

Информативные параметры ультразвуковой вокализации кроликов при высоко- и низкочастотной транскраниальной электростимуляции

Н.Н. Каркищенко¹, Ю.В. Фокин¹, А.А. Николаев^{2,3}, Ю.А. Чудина^{2,3},
Д.Б. Чайванов^{2,3}, А.Е. Емельянова²

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

³ – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

Контактная информация: к.б.н. Фокин Юрий Владимирович, fokin-yuri@yandex.ru;
к.ф.-м.н. Чайванов Дмитрий Борисович, chaivanov@yandex.ru

В данной работе на основе сравнительного анализа результатов ранее проведенного и настоящего экспериментального исследования была показана возможность использования феномена ультразвуковой вокализации для дифференциации разных функциональных состояний животного, на примере кролика. Ультразвуковой сигнал, зафиксированный в состоянии активации, вызванном электростимуляцией с частотой 70 Гц, характеризовался типичной двухпиковой формой, где пики появлялись в частотных диапазонах, схожих с диапазонами ультразвукового сигнала в состоянии покоя. Активирующая электростимуляция способствовала повышению спектральной плотности мощности по каждому пику ультразвуковой вокализации кролика по сравнению с состоянием покоя и электросна.

Ключевые слова: ультразвуковая вокализация, активация, электрическая стимуляция, спектральная плотность мощности, частота, кролики.

Введение

Многочисленные экспериментальные исследования подтверждают способность млекопитающих (летучие мыши, дельфины, крысы, мыши, хомяки, морские свинки, кролики, мини-свиньи и обезьяны) генерировать сигналы в ультразвуковом диапазоне частот. В основном, феномен ультразвуковой вокализации (УЗВ) животных изучается в обычных условиях жизнедеятельности и социального взаимодействия [7, 11, 12] с целью выявления его поведенческих особенностей и мозговых механизмов [8, 9, 10].

В связи с тем, что способность к генерации ультразвуковых сигналов

в равной степени обнаруживается и у лабораторных животных [3], представляется перспективным рассматривать феномен УЗВ как инструмент диагностики текущего состояния и динамической смены одного функционального состояния другим. В этом контексте изучение параметрических (частотные и спектральные характеристики) и непараметрических (типичная форма зафиксированного сигнала, наличие экстремумов) особенностей ультразвукового сигнала лабораторных животных, используемых в качестве животных-моделей состояний человека [6], является необходимым этапом в

процессе выявления физиологических маркеров функциональных состояний. С этой целью были проведены исследования особенностей УЗВ кроликов и мини-свиней, функциональное состояние которых инициировали с помощью низкочастотной ритмической электрической стимуляции подкорковых структур [4, 5].

Эти экспериментальные работы показали, что в инициированном состоянии электросна исследуемые лабораторные животные способны генерировать ультразвуковой сигнал, форма которого сходна с формой УЗВ в обычном состоянии покоя. Сравнительный анализ УЗВ кроликов и мини-свиней позволил выявить сходства и различия ультразвукового сигнала этих животных. Оказалось, что паттерны УЗВ этих животных обладают принципиальным сходством, проявляющимся в наличии двух максимумов, возникающих в близких по значениям частотных диапазонах, при этом значение спектральной плотности мощности первого максимума почти в два раза превышает таковое второго максимума [5].

Эти исследования выявили способность лабораторных животных генерировать УЗВ как в состоянии покоя, так и в состоянии электросна, инициированного электрическим воздействием. Исследования особенностей УЗВ лабораторных животных в состояниях, инициированных с помощью электростимуляции, продолжены в настоящей экспериментальной работе, **целью** которой явилось изучение особенностей УЗВ кроликов, подвергавшихся воздействию электростимуляции с частотой 70 Гц, вызывающему состояние общей активации [1]. В

связи с этим далее указанное состояние будет обозначено как состояние электроактивации.

Материалы и методы

Животные

Экспериментальное исследование проводили на базе ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Осуществление записи данных производилось на самках кроликов породы советская шиншилла в возрасте 6-10 мес. Всего обследовали 8 особей, из которых для анализа отобрали 5 животных. Исследованные животные содержались в индивидуальных клетках при температуре воздуха 18-22°C и относительной влажности 60-70%. В качестве пищи для кроликов использовали комбикорм ПК-90 и водопроводную очищенную воду *ad libitum*.

