

ОЦЕНКА ПОСТСПАЙКОВЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ВОЗБУДИМОСТИ НЕЙРОНА ПУТЕМ СРАВНЕНИЯ ОБЫЧНОЙ И СМЕЩЕННОЙ ВО ВРЕМЕНИ АВТОКОРРЕЛЯЦИОННЫХ ФУНКЦИЙ

© 2017 г. Н.Г. Бибиков, С.В. Низамов

ОАО «Акустический институт имени академика Н.Н. Андреева», 117036, Москва, ул. Шверника, 4

E-mail: nbibikov1@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.04.17 г.

После доработки 21.06.17 г.

Исследованы ответы нейронов дорсального (кохлеарного) ядра продолговатого мозга и слухового центра среднего мозга (полукружный торус) травяной лягушки (*Rana temporaria*) при действии тонального сигнала, модулированного повторяющимися отрезками низкочастотного шума. Получены автокорреляционные функции всей активности, вызванной этим сигналом, а также смещенные (перетасованные) автокорреляционные функции. Последние вычислялись путем корреляции ответа на каждый отрезок модулирующего сигнала с ответами на все другие отрезки, исключая исходный. После требуемой нормировки эта функция отличается от обычной автокорреляции только отсутствием постспайковых изменений возбудимости. Зависимость отношения этих двух функций от задержки непосредственно демонстрирует временной ход постспайкового изменения возбудимости исследуемой клетки. Большинство нейронов второго порядка, расположенных в дорсальном ядре продолговатого мозга, характеризовалось только короткими периодами абсолютной и относительной рефрактерности. Встречались, однако, и клетки, отличающиеся выраженной фасилитацией, наблюдавшейся непосредственно после рефрактерного периода. В полукружном торусе отмечались нейроны со сложным течением постспайковых изменений возбудимости. У этих клеток на фоне сравнительно длительного снижения возбудимости наблюдались интервалы, в которых возбудимость была существенно выше нормы. Данные свидетельствуют о том, что в слуховых нейронах ствола мозга действительно существует выраженное влияние факта генерации спайка на последующую активность. Эти эффекты могут играть важную роль в формировании временного паттерна ответа нейрона на звуковые стимулы.

Ключевые слова: слуховой путь, рефрактерность, смещенная во времени автокорреляция, временное кодирование, бесхвостые амфибии.

Вполне естественно предполагать, что основная функция нейронов стволовых отделов прямого слухового пути состоит в выделении и подчеркивании временных особенностей звукового сигнала в определенных частотных диапазонах. Механизмы, определяющие возможность выделения первичных, сравнительно простых признаков звука нейронами стволовых отделов слухового пути, к настоящему времени остаются недостаточно изученными. Для понимания этих механизмов необходимо создание адекватной модели генерации нейроном выходного разряда. При этом следует отметить, что

в каждый фиксированный момент времени вероятность спайкового ответа нейрона определяется двумя факторами: параметрами воздействующего на нейрон синаптического входа и внутренним состоянием самого нейронного элемента. Уже давно нами ставилась задача разделения этих двух факторов, прежде всего с целью создания адекватной модели исследуемого нейрона [1,2]. Наши предыдущие работы показали, что внутренние свойства нервной клетки и прежде всего изменения возбудимости, вызываемые самим фактом генерации спайка, могут существенным образом повлиять на характер реакции. Например, у многих клеток слуховой системы лягушки постспайковое снижение возбудимости вызывает эффект кратковременной адаптации [1,3,4]. Модельные эксперименты показали, что если такое снижение суммируется для последовательных спайков, подобный механизм может объяснить кратковре-

Сокращения: АКФ – автокорреляционная функция точечного процесса импульсной активности нейрона, САКФ – смещенная (перетасованная) автокорреляционная функция реакции нейрона на последовательность идентичных отрезков модуляции, СВАКФ – смещенная во времени автокорреляционная функция.

менную адаптацию ответа волокон слухового нерва млекопитающих [3].

Однако сама оценка динамики постспайковых изменений в одиночном нейроне является весьма сложной задачей. Ее обычно не удается выполнить даже при внутриклеточной регистрации, поскольку последняя не отражает характер потенциалов непосредственно в самой точке генерации спайка и далеко не всегда способна выявить динамические изменения порога генерации спайкового разряда. Быть может, поэтому в большинстве моделей слухового препроцессинга постспайковым эффектам не придается особого значения. Обычно дело ограничивается воспроизведением довольно короткой, не накапливающейся рефрактерности или использованием простой модели «интегрирование–разряд», в которой не учитываются процессы, связанные с запоминанием предшествующих разрядов, а восстановление возбудимости воспроизводится простой монотонной функцией. Такой упрощенный подход может являться одной из причин того, что модели, основанные на линейном или квазилинейном приближении и использующие данные, полученные методом обратной триггерной корреляции [5], плохо воспроизводят ответ нейронов при действии новых сигналов [6].

Между тем существует множество данных, свидетельствующих о том, что процессы постспайкового изменения возбудимости играют важную роль в реакции нейронов на звуковые сигналы, способствуя избирательности ответа к определенным временным признакам. Особую роль они играют в эффектах адаптации, во многом обуславливающих эффективность работы слухового анализатора в громадном динамическом диапазоне [3,4,7,8].

На протяжении ряда лет нами прилагались усилия для количественной оценки динамики постспайкового изменения возбудимости слуховых нейронов исходя из анализа их импульсации при отсутствии внешних воздействий. В условиях спонтанной импульсации и в предположении об отсутствии структурированного синаптического входа на исследуемый нейрон полезную информацию может дать функция риска или функция автокорреляции регистрируемого процесса [9,10]. Однако у нейронов без фоновой активности, реагирующих только на структурированные внешние стимулы, задача оценки динамики постспайковых изменений возбудимости оказывается более сложной.

