

МОДУЛЯЦИЯ СЕТЕВОЙ КОРТИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ДЫХАНИЕМ  
У ЮВЕНИЛЬНЫХ АНЕСТЕЗИРОВАННЫХ КРЫС

© 2022 г. В. В. Шумкова<sup>1</sup>, В. Р. Ситдикова<sup>1</sup>, В. М. Силаева<sup>1</sup>,  
Д. С. Сучков<sup>1, 2</sup>, М. Г. Минлебаев<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup>НИЛ Нейробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup>Средиземноморский институт нейробиологии, университет Экс-Марсель, Марсель, Франция

\*E-mail: minlebaevm@mail.ru

Поступила в редакцию 24.10.2022 г.

После доработки 09.11.2022 г.

Принята к публикации 10.11.2022 г.

Организованная нейронная активность лежит в основе функционирования головного мозга. Как обработка информации, так и ее передача между кортикальными структурами происходит за счет синхронизированной нейронной активности. В бодрствующем состоянии одним из механизмов, способствующих интеграции и синхронизации кортикальной активности между функционально связанными отделами центральной нервной системы, является сенсорный вход. Состояние глубокой анестезии или глубокого сна также характеризуется наличием организованной нейронной активности – медленными осцилляциями (МО). Однако находящаяся в этих состояниях центральная нервная система считается сенсорно депривированной. МО обладают высоким уровнем синхронизации между различными участками коры головного мозга, однако о механизмах, координирующих МО во время сна или анестезии, известно мало. Используя способы электрофизиологической регистрации активности неокортекса в модели *in vivo*, мы показали, что в состоянии глубокой анестезии МО в различных отделах неокортекса синхронизируются благодаря актам дыхания. Несмотря на разную частоту МО и дыхания, мы обнаружили фазовую привязку эпизодов кортикальной активности к дыханию. Наибольшая вероятность периодов кортикальной активности наблюдается во время фазы выдоха анестезированного животного, в то время как акт вдоха сопровождается снижением кортикальной активности. Полученные результаты показали, что дыхание играет роль водителя ритма кортикальной активности в то время, когда неокортекс ограничен в получении внешнего синхронизирующего стимула.

**Ключевые слова:** кортикальная активность, медленные осцилляции, внеклеточная регистрация, внутриклеточная регистрация, *in vivo*, крыса

**DOI:** 10.31857/S0869813922120123

Медленные осцилляции (МО) – сетевая нейронная активность в центральной нервной системе, характеризующаяся медленноволновыми колебаниями полевого потенциала. МО состоят из периодов нейронной активности – “периодов молчания и активности” (ПМА). Эпизоды активности (“Up” состояние) и ее отсутствия (“Down” состояние) чередуются с частотой около 1 Гц. Считается, что основным механизмом, лежащим в основе МО, является рекуррентное взаимодействие между нейронами коры головного мозга [1]. Но подкорковые структуры, в частности кортико-таламо-кортикальные нейронные взаимодействия, также могут вовле-

каться в генерацию МО. МО являются характерным признаком фазы глубокого сна, однако могут также наблюдаться в состояниях анестезии или травмы центральной нервной системы [1–5]. Предполагается, что в таких ситуациях неокортекс находится в состоянии относительной сенсорной депривации и занят обработкой информации и сигналов, генерируемых внутри самого мозга [3]. Было предположено, что функциональной ролью МО является создание условий для синхронизации активности нейрональных ансамблей, находящихся в различных участках неокортекса [6]. Однако для синхронизации нейронной активности в пространственно разделенных структурах неокортекса необходим общий механизм, обеспечивающий синхронизацию нейронной активности. Одним из возможных механизмов может являться наличие единого, общего источника активности, имеющего высокий уровень горизонтальных связей [7, 8]. В этом случае активность из этого участка латерально распространяется в соседние участки неокортекса, прогрессивно вовлекая весь неокортекс. Таким образом, должна наблюдаться нарастающая задержка в появлении организованной нейронной активности по мере удаления от источника. Другим потенциальным механизмом может быть сочетание единого глобального водителя ритма, синхронизирующего активность в локальных нейронных группах [9–11]. Однако наличие нейронных проекций, соединяющих “дирижера” с разными участками неокортекса, является необходимым условием для синхронизации неокортикальных нейронных ансамблей. На роль такого механизма, который может синхронизировать пространственно разделенные нейронные сети, было предложено дыхание. Корреляция кортикальной и субкортикальной активности с дыханием была продемонстрирована неоднократно [12–14]. В экспериментах на неанестезированных животных во время различных поведенческих состояний было обнаружено, что дыхание модулирует гиппокампальную активность и кортикальные переходы между периодами активности (ПА) и молчания (ПМ) в префронтальном неокортексе [13]. Похожие результаты были продемонстрированы в соматосенсорной коре бодрствующей мыши, где авторы показали, что дельта-волновая активность бочонковой части соматосенсорного неокортекса обладает фазовой привязкой к дыханию. Колебания полевого потенциала в гамма-диапазоне также были подвержены модуляции со стороны дыхательного ритма [14]. Однако мало что известно о том, оказывает ли дыхание модулирующее воздействие на кортикальную активность в соматосенсорной коре в то время, когда соматосенсорная система находится в состоянии сенсорной депривации. В настоящей работе была предпринята попытка ответить на этот вопрос, используя электрофизиологические регистрации в соматосенсорном неокортексе крысы, находящейся в состоянии глубокой анестезии. Полученные результаты показали, что кортикальная медленноволновая активность, характеризующая состояние фазы глубокого сна, является объектом модуляции со стороны дыхания. Наши результаты показали, что вероятность возникновения периода активности нейронов бочонковой коры возрастает во время акта выдоха, в то время как наибольшая вероятность периода молчания наблюдается во время вдоха животного. Обнаруженные результаты предполагают, что фазовая модуляция кортикальной активности дыханием является универсальным механизмом, наблюдаемым не только в префронтальной коре и субкортикальных структурах, как это было показано ранее, но и в соматосенсорной коре.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Этика работы с животными*

Все экспериментальные протоколы с использованием животных создавались в соответствии с требованиями Казанского федерального университета по использо-

ванию лабораторных животных (разрешение этического комитета по заботе и помощи животным Казанского федерального университета, N9-2013). Эксперименты проводились в соответствии с Директивой Совета Евросоюза от 24 ноября 1986 г. (86/609/ЕЕС).