Регистрация УЗВ

Запись ультразвуковых сигналов осуществляли с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack («Metris B.V.», Нидерланды), установленных на расстоянии 20-25 см от головы животного. Частота дискретизации записываемого в цифровом формате сигнала составляла 200 кГц. Регистрация УЗВ животного, подвергавшегося воздействию электростимуляции, производилась в течение 30 мин.

Процедура электростимуляции

Транскраниальная электростимуляция (электроактивация) осуществлялась с помощью электрического тока прямоугольной формы частотой 70 Гц (сила тока 2 мА), поступающего в мозг через глазные и затылочные электроды [2]. Данная стимуляция способствовала активации поведенческих механизмов животного: они старались снять глазные электроды и выпрыгнуть из клетки.

Транскраниальная электроактивация мозга проводилась с помощью бытового прибора «Электросон – ЭГСАФ-01» (ООО «МикроМед», Воронеж, Россия). В течение всего воздействия электростимуляции (30 мин) осуществлялась запись УЗВ.

Статистическая обработка

Первоначальная обработка полученных записей ультразвукового сигнала состояла в удалении артефактов, представленных монотонными шумами. Затем с помощью пакета программ SKILAB-5.4 методом Уэлча (функция *pwelch*) был проведен спектральный анализ ультразвука путем быстрого преобразования Фурье (эпоха анализа составляла 10 мс, размерность преобразования – 2000 интервалов) в полосе частот 15-100 кГц. В результате спектрального анализа получили зна-

чения спектральной плотности мощности (СПМ) для всего выбранного диапазона частот, нормированного к СПМ фона окружающей среды. Итогом стал вектор динамики ультразвука, в котором находили максимум, приравнивая его к 100%, остальные значения изменяли пропорционально максимуму, затем находили медианы по каждой частоте.

Результаты и их обсуждение

Данные по всем выбранным животным были усреднены и представлены в виде графика зависимости СПМ от частоты ультразвука, отражающего УЗВ группы кроликов под воздействием электроактивации (рис.).

Во время действия электростимуляции УЗВ кролика характеризуется ограниченным диапазоном частот

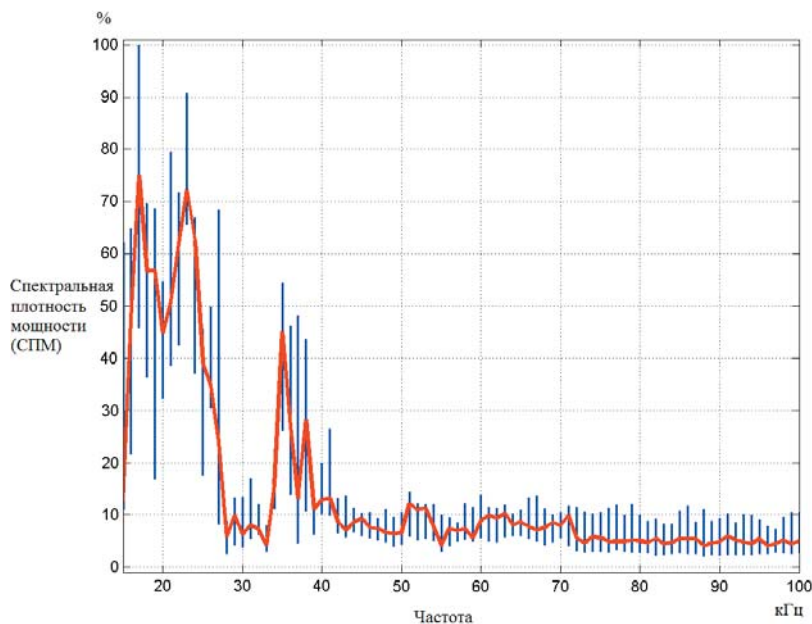


Рис. УЗВ кроликов под воздействием электростимуляции с частотой 70 Гц: красный контур – медианы частот, синие вертикальные линии – 95% доверительный интервал. По оси абсцисс отложена частота (кГц), по оси ординат – спектральная плотность мощности УЗВ (%).

~17-40 кГц. Электрическое воздействие не меняет типичную двухпиковую форму ультразвукового сигнала кролика, зафиксированную у данного животного в состоянии покоя. Первый пик возникает в диапазоне частот от 17 до 27 кГц, второй пик – в диапазоне 33-38 кГц.