В данной работе мы подошли к решению указанной проблемы, используя методику сопоставления двух корреляционных функций, характеризующих активность одиночного слухо-

вого нейрона при действии длительных тональных сигналов, модулированных по амплитуде повторяющимися отрезками низкочастотного шума. Одной из них являлась автокорреляционная функция (АКФ) всей последовательности спайков, вызванных длительным сигналом. Вторая функция была получена с использованием методического приема, впервые предложенного для анализа ответов на широкополосные шумовые сигналы, состоящие из последовательности полностью идентичных отрезков [11]. Эта функция вычисляется следующим образом. После запоминания всей последовательности спайков осуществляется построение корреляционных функций между участками импульсной активности, возникающими в ответ на все различные повторяющиеся отрезки сигнала. При этом дающие в своей сумме АКФ автокорреляционные функции импульсации, вызванной каждым из отрезков, игнорируются. Поскольку при этом число суммируемых функций для N отрезков равняется не N , а $N \times (N - 1)$, получаемая функция корреляции оказывается гораздо представительнее исходной АКФ. При этом ее значение в районе нулевой задержки соответствует числу совпадений спайков в реакции на один из отрезков сигнала со спайками, расположенными точно в том же временном окне, но уже в реакции на все другие отрезки. Таким образом, устанавливается количественный критерий степени синхронности реакции нейрона на идентичные участки сигнала. Однако особенно важно то, что поскольку интервалы между реакциями на разные отрезки превышают сотни миллисекунд, функция представляется полностью свободной от влияния рефрактерности. Хотя в данном случае фактически регистрируются функции взаимной корреляции между разными отрезками модуляции, указанная функция в англоязычной литературе не вполне корректно получила название «shuffled autocorrelation», т.е. перетасованной или смещенной автокорреляционной функции (САКФ). Для удобства мы будем использовать это обозначение, не смешивая его, например, с суммированной автокорреляцией «summary autocorrelation function», которая также иногда используется в литературе.

Если путем нормировки привести АКФ и САКФ к одинаковой размерности, то отношение этих функций в последовательные моменты времени прямо продемонстрирует динамику постспайковых изменений возбудимости клетки. Именно эта задача и была поставлена в данной работе. Прежде всего, мы пытались оценить эффективность указанной методики и продемонстрировать значительное разнообра-

зие постспайковых изменений возбудимости нейронов слухового пути. Полная классификация исследованных клеток по данному критерию, так же как и подробное сопоставление особенностей постспайковых изменений возбудимости в разных ядрах слухового пути будут являться предметом дальнейшей работы. Некоторые предварительные результаты, полученные на нейронах продолговатого мозга, были опубликованы ранее [12].

МЕТОДИКА

Методика проведения экспериментов будет изложена кратко, поскольку многократно описывалась ранее [13–15]. Опыты проводили с самцами травяной лягушки (*Rana t. temporaria*) массой 25–40 г в осенне-зимний период. Животных подвергали холодовой [16,17] или легкой эфирной анестезии, при которой проводили операцию по удалению лоскута кожи и участка кости. Края раны обрабатывали местным анестетиком лидокаином. Соблюдали этические принципы проведения экспериментов с холоднокровными лабораторными животными [18]. Во время регистрации животное находилось под воздействием обездвиживающего препарата (аллоферина) в специальном станке дорсальной стороной вверх и обеспечивалось кожным дыханием.

Для внеклеточной регистрации импульсной активности одиночных нейронов использовали стеклянные жидкостные электроды, заполненные раствором NaCl концентрацией 2–3 М с сопротивлением 3–15 МОм. Микроэлектродный усилитель с высоким входным импедансом имел систему компенсации емкости и возможность контроля состояния электрода. Дальнейшее усиление осуществлялось стандартными усилителями мощности в полосе 0,3–10 кГц. Вхождение электрода в слуховые ядра обычно легко отмечалось по появлению мультиклеточной активности на поисковый сигнал (отрезки широкополосного шума). Регистрацию осуществляли в двух ядрах прямого слухового пути амфибий – в дорсальном ядре продолговатого мозга и в основном ядре полукружного турса. Акустические сигналы поступали на барабанную перепонку животного от динамического телефона через замкнутый звукопровод и контролировались калиброванным конденсаторным микрофоном с насадкой. При исследовании дорсального ядра (гомолог вентрального кохлеарного ядра млекопитающих) стимулы предъявлялись на ипсилатеральную барабанную перепонку, при регистрации в полукружном турсе (гомо-

лог задних холмов млекопитающих) стимуляция была контралатеральной.

После вхождения в слуховые зоны вертикальное смещение электрода осуществляли дистанционно с шагом 4 мкм. Регистрацию начинали при обнаружении спайков стандартной формы, генерируемых одиночным нейроном и превосходящих амплитуду мультиклеточного шума в 5–20 раз. После обнаружения одиночного нейрона путем предъявления пробных тональных отрезков длительностью 100–200 мс определяли частоту тона, вызывающего ответ при наименьшем уровне сигнала (характеристическую частоту) и порог его реакции на этой частоте.

При проведении основного исследования животному предъявляли длительный тон характеристической частоты, модулированный по амплитуде повторяющимися отрезками низкочастотного шума. Модуляция осуществлялась на синусоидальном генераторе Г-110, имеющем специальный вход для осуществления амплитудной модуляции. Модулирующий сигнал поступал с выхода шумового генератора Г5-57, генерирующего повторяющиеся отрезки фиксированной формы. Общая длительность сигнала с фиксированными параметрами обычно составляла 100 или 200 с, длительность каждого из повторяющихся отрезков могла составлять от четверти секунды до величины, превышающей две секунды.

Использовали три разных значения верхней частоты среза модулирующего шума: 15, 50 и 150 Гц, причем для каждой полосы можно было использовать три реализации, различающиеся формой и длительностью повторяющегося отрезка. При фиксированном значении длительности и одинаковой полосе шума все реализации модулирующей шумовой функции были идентичны. Глубину модуляции измеряли в процентах среднеквадратичного отношения шумового модулирующего шума к среднему значению тонального сигнала. Во избежание перемодуляции это значение составляло обычно 20 или 30%.

Сигнал, регистрируемый усилителем, поступал на формирователь стандартных импульсов, соответствующих каждому спайку исследуемого нейрона, эти импульсы хранили в памяти персонального компьютера. Другой импульсный генератор вносил в память компьютера синхронные импульсы, отмечающие моменты начала идентичных отрезков модулирующего сигнала. Непосредственно в процессе эксперимента получали распределение межимпульсных интервалов реакции и динамику средней частоты импульсации нейрона, регистрируемой каждые две

