и cP2, а при

движении от центра к периферии формировалось также позднее негативное отклонение cN2. С точки зрения сопоставления характеристик MOR при стимуляции с ΔI и ΔT представляют интерес результаты нашей недавней работы (Shestopalova et al., 2021b). В том исследовании использовался такой же временной паттерн отсроченного движения, как в настоящей работе, но движение стимулов создавалось за счет изменений ΔT и имело только одно направление – от центра к периферии. Сравнение показало, что временная структура MOR была приблизительно одинакова при стимуляции за счет ΔI или ΔT , а амплитуда MOR была несколько выше при стимуляции с использованием ΔT , как и в работе Getzmann, Lewald (2010). Безусловно, прямое сопоставление характеристик MOR не будет корректным без экспериментального определения точного соответствия между воспринимаемым смещением звукового образа при каждом значении ΔI и ΔT , поэтому строгое сравнение MOR при этих двух видах стимуляции возможно только в рамках единого исследования (напр., Altmann et al., 2017).

Скальповое распределение амплитуд MOR чаще всего описывается как контралатеральное доминирование, но оно может несколько отличаться при разных видах пространственных признаков. Стимуляция в свободном поле или с применением передаточных функций головы приводила к суперпозиции эффектов контралатерального и правостороннего доминирования реакции (Getzmann, Lewald, 2010). По мнению авторов, это может быть связано с непроизвольным переключением внимания и с активизацией нейронных сетей высокого порядка. В целом явления межполушарной асимметрии выражены сильнее в случае движения экстернализованных звуковых образов, чем при дихотической стимуляции. Топографию MOR при стимуляции с ΔI и ΔT можно сравнить по данным настоящей работы (рис. 5) и наших предыдущих работ (Shestopalova et al., 2021a; Шестопалова и др., 2020; Шестопалова и др., 2023). Распределение cN1 и cP2 было контралатеральным при движении от центра как за счет ΔT , так и за счет ΔI . В случае ΔI (настоящая работа) асимметрия была несколько более выраженной и соответствовала описанному в литературе данным при использовании ΔT (Magezi, Krumbholz, 2010).

Эффект скорости стимула. Факторами, оказавшими влияние на величину MOR, были скорость и направление движения стимула. Быстрое движение вызывало более сильные ответы cN1 и

cP2, чем медленное, в полном соответствии с литературными данными (Getzmann, 2009; Getzmann, Lewald, 2012; Shestopalova et al., 2021b; Семенова и др., 2022; Shestopalova et al., 2024). Увеличение амплитуды ответа со скоростью изменения ΔI , соответствующего движению в горизонтальной плоскости, было также получено в ранней работе (Mäkelä, McEvoy, 1996). Однако в их исследовании применялись тональные стимулы с относительно коротким интервалом от начала звучания до начала движения, а ответ регистрировался методом МЭГ, поэтому прямое сопоставление полученных величин с нашими данными невозможно. В качестве механизма, обеспечивающего возникновение MOR и его зависимость от скорости, было предложено освобождение от адаптации (Getzmann, 2009; Getzmann, Lewald, 2011). Величина ответа может зависеть от продолжительности адаптирующего воздействия стационарного участка стимула до начала движения.

Согласно полученным в настоящем исследовании данным, величина самого раннего и самого позднего компонентов — cP1 и cN2 — от скорости не зависела. Для волны cN1 эффект скорости был значимым как при центробежном движении, так и при центростремительном. В то же время влияние скорости на амплитуду cP2 достигло статистической значимости только в случае движения от центра к периферии. При движении стимула к центру разница между ними оказалась меньше. Эффект скорости для cN1 и cP2 проявлялся одинаково в обоих полушариях.

Эффект направления движения. Влияние направления движения (к центру или к периферии) иллюстрируется сплошными и пунктирными кривыми на рис. 3, а также топограммами рис. 5. Статистическая значимость фактора направления обнаружена для негативных компонентов cN1 и cN2, вызванных быстрыми стимулами: движение вызывало больший ответ, если оно было направлено от центра к периферии, чем к центру. При этом эффект направления концентрировался в случае cN1 в контралатеральных стимулах полушариях, а в случае cN2 — только справа, ипсилатерально стимуляции.

Влияние направления движения наблюдалось и для позитивных отклонений. Межполушарная асимметрия cP1 и cP2 проявлялась только при движении от центра влево: оба ответа были сильнее в контралатеральном полушарии. При движении к центру асимметрия отсутствовала. Эффект направления, связанный с большей

величиной ответа на движение от центра, чем к центру, проявился у волны cP1 в правом полушарии при контралатеральной стимуляции. Кроме того, для компонента cP2 только при движении от центра обнаружен значимый эффект скорости (больший ответ на быстрое движение).

Как было сказано во Введении, эффект направления имеет важное значение в контексте полусферной модели кодирования слухового пространства. В последнее время полусферная модель для ΔI была подтверждена при использовании метода фМРТ (McLaughlin et al., 2016) и метода кальциевой двухфотонной визуализации нейронной активности (Panniello et al., 2018). Несколько иные результаты получены в недавней работе Ozmeral et al. (2019): для стимулов с ΔT ответ был больше при смещении к периферии, чем к центру, независимо от стороны пространства, а для стимулов с ΔI реакции зависели от стороны пространства. По данным этих авторов, для правосторонних стимулов ипсилатеральный ответ N1 был больше при смещении к центру, чем к периферии. Для левосторонних стимулов контралатеральный N1 был больше при смещении к периферии, чем к центру, а ипсилатеральный P2 был больше при смещении к центру, чем к периферии. При этом в отведении Cz практически не было различий ответа на движение к центру и от центра за счет ΔI .

Результаты нашей работы демонстрируют более выраженный MOR при движении от центра к периферии, чем в обратном направлении, вне зависимости от стороны звучания стимула. Таким образом, наши данные подтверждают справедливость полусферной модели латерализации (модели оппонентных каналов) для отсроченного движения стимулов, созданного за счет ΔI . Однако значимый эффект направления получен нами только при быстром движении, при отсутствии взаимодействия факторов скорости и направления. В связи с этим важно отметить, что в приведенных выше работах не использовалось плавное движение стимулов с разными скоростями. Под смещением стимула авторы этих работ подразумевали мгновенное изменение его положения, в соответствии с парадигмой избирательной пространственной адаптации, применявшейся ранее при записи ВП для подтверждения полусферной модели (Magezi, Krumbholz, 2010; Briley et al., 2013). С учетом интегрирующей временной функции бинауральной слуховой системы, мгновенное смещение эквивалентно движению с очень большой скоростью. Поэтому неудивительно, что именно при быстром движении

в нашей работе наблюдались максимальные различия между реакцией на смещение к центру и к периферии, сходные с ответами на мгновенное перемещение.

Единственное исследование эффекта направления в парадигме отсроченного плавного движения выполнено Getzmann (2011) в условиях свободного звукового поля. В этой работе неподвижные начальные участки сигналов были локализованы слева и справа от средней линии под углом ± 44 град, а движение было направлено от них к центру или к периферии. Амплитуды cN1 и cP2 в вертексном отведении не зависели ни от положения начала траектории, ни от направления движения. Сравнение реакции левого и правого полушарий показало, что компонент cN1 был больше в полушарии, контралатеральном положению начала траектории, и не зависел от направления движения. Компонент cP2 был больше при движении к центру, чем к периферии; при движении к периферии cP2 был больше в полушарии, контралатеральном направлению движения. На первый взгляд, эти результаты расходятся с полусферной концепцией нейронального кодирования. Однако автор не усмотрел расхождения и предложил следующую интерпретацию: при движении к периферии усиливается активность нейронов, настроенных на периферическую область, вследствие чего усиливается реакция контралатерального полушария; при движении к центру нарастает активность нейронов, настроенных на фронтальный сектор, и контралатеральность ответа снижается.

Время интеграции пространственных признаков. В упомянутой выше работе (Getzmann, 2011) было высказано интересное предположение о том, что ранний негативный и поздний позитивный компоненты MOR отражали два последовательных этапа обработки пространственной информации. Эта точка зрения находится в соответствии с концепцией, ранее предложенной при анализе ответов на стимулы, в которых начало движения совпадало с началом звучания (Discommun et al., 2002). В этой работе влияние пространственных признаков было обнаружено только в позднем позитивном компоненте вызванных потенциалов, и было высказано предположение о существовании двух нейрональных сетей, одна из которых ответственна за обработку первичных акустических признаков, а другая — за распознавание направления движения. Впоследствии в работе, посвященной фазовой синхронизации, лежащей в основе MOR, мы не нашли подтверждения концепции двухэтапной обра-

ботки движения, но обнаружили свидетельства динамической перестройки нейронных ансамблей в течение времени обработки информации о движении стимула (Shestopalova et al., 2021a).

Результаты настоящей работы свидетельствуют, что влияние направления заметно уже в интервале cP1, достигает значимости в интервале cN1, затем уменьшается, но сохраняется вплоть до позднего компонента cN2. Таким образом, потенциал MOR отражает обработку информации о направлении движения (центробежном или центростремительном) на широком временном отрезке. Если исходить из предположения, что время развития компонентов MOR связано со временем интеграции пространственной информации в группах нейронов, чувствительных к соответствующим признакам, то можно заключить, что информация о направлении движения обрабатывается обширной нейронной популяцией, которая характеризуется широким набором временных окон интеграции. С другой стороны, влияние скорости полностью отсутствует в начале развития MOR (волна cP1), достигает максимума в интервале волны cN1 и заканчивается в интервале cP2. Следовательно, обработка информации о скорости стимула характеризуется более узким временным интервалом, по сравнению с направлением. По данным Семеновой с соавт. (2022), диапазон латентностей MOR, характеризующий обработку информации о движении стимулов с ΔT , не превышает 140–180 мс. Как было сказано выше, структура MOR приблизительно одинакова для стимулов с ΔT и ΔI , поэтому можно считать, что результаты настоящей работы согласуются с этой оценкой времени интеграции при обработке информации о скорости движения.

ВЫВОДЫ

Реакция на начало движения (MOR) при межушных различиях по интенсивности ΔI имела такую же структуру, как было описано в литературе при межушных различиях по времени ΔT .

Эффект скорости был значимым для волн cN1 и cP2: быстрое движение вызывало больший ответ. Амплитуда самого раннего и самого позднего компонентов MOR (cP1 и cN2) не зависела от скорости движения.

Эффект направления движения проявлялся в большей величине негативных компонентов cN1 и cN2 в реакции на центробежное движение, чем центростремительное, а в случае позитивных

компонентов сР1 и сР2 — в изменении их скальпового распределения и появлении межполушарной асимметрии при центробежном движении.

Результаты, полученные для отсроченного движения стимулов, созданного за счет ДИ, находятся в соответствии с полусферной моделью латерализации (моделью оппонентных каналов).

Информация о направлении движения (к центру или к периферии) отражается в характеристиках потенциала MOR в более широком временном интервале, чем информация о скорости.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Семеновой В.В. и Саликовой Д.А. за неоценимую помощь в сборе данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Варфоломеев А.Л., Старостина Л.В. Слуховые вызванные потенциалы человека при иллюзорном движении звукового образа. *Росс. Физиол. Журн. им. Сеченова*. 2006. 92 (9): 1046–1057.
- Доброхотова Т.А., Брагина Н.Н. Левши. М.: Книга, 1994. 232 с.
- 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. Влияние слуховой пространственной маскировки на межполушарную асимметрию вызванных ответов. *Физиология человека*. 2023. 49 (4): 16–29.
- 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., Семенова В.В., Никитин Н.И. Ритмическая активность мозга человека, связанная с движением звуковых стимулов. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2020. 70 (5): 616–634.
- Altmann C.F., Ueda R., Bucher B., Furukawa S., Ono K., Kashino M. et al. Trading of dynamic interaural time and level difference cues and its effect on the auditory motion-onset response measured with electroencephalography. *NeuroImage*. 2017. 159: 185–194.
- Briley P.M., Kitterick P.T., Summerfield A.Q. Evidence for Opponent Process Analysis of Sound Source Location in Humans. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 2013. 14 (1): 83–101.
- 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.
- 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.
- Edmonds B.A., Krumbholz K. Are interaural time and level differences represented by independent or integrated codes in the human auditory cortex? *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 2014. 15: 103–114.
- Getzmann S. Effect of auditory motion velocity on reaction time and cortical processes. *Neuropsychologia*. 2009. 47: 2625–2633.
- Getzmann S. Auditory motion perception: onset position and motion direction are encoded in discrete processing stages. *European Journ. Neurosci.* 2011. 33: 1339–1350.
- Getzmann S., Lewald J. Effects of natural versus artificial spatial cues on electrophysiological correlates of auditory motion. *Hear. Res.* 2010. 259: 44–54.
- Getzmann S., Lewald J. The effect of spatial adaptation on auditory motion processing. *Hear. Res.* 2011. 272 (1–2): 21–29.
- Getzmann S., Lewald J. Cortical processing of change in sound location: Smooth motion versus discontinuous displacement. *Brain Research*. 2012. 1466: 119–127.
- Grzeschik R., Böckmann-Barthel M., Mühler R., Hoffmann M.B. Motion-onset auditory-evoked potentials critically depend on history. *Exp. Brain Res.* 2010. 203: 159–168.
- Grzeschik R., Böckmann-Barthel M., Mühler R., Verhey J.L., Hoffmann M.B. Direction-specific adaptation of motion-onset auditory evoked potentials. *European Journ. Neurosci.* 2013. 38: 2557–2565.
- Grzeschik R., Lewald J., Verhey J.L., Hoffmann M.B., Getzmann S. Absence of direction-specific cross-modal visual-auditory adaptation in motion-onset ERPs. *European Journ. Neurosci.* 2016. 43 (1): 66–77.
- Joris X., Smith P.H., Yin T.C. Coincidence detection in the auditory system: 50 years after Jeffress. *Neuron*. 1998. 21: 1235–1238.

- Kreitewolf J., Lewald J., Getzmann S.* Effect of attention on cortical processing of sound motion: An EEG study. *NeuroImage*. 2011. 54: 2340–2349.
- Krumbholz K., Hewson-Stoate N., Schönwiesner M.* Cortical response to auditory motion suggests an asymmetry in the reliance on inter-hemispheric connections between the left and right auditory cortices. *J. Neurophysiol.* 2007. 97: 1649–1655.
- Magezi D.A., Krumbholz K.* Evidence for opponent channel coding of interaural time differences in human auditory cortex. *J. Neurophysiol.* 2010. 104 (4): 1997–2007.
- Mäkelä J.P., McEvoy L.* Auditory evoked fields to illusory sound source movements. *Exp. Brain Res.* 1996. 110 (3): 446–454.
- McLaughlin S.A., Higgins N.C., Stecker G.C.* Tuning to Binaural Cues in Human Auditory Cortex. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 2016. 17: 37–53.
- 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.
- Panniello M., King A.J., Dahmen J.C., Walker K.M.M.* Local and global spatial organization of interaural level difference and frequency preferences in auditory cortex. *Cereb. Cortex.* 2018. 28: 350–369.
- Riedel H., Kollmeier B.* Auditory brain stem responses evoked by lateralized clicks: is lateralization extracted in the human brain stem? *Hear. Res.* 2002. 163: 12–26.
- Salminen N.H., May P.J.C., Alku P., Tiitinen H.* A population rate code of auditory Space in the human cortex. *PLoS ONE*. 2009. 4 (10): e7600.
- Salminen N.H., Takanen M., Santala O., Lamminsalo J., Altoe A., Pulkki V.* Integrated processing of spatial cues in human auditory cortex. *Hear. Res.* 2015. 327: 143–152.
- Sams M., Hämäläinen M., Hari R., McEvoy L.* Human auditory cortical mechanisms of sound lateralization: I. Interaural time differences within sound. *Hear. Res.* 1993. 67: 89–97.
- Sarrou M., Schmitz P.M., Hamm N., Rübsamen R.* Sound frequency affects the auditory motion-onset response in humans. *Exp. Brain Res.* 2018. 236: 2713–2726.
- Shestopalova L.B., Petropavlovskaja E.A., Salikova D.A., Semenova V.V.* Temporal integration of sound motion: Motion-onset response and perception. *Hear. Res.* 2024. 441: 108922.
- Shestopalova L.B., Petropavlovskaja E.A., Semenova V.V., Nikitin N.I.* Lateralization of brain responses to auditory motion: A study using single-trial analysis. *Neurosci. Res.* 2021a. 162: 31–44.
- Shestopalova L.B., Petropavlovskaja E.A., Semenova V.V., Nikitin N.I.* Brain Oscillations evoked by sound motion. *Brain Research.* 2021b. 1752: 147232.
- Tardif E., Murray M.M., Meylan R., Spierer L., Clarke S.* The spatio-temporal brain dynamics of processing and integrating sound localization cues in humans. *Brain Res.* 2006. 1092: 161–176.
- Ungan P., Yagcioglu S., Goksoy C.* Differences between the N1 waves of the responses to interaural time and intensity disparities: scalp topography and dipole sources. *Clin. Neurophysiol.* 2001. 112: 485–498.

MOTION ONSET RESPONSES ELICITED BY SOUND STIMULI WITH INTERAURAL LEVEL DIFFERENCES

L. B. Shestopalova[#], E. A. Petropavlovskaja

*Pavlov Institute of Physiology, RAS,
Saint-Petersburg, Russia*

[#]e-mail: shestopalovalb@infran.ru; shestolid@mail.ru

We studied the evoked responses of the human brain elicited by the onset of sound motion (motion-onset response, MOR). Sound motion was created by means of linear changes in the interaural level differences (ILD). The structure of the ILD-related MOR was similar to that reported in the studies which used changes in the interaural time delay. The amplitude of the cN1 component increased with sound velocity, regardless of motion direction, and the cP2 deflection increased only in the case of motion from the center to the periphery. The amplitude of both cP1 and cN2 components did not depend on motion velocity. Centrifugal motion evoked a stronger MOR than centripetal motion, which corresponds to the hemifield model of lateralization (i.e. opponent channels model). Our findings suggest that motion direction (towards the center or towards the periphery) was reflected in the MOR potential in a wider time interval than velocity.

Keywords: spatial hearing, interaural level differences, evoked responses, motion-onset response

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

УДК 612.821:575.827.5

ВЛИЯЕТ ЛИ ДЛИТЕЛЬНЫЙ ОТБОР ПО РЕАКЦИЯМ НА ЧЕЛОВЕКА НА ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССА ПРИНЯТИЯ РЕШЕНИЯ У ЛИСИЦ ПРИ НАУЧЕНИИ?

© 2024 г. И. А. Мухамедшина*, А. В. Харламова**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук” (ИЦиГ СО РАН), Новосибирск, Россия

*e-mail: aden_66@mail.ru

**e-mail: kharlam@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 23.10.2023 г.

После доработки 07.05.2024 г.

Принята к публикации 12.07.2024 г.

В настоящей работе исследовалось поведение лисиц, прошедших длительный отбор на экспериментальной базе ИЦиГ СО РАН в двух контрастных направлениях — на доместикационное и агрессивное поведение по отношению к человеку. В качестве контроля нами были использованы неселекционируемые по поведению лисицы, разводимые на экспериментальной базе ИЦиГ СО РАН. Обсуждаются особенности исследовательской активности лисиц при предъявлении им нового объекта, помещенного в домашнюю клетку, а также поведение лисиц в тесте на угашение навыка фокусировки взгляда на источнике пищевого подкрепления. Доместичированные лисицы оказались менее склонны к неофобии по сравнению с другими протестированными нами группами. Исследовательская активность ручных лисиц отличалась большим разнообразием моторных реакций по сравнению с агрессивными и неселекционируемыми. В тесте на угашение навыка фокусировки взгляда ручные лисицы использовали большее количество различных действий по сравнению с другими исследованными группами. При помещении в новую обстановку лисята из доместичируемой популяции находили разнообразные способы преодоления преграды в процессе следования за человеком. На основе этих данных обсуждаются особенности процесса принятия решения у лисиц.

Ключевые слова: доместикация, агрессивность, отбор, лисицы, вариативность поведения, когнитивные способности, процесс принятия решения

DOI: 10.31857/S0044467724030061

ВВЕДЕНИЕ

Длительный селекционный эксперимент по одомашниванию серебристо-черных лисиц, проводимый в ИЦиГ СО РАН с 1950-х гг. по инициативе и под руководством академика Беляева Д.К., позволил за короткий по эволюционным меркам срок создать популяцию лисиц, сходных по поведению с домашней собакой (Trut, 1999). Различные морфологические и физиологические изменения у лисиц в результате доместикации детально исследованы (Trut, 1999; Trut et al., 2009; Трут и др., 2004). Однако на сегодняшний день существует ограниченное количество работ, посвященных влиянию селекции по поведению, адресованному человеку, на когнитивные способности лисиц и типологические свойства их нервной системы (Hare et al., 2005; Васильева, 1991а, б).

По мнению Беляева Д.К., важнейшим объектом бессознательного отбора при доместикации были именно базовые свойства нервной системы

животных, позволяющие им адаптироваться к новой социальной среде, в частности “подвижность” нервных процессов, связанная со способностью к быстрому переключению процессов возбуждения и торможения (Беляев, 1981). Проведенное нами ранее исследование способности лисиц к переделке инструментального навыка свидетельствует об увеличении подвижности нервных процессов у “беляевских лисиц” по сравнению с агрессивными и неселекционируемыми по поведению (Мухамедшина и др., 2019а).

Вопрос о соотношении в процессе принятия решения у животных пластичности поведения и однозначных условно-рефлекторных связей является актуальным и дискуссионным (Balleine, Dickinson, 1998; Keramati et al., 2011; Dezfouli, Balleine, 2013; Dolan, Dayan, 2013; Pezzulo et al., 2013). Мы придерживаемся следующего определения: принятие решения — это выбор одного из нескольких возможных вариантов поведения, не жесткий и однозначный, а поддающийся изме-

нению (Pearson et al., 2014). В процессе принятия решения могут в разных соотношениях, в зависимости от решаемой задачи, сочетаться элементы как выученного, так и врожденного поведения.

Современная математическая модель принятия решения у животных и человека — это генеративная модель *active inference*, с точки зрения которой животное или человек всегда действует на основе своих внутренних представлений о состоянии среды, а не в соответствии с реальной полной картиной мира (Pezzulo et al., 2015). Эти представления (прогнозы) постоянно обновляются на основе вывода (*inference*), сделанного по результатам собственных действий (Friston et al., 2016; Pezzulo et al., 2015). Создается некий усредненный прогноз на основе опыта в разных ситуациях. Оценивается также точность этого прогноза, т.е. вероятность удовлетворения потребности при реализации того или иного поведения. Таким образом, мозг учитывает разные варианты развития ситуации (Friston et al., 2016; Pezzulo et al., 2015).

Крушинский Л.В. (Крушинский, 1960) исследовал способность животных к решению элементарной логической задачи без аналогичного опыта. Многие исследователи относят к когнитивным процессам и условно-рефлекторное обучение животных. Другие, наоборот, отделяют обучение от понятия когнитивных способностей (для обзора см. (Зорина, Полетаева, 2003)). В концепции *active inference* непротиворечиво рассматриваются как условно-рефлекторное обучение, так и поведение, при реализации которого проявляются когнитивные способности (Friston, 2018; Parr, Friston, 2017). Мы рассматриваем когнитивные способности животных как функции мозга, с помощью которых животное воспринимает, обрабатывает, хранит и использует информацию для взаимодействия с окружающей средой (Shettleworth, 2010). В рамках данной работы мы считаем необходимым уточнить это определение: когнитивные способности — это способности к анализу и переработке информации, необходимые для принятия оптимальных решений в тех условиях, к которым животное вынуждено приспосабливаться. В этом определении мы постарались объединить разные точки зрения в одну, поскольку нас интересует связь наблюдаемого поведения с внутренними процессами в психике, которые его запускают. С нашей точки зрения, решение новой задачи без аналогичного опыта является только одним из проявлений когнитивных способностей животных.

Поиск решения когнитивных задач может осуществляться животными разными путями: многие склонны настойчиво повторять один и тот же вариант решения задачи (стереотипные реакции или персеверации), даже несмотря на отсутствие результата. Например, в исследованиях способностей животных к пространственному обучению (*spatial cognition*) на собаках, лошадях, осликах и мулах было показано, что животные в ситуации свободного выбора направления движения стремятся раз за разом обходить барьер с той стороны, которая подкреплялась в первом тесте, даже несмотря на последующее отсутствие подкрепления (Osthaus et al., 2010, 2013). Такую форму поведения авторы назвали повторяющейся пространственной ошибкой (*spatial perseveration error*). Стереотипные способы решения задачи наблюдались у разных животных и в экспериментах по оценке способности к экстраполяции направления движения стимула (Крушинский, 1960), и при решении задач на выбор между различными количествами значимых объектов (*laterality bias*) (Petrzini, Wynne, 2016; 2017; Macpherson, Roberts, 2013; Range et al., 2014; Banskzi et al., 2016). Односторонние выборы проявлялись и у лисиц в тесте на различение количественных соотношений кусочков пищи (Мухамедшина и др., 2019), агрессивные и неселекционируемые лисицы оказались более склонны к данной форме поведения по сравнению с одомашниваемыми.

Противоположной по отношению к стереотипным способам стратегией решения когнитивных задач является активный перебор разных вариантов поведения. Показано, что разнообразие двигательных ответов (*motor diversity*) положительно коррелирует с успешностью решения когнитивных задач (*problem-solving success*) у разных видов (Rao et al., 2018; Griffin, Guez 2014; Benson-Amram, Holekamp, 2012; Manrique et al., 2013).

В психологии существует термин “вариативное мышление”, он употребляется в значении “мышление вариантами”, т.е. понимание возможности различных способов решения задачи и умение осуществлять их систематический перебор (Князева, 2008). Понятие “вариативное мышление” применяется и к животным — это определение более чем одной формы поведения, возможной в данных условиях (Криволапчук, 2008).

В настоящей работе мы хотим сосредоточить свое внимание на оценке разнообразия поведения

ческих реакций у лисиц в разных экспериментальных ситуациях. В дальнейшем при обсуждении результатов нашей работы мы будем использовать термин “вариативность поведения” в качестве показателя, отражающего вариативное мышление. Мы определяем это понятие следующим образом: вариативность поведения — наличие в “арсенале” животного разнообразных форм поведения (врожденных и приобретенных), которые оно может использовать и комбинировать в процессе принятия решений, наиболее подходящих для конкретной ситуации. Возможность применения новых вариантов поведения необходима при адаптации к изменившимся условиям обитания, например к антропогенной среде, как это происходит при domestikации животных.

МЕТОДИКА

Работа проводилась на экспериментальной базе ИЦиГ СО РАН “Генофонды пушных и сельскохозяйственных животных”. Объектом исследования являются серебристо-черные лисицы (*Vulpes vulpes*), прошедшие длительный отбор на усиление эмоционально-положительных реакций “доместикационное поведение” (более 60 лет) и на усиление агрессивного поведения, направленного на человека (более 50 лет), а также неселекционируемые по поведению лисицы (“контроль”).

Перед тестированием все лисицы были оценены по стандартной методике, используемой в селекционном эксперименте, для определения их реакции на человека (Trut et al., 2009; Трут и др., 2017). Поведение доместицируемых лисиц оценивается по следующей шкале: +0.5 — +1.0 — животные с пассивной защитной реакцией, лисица избегает тактильного контакта с экспериментатором; +1.5 — +2.0 — лисица дает установить тактильный контакт, но не проявляет эмоционально-положительной реакции; +2.5 — +3.0 — лисица проявляет эмоционально-позитивную реакцию на экспериментатора, виляет хвостом, поскуливает; +3.5 — +4.0 — лисица активно стремится установиться контакт с человеком, поскуливает для привлечения внимания, позволяет погладить разные части тела, в том числе живот. Агрессивное поведение оценивается по шкале: -0.5 или -1 — наименее агрессивные лисицы, спокойны, когда экспериментатор стоит за закрытой дверью клетки, однако если экспериментатор открывает дверь и протягивает руку к лисе, она отступает к задней стенке, издавая подобие рычания; -1.5 — когда экспериментатор открывает клетку, лисица спокойна, но при попытке прикоснуться лисица

обнажает зубы и “рычит”; -2.0 — когда экспериментатор приближается к открытой клетке и подносит защищенную руку к лисице, животное “рычит” и пытается укусить; -2.5 — когда экспериментатор находится рядом с открытой клеткой, лисица рычит, но не атакует; -3.0 — когда экспериментатор находится рядом с открытой клеткой, лисица обнажает зубы, рычит и атакует экспериментатора; -3.5 — когда экспериментатор находится рядом с закрытой клеткой, лисица рычит и пытается атаковать, не давая открыть клетку. В ходе отбора на разных его этапах показана отрицательная корреляция уровня агрессивности и страха по отношению к человеку (Трут и др., 2017). На данном этапе отбора среднепопуляционные значения оценки поведения для ручной популяции составляют +3.60, для агрессивной -2.10, для неселекционируемой +0.06.

Тест на неофобию

Эксперимент проводили в августе 2015 г., в нем были использованы 107 агрессивных, 120 ручных и 77 неселекционируемых лисиц в возрасте 6–7 месяцев, в равном количестве самцы и самки. Лисице в домашнюю клетку помещали новый объект (металлическую педаль), которую использовали в тестах на формирование и переделку инструментального навыка (Мухамедшина и др., 2019а), и в течение 2 мин оценивалось поведение животного. Из 120 доместицируемых лисиц 36.7% животных сразу (латентное время подхода равнялось нулю) подходили к новому объекту и начинали активно исследовать его. Однако среди ручных лисиц встречались не только особи, проявляющие страх перед педалью, но и особи, проявляющие к ней чрезмерный интерес и впадавшие в состояние перевозбуждения от нового объекта. Реакция перевозбуждения выражалась в том, что при взаимодействии с новым объектом лисица проявляла чрезмерную двигательную активность, вплоть до возникновения тремора (доля таких животных составила среди ручных 30.8% из 120). У некоторых доместицируемых лисиц реакция страха сочеталась с проявлениями перевозбуждения или постепенно сменялась ими на протяжении 2-минутного теста (19.2% из 120). Доля ручных животных, у которых неофобия подавляла исследовательское поведение при первом предъявлении педали, составила 16.6% из 120. У ручных лисиц, которые не проявляли ни реакции страха, ни перевозбуждения по отношению к педали в течение 2 мин, мы оценили показатель — число вариантов поведенческих реакций исследовательской активности (грызет педаль, трогает лапой и т.д.).

У 78.5% из 107 агрессивных и 66.2% из 77 не-селекционируемых лисиц страх полностью подавлял исследовательское поведение в течение отведенного 2-минутного отрезка времени. Эти животные уходили в дальний угол клетки, избегая взаимодействовать с педалью. В пилотном исследовании (данные не опубликованы) нами было показано, что при попытках адаптировать этих животных к новому объекту в течение длительного времени (3–4 последовательных дня по 40 мин) они продолжали избегать контакта с педалью. Поэтому показатель вариативности исследовательского поведения по отношению к педали оценивали у лисиц, которые в течение 2 мин после первого предъявления исследовали новый объект, а не избегали его — соответственно у 21.5% агрессивных и 33.8% неселекционируемых (среднее время первого подхода к новому объекту для них составляло 22.3 ± 7.82 с). Вариативность поведения по отношению к новому объекту была оценена у ручных с высоким баллом доместикационного поведения и умеренной возбудимостью, у агрессивных — менее пугливых, с высоким баллом агрессивного поведения и у наименее пугливых неселекционируемых. Их число составило: 14 агрессивных, 15 ручных и 16 неселекционируемых. Средний балл, оцененный по реакции на человека у этих лисиц, составил для ручных +4.0, для агрессивных -2.3, для неселекционируемых +0.2 балла.

Тест на выработку и угашение навыка фокусировки взгляда (ФВ)

Эксперимент по выработке навыка фокусировки взгляда проводили в осенний период (август–октябрь) 2010 г. Всего было протестировано 22 ручных, 21 агрессивных и 11 неселекционируемых самцов лисиц в возрасте 6–7 мес. (сеголетки). Тест на угашение навыка ФВ проводили только в 2011 г., в нем были использованы 15 ручных и 14 агрессивных лисиц (неселекционируемые по поведению лисицы не были протестированы на угашение ФВ).

Выработку фокусировки взгляда на источнике пищевого подкрепления проводили в течение трех последовательных дней по методике пищевого подкрепления (Мухамедшина и др., 2014) после суточной пищевой депривации животных. Для оценки способности лисиц фокусировать взгляд на адаптивно важном объекте нами была сконструирована и изготовлена съемная установка, которая крепилась снаружи к домашней клетке животного перед началом эксперимента. Основным показателем, который оценивали в этом

тесте, был направленный пристальный взгляд на источник пищевого подкрепления. Этот взгляд награждали небольшой порцией подкормки. Продолжительность подкрепляемого взгляда увеличивали пошагово на 0.5 с. Во второй и третий дни тестирования через 5-минутные промежутки времени замеряли максимальную продолжительность направленного взгляда (МФВ) (видеозапись доступна на сайте: <https://www.icgbio.ru/wp-content/uploads/2023/12/den3.flv>, “МКВ день третий”). Это время, в течение которого лисица фиксировала взгляд на желобке, ожидая, но не получая пищевое подкрепление, до момента, пока лисица сама не прервет взгляд. Тест на угашение навыка ФВ проводили в четвертый день после выработки этого навыка. Для этого к клетке крепили ту же экспериментальную установку, что и в предыдущем тесте. Перед началом эксперимента бункер заполняли небольшим количеством корма. Десять первых направленных взглядов на желобок подкрепляли порцией корма. Затем корм извлекали из бункера и начинали тестирование угашения навыка. Экспериментатор, находящийся за ширмой, также нажимал на кнопку в тот момент, когда лисица смотрела на желобок. При этом раздавался специфический звук, уже знакомый лисице из первого теста, услышав который лисица сразу же переводила взгляд на миску в ожидании корма, но подкрепления она уже не получала. Продолжительность теста была одинаковой для всех животных и ограничивалась десятью минутами. В течение этого временного промежутка угашение навыка фокусировки взгляда наступало у всех протестированных животных.

В этом тесте оценивали общее число взглядов, которое было необходимо, чтобы лисица перестала фиксировать взгляд на желобке (видеозапись доступна по ссылке: <https://www.icgbio.ru/wp-content/uploads/2023/12/ugasanie.flv>). Помимо количественной оценки проявления выработанного навыка, в данном тесте оценили число других способов пищедобывательного поведения (лисица копает или грызет установку через стенку клетки и т.д.) для сравнения вариативности поведения у исследуемых нами групп лисиц.

Поиск ручными лисицами вариантов решений при преодолении преграды в процессе следования за человеком

Эксперимент проводили в июле 2023 г. В нем были протестированы лисята из доместицируемой популяции в возрасте 3.5–4 мес, самцы, 20 животных. Предварительно они были оцене-

ны по стандартной методике оценки поведения в домашней клетке. Для теста выбирали лисят только с максимальным баллом ручного поведения, не проявлявших избегания человека: лисенок самостоятельно инициировал контакт с человеком, не уклонялся от руки при попытках его погладить, наоборот, тянулся за ней. Во время теста лисят помещали в новую обстановку: вольер (6 × 6 м), перегороженный посередине полосой из деревянных препятствий (ширма, переноски, листы ДВП, деревянные поддоны). Тест проводили трое человек, которых лисята видели впервые.

На экспериментальной звероферме лисята всех трех линий (ручные, агрессивные и неселекционируемые) содержатся в клетках со своими матерями до достижения 1.5–2-месячного возраста. Затем их отсаживают от матери в соседнюю клетку и до трех месяцев содержат в ней весь выводок вместе. В возрасте 3 месяцев каждого щенка помещают в отдельную клетку (Беляев, 1981а, 1983; Беляев, Трут, 1982, 1989; Trut, 1999; Трут и др., 2004). Размер клеток 90 × 90 × 90 см, они приподняты на высоту 80 см от поверхности и расположены в два ряда под общим навесом, по 80 клеток в ряду. Между двумя рядами клеток в шеде имеется проход шириной 1.7 м. Взаимодействия лисят с человеком ограничены ежедневными процедурами кормления животных. Тестируемые лисята никогда ранее не бывали в этом вольере, они не имели никакой тренировки или похожего опыта до тестирования.