При этом максимальное значение СПМ первого пика обнаруживается на частоте 17 кГц, а максимальное значение СПМ второго пика – на частоте 36 кГц.

Как было показано в предыдущей работе [5], в состоянии покоя УЗВ кролика характеризуется диапазоном 20-40 кГц и двухпиковой формой, где первый и второй пик обнаруживаются, соответственно, на частоте 20-25 и 33-38 кГц. Эти данные являются схожими с результатами, полученными в настоящем исследовании. Выявляется сходство в общем диапазоне частот ультразвукового сигнала и пересечение в диапазонах появления экстремумов или пиков (табл.). Максимальные значения второго пика совпадают для состояния покоя и под воздействием электроактивации, а для первого пика наблюдается небольшой сдвиг на 4 кГц: 21 кГц – для состояния покоя и 17 кГц – под

воздействием электроактивации. Следовательно, частотные характеристики УЗВ кролика в покое и под воздействием электроактивации в целом являются схожими.

Различия же между УЗВ кролика без стимуляции и под воздействием активационной стимуляции относятся к СПМ выделенных пиков. Нормализация СПМ в обоих экспериментах допускает сравнительный анализ, который показал, что под действием электроактивации происходит увеличение СПМ для обоих пиков. В состоянии покоя СПМ первого пика составляла 56%, а второго – 21%, под действием электростимуляции значения СПМ для первого и второго пиков, соответственно, составили 75 и 46%. Таким образом, СПМ первого пика под воздействием активирующей стимуляции увеличилась в 1,3 раза (на 19%), а второго – в 2,2 раза (на 25%).

Сравнение УЗВ кролика при действии электростимуляции с разной частотой позволило выявить сходства и различия. Сходными являются двухпиковая форма, близкие по значению частоты возникновения первых пиков и одинаковые частоты возникновения вторых пиков (табл.). Различное влияние на

Таблица

Основные параметрические характеристики УЗВ кролика в разных состояниях

Функциональное состояние	Общий диапазон частот УЗВ кролика, кГц	Диапазон частот пика, кГц		Частота максимального значения пика, кГц		СПМ пика, %		Отношение СПМ 2-го пика к 1-му пику
		1-й пик	2-й пик	1-й пик	2-й пик	1-й пик	2-й пик	
Покой	20-40	20-25	33-38	21	36	56	21	0,38
Электросон	20-40	24-29	32-39	26	36	56	16	0,29
Электроактивация	20-40	17-27	33-38	17	36	75	46	0,61

характеристики УЗВ кролика 6-ти-Гц-вой электростимуляции (электросна) и 70-ти-Гц-вой электростимуляции (электроактивации) обнаруживается в виде разных значений СПМ обоих пиков: при электроактивации мощность сигналов усиливается.

Сравнение УЗВ кролика в трех разных состояниях – в состоянии покоя, в состоянии электросна [5] и в состоянии электроактивации – показало стабильность частотных характеристик УЗВ-сигнала и закономерное изменение значений СПМ (табл.). По сравнению с состоянием покоя СПМ в состоянии электросна для первого пика не меняется, а для второго – уменьшается; в состоянии электроактивации СПМ и первого, и второго пика увеличивается. Такое увеличение СПМ на всем пиковом диапазоне УЗВ кролика является следствием воздействия 70-ти-Гц-вой электростимуляции, вызывающей состояние общей активации.

Для более наглядного представления различий между СПМ УЗВ кролика в разных состояниях вычислили отношения значений СПМ второго пика к СПМ первого пика и получили три значения для каждого состояния. Оказалось, что для состояния покоя соотношение составляет 0,38, для состояния электросна – 0,29, а для состояния электроактивации – 0,61 (табл.). Сравнение показывает, что минимальное значение соответствует состоянию электросна, максимальное – состоянию электроактивации, а для состояния покоя характерно промежуточное значение. Таким образом, значения соотношения показывают суммарные изменения СПМ-паттерна УЗВ в разных состояниях и

могут быть рассмотрены как количественная мера оценки уровня активации животного.

Выводы

Сравнительный анализ результатов исследования УЗВ кролика в состоянии спокойного бодрствования и в состояниях, вызванных воздействием электростимуляции, позволил сделать следующие выводы:

1. Экспериментально подтверждена способность кролика генерировать УЗВ как в состоянии покоя, так и при действии электростимуляции с разной частотой воздействия.