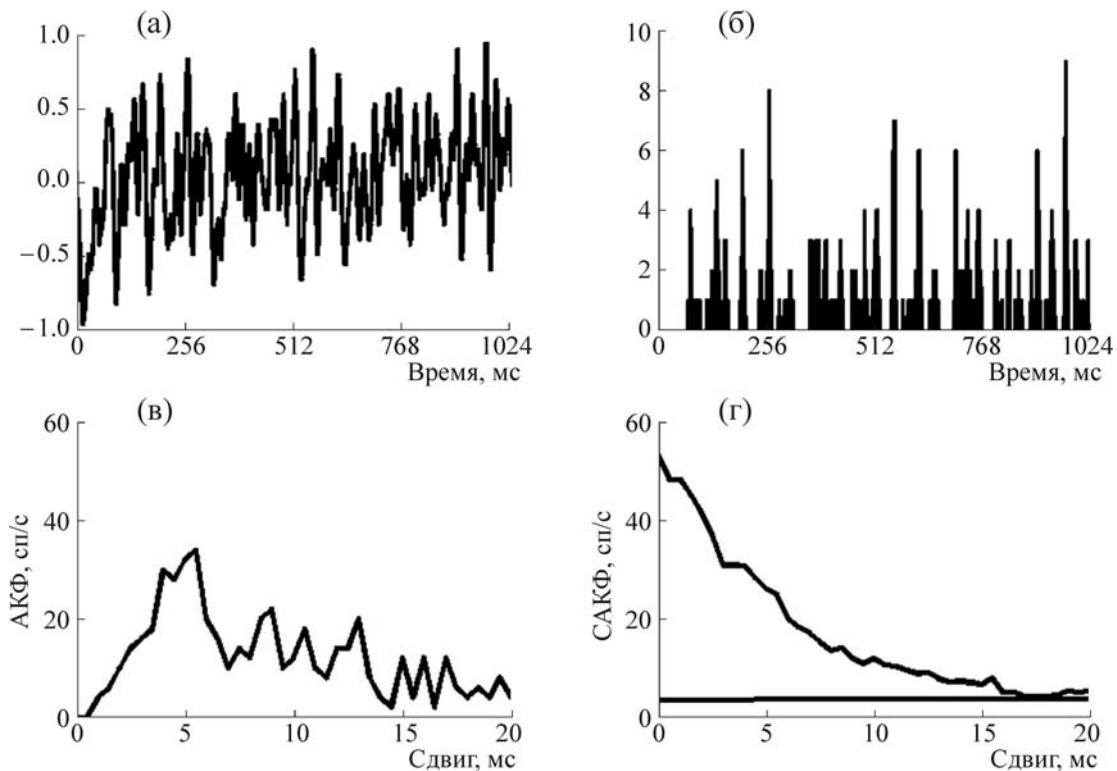


Рис. 1. Реакция типичного нейрона полукружного тора при действии сигнала характерической частоты, модулированного повторяющимися отрезками шума в полосе 0–50 Гц длительностью по 1024 мс: (а) – нормированная форма участка огибающей, (б) – циклическая гистограмма реакции на этот участок, (в) – гистограмма автокорреляционной функции, построенной по всей длительности реализации, (г) – гистограмма смещенной автокорреляционной функции, полученной путем сравнения реакций на разные отрезки модулирующего сигнала. Горизонтальная линия соответствует средней частоте импульсации.

секунды. Последнюю функцию использовали для контроля отсутствия резких неконтролируемых изменений реакции нейрона в процессе регистрации. Обычно ответ клетки начинали регистрировать не с первого момента действия стимула, а спустя 10–25 с, когда ответ становился близким к стационарному.

По окончании эксперимента файл, содержащий всю последовательность спайков, разбивали на участки, соответствующие длительности фиксированного шумового отрезка, используемого для модуляции. Число таких участков зависело от общей длительности регистрации и от продолжительности каждого отрезка, варьируя от 50 до 250. На рис. 1а в качестве примера приведена форма одного повторяющегося участка огибающей длительностью 1012 мс при полосе модулирующей функции 0–50 Гц. Единичное значение соответствует максимуму амплитуды на участке модуляции, значение -1 соответствует минимуму. На первом этапе обработки получали гистограммы распределения импульсов на протяжении такого участка модулирующего шума, называемые

циклическими гистограммами. Пример подобной гистограммы приведен на рис 1б.

Построение ненормированной АКФ осуществляли по всей длительности реализации по формуле:

$$AKF(T) = \sum x(t)x(t + T)dt.$$

При построении САКФ ответ на все предъявление разбивали на участки, соответствующие одному периоду модулирующей функции, и подсчитывали число совпадений моментов возникновения импульсов в реакции на каждый из участков модулирующей функции с моментами возникновения импульсов в ответах на все оставшиеся участки. Как уже указывалось, число таких участков составляло $N \times (N - 1)$. Гистограмму функции САКФ получали в результате суммирования всех полученных функций.

Как САКФ, так и АКФ нормировали таким образом, чтобы при полной независимости сравниваемых участков импульсации их средние значения соответствовали средней частоте импульсации. Для этого при построении АКФ

число совпадений при каждой задержке делили на общую длительность отрезка, ширину единичного сдвига и среднюю частоту импульсации, а при построении смещенной во времени автокорреляционной функции (СВАКФ) дополнительно еще и на число отрезков минус единица. После такой нормировки обе функции были выражены в размерности текущей плотности импульсации, что позволяет осуществить их прямое сопоставление.

Гистограмма функции АКФ приведена на рис. 1в. Ее значение в нулевом канале, соответствующее единичной вероятности и при использованной величине единичного отсчета 0,5 мс, равное 2000, на рисунке не приведено. При малых сдвигах функция имеет нулевые значения, поскольку сразу после генерации одного спайка последующий спайк возникнуть не может вследствие явления абсолютной рефрактерности. Начиная с задержки 1,5 мс, функция постепенно нарастает, освобождаясь от рефрактерности, достигает локального максимума и затем спадает до уровня, соответствующего средней частоте импульсации.

Гистограмма функции САКФ (рис. 1д) имеет максимум при нулевой задержке, соответствующий вероятности возникновения импульса в одном и том же месте на разных участках модулирующего сигнала. Заметим, что отношение этого максимума к средней частоте импульсации прямо демонстрирует степень синхронности ответа при последовательных проявлениях одного и того же отрезка сигнала. Этот показатель было предложено называть коэффициентом или индексом синхронности [15,19]. Обратим также внимание на то, что функция САКФ выглядит существенно более сглаженной, чем АКФ, что определяется большим объемом сопоставляемых данных.

Нас интересовало частное от деления значений АКФ на значения САКФ в каждые последовательные значения сдвига корреляционных функций. Именно отношение этих функций характеризует процесс изменения возбудимости нейрона, обусловленный генерацией им потенциала действия (спайка). Если эксперименты на одном нейроне были произведены при разных параметрах сигнала, то зависимость этого отношения от времени после генерации спайка, обусловленная его внутренними свойствами, должна быть примерно постоянна, что дает возможность суммировать такие зависимости с определением среднего и стандартного отклонения. Эти операции осуществляли с помощью стандартных программ Excel и Origin.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всего было изучено более 40 нейронов дорсального ядра продолговатого мозга и более 100 клеток, расположенных в полукружном турсе. Исследовали только те нейроны, которые характеризовались устойчивым ответом на тональные сигналы оптимальной частоты, модулированные на 20–30% по амплитуде низкочастотным шумом. В задачу настоящей работы не входит подробный количественный анализ всей совокупности полученных данных. Цель работы состоит, прежде всего, в обосновании эффективности предлагаемого метода и демонстрации существенного разнообразия постспайковых изменений возбудимости у нейронов слухового пути.