В течение 2 мин с начала теста лисятам давали время на самостоятельное освоение нового пространства. В последующие 2 мин экспериментаторы пытались привлечь внимание лисенка, ласково подзывая его к себе и пытаясь погладить, если он подходил. Если у лисенка преобладали реакции боязни новой обстановки, в том числе он избегал контактов с экспериментаторами, эксперимент с ним прекращали. Преобладание боязни новой обстановки над исследовательским поведением наблюдалось у 5 лисят. Если лисенок подходил к людям и позволял к себе прикоснуться, то начинался следующий этап эксперимента. Экспериментаторы вставляли и переходили через преграду, ласковым голосом побуждая лисенка следовать за собой. Как только лисенок преодолевал препятствия и переходил к людям, они сразу же возвращались на другую сторону преграды, продолжая звать лисенка за собой. На этом этапе теста фиксировали общее число переходов лисенка за экспериментаторами в течение 1 мин и число различных вари-

антов преодоления преграды (вариативность поведения) за указанный промежуток времени. Никакой подкормки во время этого эксперимента лисятам не давали.

Статистическая обработка результатов

Для статистической обработки данных применялся пакет программ Statistica 6. Средние значения приведены как mean ± SEM. Различия между исследуемыми группами оценивали с помощью непараметрического теста Манна–Уитни для независимых выборок (Mann–Whitney U-test). Влияние года (т.е. правомерность объединения животных, протестированных в разные годы, в одну выборку) проверялось с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA one-way). Корреляцию между признаками считали с помощью критерия Спирмена (r-Spearman's). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

Вся работа проводилась в соответствии с международными нормами охраны животных, используемых в научных целях (Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Поведенческие реакции лисиц по отношению к новому объекту, впервые помещенному в домашнюю клетку животного

У domestизируемых, агрессивных и неселекционируемых лисиц с преобладанием исследовательской активности над неофобией мы оценивали показатель вариативности поведения. Все поведенческие реакции, приведенные в табл. 1, дополнительно проиллюстрированы на видеозаписи: <https://youtu.be/LZqfecJu3lA?list=PLQCBTyCmAtEngL0WI-3babmT9c8eavcqE>. Из табл. 1 видно, что ручные лисицы обнаруживают более широкий набор элементов исследовательской активности, а также в течение 2-минутного теста они используют больше вариантов поведения по отношению к исследуемому объекту, чем агрессивные и неселекционируемые лисицы (рис. 1).

Тест на выработку и угашение навыка фокусировки взгляда (ФВ)

У всех протестированных нами лисиц удалось выработать фиксацию взгляда на источнике подкрепления. По числу эпизодов ФВ в первый день тестирования не было обнаружено статистических различий между группами: 48.9 ± 4.7 эпизо-

Таблица 1. Варианты поведенческих реакций исследовательской активности лисиц по отношению к новому объекту (педаль), впервые помещенному в их домашнюю клетку**Table 1.** The variants of research behavior of foxes toward new object (pedal), introduced into their home cage

Поведенческие реакции, характерные для всех трех исследованных групп лисиц	а) Первичное исследование: нюхает педаль, ощупывает педаль носом, нажимает на педаль носом, исследует правое нижнее крепление, исследует левое нижнее крепление, грызет (резцами) правое верхнее крепление, грызет (резцами) среднее верхнее крепление, грызет (резцами) левое верхнее крепление; б) активное взаимодействие: грызет (полной пастью) педаль с правой стороны, грызет (полной пастью) педаль с левой стороны, грызет (полной пастью) основание педали, тянет педаль на себя, выдергивает педаль из стенки клетки, качает зубами сорванную с креплений педаль, трогает педаль правой лапой, трогает педаль левой лапой, нажимает на педаль (до щелчка) правой лапой, нажимает на педаль (до щелчка) левой лапой, играет с педалью
Поведенческие реакции, которые встречались только у агрессивных лисиц	б) активное взаимодействие: нападает на педаль
Поведенческие реакции, которые встречались только у ручных лисиц	б) активное взаимодействие: скребет лапой верхнее крепление педали, качает лапой сорванную с креплений педаль, копает педаль двумя лапами, копает педаль снизу (лежа на боку), грызет (полной пастью) педаль снизу, пытается через сетку захватить ртом все крепление педали

дов ФВ у ручных лисиц ($n = 22$); 60.6 ± 6.9 эпизодов ФВ у агрессивных ($n = 21$); 62 ± 9.2 эпизодов ФВ у неселекционируемых лисиц ($n = 11$). Главной целью данного эксперимента была выработка длительной фокусировки взгляда на желобке экспериментальной установки. Агрессивные лисицы оказались успешнее в решении этой задачи

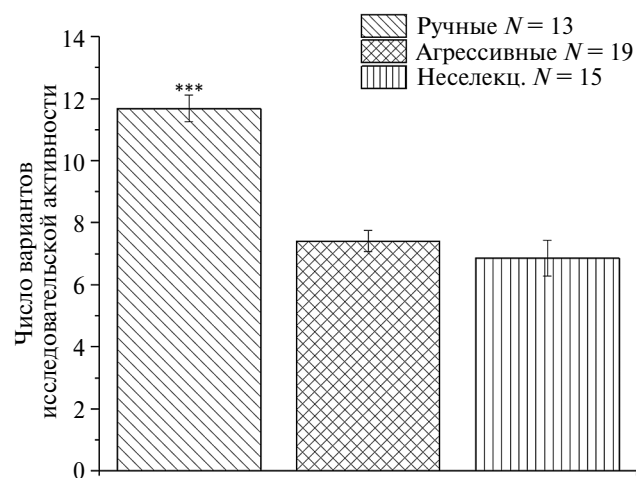


Рис. 1. Число вариантов поведенческих реакций исследовательской активности по отношению к новому объекту (педаль), используемых лисицей в течение 2 минут. Тест Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test) *** $p \leq 0.001$ по сравнению с агрессивными и неселекционируемыми лисицами.

Fig. 1. The number of variants of research behavior, used by foxes toward new object (pedal) during two minutes of test. Mann–Whitney U test: *** $p \leq 0.001$ in comparison with aggressive and unselected foxes.

по сравнению с ручными и неселекционируемыми (Мухамедшина и др., 2014). Максимальная ФВ у ручных лисиц составила 5.9 ± 0.9 с ($n = 21$); у агрессивных 9.6 ± 1.4 с ($n = 21$); у неселекционируемых 5.8 ± 0.7 с ($n = 11$). Статистически значимые различия были показаны между ручными и агрессивными лисицами, $p \leq 0.05$. Тенденция к достоверным различиям была обнаружена между агрессивными и неселекционируемыми лисицами, $p = 0.054$, тест Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test). При увеличении времени задержки пищевого подкрепления ручные лисицы сразу начинали искать другие варианты получения корма из экспериментальной установки (те же самые варианты они впоследствии использовали в тесте на угашение навыка ФВ), неселекционируемые лисицы демонстрировали такое же поведение, но предпочитали менее активные формы поведения — чаще всего они начинали менять положение головы и прикасаться носом к желобку. Агрессивные лисицы при первых задержках пищевого подкрепления продолжали фокусировать взгляд на желобке, в результате получили подкормку за более длительный взгляд на источнике пищевого подкрепления.

В ответ на отмену пищевого подкрепления в тесте на угашение навыка ФВ ручные и агрессивные лисицы проявили следующие варианты пищедобывательных реакций: копает установку, грызет установку через сетку, копает желобок через сетку, грызет желобок через сетку, прикасается носом к желобку и замирает, крутит домаш-

Таблица 2. Особенности поведения лисиц в тесте на угашение выработанного навыка
Table 2. The features of fox behavior in the test for attenuation of elaborated skill

Показатель	Агрессивные (n = 14)	Ручные (n = 17)
Суммарное время (с), в течение которого лисица учащенно дышит с открытой пастью	$5.6 \pm 3.2^{***}$	334.6 ± 62.5
Процент животных, у которых в течение теста наблюдались эпизоды отсутствия двигательной активности (лисица сидит или лежит в стороне от кормушки)	35.7*	70.6

Примечание. Тест Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test), *** – $p \leq 0.001$, * – $p \leq 0.05$, по сравнению с ручными лисицами.

Note. Mann–Whitney U-test: *** – $p \leq 0.001$; * – $p \leq 0.05$ in comparison with tame foxes.

нюю миску. Уникальный поведенческий паттерн, характерный только для группы ручных лисиц: срывает установку с креплений (возможно, это связано с их перевозбуждением). У ручных лисиц (n = 14) во время теста на угашение наблюдалось учащенное дыхание с открытой пастью (суммарное время, в течение которого лисица учащенно дышит с открытой пастью – 334.6 ± 62.5 с), что может свидетельствовать об их большем нервном возбуждении во время теста по сравнению с агрессивными (n = 17) (5.6 ± 3.2 с; $p \leq 0.001$; тест Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test)). Мы наблюдали учащенное дыхание только в момент проведения теста, в покое учащенного дыхания у ручных лисиц не наблюдается.

Ручные лисицы в тесте на угашение отличались от агрессивных большим разнообразием поведенческих реакций (рис. 2, видеозапись поведения ручной лисицы в тесте на угашение навыка: https://youtu.be/u-d_Adu24VA?list=PLQCBTycmAtEngL0WI-3babmT9c8eavcqE; видеозапись поведения агрессивной лисицы в тесте на угашение навыка: <https://youtu.be/-jK4HNXaVRw?list=PLQCBTycmAtEngL0WI-3babmT9c8eavcqE>). Что касается вырабатываемого навыка ФВ, по которому традиционно оценивается угашение навыка (Protoropova et al., 2014; Lutz et al., 2004), между ручными и агрессивными лисицами не было обнаружено различий по количеству эпизодов фокусировки взгляда на желобке после того, как это поведение перестали подкреплять (рис. 3). Но, несмотря на одинаковое число эпизодов, угашение навыка у ручных лисиц происходило быстрее. Это выражалось в том, что ручные лисицы сидели или лежали в стороне от экспериментальной установки в течение большего времени по сравнению с агрессивными (рис. 4).

Поиск ручными лисицами вариантов решений при преодолении преграды в процессе следования за человеком

Тест проводили в вольере размером 6 х 6 м, разделенном на две равные части перегородкой,

составленной из различных материалов (ширма, листы ДВП, столешница и пр.). При изготовлении перегородки в ней преднамеренно было оставлено несколько мест для возможного перехода лисицы с одной стороны вольера на другую. Экспериментатор помещал лисицу из домашней клетки в вольер, и после 2-минутной адаптации призывал ее следовать за собой, переходя с одной стороны перегородки на другую и обратно (экспериментатор имел возможность перешагнуть через преграду в разных местах; лисица самостоятельно искала варианты для перехода). Перечень вариантов перехода через преграду, использованных лисицами на протяжении теста: 1) узкий проход между ширмой и тканью; 2) перепрыгивание через деревянный короб; 3) перепрыгивание через лист ДВП; 4) широкий “лабиринт” под столешницей; 5) зигзагообразный проход под наклонным поддоном; 6) широкий

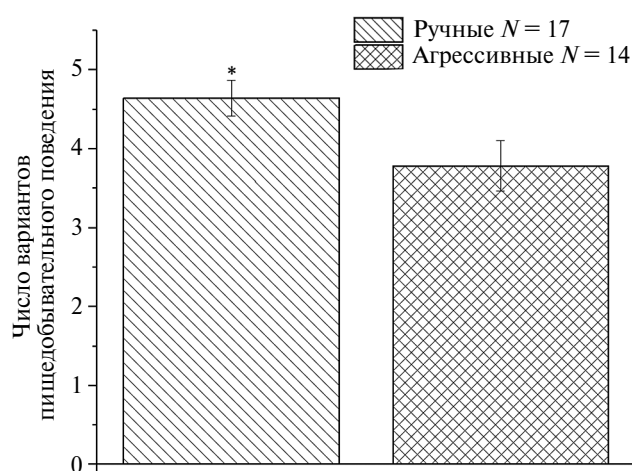


Рис. 2. Число различных вариантов пищедобывательного поведения, используемых лисицами в тесте на угашение навыка фокусировки взгляда. Тест Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test) * $p \leq 0.05$ по сравнению с агрессивными.

Fig. 2. The number of variants food-procuring behavior used by foxes at the test of attenuation of focus attention. Mann–Whitney U test: * $p \leq 0.05$ in comparison with aggressive foxes.

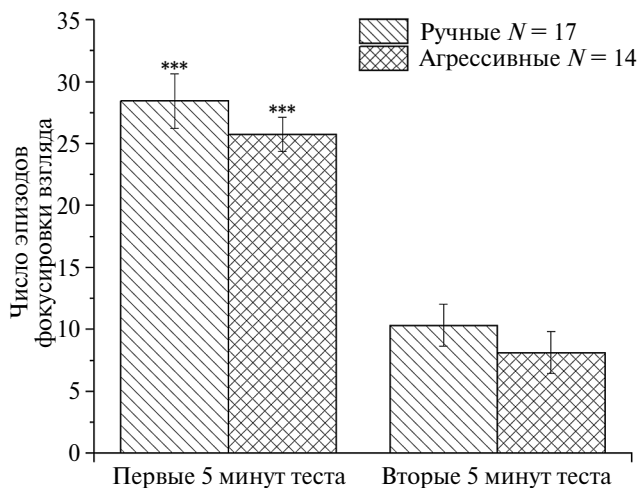


Рис. 3. Количество взглядов, направленных лисицей на желобок экспериментальной установки, в тесте на угашение навыка. Тест Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test) *** $p \leq 0,001$ по сравнению со второй половиной теста.

Fig. 3. The number of glances directed by fox on groove of the experimental setup at the test of attenuation of focus attention. Mann–Whitney U test: *** $p \leq 0.001$ in comparison with the second part of the test.

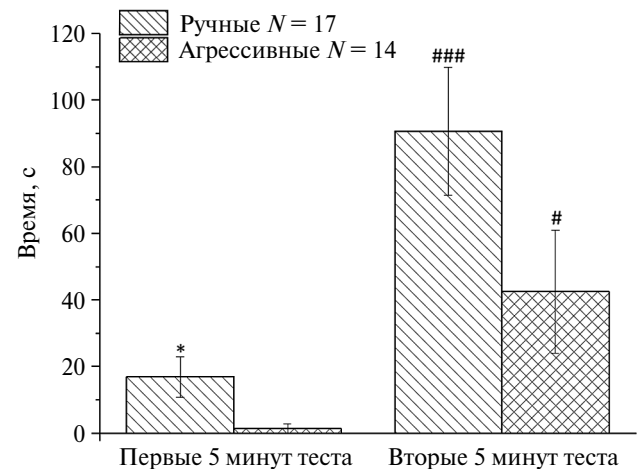


Рис. 4. Время отсутствия двигательной активности (лисица сидит или лежит в стороне от кормушки). Тест Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test) *** $p \leq 0.001$; * $p \leq 0.05$ по сравнению с первой половиной теста. # $p \leq 0.05$ по сравнению с агрессивными.

Fig. 4. The duration of absence of motor activity (the fox sits or lies away from the feeder). Mann–Whitney U test: *** $p \leq 0.001$ in comparison with the first part of the test; # $p \leq 0.05$ in comparison with aggressive foxes.

“лабиринт” под столешницей – в обратную сторону; 7) проход в углу между наклонным поддоном и сеткой; 8) прямой проход под наклонным поддоном; 9) проход по наклонному поддону с последующим спрыгиванием на бетонный пол; 10) проход по наклонному поддону с последующим спрыгиванием на неустойчивый лист ДВП; 11) узкий проход между ширмой и сеткой; 12) перепрыгивание через лист двп рядом со столешницей. Все перечисленные варианты переходов через преграду проиллюстрированы на видеозаписи: <https://rutube.ru/video/c51261ecc46a0b71d36d23c83539d5dd/?r=plwd>.

В данном тесте мы измеряли число переходов ручных лисиц за экспериментатором через преграду в течение 1 мин (среднее число составило 4.33 ± 0.33 ; $n = 15$). Лисицы находили разные пути преодоления преграды (среднее число использованных лисицами вариантов составило 3.46 ± 0.24 ; $n = 15$), при этом общее количество переходов за 1 мин положительно коррелировало с количеством вариантов ($R = +0.67$; $p \leq 0.05$, критерий Спирмена r -Spearman's). Лисята следовали за человеком благодаря очень сильной социальной мотивации, никакой подкормки животным не давали, не заманивали игрушкой. Лисята воспринимали человека как социального партнера, что облегчало их адаптацию к новым условиям. Их поведение в течение теста характе-

ризуют следующие показатели: 5.46 ± 1.88 – среднее время (с), в течение которого лисята обнюхивали пол или стены в вольере; 23 ± 2.34 – среднее время (с), в течение которого лисята находились в радиусе 1 м около человека (в движении и в статике); 11.2 ± 2.2 – латентное время (с) до первого прохода лисенка через преграду.

Нами были обнаружены следующие корреляции между измеренными признаками: латентное время до первого прохода отрицательно коррелировало со средним числом переходов через преграду за 1 мин теста ($R = -0.75$; $p \leq 0.05$, критерий Спирмена r -Spearman's) и со средним числом вариантов переходов, используемых лисицами ($R = -0.55$; $p \leq 0.05$, критерий Спирмена r -Spearman's); среднее время, в течение которого лисята обнюхивали пол или стены в вольере, отрицательно коррелировало со средним временем, в течение которого лисята находились в радиусе 1 м около человека ($R = -0.67$; $p \leq 0.05$, критерий Спирмена r -Spearman's); среднее время, в течение которого лисята находились в радиусе 1 м около человека, положительно коррелировало со средним числом переходов через преграду за 1 мин теста ($R = +0.7$; $p \leq 0.05$, критерий Спирмена r -Spearman's) и со средним числом вариантов переходов, используемых лисицами ($R = +0.71$; $p \leq 0.05$, критерий Спирмена r -Spearman's). Картина поведения лисят говорит о том, что чем сильнее у животного

была мотивация следовать за человеком, тем успешнее (больше раз и большим числом вариантов) оно решало задачу.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Страх перед новизной и стремление исследовать незнакомые условия или объекты всегда существуют у животных в некотором балансе. Как мы можем видеть по результатам теста с новым объектом, во всех трех исследуемых популяциях большинство животных проявляли реакцию неophobia по отношению к педали, однако в популяции domesticated лисиц по сравнению с агрессивными и не селекционируемыми у большего процента животных баланс сдвинут в сторону преобладания исследовательского поведения над неophobia. Исследовательское поведение, измеряемое в основном с точки зрения времени, затрачиваемого на изучение объекта/задачи и взаимодействие с ним (настойчивости), оказалось связано с успехом в решении когнитивных задач у широкого круга видов (большие синицы: (Morand-Ferron et al., 2011); лазоревки: (Morand-Ferron, Quinn, 2011); гиены: (Benson-Amram, Holekamp, 2012); сурикаты: (Thornton, Samson, 2012)). У диких гиен особи, которые меньше боялись нового объекта, были успешнее в решении проблемной задачи, в которой требовалось открыть коробку с едой (Benson-Amram, Holekamp, 2012).

В нашем исследовании мы хотим сосредоточить внимание не на времени, затраченном животным на исследование нового объекта, а на особенностях поведения, проявляемых животным при исследовании. При первом помещении нового объекта (педали) в домашнюю клетку ручные лисицы использовали более широкий репертуар исследовательской активности, чем агрессивные и не селекционируемые (табл. 1, видеозапись доступна по ссылке: <https://youtu.be/LZqfecJu3lA?list=PLQCBTycmAtEngL0WI-3babmT9c8eavcqE>), и в течение фиксированного временного интервала они успевали использовать больше вариантов манипуляторной активности (рис. 1). Во время теста на угашение навыка фокусировать взгляд (рис. 3) ручные лисицы проявляли больше способов взаимодействия с экспериментальной установкой по сравнению с агрессивными. При этом угашение навыка ФВ у ручных лисиц наступало быстрее.

Одним из объяснений полученных результатов может являться большая активность ручных лисиц по сравнению с агрессивными и не селекционируемыми. Которая в свою очередь являет-

ся следствием повышенной нервной возбудимости ручных лисиц, что было нами показано ранее при измерении уровня вокализации лисиц в присутствии человека, а также их двигательной активности во время ежедневной процедуры кормления (Мухамедшина и др., 2019а). Однако вариативность у ручных лисиц проявлялась не только на уровне элементарных реакций при исследовании нового объекта или манипуляций с экспериментальной установкой при угашении, но и на уровне более сложного поведения, требующего принятия решения, состоящего более чем из одного шага. Преграду, которая разделяла вольер на две части, можно было преодолеть разными способами. В отличие от простого перебора вариантов взаимодействия с педалью или экспериментальной установкой, каждый способ преодоления преграды состоял из нескольких действий. Например, запрыгнуть, пробежать по наклонному поддону и спрыгнуть вниз; или развернуться в другую сторону от человека, обойти ширму, снова повернуться к человеку и т.д. Высокая возбудимость может обуславливать быстрый перебор простых инстинктивных действий, но для сложного поведения необходимо удерживать внимание на цели. Человек мог перешагнуть через преграду только в двух местах, в то время как лисята склонны были решать задачу по-разному, а не следовать одному и тому же найденному пути. Хотим подчеркнуть, что у лисят не было никакого предварительного опыта. Это было решение новой для них задачи в сложной обстановке, где они оказались впервые. Успешность решения этой задачи зависела от силы социальной мотивации животных. Лисята, у которых среднее время следования за человеком было ниже и наблюдались ориентировочные реакции (отвлечение на обнюхивание), меньше раз преодолевали преграду за 1 мин теста. Лисята, которые лучше всего решали задачу, практически не отвлекались от человека, следуя за ним непрерывно на протяжении минуты.

Ручные лисицы быстро и гибко адаптируют свои решения под ситуацию, что дает им преимущество в приспособлении к новым обстоятельствам по сравнению с дикими и агрессивными. Новая обстановка, принципиально отличающаяся от их привычных условий содержания, не подавляет у них процесс принятия решения. Благодаря этому, без периода длительного привыкания к обстановке тестирования, они справляются с многократным последовательным решением новой сложной задачи. Причем высокая скорость принятия решений у ручных лисиц

оказалась связана с высокой вариативностью этих решений: лисицы, которые за минуту успевали больше раз пройти через преграду, делали это большим числом способов.

Такой тип процесса принятия решений дает преимущество в задачах, которые имеют множество вариантов решений, но затрудняет решение задач, требующих подавления импульсивных реакций. Так, в тесте на выработку фокусировки взгляда быстрый перебор разных действий, наоборот, оказался менее успешной тактикой у ручных лисиц по сравнению с агрессивными (Мухамедшина и др., 2014). Все лисицы быстро устанавливали связь между непродолжительным взглядом на желобок и получением пищевого подкрепления, т.к. выдача корма происходила немедленно, но при увеличении требования к продолжительности взгляда ручные и неселекционируемые лисицы начинали искать другие способы добывания пищи из экспериментальной установки. Они меняли положение головы, или через сетку прикасались носом к желобку (видеозапись доступна по ссылке: <https://youtu.be/uMouKq6lBa8?list=PLQCBTycmAtEngL0WI-3babmT9c8eavcqE>), или копали и грызли установку через стенку клетки (видеозапись доступна по ссылке: <https://youtu.be/i3HpzgoHEv0?list=PLQCBTycmAtEngL0WI-3babmT9c8eavcqE>). Агрессивные лисицы оказались не склонны к поиску других вариантов добывания пищи, и при увеличении времени ожидания подкрепления они замирали и получали порцию корма за более длительную фиксацию взгляда. Поэтому у агрессивных лисиц была выработана самая продолжительная фокусировка взгляда на источнике подкрепления.

Во всех представленных в данной работе тестах ручные лисицы проявляли одну и ту же особенность принятия решения — использование большего числа различных вариантов поведенческих реакций в единицу времени. Отсутствие страха и усиление исследовательских реакций, проявляющееся высокой вариативностью поведения, повышают вероятность адаптации домашних лисиц к новым условиям, в том числе к антропогенной среде.

ВЫВОДЫ

1. Ручные лисицы проявляют более разнообразное (вариативное) поведение в условиях тестов по сравнению с агрессивными и неселекционируемыми.

2. Чем выше у доместизируемых лисиц социальная мотивация, адресованная человеку, тем больше раз они преодолевают преграду за минуту теста. Число переходов через преграду положительно коррелирует с числом разных способов ее преодоления.

3. Вариативность поведения является успешной стратегией у ручных лисиц в тех задачах, для которых существует несколько возможных вариантов решения.

4. Если же вариант решения задачи является единственным (подкрепляется только успешный вариант решения задачи), тактика поведения ручных лисиц, наоборот, оказывается неэффективной.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ КАЖДОГО АВТОРА

Мухамедшина И.А. — концепция и интерпретация результатов работы, проведение экспериментов, написание текста; Харламова А.В. — концепция и руководство работой, обсуждение результатов исследования, редактирование текста статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ РАБОТЫ

Данная работа финансирована грантом Российского научного фонда № 21-44-04405.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем искреннюю благодарность Трут Л.Н., Гербеку Ю.Э. за участие в обсуждении результатов, ЦКП “Генофонды пушных и сельскохозяйственных животных” ИЦиГ СО РАН за использование животных и экспериментальной базы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике (ИЦиГ СО РАН, протокол № 134 Биоэтической комиссии от 15.11.2022).

УКАЗАНИЕ НА ДОСТУПНОСТЬ ПЕРВИЧНЫХ ДАННЫХ

Первичные данные авторами нигде не выкладывались, они доступны для запроса при необходимости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беляев Д.К. Современная наука и проблемы исследования человека. *Вопр. философии*. 1981. 3: 3–16.
- Васильева Л.Л. Анализ эффекта одомашнивания в изменении способности серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes*) к обучению. Эволюционно-генетические и генетико-физиологические аспекты одомашнивания пушных зверей. Новосибирск. 1991а. 57–69.
- Васильева Л.Л. Феногенетический анализ поведения серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes*) при ослаблении эффективности отбора на одомашнивание. Дисс. ... к.б.н. Новосибирск. ИЦиГ СО РАН. 1991б. 184 с.
- Зорина З.А., Поляева И.И. Элементарное мышление животных: Учеб. пособие по ВНД и зоопсихологии. 2003.
- Князева В.В. К теории понятия “вариативное мышление”. Вестник Оренбургского государственного педагогического университета. 2008. 1: 96–109.
- Криволапчук Н.Д. Прикладная психология собаки. Ростов-на-Дону: Феникс. 2008. 558 с.
- Крушинский Л.В. Формирование поведения животных в норме и патологии. Издательство Московского университета. 1960. 263 с.
- Мухамедшина И.А., Харламова А.В., Трут Л.Н. Изменяет ли отбор лисиц на одомашнивание и агрессивность их способность концентрировать внимание и формировать двигательный навык? *Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова*. 2014. 64 (5): 521–530. <http://doi.org/10.7868/S0044467714050086>
- Мухамедшина И.А., Харламова А.В., Трут Л.Н. Некоторые особенности высшей нервной деятельности лисиц и влияние на них отбора по социальным реакциям на человека. *Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова*. 2019а. 69 (1): 88–97. <http://doi.org/10.1134/S0044467719010076>
- Мухамедшина И.А., Харламова А.В., Трут Л.Н. Поведение одомашниваемых и агрессивных лисиц в ситуации выбора между разными количествами кусочков пищи. *Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова*. 2019б. 69 (5): 590–600. <http://doi.org/10.1134/S0044467719050083>
- Трут Л.Н., Харламова А.В., Владимирова А.В., Гербек Ю.Э. Об отборе лисиц на агрессивность и его коррелированных последствиях. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. 21 (4): 392–401. <http://doi.org/10.18699/VJ17.257>
- Alagoz O., Hsu H., Schaefer A.J., Roberts M.S. Markov decision processes: a tool for sequential decision making under uncertainty. *Med. Decis. Making* 2010. 30 (4): 474–483. <http://doi.org/10.1177/0272989X09353194>
- Balleine B.W., Dickinson A. Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology* 1998. 37 (4–5): 407–419.
- Banszegi O., Urrutia A., Szenczi P., Hudson R. More or less: spontaneous quantity discrimination in the domestic cat. *Anim. Cogn.* 2016. 19 (5): 879–888. <http://doi.org/10.1007/s10071-016-0985-2>
- Benson-Amram S., Holekamp K.E. Innovative problem solving by wild spotted hyenas. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2012. 279 (1744): 4087–4095. <http://doi.org/10.1098/rspb.2012.1450>
- Charnov E.L. Optimal foraging, the marginal value theorem. *Theoretical Population Biology*. 1976. 9: 129–136.
- Dezfouli A., Balleine B.W. Actions, action sequences and habits: evidence that goal-directed and habitual action control are hierarchically organized. *PLoS Comput. Biol.* 2013. 9 (12): e1003364
- Dolan R.J., Dayan P. Goals and habits in the brain. *Neuron* 2013. 80 (2): 12–325. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.007>
- Friston K., FitzGerald T., Rigoli F., Schwartenbeck P., O’Doherty J., Pezzulo G. Active inference and learning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2016. 68: 862–879. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.022>
- Friston K.J. Active inference and cognitive consistency. *Psychological inquiry*. 2018. V. 29, №. 2. P. 67–73. <http://doi.org/10.1080/1047840X.2018.1480693>
- Fudenberg D., Newey W., Strack P., Strzalecki T. Testing the drift-diffusion model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020. V. 117 (52): 33141–33148.
- Griffin A.S., Guez D. Innovation and problem solving: a review of common mechanisms. *Behavioural Processes*. 2014. 109: 121–134. <http://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.08.027>
- Hare B., Plyusnina I., Ignacio N., Schepina O., Stepika A., Wrangham R., Trut L. Social cognitive evolution in captive foxes is a correlated by-product of experimental domestication. *Current Biology*. 2005. 15 (3): 226–230.
- Keramati M., Dezfouli A., Piray P. Speed/accuracy trade-off between the habitual and the goal-directed processes. *PLoS Comput. Biol.* 2011. 7 (5): e1002055.
- Lutz C., Tiefenbacher Meyer J., Novak M.S. Extinction deficits in male rhesus macaques with a history of self-injurious behavior. *American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists*. 2004. 63 (2): P. 41–48.
- Macpherson K., Roberts W. Can dogs count? *Learning and Motivation*. 2013. (44) 4: 241–251. <http://doi.org/10.1016/j.lmot.2013.04.002>
- Manrique H.M., Völter C.J., Call J., Repeated innovation in great apes. *Anim. Behav.* 2013. 85: 195–202.
- Marshall-Pescini S., Virányi Z., Kubinyi E., Range F. Motivational factors underlying problem solving: comparing wolf and dog puppies’ explorative and neophobic behaviors at 5, 6, and 8 weeks of age. *Frontiers in psychology*. 2017. 8: 180. <http://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.00180>

- Morand-Ferron J., Quinn J.L.* Larger groups of passerines are more efficient problem solvers in the wild. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. 108: 15898–15903. <http://doi.org/10.1073/pnas.1111560108>
- Morand-Ferron J., Cole E.F., Rawles J.E.C., Quinn J.L.* Who are the innovators? A field experiment with 2 passerine species. *Behav. Ecol.* 2011. 22: 1241–1248. <http://doi.org/10.1093/beheco/arr120>
- Osthaus B., Marlow D., Ducat P.* Minding the gap: spatial perseveration error in dogs. *Anim. Cogn.* 2010. 13 (6): 881–885.
- Osthaus B., Proops L., Hocking I., Burden F.* Spatial cognition and perseveration by horses, donkeys and mules in a simple A-not-B detour task. *Anim. Cogn.* 2013. 16 (2): 301–305.
- Parr T., Friston K.J.* Working memory, attention, and salience in active inference. *Scientific reports.* 2017. 7 (1): 1–21.
- Pearson J.M., Watson K.K., Platt M.L.* Decision making: the neuroethological turn. *Neuron.* 2014. 82 (5): 950–965.
- Petrazzini M., Wynne C.* What counts for dogs (*Canis lupus familiaris*) in a quantity discrimination task? *Behav. Proc.* 2016. 122: 90–97.
- Petrazzini M., Wynne C.* Quantity discrimination in canids: dogs (*Canis familiaris*) and wolves (*Canis lupus*) compared. *Behav. Proc.* 2017. 144: 89–92. <http://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.09.003>
- Pezzulo G., Rigoli F., Chersi F.* The mixed instrumental controller: using value of information to combine habitual choice and mental simulation. *Front. Psychol.* 2013. 4: 92.
- Pezzulo G., Rigoli F., Friston K.* Active inference, homeostatic regulation and adaptive behavioural control. *Progress in neurobiology.* 2015. 134: 17–35.
- Protopopova A., Hall N.J., Wynne C.D.* Association between increased behavioral persistence and stereotypy in the pet dog. *Behavioural processes.* 2014. 106: 77–81.
- Range F., Jenikejew J., Schröder I., Virányi Z.* Difference in quantity discrimination in dogs and wolves. *Front. Psychol.* 2014. 5: 1299. <http://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.01299>
- Rao A., Bernasconi L., Lazzaroni M., Marshall-Pescini S., Range F.* Differences in persistence between dogs and wolves in an unsolvable task in the absence of humans. *PeerJ.* 2018. V. 6. e5944.
- Shettleworth S.J.* Cognition, evolution, and behavior. Oxford: Oxford University Press. 2010.
- Thornton A., Samson J.* Innovative problem solving in wild meerkats. *Anim. Behav.* 2012. 83 (6): 1459–1468. [10.1016/j.anbehav.2012.03.018](http://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.03.018)
- Trut L.N.* Early canid domestication: the farm-fox experiment. *American Scientist.* 1999. 87 (2): 160–169.
- Trut L.N., Oskina I., Kharlamova A.* Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model. *BioEssays.* 2009. 31 (3): 349–360.

DOES THE SELECTION OF FOX FOR THEIR REACTIONS TO HUMANS AFFECT THE DECISION-MAKING DURING LEARNING?

I. A. Mukhamedshina*, A. V. Kharlamova**

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Novosibirsk, Russia

**e-mail: aden_66@mail.ru*

***e-mail: kharlam@bionet.nsc.ru*

In foxes selectively bred by IC&G SB RAS for domestication or aggressive behavior toward humans, the behavior was analyzed. We have used the foxes not selected for behavior features as a control. Control foxes also were bred on experimental farm of IC&G SB RAS. The peculiarities of explorative activities of foxes toward new objects, introduced inside the domestic cage, as well as behavioral features during attenuation of focused attention on the object of food reinforcement are discussed in the paper. Domesticated foxes demonstrated less neophobia during experiments than aggressive and unselected ones. On the other hand, the explorative behavior of tame foxes was characterized by a greater variability of motor reactions compared to aggressive and unselected ones. In the test for attenuation of focused attention, tame foxes used a greater number of different actions compared to other studied groups. Fox cubs from the domesticated population, placed in a new environment for the first time, found various ways go through obstacles when following a person. Based on these results we discuss the peculiarities of the decision-making in foxes.

Keywords: domestication, aggressiveness, selection, foxes, motor diversity, cognitive abilities, making decision process

HYPOXIC PRECONDITIONING IN RATS WITH LOW AND HIGH PREPULSE INHIBITION OF ACOUSTIC STARTLE IS IMPLEMENTED THROUGH TOPOGRAPHICALLY DIFFERENT SENSORY INPUTS. WORKING HYPOTHESIS

© 2024 г. Е. И. Zakharova^{a, #}, Z. I. Storozheva^b, A. T. Proshin^b, M. Yu. Monakov^a, A. M. Dudchenko^a

^a*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

^b*Federal Research Center for Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russia*

e-mail: zakharova-ei@yandex.ru

Received November 27, 2023; Revised February 08, 2024; Accepted March 11, 2024

The neurotransmitter and network mechanisms of hypoxic preconditioning are practically unknown. Previously, in rats, we identified the key role of the hippocampus and its cholinergic projections in the preconditioning mechanism of single-exposure of moderate hypobaric hypoxia (HBH) based on the association between the efficiency of HBH and the magnitude of Prepulse Inhibition of Acoustic Startle (PPI). This study presents the first data on PPI-dependent neuronal networks of hypoxic preconditioning and their cholinergic components. The activity of synaptic choline acetyltransferase (ChAT), an indicator of cholinergic function, was used for a correlation analysis of ChAT response to HBH in the hippocampus, cerebral cortex, and caudal brainstem in animals with different levels of PPI. In rats with PPI < 40%, ChAT activity was correlated in the hippocampus, cortex and caudal brainstem, while in rats with PPI > 40% in the hippocampus and cortex. It is hypothesized that HBH is realized through topographically different sensory inputs, namely through respiratory neurons of the brainstem in rats with low PPI and respiratory neurons of the olfactory epithelium in rats with high PPI.