#### *Хирургия*

Эксперименты проводились на крысах линии Wistar обоих полов в возрасте с P19 по P29 день (P0 день рождения животного). Хирургическое вмешательство на животном производилось в условиях анестезии с использованием газообразного анестезирующего вещества – изофлурана (Baxter, США) (5% для индукции и 1.5% во время хирургии). В ходе хирургии удалялась кожа над дорзальной поверхностью черепа. На очищенную и подсушенную поверхность кости наносился зубной цемент быстрой и холодной фиксации за исключением участка  $5 \times 5 \text{ мм}^2$  над ожидаемым расположением неокортикального представления соматосенсорной системы. Над этим участком закреплялась суперфузионная камера (патентная заявка № 2020140611 от 09.12.2020), дном которой являлась поверхность черепа. Далее животному внутривенно инъецировался анестетик – уретан (1.5 г/кг, Sigma-Aldrich, США) для последующей анестезии. Перед началом эксперимента животное фиксировалось в экспериментальной установке, где над областью с соматосенсорной корой в костях черепа вырезалось отверстие диаметром в 3.5–4 мм. Мозговые оболочки аккуратно убирались так, чтобы сосуды, питающие неокортекс, оставались неповрежденными. После этого поверхность неокортекса поджималась перфорированной пластиной, чтобы убрать пульсации, связанные с дыханием и сердцебиением животного. Перфорации в прижимающей пластине были необходимы для последующей имплантации электродов. Для снижения уровня стресса и создания комфортных условий животное было обернуто ватой. Поддержание температуры осуществлялось с помощью термоковрика, расположенного под животным и поддерживающим постоянную температуру подогрева 35–37°C.

#### *Регистрация внеклеточной активности*

Регистрация кортикальной активности в соматосенсорной системе проводилась с помощью 16-ти канального электрода на кремниевой основе (шаг между регистрирующими площадками 100 мкм, производство Neuronexus Technologies, США). Вертикальное расположение электродов позволяло проводить одновременную регистрацию кортикальной активности от разных слоев одной кортикальной колонки. Для оценки синхронности кортикальной активности в ряде экспериментов в неокортекс животного имплантировалось 2 многоканальных электрода (один из которых находился в соматосенсорной коре, а второй на расстоянии в 1.5–2 мм). В качестве референтного электрода использовалась хлорсеребряная проволока, расположенная в растворе, омывающем поверхность неокортекса. В ходе эксперимента проводилась регистрация колебаний локального полевого потенциала (ЛПП). Сигнал, зарегистрированный электродом, был усилен и отфильтрован ( $\times 10000$ ; 0.15 Гц до 10 кГц) с помощью усилителя Digital Lynx SX (Neuralynx, США), запись производилась с частотой дискретизации 40 кГц.

#### *Регистрация внутриклеточной активности*

Для проведения внутриклеточной регистрации нейронной активности использовалась методика фиксации тока. Стеклообразные электроды из боросиликатного стекла (Sutter instrument, США) вытягивались на вертикальной кузнице (Narishige, Япония). Для регистрации использовались пипетки с сопротивлением 4–9 МОм.

Пипеточный раствор для регистрации в режиме фиксации тока содержал (мМ): 150 глюконата калия, 2  $MgCl_2$ , 1  $CaCl_2$ , 1 EGTA, 20 HEPES, pH 7.31 и имел осмолярность 295 мОсм/л. Средняя глубина регистрации составляла 200–800 мкм.

#### *Регистрация дыхания*

Дыхание регистрировалось с помощью пьезоэлектрического элемента, расположенного под грудной клеткой животного. Зарегистрированный сигнал был усилен и отфильтрован ( $\times 10000$ ; 0.15 Гц до 10 кГц) с помощью усилителя Digital Lynx SX (Neuralynx, США), запись производилась с частотой дискретизации 40 кГц. Дополнительно была сделана серия экспериментов, где параллельно с регистрацией пьезодатчиком проводилась видеорегистрация (18 кадров/с) движений грудной клетки. Эти данные использовались для последующей оценки соответствия вдоха и выдоха.

#### *Анализ данных*

Анализ данных проводился с помощью функций, написанных в среде Matlab. Анализ выполнялся в несколько этапов. Первоначально детектировались внеклеточно зарегистрированные потенциалы действия – множественная нейронная активность (МНА). Все события, чья амплитуда превышала 5 стандартных отклонений, считались как МНА. После детекции МНА частота дискретизации исходного сигнала снижалась до 1000 Гц для уменьшения размера файлов с зарегистрированными данными.

#### *Определение фаз дыхания*

По данным с пьезодатчика детектировались начало и конец фаз вдоха и выдоха. Так как вдох и выдох характеризуются различными длительностями, для изучения модуляции активности мы прибегли к нормализации сигнала. Основываясь на амплитудных параметрах, цикл дыхания, состоящий из вдоха и выдоха, разбивался на 72 равные части. Таким образом, как вдох, так и выдох состояли из одинакового количества частей, несмотря на их различную продолжительность.

#### *Детекция периодов активности и молчания*

В контрольных условиях для детекции физиологического паттерна ПМА использовался модифицированный метод, описанный ранее [15]. Так как ПМА характеризуется частотой около 1 Гц, для исключения избыточных низко- и высокочастотных колебаний проводилась вейвлет-фильтрация сигнала в диапазоне 0.1–20 Гц. Для последующего определения порога строилась гистограмма распределения отфильтрованного сигнала, которая описывалась бимодальными характеристиками. Алгоритм максимизации ожидания был использован для подбора этого распределения смесью двух распределений Гаусса со средними значениями  $\mu$  и  $\sigma$ . Периоды времени, когда отфильтрованный потенциал был выше  $\mu - (1-3)\sigma$ , считались кортикальными состояниями ПА, а ниже  $\mu + (1-3)\sigma$  – кортикальными состояниями ПМ. При этом порог в  $1\sigma$  использовался в случае, если во время ПА наблюдались высокоамплитудные осцилляции, а  $3\sigma$  в остальных случаях. Далее проводилась коррекция границ ПМ и ПА по задетектированным временным меткам МНА. Окончательно за ПМ считались эпизоды ниже порога, и во время которых отсутствовала МНА. За ПА считались эпизоды выше порога и сопровождающиеся МНА.

**Таблица 1.** Отношение площадей периодов активности, молчания и множественной нейронной активности во время вдоха и выдоха

	Медиана	25%	75%
ПМ	0.94	0.91	0.96
ПА	1.10	1.04	1.16
МНА	1.11	1.08	1.21

#### *Статистическая обработка*

Достоверность изменений считалась с помощью парного *t*-теста Стьюдента с уровнем значимости  $p < 0.05$ . Для описания групповых результатов использовались диаграммы размаха (boxplot) с центральной отметкой, указывающей на медиану, и нижним и верхним краями прямоугольника, указывающими на 25-й и 75-й процентиля соответственно. Степень дисперсии обозначалась исходящими из прямоугольника пунктирными линиями, которые простирались до самых крайних точек данных, не считающихся выбросами, и выбросы строились индивидуально с использованием символа “+”.