Как в дорсальном ядре продолговатого мозга, так и в полукружном турсе были отмечены клетки со слабо выраженными постспайковыми эффектами. На рис. 2 приведены основные характеристики двух нейронов полукружного турса, принадлежащего к этой группе. В верхнем ряду приведены три САКФ, полученные соответственно при разных спектрах модулирующего сигнала, а в среднем ряду показаны таким же образом нормированные значения АКФ. В нижнем ряду дано отношение этих функций, причем сплошной линией показано его усредненное значение. Нейроны различались по характеристической частоте (соответственно 0,50 и 0,83 кГц) и особенно резко по средней плотности импульсации (при действии сигнала, модулированного в полосе до 15 Гц, соответственно 0,50 и 28,3 имп/с). При этом оба нейрона характеризовались короткой (порядка 1 мс) абсолютной рефрактерностью, столь же короткой относительной рефрактерностью и поддержанием дальнейшего отношения функций АКФ и САКФ в районе единичного значения. Обратим также внимание на то, что у клетки, отличающейся высокой частотой импульсации (рис. 2б), при анализе ответов на низкочастотную модуляцию можно отметить периодичность функции АКФ. Эта особенность связана, по-видимому, именно с существованием короткой, но сильно выраженной рефрактерности, приводящей к появлению пар с жестко заданным межимпульсным интервалом. Поскольку в реакциях на последовательные участки сигнала моменты появления этих пар могут несколько варьировать, эффект проявляется в АКФ, но практически не заметен в САКФ.

При анализе полученных данных возникает закономерный вопрос о константности выявленных постспайковых эффектов при изменении параметров воздействующего сигнала. Если

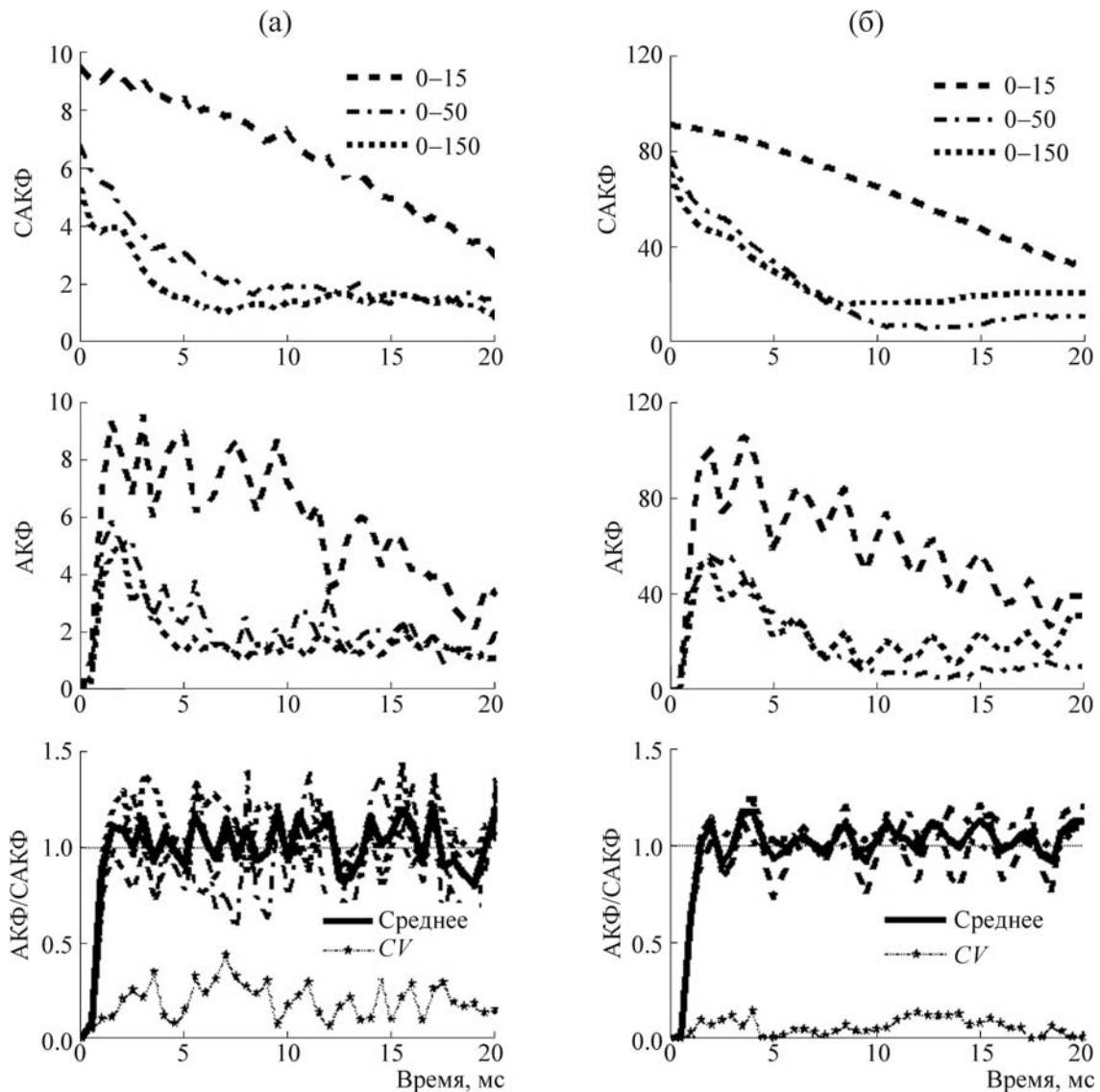


Рис. 2. Характеристики импульсации двух нейронов полукруглого турса при действии сигналов характерической частоты, модулированных повторяющимися отрезками шума. В верхнем ряду приведены значения смещенной автокорреляционной функции, в среднем ряду значения автокорреляционной функции, в нижнем ряду отношения значений АКФ к значениям САКФ для трех сигналов с разными спектрами модулирующего шума, а также среднее значение (*mean*) и стандартное отклонение (*CV*) этих отношений. (а) – Нейрон 91102: частота несущей – 0,5 кГц, средний уровень сигнала 30 дБ над порогом, среднеквадратичное значение глубины модуляции – 20%; (б) – нейрон 62001: частота несущей – 0,83 кГц, средний уровень сигнала 30 дБ над порогом, среднеквадратичное значение глубины модуляции – 20%. Параметры модуляции, указанные справа в верхнем ряду, применимы к остальным рисункам.