Keywords: hypoxic preconditioning; neuronal/ neural networks; HBH; PPI; hippocampus; cerebral cortex; caudal brainstem; cholinergic forebrain projective neurons and interneurons; ‘light’ and ‘heavy’ synaptosomes; synaptic membrane-bound and soluble ChAT

DOI: 10.31857/S0044467724030074

INTRODUCTION

Changes in the oxygen content of the inhaled air can have both positive and negative effects on the aerobic organism. This depends on the depth of oxygen deficiency and the length of stay in such conditions (Navarrete-Opazo, Mitchell, 2014; Ando et al., 2020).

Moderate hypoxia is a necessary natural factor in cellular differentiation and proliferation at different stages of prenatal ontogenesis (Radhakrishnan et al., 2021). This suggests the presence of genetic and metabolic pathways of cell adaptation to hypoxic influences in all body tissues and explains the phenomenon of the ‘cross-adaptation’ of hypoxic training to damaging factors of other origins (Rybnikova, Zenko, 2019).

That’s why treatment of the body or individual organs with an adaptive, moderately reduced concentration of oxygen in the air in courses (interval) or in short-term one-day hypoxic training (hypoxic preconditioning) can increase the resistance of organs and tissues to the damaging effects of severe hypoxic or ischemic strokes (Das, Das, 2008; Gavrilova et al.,

2008; Lukyanova et al., 2008, 2009; Maslov et al., 2011; Rybnikova et al., 2022).

It is known that the brain is the most sensitive organ to hypoxia (Akopyan et al., 1984; Maslov et al., 2011; Liu et al., 2022) and the brain is a leading regulatory system in all body functions. The central nervous system is realized through the neural networks. Currently, the question of the neural networks of cognitive functions is being actively examined, and this includes investigations of synaptic plasticity (Obermayer et al., 2019; Appelbaum et al., 2022; Lara-González et al., 2022). At the same time, the neuronal, including the synaptic organization of hypoxic adaptation functions remains poorly understood.

Our studies on the one-time moderate hypobaric hypoxia model (HBH) allowed us to analyze the central cholinergic systems in the neuronal organization of hypoxic preconditioning.

In rats, HBH (5000 m, pO₂ is 85 mm Hg, 60 min) initiates a most pronounced preconditioning effect in the first minutes of reoxygenation that provides increased resistance to severe hypobaric hypoxia, in-

compatible with life (SHBH, 11500 m, pO_2 is 31 mm Hg) (Lukyanova et al., 2008, 2009). Using the same hypoxic regime, we confirmed the pronounced preconditioning effect of HBH after 4 min of reoxygenation (Zakharova et al., 2011; Zakharova, Dudchenko, 2016). By using the HBH-SHBH test, we found that the efficiency of HBH was associated with the efficiency of sensory-motor gating estimated by the magnitude of Prepulse Inhibition of Acoustic Startle (PPI). The values of HBH efficiency were inversely proportional to the PPI values (Dudchenko et al., 2014). All subsequent experiments confirmed this regularity (Zakharova et al., 2018a, 2018b, 2020). This allowed us to investigate the preconditioning mechanisms of HBH by using the PPI test readings as a predictor of the efficiency of hypoxic training.

By studying the cholinergic brain system in the mechanism of HBH, we identified the following regularities:

(1) Administration of cholinergic ligands PNU-282987 (PNU), a selective agonist of $\alpha 7$ subtype of nicotinic receptor (nAChR), and dimethyl sulfoxide (DMSO), an anti-acetylcholinesterase agent at a concentration of 2–3% (Sawada, Sato, 1975), had the multidirectional effects on the efficiency of HBH in rats with PPI greater and less than 40%. The results suggest the involvement of the cholinergic system in the preconditioning mechanism of HBH and the existence of at least two cholinergic mechanisms (Zakharova et al., 2021a, 2018b, 2020).

(2) Choline acetyltransferase (ChAT, acetyl-CoA: choline O-acetyl transferase, EC 2.3.1.6) is a marker of cholinergic neurons and the most specific indicator for monitoring the functional state of cholinergic neurons (Monmaur et al., 1984; Dunbar et al., 1993; Zakharova, Dudchenko, 2014; Bagwe, Sathaye, 2022; Kirstein et al., 2022; AlQot, Rylett, 2023). We measured ChAT activity in the synaptic membranes (membrane-bound ChAT, mChAT) and synaptoplasm (water-soluble ChAT, sChAT) subfractions. This made it possible to identify mChAT, whose activity is a minor part of the total synaptic ChAT (Zakharova, Dudchenko, 2014).

Under HBH, synaptic mChAT changed its own activity in different directions in subgroups of rats with PPI greater and less than 40%. This was observed in only the hippocampus, but not in the caudal brainstem or cerebral cortex (Zakharova et al., 2020). The biochemical data coincided with the results of our pharmacological study and allowed us to assume that the hippocampus is crucial for the preconditioning effect of HBH.

(3) The hippocampus hypothesis was confirmed in our pharmacological study with the intrahippocampal administration of cholinergic ligands in rats with PPI > 40% (Zakharova et al., 2021).

(4) Multidirectional changes in the mChAT activity were observed selectively in the light fraction of hippocampal synaptosomes, in which the presynapses of cholinergic projections from forebrain nuclei are concentrated (Zakharova, Dudchenko, 2014). Thus, we have clarified that a key role in the mechanisms of hypoxic preconditioning is played by the hippocampal cholinergic projections.

(5) In the brain cortex and caudal brainstem, the synaptic ChAT response to HBH did not agree with our pharmacological data. At the same time, the caudal brainstem is a primary sensor of vegetative information, including respiratory signals ('the primary respiratory network') (Ashhad et al., 2022; Karalis, Sirota, 2022) and the cortex is a structure, in which the processing of sensory information preceded that in the hippocampus (Yang et al., 2021; Karalis, Sirota, 2022). This suggested the involvement of these brain structures in hypoxic preconditioning neuronal networks.

To identify HBH-initiated interstructural connections, in this study, a correlation analysis of biochemical parameters of the hippocampus, cerebral cortex and caudal brainstem was carried out. The activity of mChAT, sChAT and the content of membrane and synaptoplasmic proteins (Pr, mPr and sPr) in subfractions of synaptic membranes and synaptoplasm isolated from light and heavy synaptosomes of each brain structure were analyzed.

In the models of hypoxic preconditioning, the cholinergic components of neuronal network in the mechanisms of their protective action have not yet been studied, especially taking into account the dependence of these mechanisms on the PPI value. Thus, the proposed study is the first in this scientific direction.

The main purpose of the study was to determine whether there are connections between HBH-initiated cholinergic changes in the hippocampus, caudal brainstem and cerebral cortex, and the specificity of these connections in rats with PPI < 40% and PPI > 40%?

METHODS

The behavioral experiments were carried out in male albino laboratory outbred rats that were aged 2.5–3.5 months (250–350 g). The animals came from the Light Mountains Nursery (Moscow region, Rus-

sia) and were kept in the vivarium of the Institute of General Pathology and Pathophysiology. The number and suffering of the experimental animals has been minimized. The rats were housed in a temperature-controlled room (20–24 °C) and were exposed to a 12 h light–dark cycle. They were kept with 5–7 animals per rat cage with a size of 40 × 60 cm, and they had free access to food and water. All animal care and experimental procedures were carried out in accordance with EU Directive 2010/63/EU. All experimental protocols were approved by the Ethical Committee of the Institute of General Pathology and Pathophysiology. After the behavioral experiments, the rats were selected for the biochemical experiment.

Acoustic startle reaction model

The acoustic sensorimotor startle reaction model (PPI Test) (Wood et al., 1998) was measured by using a startle response system (TSE System, Bad Homburg, Germany) as previously described (Zakharova et al., 2021).

Rats were tested in soundproof boxes within restraining metal cages that were installed on a platform (27 × 9 × 19 cm). The acoustic stimuli were issued from two loudspeakers, which were mounted on the walls of the metal cages. Broadband noise with duration of 100 ms and a loudness of 110 dB was used as the main stimulus. The background-masking sound signal had broadband noise with a loudness of 72 dB, and the prestimulus (prepulse) had signal duration of 40 ms and a loudness of 85 dB. The animals were exposed to a total of 12 trials after 5 min of adaption. The first two trials were pulse-only trials (habituation). The remaining 10 trials were presented in a pseudo-random order and included five pulse-only trials and five pulse trials with a preceding prepulse of 100 ms in a lead-off interval. The intertrial intervals had a mean value of 15 s (from 10 to 20 s). The PPI value was estimated by using the formula $(Am - Ap)/Am \times 100\%$, where Am is the average reaction amplitude in the samples without a prepulse, excluding the first two ($n = 5$), and Ap is the average reaction amplitude in the samples with a prepulse ($n = 5$).

Hypoxic preconditioning model

The HBH and SHBH models were used as previously described (Zakharova, Dudchenko 2016; Zakharova et al., 2020).

In the HBH model, a pressure chamber was used for the simultaneous testing of few rats (a branded pressure chamber from “Schröder.Co”, Germany). The chamber was connected to a single-stage vacuum pump (model VP 115, 2016, YANG YI, China) and an

altitude gauge, which was calibrated to an altitude above sea level (model VD-20, # 152300254, 2016, RF). The rats in the chamber were “raised” at a speed of 12–15 m/s to the adaptive altitude of 5000 m (pO_2 is 85 mm Hg, equivalent to 11% O_2 , 60 min) and “descended” at the same speed at the end of the training.

In the SHBH model, pressure chambers were used to test one rat in each of them. Each chamber is equipped with a vacuum cap with a needle valve and valves for a vacuum pump and altimeter inlets. The rat was “raised” at a speed of 63.5–64 m/s to the critical altitude of 11.500 m (pO_2 is 31 mm Hg, equivalent to 4.5% O_2). In the critical altitude test, the resistance to hypoxia was recorded as the time (T) until agonal inspiration (apnoea) in combination with a loss of control of body tone. When these symptoms were achieved, the animal immediately “descended” using wide access of atmospheric air into the chamber.

Preparative and Biochemical procedures

The methods of preparation of the synaptosomal subfractions from the brain tissue structures and the determination of the ChAT activity and protein content were the same as previously described (Zakharova et al., 2020, 2022).

The preparative procedures were performed at 2–4 °C. The hippocampus, cerebral cortex, and caudal brainstem (medulla oblongata + pons Varolii) were separated from a brain. From each structure, the light and heavy fractions of synaptosomes were obtained from the rough mitochondrial fraction. The synaptosomal fractions were precipitated and disrupted. From each disrupted synaptosomal fraction, the subfractions of synaptoplasm and synaptic membranes were obtained. All samples were stored at -80 °C.

The ChAT activity was determined by using Fonnum’s radiometric method (Fonnum, 1969). The protein content was measured by using Lowry’s spectrophotometric method (Lowry et al., 1959).

Experimental Protocol

The rats were handled for at least two consecutive days before starting the experimental procedures.

All experimental rats ($n = 60$) were tested with the acoustic sensorimotor startle reaction model (PPI model), and the values of PPI were estimated. After that, the rats were subdivided into the control group ($n = 6$) and HBH group ($n = 6$). As far as possible, for the control and HBH groups, the rats with the lowest and highest PPI values were taken to more clearly identify the biochemical correlates of the PPI-associated values. PPI values were, respectively, -4.4, +11.9, +29.8

and -1.1, +19.2, +37.5 for the control and HBH rats in the subgroups with PPI < 40% and + 68.0, +87.2, +91.7 and +64.3, +83.9, +93.2 for the control and HBH rats in the subgroups with PPI > 40%.

Several days after the PPI testing, the rats were subjected to subsequent experimental procedures.

The rats in the HBH group were subjected to an HBH session; 4 min after it ended, they were taken for an acute biochemical experiment. The first minutes of reoxygenation after HBH had the most pronounced preconditioning effect (Das, Das, 2008; Lukyanova et al., 2008, 2009), and we selected 4 min as the optimal time period for our experimental conditions. The animals in the control group were taken directly for the biochemical experiment, bypassing HBH.

In the same HBH regime, rats were tested for resistance to SHBH ('HBH + SHBH' group). Intact rats ('SHBH' group) served as controls. Animals within a similar range of PPI values were selected into both SHBH groups. PPI values were, respectively, from -13.1% to +36.6 (n = 13) and from -12.2% to +37.8 (n = 11) for the 'SHBH' and 'HBH + SHBH' rats in the subgroups with PPI < 40% and from +38.3% to +92.5% (n = 11) and from +39.6% to +91.1 (n = 10) for the 'SHBH' and 'HBH + SHBH' rats subgroups with PPI > 40%.

The activity of ChAT and the protein content was determined in the subfractions of the synaptic membranes and synaptoplasm of light and heavy synaptosomes isolated from the cortex, hippocampus, and caudal brainstem. Thus, the membrane-bound mChAT activity and mPr content were estimated in the synaptic membrane subfractions, while the water-soluble sChAT activity and sPr content were estimated in the synaptoplasm subfractions.

All data were obtained in a blind manner. The experimenters did not know the key characteristics of tested rats at the stage of obtaining experimental data; the experiments and animal preparation were performed by different experimenters.

Statistics

The results of the biochemical experiments were expressed in units of ChAT activity per minute or units of protein content in 1 g of raw tissue from a corresponding brain structure.

The normality of all data was assessed with STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc. USA) by using the Kolmogorov–Smirnov test (parameter d and p-values). No deviations from normality were found.

The results were statistically processed with STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc. USA) by using the non-parametric Fisher's exact test (FET criterion) and/ or Wilcoxon-Mann-Whitney test (u-criterion). A correlation analysis was performed by using Pearson's r-criterion in Microsoft Excel, and a correcting formula was used for small samples where $n \leq 15$ (Kobzar, 2006). For correlation analysis, the variation samples included the values of the corresponding control and HBH subgroups, n = 6 for each sample. The differences and correlations were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Resistance to SHBH in the PPI-Associated Subgroups of Rats under the Control and HBH Conditions

The control rats ('SHBH' group) exposed to direct SHBH showed a usual spectrum of innate resistance to severe hypoxia from 37 s to 1289 s in a PPI-independent manner. Average T values ($M \pm m$) were, respectively, 344 ± 89 s (n = 13) and 362 ± 91 s (n = 11) for the 'SHBH' rats in the subgroups with PPI < 40% and PPI > 40%. T-PPI values were not correlated (in the general data array, $r = -0.098$, n = 24, $P > 0.05$).

In the 'HBH + SHBH' group, Average T values were, respectively, 802 ± 72 s (n = 11) and 656 ± 63 s (n = 10) for the rats in the subgroups with PPI less and greater than 40%. HBH increased resistance to SHBH by 2.4 times in rats with PPI < 40% ($P < 0.001$) and by 1.8 times in rats with PPI > 40% ($P < 0.005$). T-PPI values were correlated (in the general data array, $r = -0.594$, $P < 0.01$, n = 21).

Synaptic ChAT Activity and Protein Content in the PPI-Associated Subgroups under the Control and HBH Conditions

The values of synaptic ChAT activity and protein content in the control and HBH subgroups of rats with PPI < 40% and > 40% are shown in Figures 1 and 2, respectively. These data formed the basis for the correlation analysis.

The main results on ChAT activity were published and discussed in detail previously (Zakharova et al., 2020). Here we present new data on protein content, as well as data on ChAT activity in a new format.

The ChAT activity was present in natural quantities (Figure 1). This made it possible to demonstrate the PPI-associated features of the enzyme's reaction to HBH. It can be seen that reciprocal changes in ChAT (mChAT) activity were observed only in the hippocampus and in the subfraction of synaptic

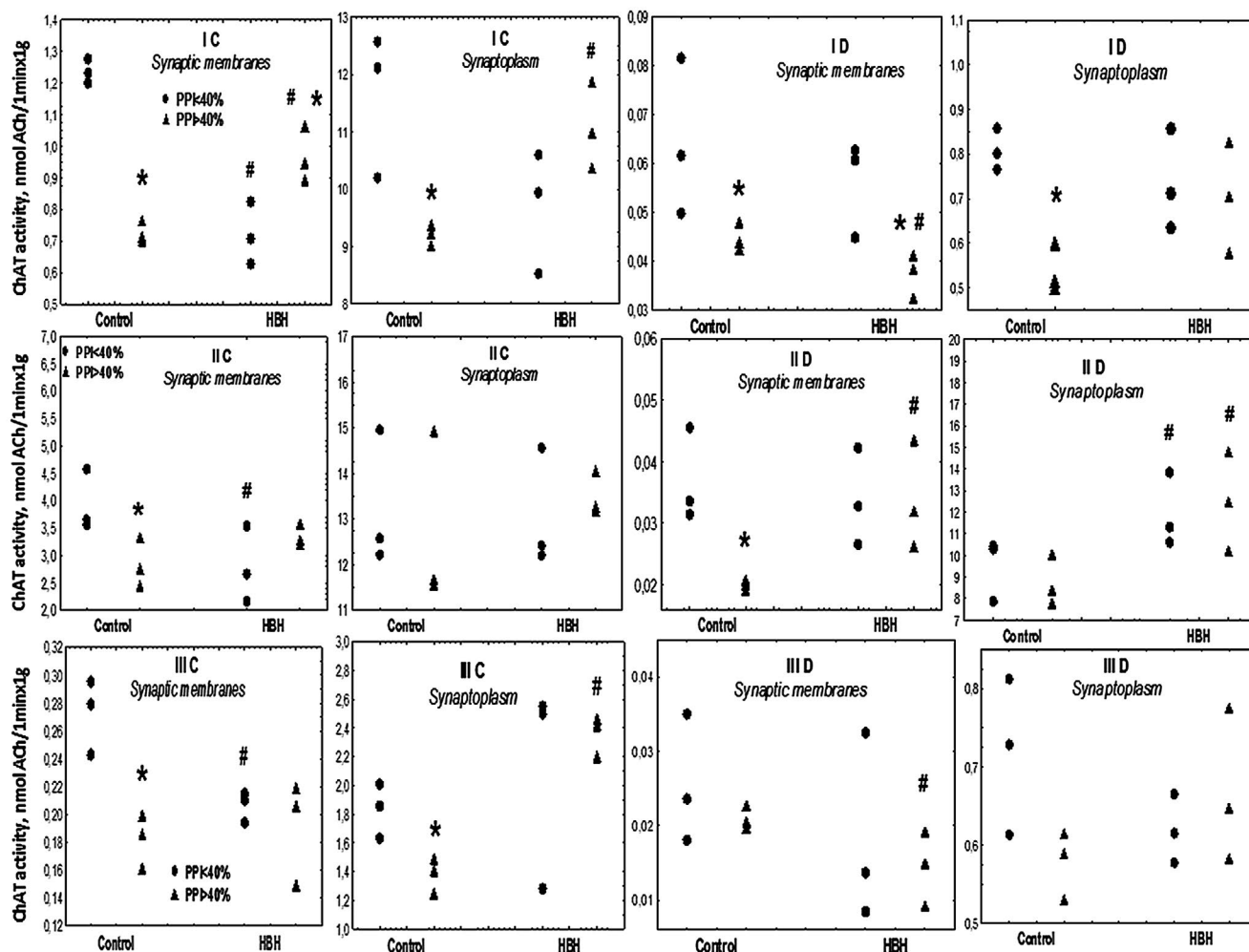


Fig. 1. Individual values of the synaptic ChAT activity in the control and HBH subgroups of rats with PPI values of <40% and >40%. Designations. The ChAT activity is presented in nmol ACh/1 min in 1 g wet weight of the corresponding brain structure. The software package STATISTICA 8.0 (StatSoft., USA) was used to visualize the data. I, hippocampus; II, cerebral cortex; III, caudal brainstem. C, the fraction of light synaptosomes. D, the fraction of heavy synaptosomes. Synaptic membranes, the subfraction of synaptic membranes. Synaptoplasm, the subfraction of the synaptoplasm. Control, the control subgroups of rats. HBH, the subgroups of rats after one-time moderate hypobaric hypoxia (85 mm Hg, equivalent to 11% O₂, 60 min). N = 3 for each subgroup. *, the significant differences in ChAT activity values between the paired subfractions of rats with PPI < 40% and PPI > 40%, $p < 0.05$. #, the significant changes in the ChAT activity values after HBH were compared with the corresponding control subgroup, $p < 0.05$. Fisher's exact test (FET criterion).

Рис. 1. Индивидуальные значения синаптической активности ХАТ в контрольной и HBH подгруппах крыс со значениями ПСТ < 40% и > 40%. Обозначения. Активность ХАТ представлена в нмоль АХ/1 мин в 1 г сырой массы соответствующей структуры мозга. Для визуализации данных использовали пакет программ STATISTICA 8.0 (StatSoft., США). I – гиппокамп; II – кора головного мозга; III – каудальный ствол головного мозга (продолговатый мозг + Варолиев мост). С – фракция легких синапсомом. D – фракция тяжелых синапсомом. Synaptic membranes – субфракция синаптических мембран. Synaptoplasm – субфракция синаптоплазмы. Control – контрольные подгруппы крыс. HBH – подгруппы крыс после однократной умеренной гипобарической гипоксии (85 мм рт. ст., эквивалентно 11% O₂, 60 мин). N = 3 для каждой подгруппы. * – достоверные различия в активности ХАТ между субфракциями у крыс с ПСТ < 40% и ПСТ > 40% в пределах подгруппы, $p < 0.05$. # – достоверные изменения в активности ХАТ после ГБГ по сравнению с соответствующей контрольной подгруппой, $p < 0.05$. Точный Метод Фишера (ТМФ-критерий).

membranes in the light fraction of synaptosomes. In most other subfractions, the ChAT response to HBH was manifested in one of the subgroups or the changes in ChAT activity were unidirectional (in the synaptoplasm subfraction in the heavy synaptosomes of the cerebral cortex).

As a result, under the influence of HBH, the vector of differences in the mChAT activity in the light synaptosomes of the hippocampus significantly changed to the opposite value. In the remaining subfractions, there was an alignment of the initial, control differences in ChAT values between the

subgroups. The exception to the latter pattern was the heavy hippocampal synaptosomes, in which, due to a drop in mChAT activity in the subgroup of rats with PPI > 40%, the differences in enzyme activity observed in the control subgroups became even more pronounced under the influence of HBH.

The results revealed by protein content replicate changes in ChAT activity in response to HBH in a number of subfractions in both subgroups of rats, and also exhibit a response independent of the response of ChAT activity to HBH (in subfractions D of the hippocampus in rats with PPI < 40%), (Figure 2). We will present the results of the ChAT-Pr correlation analysis below.

Conjugacy of HBH-initiated Changes in the Synaptic ChAT activity and Protein Content in the Hippocampus, Cerebral Cortex, and Caudal Brainstem in the Subgroups of Rats with PPI values of < 40% or > 40%

To perform correlation analysis of biochemical parameters, we included data on HBH and the corresponding control in each sample ($n = 6$). This made it possible to identify the consistency of the response of identical indicators to hypoxia in different brain structures, as well as different indicators within the synaptosomal fraction (ChAT-Pr, mChAT-sChAT and mPr-sPr correlations).

Subgroup of Rats with PPI < 40%

In the subgroup of rats with PPI < 40%, a decrease in ChAT activity and Pr content prevailed (Figure 3,

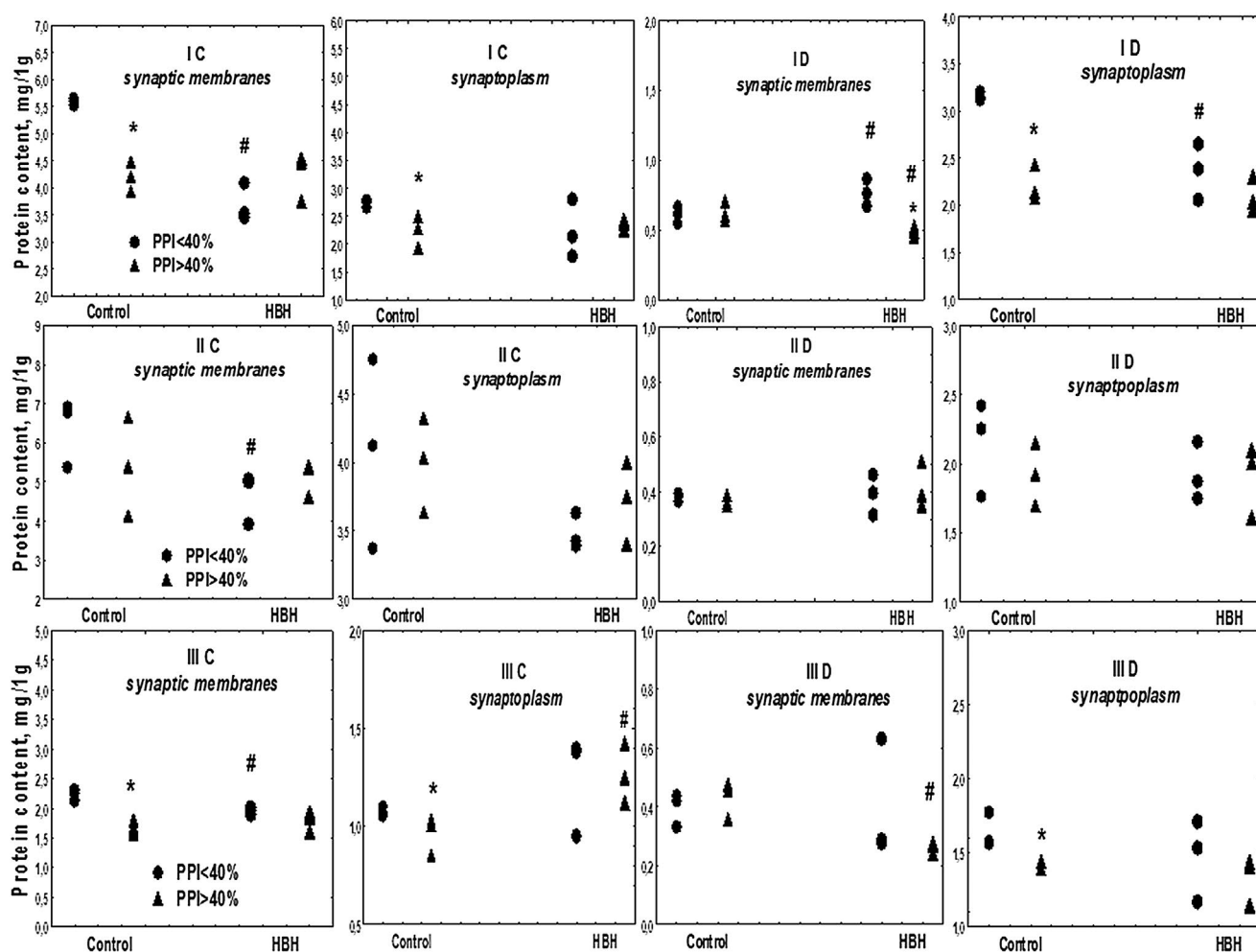


Fig. 2. Individual values of the protein content in the control and HBH subgroups of rats with PPI values of <40% and >40%. Designations. The protein content is presented in mg in 1 g wet weight of the corresponding brain structure. The remaining designations are the same as those in Figure 1.

Рис. 2. Индивидуальные значения содержания белка в контрольной и HBH подгруппах крыс со значениями ПСТ < 40% и > 40%. Обозначения. Содержание белка представлено в мг в 1 г сырой массы соответствующей структуры мозга. Остальные обозначения как на рис. 1.

Table 1, I – III). A positive correlation was observed between changes in mChAT activity and in mPr content between the fractions of light synaptosomes of the caudal brainstem and hippocampus, as well as between the caudal brainstem and cerebral cortex. In all three fractions, the decrease in mPr content was associated with a decrease in mChAT activity. When comparing the mChAT–mChAT and mPr–mPr values in these fractions between the hippocampus and cerebral cortex, there was no conjugacy of changes.

In addition, HBH initiated the changes in Pr content that did not depend on the cholinergic index: an increase in mPr and a decrease in sPr in the heavy fraction of the hippocampal synaptosomes. The increase in mPr content was negatively correlated with the decrease in mPr content in the light fraction of the hippocampus, and the decrease in sPr content was positively correlated with the decrease in mPr content in the light fractions of both the hippocampus and caudal brainstem.

Subgroup of Rats with PPI > 40%

In the subgroup of rats with PPI > 40%, after HBH, ChAT activation prevailed without changes in the Pr content (Figure 4, Table 1, IV – VI).

The following interstructural associations of ChAT activity were identified: (1) a positive correlation between the activation of mChAT in the light fraction of hippocampal synaptosomes and mChAT in the heavy fraction of cortical synaptosomes; (2) a negative correlation between the inhibition of mChAT in the heavy fraction of the hippocampus and the activation of sChAT in the heavy fraction of the cerebral cortex; (3) a positive correlation of the sChAT activation in the light fraction of the hippocampus with the sChAT activation in the light fraction of the caudal brainstem and, simultaneously, a negative correlation with the inhibition of mChAT in the heavy fraction of the caudal brainstem.

An increase in sPr content was associated with an increase in sChAT activity only in the light fraction of synaptosomes of the caudal brainstem. In addition, the increased sPr content in this fraction turned out to be negatively correlated with a decrease in mPr content in the heavy fraction of the hippocampus. In the heavy fractions of the hippocampus and caudal brainstem, the values of both cholinergic and protein s-indicators decreased, but no significant intrastructural correlations were found.

DISCUSSION

In the rats of 'HBH + SHBH' group tested at the critical altitude, HBH significantly increased SHBH tolerance (T values) in a PPI-dependent manner, av-

eraging 2.4- and 1.8-fold in the subgroups with PPI less than and greater than 40%, respectively. In the 'HBH + SHBH' group, a significant T-PPI dependence was observed, in contrast to the SHBH control group. Data on all characteristics are fully consistent with those obtained previously (Dudchenko et al., 2014; Zakharova, Dudchenko, 2016; Zakharova et al., 2018a, 2018b, 2020).

Our study revealed for the first time a number of related changes in the synaptic ChAT activity and Pr content in the cerebral cortex, hippocampus and caudal brainstem under HBH conditions.

The presynapses of cholinergic projections of the hippocampus and cerebral cortex were mainly concentrated in the light fractions of synaptosomes and the presynapses of cholinergic interneurons in the heavy fraction of synaptosomes (see the review in (Zakharova, Dudchenko, 2014)).

Only the light synaptosomes of the hippocampus were a fraction whose cholinergic presynapses responded to HBH with multidirectional changes in ChAT activity. This cholinergic reaction corresponded to the division of rats into subgroups at the boundary of approximately 40% PPI in our pharmacological data. Activation of cholinergic mediator function by DMSO reduced the preconditioning effect of HBH on resistance to SHBH in rats with PPI < 40% in IP administration and potentiated it in rats with PPI > 40% in IP and intrahippocampal administration (Zakharova et al., 2020, 2021, 2022).

From this it followed that the hippocampus is a key structure in the mechanisms of hypoxic preconditioning, namely, its cholinergic projections from the corresponding forebrain nuclei (Figure 5).

Participation of the hippocampal cholinergic projections in generation of the hippocampal theta rhythm in response to significant stimuli of any modality is known (Kitchigina, 2004; Yoder, Pang, 2005). In the electrophysiological studies, an increase in the power of slow wave activity in the EEG spectrum is a stable symptom of moderate brain hypoxia in a wide range of its values, starting at an altitude of 2000 m (pO₂ is 125 mm Hg). This has been shown in both rodent and human brains, and all publications mention the theta rhythm (Akopyan et al., 1984; Ramadan et al., 2020).

Therefore, when analyzing interstructural correlations, we took into account coherence with mChAT activity in the presynapses of light synaptosomes of the hippocampus as the elements of neural network

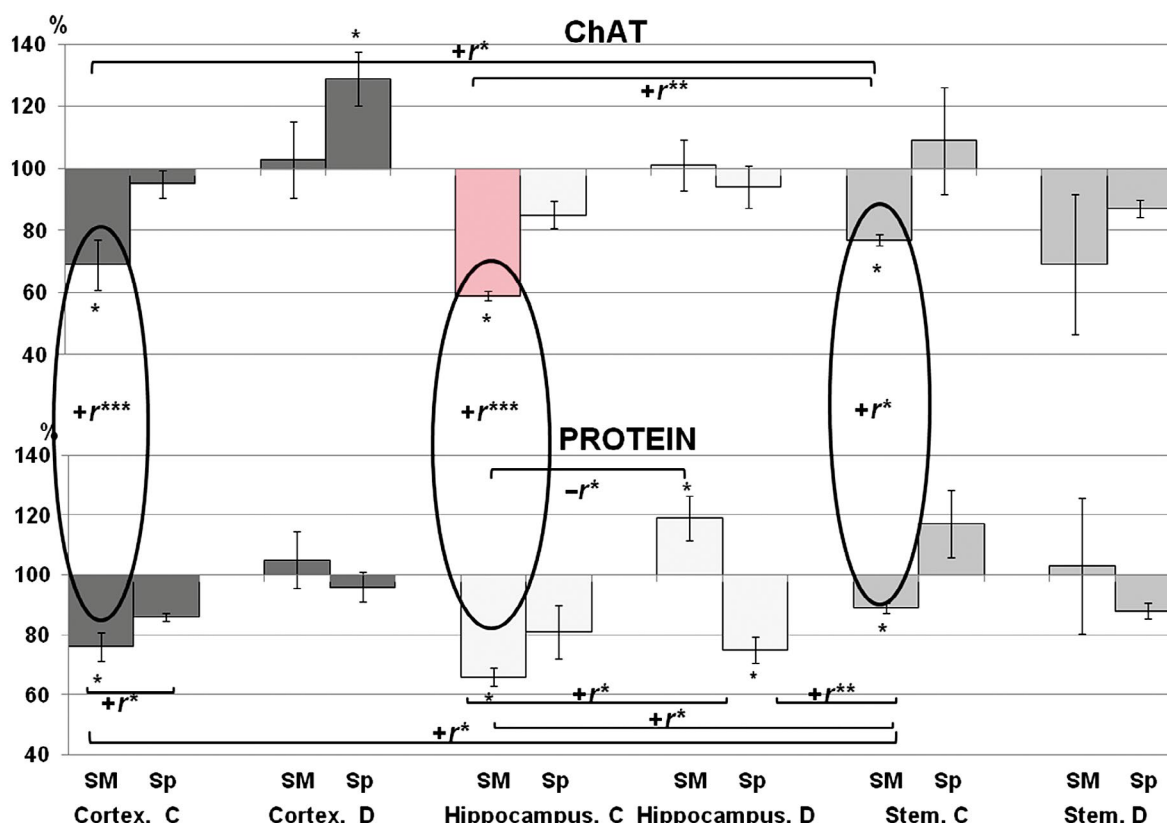


Fig. 3. Conjugacy of HBH-initiated changes in the synaptic ChAT activity and Pr content in the hippocampus, cerebral cortex, and caudal brainstem in rats with PPI < 40%. Designations. The ChAT activity and Pr content values are represented as a percentage change (mean $\pm$ SEM%) relative to the values in the corresponding control subgroup, which were taken as 100%. Cortex, the cerebral cortex. Stem, the caudal brainstem. C and D, the fractions of light and heavy synaptosomes, respectively, as in Figure 1. SM, the synaptic membrane subfraction. Sp, the synaptoplasm subfraction. The SM and Sp indicators are shown in pairs according to their belonging to a synaptosome fraction. ChAT, top row, the ChAT activity. PROTEIN, bottom row, the Pr content. Accordingly, in each brain structure, changes in mChAT/mPr values are presented in SM, and changes in sChAT/sPr values are presented in Sp. For better perception, the indicators of different brain structures (Cortex, Hippocampus, Stem) are presented in different colors (different shades of gray). In the Hippocampus, C, the SM column is highlighted in red in the 'ChAT' row, as it is a key indicator for the mechanism of hypoxic preconditioning. *, significant differences from the corresponding control subgroups, $p < 0.05$, $n = 3$, Fisher's exact test (FET-criterion), which for ChAT is similar to the '#' marker in Figure 1. Ovals represent a significant correlation between changes in ChAT activity and Pr content in a subfraction (an intrafractional association), Pearson's test (r -criterion). Horizontal brackets indicate a significant correlation of indicator changes (ChAT or Pr) between different subfractions (an interfractional and interstructural coherence) according to Pearson's test (r -criterion). $+r/-r$, positive/negative correlation, respectively; $r^*/r^{**}/r^{***}$, $p < 0.05/p < 0.02/p < 0.01$, respectively; $n = 6$ for each sample.