2. Выявлено, что УЗВ кролика в разных состояниях имеет общий паттерн ультразвукового сигнала, представленный двухпиковой формой со сходной частотой возникновения пиков.

3. Разные состояния (покоя, иницированное состояние электросна и иницированное состояние электроактивации) отличаются соотношением СПМ двух пиков паттерна УЗВ, которое может быть рассмотрено как количественная мера уровня активации животного.

4. На основе результатов проведенных экспериментальных исследований УЗВ кролика динамика параметров ультразвукового сигнала может быть использована для дифференциации разных состояний животного, как обычных, так и иницированных с помощью воздействия электростимуляции.

5. Информативные параметры УЗВ кроликов в различных функциональных состояниях позволяют проводить экстраполяцию результатов на других животных-моделей, используемых в биомедицинских исследованиях.

Список литературы

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения: Пер. с англ. Е.Н. Живовищевой / Под ред. Батуева А.С. – М.: Высшая школа. – 1991. – 399 с.
2. Гиляровский В.А., Ливенцев Н.М., Сегаль Ю.Е., Кириллова З.А. Электросон. – М.: Медгиз. – 1958. – 172 с.
3. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Сахаров Д.С., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Чайванов Д.Б. Ультразвуковая вокализация и ее информативные параметры у животных и человека // Биомедицина. – 2011. – № 1. – С. 4-23.
4. Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А., Николаев А.А. Влияние транскраниальной низкочастотной электростимуляции головного мозга на спектральные характеристики ультразвуковой вокализации мини-свиней светлогорской популяции // Биомедицина. – 2015. – № 3. – С. 20-26.
5. Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Чудина Ю.А., Емельянова А.Е., Николаев А.А., Чайванов Д.Б. Исследование влияния низкочастотной ритмической электростимуляции подкорковых структур головного мозга кролика на его способность к ультразвуковой вокализации // Биомедицина. – 2016. – № 1. – С. 18-24.
6. Чайванов Д.Б., Станкова Н.В. Анализ ограничений моделирования на животных физических методов модуляции и диагностики функционального состояния нервной системы человека с целью выбора животного-модели // Биомедицина. – 2013. – № 4. – С. 164-168.
7. Brudzynski S.M., Neville H. Fletcher Rat ultrasonic vocalization: short-range communication // In: Stefan M. Brudzynski (Ed.) Handbook of Mammalian Vocalization. – 2010. – No. 3. – Pp. 69-76.
8. Carruthers I.M., Natan R.G., Geffen M.N. Encoding of ultrasonic vocalizations in the auditory cortex // J. Neurophysiol. – 2013. – No. 109. – Pp. 1912-1927.
9. Ciucci M.R., Ahrens A.M., Ma S.T., Kane J.R., Windham E.B., Woodlee M.T., Schallert T. Reduction of dopamine synaptic activity: Degradation of 50-kHz ultrasonic vocalization in rats // Behav. Neurosci. – 2009. – No. 123(2). – Pp. 328-336.

10. Hage S.R., Gavrilov N., Salomon F., Stein A.M. Temporal vocal features suggest different call-pattern generating mechanisms in mice and bats // BMC Neuroscience. – 2013. – No. 14. – P. 99.
11. Ramsier M.A., Cunningham A.J., Moritz G.L., Finneran J.J., Williams C.V., Ong P.S., Gursky-Doyen S.L., Dominy N.J. February primate communication in the pure ultrasound // Biology Letters. – 2012. – No. 8 [Epub ahead of print].
12. Schuh D., Hoy S.T., Selzer D. Vocalization of rabbit pups in the mother-young relationship // Proceedings of the 8th World Rabbit Congress. – Puebla, Mexico. – 2004. – Pp. 1266-1270.