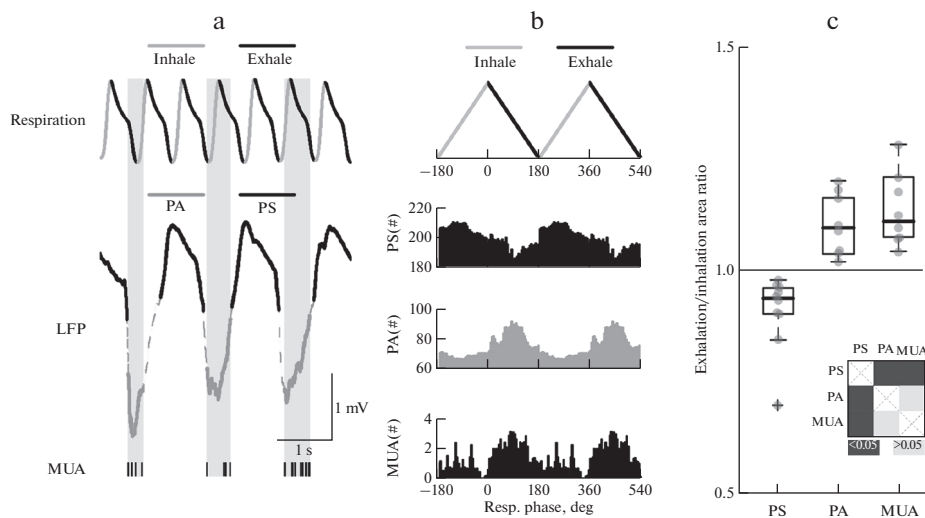
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Кортикальная активность модулируется дыханием во время медленноволнового сна*

В настоящее время зависимость кортикальной активности от дыхания уже неоднократно была продемонстрирована у бодрствующих животных, однако до сих пор мало известно о модуляторной роли дыхания в кортикальную активность в то время, когда неокортекс находится в состоянии сенсорной депривации. Чтобы ответить на этот вопрос, мы провели серию экспериментов с одновременной регистрацией дыхательных движений и кортикальной активности в соматосенсорной коре анестезированной крысы. В ходе регистрации мы наблюдали медленноволновые колебания локального полевого потенциала, имеющие низкую частоту – медленные осцилляции (рис. 1а). МО являются характерным маркером глубокого сна и состоят из периодов молчания и периодов нейронной активности. Во время пика ПА также наблюдались всплески МНА. Чтобы избежать влияния различной длительности фаз на модуляцию кортикальной активности, была проведена нормализация. При этом сигнал с пьезодатчика разбивался на 72 равных по амплитуде интервала, что соответствовало 180 градусам на вдох и столько же на выдох (см. Методы исследования). Анализ привязки активности к фазам дыхания показал, что наибольшая вероятность ПМ наблюдается на вдохе, при этом ПА более привязаны к выдоху. Дополнительно оценивалась привязка МНА, которая также преобладала во время выдоха (рис. 1б). Групповая статистика показала, что соотношение площади ПМ во время выдоха и вдоха меньше 1 (медиана 0.94) для всех животных ( $n = 10$  животных,  $p < 0.01$ , рис. 1с, табл. 4), то есть ПМ чаще наблюдались во время выдоха. Подобный анализ для ПА показал, что такое соотношение больше 1 (медиана 1.1), таким образом, периоды активности чаще наблюдались во время выдоха. Подобные результаты также показала оценка соотношения МНА во время вдоха и выдоха (медиана составила 1.11). Таким образом, МО модулируются дыханием, при этом ПА коррелируют с фазой выдоха.

### *Пьезосигнал позволяет отследить дыхательные движения животного*

Чтобы оценить используемый нами способ регистрации фаз дыхания с помощью пьезодатчика, мы провели параллельную пьезо- и видеорегистрацию дыха-