Рис. 3. Сопряженность HBH-инициируемых изменений в синаптической активности ХАТ и содержании белка (Pr) в гиппокампе, коре головного мозга и каудальном стволе головного мозга у крыс с ПСТ < 40%. Обозначения. Изменения в активности ХАТ и содержании белка представлены в процентах ($M \pm m\%$) по отношению к значениям в соответствующих субфракциях контрольной подгруппы, принятым за 100%. Cortex — кора головного мозга. Stem — каудальный ствол головного мозга. С и D — фракции легких и тяжелых синапсомов соответственно, как на рис. 1. SM — субфракция синаптических мембран. Sp — субфракция синаптоплазмы. Индикаторы SM и Sp спарены в соответствии с их принадлежностью к фракции синапсомов. ChAT — верхний ряд, активность ХАТ. PROTEIN — нижний ряд, содержание белка. Соответственно, в каждой структуре мозга, в субфракциях SM представлены изменения значений mChAT/mPr, а в субфракциях Sp представлены изменения значений sChAT/sPr. Для лучшего восприятия показатели разных структур мозга (коры, гиппокампа, ствола) представлены разными оттенками серого. В ряду "ChAT", в гиппокампе С столбец SM выделен розовым цветом, поскольку это ключевой индикатор в механизме гипоксического preconditionирования. * — достоверные отличия от соответствующих контрольных подгрупп, идентичны маркеру "#" на рис. 1 и 2, $p < 0.05$, $n = 3$, Точный Метод Фишера (ТМФ-критерий). Овалы обозначают значимую корреляцию между изменениями в активности ХАТ и содержании белка в пределах субфракции (внутрифракционная ассоциация), тест Пирсона (r -критерий). Горизонтальные скобки индексируют значимую корреляцию изменений биохимических показателей (активности ХАТ или содержания белка) в разных субфракциях (межфракционная и межструктурная когерентность, r -критерий). $+r/-r$ — положительная/отрицательная корреляция соответственно; $r^*/r^{**}/r^{***}$ — $p < 0.05/p < 0.02/p < 0.01$ соответственно; $n = 6$ для каждой выборки.

Table 1. Significant correlation values of HBH-initiated changes in the synaptic ChAT activity and Pr content in the hippocampus, cerebral cortex, and caudal brainstem in rats with PPI < 40% (I – III) and > 40% (IV – VI)

Таблица 1. Значения достоверных корреляций инициируемых ГБГ изменений синаптической активности ХАТ и содержания белка в гиппокампе, коре головного мозга и каудальном стволе головного мозга у крыс с ПСТ < 40% (I – III) и ПСТ > 40% (IV – VI)

I, ChAT – ChAT				
Fraction	Pirson's test/ Fraction	Hippocampus, C, SM	Hippocampus, D, Sp	Cortex, C, SM
Stem, C, SM	<i>r</i>	+0.936		+0.863
	P	P < 0.02		P < 0.05
II, Pr – Pr				
Fraction	Pirson's test/ Fraction	Hippocampus, C, SM	Hippocampus, D, Sp	Cortex, C, SM
Stem, C, SM	<i>r</i>	+0.880	+0.956	+0.878
	P	P < 0.05	P < 0.02	P < 0.05
Hippocampus, D, SM	<i>r</i>	-0.823		
	P	P < 0.05		
Hippocampus, D, Sp	<i>r</i>	+0.867		
	P	P < 0.05		
Cortex, C, Sp	<i>r</i>			+0.895
	P			P < 0.02
III, ChAT - Pr				
Fraction	Pirson's test/ Fraction	Stem, C, SM, Pr	Hippocampus, C, SM, Pr	Cortex, C, SM, Pr
Stem, C, SM, ChAT	<i>r</i>	+0.911		
	P	P < 0.02		
Hippocampus, C, SM, ChAT	<i>r</i>		+0.977	
	P		P < 0.01	
Cortex, C, SM, ChAT	<i>r</i>			+0.972
	P			P < 0.01
IV, ChAT - ChAT				
Fraction	Pirson's test/ Fraction	Hippocampus, C, SM	Hippocampus, C, Sp	Hippocampus, D, SM
Cortex, D, SM	<i>r</i>	+0.898		
	p	P < 0.02		
Cortex, D, Sp	<i>r</i>			-0.960
	P			P < 0.01
Stem, C, Sp	<i>r</i>		+0.948	
	P		P < 0.01	
Stem, D, SM	<i>r</i>		-0.968	
	P		P < 0.01	

V, Pr - Pr				
Fraction	Pirson's test/ Fraction	Hippocampus, C, SM	Hippocampus, C, Sp	Hippocampus, D, SM
Stem, C, Sp	<i>r</i>			-0.878
	<i>P</i>			<i>P</i> < 0.05
VI, ChAT – Pr				
Fraction	Pirson's test/ Fraction	Stem, C Sp	Hippocampus, C, Sp	Hippocampus, D, SM
Stem, C, Sp	<i>r</i>	+0.866		
	<i>P</i>	<i>P</i> < 0.05		

Designations. The table includes only samples with significant ChAT–ChAT, Pr–Pr and ChAT–Pr correlations presented in Fig. 3 and 4. The designations are the same as in Figures: Cortex, the cerebral cortex; Stem, the caudal brainstem; C and D, the fractions of light and heavy synaptosomes, respectively; SM, the synaptic membrane subfraction; Sp, the synaptoplasm subfraction; ChAT, the ChAT activity; Pr, the protein content. Pearson's test (*r*-criterion), *n* = 6 for each sample.

Обозначения. В таблицу включены значения только достоверных корреляций ХАТ-ХАТ, белок-белок и ХАТ-белок, представленные на рис. 3 и 4. Обозначения как и на рисунках: Cortex – кора головного мозга; Stem – каудальный ствол головного мозга; C и D – фракции легких и тяжелых синапсомов соответственно; SM – субфракция синаптических мембран; Sp – субфракция синаптоплазмы; ChAT – активность ХАТ; Pr – содержание белка. Метод Пирсона (*r*-критерий), *n* = 6 для каждой выборки.

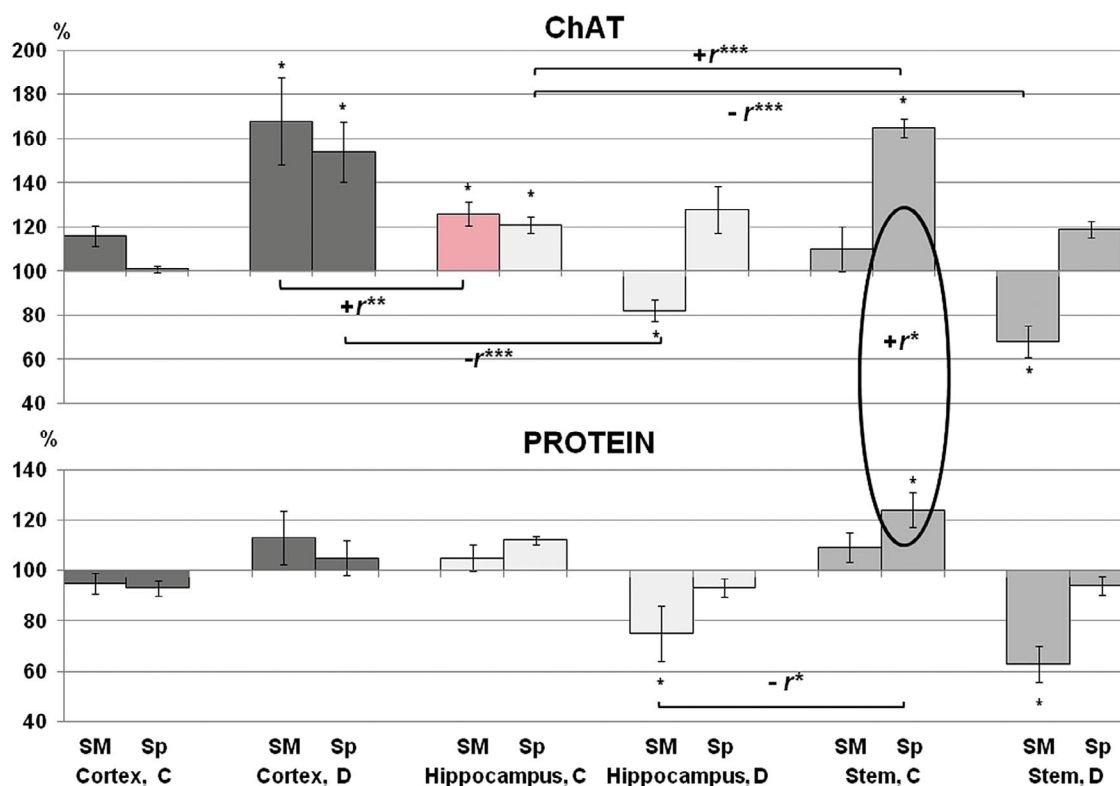


Fig. 4. Conjugacy of HBH-initiated changes in the synaptic ChAT activity and Pr content in the hippocampus, cerebral cortex, and caudal brainstem in rats with PPI > 40%. The designations are the same as those in Figure 2.

Рис. 4. Сопряженность ГБГ-инициируемых изменений в синаптической активности ХАТ и содержании белка в гиппокампе, коре головного мозга и каудальном стволе головного мозга у крыс с ПСТ > 40%. Обозначения как на рис. 3.

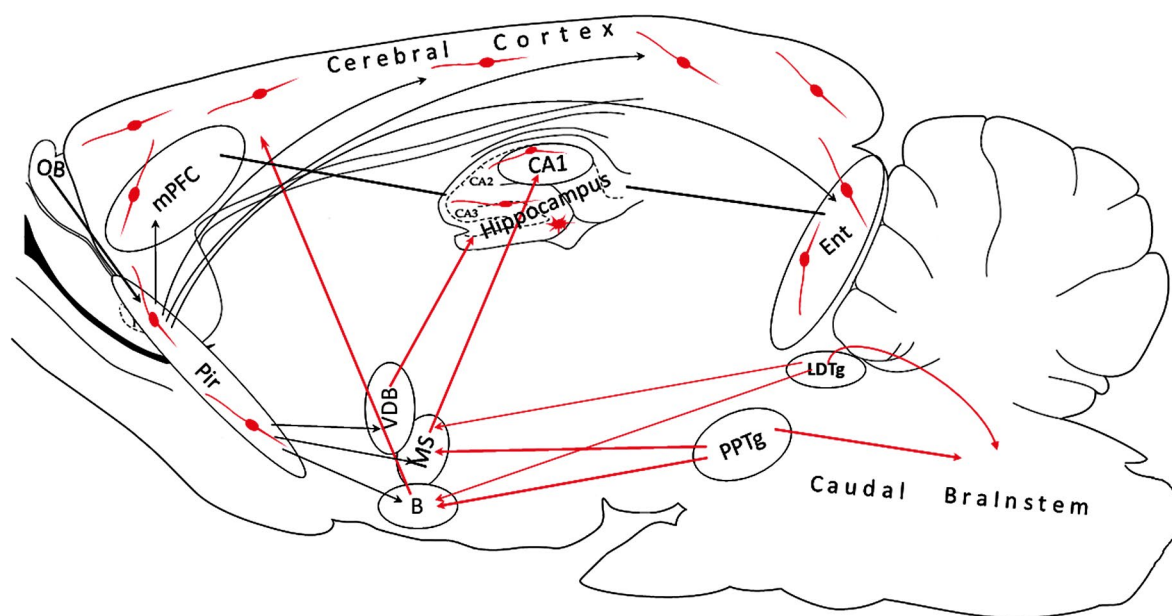


Fig. 5. Scheme of the sources of cholinergic influences in the cerebral cortex and hippocampus, as well as components of neural networks of hypoxic preconditioning. The scheme is based on the Rat Brain Atlas by Paxinos and Watson (Paxinos, Watson, 1998) and later data on the stereotaxic coordinates of the prefrontal cortex (Sampath et al., 2017; Wirt, Hyman, 2017). Designations. B, nucleus basalis magnocellularis. CA1, CA2, CA3, fields of the hippocampus. Caudal Brainstem, medulla oblongata + pons Varolii. Ent, entorhinal cortex. LDTg, laterodorsal tegmental nucleus. LC, locus coeruleus. MS, medial septal nucleus. mPFC, medial prefrontal cortex. OB, olfactory bulb. Pir, piriform cortex. PPTg, pedunculopontine tegmental nucleus. VDB, nucleus of the vertical limb of the diagonal band. Red ovals with short processes in the cerebral cortex and hippocampus, cholinergic interneurons (predominantly bipolar neurons). Red lines, cholinergic projections from the nuclei of the forebrain and tegmental nuclei of the midbrain. Black lines, projections of other neuromodulation (most often glutamatergic). The arrows indicate a direction of projections to a target structure. Where known, a line thickness reflects the relative power of single-color projections. The scheme shows only the brain structures and connecting fibers that are mentioned in the text.

Рис. 5. Схема источников холинергических влияний в неокортексе и гиппокампе, а также компонентов нейронных сетей гипоксического preconditionирования. Схема основана на Атласе мозга крысы Паксиноса и Уотсона (Paxinos, Watson, 1998) и более поздних данных о стереотаксических координатах префронтальной коры (Sampath et al., 2017; Wirt, Hyman, 2017). Обозначения. В – базальное крупноклеточное ядро. CA1, CA2, CA3 – поля гиппокампа. Caudal Brainstem – каудальный ствол головного мозга (продолговатый мозг + Варолиев мост). Cerebral Cortex – кора головного мозга. Ent – энторинальная кора. Hippocampus – гиппокамп. LDTg – латеродорсальное тегментальное ядро. MS – медиальное ядро перегородки. mPFC – медиальная префронтальная кора. OB – обонятельная луковица. Pir – грушевидная кора. PPTg – педункулопонтинное тегментальное ядро. VDB – ядро вертикального лимба диагональной связи. Красные овалы с короткими отростками в коре головного мозга и гиппокампе – холинергические интернейроны (преимущественно биполярные). Красные линии – холинергические проекции из ядер переднего мозга и тегментальных ядер среднего мозга. Черные линии – проекции других нейромедиаторов (чаще всего глутаматергических). Стрелки указывают направление проекций на целевую структуру. Если известно, толщина линии отражает относительную мощность одноцветных проекций. На схеме показаны только те структуры мозга и соединительные волокна, которые упомянуты в тексте.

involved in the generation of theta rhythm in the preconditioning mechanism of HBH.

Analysis of the Composition of the Neuronal Network of Hypoxic Preconditioning in Rats with PPI < 40% (Figure 3)

Cholinergic Presynaptic Components of the Neuronal Network

In the subgroup of rats with PPI < 40%, HBH initiated a decrease in mChAT activity in the light frac-

tions of the hippocampus, cortex and caudal brainstem. This indicated the inhibition of neurotransmitter function in the cholinergic projective neurons of the hippocampus and cortex, as well as in the population of the cholinergic synaptic pool of the caudal brainstem. The decrease in mChAT activity in the caudal brainstem was positively correlated with a decrease in mChAT activity in both the hippocampus and cortex. There was no correlation between the cortex and hippocampus. Therefore we concluded that the reaction in the caudal brainstem was primary, and its effects

extended to the cholinergic projective neurons of the forebrain nuclei of the cortex and hippocampus.

The synaptic response in all three structures – through a decrease in mChAT activity – was correlated with a decrease in mPr content in the corresponding fractions. The decrease in both biochemical parameters occurred conjugately (positive intrafractional correlations mChAT–mPr). Moreover, the mPr content showed the same correlations of the caudal brainstem with the hippocampus and cortex as those for mChAT.

The density of the cholinergic fibers of projective cholinergic laterodorsal (LDTg) and pedunculopontine (PPTg) nuclei from the middle-brain tegmentum is much more powerful than that of any other network of cholinergic fibers in the caudal brainstem (Woolf, Butcher, 1989; Jones, 1990). For both tegmental nuclei, the synaptic manner of transmitting cholinergic signals was characteristic and size of these synapses (medium and small) corresponded to the presynapses of the light fraction of synaptosomes (Bautista et al., 2010). Thus, it is likely that a reaction of projective presynapses from LDTg and PPTg was manifested in the fraction of light synaptosomes of the caudal brainstem.

PPTg and LDTg are the main relay nuclei between the cortical cholinergic projective neurons and brainstem formations (Semba et al., 1989). This signal transmission scheme can provide an interstructural association that explains the coherence of the cholinergic reaction in both the cerebral cortex and hippocampus with the cholinergic reaction in the caudal brain stem (Figure 5). However, there is a lack of association between the cortex and hippocampus in this cholinergic response. Therefore, it is possible that another source of innervation of the cholinergic nuclei of the forebrain is also involved in the preconditioning mechanism.

Noncholinergic Presynaptic Components of the Neuronal Network

The study of synaptic proteins also revealed a reaction to HBH of a noncholinergic nature in the presynapses in the heavy fraction of hippocampal synaptosomes. The increase in mPr and the decrease in sPr content were not correlated with each other, but both indicators were correlated with the mPr content in the light fraction of the hippocampus. In addition, the sPr content was correlated with the mPr content of the synaptic presynapses in the light fraction of the caudal brainstem. Thus, these correlations reflect the involvement of the noncholinergic synaptic pool of

the hippocampus in the hypoxic preconditioning neural network.

Note that in the heavy fractions of synaptosomes, GABAergic and glutamatergic presynapses dominate (see the review in (Zakharova et al., 2018b)). In the hippocampus, GABAergic and glutamatergic neurons are both mandatory components of the theta oscillation network and targets of projected cholinergic influences (Müller, Remy, 2018; Zinchenko et al., 2020; Gu, Yakel, 2022).

Analysis of the Composition of the Neuronal Network of Hypoxic Preconditioning in Rats with PPI > 40% (Figure 4)

Cholinergic Presynaptic Components of the Neuronal Network

In the subgroup of rats with PPI > 40%, the activation of mChAT in the light fraction of hippocampal synaptosomes was associated with the activation of mChAT in the heavy fraction of the cerebral cortex. There were no correlations of the mChAT activity in this fraction with the synaptic populations of the caudal brainstem.

Unlike mChAT, the activation of sChAT in the same light fraction of the hippocampus was associated with the activation of sChAT in the light fraction of synaptosomes and a negative correlation with the decrease in mChAT activity in the heavy fraction of the caudal brainstem. However, this reorganization led to intersubgroup alignment in ChAT activity in both the hippocampus and caudal brainstem. Therefore, this did not meet the criterion for the involvement of corresponding cholinergic synaptic populations in the performance of hypoxic preconditioning.

The lack of coherence of key neurons with the ascending airways in the HBH mechanism became possible to explain by scientific research over the past 20 years on the existence of breathing-sensitive neurons in the cerebral cortex.

It was found that neurons in the nasal olfactory epithelium respond to mechanical stimuli, including airflow pressure (Connelly et al., 2015; Girin et al., 2021; Juventin et al., 2023) and an odorless airflow (Carey et al., 2009; Phillips et al., 2012; Vaaga, Westbrook, 2016, Salimi et al., 2023). Moreover, nasal respiratory rhythms have been shown to modulate cortical rhythmic activity (Fontanini et al., 2003; Connelly et al., 2015; Lockmann et al., 2016; Vaaga, Westbrook, 2016; Heck et al., 2019; Girin et al., 2021; Sherif et al., 2021, Salimi et al., 2023), and it has been shown that cortical rhythms disappear after tracheotomy and they reappear by artificially passing

air through the nose (Fontanini et al., 2003; Lockmann et al., 2016).

It is especially important that several years ago, an atypical class of sensory neurons, the type B cells, were identified in the main olfactory epithelium. These type B cells are not sensitive to atmospheric oxygen (pO_2 is 159 mm Hg) and are activated by low O_2 , starting from pO_2 is 138 mm Hg (Bleymehl et al., 2016; Koike et al., 2021). Such data allow us to assume the existence of own cortical regulatory mechanism under the conditions of adaptive hypoxia.

The presynapses of cholinergic interneurons are concentrated in the heavy fraction of synaptosomes of the cerebral cortex. At the same time, the anatomical connections of the olfactory brain with the cortical regions and hippocampus are well known. In the olfactory brain, the piriform area is the main switching link of sensory information (Sheriff et al., 2021). Direct connections of the piriform area with the hippocampus and cortex have been shown, including the prefrontal and entorhinal cortical areas, and the primacy of the signal in the piriform cortex in relation to the hippocampus and entorhinal cortex has been traced (de Curtis et al., 2019; Sheriff et al., 2021; Zhou et al., 2021), as well as that with forebrain subcortical cholinergic nuclei, which are projected both in the hippocampus and cortex (Biagioni et al., 2019).

Therefore, it is likely that the piriform area is the structure that transmits respiratory stimuli from the olfactory epithelium to the cholinergic interneurons of the cortex and to the corresponding cholinergic subcortical nuclei that innervate the hippocampus (Figure 5).

In our study, both mChAT and sChAT were activated in the heavy fraction of the cortex. There were no correlations between these indicators. Therefore, we believe that the observed changes occurred in the presynapses of different populations of interneurons.

Noncholinergic Presynaptic Components of the Neuronal Network

In the heavy fraction of synaptosomes in the hippocampus, there was a decrease in the mPr content in presynapses of a noncholinergic nature. The negative correlation with the increase in the sPr content in the fraction of light synaptosomes of the caudal brainstem indicated the involvement of this population of noncholinergic presynapses (GABA- or glutamatergic) in the same neural network as that of the corresponding cholinergic populations of the caudal brainstem and hippocampus.

Physiological Significance of the Brain's Cholinergic Response to HBH

In this experiment, after HBH, the lower limit of resistance to SHBH was 5 min 29 s for the rats with $PPI > 40\%$, while for the rats with $PPI < 40\%$, it was 8 min 51 s.

In all of our experiments, for the rats with $PPI > 40\%$, this lower limit was 4 min 20 s, while for the rats with $PPI < 40\%$, it corresponded to the above (Dudchenko et al., 2014; Zakharova et al., 2018a, 2018b, 2020). The network differences in the implementation of hypoxic preconditioning in the rats with PPI values of $< 40\%$ or $> 40\%$ may be critical for the efficiency of HBH.

Increase of resistance to severe hypoxia in these subgroups of rats as a result of multidirectional functional changes in the same population of neurons is a poorly understood problem. Apparently, we first formulated this problem in this and our previous research (Zakharova et al., 2020). In the previous study, we hypothesized that the differential changes in ChAT activity in the subgroups of animals with PPI less than or greater than 40% may be a biochemical equivalent of theta filtering mechanism. And also we hypothesized that a physiological cause of these differences may be the different ways of its regulation. The second assumption is supported by the results of this study, which suggest radically different ways of its regulation in these subgroups of animals.

ChAT activity is the specific indicator for monitoring the functional state of cholinergic neurons and has become increasingly in demand over the years. This has been demonstrated both in the studies of ChAT activity and registration of EEG patterns in the hippocampus (Monmaur et al., 1984), and in experimental impairment of nervous functions or at early stages of neurodegenerative disorders in animals and humans (Dunbar et al., 1993; Zakharova, Dudchenko, 2014; Bagwe, Sathaye, 2022; Kirstein et al., 2022; AlQot, Rylett, 2023).

The activation of synaptic mChAT reflects, as a rule, the activation of synaptic cholinergic function (see the review in (Zakharova, Dudchenko, 2014)). It has been repeatedly shown that the activation of cholinergic projections of the hippocampus is necessary for the generation of theta rhythm (Müller, Remy, 2018; Ma et al., 2020; Gu, Yakel, 2022). Thus, our data in rats with $PPI > 40\%$ are consistent with the literature.

On the contrary, in rats with $PPI < 40\%$, a conjugated synaptic reaction in all three structures occurred through a decrease in mChAT activity. A similar re-

sponse to HBH of synaptic protein in the same sub-fractions reinforces these data. This, at first glance, contradicts the ideas about the role of the cholinergic mechanisms of the hippocampal theta rhythm in the rats with PPI > 40%, but this is a question that requires careful investigation. Thus, a number of studies have data that the interaction of cholinergic projections with hippocampal interneurons contributes to an adaptation of the theta rhythm to a current form of behavior (Gu, Yakel, 2022). In particular, the authors of this study provided data on the potentiation of the theta rhythm after cholinergic blockade.

The equalization of ChAT activity in response to HBH in the cerebral cortex and caudal brainstem may indicate the completion of the phase of perception and integration during the dominance of hippocampal phase of preconditioning. This “leveling” may reflect the filtering inherent in the theta rhythm, which provides insensitivity to stimuli from other modalities.

We also attributed the mChAT inhibition in the heavy fraction of hippocampal synaptosomes in the subgroup of rats with PPI > 40% to the filtration mechanism. This was the only fraction in which HBH did not even out but rather further deepened the intergroup differences. The cholinergic presynapses in this fraction are necessary for successful consolidation of early spatial memory (Zakharova et al., 2022).

These data could be consistent with our pharmacological experiments. Alpha7 subtype of nAChRs is recognized as procognitive receptors, the elimination of which blocks the possibility of memory consolidation during learning (Lykhmus et al., 2020; Sadigh-Eteghad et al., 2020; Shenkarev et al., 2020; Cheng et al., 2021). In our experiments, selective agonist of receptors of this subtype PNU abolished the effect of its DMSO solvent on HBH and, at high concentrations, suppressed the preconditioning effect of HBH in rats with PPI > 40% under IP and intrahippocampal administration (Zakharova et al., 2020, 2021).

It is also known that alpha7 nAChRs is involved in the hippocampal theta rhythm (Hummos, Nair, 2017; Gu, Yakel, 2022). Therefore it seems obvious that the theta rhythm is realized through different neural networks and various neurotransmitter receptors depending on the source of significant sensory stimulation and from PPI.

CONCLUSIONS

1. The first data on the central cholinergic components of neural networks in the mechanism of hypoxic preconditioning are presented.

2. Differences in the composition of hypoxic preconditioning network were revealed in rats with PPI values <40% and >40%. The neural network included cholinergic synapses of the hippocampus, caudal brainstem and cerebral cortex in rats with low PPI and only of the hippocampus and cortex in rats with high PPI.

3. A working hypothesis is substantiated that in the subgroups of rats with different PPI levels, hypoxic preconditioning is realized in the hippocampus through neural networks that include topographically different sensory inputs, namely respiratory neurons of the brainstem in rats with low PPI and respiratory neurons of the olfactory epithelium in rats with high PPI.

4. We hope that this direction of research will help to best realize the innate individual abilities of the body while optimizing personalized modes of adaptation to hypoxia.

REFERENCES

- Akopyan N.S., Baklavadzhyan O.G., Karapetyan M.A.* Effects of acute hypoxia on the EEG and impulse activity of the neurons of various conelly brain structures in rats. *Neurosci. Behav. Physiol.* 1984. 14 (5): 405–411.
- AlQot H.E., Rylett R.J.* A novel transgenic mouse model expressing primate-specific nuclear choline acetyltransferase: insights into potential cholinergic vulnerability. *Sci Rep.* 2023. 13 (1): 3037.
- Ando S., Komiyama T., Sudo M., Higaki Y., Ishida K., Costello J.T., Katayama K.* The interactive effects of acute exercise and hypoxia on cognitive performance: A narrative review. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 2020. 30 (3): 384–398.
- Appelbaum L.G., Shenasa M.A., Stolz L., Daskalakis Z.* Synaptic plasticity and mental health: methods, challenges and opportunities. *Neuropsychopharmacology.* 2022. 48: 113–120.
- Ashhad S., Kam K., Del Negro C.A., Feldman J.L.* Breathing Rhythm and Pattern and Their Influence on Emotion. *Annu. Rev. Neurosci.* 2022. 45: 223–247.
- Bagwe P., Sathaye S.* Significance of Choline Acetyltransferase Enzyme in Tackling Neurodegenerative Diseases. *Current Molecular Biology Reports.* 2022. 8: 9–22.
- Bautista T.G., Sun Q.J., Zhao W.J., Pilowsky P.M.* Cholinergic inputs to laryngeal motoneurons functionally identified in vivo in rat: A combined electrophysiological and microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 2010. 518: 4903–4916.
- Biagioni F., Gaglione A., Giorgi F.S., Bucci D., Moyanova S., De Fusco A., Madonna, M., Fornai F.* Degeneration of cholinergic basal forebrain nuclei after focally evoked status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 2019. 121: 76–94.
- Bleymehl K., Pérez-Gómez A., Omura M., Moreno-Pérez A., Macías D., Bai Z., Johnson R.S., Leinders-Zufall T.*

- Zufall F., Mombaerts P.A. Sensor for Low Environmental Oxygen in the Mouse Main Olfactory Epithelium. *Neuron*. 2016. 92: 1196–1203.
- Carey R.M., Verhagen J.V., Wesson D.W., Pérez N., Wachowiak M. Temporal structure of receptor neuron input to the olfactory bulb imaged in behaving rats. *J. Neurophysiol.* 2009. 101: 1073–1088.
- Cheng Q., Lamb P., Stevanovic K., Bernstein B.J., Fry S.A., Cushman J.D., Yakel J.L. Differential signalling induced by $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in hippocampal dentate gyrus in vitro and in vivo. *J. Physiol.* 2021. 599 (20): 4687–4704.
- Connelly T., Yu .Y., Grosmaître X., Wang J., Santarelli L.C., Savigner A., Qiao X., Wang Z., Storm D.R., Ma. M. G protein-coupled odorant receptors underlie mechanosensitivity in mammalian olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2015. 112: 590–595.
- Das M., Das D.K. Molecular Mechanism of Preconditioning. *IUBMB Life*. 2008. 60: 199–203.
- de Curtis M., Uva L., Lévesque M., Biella G., Avoli M. Piriform cortex ictogenicity in vitro. *Exp. Neurol.* 2019. 321: 113014.
- Dudchenko A.M., Zakharova E.I., Storozheva Z.I. Method for Predicting the Limit of Resistance of Animals to Severe Hypoxia after Hypoxic Preconditioning. RF Patent 2571603. 4 July 2014.
- Dunbar G.L., Rylett R.J., Schmidt B.M., Sinclair R.C., Williams L.R. Hippocampal choline acetyltransferase activity correlates with spatial learning in aged rats. *Brain Res.* 1993. 604 (1–2): 266–272.
- Fonnum F. Radiochemical microassays for the determination of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities. *Biochem. J.* 1969. 115: 465–472.
- Fontanini A., Spano P., Bower J.M. Ketamine-Xylazine-induced slow (< 1.5 Hz) oscillations in the rat piriform (olfactory) cortex are functionally correlated with respiration. *J. Neurosci.* 2003. 23: 7993–8001.
- Gavrilova S.A., Samojlenkova N.S., Pirogov Yu.A., Khudoerkov R.M., Koshelev V.B. Neuroprotective effect of hypoxic preconditioning in the rat brain with focal ischemia. *Pathogenesis*. 2008. 6 (3): 13–17. In Russian
- Girin B., Juventin M., Garcia S., Lefèvre L., Amat C., Fourcaud-Trocmé N., Buonviso N. The deep and slow breathing characterizing rest favors brain respiratory-drive. *Sci. Rep.* 2021. 11 (1): 7044.
- Gu .Z., Yakel J.L. Cholinergic Regulation of Hippocampal Theta Rhythm. *Biomedicines*. 2022. 10: 745.
- Heck D.H., Kozma R., Kay L.M. The rhythm of memory: How breathing shapes memory function. *J. Neurophysiol.* 2019. 122: 563–571.
- Hummos A., Nair S.S. An integrative model of the intrinsic hippocampal theta rhythm. *PLoS ONE*. 2017. 12: e0182648.
- Jones B.E. Immunohistochemical study of choline acetyltransferase immunoreactive processes and cells innervating the pontomedullary reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1990. 295: 485–514.
- Juventin M., Ghibaudo V., Granget J., Amat C., Courtiol E., Buonviso N. Respiratory influence on brain dynamics: the preponderant role of the nasal pathway and deep slow regime. *Pflugers Arch.* 2023. 475 (1): 23–35.
- Karalis N., Sirota A. Breathing coordinates cortico-hippocampal dynamics in mice during offline states. *Nat. Commun.* 2022. 13: 467.
- Kirstein M., Cambrils A., Segarra A., Melero A., Varea E. Cholinergic Senescence in the Ts65Dn Mouse Model for Down Syndrome. *Neurochem Res.* 2022. 47 (10), 3076–3092.
- Kitchigina V.F. Mechanisms of the regulation and the functional significance of the Theta-Rhythm. Roles of serotonergic and noradrenergic systems. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat.* 2004. 54: 101–119. In Russian
- Kobzar A.I. Applied Mathematical Statistics. For Engineers and Scientists. Moscow: FIZMATLIT, 2006. 816 p. In Russian
- Koike K., Yoo S.J., Bleyemehl K., Omura M., Zapiec B., Pyrski M. et al. Danger perception and stress response through an olfactory sensor for the bacterial metabolite hydrogen sulfide. *Neuron*. 2021. 109 (15): 2469–2484.e7.
- Lara-González E., Padilla-Orozco M., Fuentes-Serrano A., Bargas J., Duhne M. Translational neuronal ensembles: Neuronal microcircuits in psychology, physiology, pharmacology and pathology. *Front. Syst. Neurosci.* 2022. 16: 979680.
- Liu H., Shi R., Liao R., Liu Y., Che J., Bai Z., Cheng N., Ma H. Machine Learning Based on Event-Related EEG of Sustained Attention Differentiates Adults with Chronic High-Altitude Exposure from Healthy Controls. *Brain Sci.* 2022 12 (12):1677.
- Lockmann A.L., Laplagne D.A., Leão R.N., Tort A.B. A Respiration-Coupled Rhythm in the Rat Hippocampus Independent of Theta and Slow Oscillations. *J. Neurosci.* 2016. 36: 5338–5352.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem.* 1959. 193: 265–275.
- Lukyanova L.D., Germanova E.L., Kopaladze R.A. Development of resistance of an organism under various conditions of hypoxic preconditioning: role of the hypoxic period and reoxygenation. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009. 147: 400–404.
- Lukyanova L.D., Germanova E.L., Tsibina T.A., Kopaladze R.A., Dudchenko A.M. Efficiency and mechanism for different regimens of hypoxic training: The possibility of optimization of hypoxic therapy. *Pathogenesis*, 2008, 6: 32–36. In Russian
- Lykhmus O., Kalashnyk O., Uspenska K., Horid'ko T., Kosyakova H., Komisarenko S., Skok M. Different Effects of Nicotine and N-Stearoyl-ethanolamine on Episodic Memory and Brain Mitochondria of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Knockout Mice. *Biomolecules*. 2020. 10 (2): 226.
- Ma X., Zhang Y., Wang L., Li .N., Barkai E., Zhang X., Lin L., Xu J. The Firing of Theta State-Related Sep-