предложенный методический прием действительно позволяет адекватно оценить динамику постспайковых изменений возбудимости, то вид регистрируемой функции, характеризующей отношение АКФ к САКФ, не должен сильно зависеть от вида сигнала. Как показывают результаты, приведенные на рис. 2, функция действительно качественно не изменяется при изменении спектра модуляции.

Вывод о качественной стабильности этого отношения при изменении параметров воздей-

ствующего сигнала подтверждается и данными, полученными на нейронах дорсального ядра продолговатого мозга. На рис. 3а,б приведены усредненные результаты, полученные при исследовании двух нейронов этого ядра, отличающихся сравнительно короткими постспайковыми эффектами. Функции были получены после усреднения данных, полученных при действии сигналов, отличающихся между собой не только полосой модулирующих частот, но также уровнем несущей и длительностью отрезков.

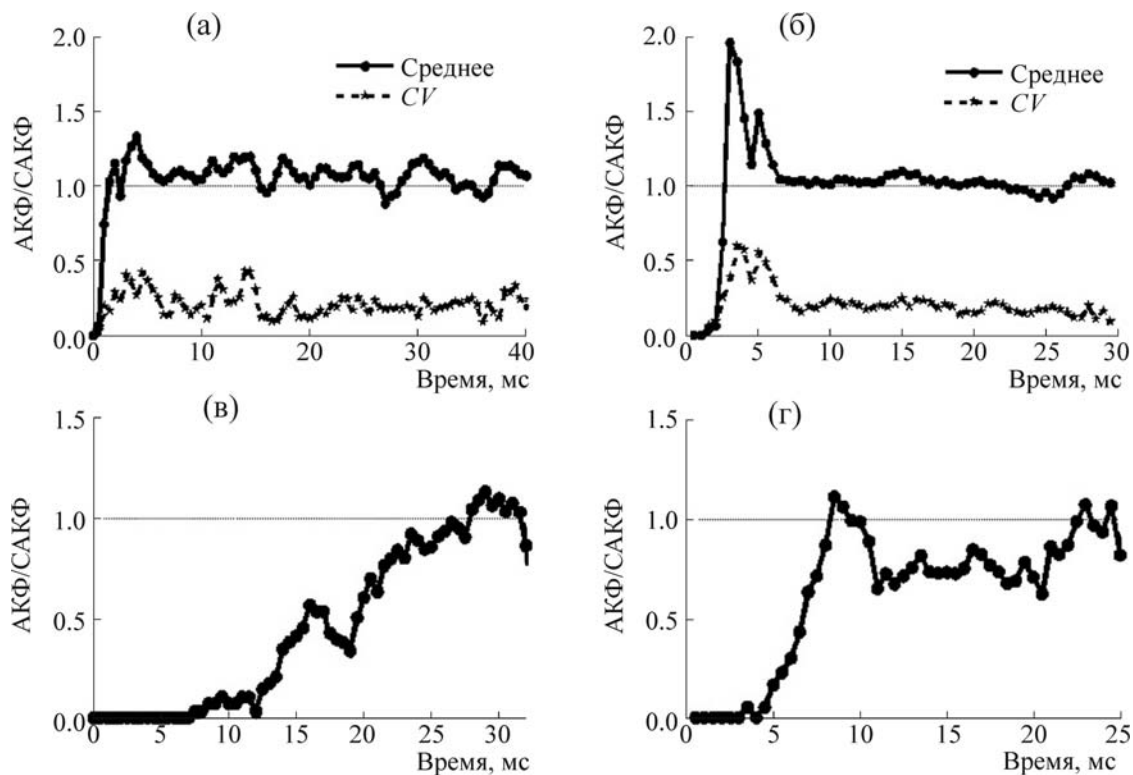


Рис. 3. Функции, характеризующие усредненные для разных сигналов значения отношения обычной автокорреляционной функции к смещенной функции автокорреляции, для двух нейронов дорсального ядра продолговатого мозга (а, б) и двух нейронов полукружного турса (в, г) при действии сигнала характеристической частоты, модулированного повторяющимися отрезками шума. (а) – Нейрон 91303: частота несущей – 0,53 кГц, усреднение по реакциям на 9 разных сигналов; (б) – нейрон 62105: частота несущей – 1,2 кГц, усреднение по реакциям на 12 разных сигналов; (в) – нейрон 90401: частота несущей – 0,64 кГц, средний уровень сигнала 20 дБ над порогом, среднееквадратичное значение глубины модуляции – 30%; (г) – нейрон 60910: частота несущей – 1,28 кГц, средний уровень сигнала 30 дБ над порогом, среднееквадратичное значение глубины модуляции – 20%.

Несмотря на значительные различия в частоте импульсации и в форме циклических гистограмм реакции на предъявляемые стимулы (не показано), временной ход исследуемого отношения оставался качественно неизменным. У одного из нейронов (рис. 3а) восстановление возбудимости после генерации спайка происходило весьма быстро и другие особенности поведения функции не отмечены. У другого нейрона (рис. 3б) непосредственно после рефрактерного периода длительностью около 2 мс наблюдали два локальных максимума функции с последующим постепенным снижением возбудимости до единичного значения. Заметим, что не столь выраженный, но качественно подобный эффект может быть отмечен и на рис. 3а. Для обеих клеток приведены также значения среднееквадратичного отклонения по результатам анализа реакций на девять (рис. 3а) и двенадцать (рис. 3б) разных сигналов. Разброс примерно соответствует обычному биномиальному распределению и следует за изменениями среднего значения.

Иллюстрированные нейроны характеризовались сравнительно быстрым восстановлением возбудимости после короткого рефрактерного периода и (или) сравнительно небольшого участка повышенной возбудимости. Однако такие клетки не составляли значительного большинства даже в дорсальном ядре продолговатого мозга, притом, что среди нейронов полукружного турса, они составляли меньшинство. Другие клетки полукружного турса наряду с иллюстрированными постспайковыми влияниями, длящимися всего несколько миллисекунд, проявляли и иные, более длительные изменения возбудимости после генерации собственного спайка.