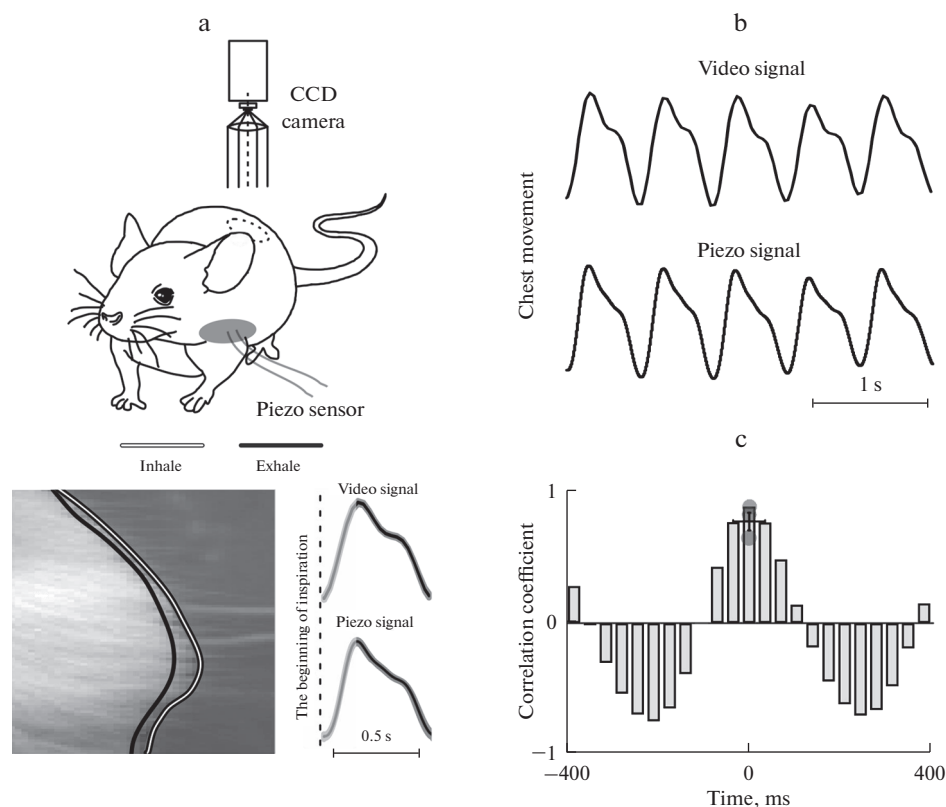


**Рис. 1.** Модуляция медленных осцилляций, зарегистрированных во время глубокой анестезии, дыханием. (а) – пример одновременной регистрации дыхания (верхний график), колебаний локального полевого потенциала (LFP, средний график) с мультинейронной активностью (MUA, нижний график) в неокортексе крысы *in vivo*. Цветовой код периода вдоха – серый, выдоха – черный. Отдетектированные периоды активности показаны вертикальными прямоугольниками. (б) – гистограммы распределения периодов молчания (PS, второй сверху график), периодов активности (PA, третий сверху график) и множественной нейронной активности (MUA, нижний график) по отношению к нормализованным циклам дыхания (цветовой код периода вдоха – серый, выдоха – черный). (с) – результаты групповой статистики по привязке периодов молчания (PS), периодов активности (PA) и множественной нейронной активности (MUA) к фазам дыхания (вдох, выдох). Значения ниже 1 соответствуют доминирующей представленности во время вдоха, значения выше 1 соответствуют доминирующей представленности во время выдоха. Средняя линия диаграммы размаха отражает медиану, верхние и нижние контуры соответствуют нижнему и верхнему квартилю, а усы характеризуют минимальное и максимальное значение выборки. Серые круги соответствуют результатам отдельных экспериментов ( $n = 10$ ). Результаты статистических тестов представлены в виде карты достоверностей, где значения  $p$  показано цветом.

тельных движений животного (рис. 2а). Полученные результаты показали, что изменение объема грудной клетки во время актов дыхания имело высокую степень схожести с изменениями, наблюдаемыми на пьезосигнале. Расширение грудной клетки (вдох) сопровождалось положительным отклонением пьезосигнала. Сужение грудной клетки во время выдоха отражалось возвращением пьезосигнала к базовой линии (рис. 2а, б). Результаты кросскорреляционного анализа показали высокий коэффициент корреляции с видеоданными и отсутствие временного сдвига между пьезо- и видеосигналом (коэффициент корреляции составлял 0.83 (25% – 0.69 и 75% – 0.85),  $n = 3$  животных) (рис. 2с). Таким образом, пьезодатчик может использоваться как простой метод мониторинга дыхания животного.

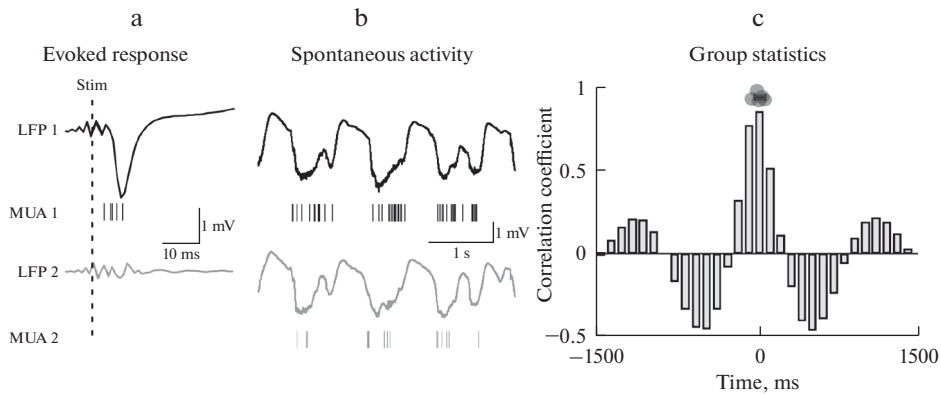
*Синхронность медленных осцилляций в разных участках неокортекса*

Чтобы оценить синхронность кортикальной активности в разных участках неокортекса, мы провели одновременную регистрацию электрофизиологической активности с использованием 2 внеклеточных электродов. Один из электродов рас-



**Рис. 2.** Мониторинг дыхания с помощью пьезосигнала. (а) — экспериментальная схема параллельной видеорегистрации движений грудной клетки и пьезосигнала показана сверху. Пример видеоизображения границы грудной клетки на выдохе (черная линия) и вдохе (белая линия с окантовкой) показаны ниже слева. Усредненный дыхательный цикл, отдетектированный по видео- и пьезосигналам показан ниже справа. Цветовой код периода вдоха — серый и выдоха — черный. (б) — примеры результатов анализа изменений объема грудной клетки, зарегистрированного с помощью видео- (верхний график) и пьезорегистрации. (с) — результат анализа корреляции пьезо- и видеосигналов для одного эксперимента. Кругами показаны результаты отдельных экспериментов ( $n = 3$  животных).

полагался в соматосенсорном неокортексе, а второй находился на расстоянии 1–1.5 мм в рострально-медиальном направлении. Нахождение электрода “1” в бочонковом отделе соматосенсорного неокортекса подтверждалось наличием вызванного ответа на стимуляцию вибриссы (рис. 3а). Отсутствие вызванного ответа на записях электрода “2” подтверждало то, что он находился за пределами бочонкового отдела соматосенсорного неокортекса. Несмотря на то, что электроды находились в функционально не связанных отделах неокортекса, на обеих регистрациях наблюдались медленноволновые колебания (рис. 3б). Наряду с этим, спонтанные МО на двух электродах характеризовались высокой степенью схожести и отсутствием временных задержек, что подтверждается результатами корреляционного анализа. Медианное значение по групповой статистике коэффициентов корреляции составляет 0.93 (25% — 0.93 и 75% — 0.95) ( $n = 5$  животных, рис. 3с). Таким образом, МО синхронны в различных отделах неокортекса.