- tal Cholinergic Neurons Disrupt Hippocampal Ripple Oscillations via Muscarinic Receptors. *J. Neurosci.* 2020. 40 (18): 3591–3603.
- Maslov L.N., Lishmanov Yu.B., Emelianova T.V., Prut D.A., Kolar F., Portnichenko A.G. et al. Hypoxic Preconditioning as Novel Approach to Prophylaxis of Ischemic and Reperfusion Damage of Brain and Heart. *Angiol. Sosud. Khir.* 2011; 17 (3): 27–36. In Russian
- Monmaur P., Fage D., M'Harzi M., Delacour J., Scatton B. Decrease in both choline acetyltransferase activity and EEG patterns in the hippocampal formation of the rat following septal macroelectrode implantation. *Brain Res.* 1984. 293 (1): 178–183.
- Müller C., Remy S. Septo-hippocampal interaction. *Cell Tissue Res.* 2018. 373 (3): 565–575.
- Navarrete-Opazo A., Mitchell G.S. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014. 307 (10): R1181–R1197.
- Obermayer J., Luchicchi A., Heistek T.S., de Kloet S.F., Terra H., Bruinsma B. et al. Prefrontal cortical ChAT-VIP interneurons provide local excitation by cholinergic synaptic transmission and control attention. *Nat. Commun.* 2019. 10: 5280.
- Paxinos G., Watson Ch. *Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Fourth Edition, San Diego: Academic Press, 1998, 474 p.
- Phillips M.E., Sachdev R.N., Willhite D.C., Shepherd G.M. Respiration drives network activity and modulates synaptic and circuit processing of lateral inhibition in the olfactory bulb. *J. Neurosci.* 2012. 32: 85–98.
- Radhakrishnan S., Martin C.A., Dhayanithy G., Reddy M.S., Rela M., Kalkura S.N., Sellathamby S. Hypoxic Preconditioning Induces Neuronal Differentiation of Infrapatellar Fat Pad Stem Cells through Epigenetic Alteration. *ACS Chem. Neurosci.* 2021. 12: 704–718.
- Ramadan M.Z., Ghaleb A.M., Ragab A.E. Using Electroencephalography (EEG) Power Responses to Investigate the Effects of Ambient Oxygen Content, Safety Shoe Type, and Lifting Frequency on the Worker's Activities. *Biomed. Res. Int.* 2020: 7956037.
- 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.
- Sadigh-Eteghad S., Vatandoust S.M., Mahmoudi J., Rahigh Aghsan S., Majdi A. Cotinine ameliorates memory and learning impairment in senescent mice. *Brain Res. Bull.* 2020. 164: 65–74.
- Sampath D., Sathyanesan M., Newton S.S. Cognitive dysfunction in major depression and Alzheimer's disease is associated with hippocampal-prefrontal cortex dyconnectivity. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2017. 13: 1509–1519.
- Salimi M., Ayene F., Parsazadegan T., Nazari M., Jamali Y., Raoufy M.R. Nasal airflow promotes default mode network activity. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2023. 307:103981.
- Sawada M., Sato M. The effect of dimethyl sulfoxide on the neuronal excitability and cholinergic transmission in Aplysia ganglion cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1975. 243: 337–357.
- Semba K., Reiner P.B., McGeer E.G., Fibiger H.C. Brainstem projecting neurons in the rat basal forebrain: Neurochemical, topographical, and physiological distinctions from cortically projecting cholinergic neurons. *Brain Res. Bull.* 1989. 22: 501–509.
- Shenkarev Z.O., Shulepko M.A., Bychkov M.L., Kulbatskii D.S., Shlepova O.V., Vasilyeva N.A. et al. Water-soluble variant of human Lynx1 positively modulates synaptic plasticity and ameliorates cognitive impairment associated with $\alpha 7$ -nAChR dysfunction. *J. Neurochem.* 2020. 155 (1):45–61.
- Sheriff A., Pandolfi G., Nguyen V.S., Kay L.M. Long-Range Respiratory and Theta Oscillation Networks Depend on Spatial Sensory Context. *J. Neurosci.* 2021. 41: 9957–9970.
- Vaaga C.E., Westbrook G.L. Parallel processing of afferent olfactory sensory information. *J. Physiol.* 2016. 594: 6715–6732.
- Wirt R.A., Hyman J.M. Integrating Spatial Working Memory and Remote Memory: Interactions between the Medial Prefrontal Cortex and Hippocampus. *Brain Sci.* 2017. 7 (4): 43.
- Wood G.K., Tomasiewicz H., Rutishauser U., Magnuson T., Quirion R., Rochford J., Srivastava L.K. NCAM-180 knockout mice display increased lateral ventricle size and reduced prepulse inhibition of startle. *Neuroreport.* 1998. 9: 461–4666.
- Woolf N.J., Butcher L.L. Cholinergic systems in the rat brain: IV. Descending projections of the pontomesencephalic tegmentum. *Brain Res. Bull.* 1989. 23: 519–540.
- Yang Y., Gritton H., Sarter M., Aton S.J., Booth V., Zochowski M. Theta-gamma coupling emerges from spatially heterogeneous cholinergic neuromodulation. *PLoS Comput. Biol.* 2021. 17: e1009235.
- Yoder R.M., Pang K.C. Involvement of GABAergic and cholinergic medial septal neurons in hippocampal theta rhythm. *Hippocampus.* 2005. 15: 381–392.
- Zakharova E.I., Dudchenko A.M. Hypoxic Preconditioning Eliminates Differences in the Innate Resistance of Rats to Severe Hypoxia. *Journal of Biomedical Science and Engineering.* 2016. 9: 563–575.
- Zakharova E.I., Dudchenko A.M. Synaptic soluble and membrane-bound choline acetyltransferase as a marker of cholinergic function in vitro and in vivo. *Neurochemistry.* Ed. Heinbockel T. Rijeka: InTechOpen, 2014. 5: 143–178 pp.
- Zakharova E.I., Dudchenko A.M., Germanova E.L. Effects of preconditioning on the resistance to acute hypobaric hypoxia and their correction with selective antagonists

- of nicotinic receptors. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. 151 (2): 179–182.
- Zakharova E.I., Proshin A.T., Monakov M.Y., Dudchenko A.M. Cholinergic Internal and Projection Systems of Hippocampus and Neocortex Critical for Early Spatial Memory Consolidation in Normal and Chronic Cerebral Hypoperfusion Conditions in Rats with Different Abilities to Consolidation: The Role of Cholinergic Interneurons of the Hippocampus. *Biomedicines*. 2022. 10: 1532.
- Zakharova E.I., Proshin A.T., Monakov M.Y., Dudchenko A.M. Effect of Intrahippocampal Administration of $\alpha 7$ Subtype Nicotinic Receptor Agonist PNU-282987 and Its Solvent Dimethyl Sulfoxide on the Efficiency of Hypoxic Preconditioning in Rats. *Molecules*. 2021. 26: 7387.
- Zakharova E.I., Storozheva E.I., Proshin A.T., Monakov M.Y., Dudchenko A.M. The Acoustic Sensorimotor Gating Predicts the Efficiency of Hypoxic Preconditioning. Participation of the Cholinergic System in This Phenomenon. *J. Biomed. Sci. Eng.* 2018a. 11: 10–25.
- Zakharova E.I., Storozheva Z.I., Proshin A.T., Monakov M.Y., Dudchenko A.M. Hypoxic Preconditioning: The multiplicity of central neurotransmitter mechanisms and method of predicting its efficiency. *Hypoxia and Anoxia*. Eds. Das K.K., Biradar M.S., London: In-TechOPEN, 2018b. 6: 95–131 pp.
- Zakharova E.I., Storozheva Z.I., Proshin A.T., Monakov M.Y., Dudchenko A.M. Opposite Pathways of Cholinergic Mechanisms of Hypoxic Preconditioning in the Hippocampus: Participation of Nicotinic $\alpha 7$ Receptors and Their Association with the Baseline Level of Startle Prepulse Inhibition. *Brain Sci.* 2020. 11: 12.
- Zenko M.Y., Rybnikova E.A. Cross Adaptation: from F.Z. Meerson to the Modern State of the Problem. Part 1. Adaptation, Cross-Adaptation and Cross-Sensitization. *Usp. Fiziol. Nauk.* 2019. 50 (4): 3–13. In Russian
- Zhou G., Olofsson J.K., Koubeissi M.Z., Menelaou G., Rose-now, J., Schuele S.U. et al. Human hippocampal connectivity is stronger in olfaction than other sensory systems. *Prog. Neurobiol.* 2021. 201: 102027.
- Zinchenko V.P., Gaidin S.G., Teplov I.Yu., Kosenkov A.M., Sergeev A.I., Dolgacheva L.P., Tuleuhanov S.T. Visualization, Properties, and Functions of GABAergic Hippocampal Neurons Containing Calcium-Permeable Kainate and AMPA Receptors. *Biochemistry (Moscow)*, Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2020. 14: 44–53.

ГИПОКСИЧЕСКОЕ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ У КРЫС С НИЗКИМ И ВЫСОКИМ ПРЕДСТИМУЛЬНЫМ ТОРМОЖЕНИЕМ АКУСТИЧЕСКОГО ВЗДРАГИВАНИЯ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ ЧЕРЕЗ ТОПОГРАФИЧЕСКИ РАЗЛИЧНЫЕ СЕНСОРНЫЕ ВХОДЫ. РАБОЧАЯ ГИПОТЕЗА

Е. И. Захарова^{1,*}, З. И. Сторожева², А. Т. Прошин², М. Ю. Монаков¹, А. М. Дудченко¹

¹ ФГБНУ Институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

² ФГБНУ ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, Москва, Россия

*e-mail: zakharova-ei@yandex.ru

Нейромедиаторные и сетевые механизмы гипоксического preconditionирования практически не изучены. Ранее на крысах мы выявили ключевую роль гиппокампа и его холинергических проекций в preconditionирующем механизме однократной умеренной гипобарической гипоксии (ГБГ) благодаря ассоциации между эффективностью ГБГ и величиной предстимульного торможения в акустической стартовой реакции (ПСТ). В настоящем исследовании представлены первые данные о ПСТ-зависимых нейронных сетях гипоксического preconditionирования и их холинергических компонентах. Для корреляционного анализа использовалась активность синаптической холинацетилтрансферазы (ХАТ), индикатора холинергической функции как показатель реакции на ГБГ в гиппокампе, коре головного мозга и каудальном отделе ствола головного мозга у животных с различным уровнем ПСТ. У крыс с ПСТ < 40% активность ХАТ коррелировала в гиппокампе, коре и каудальном отделе ствола мозга, а у крыс с ПСТ > 40% – в гиппокампе и коре головного мозга. Предполагается, что ГБГ реализуется через топографически различные сенсорные входы, а именно через дыхательные нейроны ствола мозга у крыс с низким уровнем ПСТ и дыхательные нейроны обонятельного эпителия у крыс с высоким уровнем ПСТ.

Ключевые слова: гипоксическое preconditionирование; нейронные (биологические) сети; ГБГ; ПСТ; гиппокамп; кора головного мозга; каудальный ствол головного мозга; холинергические проекционные нейроны из ядер переднего мозга и интернейроны; “легкие” и “тяжелые” синапсомы; синаптическая мембраносвязанная и водорастворимая ХАТ

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

УДК 612.821

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОЙ
СКУЧЕННОСТИ НА ТРЕВОЖНОСТЬ
И УСЛОВНО-РЕФЛЕКТОРНЫЙ СТРАХ

© 2024 г. И.В. Павлова*, Н.Д. Брошевицкая

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

*e-mail: pavlovmf@mail.ru

Поступила в редакцию 31.10.2023 г.

После доработки 07.12.2023 г.

Принята к публикации: 11.03.2024 г.

Исследовали влияние длительного содержания (с 30-го по 150-й постнатальный день) в условиях повышенной скученности (15–17 крыс в стандартной клетке размером $31 \times 52 \times 20$ см, 106–120 см² на крысу) на тревожное поведение, а также выработку и угашение классического условного оборонительного рефлекса у взрослых животных. У половины крыс в раннем онтогенезе вызвали активацию иммунной системы с помощью введения бактериального липополисахарида на 3-й и 5-й постнатальный день в дозе 50 мкг/кг (группа ЛПС), другой половине животных вводили физиологический раствор (группа ФИЗ). Начиная с 90-го дня крыс тестировали в “открытом поле”, приподнятом крестообразном лабиринте, вырабатывали условно-рефлекторное замирание на звук. В экспериментах участвовали как самцы, так и самки. Тестирование не выявило признаков увеличения уровня тревожности под влиянием скученности, но обнаружило снижение двигательной активности и увеличение замещающей активности (груминга) как у самцов, так и самок. При выработке условно-рефлекторного страха на звук у всех самцов, содержащихся в скученных условиях, по сравнению с контролем время замирания было меньше. Однако только у самцов группы ЛПС под влиянием скученности нарушалась память о сигнале, страдала дифференцировка контекста и сигнала, быстрее проходило угашение рефлекса. Таким образом, при выработке условно-рефлекторного страха самцы по сравнению с самками были более подвержены негативному влиянию скученности. Пережитый ранний провоспалительный стресс у крыс усугублял влияние скученности.

Ключевые слова: повышенная скученность, тревожность, условно-рефлекторный страх, замирание, липополисахарид

DOI: 10.31857/S0044467724030085

В литературе в качестве одного из широко распространенных психосоциальных стрессов рассматривается перенаселенность, или скученность, которая оказывает негативное воздействие как на людей, так и на животных (Лосева, 2021). Разработана экспериментальная модель перенаселенности на грызунах в условиях вивария — содержание в условиях повышенной скученности в клетках стандартного объема, рассчитанных на 4–6 животных. Описано несколько протоколов исследования скученности, при этом варьируют длительность, возраст начала воздействия, число крыс в клетке. В ряде работ помещение животных в скученные условия на 1–14 дней осуществляли во взрослом возрасте после месяца жизни в комфортных условиях (Лосева, 2021; Кныазева et al., 2012; Botelho et al., 2007), такой протокол считается наиболее стрес-

согенным для крыс. В других работах животных помещали в скученные условия в раннем онтогенезе и на более длительный срок (Daniels et al., 2000; Гаврилов с соавт. 2021) или в зрелом возрасте в 10–14 месяцев (Bubna-Littitz et al., 1981). В специальных исследованиях изучалась зависимость эффектов от содержания в клетке разного числа крыс, в стандартную клетку помещали 8, 10, 12, 16, 24, 32 животных (Goekner et al., 1973; Botelho et al., 2007). Было установлено, что негативный эффект скученности наблюдался, когда в клетке было не менее 16 крыс.

В большинстве работ было показано, что содержание в условиях повышенной скученности может вызывать повышение уровня тревожности у крыс и мышей (Botelho et al., 2007; Daniels et al., 2000; Moiseeva et al., 2009; Кныазева с соавт., 2012; Лосева, 2021; Lin et al., 2015; Delaroque et al., 2021).

В некоторых работах наблюдали увеличение депрессивно-подобного поведения у крыс после 14-дневного содержания в скученных условиях (Лосева с соавт., 2015), в других работах такие изменения отсутствовали после 9 недель проживания мышей в этих условиях (Lin et al., 2015).

Влияние повышенной скученности на обучение и память изучали в сравнительно меньшем числе работ. В простых заданиях с односторонним активным избеганием или тормозным избеганием (спуск с платформы) не было обнаружено нарушения в обучении у “скученных” (содержавшихся в условиях скученности) крыс (Goekner et al., 1973). Нарушений в обучении и памяти не наблюдали также при выработке избегания определенного рукава в приподнятом крестообразном лабиринте у самок крыс, проживавших в скученных условиях (Nascimento et al., 2019). Скученность не влияла на выработку пищедобывательного инструментального рефлекса как при индивидуальном, так и при кооперативном обучении (Гаврилов с соавт. 2021). Однако в более сложных задачах — с выбором и дискриминантным избеганием в Y-лабиринте — наблюдали ухудшение обучения (Goekner et al., 1973). Крысы, содержащиеся в скученных условиях по 32 штуки в клетке, вырабатывали двухстороннее избегание в челночной камере, но более медленно, чем контрольные животные (Goekner et al., 1974). У “скученных” крыс наблюдали ухудшение пространственной памяти в водном лабиринте Морриса (Diaz-Burke et al., 2010). В некоторых работах обнаружили, наоборот, улучшение обучения и памяти под влиянием скученности у крыс в возрасте с 10 до 12 мес в Т-образном лабиринте с семью точками выбора (Bubna-Littitz et al., 1981). Следует признать, что влияние скученности на обучение исследовано недостаточно полно, данные по ряду моделей, например по выработке условно-рефлекторного страха (fear conditioning), отсутствуют. Неизвестно, как влияет скученность на выработку вунтренного торможения, например на угашение рефлексов.

В большинстве работ при изучении скученности использовали только самцов, как скажется скученность на поведении самок — было неизвестно. Ранее при анализе уровня кортикостерона было обнаружено его повышение при содержании в скученных условиях у самцов, но не у самок, у которых он снижался по сравнению с условиями социальной изоляции (Brown, Grunberg, 1995). Авторы считали, что самки, в отличие от самцов, успокаивались при скучен-

ности. Кроме того, при другом виде социального стресса, при социальной изоляции, были обнаружены половые различия, самки показали большую чувствительность к стрессу по сравнению с самцами (Krupina et al., 2020; Павлова с соавт., 2021а, б).

Известно, что пережитый ранний провоспалительный стресс делает крыс более уязвимыми к стрессирующим воздействиям во взрослом возрасте (Павлова с соавт., 2021б; Walker et al., 2009). Активация иммунитета в раннем онтогенезе с помощью введения бактериального липополисахарида (ЛПС) на 3-й и 5-й день жизни приводила к более выраженным негативным последствиям от стресса социальной изоляции, чем у контрольных крыс, получавших физиологический раствор (Павлова с соавт., 2021 а, б). Как скажется влияние скученности на крыс, переживших ранний провоспалительный стресс, было неизвестно.

Целью нашей работы был анализ влияния содержания в условиях повышенной скученности на уровень тревожности, а также на выработку и угашение условно-рефлекторного страха у крыс в норме и после раннего провоспалительного стресса. Для достижения поставленной цели у половины крысят в раннем онтогенезе проводили активацию иммунной системы с помощью введения бактериального липополисахарида (ЛПС), другая половина крысят получала физиологический раствор (контроль). Необходимо было проанализировать поведение крыс в тестах на тревожность (в “открытом поле” и приподнятом крестообразном лабиринте), а также провести выработку, тестирование и угашение условно-рефлекторного страха на звук, проявляющегося в виде замирания. На всех этапах исследования предполагали сопоставить поведение самцов и самок.

МЕТОДИКА

1. Животные. В экспериментах использовали 122 крысы Вистар (64 самца и 58 самок) в возрасте с 3-го по 150-й постнатальный день (ПНД). Крысята были выведены в виварии ИВНД и НФ от родителей, полученных из филиала “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА, Россия. С целью вызвать ранний провоспалительный стресс на 3-й и 5-й ПНД одной половине крысят из пометов делали инъекцию бактериального липополисахарида подкожно в холку в дозе 50 мкг/кг в объеме 10 мкл на 1 г веса (группа ЛПС). Другой половине крысят из пометов в этом возрасте вво-

дили физиологический раствор в том же объеме (группа ФИЗ). На 25-й ПНД крысят отсаживали от матери, и в дальнейшем животных содержали в виварии при обычном 12-часовом световом режиме в свободном доступе к воде и стандартному корму. В экспериментах соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского Сообщества (2010/63/EU), и положения ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

2. Условия содержания. На 30-й ПНД крысят помещали в различные условия содержания, в которых они находились до окончания экспериментов. Часть крыс (32 самца и 33 самки) содержали в стандартных условиях по 5 особей в клетках размером $52 \times 31 \times 20$ см (360 см^2 на крысу, группа СТАНД), другая часть (32 самца и 25 самок) проживала в условиях повышенной скученности по 15–17 особей в клетках такого же размера ($106\text{--}120 \text{ см}^2$ на крысу, группа СКУЧ). При недостаточном количестве экспериментальных животных из группы ФИЗ или ЛПС для создания условий повышенной скученности в возрасте 30 дней в клетку подсаживали интактных крыс такого же возраста. Животные, содержащиеся в условиях повышенной скученности, не испытывали недостатка в корме и воде, смену опилок в клетке проводили каждый день. В зависимости от условий содержания, пола и вещества, вводимого в раннем онтогенезе, было сформировано 8 групп крыс: самцы ФИЗ+СТАНД (15 крыс), самцы ФИЗ+СКУЧ (15 крыс), самцы ЛПС+СТАНД (17 крыс), самцы ЛПС+СКУЧ (17 крыс), самки ФИЗ+СТАНД (16 крыс), самки ФИЗ+СКУЧ (13 крыс), самки ЛПС+СТАНД (17 крыс), самки ЛПС+СКУЧ (12 крыс).

3. Тестирование на тревожность. Начиная с 90-го ПНД, вначале в течение 3–4 дней проводили хэндлинг животных по 7–10 мин в день, затем через 2–3 дня крыс тестировали на тревожность в “открытом поле” и приподнятом крестообразном лабиринте. “Открытое поле” (ОП) представляло собой круглую арену диаметром 100 см с высотой стенок 30 см. Освещенность ОП достигала 30–40 люкс. В компьютерной программе условно вся арена с помощью окружностей, центр которых совпадал с центром в ОП, была поделена на центральную часть ОП ($d = 30$ см), среднюю часть (шириной 16.5 см) и периферию (шириной 17 см). Время наблюдения в тесте 5 мин. Анализировали показатели, отражавшие тревожность/смелость крыс (время нахождения на периферии, число и длительность выходов в центр), двигательную активность крыс (прой-

денная дистанция, скорость движения, время движения, латентность ухода из центра в начале опыта), исследовательское поведение (стойки), поведение по оценке риска (вытягивания (stretch-attend postures)), замещающую активность (число эпизодов и длительность груминга), а также ряд показателей, отражавших вегетативные реакции (число дефекаций и уринаций).

Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) состоял из центральной площадки (10×10 см) и 4 рукавов, двух открытых и двух закрытых, шириной 10 см и длиной 50 см, закрытые рукава имели боковые стенки высотой 40 см. Рукава располагались под углом 90° друг относительно друга. Лабиринт находился на высоте 50 см над уровнем пола. Освещенность открытых рукавов достигала 60–80 люкс, закрытых – 20 люкс. В начале опыта крысу помещали на центральную площадку, голова была направлена в сторону открытого рукава. Время наблюдения в тесте 5 мин. Анализировали показатели, отражавшие тревожность/смелость крыс (число и длительность выходов в открытые и закрытые рукава), двигательную активность (пройденную дистанцию, скорость движения, время движения, число переходов между рукавами), исследовательское поведение (стойки, выглядывания в открытые рукава, свешивания), поведение по оценке риска (вытягивания (stretch-attend postures)), замещающую активность (число и длительность эпизодов груминга), а также ряд показателей, свидетельствовавших о вегетативных реакциях (число дефекаций и уринаций). При дальнейшей обработке для оценки тревожности в ПКЛ подсчитывали процент времени нахождения в открытых рукавах от общего времени, проведенного в открытых и закрытых рукавах, а также процент заходов в открытые рукава от общего числа заходов в открытые и закрытые рукава.

Для фиксирования траектории движения крыс и элементов поведения в тестах на тревожность использовали программу Etho Vision (Noldus), а также видеорегистрацию.

4. Выработка, тестирование и угашение классического условного оборонительного рефлекса (fear conditioning). Для выработки классического Павловского условного оборонительного рефлекса использовали камеру Startle and Fear Combined System производства PanLab Harvard apparatus (Испания, 2000). Эксперименты начинали у крыс на 110-й ПНД. При обучении после 120-секундного периода обследования камеры

животным давали 3 сочетания звука (30 с, 80 дБ, 2000 Гц) и электрокожного болевого раздражения (2 с, 0.8 мА, задержка 28 с от начала действия звука) с 40–50-секундными межсигнальными интервалами, после чего следовал период последствия в 40 с без каких-либо стимулов. Через 24 ч после обучения проводили тестирование условно-рефлекторного страха (Тест 1). В Тесте 1 животных помещали в ту же камеру и ту же обстановку на 120 с, после чего предъявляли только звук в течение 120 с (80 дБ, 2000 Гц), далее следовал период последствия в 120 с. Далее в двух опытах с интервалом 24 ч проводили угашение условно-рефлекторного страха, при этой процедуре давали по 10 изолированных звуковых стимулов (30 с, 80 дБ, 2000 Гц) без электрокожных раздражений с 20-секундными межсигнальными интервалами. После процедуры угашения через 24 ч тестировали сохранность рефлекса (Тест 2), при этом последовательность стимулов была такой же, как в Тесте 1.

Поведение крыс анализировали в различные интервалы времени: до (реакции на контекст), во время действия звукового сигнального раздражителя, в межсигнальные интервалы (при обучении или угашении), в последствии. Условно-рефлекторный страх оценивали по времени замирания. Замирание – периоды неподвижности длительностью не менее 2 с, когда наблюдали только дыхательные движения животного. Замирание определяли по записи механограммы пола камеры с помощью амплитудного и временного порогов. Обработку проводили с помощью стандартной программы, прилагавшейся к установке фирмы Panlab. Программа позволяла детектировать эпизоды замирания, определять их длительность и рассчитывать процент времени замирания от времени каждого интервала. Кроме того, для оценки уровня эмоционального напряжения у крыс подсчитывали число дефекаций и уринаций.

5. Статистическая обработка данных. Для обработки результатов использовали стандартную программу STATISTICA 8.0. Распределение значений исследованных параметров было проверено на нормальность по критерию Колмогорова–Смирнова (Basic Statistics, раздел Descriptive Statistics). При нормальном распределении значений при сравнении групп крыс использовали дисперсионный анализ ANOVA, раздел *factorial* ANOVA. При *post-hoc*-анализе применяли критерий *Newman-Keuls test*. Анализировали влияние факторов ВЕЩЕСТВО (ЛПС или ФИЗ), ПОЛ (самцы и самки), УСЛОВИЯ

СОДЕРЖАНИЯ (СТАНД и СКУЧ), ИНТЕРВАЛ (до, звук, межсигнальный интервал, последствие). При отсутствии нормальности распределения поведенческих параметров использовали *Kruskal-Wallis test*, с последующим сравнением групп с помощью *Multiple Comparisons (Nonparametric Statistics)*. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$, отмечали наличие тенденции при $0.05 \leq p < 0.1$. Данные на рисунках представлены в виде средних значений $\pm$ ошибки средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Влияние содержания в скученных условиях на уровень тревожности крыс. Результаты анализа влияния скученности на различные показатели поведения крыс в ОП представлены на рис. 1 и в табл. 1. На поведение крыс в ОП существенное влияние оказывал фактор ПОЛ (табл. 1), самки по сравнению с самцами совершали больше выходов в центр ОП (рис. 1 (а)), меньше времени проводили на периферии, проходили большую дистанцию (рис. 1 (б)), двигались с большей скоростью (рис. 1 (в)), больше времени находились в движении, совершали меньше актов груминга (рис. 1(г)), делали меньше болюсов дефекации, но больше стоек. Эти данные свидетельствовали о меньшем уровне тревожности самок и большей двигательной и исследовательской активности, что подтверждало ранее полученные данные (Павлова с соавт., 2021 б). Фактор УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ не влиял на число выходов в центр и время нахождения на периферии, а также число стоек, уринаций и дефекаций, на среднюю длительность акта груминга, но на многие другие показатели поведения крыс в ОП оказывал влияние (табл. 1). Крысы, содержащиеся в СКУЧ-условиях, по сравнению со СТАНД-группой проходили меньшую дистанцию и с меньшей скоростью (рис. 1 (б), (в)), меньше времени находились в движении, совершали больше актов груминга (рис. 1 (г)), имели большую латентность ухода из центра поля, куда экспериментатор сажал животное в самом начале опыта (рис. 1 (д)). Взаимодействия факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ x ПОЛ обнаружено не было (табл. 1), что свидетельствовало об отсутствии половых различий во влиянии скученности на поведение крыс в ОП. Фактор ВЕЩЕСТВО не оказывал влияния на показатели тревожности/смелости, двигательной активности и исследовательского поведения в ОП. Было обнаружено только влияние этого фактора на болюсы дефекации, среднюю длительность акта груминга и латентность

Таблица 1. Значение F и p при анализе с помощью Factorial ANOVA различных показателей поведения в ОП и ПКЛ.**Table 1.** The value of F and p in the analysis using Factorial ANOVA of various indicators of behavior in open field and elevated plus maze

Тест	Показатели поведения	Факторы				
		ПОЛ	ВЕЩЕСТВО	УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ	УСЛ. СОД. × ВЕЩЕСТВО	УСЛ. СОД. × ПОЛ
ОП	Выходы в центр	$F_{1,114} = 25.37$, $p = 0.000$	—*	—	—	—
	Время на периферии	$F_{1,114} = 19.36$, $p = 0.000$	—	—	—	—
	Дистанция	$F_{1,114} = 75.79$, $p = 0.000$	—	$F_{1,114} = 60.87$, $p = 0.000$	—	—
	Скорость	$F_{1,114} = 76.01$, $p = 0.000$	—	$F_{1,114} = 60.73$, $p = 0.000$	—	—
	Время движения	$F_{1,114} = 61.11$, $p = 0.000$	—	$F_{1,114} = 15.21$, $p = 0.000$	—	$F_{1,114} = 4.91$, $p = 0.029$
	Стойки	$F_{1,114} = 11.34$, $p = 0.001$	—	—	—	—
	Груминг, число	$F_{1,114} = 10.19$, $p = 0.002$	—	$F_{1,114} = 22.36$, $p = 0.000$	—	—
	$T_{\text{ср.}}$ акта груминга	—	$F_{1,105} = 5.24$, $p = 0.024$	—	—	—
	Болюсы дефекации	$F_{1,114} = 10.77$, $p = 0.001$	$F_{1,114} = 7.54$, $p = 0.007$	—	—	—
	Уринации	—	—	—	—	—
	Латентность ухода из центра	—	$F_{1,114} = 4.78$, $p = 0.031$	$F_{1,114} = 41.56$, $p = 0.000$	$F_{1,114} = 4.70$, $p = 0.032$	—
	Вытягивания	—	—	—	—	—
ПКЛ	% выходов в ОР	$F_{1,114} = 13.39$, $p = 0.000$	—	—	—	—
	%Т выходов в ОР	$F_{1,114} = 14.94$, $p = 0.000$	—	—	—	—
	%Т в закрытых рукавах (с)	$F_{1,115} = 7.92$, $p = 0.006$	—	—	—	—
	Дистанция	$F_{1,114} = 30.66$, $p = 0.000$	—	—	—	—
	Скорость	$F_{1,114} = 36.07$, $p = 0.000$	—	—	—	—
	Время движения	$F_{1,114} = 10.82$, $p = 0.001$	—	—	—	—
	Груминг, число	$F_{1,114} = 18.54$, $p = 0.000$	—	$F_{1,114} = 20.35$, $p = 0.000$	—	$F_{1,114} = 14.88$, $p = 0.000$
	$T_{\text{ср.}}$ акта груминга	—	—	—	—	—
	Свешивания	$F_{1,114} = 21.00$, $p = 0.000$	—	—	—	—
	Стойки	$F_{1,114} = 4.30$, $p = 0.040$	—	—	—	—
	Болюсы дефекации	$F_{1,114} = 8.61$, $p = 0.004$	—	—	—	—
	Уринации	—	—	—	—	—
	Вытягивания	—	—	—	—	—

* *Примечание.* Прочерк — статистически незначимое влияние фактора. $T_{\text{ср.}}$ — среднее время, %Т — процент времени.* *Note.* Dash — statistically insignificant influence of the factor. $T_{\text{ср.}}$ — average time, %Т — percentage of time.

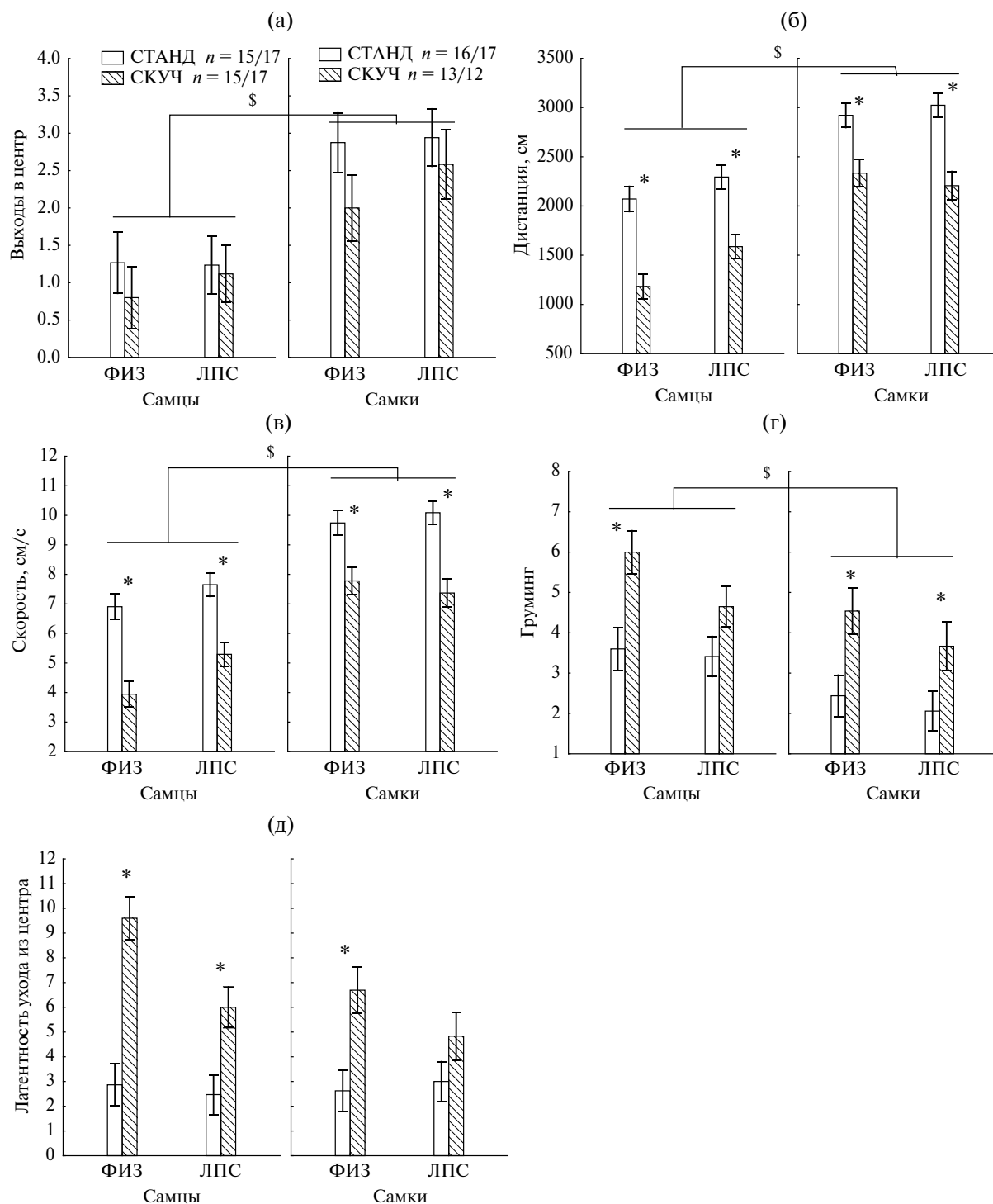


Рис. 1. Влияние содержания в скученных условиях на поведение крыс в “открытом поле”. СТАНД – группа крыс, содержащаяся в стандартных условиях, СКУЧ – крысы, проживающие в скученных условиях. ФИЗ – крысы с введением физиологического раствора в раннем онтогенезе, ЛПС – крысы с введением ЛПС. * – статистически значимые различия между группой СТАНД и СКУЧ, \$ – между самцами и самками ($p < 0.05$, Factorial ANOVA, post hoc анализ). n – число крыс в группах ФИЗ/ЛПС.

Fig. 1. The effect of housing in crowded conditions on the behavior of rats in an open field. СТАНД – a group of rats contained in standard conditions, СКУЧ – rats living in crowded conditions. ФИЗ – rats with the administration of saline solution in early ontogeny, ЛПС – rats with the injection of LPS. * – statistically significant differences between СТАНД and СКУЧ groups, \$ – between males and females ($p < 0.05$, Factorial ANOVA, post hoc analysis). n is the number of rats in the ФИЗ/ЛПС groups.