Некоторые из клеток этого ядра характеризовались весьма длительным снижением возбудимости после генерации спайка. Пример кривой восстановления возбудимости такого нейрона приведен на рис. 3в. В АКФ этого нейрона полностью отсутствовали интервалы меньше 7 мс. Дальнейшее восстановление возбудимости происходило довольно медленно,

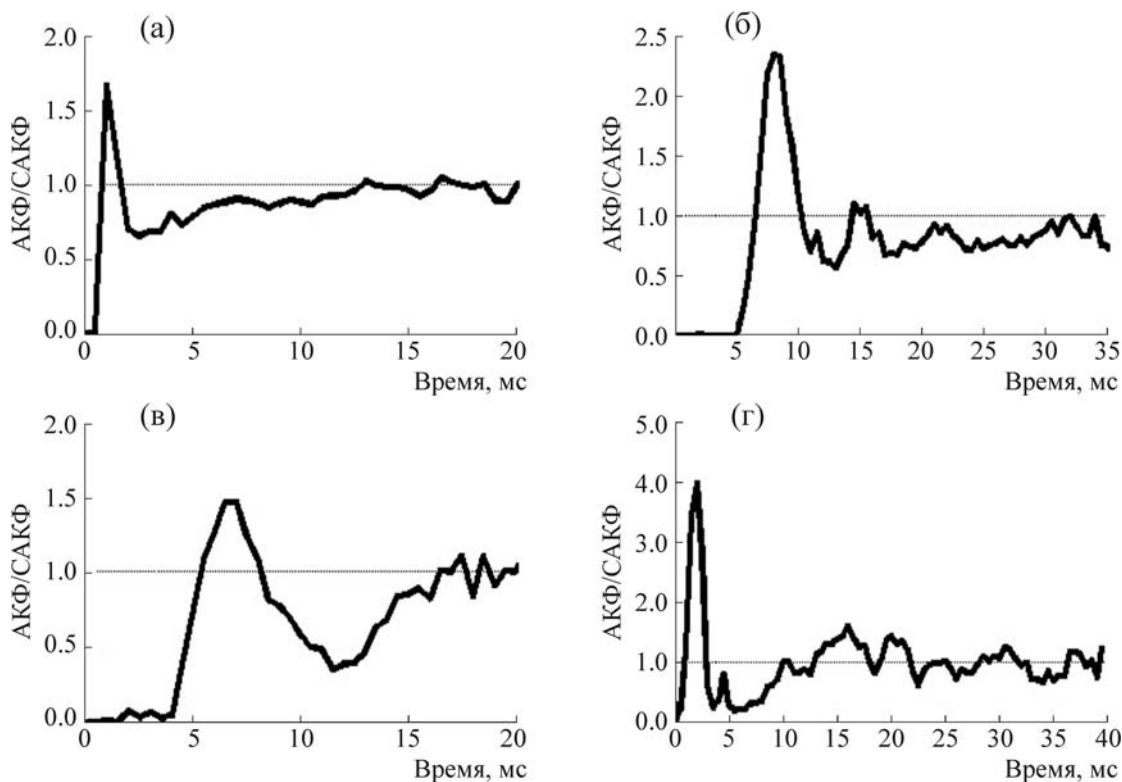


Рис. 4. Функции, характеризующие отношение обычной автокорреляционной функции к смещенной функции автокорреляции в реакции четырех нейронов полукружного турса с немонотонной зависимостью возбудимости от времени после генерации спайка. (а) – Нейрон 50406: частота несущей – 0,6 кГц, средний уровень сигнала 30 дБ над порогом, среднееквадратичное значение глубины модуляции – 20%; (б) – нейрон 60607: огибающая 0–50 Гц, частота несущей – 1,14 кГц, средний уровень сигнала 20 дБ над порогом, среднееквадратичное значение глубины модуляции – 20%; (в) – нейрон 61813: полоса огибающей 0–150 Гц, частота несущей – 0,64 кГц, средний уровень сигнала 30 дБ над порогом, среднееквадратичное значение глубины модуляции – 20%; (г) – нейрон 62109: частота несущей – 0,8 кГц, средний уровень сигнала 30 дБ над порогом, среднееквадратичное значение глубины модуляции – 30%.

так что полностью возбудимость клетки восстанавливалась не ранее чем к 30 мс после генерации спайка. У нейрона, иллюстрированного на рис. 3г, восстановление возбудимости также происходило довольно медленно, однако немонотонность этого процесса, присутствующая на рис. 3в, у данной клетки выражалась гораздо ярче. В интервале 8–10 мс после спайка возбудимость клетки восстанавливалась с тем, чтобы вновь снизиться при больших значениях задержки.

Такая сложная динамика постспайкового восстановления возбудимости оказалась характерной для многих нейронов полукружного турса. При этом наличие участка, соответствующего фасилитации реакции непосредственно после окончания рефрактерного периода, иллюстрированное для нейрона продолговатого мозга на рис. 3б, наблюдалось у многих слуховых нейронов среднего мозга. Часто, как это показано на рис. 3в,г, после первичного максимума часто наблюдали вторичный минимум

функции с последующим медленным восстановлением. Конкретные времена и выраженность отдельных компонент, соответствующих разным участкам такой немонотонной функции, могли сильно различаться.

Рис. 4 иллюстрирует поведение четырех нейронов полукружного турса, у которых постспайковые изменения возбудимости оказываются выраженными весьма резко. У нейрона, проиллюстрированного на рис. 4а, участок, соответствующий фасилитации ответа, следует за периодом абсолютной рефрактерности и имеет весьма малую длительность, сменяясь более длительным, хотя и не сильно выраженным снижением возбудимости, продолжающимся более 10 мс. У других нейронов все указанные фазы постспайкового изменения возбудимости оказываются выраженными гораздо ярче, причем длительность участка повышенной возбудимости может достигать нескольких миллисекунд (рис. 4б). Два случая, иллюстрированные рис. 4в и 4г, еще раз демонстрируют, что у

этих нейронов эпоха вторичного постспайкового снижения возбудимости может продолжаться довольно долго, причем процесс восстановления возбудимости может быть немонотонным. Вторичные максимумы, видимые на рис. 4в,г, наблюдали и в других случаях.

В нескольких случаях нам не удалось полностью охарактеризовать динамику восстановления возбудимости, поскольку значения САКФ на протяжении начального участка быстро падали до нуля, а при малых задержках, когда эта функция была отлична от нуля, АКФ тождественно равнялась нулю. Такую ситуацию наблюдали у клеток, реагирующих единичным импульсом только на определенные, весьма короткие участки сигнала. Как было показано нами ранее [15], такие элементы отличались весьма высоким коэффициентом синхронности и быстрым спадом САКФ до нулевого значения. Это поведение соответствует типу кодирования, называемому *sparse coding*, когда в ответе на конкретный сигнал принимают участие весьма малое число нейронов исследуемой популяции, причем каждый из них выделяет только свой характерный признак стимула.