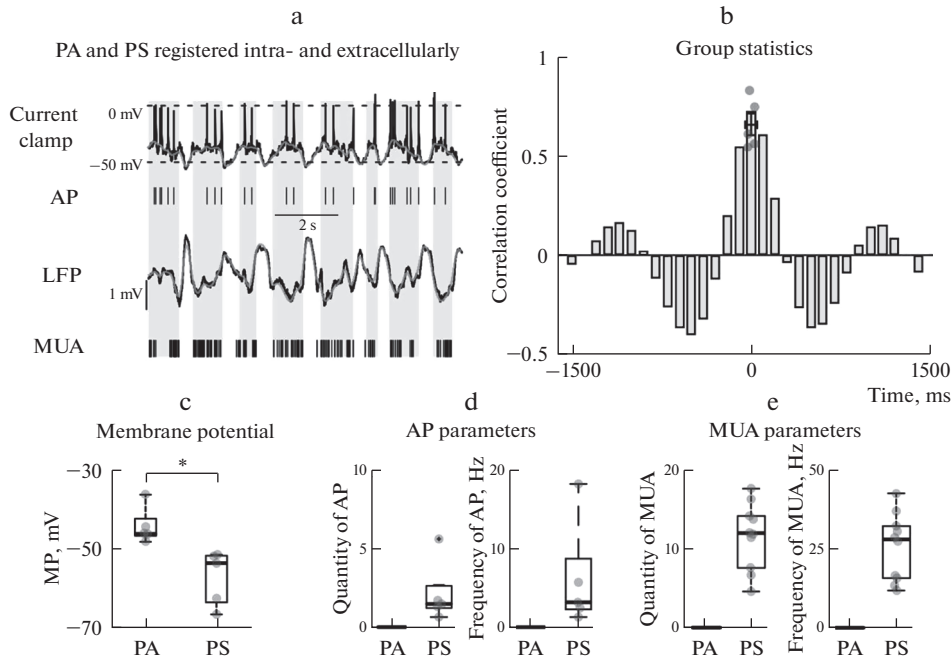


**Рис. 3.** Внеклеточная регистрация организованной нейронной активности в различных отделах неокортекса. (a) – кортикальный ответ на стимуляцию чувствительных вибрисс, зарегистрированный двумя внеклеточными электродами, находящимися на расстоянии 1–1.5 мм друг от друга. Наличие вызванного ответа на электроде “1” (LFP1) подтверждает его расположение в бочонковом отделе соматосенсорного неокортекса. (b) – спонтанные медленноволновые осцилляции, зарегистрированные двумя электродами, находящимися на расстоянии 1–1.5 мм друг от друга. (c) – гистограмма, отражающая результат корреляционного анализа медленноволновых осцилляций, зарегистрированных в 2 различных отделах неокортекса для одного эксперимента. Кругами показаны пиковые значения коэффициентов корреляции внеклеточной активности для разных экспериментов ( $n = 5$  экспериментов).

#### *Организованная активность одиночных нейронов во время медленноволновых осцилляций*

В предыдущем разделе мы продемонстрировали модуляцию МО дыханием и охарактеризовали колебания локального полевого потенциала в разных участках неокортекса. Однако флуктуации локального полевого потенциала являются результатом интегральной активности множества клеток. Чтобы оценить активность отдельных нейронов во время медленноволновых событий, мы провели серию регистраций активности отдельных нейронов с использованием техники фиксации потенциала в конфигурации “целой клетки” совместно с внеклеточной регистрацией (рис. 4a). Мы наблюдали, что колебания мембранного потенциала отдельных нейронов и полевого потенциала характеризуются синхронной медленноволновой активностью. Направления колебаний МО были противоположными, что связано с разным типом регистрации (внутри- и внеклеточной). Результаты корреляционного анализа подтвердили наше наблюдение (медианный коэффициент корреляции колебаний мембранного потенциала и полевого потенциала составил 0.61 (25% – 0.55 и 75% – 0.77,  $n = 5$  животных, рис. 4b). Во время ПА мембранный потенциал нейрона деполяризовывался до  $-45.80$  мВ, а во время ПМ наблюдалась его реполяризация до  $-53.25$  мВ ( $n = 5$  клеток,  $n = 5$  животных, рис. 4c, табл. 5). Во время ПА деполяризованное состояние регистрируемых нейронов сопровождалось спайкованием клетки (1.44 ПД на каждый ПА,  $n = 5$  клеток,  $n = 5$  животных, рис. 4d), в то время как во время ПМ и реполяризации клетки спайки отсутствовали. Отсутствие разрядов нейронов во время ПМ также характеризовало множественную нейронную активность, когда в период активности уровень внеклеточно зарегистрированных потенциалов действия достигал 11.9 потенциалов действия/ПА, наблюдаемых с частотой в 28 Гц ( $n = 10$  животных, рис. 4e, табл. 5). Таким образом, активность отдельных нейронов повторяет общее поведение неокортекса во время МО.





**Рис. 4.** Корреляция внеклеточной и внутриклеточной нейронной активности во время медленноволновых осцилляций. (а) – пример одновременной внеклеточной и внутриклеточной (в режиме фиксации тока) регистрации нейронной активности. Верхний график соответствует внутриклеточной регистрации, ниже, вертикальные черточки – отдетектированные потенциалы действия (AP на рисунке), график ниже – колебания локального полевого потенциала (LFP) и нижние вертикальные черточки – внеклеточно зарегистрированные потенциалы действия (множественная нейронная активность, MUA). (б) – гистограмма, отражающая результат корреляционного анализа внутриклеточной и внеклеточной регистраций. Кругами показаны пиковые значения коэффициентов корреляции внутриклеточной и внеклеточной регистраций для разных экспериментов ( $n = 5$  экспериментов). (с, d, e) – результаты групповой статистики мембранного потенциала, количества и частоты потенциалов действия (AP) и множественной нейронной активности (MUA) во время периодов молчания (PS) и активности (PA) соответственно. Средняя линия отражает медиану, верхние и нижние контуры “коробки” соответствуют нижнему и верхнему квартилю, а усы характеризуют минимальное и максимальное значение выборки. Серые круги соответствуют результатам отдельных экспериментов.

**Таблица 2.** Поведение отдельных и множества нейронов во время медленноволновой активности

	Медиана		25%		75%	
	ПА	ПМ	ПА	ПМ	ПА	ПМ
Мембранный потенциал, мВ	-45.80	-53.25	-46.34	-63.08	-41.95	-51.3
Количество ПД	1.44	0	1.14	0	2.6	0
Частота ПД, Гц	3.16	0	2.15	0	8.82	0
Количество МНА	11.90	0	7.54	0	14.03	0
Частота МНА, Гц	28.00	0	15.80	0	32.30	0

**Таблица 3.** Частотные и временные характеристики дыхания и медленноволновых осцилляций

Параметр	Медиана	25%	75%
Частота дыхания, Гц	1.60	1.52	1.69
Частота ПМА, Гц	0.63	0.56	0.74
Длительность вдоха, мс	144.99	133.73	151.72
Длительность выдоха, мс	374.41	355.59	404.01
Отношение длительностей выдох/вдох	2.56	2.43	2.73
Длительность ПА, мс	504.39	440.35	544.20
Длительность ПМ, мс	454.25	360.67	568.60
Отношение длительностей ПМ/ПА	0.96	0.58	1.26