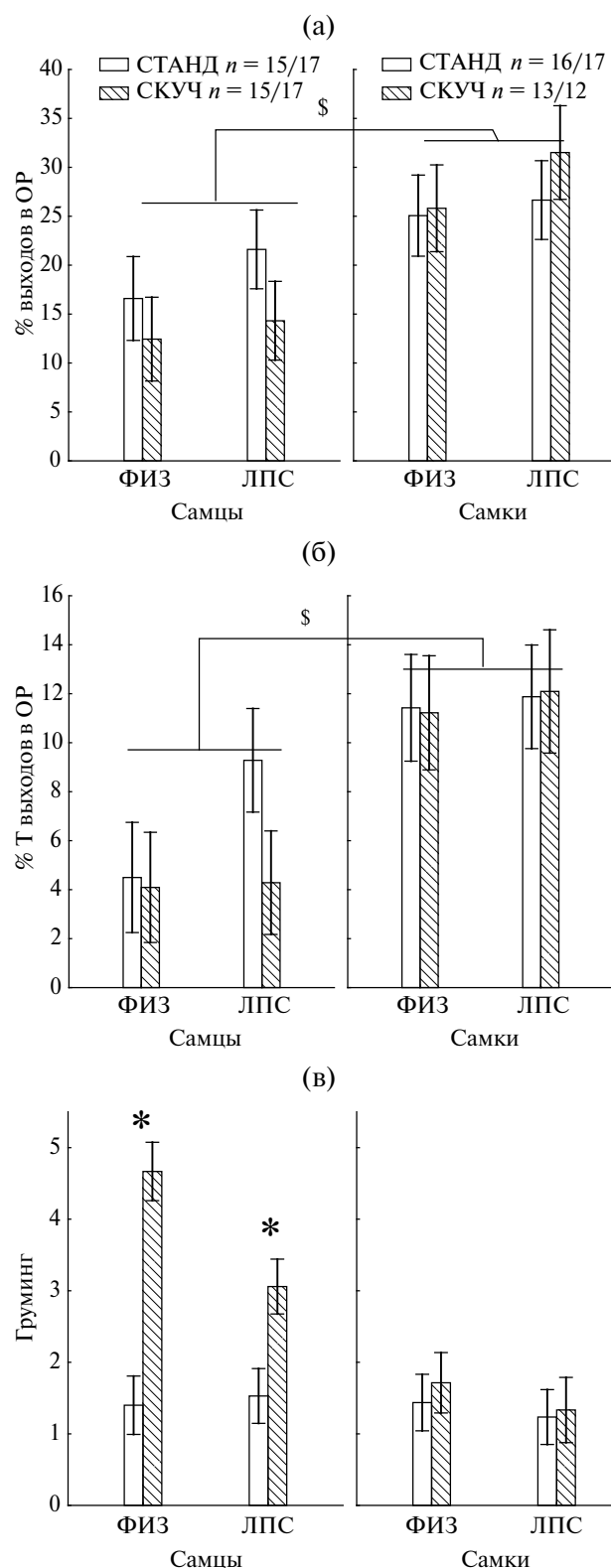


Рис. 2. Влияние содержания в скученных условиях на поведение крыс в приподнятом крестообразном лабиринте. Т – время, ОР – открытые рукава. * – статистически значимые различия между группой СТАНД и СКУЧ, \$ - между самцами и самками ($p < 0.05$, Factorial ANOVA, post hoc анализ). Остальные обозначения как на рис. 1.

Fig. 2. The effect of housing in crowded conditions on the behavior of rats in an elevated plus maze. T – time, ОР – open arms. * - statistically significant differences between СТАНД and СКУЧ groups, \$ - between males and females ($p < 0.05$, Factorial ANOVA, post hoc analysis). The remaining designations are as in Fig. 1.

ухода из центра. У крыс ЛПС-группы болюсов было больше, а длительность акта груминга и латентность ухода из центра – меньше, чем в ФИЗ-группе. Кроме того, наблюдалось взаимодействие фактора ВЕЩЕСТВО $\times$ УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ во влиянии на латентность ухода из центра, в ЛПС-группах у СКУЧ латентность была меньше, чем в ФИЗ-группах (рис. 1 (д)). Таким образом, содержание в условиях повышенной скученности не влияло на показатели уровня тревожности в ОП, но снижало двигательную активность крыс, увеличивало замещающую активность и тормозило двигательную активность в начале опыта.

Содержание в скученных условиях в меньшей степени оказало влияние на поведение крыс в ПКЛ (табл. 1, рис. 2). Фактор ПОЛ, так же как и в ОП, оказывал существенное влияние на поведение крыс в ПКЛ (табл. 1). Самки по сравнению с самцами совершали большее число выходов в открытые рукава (рис. 2 (а)), проводили больше времени в них (рис. 2 (б)), но меньше времени находились в закрытых рукавах, проходили большую дистанцию, двигаясь с большей скоростью, больше времени находились в движении, совершали больше стоек и свешиваний, но делали меньше болюсов дефекации. Эти данные свидетельствовали о меньшем уровне тревожности самок, большей их двигательной и исследовательской активности по сравнению с самцами, что соответствовало ранее полученным данным (Павлова с соавт., 2021 б). Фактор УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ не оказал влияния на показатели, отражавшие уровень тревожности/смелости и двигательную активность крыс – на процент времени нахождения в открытых и закрытых рукавах, длину пройденной дистанции, скорость и время движения (табл. 1). Не было обнаружено влияния данного фактора на число стоек, уриаций и дефекаций. Фактор УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ повлиял на число актов груминга (табл. 1), при этом наблюдалось взаимодействие фактора УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ $\times$ ПОЛ. В ПКЛ только самцы, содержащиеся в СКУЧ-условиях, совершали больше актов груминга, чем самки (рис. 2 (в)), средняя длительность акта груминга не зависела от условий содержания (табл. 1). Таким образом, содер-

жание в СКУЧ-условиях не повлияло на уровень тревожности крыс в ПКЛ, на их двигательную и исследовательскую активность, однако только у самцов привело к увеличению замещающей активности.

Итак, тестирование в ОП и ПКЛ не выявило влияния содержания в скученных условиях на показатели тревожности/смелости крыс, но обнаружило снижение двигательной активности и ее торможение в начале опыта (только в ОП) и

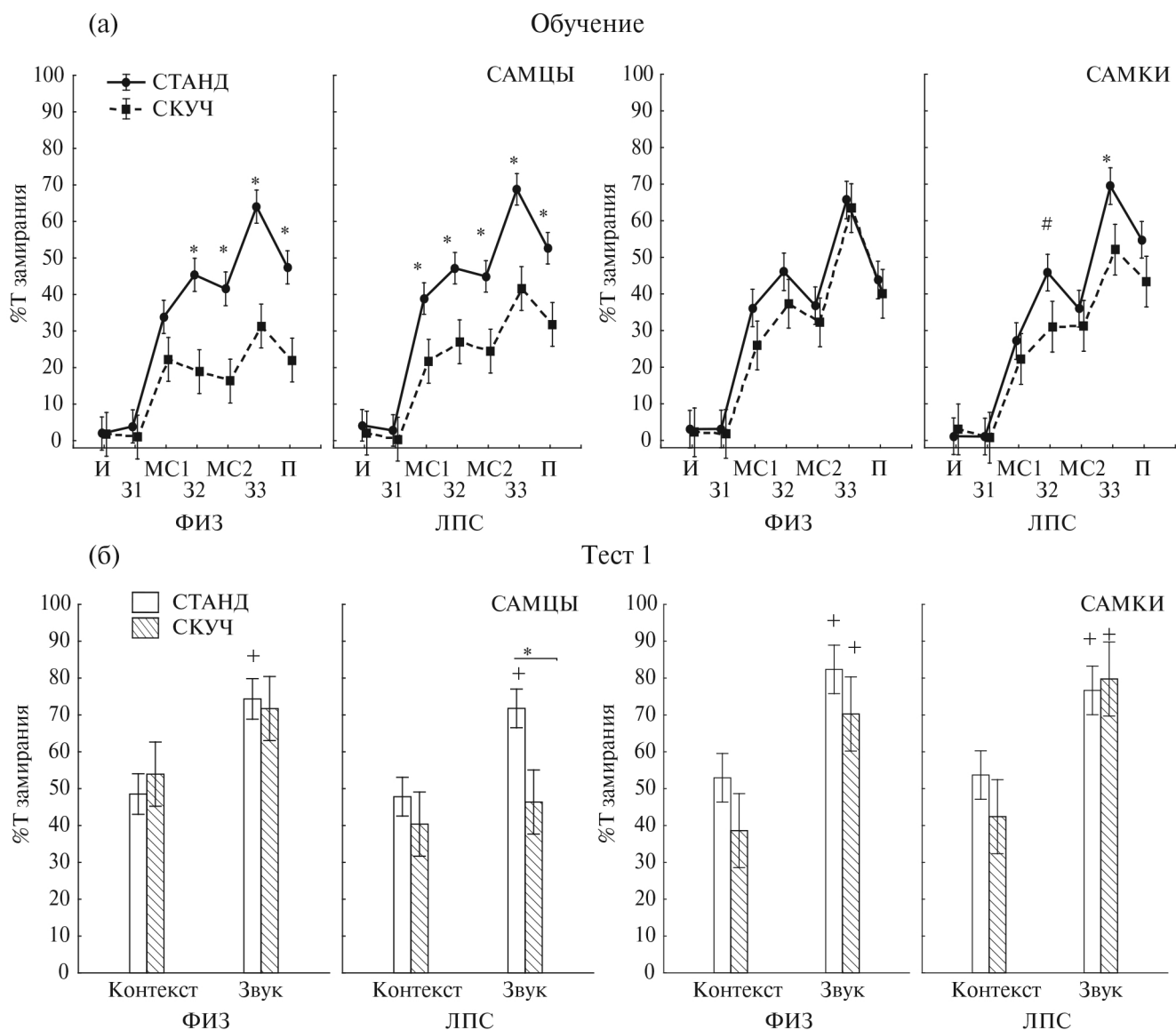


Рис. 3. Влияние содержания в скученных условиях на выработку (а) и проявление условно-рефлекторного страха в Тесте 1 (б). По оси абсцисс — интервал времени, на (а): И — исследовательский интервал до звука, 31, 2, 3 — при действии звукового стимула, МС1, 2 — межсигнальные интервалы, П — последствие; на (б): предъявление контекста или звука. По оси ординат — процент времени замирания. * — статистически значимые различия между группой СТАНД и СКУЧ ($p < 0.05$, Factorial ANOVA, post hoc анализ), # — тенденция ($0.05 \leq p < 0.1$). + — различия в уровне замирания в ответ на контекст и звук в данной группе крыс.

Fig. 3. The effect of housing in crowded conditions on the acquisition (a) and the expression of conditioned fear in Test 1 (б). On the abscissa axis is the time interval, on (a): И is the research interval, 31, 2, 3 is the number of the sound stimulus, МС1, 2 are the inter-signal intervals, П is the aftereffect; on (б): presentation of the context or sound. On the ordinate axis — the percentage of freezing time. * — statistically significant differences between the СТАНД and СКУЧ group ($p < 0.05$, Factorial ANOVA, post hoc analysis), # - trend ($0.05 \leq p < 0.1$). + — differences in the freezing time in response to context and sound in this group of rats.

увеличение замещающей активности (груминга) в обоих тестах.

2. Влияние содержания в скученных условиях на выработку, тестирование и угашение условно-рефлекторного страха у крыс. Фактор ИНТЕРВАЛ оказывал существенное влияние на замирание крыс при обучении (табл. 2), что проявлялось в последовательном увеличении времени замирания по мере предъявления сочетаний звуковых и болевых стимулов (рис. 3 (а)). Фактор УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ оказал существенное влияние на обучение крыс (табл. 2), кроме того, наблюдалось взаимодействие факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ х ИНТЕРВАЛ и УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ х ПОЛ. Начиная с первого межсигнального периода (ЛПС-группа) или со второго звука (ФИЗ-группа) и до конца опыта самцы группы СКУЧ замирали на меньшее время, чем самцы группы СТАНД (рис. 3 (а)). У самок различия во времени замирания в группах СКУЧ и СТАНД проявлялись в меньшей степени, статистически значимые различия были обнаружены только при третьем звуке в группе ЛПС (рис. 3 (а)).

Через 24 ч после обучения в Тесте 1, когда предъявляли только контекст и звук без тока, факторы УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ и ИНТЕРВАЛ также оказывали влияние на уровень замирания крыс (табл. 2). Действие фактора ИНТЕРВАЛ проявлялось в большем замирании крыс при звуке по сравнению с контекстом, а фактора УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ – в меньшем замирании у крыс группы СКУЧ, чем у группы СТАНД. Кроме того, только у самцов, но не у самок, фактор ВЕЩЕСТВО оказывал влияние на уровень замирания ($F_{1,108} = 4.29, p = 0.040$), также наблюдали тенденцию к взаимодействию факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ х ВЕЩЕСТВО ($F_{1,108} = 3.06, p = 0.083$). Post hoc анализ показал, что самцы группы СКУЧ замирали на меньшее время в группе ЛПС при действии звука, чем самцы группы СТАНД (рис. 3 (б)). У самок различий во времени замирания в группах СКУЧ и СТАНД не наблюдалось (фактор УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ $F_{1,72} = 2.05, p = 0.156$). Важно отметить, что в группах СТАНД у самцов и у всех самок время замирания при действии звука было больше, чем при предъявлении контекста, что отражало большую аверсивную значимость звука по сравнению с контекстом (рис. 3 (б)). У самцов группы СКУЧ такой разницы не наблюдали, что отражало нарушение, по-видимому, памяти о сигнале и дифференцировки контекста и сигнала.

В процессе 1-го и 2-го угашения рефлекса фактор ИНТЕРВАЛ оказывал существенное влияние на время замирания (табл. 2), что проявлялось в последовательном уменьшении времени замирания по мере предъявления десяти неподкрепляемых звуков (рис. 4 (а), (б)). Фактор УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ также оказывал влияние на время замирания крыс, кроме того, наблюдали взаимодействие факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ х ПОЛ (табл. 2). Анализ процесса угашения выявил меньшее время замирания у самцов группы СКУЧ по сравнению с группой СТАНД как в первый, так и во второй день (рис. 4 (а), (б)), у самок указанное различие практически не проявлялось. При 2-м угашении проявилось влияние фактора ВЕЩЕСТВО, у самцов, проживавших в СКУЧ-условиях, в группе ЛПС угашение проходило быстрее, чем в группе ФИЗ (рис. 4 (б)).

В Тесте 2 после угашения на время замирания также оказывал влияние фактор УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ, наблюдали взаимодействие факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ х ИНТЕРВАЛ (табл. 2). У самцов группы ЛПС, содержащихся в СКУЧ-условиях, время замирания в ответ на звук в Тесте 2 было меньше, чем у самцов в СТАНД-условиях, время замирания в ответ на контекст не различалось при разных условиях содержания (рис. 4 (в)). У самок различий между группами СКУЧ и СТАНД не было обнаружено.

Таким образом, при выработке условно-рефлекторного страха были выявлены половые особенности во влиянии повышенной скученности, самцы в отличие от самок были более подвержены негативному влиянию скученности. Самцы группы СКУЧ меньше времени замирали в процессе выработки и угашения условно-рефлекторного страха, чем самцы группы СТАНД. У самцов группы ЛПС происходили наиболее выраженные изменения в поведении по сравнению с группой ФИЗ. У самцов ЛПС-группы, содержащихся в СКУЧ-условиях, по сравнению с группой ФИЗ, нарушалась память о звуковом сигнале, а также дифференцировка контекста и сигнала, быстрее проходило угашение рефлекса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе не было выявлено убедительных доказательств изменения уровня тревожности крыс при скученности в двух тестах: в “открытом поле” и приподнятом крестообразном лабиринте (табл. 3). Число выходов в центр, время на периферии в ОП, число выходов и дли-

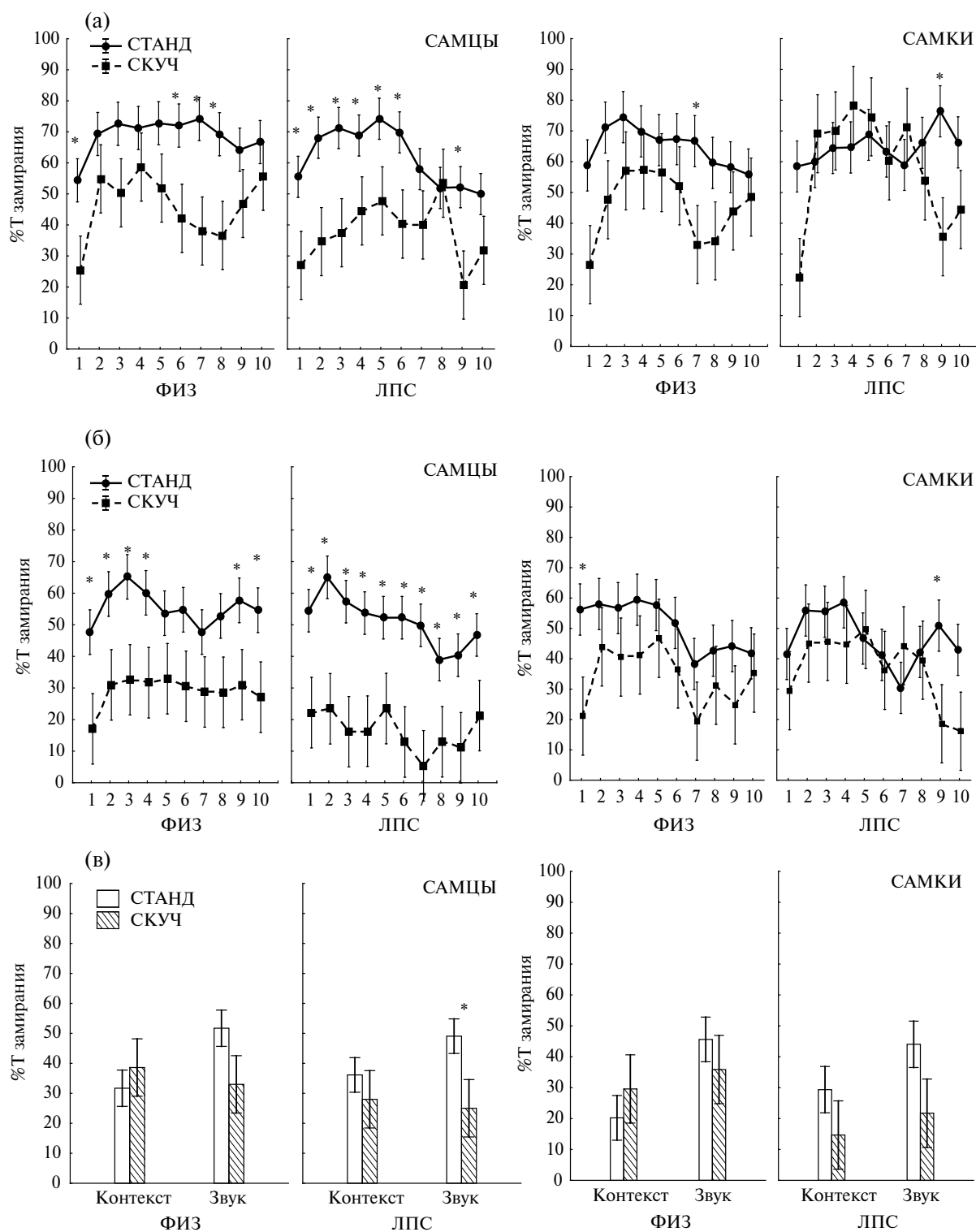


Рис. 4. Влияние содержания в скученных условиях на угашение 1 (а), угашение 2 (б) и проявление условно-рефлекторного страха в Тесте 2 (в). По оси абсцисс на (а) и (б) — номер звукового стимула, на (в) — предъявление контекста или звука. По оси ординат — процент времени замирания. * — статистически значимые различия между группой СТАНД и СКУЧ ($p < 0.05$, Factorial ANOVA, post hoc анализ). Остальные обозначения как на рис. 1.

Fig. 4. The effect of housing in crowded conditions on extinction 1 (a), extinction 2 (б) and the expression of conditioned fear in Test 2 (в). On the axis of the abscissa on (a) and (б) is the number of the sound stimulus, on (в) is the presentation of the context or sound. On the ordinate axis — the percentage of freezing time. * — statistically significant differences between the СТАНД and СКУЧ group ($p < 0.05$, Factorial ANOVA, post hoc analysis). The remaining designations are as in Fig. 1.

Таблица 2. Значение F и p при анализе с помощью Factorial ANOVA выработки, тестирования и угашения условно-рефлекторного страха**Table 2.** The value of F and p in the analysis using Factorial ANOVA of the development, testing and extinction of conditioned fear

Этап	Факторы					
	ПОЛ	ВЕЩЕ- СТВО	УСЛОВИЯ СОДЕРЖА- НИЯ	ИНТЕРВАЛ	ИНТЕРВАЛ × УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ	УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ × ПОЛ
Обучение	$F_{1,1070} = 5.22$, $p = 0.023$	-	$F_{1,1070} = 56.81$, $p = 0.000$	$F_{6,1070} = 104.19$, $p = 0.000$	$F_{6,1070} = 3.62$, $p = 0.001$	$F_{1,1070} = 12.89$, $p = 0.000$
Тест 1	-	-	$F_{1,180} = 4.20$, $p = 0.042$	$F_{1,180} = 38.16$, $p = 0.000$	-	-
Угашение 1	$F_{1,900} = 4.50$, $p = 0.034$	-	$F_{1,900} = 66.90$, $p = 0.000$	$F_{9,900} = 4.25$, $p = 0.000$	-	$F_{1,900} = 5.50$, $p = 0.019$
Угашение 2	-	$F_{1,900} = 4.03$, $p = 0.045$	$F_{1,900} = 92.96$, $p = 0.000$	$F_{9,900} = 2.47$, $p = 0.009$	-	$F_{1,900} = 14.69$, $p = 0.000$
Тест 2	-	-	$F_{1,178} = 5.47$, $p = 0.020$	$F_{1,178} = 4.99$, $p = 0.027$	$F_{1,178} = 3.85$, $p = 0.049$	-

* *Примечание.* Прочерк — статистически незначимое влияние фактора.* *Note.* Dash — statistically insignificant influence of the factor.

тельность пребывания в открытых рукавах ПКЛ не различались в группах СКУЧ и СТАНД. Однако при другом протоколе скученности, при менее длительном 14-дневном проживании в скученных условиях после месяца пребывания в комфортных условиях, в ряде работ (Botelho et al., 2007; Князева с соавт., 2012) у крыс происходило увеличение уровня тревожности. Это проявлялось в уменьшении латентного периода захода в темный отсек в темно-светлой камере, увеличении времени пребывания в закрытых рукавах и уменьшении времени в центре ПКЛ, время в открытых рукавах при этом не изменялось. Можно предположить, что более длительное содержание в скученных условиях в наших опытах и ранний возраст начала воздействия привели к привыканию и адаптации крыс к негативным условиям содержания. При раннем помещении крыс (в 30 дней) в скученные условия небольшие еще по массе крысы не испытывали стресса, а, возможно, воспринимали такие условия как социальное обогащение. Предположение об адаптации крыс к скученным условиям подтверждают результаты анализа некоторых показателей сердечно-сосудистой системы при длительном воздействии различных видов стрессов — изоляции, скученности, иммобилизации, принудительного плавания (Nagaraja, Jeganathan, 1999). Увеличение частоты сердечных сокращений и массы сердца наблюдали только в начальный период воздействия стрессора, при длительном воздействии (15 и 30 дней) дальнейшего увеличе-

ния не происходило. Аналогично, длительная социальная изоляция в течение 8.5 мес. вызывала меньшие изменения в уровне тревожности и социальном поведении, чем 2-месячная (Ширенова с соавт., 2022). После 2-месячной социальной изоляции у крыс наблюдали повышение тревожности, снижение исследовательской активности, увеличение агрессивности, повышение предпочтения социального объекта несоциальному. После 8.5 мес. социальной изоляции признаки повышения тревожности и агрессивности исчезали, появлялись признаки дефицита социальности, которые выражались в уменьшении предпочтения социального объекта. Авторы считают, что с увеличением длительности стресса происходит изменение стратегии преодоления, активные стратегии заменяются на пассивные.

В наших опытах двигательная активность в ОП у группы СКУЧ была понижена, о чем свидетельствовало уменьшение пройденной дистанции, снижение скорости, уменьшение времени движения (табл. 3). Увеличение латентности ухода из центра ОП, куда экспериментатор сажал крысу в начале опыта, также, по-видимому, говорило о торможении двигательной активности при попадании в авersiveную обстановку. Ранее сходное увеличение латентности наблюдалось у крыс после социальной изоляции (Павлова с соавт., 2021б). Как в ОП, так и в ПКЛ у группы СКУЧ происходило увеличение числа эпизодов грумин-

га (табл. 3). Согласно литературе, груминг служит не только для поддержания чистоты поверхности тела, но и играет роль замещающей или смещенной (displacement) активности (Spruijt et al., 1992), т.е. облегчает напряжение и является “выходом мотивационной энергии” при конфликте мотиваций. Согласно этой точке зрения, груминг возникает после стресса и отражает его окончание или привыкание к стрессирующим воздействиям, корреляционных связей между грумингом и уровнем тревожности не было обнаружено. При анализе структуры груминга различают “стрессорный” и “комфортный” груминг (Калуев, 1998). Для стрессорного груминга характерно преобладание стереотипии и повторяющихся движений,

“заикливание” на одной стадии и большая длительность, а для комфортного груминга – последовательная смена стадий от умывания мордочки до хвоста. В нашей работе содержание в СКУЧ-условиях не вызывало изменений средней длительности эпизода груминга, что свидетельствует против “стрессорной” природы груминга. Можно предположить, что снижение горизонтальной двигательной активности возникает у крыс при длительном содержании в скученных условиях, когда пробежкам препятствуют многочисленные соседи по клетке. Горизонтальная активность замещается, по всей видимости, в этих условиях грумингом. Увеличение числа актов груминга у крыс группы СКУЧ также могло быть вызвано и

Таблица 3. Схематическое изображение влияния скученных условий на поведение крыс в различных поведенческих парадигмах. - – отсутствие изменений у группы СКУЧ по сравнению с группой СТАНД, ↓ – уменьшение одного показателя, ↑ – увеличение одного показателя. Т – время, ОР – открытые рукава лабиринта
Table 3. A schematic representation of the influence of crowded conditions on rat behavior in various behavioral paradigms. - – no changes in the СКУЧ group of indicators compared to the СТАНД, ↓ – a decrease in one indicator, ↑ – an increase in one indicator. T is time, ОР is the open arms of the maze

Парадигма	Поведенческие показатели	Самцы		Самки	
		ФИЗ-группа	ЛПС-группа	ФИЗ-группа	ЛПС-группа
ОП	Показатели тревожности (выходы в центр, время на периферии)	--	--	--	--
	Двигательная активность (дистанция, скорость, время движения)	↓↓↓	↓↓↓	↓↓-	↓↓-
	Исследовательская активность (стойки)	-	-	-	-
	Замещающая активность (число актов груминга)	↑	-	↑	↑
	Оценка риска (вытягивания)	-	-	-	-
	Вегетативная активность (болюсы дефекации, уринации)	--	--	--	--
ПКЛ	Показатели тревожности (% выходов в ОР, % Т выходов в ОР)	--	--	--	--
	Двигательная активность (дистанция, скорость, время движения)	---	---	---	---
	Исследовательская активность (стойки, свешивания, Т выглядывания)	---	---	---	---
	Замещающая активность (число актов груминга)	↑	↑	-	-
	Вегетативная активность (болюсы дефекации, уринации)	--	--	--	--
УР, обучение	% Т замирания	↓	↓	-	↓
Тест 1, контекст	% Т замирания	-	-	-	-
Тест 1, звук	% Т замирания	-	↓	-	-
Угашение 1, звук	% Т замирания	↓	↓	-	-
Угашение 2, звук	% Т замирания	↓	↓	-	-
Тест 2, контекст	% Т замирания	-	-	-	-
Тест 2, звук	% Т замирания	-	↓	-	-

загрязнением поверхности тела и шерсти экскрементами соседей по клетке, т.е. выполняло гигиеническую роль. Увеличение числа актов груминга и уменьшение пройденной дистанции у животных, проживающих в скученных условиях, наблюдали и ранее (Князева с соавт., 2012).

Наиболее значительные изменения в поведении крыс после скученности мы наблюдали при выработке условно-рефлекторного страха (табл. 3). Уже на этапе обучения крысы-самцы группы СКУЧ как ФИЗ-, так и ЛПС-группы замирали на меньшее время после получения ударов током, чем крысы группы СТАНД, на самок содержание в скученных условиях повлияло в значительно меньшей степени. Уменьшение времени замирания при обучении не могло быть связано с увеличением двигательной активности крыс, поскольку в тесте ОП у “скученных” крыс наблюдали, наоборот, снижение двигательной активности. Согласно данным литературы (Goekner et al., 1973), у “скученных” крыс не нарушалась выработка пассивного избегания, что свидетельствовало об отсутствии нарушений в проявлении пассивно-оборонительных реакций. Одной из возможных причин уменьшения времени замирания после ударов тока является уменьшение болевой чувствительности у “скученных” крыс. Данное предположение подтверждается данными о снижении болевой чувствительности (гипоальгезии) к соматическим стимулам в тесте “горячая пластинка” у мышей, подвергнутых комбинированному психосоциальному стрессу (социальному поражению и повышенной скученности) (Tramullas et al., 2012), у крыс при социальной изоляции (Ширенова с соавт., 2019), а также при других видах стрессов (Butler, Finn, 2009). Анальгезия, вызванная стрессом плавания в холодной воде, выявлялась в тесте “вздрагивание/прыжки” (flinch-jump) при стимуляции лап электрическим током (Bodnar et al., 1978). Показано, что при анальгезии во время стресса включаются эндогенные механизмы, опосредованные опиоидами (Miczek et al., 1982). Показано, что анальгезия, индуцированная стрессом, зависит от пола животного, у самок анальгезия была выражена в меньшей степени, чем у самцов (Butler, Finn, 2009), при этом половые гормоны самцов и самок крыс оказывают существенное влияние на анальгезию. В наших опытах уменьшение времени замирания после действия тока мы наблюдали преимущественно у самцов, что соответствовало данным литературы о половых различиях в анальгезии при стрессе.

В Тесте 1 через 24 ч после обучения у самцов с комбинированным стрессом ЛПС+СКУЧ время замирания на звуковой сигнал было меньше, чем у группы ЛПС+СТАНД, что, вероятно, связано с нарушением сигнальной памяти (табл. 3). У самцов в группе ЛПС+СКУЧ нарушалось дифференцирование контекста и сигнала, проявлявшееся в том, что увеличения времени замирания на сигнал по сравнению с контекстом не происходило. При этом время замирания при предъявлении только контекста в группах ФИЗ и ЛПС не отличалось у крыс в стандартных и скученных условиях. Важно отметить, что в контрольной группе ФИЗ+СКУЧ в тесте время замирания не отличалось от группы ФИЗ+СТАНД, т.е. отдельно скученность не влияла на память, важно было совместное действие скученности и раннего провоспалительного стресса. Ранее мы показали, что крысы, пережившие ранний провоспалительный стресс, оказались наиболее чувствительными к другому виду социального стресса (социальной изоляции), судя по изменениям в тревожном поведении, условно-рефлекторном страхе и в уровне кортикостерона в крови (Павлова с соавт., 2021 а, б). Сходные результаты были получены в работе (Walker et al., 2009). Крысы после раннего провоспалительного стресса, подвергавшиеся комбинированному стрессу (обездвижение и социальная изоляция) во взрослом возрасте, проявляли тревожное поведение в большей степени, чем контрольные животные, что авторы рассматривали как подтверждение гипотезы “двойного удара” (Walker et al., 2009). Ранее мы высказали предположение, что провоспалительный ЛПС-стресс в раннем возрасте вызывает сенситизацию иммунной и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, из-за чего реакция на второй стресс оказывается более сильной, чем в случае одиночного стресса (Брошевицкая и др., 2020). Известно, что длительное проживание в скученных условиях вызывает увеличение провоспалительных цитокинов в крови. В одних работах наблюдали увеличение только уровня ИЛ-1бета (Гаврилов с соавт., 2021), в других обнаружили активацию транскрипции ИЛ-17 и угнетение экспрессии гена противовоспалительного цитокина ИЛ-4 (Лосева с соавт., 2013). При скученности наблюдали увеличение провоспалительных цитокинов не только в крови, но и в толстой кишке, что сопровождалось изменениями микробиоты кишечника (Delaroque et al., 2021). Введение ЛПС в раннем онтогенезе вызывало болезненное состояние у крысят и увеличение продукции провоспалительных цитокинов (Alexander, Rietschel, 2001). Как введение ЛПС в

раннем онтогенезе, так и скученность оказывают однонаправленное действие на иммунную систему крыс. Исходя из этих данных, мы полагаем, что происходила суммация эффектов от ЛПС и скученности, что приводило к нарушениям памяти у крыс самцов группы ЛПС+СКУЧ при условно-рефлекторном страхе.

В качестве возможного механизма уменьшения времени замирания в ответ на сигнал у самцов в группе ЛПС+СКУЧ можно предположить нарушение долговременной памяти. Ранее уменьшение времени замирания на сигнал в Тесте 1 наблюдали при другом виде социального стресса — при социальной изоляции (Павлова с соавт., 2021а). Согласно данным литературы, после изоляции в модели выработки условно-рефлекторного страха возникает нарушение долговременной памяти, но не кратковременной, о чем свидетельствовало нарушение памяти через 24 ч или 4 дня после обучения, но не через 90 мин и 4 ч (Okada et al., 2014; Matsumoto et al., 2019). Нарушение долговременной памяти происходило и при другом виде социального стресса — стрессе социальной нестабильности, когда каждый день меняли партнеров по клетке (Green, McCotmick, 2013).

У самцов в группе ЛПС+СКУЧ после угашения в Тесте 2 время замирания также было меньше, чем в группе ЛПС+СТАНД, что, по-видимому, было связано с более слабым проявлением рефлекса в Тесте 1 сразу после обучения (табл. 3). То есть более быстрое угашение рефлекса в группе ЛПС+СКУЧ можно объяснить меньшим проявлением рефлекса после выработки, а не влиянием скученности на сам процесс угашения.

В нашей работе длительное проживание в скученных условиях оказало наибольшее воздействие на самцов как при тестировании в ПКЛ, так и при выработке условно-рефлекторного страха. При анализе уровня кортикостерона в крови крыс также была показана большая чувствительность самцов к скученным условиям (Brown, Gruberg, 1995). У самцов проживание в скученных условиях приводило к увеличению концентрации кортикостерона в крови, у самок уровень кортикостерона не менялся по сравнению со стандартными условиями, т.е. скученность являлась стрессом только для самцов. Увеличение уровня кортикостерона в крови или в волосах самцов крыс и мышей после скученности было обнаружено и в других работах (Uarquin et al., 2016; Delaroque et al., 2021; Smitha, Mukkadan, 2014). Необходимо отметить, что ран-

ний провоспалительный стресс также оказывал большее влияние на тревожно-депрессивное и социальное поведение самцов (Брошевицкая с соавт., 2020; 2021). Это, по-видимому, связано с тем, что существуют половые различия в ответе иммунной системы на стрессирующие воздействия. Так, например, у самцов по сравнению с самками происходит более высокая экспрессия генов провоспалительных цитокинов при ишемическом инсульте (Villapol et al., 2019) или травме (Doran et al., 2019). Большая уязвимость самцов к влиянию ЛПС объясняется тем, что нейровоспалительный процесс протекает по-разному у самцов и самок (Григорьян, 2020). Кроме того, эстрогены самок способны оказывать противовоспалительное влияние. Известно, что эстрогены ускоряют протекание воспалительного процесса в сторону его деактивации, большая роль при этом отводится противовоспалительному IL-4 (Villa et al., 2016), и эстрогены способны затормозить выработку провоспалительных цитокинов (Najjar et al., 2018).