Данные, полученные для одного из таких нейронов, продемонстрированы на рис. 5. На рис. 5а приведены САКФ, полученные при действии сигнала, модулированного огибающей в полосе 0–150 Гц. Функция имела резко выраженный максимум при самых малых задержках, после чего быстро падала до нуля. Вторичный небольшой максимум в районе задержек 22–24 мс соответствовал интервалу между двумя особенностями огибающей, приводящими к появлению спайка. На рис. 5б приведено отношение функций АКФ и САКФ, усредненное для трех рассматриваемых сигналов. На протяжении первых 4,5 мс оно равняется нулю, в интервале 4,5–21 мс это отношение не определено, поскольку обе функции равны (или очень близки) нулю. Однако при задержках 22–25 мс, соответствующих интервалу между двумя особенностями сигнала, вызывающими импульсную активность, отношение приближается к единице (рис. 5б). При более низкочастотных спектрах огибающей сигнала первичному максимуму САКФ также соответствовали нулевые значения обычной автокорреляционной функции, а задержка вторичных максимумов была еще больше.

ОБСУЖДЕНИЕ

Вполне естественно попытаться сопоставить полученные результаты с нашими предыдущими попытками охарактеризовать динамику

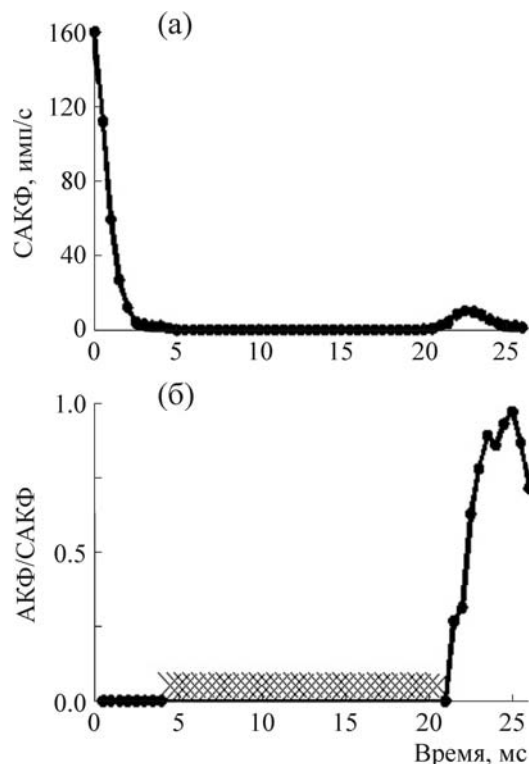


Рис. 5. Функции, характеризующие реакцию нейрона полукружного турса (нейрон 61303), отличающегося короткой реакцией только на отдельные участки огибающей. (а) – Смещенная функция автокорреляции, усредненная при действии трех тональных сигналов, модулированных шумом в диапазоне 0–150 Гц. Частота несущей и характеристическая частота нейрона 0,67 кГц. Параметры трех сигналов: при уровне несущей 20 дБ над порогом, глубина модуляции 20 и 30%, при уровне несущей 30 дБ над порогом глубина модуляции 20%. (б) – Отношение обычной автокорреляционной функции к смещенной функции автокорреляции для этой клетки. На интервале 5–25 мс отношение не определено, поскольку обе функции имеют нулевые значения.

постспайковых изменений возбудимости тех же элементов прямого слухового пути амфибий. В работе [20] степень восстановления возбудимости оценивали путем сопоставления вероятности ответа нейрона на второй щелчок в паре при условии наличия или отсутствия спайка в ответе на первый из щелчков. Использовали интервалы между первым и вторым щелчком в 20, 40, 60 и 100 мс. При наименьшем из использованных интервалов у большинства клеток наблюдали подавление ответа на второй щелчок при условии возникновения спайка в ответ на первый сигнал. При интервалах 40 и 60 мс наряду с таким типом взаимодействия в некоторых случаях наблюдали и эффект повышения вероятности ответа на второй щелчок при условии существования ответа на первый.

Как было указано в рассматриваемой работе, процент клеток с выраженным влиянием предшествующего спайка на вероятность ответа мог быть занижен вследствие ограничений, накладываемых при использовании применяемого метода. Эти ограничения определялись необходимостью четко различать импульсную активность, вызываемую первым и вторым щелчками, и при этом получить достаточно представительную подборку реакций, в которых ответ на первый щелчок отсутствовал. Кроме того, в работе исключали клетки, у которых ответ на щелчок состоял более чем из одного импульса. Можно допустить, что в результате отбирали клетки с выраженным постстимульным или (и) постспайковым торможением притома, что постспайковую фасилитацию, развивающуюся обычно при небольших задержках, выявлять было значительно труднее.

Близкое по своему подходу исследование было осуществлено и на нейронах слухового центра среднего мозга мышей [21]. В этом случае сигнал состоял из пары коротких тональных отрезков, и результаты были получены при фиксированных межстимульных интервалах 50 мс и более. Даже для столь больших межстимульных интервалов наблюдались случаи, когда при значительной вероятности ответа на второй сигнал в отсутствие спайка на первый, вероятность его генерации при условии существования ответа на первый равнялась нулю. Однако наблюдались и нейроны, существенно повышающие свою возбудимость при условии возникновения спайка в ответ на первый сигнал. Один из таких нейронов проявлял указанное свойство даже при межстимульном интервале в 200 мс.

В другой работе [22] была проведена попытка оценки временной динамики постспайкового восстановления возбудимости непосредственно из анализа реакции нейрона на тональные отрезки. Для этих целей сравнивали распределение моментов появления всех импульсов относительно начала сигнала (постстимульную гистограмму) и гистограмму ожидаемой плотности импульсации [23], демонстрирующую гипотетическое временное распределение спайков, возникающих в ответ на сигнал, при условии отсутствия рефрактерности. Последнюю вычисляли из достаточно представительного распределения латентных периодов реакции в отсутствие спонтанной активности. Эти данные позволяли с помощью аналитической модели оценить динамику восстановления возбудимости, но только при крайне упрощенных модельных предположениях о ее временных параметрах. Предполагалось существование одной абсолют-

ной рефрактерности, длительность которой и являлась единственным варьируемым параметром. При таких предположениях вновь было продемонстрировано, что нейроны слухового центра среднего мозга травяной лягушки сильно различаются между собой по длительности полного постспайкового торможения. У ряда клеток она почти не влияла на ход реакции, у других ее длительность, оцененная с использованием указанной упрощенной модели, достигала 20 мс. Данные, приведенные в настоящей работе, также демонстрируют существование столь длительного постспайкового торможения в ограниченной, видимо специализированной, группе нейронов среднего мозга.