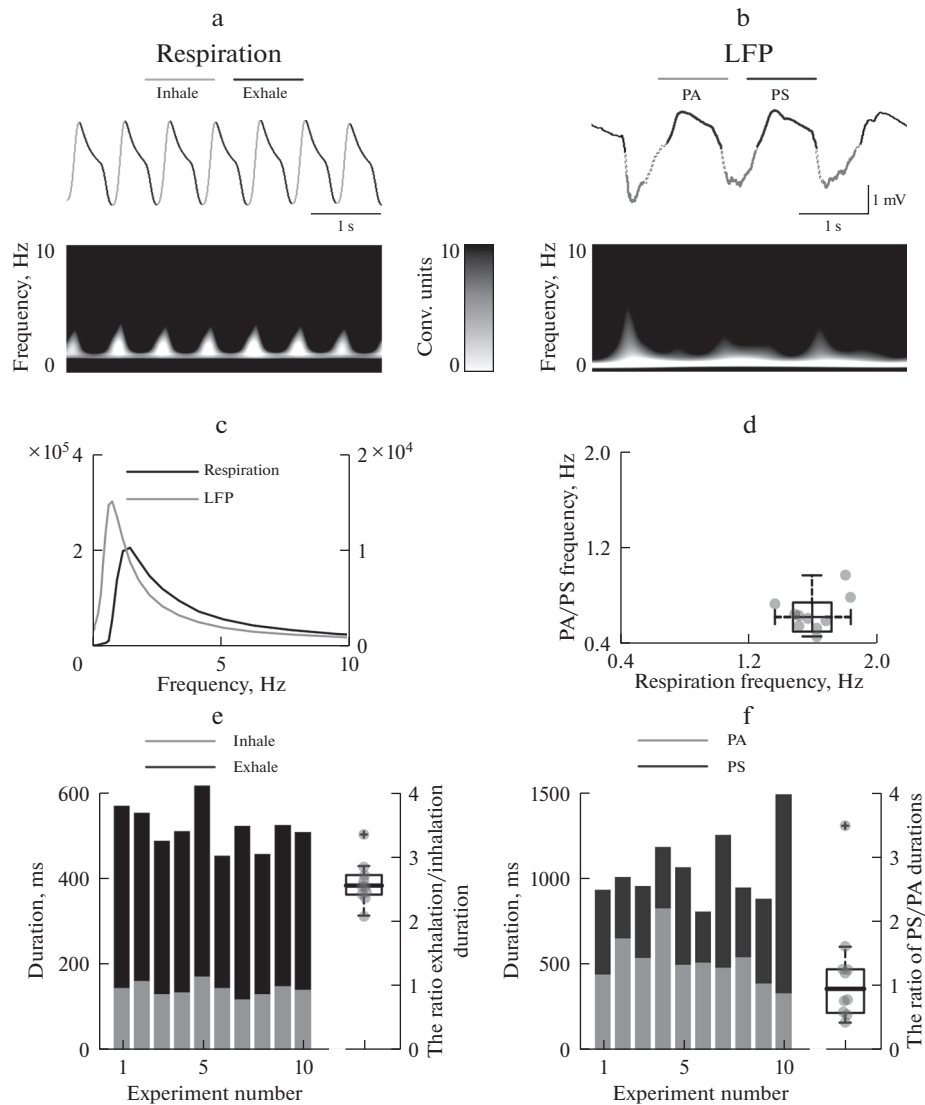
*Частотные и временные характеристики дыхания и медленноволновых осцилляций*

Частота МО крайне вариабельна и зависит от ряда факторов, одним из которых является глубина анестезии [16]. В ряде случаев частота МО может совпадать или мало отличаться от частоты дыхания, что может привести к ошибочной интерпретации результатов. Если дыхание и МО находятся в одном частотном диапазоне, то анализ причинно-следственных связей позволяет ответить на вопрос о том, насколько они зависят друг от друга. Для того, чтобы оценить необходимость проведения анализа причинно-следственных связей мы проанализировали частотные и временные характеристики дыхания и медленноволновой активности. Несмотря на то, что дыхание модулирует кортикальную активность, мы наблюдали достоверное различие в частотных характеристиках дыхательных движений и кортикальной активности (рис. 5a–d). Медианная частота дыхания составляла 1.60 Гц, медианная частота ПМА 0.63 Гц ( $p < 0.01$ ,  $n = 10$  животных, рис. 5d, табл. 6). Значительное различие в частоте дыхания и МО позволяет исключить возможность их случайного фазового совпадения. Мы также провели оценку временных параметров дыхания (рис. 5e). Медианная длительность вдоха 144.99 мс, длительность выдоха 374.41 мс ( $n = 10$  животных, рис. 5e, табл. 6). Длительность выдоха в 2–3 раза превышает длительность вдоха, отношение длительностей выдох/вдох составляет 2.56. Оценка параметров МО показала, что медиана длительностей ПМ и ПА достоверно не отличается,  $p > 0.05$  (рис. 5f). При этом медианная длительность ПМ составляла 454.25 мс, а длительность ПА была 504.39 мс ( $n = 10$  животных, рис. 5f, табл. 6). Отношение длительностей ПМ/ПА составляет 0.96.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используя электрофизиологические подходы в модели *in vivo*, мы показали, что кортикальная активность модулируется дыханием, это подтверждается результатами других исследовательских групп. Однако в нашей работе мы продемонстрировали, что кортикальная активность модулируется дыханием во время глубокой анестезии животного, то есть в тот период, когда неокортекс находится в сенсорно депривированном состоянии. На этом основании, мы предполагаем, что модуляция кортикальной активности происходит без вовлечения сенсорной компоненты соматосенсорной системы. Мы также идентифицировали и описывали характеристики медленноволновой активности, а именно ПА и ПМ и их привязку к актам дыхания. Наши результаты показывают, что наибольшая вероятность “периода активности” наблюдается во время акта выдоха животного.

Наша работа не является первой, где демонстрируется модуляторная роль дыхания в кортикальной активности. Однако большинство опубликованных результа-



**Рис. 5.** Частотные и временные характеристики дыхания и медленноволновых осцилляций. (a) – пример регистрации дыхательных движений (верхний график) с соответствующим ему непрерывным временно-частотным анализом (нижняя картинка). Цветом закодированы фазы вдоха и выдоха (светло- и темно-серый цвета соответственно). (b) – пример регистрации МО (верхний график) с соответствующим ему непрерывным временно-частотным анализом (нижняя картинка). Цветом закодированы фазы вдоха и выдоха (светло- и темно-серый цвета соответственно). (c) – результаты частотного анализа на основе преобразования Фурье для эксперимента, показанного на a, b. (d) – результаты групповой статистики частот дыхания и МО, где средняя линия отражает медиану, верхние и нижние, правые и левые контуры “коробки” соответствуют нижнему и верхнему квартилю, а усы характеризуют минимальное и максимальное значение выборки. Серые круги соответствуют результатам отдельных экспериментов. Необходимо отметить, что частота дыхания выше, чем частота МО во всех экспериментах. (e) – временные параметры цикла дыхания для каждого эксперимента, где длительности вдоха и выдоха закодированы цветом. Результаты групповой статистики продемонстрированы справа от результатов индивидуальных экспериментов. (f) – временные параметры цикла периодов активности и молчания для каждого эксперимента, где длительности периодов активности и молчания закодированы цветом. Результаты групповой статистики продемонстрированы справа от результатов индивидуальных экспериментов.