ВЫВОДЫ

1. Тестирование в “открытом поле” и приподнятом крестообразном лабиринте не выявило признаков увеличения уровня тревожности под влиянием скученности. Число выходов в центр, время на периферии в ОП, число выходов и длительность пребывания в открытых рукавах ПКЛ не различались в группах СКУЧ и СТАНД. Тестирование обнаружило снижение двигательной активности и увеличение замещающей активности (груминга) как у самцов, так и самок.

2. У всех самцов, содержащихся в скученных условиях, менее успешно вырабатывалась реакция условно-рефлекторного замирания в ответ на звук как условный сигнал. Однако только у самцов группы ЛПС нарушалась память о сигнале под влиянием скученности, страдала дифференцировка контекста и сигнала, быстрее происходило угашение рефлекса.

3. При выработке условно-рефлекторного страха самцы по сравнению с самками были более подвержены негативному влиянию скученности.

4. Пережитый ранний провоспалительный стресс у самцов усугублял влияние скученности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В., Зайченко М.И., Груздева В.А., Григорьян Г.А. Влияние раннего провос-

- палительного стресса на тревожное и депрессивно-подобное поведение крыс разного возраста. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2020. 106 (6): 823–842.
- Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В., Зайченко М.И. Ранний провоспалительный стресс влияет на социальное поведение взрослых крыс: эффекты пола и базового уровня интерлейкина 1–бета в крови. Нейрохимия. 2022. 39 (3): 279–287.
- Гаврилов В.В., Онуфриев М.В., Моисеева Ю.В., Александров Ю.И., Гуляева Н.В. Хронические социальные стрессы изоляции и скученности у крыс по-разному влияют на научение инструментальному поведению и состояние гипоталамо-гипофизарно-адреноренальной системы. Журн.высш.нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2021. 71 (5): 710–719.
- Григорьян Г.А. Половые различия в поведении и биохимических маркерах у животных в ответ на нейровоспалительный стресс. Успехи физиол. наук. 2020. 51 (1): 18–32.
- Калуев А.В. Стресс, тревожность и поведение (актуальные проблемы моделирования тревожного поведения у животных). 1998. Киев: Энигма, 96 с.
- Князева С.И., Логинова Н.А., Лосева Е.В. Уровень тревожности и изменение массы тела при скученности у крыс. Бюлл. экспер. Биол и мед. 2012. 154 (7): 7–10.
- Лосева Е.В., Логинова Н.А., Мезенцева М.В., Клодт П.М., Кудрин В.С. Иммунологические показатели крови и уровни моноаминов в мозге крыс, содержащихся в условиях хронической скученности. Бюлл. экспер. биол. и мед. 2013. 155 (4): 464–467.
- Лосева Е.В., Саркисова К.Ю., Логинова Н.А., Кудрин В.С. Депрессивное поведение и содержание моноаминов в структурах мозга у крыс при хронической скученности. Бюл.эксперим. биологии и медицины. 2015. 159 (3): 304–307.
- Лосева Е.В. Психосоциальный стресс перенаселенности (скученности): негативные последствия для организма человека и грызунов. Интегративная физиология. 2021. 2 (1): 33–40.
- Павлова И.В., Брошевицкая Н.Д. Влияние обогащенной среды и социальной изоляции на условно-рефлекторный страх у крыс, перенесших ранний провоспалительный стресс. Журн. эвол. биохимии и физиологии. 2021a. 57 (4): 329–341.
- Павлова И.В., Брошевицкая Н.Д., Зайченко М.И., Григорьян Г.А. Влияние социальной изоляции и обогащенной среды на тревожно-депрессивное поведение крыс в норме и после раннего провоспалительного стресса. Журнал высш. нервн. деят. им. И.П.Павлова. 2021b. 71 (5): 690–709.
- Ширенова С.Д., Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н. Динамика болевой чувствительности у самцов и самок крыс в условиях длительной социальной изоляции. Росс. журн. боли. 2019. 17 (4): 27–34.
- Ширенова С.Д., Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А. Изменения социальности и предпочтения социальной новизны у самок крыс в условиях пролонгированной социальной изоляции. Журн. высш. нервн. деят. им. И. П.Павлова. 2022. 72 (4): 520–542.
- Alexander C., Rietschel E.T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. J. Endotoxin. Res. 2001. 7 (3): 167–202.
- Bodnar R.J., Kelly D.D., Steiner S.S., Glusman M. Stress-produced analgesia and morphine-produced analgesia: lack of cross-tolerance. Pharmacol Biochem Behav. 1978. 8 (6): 661–666.
- Botelho S., Estanislau C., Morato S. Effects of under and overcrowding on exploratory behavior in the elevated plus-maze. Behavioural Processes. 2007. 74: 357–362.
- Brown K. J., Grunberg N.E. Effects of housing on male and female rats: Crowding stresses male but calm females. Physiology and Behavior. 1995. 58 (6): 1085–1089.
- Bubna-Littitz H., Hofecker G., Kment A, Niedermüller H. Gerontological pilot study on learning ability and memory in the stressed rat. Aktuelle Gerontol. 1981. 11 (1): 28–31.
- Butler R.K., Finn D.P. Stress-induced analgesia. Prog. Neurobiol. 2009. 88: 184–202.
- Daniels W. M. U., Pietersen C.Y., Carstens M.E., Daya S., Stein D. Overcrowding induces anxiety and causes loss of serotonin 5HT-1a receptors in rats. Metabolic Brain Disease. 2000. 15 (4): 287–295.
- Delaroque C., Chervy M., Gewirtz A.T., Chassaing B. Social overcrowding impacts gut microbiota, promoting stress, inflammation, and dysglycemia. Gut Microbes. 2021. 13 (1):2000275.
- Diaz-Burke Y., Gonzalez-Sandoval C.E., Valencia-Alfonso C.E., Huerta M., Trujillo X., Diaz L. et al. Progesterone regulates corticosterone elevation and alterations in spatial memory and exploratory behavior induced by stress in Wistar rats. Univ. Psychol. 2010. 9: 627–640.
- Doran S.J., Ritzel R.M., Glaser E.P., Henry R.J., Faden A.I., Loane D.J. Sex differences in acute neuroinflammation after experimental traumatic brain injury are mediated by infiltrating myeloid cells. J. Neurotrauma. 2019. 36 (7): 1040–1053.
- Goeckner D.J., Greenough W.T., Mead W.R. Deficits in learning tasks following chronic overcrowding in rats. J. Personality and Social Psychol., 1973. 28 (2): 256–261.
- Goeckner D.J., Greenough W.T., Maier S.F. Escape learning deficit after overcrowded rearing in rats: Test of helplessness hypothesis. Bulletin of the Psychonomic Society. 1974. 3: 54–56.
- Green M.R., McCotmick C.M. Effects of social instability stress in adolescence on long-term, not short-term, spatial memory performance. Behav. Brain Res. 2013. 256: 165–171.
- Krupina N.A., Shirenova S.D., Khlebnikova N.N. Prolonged social isolation, started early in life, impairs cognitive abilities in rats depending on sex. Brain sciences. 2020. 10: 799.

- Lin E.J., Sun M., Choi E.Y., Magee D., Stets C.W., During M.J. Social overcrowding as a chronic stress model that increases adiposity in mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2015. 51: 318–330.
- Matsumoto K., Fujiwara H., Araki R., Yabe T. Postweaning social isolation of mice: a putative animal model of developmental disorders. *J. Pharmacol. Sci.* 2019. 141: 111–118.
- Miczek K.A., Thompson M.L., Shuster L. Opioid-like analgesia in defeated mice. *Science*. 1982. 215: 1520–1522.
- Moiseeva Yu.V., Khonicheva N.M., Ajrapetyanz M.G., Onufriev M.V., Lazareva N.A., Stepanichev M.Yu., Gulyaeva N.V. Increased anxiety level induced by social crowding stress in rats is not related to changes in the nitrenergic system of the brain. *Neurochemical Journal*. 2009. 3 (1): 57–63.
- Najjar F., Ahmad M., Lagace D., Leenen F.H.H. Sex differences in depression-like behavior and neuroinflammation in rats post-MI: role of estrogens. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2018. 315 (5): H1159–H1173.
- do Nascimento E.B., Dierschnabel A.L., de Macêdo Medeiros A.M., Suchecki D., Silva R.H., Ribeiro A.M. Memory impairment induced by different types of prolonged stress is dependent on the phase of the estrous cycle in female rats. *Horm. Behav.* 2019. 115: 104563.
- Nagaraja H.S., Jeganathan P.S. Influence of different types of stress on selected cardiovascular parameters in rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 1999. 43 (3): 296–304.
- Okada R., Marumoto K., Tsushima R., Fujiwara H., Tsuneyama K. Social isolation stress-induced fear memory deficit is mediated by down-regulated neurosignaling system and Egr-1 expression in the brain. *Neurochem. Res.* 2014. 39: 875–882.
- Smitha K.K., Mukkadan J.K. Effect of different forms of acute stress in the generation of reactive oxygen species in albino Wistar rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 2014. 58 (3): 229–232.
- Spruijt B.M., van Hooff J.A., Gispen W.H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol. Rev.* 1992. 72 (3): 825–852.
- Tramullas M., Tramullas M., Dinan T.G., Cryan J.F. Chronic psychosocial stress induces visceral hyperalgesia in mice. *Stress*. 2012. 15 (3): 281–292.
- Uarquin D.G., Meyer J.S., Cardenas F.P., Rojas M.J. Effect of overcrowding on hair corticosterone concentrations in juvenile male Wistar rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2016. 55 (6): 749–755.
- Villa A., Vegeto E., Poletti A., Maggi A. Estrogens, neuroinflammation, and neurodegeneration. *Endocr. Rev.* 2016. 37 (4): 372–402.
- Villapol S., Faivre V., Joshi P., Moretti R., Besson V.C., Charriaut-Marlangue C. Early Sex Differences in the Immune-Inflammatory Responses to Neonatal Ischemic Stroke. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. 20 (15). pii: E3809.
- Walker A.K., Nakamura T., Byrne R.J., Sundresan Naicker, Tynan R.J., Hunter M., Hodgson D.M. Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology*. 2009. 34: 1515–1525.

THE EFFECT OF OVERCROWDING ON ANXIETY AND CONDITIONED FEAR IN RATS

I. V. Pavlova*, N. D. Broshevitskaya

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, RAS, Moscow, Russia

*e-mail: pavlovfml@mail.ru

The effect of prolonged housing (from the 30th to the 150th postnatal day) in increased crowding (15–17 rats in a standard cage measuring 31 × 52 × 20 cm, 106–120 cm² per rat) on anxiety behavior, as well as the acquisition and extinction of the conditioned fear in adult animals was studied. In half of the rats in early ontogenesis, activation of the immune system was induced by the administration of bacterial lipopolysaccharide on the 3rd and 5th postnatal days at a dose of 50 mcg/kg (LPS group). The other half of the rats were injected with saline solution (SAL group). Starting from the 90th day, the rats were tested in an open field, an elevated plus maze, and conditioned fear to sound was developed. Both males and females participated in the experiments. Testing revealed that the level of anxiety didn't increase, but the locomotor activity decreased and displacement activity (grooming) increased in both males and females under the influence of crowding. During fear conditioning, all males kept in crowded conditions had a shorter freezing time compared to the control. However, only in males of the LPS group, the memory of the signal was disturbed under the influence of crowding, the differentiation of the context and the signal suffered, the extinction of the freezing reaction passed faster. Thus, males compared to females were more susceptible to the negative impact of crowding. Experienced early proinflammatory stress in the LPS group aggravated the effect of crowding.

Keywords: overcrowding, anxiety, conditioned fear, freezing, lipopolysaccharide

УДК 57.081.23

AVRAWRA – APPLICATION FOR VIDEO RAW RECORD ACQUISITION FOR NEUROIMAGING AND VIDEOREGISTRATION RESEARCH

© 2024 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, Y. V. Popova^b, L. S. Sharipzyanova^b, M. G. Minlebaev^{a, b}

^a INSERM UMR1249, INMED, Aix-Marseille University, Marseille, France

^b Kazan Federal University, Kazan, Russia

[#] e-mail: suchkov.dmitriy.ksu@gmail.com

Received December 01, 2023; Revised February 20, 2024; Accepted March 11, 2024

Abstract. Application for Video Raw Record Acquisition – AVRawRA [ɔ:v'ɾɔ:rə], is a software designed for acquisition and recording video from the cameras into raw binary and compressed video formats. AVRawRA allows using a wide range of camera devices in various neuroimaging applications. That provides the benefit of usage of expensive video registration equipment for several tasks with single software. The concept of presented software allows adding any camera device without rebuilding of the main code pipeline. Presented software has a user-friendly interface with interactive elements for regulating parameters of acquisition and recording in real time, without stopping video stream. Simultaneous real-time visualization, analysis and recording can be performed without loss of the efficiency and missed frames. AVRawRA supports recordings from camera devices with both external and internal triggers. The size of the saved video file is not restricted by the recording time and is limited only by the space on the storage. Our software is perfectly suited both for the neuroimaging applications and experiments with supplementary videoregistration. To summarize, AVRawRA represents a universal platform for usage of various videoregistration devices, performing real-time analysis and high-speed recordings in raw and compressed video formats.

Keywords: video acquisition software, optical recording, neuroimaging

DOI: 10.31857/S0044467724030094

1. INTRODUCTION

Nowadays, the vast majority of videoregistration equipment (cameras) is provided by manufacturers with their own software. This software allows the user to acquire and store the data in commonly used video formats like *.mp4, *.avi etc. Usage of multimedia compression based also on the suggestion that a human being's eye's limitation, that an eye cannot recognize high frequency intensity changes (Venkatesh, 2018; Hubel, 1962). Therefore, reasonable loss of information from the raw image data won't be detected by our brain. However, changes in the recorded visual image below the eye sensitivity level can contain important and crucial information in scientific applications. In a large amount of neuroimaging research, qualitative description of the neuronal activity critically depends on the spatial resolution, noise/signal ratio and acquisition rate. In calcium imaging, loss of the spatial resolution can affect the following separation of active neurons (Hendel, 2020; de Melo Reis, 2022; Dard, 2022; Oh, 2019; Mues, 2013). Voltage sensitive dyeing can provide a good time resolution of the optical signal from the neuron, while modifying each frame can lead to loss of this advantage (Petersen, 2001; Grinvald, 2004; Baker, 2005; Popovic,

2015). In optical intrinsic signal (OIS) imaging the level of beneficial signal reaches only fractions of percents from background intensity and loss of information via compression can lead to absence of results (Aitken, 1999; Vincis, 2015; Suchkov, 2022; Sintsov, 2017). In behavioral studies, videoregistration of animal movements can require high time and spatial precision for correlation to the neuronal activity, with accuracy of several milliseconds (Tiriac, 2015; Akhmetshina, 2016; Inácio, 2016). Therefore, recording video files in raw format is essential for neurobiological research. Sometimes cameras are supported by software, which can have some limitations due to the specialization of the software to the given field of research. That software, in practice, also has low compatibility with other cameras, which prevent usage of the same cameras or software in various applications. Proprietary software, commonly used in non-scientific areas, mostly provide recordings in compressed formats and only for widely used cameras (Salem, 2020). While the cost of the scientific video equipment can reach tangible values, the necessity of the software, which can cover at least basic functions of video acquisition in various research, becomes noticeable. Here we presented an AVRawRA,

software, which can provide main functions for video acquisition and recording in raw data format from the large amount of modern cameras, including web cameras. Our software is fully compatible with FireWire (IEEE 1394), GigE (Gigabit Ethernet) and USB cameras (USB3 Vision or DirectShow). AVRawRA allows the user to record video files in several formats, including raw binary (*.bin) and compressed video format (*.avi). According to the technical features of the camera, video recordings can be performed in several modes using both internal and external triggers in various configurations. Frame rate and spatial region of interest (ROI) can be manually regulated if the camera allows that. A basic analysis of intensity included in this version of software to present the opportunity of the real-time analysis without significant loss of the camera time resources.

2. AVRAWRA GRAPHICAL USER INTERFACE

AVRawRA graphical user interface contains panel for setup main camera features, panel for setup region of interest (ROI), panel for the record configuration, panel for real-time image visualization and panel for real-time analysis (Fig. 1).

2.1. “Camera setup” panel. The main step for the user is a definition of the video adapter, camera and its operating mode. First, the user should check availability and indicate the camera’s video adapter in the “Adapter” combo box. Absence of an adapter of interest may represent incorrect installation of the drivers for the camera. Secondly, the user determines which camera device, presented in the “Camera” combo box, will be used for acquisition. Only connected and supported by the chosen adapter cameras will be represented in the “Camera” combo box. Thirdly, the user should choose the operating mode of the camera in the “Mode” combo box. Here will be defined resolution, color mode. Some cameras with unregulated frame rate also present different modes with various predefined frame rates. Finally, numeric controls “Exposure” and “Unit” will be available, if the camera’s hardware architecture allows controlling frame rate. When all combo boxes contain correct (not blank) information, “Start” button will be enabled to press and start acquisition with imaging in the panel for real-time image visualization.

2.1.1. “Adapter” combo box. Combo box for selection between available video adapters. To overview, the user should press the button with V symbol to expand the list of automatically detected adapters. The first video adapter is “IMAQ”, which represents a part of the LABView Vision Acquisition Module product. “IMAQ” video adapter based on NI-IMAQdx package functions for acquiring and recording video.

LABView Vision Acquisition Module covers the vast majority of modern manufacture cameras with supporting FireWire (IEEE 1394), GigE (Gigabit Ethernet) and USB (USB3 Vision or DirectShow) connection interfaces. The second available video adapter is “Qimaging”, which represents the drivers for the line of Qimaging CCD cameras. A package of functions was designed by Qimaging for acquiring data using LABView resources. That video adapter was added as an example of an opportunity to acquire data without the NI-IMAQdx package. Selection of the video adapter automatically creates a list of the available camera devices in the “Camera” combo box.

2.1.2. “Camera” combo box. Combo box for camera device selection. Camera device selection available only after definition of the video adapter in “Adapter” combo box. To overview, the user should press the button with V symbol to expand the list of automatically detected cameras. Selection of the camera device automatically creates a list of the available camera operation modes in the “Mode” combo box.

2.1.3. “Mode” combo box. Combo box for camera operation mode selection. To overview, the user should press the button with V symbol to expand the list of automatically extracted modes for the selected camera device from “Camera” combo box. Camera operation mode selection is available only after definition of the camera device in the “Camera” combo box. Camera operation mode can be changed during video acquisition (after pressing the “Start” button from the “Camera setup” panel), but not during the recording (after pressing “Rec” button from the “Record control” panel). Selection of the camera operation mode is a last obligatory action to unlock the “Start” button.

2.1.4. “Exposure” numeric control and “Unit” combo box. Numeric control and combo box to set value and units, respectively, of the exposure time for each acquisition frame. To change a numeric value, the user should manually type the acquisition frame time or press a button with Δ or V symbol (to increase or decrease on 1 value point, respectively). To change time units, the user should press the button with V symbol to expand the list of automatically defined time units. The exposure time is automatically set to 16 ms, however, that value can be out of range of the used camera. Therefore, users should verify acceptable time ranges for exposure times before operation. Not correct exposure time will lead to abort of the application. “Exposure” numeric control and “Unit”

combo box are not available for the cameras with constant frame rate.

2.1.5. “Start” button and “Acquiring” indicator.

Button to start/stop acquisition and indicator to represent corresponding mode. To start acquisition, press once on the “Start” button. Normally, “Acquiring” indicator will change color to light green, “Start” button will be highlighted with yellow color and an image from the camera will appear on image display in the real-time image visualization panel. A second press on the “Start” button will stop acquisi-

tion, deactivate “Start” button (yellow highlight removed) and switch off “Acquiring” indicator (dark green color). It is highly recommended to stop acquisition before switching between camera devices to avoid unpredictable abort of the application.

2.2. Real-time image visualization panel. Real-time image visualization panel is designed to display acquired frames, provide spatial navigation through the image, set or change ROI, represent information about current camera operation mode and writing status.

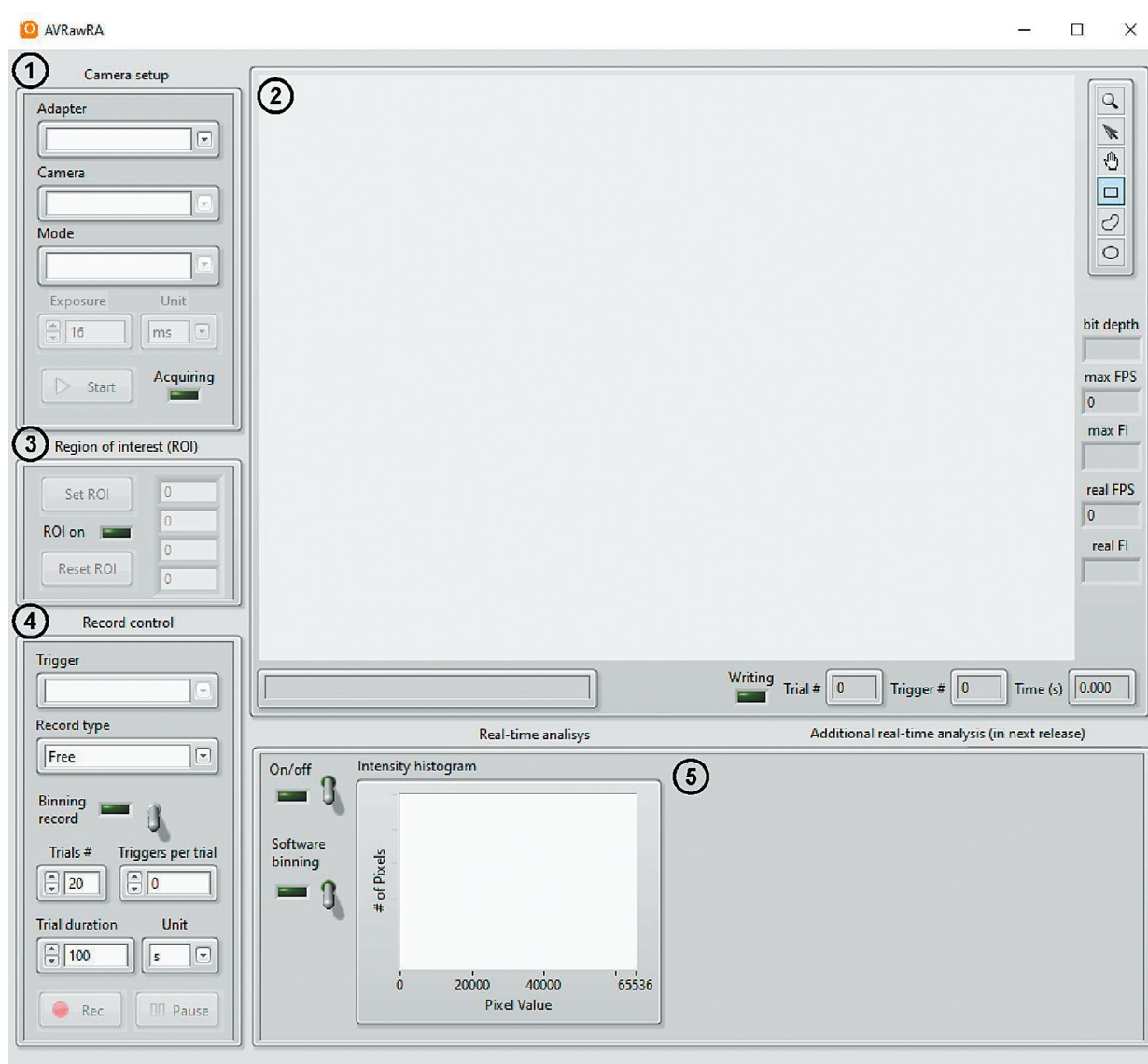


Fig. 1. General view of the AVRawRA user interface. The following panels are presented: 1) “Camera setup” panel; 2) Real-time image visualization panel; 3) “Region of interest (ROI)” panel; 4) “Record control” panel; 5) “Real-time analysis” pane.

Рис. 1. Общий вид пользовательского интерфейса AVRawRA. Представлены следующие панели: 1) панель “Настройка камеры”; 2) панель визуализации изображения в реальном времени; 3) панель “Область интереса (ROI)”; 4) панель “Управление записью”; 5) панель “Анализ в реальном времени”.

2.2.1. Image display. Interactive display for image acquired frames. Become enabled automatically after “Start” button press. Interactive display allows user to observe real-time image from the camera, change image color map (visually), snap and save image to file (*.png). ROI selection by default is represented as a red-colored contour which covers the image. Color map change and snap/save image functions can be called by right-clicking on the image display area with the following selection of the related functions.

2.2.2. Navigation and ROI toolbar. Toolbar with tools for spatial navigation through the image and setting the ROI. Toolbar contains zooming tool (magnifying glass symbol), selection tool (arrow symbol), dragging tool (hand symbol), rectangle ROI set tool (hand symbol), freehand ROI set tool (blot symbol), ellipse ROI set tool (ellipse symbol). The zooming tool allows the user to zoom in/out the displayed image. Zooming tools don't affect the recorded image size and are used only for the visual zoom. Selection tool is a neutral tool, which replaces actions of other tools and indicates the position of the pointer on the image display in the status string (see Graphical user interface → Panel for real-time image visualization → Status string subsection). Dragging tool allows the user to move along a zoomed image. Rectangle, freehand and ellipse ROI set tool allows the user to draw the area, which will be used to calculate the ROI region, using respective interactive shapes.

2.2.3. “Bit depth” string. Text string that shows a bit depth of the image, used to record (except compressed video, see Methodology section).

2.2.4. “max FPS” string. Text string that shows a maximum frame per second (FPS) value. Maximum FPS value is evaluated from the camera parameters.

2.2.5. “max FI” string. Text string that shows a maximum frame interval (FI) value. Maximum FI value is evaluated from the camera parameters.

2.2.6. “real FPS” string. Text string that shows a real frame per second (FPS) value. The Real FPS value is evaluated as reciprocal to the frame time interval (in seconds) extracted during acquisition between current and previous frame timestamps.

2.2.7. “real FI” string. Text string that shows a real frame interval (FI) value. The Real FI value is evaluated as the frame time interval (in seconds) extracted during acquisition between current and previous frame timestamps.

2.2.8. Status string. Text string that shows current used camera operation mode, zoom factor, a bit

depth of the acquisition stream and position of the pointer on the display image.

2.2.9. “Writing” indicator. Button for start/stop acquisition and indicator to represent corresponding mode. To start acquisition, press the “Start” button once. Normally, “Acquiring” indicator will change color to light green, “Start” button will be highlighted with yellow color and an image from the camera will appear on image display in the real-time image visualization panel. A second press on the “Start” button will stop acquisition, deactivate “Start” button (yellow highlight removed) and switch off “Acquiring” indicator (dark green color). It is highly recommended to stop acquisition before switching between camera devices to avoid unpredictable abort of the application.

2.2.10. “Trial #” string. Text string that shows a number of the current recording trial. Text string shows zero value when the number reaches the value defined by “Trials #” numeric control.

2.2.11. “Trigger #” string. Text string that shows a number of the current received camera trigger. Text string shows zero value when the number reaches the value defined by “Triggers per trial” numeric control.

2.2.12. “Time” string. Text string that shows a time of the current recording trial in seconds. Text string shows zero value when the number reaches the value defined by “Triggers per trial” numeric control.

2.3. “Region of interest (ROI)” panel. Region of interest panel is designed to set/unset ROI and display ROI parameters. ROI region calculated as a rectangle area with left, top, width and height parameters extracted from the minimum and maximum x-y values of the interactive shape mask borders (see Graphical user interface → Panel for real-time image visualization → Navigation and ROI toolbar). Interactive shape mask is a rectangle that circumscribes interactive shape.

2.3.1. “Set ROI” button and “ROI on” indicator. Button to set ROI action and indicator to show that ROI is used. To set ROI, press the “Set ROI” button. Normally, “ROI on” indicator will change color to light green and an image on the real-time image visualization panel will be reduced to ROI values.

2.3.2. ROI array indicator. Indicator of ROI values that represent left, top, width and height values for the rectangle that circumscribes interactive shape of ROI.

2.3.3. “Reset ROI” button. Button to reset ROI back to the original size of the camera operation

mode. To reset ROI, press the “Reset ROI” button. Normally, “ROI on” indicator will change color to dark green and image on the real-time image visualization panel will be recovered to the camera operation mode values.

2.4. “Record control” panel. “Record control” panel is designed to manage record parameters, select the type of record file and start recording. Record triggering parameters are extracted from the camera device properties and presented in the “Trigger” combo box. “Record type” combo box is used to specify the record file type (raw or compressed). The record can also be binned using a 4x4 square kernel, if necessary. Each record is formed by repetitive trials with predefined duration and number of triggers. Trial recording stops when the duration time or number of triggers per trial reaches predefined values. Record automatically stops when the number of trials was reached or the “Rec” button was manually disabled by the user. Number of trials, trial duration and number of camera triggers are defined by user in the “Trials #”, “Trial duration”, “Triggers per trial” numeric controls. Additionally, time units for trial duration time can be specified in the “Unit” combo box. After adjusting all necessary parameters, “Rec” button can be pressed to start recording. Record will start immediately, if the user selected the “Free” file type. Otherwise, a user dialog interface will ask for the saving folder pathway. The user should specify the folder and press the “Current folder” button in the user dialog. Afterward, AVRawRA will automatically create a subfolder, named as current date (format YYYY-MM-DD) and place a record file there.

2.4.1. “Trigger” combo box. Combo box for selection between available camera trigger modes. “Free” mode is set by default to cameras without the possibility of external triggering. To change trigger type, the user should press the button with V symbol to expand the list of automatically defined time units. Trigger mode has different designs for different devices (cameras) and depends on the specific model. The most common type is a free (or internal) trigger (“Free”), in which the image is read from the camera after the exposure time has been reached. When using other modes, the trigger will determine when information needs to be read from the camera. In this case, this can be either the time of each frame determined by the trigger, or, for example, a set of frames received while maintaining the trigger in the active state (+5V). The source is an external signal generator connected to the corresponding functional port of the camera (if available). Thus, the operation of the trigger will depend on the corresponding selected camera mode according to the documentation. The

list of trigger modes is automatically read from the device during camera initialization and displayed here.

2.4.2. “Record type” combo box. Combo box for selection between record file types. The record can be saved in raw binary (*.bin) or compressed (*.avi) formats. Experimental IOS3 format is also presented in the current software release and will be used as format for RGB-colored video (see Future directions). “Free” format allows the user to record in the testing mode without creating any files. To change record type, the user should press the button with V symbol to expand the list of automatically defined time units.

2.4.3. “Binning record” switch with indicator. Switch with an indicator to set/unset binning mode for the record file. The indicator changes its color to light green for “binning on” mode and to dark green color for “binning off” mode.

2.4.4. “Trials #” numeric control. Numeric control to set number of repetitive trials. Users can interactively change this value during recording. Value will be checked only after the current trial finishes recording. Trial number displayed in the “Trial #” string (see Real-time image visualization panel → “Trial #” string). To change a numeric value, the user should manually type the number of trials or press a button with Λ or V symbol (to increase or decrease on 1 value point, respectively).

2.4.5. “Triggers per trial” numeric control. Numeric control to set the number of triggers in a single trial. Users can interactively change this value during recording. Interactively set value will be taken into account if it is more than the current value, displayed in the “Trigger #” string (see Real-time image visualization panel → “Trigger #” string). To change a numeric value, the user should manually type the number of triggers or press a button with Λ or V symbol (to increase or decrease on 1 value point, respectively).

2.4.6. “Trial duration” numeric control. Numeric control to set duration of single trial. Users can interactively change this value during recording. Interactively set value will be taken into account if it is more than the current value, displayed in the “Time” string (see Real-time image visualization panel → “Time” string). To change numeric value, the user should manually type the duration time or press a button with Λ or V symbol (to increase or decrease on 1 value point, respectively).

2.4.7. “Unit” combo box. Combo box for selection time units of the trial duration, presented in the “Trial duration” numeric control. To change time units,

the user should press the button with V symbol to expand the list of automatically defined time units. Change of the units will not affect the presentation of time in the “Time” string (see Real-time image visualization panel → “Time” string), which is always displayed in seconds.

2.4.8. “Rec” button. Button to start recording to the file. To start recording, press the “Rec” button once. Normally, “Writing” indicator (see Real-time image visualization panel → “Writing” indicator) will change color to light green, and the “Rec” button will be highlighted with yellow color. A second press on the “Rec” button will stop recording, deactivate the “Rec” button (yellow highlight removed) and switch off the “Writing” indicator (dark green color). However, the camera will wait for the last trigger due to the mechanisms of stream triggering.

2.4.9. “Pause” button. Unfunctional experimental button, will be developed for the next release to pause recording.

2.5. “Real-time analysis” panel. “Real-time analysis” panel is designed to show users some additional information about image properties. This panel is still developing, and for now presents two options: analysis of pixel intensity distribution (“Intensity histogram” graph) and preview for the image binning (“Software binning” switch with indicator).

2.5.1. “On/off” switch with indicator. Switch with an indicator to enable/disable real-time analysis. The indicator changes its color to light green for “analysis on” mode and to dark green color for “analysis off” mode.

2.5.2. “Software binning” switch with indicator. Switch with an indicator to enable/disable software binning of the data. The indicator changes its color to light green for “binning on” mode and to dark green color for “binning off” mode. Software binning disables the “Rec” button. If software binning was enabled, the video stream was replaced by original images, spatially smoothed using cumulative intensity from the 4x4 square kernel.

2.5.3. “Intensity histogram” graph. Graph for showing image pixel intensity distribution. Full image used by the default. If the ROI contour was defined by a user, only pixels inside the ROI contour will be used for estimation of the pixel intensity distribution. Automatically evaluated after enabling real-time analysis. Bit depth of each pixel is defined by the video stream parameters. X-value represents intensity in the bit fullness, Y-value represents number of pixels with current bit fullness. Number values for

the y-axis are switched off to remove the effect of the rapid change of the values during autoscaling.

3. METHODOLOGY

AVRawRA is following a simple workflow. During “Prepare device mode” users select necessary camera device and operation mode and define a frame rate, if possible. Interface for setting acquisition parameters is placed in the Camera setup panel (see “Camera setup” panel). Afterwards, “Acquisition session” is started after pressing the “Start” button (see “Camera setup” panel → “Start” button and “Acquiring” indicator). During “Acquisition session”, the user is able to monitor the real-time image from the camera device (see Real-time image visualization panel), set ROI (see “Region of interest (ROI)” panel) and change camera operation mode and frame rate (see “Camera setup” panel), if necessary. Real-time analysis can be optionally switched on to visualize parameters of the image (see “Real-time analysis” panel) or sequence of images (see Future directions). To move to the “Recording session”, the user should set properties of the record (see “Record control” panel) and press “Rec” button. After the record will be stopped (manually or according to the record parameters), the program state will return to “Acquisition session”. AVRawRA does not allow you to open and view already recorded files. Files with AVI extension can be played in any media player that supports this format (if there are appropriate decoding libraries - codecs). The binary format can be read using any programming language with an implementation for reading binary files (for example, the “fread” function in the Matlab programming environment).

3.1. “Prepare device mode”. “Prepare device mode” is the first and important stage of the workflow for the full description of the device which will be used in “Acquisition session” and “Recording session”. Necessity of this stage obviously originates from the logic of interaction between devices and software. Firstly, each camera device uses a corresponding video adapter to identify itself in the operating system. Software will not find the device without correctly installed camera drivers for the adapter. That is a key point to allow software to find the camera device. Secondly, the camera device itself and operation mode of the camera should be selected to create the correct video stream (see “Acquisition session”). Created video streams correspond to the camera device, and it should be reorganized after changing the device. Therefore, it is highly recommended to stop “Acquisition session” before changing camera device or adapter, but not the camera operation mode or frame rate. That recommendation is

based on the architecture of the program. After change of the camera device or adapter, the dependent parameters of camera names and operation modes will be fully reset and unset. Therefore, algorithms will not recognize camera name or operation mode, leading the program to abort. Operation mode or frame rate have no critical dependencies, therefore they can be changed anytime. During “Prepare device mode” a video stream is not created that is indicated by the “Start” button and “Acquiring” indicator.