References

1. Buresh Ja., Bureshova O., H'juston Dz.h.P. Metodiki i osnovnye jeksperimenty po izucheniju mozga i povedenija [Techniques and basic experiments on studying of a brain and behavior]: Per. s angl. E.N. Zhivopiscevoj [The translation from English of E.N. Zhivopistseva]. Pod red. Batueva A.S. [Edited by Batuev A.S.]. Moscow: Vysshaja shkola. 1991. 399 p. (In Russian).
2. Giljarovskij V.A., Livencev N.M., Segal' Ju.E., Kirillova Z.A. Jeletroson [Electrosleep]. Moscow: Medgiz. 1958. 172 p. (In Russian).
3. Karkischenko N.N., Fokin Yu.V., Sakharov D.S., Karkischenko V.N., Kapanadze G.D., Chayvanov D.B. Ul'trazvukovaja vokalizacija i ee informativnye parametry u zhivotnyh i che-loveka [Ultrasonic vocalization and its informative parameters in animals and humans]. Bio-medicine. 2011. No. 1. P. 4-23. (In Russian).
4. Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Chayvanov D.B., Chudina Yu.A., Nikolaev A.A. Vli-janie transkranal'noj nizkochastotnoj jelektro-stimuljacji golovnogogo mozga na spektral'nye harakteristiki ul'trazvukovoj vokalizacii mini-svinej svetlogorskoj populjacji [Influence of transcranial low-frequency electrical stimulation of a brain on the spectral characteristics of ultrasonic vocalization of mini-pigs of the Svet-logorsk population]. Biomedicine. 2015. No. 3. Pp. 20-26. (In Russian).
5. Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Chudina Yu.A., Emelyanova A.E., Nikolaev A.A., Chayvanov D.B. Issledovanie vlijanija nizko-chastotnoj ritmicheskoj jelektrostimuljacji pod-korkovyh struktur golovnogogo mozga krolika na ego sposobnost' k ul'trazvukovoj vokalizacii [Investigation of the influence of low-frequency

- rhythmic electrostimulation of subcortical structures of the rabbit brain on his ability to ultrasonic vocalization]. *Biomedicine*. 2016. No. 1. Pp. 18-24. (In Russian).
6. *Chayvanov D.B., Stankova N.V.* Analiz ogranichenij modelirovanija na zhivotnyh fizicheskikh metodov moduljacji i diagnostiki funkcional'nogo sostojanija nervnoj sistemy cheloveka s cel'ju vybora zhivotnogo-modeli [The analysis of restrictions of model operation for animals of physical methods of modulation and diagnostics of the functional state of nervous system of the person for the purpose of the choice of an animal model]. *Biomedicine*. 2013. No. 4. Pp. 164-168. (In Russian).
 7. *Brudzynski S.M., Neville H.* Fletcher Rat ultrasonic vocalization: short-range communication In: Stefan M. Brudzynski (Ed.) *Handbook of Mammalian Vocalization*. 2010. No. 3. Pp. 69-76.
 8. *Carruthers I.M., Natan R.G., Geffen M.N.* Encoding of ultrasonic vocalizations in the auditory cortex. *J. Neurophysiol.* 2013. No. 109. Pp. 1912-1927.
 9. *Ciucci M.R., Ahrens A.M., Ma S.T., Kane J.R., Windham E.B., Woodlee M.T., Schallert T.* Reduction of dopamine synaptic activity: Degradation of 50-kHz ultrasonic vocalization in rats. *Behav. Neurosci.* 2009. No. 123(2). Pp. 328-336.
 10. *Hage S.R., Gavrilov N., Salomon F., Stein A.M.* Temporal vocal features suggest different call-pattern generating mechanisms in mice and bats. *BMC Neuroscience*. 2013. No. 14. P. 99.
 11. *Ramsier M.A., Cunningham A.J., Moritz G.L., Finneran J.J., Williams C.V., Ong P.S., Gursky-Doyen S.L., Dominy N.J.* February primate communication in the pure ultrasound. *Biology Letters*. 2012. No. 8 [Epub ahead of print].
 12. *Schuh D., Hoy S.T., Selzer D.* Vocalization of rabbit pups in the mother-young relationship. *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress*. Puebla, Mexico. 2004. Pp. 1266-1270.

Informative parameters of ultrasonic vocalization of rabbits with high- and low-frequency transcranial electrostimulation

N.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, A.A. Nikolaev, Yu.A. Chudina,
D.B. Chayvanov, A.E. Emelyanova

On the comparative analysis of the present and earlier obtained research results it have been demonstrated possibility of using the ultrasonic vocalization for differentiation animal functional states (by the example of rabbits) in this article. Recorded in activating state, generated electrostimulation with frequency 70 Hz, the ultrasonic signal was characterized by typical two-peak shape, where pikes appeared in the same frequency range that ultrasonic signal in the rest state. The activating electrostimulation made increasing of power spectral density of ultrasonic signal for each pike as compared with rest state and electrosleep state.

Key words: ultrasonic vocalization, activation, electrical stimulation, power spectral density, frequency, rabbits.