тов были получены у бодрствующих животных. В состоянии бодрствования кортикальная активность принципиально отличается от активности у спящего или анестезированного животного. Бодрствующий мозг находится в постоянной активности. Флуктуации интегральной нейронной активности образуют высокоструктурированные паттерны — осцилляции в различных частотных диапазонах [17, 18], которые влияют как на вызванную активность, так и на сенсорное восприятие [19–22]. Эти ритмы активности могут модулироваться, в частности дыханием. Так, регистрируя локальный полевой потенциал в бочонковой коре бодрствующей мыши, Ito и соавт. [14] показали, что осцилляторная кортикальная активность в дельта-диапазоне (0.5–4 Гц) коррелирует с частотой дыхания (1–3 Гц). Авторы обнаружили, что колебания ЛПП в гамма-частотном диапазоне также модулированы фазами дыхания. Так как регистрации проводились в соматосенсорном неокортексе, а гамма-активность связана с сенсорным входом [23, 24], можно предположить, что модуляция кортикальной активности дыханием связана со стимуляцией периферических сенсорных входов током воздуха, проходящего через дыхательные пути. Основанием для этого является то, что ольфакторные чувствительные нейроны у млекопитающих также являются механочувствительными [25], то есть изменение давления в носовых проходах во время дыхания может приводить к их активации. Однако авторы показали, что механизм модуляции кортикальной активности связан именно с активностью в ольфакторной системе. Хирургическое иссечение обонятельных луковиц приводило к исчезновению медленноволновой активности в соматосенсорной коре. Кроме этого, прямая электрическая стимуляция обонятельных луковиц сопровождалась высококоррелированными колебаниями полевого потенциала. Авторы продемонстрировали, что синхронизация медленноволновой активности дыхательными движениями не вовлекает активацию периферических сенсорных входов, что также подтверждает наши результаты и выводы. Одним из механизмов регуляции кортикальной активности может быть вовлечение субкортикальных структур. Необходимым условием для этого является наличие обширной сети проекций в неокортекс. Потенциальным кандидатом на роль “дирижера” кортикальных МО может выступать таламус. Наличие анатомического субстрата для синхронизации медленноволновой активности таламусом во время сна ранее уже было продемонстрировано [1]. Необходимо уточнить, что таламус в этом случае не выступает генератором активности, а обеспечивает синхронизацию нейронной активности, возникшей в разных участках неокортекса. Наличие кортикальных нейронных ансамблей, способных к генерации сетевой активности, ранее уже было продемонстрировано [3, 26]. Но механизм синхронизации кортикальной активности таламусом может быть не единственным механизмом. Продемонстрированная модуляция кортикальной активности в ответ на электрическую стимуляцию обонятельных луковиц [14] может являться результатом горизонтального проведения через нейронные связи неокортекса. Эта гипотеза подтверждается результатами морфологических исследований с использованием ретроградных клеточных маркеров [14, 27]. Инъецированный в бочонковую кору ретроградно распространяющийся маркерный краситель был обнаружен в нейронах не только таламических релейных ядер (вентрозаднемедиальное и вентрозаднелатеральное), но и в контралатеральном бочонковом, вторичном соматосенсорном, энторинальном и двигательном неокортексе. Таким образом, модуляция одной из этих структур дыханием может быть достаточным условием для общей синхронизации как вышеперечисленных структур, так и соматосенсорного неокортекса. Это предположение подтверждается результатами регистрации активности в разных структурах у спящего животного [13]. Используя внеклеточную регистрацию кортикальной активности в сочетании с фармакологическими манипуляциями, авторы показали дыхательную модуляцию сетевой нейронной активности в гиппокампе, таламусе,

амигдале и зрительной коре у бодрствующего животного. Но в этой работе также продемонстрировано, что ПА и ПМ, наблюдаемые у спящего животного в префронтальном неокортексе, модулируются со стороны дыхания. Однако в отличие от работы Ito с соавт. [14] фармакологическая десенситизация обонятельной системы не привела к исчезновению модуляторного влияния дыхания на кортикальную активность. Авторы объяснили это наличием восходящих и расходящихся нейронных проекций из дыхательного центра, точнее из его вентральной респираторной группы (пре-Бётцингеровского комплекса), которые модулируют кортикальную активность. Наши данные впервые показывают, что сетевая активность соматосенсорного кортекса координируется дыханием в состоянии сенсорной депривации центральной нервной системы. Представленные данные свидетельствуют о том, что дыхание обеспечивает постоянный поток ритмических сигналов в мозг, вне зависимости от состояния центральной нервной системы. Возможно, что такая координация является необходимым условием для функциональной интеграции локальных нейронных ансамблей в общекортикальную активность в отсутствие сенсорных входов. Для проверки этой гипотезы потребуются дальнейшие исследования по тщательному изучению временных параметров нейронной активности разных структур центральной нервной системы и дыхательного ритма. Описанные нами свойства МО и их зависимость от дыхательных ритмов могут объяснять роль дыхания в духовной и реабилитационной практике и при эмоциональных нарушениях [28–30].

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00225.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (М.Г.М.), сбор данных (В.В.Ш., В.Р.С., В.М.С.), обработка данных (В.В.Ш., В.Р.С.), написание и редактирование манускрипта (М.Г.М., В.В.Ш., В.Р.С.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262(5134): 679–685. <https://doi.org/10.1126/science.8235588>
2. Riedner BA, Vyazovskiy V, Huber R, Massimini M, Esser S, Murphy M, Tononi G (2007) Sleep homeostasis and cortical synchronization: III. A high-density EEG study of sleep slow waves in humans. *Sleep* 30: 1643–1657. <https://doi.org/10.1093/sleep/30.12.1643>
3. Steriade M, Timofeev I, Grenier F (2001) Natural waking and sleep states: A view from inside neocortical neurons. *J Neurophysiol* 85: 969–1985. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.5.1969>
4. Chauvette S, Crochet S, Volgushev M, Timofeev I (2011) Properties of slow oscillation during slow-wave sleep and anesthesia in cats. *J Neurosci* 31: 14998–15008. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2339-11.2011>
5. Andersen P, Andersson SA, Lomo T (1968) Thalamo-cortical relations during spontaneous barbiturate spindles. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 24(1): 90.
6. Sirota A, Buzsáki G (2005) Interaction between neocortical and hippocampal networks via slow oscillations. *Thalamus Relat Syst* 3: 245–259. <https://doi.org/10.1017/S1472928807000258>