3.2. “Acquisition session”. “Acquisition session” is a main and mostly used stage of the workflow, where a real-time video stream from the camera device is created and processed. On this stage the user is allowed to work with the video stream in the “Live view” mode to see its features (such as FPS) during preparation for the record. Video stream presents a sequence of the images, constantly collecting from the camera. Once created, the video stream corresponds to the parameters which were set in “Prepare device mode”. The internal logic of the AVRawRA allows building video streams for any cameras in the universal way. That was achieved by isolating processes of setting camera parameter names, provided by the manufacturer, to the blocks with universe inputs from “Prepare device mode” and output in form of video stream. That approach allows a simple process of building and encapsulation of the necessary camera block, despite the large variety of parameter names from company to company. If bit depth is specified among internal camera acquisition parameters, it will be used to build the video stream. Otherwise, 16-bit depth will be used for each image in the video stream by default. Only monochrome video streams are allowed in the presented version of the software. Camera operation modes, providing colored images, are automatically converted to the monochrome image. However, opportunities to work with colored images will be recovered in the future release (see Future directions). Image display (see “Real-time image visualization” panel → “Image display”) shows one current image from the sequence and renews it according to the frame rate. Parameters of the stream are represented in the status string below the image display (see “Real-time image visualization” panel → “Status string”). All real-time analysis in presented software is based on the current image properties (see “Real-time analysis”). To switch on/off real-time analysis advantages, “On/off” switch with indicator is used. During usage of software binning (see “Real-time analysis” → “Software binning” switch with indicator) each consequent image is extracted from the video stream, recalculated as a cumulative intensity from 16 pixels forming 4x4 square

and placed back to the video stream. That option is used only for the displaying and real-time analysis functions (“Recording session” is blocked), because it consumes machine time resources. Therefore, for the correct recording with binning instead of “Software binning”, the user should use a corresponding switch on the “Record control” panel (see “Record control” panel → “Binning record” switch with indicator). That option will perform data binning during saving to file, but not during acquisition. “Acquisition session” also allows users to optionally define ROI using Navigation and ROI toolbar instruments (see “Real-time image visualization” panel → “Navigation and ROI” toolbar). ROI contour is used to extract pixels from an image to build an intensity histogram (see “Real-time analysis” → “Intensity histogram” graph). The user also can use ROI as a reference for image size by using the “Region of interest (ROI)” panel. A rectangle that circumscribes the interactive shape of ROI will be used as a new size for the frame. Video stream will be reconfigured, if camera device properties allow defining ROI (described in the camera device manual). Finally, “Acquisition session” allows the user to start “Recording session” using the “Rec” button (see “Record control” panel → “Rec” button).

3.3. “Recording session”. “Recording session” is a final stage of the workflow, where the user can save acquired frames to the file. To start a “Recording session”, the user should define record parameters using the “Record control” panel (see “Record control” panel). According to set parameters, each record will contain trials with frames. Frames acquisition can be triggered internally (or in “Free” record mode) by camera device pacemaker or externally by trigger input on camera device (if it exists). The full set of trigger modes is extracted from the camera device properties at the stage of forming the camera block (see “Acquisition session”) and is presented in the “Trigger” combo box (see “Record control” panel → “Trigger” combo box). When the camera device obtains a trigger, the image is acquired and placed into the buffer. Buffer is created in the beginning of the record and works as a process parallel to the video streaming. Images from the buffer are extracted and written to the file by the third parallel process. Therefore, acquiring and recording processes are working independently, providing high speed of the simultaneous visualization and saving of the data. Finally, files are saved to the raw binary or compressed video formats. The raw binary file (*.bin) consists of two parts: header and data array part with structure presented in Table 1. The “Header” section of the file contains the following sequential information (93 bits): 1) Service (80 bits); 2) Number of light sources (optional, 1 bit);

3) Frame width (number of pixels, 2 bits); 4) Frame height (number of pixels, 2 bits); 5) Parameters of the rectangular region of interest (ROI) used in the recording (coordinate values of the upper left corner of the ROI relative to the upper left corner of the frame in pixels - 4 bits, ROI width - 2 bits, and ROI height - 2 bits). In the “Data Array” section of the file, each frame (Frame) corresponds to a data block that sequentially contains: 1) information about the occupancy (in bits) of each pixel of the frame; 2) Timestamp in seconds (2 bits), milliseconds (2 bits) and microseconds (2 bits); 3) Trial number. In the case of an avi-file, the information is organized according to the structure of the avi-file, with frames being recorded sequentially, trial by trial.

4. RESULTS

We tested AVRawRA in several applications. Firstly, AVRawRA showed perfect results for registration reflected light from the animal skull (Fig. 2). The record was performed with external triggering of the camera under the green LED illumination. AVRawRA was able to catch, visualize and analyze each frame simultaneously with FPS rate 36 frames per second with resolution of 348x260 pixels. Video stream was recorded to the raw binary file without loss of the points. AVRawRA successfully visualized and recorded each frame to the raw binary file, which had a final size of 1.5 Gb. That shows us the stability of the record even with switched-on visualization and real-time analysis.

Secondly, we tested usage of the ROI instrument. To demonstrate that we used an experiment shown

on Fig. 2. Usage of the ROI allowed the user to estimate pixel intensity distribution in the targeted area (Fig. 3). After the decision to set the current ROI the “Set ROI” button was pressed. Image size in the stream was reduced from 348x260 pixels (Fig. 3) to 88x112 pixels (Fig. 4), which increased FPS from 36 to 50 frames per seconds. “ROI on” indicator was highlighted with a light green color, while ROI coordinates were represented as non editable values in the right part of the “Region of interest (ROI)”.

To verify the efficiency of the IMAQ adapter, we connected to the web camera with AVRawRA (Fig. 5). Software was able to perform all types of video recordings. Web cameras usually did not support external triggering, therefore all recordings were made using internal triggers.

Testing showed us several results. AVRawRA software allows us to use various camera devices. AVRawRA software allows us to use one camera device for the different scientific neuroimaging approaches. Real-time analysis is fully functional and compatible with AVRawRA features like ROI and binning. AVRawRA software allows us to use one camera device for the different scientific neuroimaging approaches. Summarizing that, AVRawRA software allows performing high-speed recordings with simultaneous visualization and real-time analysis without loss of efficiency.

Future directions

AVRawRA demonstrates a well organized environment and concept of data workflow. However, despite obvious benefits, presented software has some restrictions and deficiencies. Therefore, future re-

Table 1. The raw binary file (*.bin) file structure
Таблица 1. Структура двоичного файла (*.bin)

Variable name	Number of elements	Type
HEADER		
Free space	80	char
Number of colors	1	uint8
Image width	1	uint16
Image height	1	uint16
ROI elements	4	uint16
DATA ARRAY		
Frame 1	image width * image height	uint16
Timestamp 1 (s,ms,us)	3	uint16
Trial number 1	1	uint16
...	...	...
Frame N	image width * image height	uint16
Timestamp N (s,ms,us)	3	uint16
Trial number N	1	uint16

lease of the AVRawRA will cover the following key improvements: 1) acquiring and recording both in monochrome and colored modes; 2) moving from NI-IMAQdx functions (which require additional licensing after the installation of the compiled application) to NI-IMAQ functions (which provide fully free compiled application); 3) extension of the real-time analysis to display image sequence features; and 4) opportunity of the recording pause. Also, au-

thors plan to develop an application for creating camera blocks. Camera blocks will be created independently as virtual instruments by the user for further upload to the AVRawRA.

5. DISCUSSION

Modern scientific videoregistration equipment can require large finances. Therefore, usage of the

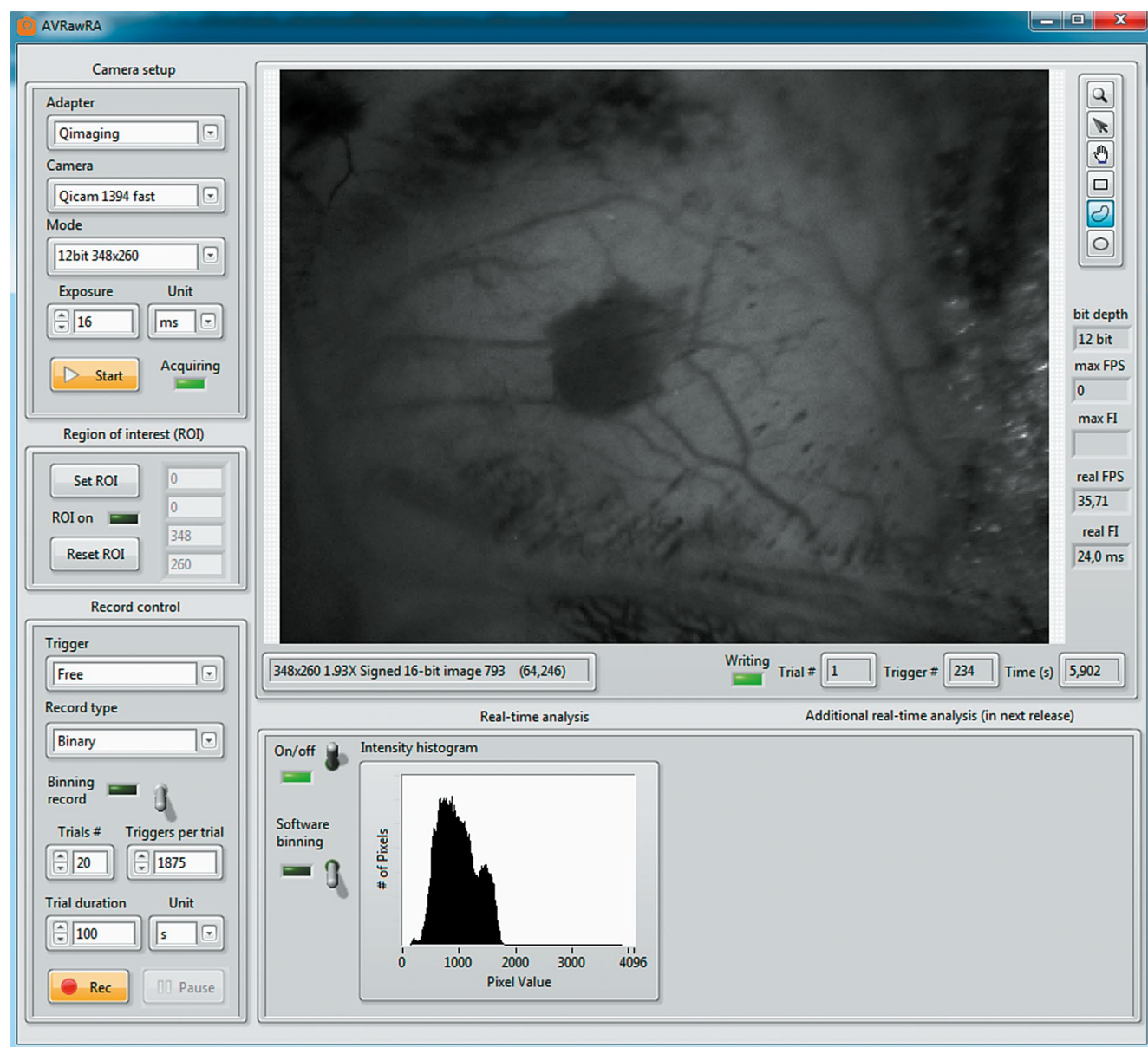


Fig. 2. Real-time intensity analysis during recording with Qcam 1394 fast camera. Image display shows a single frame with an image of the rat skull surface under the green (525 nm) LED highlight. Real-time intensity analysis shows distribution of the pixel intensity for the current frame in the image display.

Рис. 2. Анализ интенсивности кадра в реальном времени во время записи камерой Qcam 1394. На дисплее отображается один кадр с изображением поверхности черепа крысы с подсветкой зеленым (525 нм) светодиодом. Анализ интенсивности в реальном времени показывает распределение интенсивности пикселей для текущего кадра на дисплее изображения.

camera device in various imaging techniques can be essential for the researcher. We developed AVRawRA in the universal way to provide the user an opportunity of connection of the camera device in any configuration for performing various scientific research requiring videoregistration. However, diversity of the camera device parameters among modern manufactures creates a problem for the design of the universal software. AVRawRA was conceived as a tool for the fast video recording in the raw binary

data format for a wide range of the cameras. That requires high performance of the acquiring, visualizing and saving of the video data. Therefore, we used LABView as the most suitable development environment for the interaction with hardware. The greatest advantage of the LABView is a large and convenient functionality to direct connection to hardware devices and integrated by default ability of creating parallel processes. Firstly, stable interaction with various hardware using LABView libraries

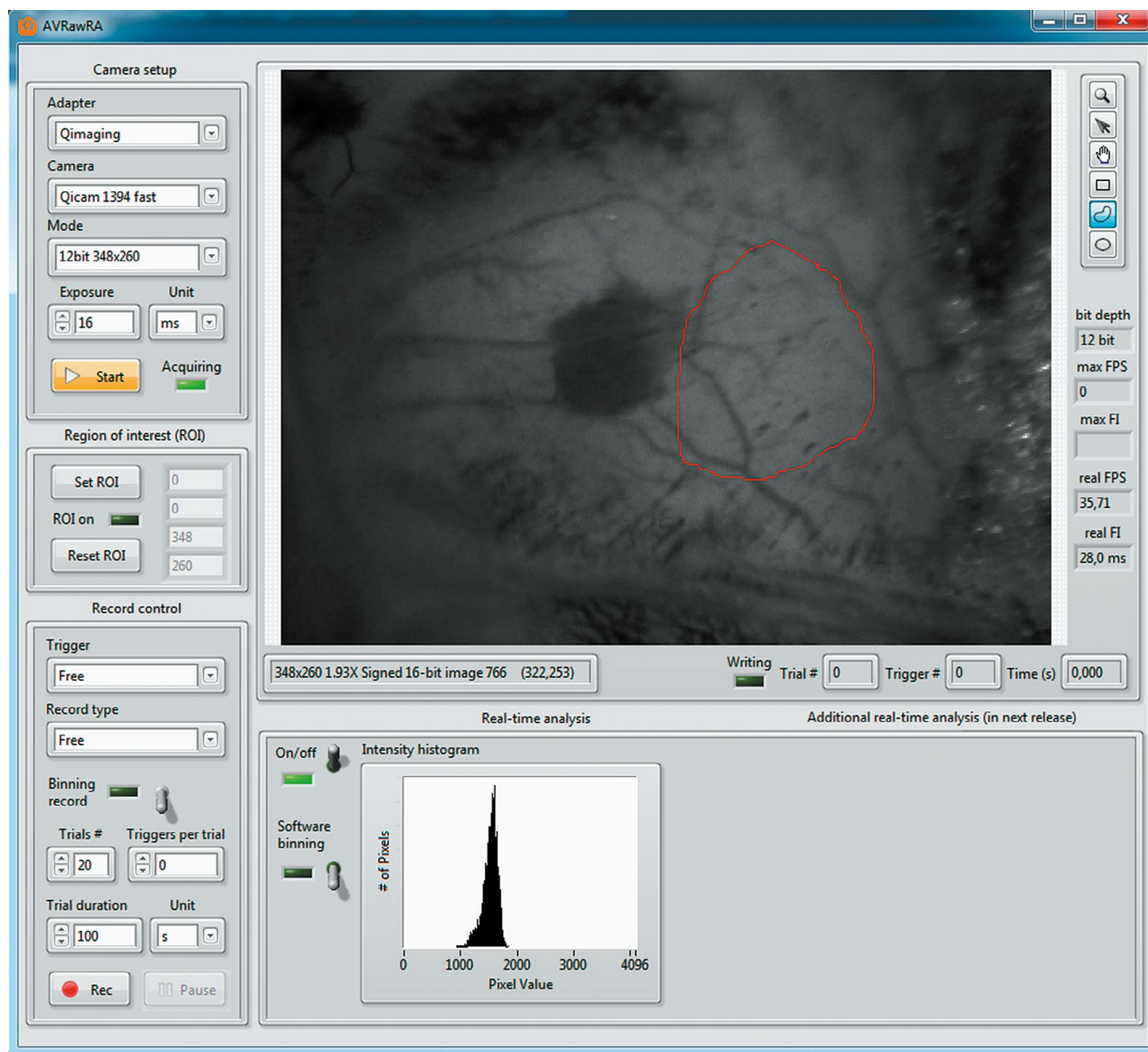


Fig. 3. Real-time intensity analysis using Qcam 1394 fast camera with marked ROI to the video stream from Fig. 2. Image display shows a single frame with an image of the mouse skull surface under the green (525 nm) LED highlight. The ROI region was marked with a red contour using the “freehand” tool. Real-time intensity analysis shows distribution of the pixel intensity inside the ROI region. Frame rate is 36 frames per second.

Рис. 3. Анализ интенсивности кадра в реальном времени с использованием камеры Qcam 1394 с отмеченным регионом интереса для видеопотока на рис. 2. На дисплее отображается один кадр с изображением поверхности черепа мыши под подсветкой зеленого (525 нм) светодиода. Регион интереса отмечен красным контуром с помощью инструмента “свободная рука”. Анализ интенсивности в реальном времени показывает распределение интенсивности пикселей внутри области ROI. Частота составляет 36 кадров в секунду.

eliminates the necessity of developing a support package for each device. Secondly, the universal set of functions for each type of device provides a convenient architecture of code, where each interaction with any device can be formed as blocks with constant inputs and outputs, despite different numbers and names of the internal parameters of the devices. Thirdly, various tasks can be performed independently in the same time as a part of LABView language logic, while in other development environments that is an option. The combination of the described factors completely satisfied the conditions for completing our task. However, synchronization

and accuracy of interactions between parallel processes should be carefully taken into account. Using the advantages of the LABView, we designed a concept of “camera block”, where a virtual instrument is designed with standard inputs and outputs, while all differences of the camera device parameter names are described only inside this virtual instrument (“camera block”). That allows the user to add “camera block” to the software without reorganizing the main interface.

Among the available free software, Micro-Manager can be noticed as the closest analogue (in terms of functionality). However, Micro-Manager is a pro-

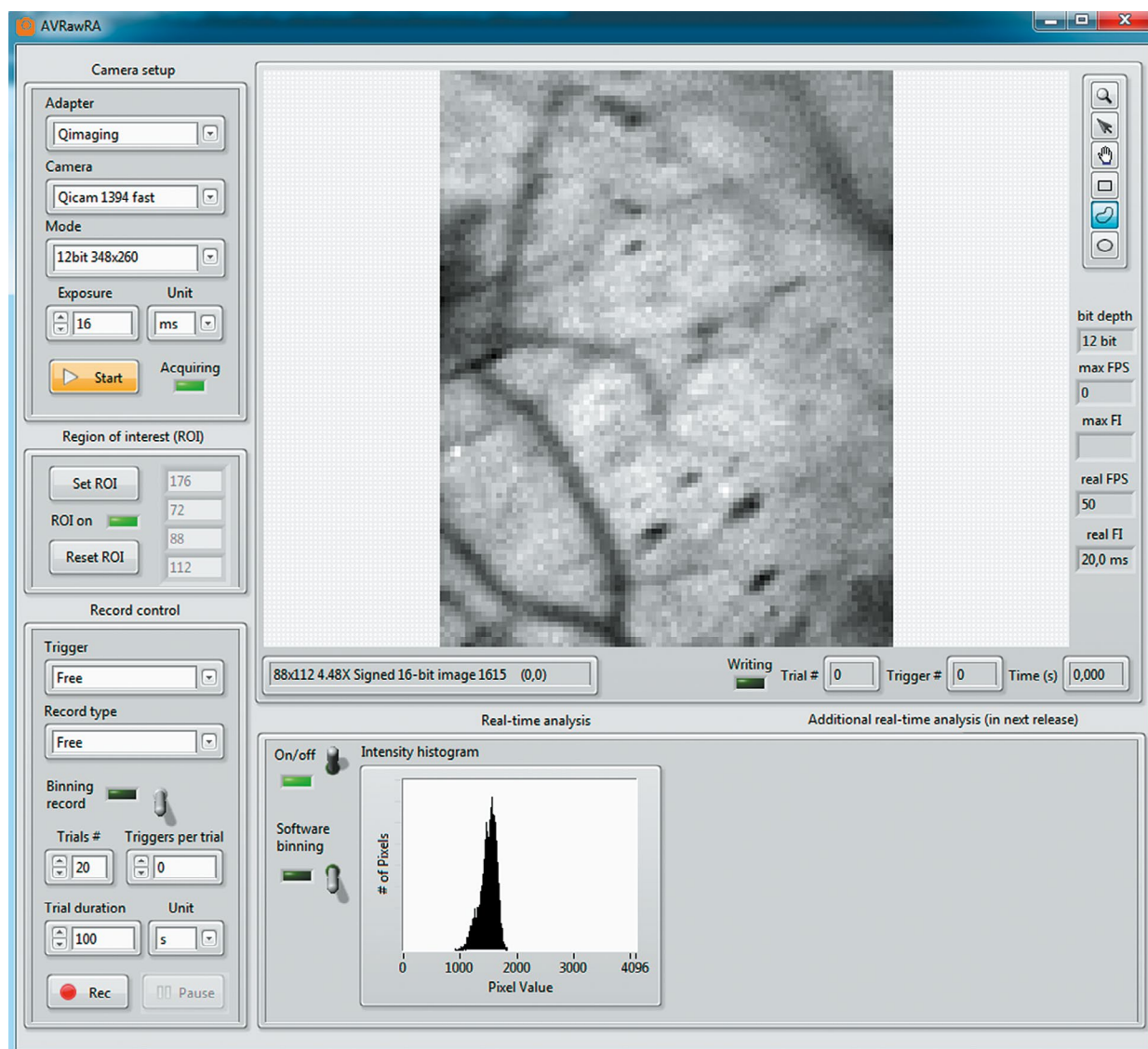


Fig. 4. Real-time intensity analysis using Qcam 1394 fast camera after setting ROI to the video stream from Fig.2. Frame was reduced using ROI from 348×260 pixels to 88×112 pixels. Frame rate is 50 frames per second.

Рис. 4. Анализ интенсивности в реальном времени с помощью быстрой камеры Qcam 1394 после настройки ROI для видеопотока с рис.2. Кадр был уменьшен с помощью ROI с 348×260 пикселей до 88×112 пикселей. Частота составляет 50 кадров в секунду.

fessional solution for a wide range of tasks, which leads to a more complex interface, as well as to some limitations (for example, organizing video recording in timed trials). The functionality implemented in AVRawRA is specialized to the usage of video cameras for recording video files. The user can configure video recording and camera parameters in one interface. Flexible modes for setting up and organizing video recording in AVRawRA allow the user to organize record both in streaming form and in the form of partial trials with fixed time intervals.

In the presented software we designed and integrated a “camera block” for three cameras (Qimaging Qicam 1394 fast, Photonfocus MV1-R1280-50-G2-16, Teledyne FLIR Blackfly S BFS-U3-04S2M). Qimaging Qicam 1394 fast requires a unique adapter, which is provided with application as self-extracted installation free package. Photonfocus MV1-R1280-50-G2-16, Teledyne FLIR Blackfly S BFS-U3-04S2M and a large set of similar cameras are supported by the resources provided by the NI-IMAQdx module. That is quite convenient and removes hardware problems of interac-

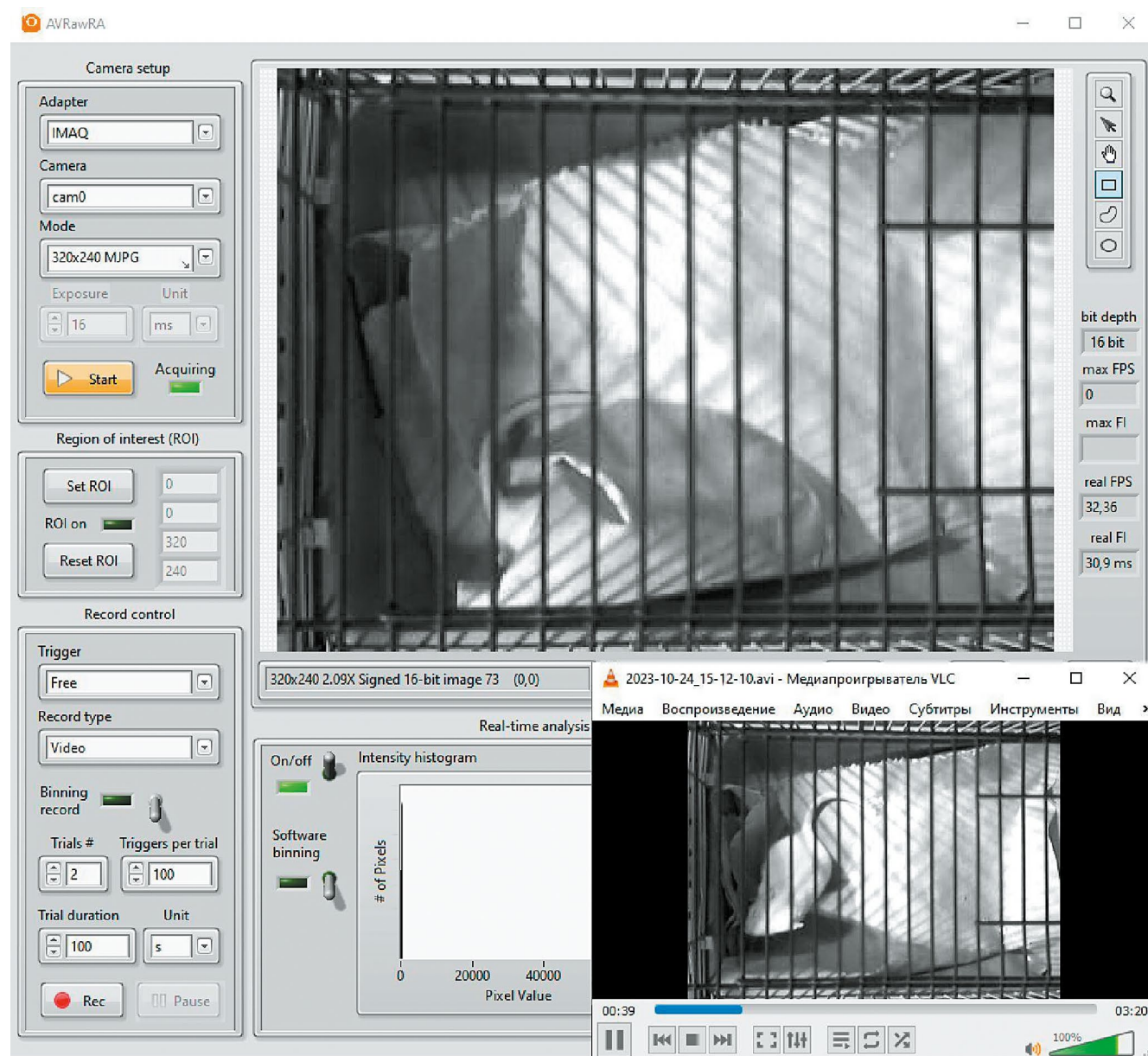


Fig. 5. Acquiring and recording with a web camera device (Logitech C270) to the compressed video format (AVI). In the right bottom corner an inset with a fragment of the recorded video file opened in the media player.

Рис. 5. Съемка и запись веб-камерой (Logitech C270) в сжатый видеоформат (AVI). В правом нижнем углу показана вставка с фрагментом записанного видеофайла открытого в медиаплеере.

tion with camera devices. However, the principal limitation should be mentioned. NI-IMAQdx module requires additional licensing, which can be a large budgetary burden for the laboratory. Therefore, our team plans to move from the NI-IMAQdx module to the simple NI-IMAQ and NI-IMAQ I/O functions that are covered by the developing license. Another option is to use LABView virtual instruments, which are already provided by some manufacturers in the camera device support package. However, those virtual instruments are still specific for certain camera devices. Therefore, the universal approach of “camera block” again can solve that problem. For now, all “camera block” virtual instruments can be designed by request. However, in future software releases we plan to create an application that will allow the user to create his own “camera block” virtual instrument and upload it to the AVRawRA.

6. CONCLUSION

AVRawRA software concept is trying to keep the delicate edge between complexity of the camera device software/hardware interaction and user-friendly interface. Moreover, AVRawRA provides an opportunity for high-speed raw video data acquisition and recording. Additionally, AVRawRA demonstrates low-resource consuming real-time image analysis that can be essential for neuroimaging research. In summary, AVRawRA is a convenient tool for video acquisition and recording, however, for now with some additional licensing limitations.

7. HARDWARE AND SOFTWARE REQUIREMENTS

Disk space: 1GB; RAM: 1GB;
IBM PC-compatible;
OS: Windows 7.0/8.0/8.1/10

8. LICENSE

The software can be freely used for scientific and educational purposes. If used for commercial purposes, it is necessary to notify the first author (Dmitrii Suchkov). AVRawRA is developed in LABView, therefore a run-time module for LABView 2020 is included in the installation executable file. The installation file is designed for direct installation on Windows operating system without additional preparations. Attention: IMAQ adapter requires additional licensing (<https://www.ni.com/en/support/documentation/supplemental/18/licensingnational-instruments-vision-software.html>).

To install AVRawRA all files from the presented repository should be uploaded. Link to the free repository with installation files: <https://gitlab.com/lab-equipment-assemblies1/avrawra>

9. ETHICAL APPROVAL

All animal-use protocols followed the guidelines of the Kazan Federal University on the use of laboratory animals (ethical approval by the Institutional Animal Care and Use Committee of Kazan State Medical University N9-2013).

10. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by RSF grant 22-25-00225.

REFERENCES

- Aitken P.G., Fayuk D., Somjen G.G., Turner D.A.* Use of intrinsic optical signals to monitor physiological changes in brain tissue slices. *Methods* 1999. 18: 91–103. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0762>
- Akhmetshina D., Nasretdinov A., Zakharov A., Valeeva G.* The Nature of the Sensory Input to the Neonatal Rat Barrel Cortex. *The Journal of Neuroscience* 2016. 36 (38): 9922–9932. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1781–16.2016>
- Baker B.J., Kosmidis E.K., Vucinic D., Falk C.X., Cohen L.B., Djuricic M., Zecevic D.* Imaging brain activity with voltage- and calcium-sensitive dyes. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2005. 25 (2): 245–282. <https://doi.org/10.1007/s10571–005–3059–6>
- Dard R., Leprince E., Denis J., Rao Balappa S., Suchkov D., Boyce R. et al.* The rapid developmental rise of somatic inhibition disengages hippocampal dynamics from self-motion. *eLife* 2022. 11:e78116. <https://doi.org/10.7554/eLife.78116>
- Grinvald A., Hildesheim R.* VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics. *Nature Reviews . Neuroscience* 2004. 5 (11): 874–885. <https://doi.org/10.1038/nrn1536>
- Hendel T., Mank M., Schnell B., Griesbeck O., Borst A., Reiff D.F.* Fluorescence changes of genetic calcium indicators and OGB-1 correlated with neural activity and calcium in vivo and in vitro. *The Journal of Neuroscience* 2008. 28 (29): 7399–7411. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1038–08.2008>
- Hubel D.H., Wiesel T.N.* Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat’s visual cortex. *Journal of Physiology* 1962. 160: pp. 106–154. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.2017020607>
- Inácio A.R., Nasretdinov A., Lebedeva J., Khazipov R.* Sensory feedback synchronizes motor and sensory neu-

- ronal networks in the neonatal rat spinal cord. *Nature Communications* 2016. 7:13060.
<https://doi.org/10.1038/ncomms13060>.
- de Melo Reis R.A., Freitas H.R., de Mello F.G. Cell Calcium Imaging as a Reliable Method to Study Neuron–Glial Circuits. *Frontiers in Neuroscience* 2020. 14: 975.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.569361>
- Mues M., Bartholomäus I., Thestrup T., Griesbeck O., Wekerle H., Kawakami N., Krishnamoorthy G. Real-time in vivo analysis of T cell activation in the central nervous system using a genetically encoded calcium indicator. *Nature Medicine* 2013. 19 (6): 778–783.
<https://doi.org/10.1038/nm.3180>
- Oh. J., Lee C., Kaang B.K. Imaging and analysis of genetically encoded calcium indicators linking neural circuits and behaviors. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 2019. 23 (4): 237–249.
<https://doi.org/10.4196/kjpp.2019.23.4.237>
- Petersen C.C., Sakmann B. Functionally independent columns of rat somatosensory barrel cortex revealed with voltage-sensitive dye imaging. *The Journal of Neuroscience* 2001. 21 (21): 8435–8446.
<https://doi.org/doi:10.1523/JNEUROSCI.21–21–08435.2001>
- Popovic M.A., Carnevale N., Rozsa B., Zecevic D. Electrical behaviour of dendritic spines as revealed by voltage imaging. *Nature Communications* 2015. 6 (1): 8436.
<https://doi.org/10.1038/ncomms9436>
- Salem G., Krynitsky J., Cubert N., Pu A., Anfinrud S., Pedersen J. et al. Digital video recorder for Raspberry PI cameras with multi-camera synchronous acquisition. *HardwareX* 2020. 8:e00160.
<https://doi.org/10.1016/j.ohx.2020.e00160>
- Sintsov M., Suchkov D., Khazipov R., Minlebaev M. Developmental Changes in Sensory-Evoked Optical Intrinsic Signals in the Rat Barrel Cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2017. 11.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00392>
- Suchkov D., Shumkova V., Sitdikova V., Minlebaev M. Simple and efficient 3D-printed superfusion chamber for electrophysiological and neuroimaging recordings in vivo. *eNeuro* 2022. 9 (5).
<https://doi.org/10.1523/eNeuro.0305–22.2022>
- Tiriac A., Sokoloff G., Blumberg M.S. Myoclonic twitching and sleep-dependent plasticity in the developing sensorimotor system. *Current Sleep Medicine Reports* 2015. 1: 74–79.
<https://doi.org/10.1007/s40675–015–0009–9>
- Venkatesh M., Victor S.P. Video Compression based on Visual Perception of Human Eye. *IJRASET* 2018. 6 (1): 2661–2664.
<https://doi.org/10.22214/ijraset.2018.1365>
- Vincis R., Lagier S., Van De Ville D., Rodriguez I., Carleton A. Sensory-evoked intrinsic imaging signals in the olfactory bulb are independent of neurovascular coupling. *Cell Reports* 2015. 12: 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.016>

AVRAWRA – ПРИЛОЖЕНИЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИСХОДНЫХ ВИДЕОЗАПИСЕЙ В НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ И ВИДЕОРЕГИСТРАЦИИ

Д. С. Сучков^{1,*}, В. В. Шумкова², В. Р. Ситдикова², В. М. Силаева², А. Е. Логашкин²,
 А. Р. Мамлеев², Я. В. Попова², Л. С. Шарипзянова², М. Г. Минлебаев^{1,2}

¹ Средиземноморский Институт Нейробиологии, ИНСЕРМ, Университет Экс-Марсель, Марсель, Франция

² Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

* e-mail: suchkov.dmitriy.ksu@gmail.com

Аннотация. Программа видеорегистрации в бинарном формате – AVRawRA [аврора] представляет собой программное обеспечение, предназначенное для сбора и записи видеосигнала с камер в виде двоичного кода или сжатого видеоформата. AVRawRA позволяет использовать широкий спектр видеокамер в различных нейровизуализационных задачах. Это дает преимущество использования дорогостоящего оборудования видеорегистрации для решения нескольких задач с помощью одного программного обеспечения. Концепция представленного программного обеспечения позволяет добавлять любое камерное устройство без перестройки основного конвейера кода. Представленное программное обеспечение имеет удобный интерфейс с интерактивными элементами для регулирования параметров получения и записи в реальном времени без остановки видеопотока. Одновременная визуализация, анализ и запись в реальном времени могут осуществляться без потери эффективности и пропуска кадров. AVRawRA поддерживает запись с камерных устройств как с внешними, так и с внутренними триггерами. Размер сохраняемого видеофайла не ограничивается временем записи и ограничен только местом на накопителе. Наше программное обеспечение прекрасно подходит как для нейровизуализационных исследований, так и для экспериментов с дополнительной видеорегистрацией. В заключение можно сказать, что AVRawRA представляет собой универсальную платформу для использования различных устройств видеорегистрации, проведения анализа в реальном времени и высокоскоростной записи в форматах бинарного и сжатого видео.

Ключевые слова: программное обеспечение для получения видеоизображений, видеорегистрация оптических явлений, нейровизуализация