7. *Sanchez-Vives MV, McCormick DA* (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* 3: 1027–1034.  
<https://doi.org/10.1038/79848>
8. *Cossart R, Aronov D, Yuste R* (2003) Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* 423: 283–288.  
<https://doi.org/10.1038/NATURE01614>
9. *Kumar A, Rotter S, Aertsen A* (2010) Spiking activity propagation in neuronal networks: Reconciling different perspectives on neural coding. *Nat Rev Neurosci* 11: 615–627.
10. *Fischer I, Vicente R, Buldú JM, Peil M, Mirasso CR, Torrent MC, García-Ojalvo J* (2006) Zero-lag long-range synchronization via dynamical relaying. *Phys Rev Lett* 97(12): 123902.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.123902>
11. *Buzsáki G, Lógothetis N, Singer W* (2013) Scaling brain size, keeping timing: Evolutionary preservation of brain rhythms. *Neuron* 80: 751–764.
12. *Biskamp J, Bartos M, Sauer JF* (2017) Organization of prefrontal network activity by respiration-related oscillations. *Sci Rep* 7: 45508.  
<https://doi.org/10.1038/srep45508>
13. *Karalis N, Sirota A* (2022) Breathing coordinates cortico-hippocampal dynamics in mice during offline states. *Nat Commun* 13(1): 467.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-28090-5>
14. *Ito J, Roy S, Liu Y, Cao Y, Fletcher M, Lu L, Boughter JD, Grün S, Heck DH* (2014) Whisker barrel cortex delta oscillations and gamma power in the awake mouse are linked to respiration. *Nat Commun* 5: 3572.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms4572>
15. *Saleem AB, Chadderton P, Aergis-Schoute J, Harris KD, Schultz SR* (2010) Methods for predicting cortical UP and DOWN states from the phase of deep layer local field potentials. 29(1–2): 49–62.  
<https://doi.org/10.1007/s10827-010-0228-5>
16. *Torao-Angosto M, Manasanch A, Mattia M, Sanchez-Vives M* (2021) Up and Down States During Slow Oscillations in Slow-Wave Sleep and Different Levels of Anesthesia. *Front Syst Neurosci* 15: 5.  
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2021.609645>
17. *Arieli A, Sterkin A, Grinvald A, Aertsen A* (1996) Dynamics of ongoing activity: Explanation of the large variability in evoked cortical responses. *Science* 273: 1868–1871.  
<https://doi.org/10.1126/science.273.5283.1868>
18. *Poulet JFA, Petersen CCH* (2008) Internal brain state regulates membrane potential synchrony in barrel cortex of behaving mice. *Nature* 454: 881–885.  
<https://doi.org/10.1038/nature07150>
19. *Linkenkaer-Hansen K, Nikulin VV, Palva JM, Kaila K, Ilmoniemi RJ* (2004) Stimulus-induced change in long-range temporal correlations and scaling behaviour of sensorimotor oscillations. *Eur J Neurosci* 19: 203–218.  
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03116.x>
20. *Boly M, Baeteau E, Schnakers C, Degueldre C, Moonen G, Luxen A, Phillips C, Peigneux P, Maquet P, Laureys S* (2007) Baseline brain activity fluctuations predict somatosensory perception in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12187–12192.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0611404104>
21. *Sadaghiani S, Hesselmann G, Kleinschmidt A* (2009) Distributed and antagonistic contributions of ongoing activity fluctuations to auditory stimulus detection. *J Neurosci* 29: 13410–13417.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2592-09.2009>
22. *Palva JM, Zhigalov A, Hirvonen J, Korhonen O, Linkenkaer-Hansen K, Palva S* (2013) Neuronal long-range temporal correlations and avalanche dynamics are correlated with behavioral scaling laws. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 3585–3590.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1216855110>
23. *Gray CM, König P, Engel AK, Singer W* (1989) Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit intercolumnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature* 338: 334–337.  
<https://doi.org/10.1038/338334a0>
24. *Lachaux JP, George N, Tallon-Baudry C, Martinerie J, Hugueville L, Minotti L, Kahane P, Renault B* (2005) The many faces of the gamma band response to complex visual stimuli. *Neuroimage* 25: 491–501.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.11.052>
25. *Grosmaître X, Santarelli LC, Tan J, Luo M, Ma M* (2007) Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nat Neurosci* 10: 348–354.  
<https://doi.org/10.1038/nn1856>
26. *Luczak A, Barthó P, Marguet SL, Buzsáki G, Harris KD* (2007) Sequential structure of neocortical spontaneous activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 347–352.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0605643104>

27. Brown CE, Dyck RH (2005) Retrograde tracing of the subset of afferent connections in mouse barrel cortex provided by zincergic neurons. *J Compar Neurol* 486: 48–60.  
<https://doi.org/10.1002/cne.20522>
28. Brown RP, Gerbarg PL (2005) Sudarshan Kriya Yogic breathing in the treatment of stress, anxiety, and depression: Part II - Clinical applications and guidelines. *J Alternat Complement Med* 11: 711–717.
29. Kunik ME, Roundy K, Veazey C, Soucek J, Richardson P, Wray NP, Stanley MA (2005) Surprisingly high prevalence of anxiety and depression in chronic breathing disorders. *Chest* 127:1205–1211.  
<https://doi.org/10.1378/chest.127.4.1205>
30. Gold AR (2011) Functional somatic syndromes, anxiety disorders and the upper airway: A matter of paradigms. *Sleep Med Rev* 15: 389–401.

### Cortical Network Activity Modulation by Breath in the Anesthetized Juvenile Rats

V. V. Shumkova<sup>a</sup>, V. R. Sitdikova<sup>a</sup>, V. M. Silaeva<sup>a</sup>,  
D. S. Suchkov<sup>a, b</sup>, and M. G. Minlebaev<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup>Kazan Federal University, Kazan, Russia

<sup>b</sup>Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Aix-Marseille University, Marseille, France

\*e-mail: minlebaevm@mail.ru

Organized neuronal activity underlies brain functioning. Both information processing and transmission between cortical structures occur due to synchronized neuronal activity. In the awake state, one of the mechanisms contributing to integration and synchronization of cortical activity between functionally linked parts of the central nervous system is sensory input. The state of deep anesthesia or deep sleep is also characterized by the presence of organized neural activity – slow oscillations (SO). However, under these states, the central nervous system is considered to be sensory deprived. While SOs have a high level of synchronization between different cortical areas, little is known about the mechanisms that coordinate MOs during sleep or anesthesia. Using methods of electrophysiological recording of neocortex activity in a *in vivo* model, we show that during deep anesthesia, SOs in different parts of the neocortex are synchronized by breathing. Despite the different frequencies of SOs and breathing, we found a phase-lock of episodes of cortical activity to breathing. The highest probability of periods of cortical activity is observed during the exhalation phase of the anesthetized animal, while the inhalation is accompanied by a decrease in cortical activity. Our results, show that breath plays the role of a driver of the rhythm of cortical activity at a time when the neocortex is restricted in receive of an external synchronizing stimulus.

**Keywords:** cortical activity, slow wave oscillations, extracellular recordings, intracellular recordings, *in vivo*, rat