Подводя итоги сопоставления полученных данных с результатами других исследований, выполненных на тех же объектах и с той же целью, можно сказать, что обнаруженное ранее у некоторых нейронов весьма продолжительное последствие генерации спайка нашло подтверждение в настоящей работе. При этом предложенный метод позволил не просто продемонстрировать наличие такого последствия, но и охарактеризовать его временную динамику.

Конечно, для нейронов с выраженной спонтанной импульсной активностью исследование интересующих нас процессов можно производить, используя функцию автокорреляции этой активности или функцию риска [9,24]. Однако нейроны слухового центра среднего мозга как у амфибий, так и у млекопитающих в своем большинстве не генерируют спайковой активности в отсутствие внешнего сигнала. Кроме того, сама по себе генерация подобной активности еще не означает отсутствия входов на исследуемую клетку, которые могут происходить из иных источников и могут быть сколь угодно сложно организованы. Метод, примененный в данной работе, в меньшей степени должен быть подвержен подобным влияниям, поскольку регистрируемая импульсация определяется главным образом внешним сигналом, идентичным как для САКФ, так и для АКФ, хотя полностью исключить входы, никак не связанные с внешним воздействием, невозможно.

Хотя нам неизвестны работы, которые позволяли бы подробно охарактеризовать динамику постспайкового изменения возбудимости восстановления слуховых нейронов при действии звука, полученные нами данные не противоречат результатам других авторов. Прямое сопоставление функций САКФ и АКФ, полученной по всей реализации, было проведено в работе, выполненной на слуховом нерве кошки (см. рис. 3 в работе [11]). Такое сопоставление

было чисто качественным и не ставило своей целью оценку всего хода постспайкового изменения возбудимости нейрона. При этом максимум обычной АКФ, расположенный непосредственно после окончания рефрактерного периода (при задержке 2 мс), примерно соответствовал значению в этой точке функции САКФ, т.е. длительность рефрактерности была крайне невелика, а фасилитация реакции клетки после окончания рефрактерного периода либо была весьма слабой, либо не наблюдалась вовсе. Такое поведение примерно соответствовало поведению нейронов, иллюстрированных в нашей работе на рис. 2 и 3а. Однако наши данные, особенно те из них, которые были получены в среднем мозге, свидетельствуют о существовании гораздо более длительных и сложных изменений возбудимости слуховых нейронов, вызванных генерацией спайкового разряда.

Постспайковое снижение возбудимости, отличающееся от классического поведения модели Ходжкина–Хаксли, довольно широко распространено среди нейронов головного мозга в целом и среди нейронов стволовых отделов слуховой системы в частности. Механизмы этих эффектов анализировали как на нейронах слуховой системы, так и в других структурах мозга. Обычно эти эффекты объясняются функционированием кальций-активируемых калиевых каналов, которые разделяются на две подгруппы. Каналы с высокой проводимостью, локализованные, по-видимому, в начальном сегменте аксона [25], действуют в интервалах нескольких миллисекунд после генерации спайка, хотя каналы с малой проводимостью могут иметь существенно большие постоянные времени [26]. В нашем случае начальное снижение возбудимости, видимое, например, на рис. 2 и 3а, ориентировочно можно сопоставить с действием каналов с высокой проводимостью. Функционирование кальций-активируемых каналов со слабой проводимостью может обусловить более медленное изменение возбудимости, иллюстрируемое на рис. 3в,г и 4.

Можно заметить, что оба тока, гиперполяризующих клетку, по своей природе являются аддитивными, т.е. способны накапливаться при действии следующих друг за другом потенциалов действия. Уже давно было указано, что наличие таких накапливающихся токов, в частности, может объяснить важный феномен кратковременной адаптации в волокнах слухового нерва [3]. Между тем в значительном большинстве моделей постспайковые изменения возбудимости воспроизводятся в рамках подхода integrate and fire, который полностью игнорирует влияние на состояние нейрона в фикси-

рованный момент времени всех его спайков, за исключением одного, непосредственно предшествующего этому моменту.

Локальный максимум отношения АКФ к САКФ, наблюдаемый нами во многих исследованных клетках, может определяться несколькими принципиально различными причинами. Весьма вероятно истинное повышение возбудимости нейрона непосредственно после генерации спайка и следующей за этим быстрой рефрактерности. Ионные механизмы, которые могут быть ответственными за данный эффект, довольно многочисленны. Один из возможных механизмов постспайковой деполяризации для слуховых нейронов ствола мозга млекопитающих был рассмотрен в работе [27]. На срезах нейронов медиального ядра трапециевидного тела было показано существование так называемого восстанавливающего (resurgent) временного натриевого тока (I_{NaR}), который активируется во время реполяризации мембраны после потенциала действия. По-видимому, эти же токи определяют и существование пачковой активности в так называемых свастикообразных клетках дорсального кохлеарного ядра млекопитающих [28].

Другие механизмы постспайковой деполяризации могут быть связаны с деполяризационной отдачей после постспайковой гиперполяризации [29] или с временным подавлением выходящих калиевых токов [30]. Эти процессы также запускаются входом внутрь клетки ионов кальция.

Максимумы регистрируемой в данной работе функции постспайкового восстановления возбудимости клетки могут определяться не только реальной фасилитацией. Может показаться, что они вызываются просто низкочастотностью входного воздействия, приводящей к тому, что амплитуда сигнала после генерации первого спайка остается в среднем больше среднего значения. Однако указанный эффект должен также отражаться и в СВАКФ, приводя к расширению начального пика, Такое расширение действительно имеет место: длительность начального пика СВАКФ растет с уменьшением верхней частотной границы модулирующей функции [15]. Поэтому существенное превышение функции АКФ над функцией СВАКФ нельзя объяснить этой причиной. На самом деле мы не наблюдали выраженной зависимости регистрируемой функции восстановления от ширины полосы модулирующего шума (см. рис. 2, 3).

Однако можно предположить, что реакции на последовательные предъявления одной и той же реализации шумовой огибающей существен-

но различаются между собой, так что некоторые предъявления вызывают усиленные ответы, в которых чаще встречаются пары близкорасположенных импульсов. Процедура получения САКФ приводит к ликвидации таких особенностей и в результате к уменьшению числа соответствующих интервалов. Это может обусловить локальное превышение значений АКФ над значениями САКФ. В сильно упрощенном виде представим себе ситуацию, при которой в половине предъявлений возникает пара импульсов с фиксированным интервалом, а в остальных предъявлениях реакция отсутствует. Тогда мы будем наблюдать существенное превышение АКФ над САКФ в диапазоне, соответствующем межспайковому интервалу в паре.

Есть основания полагать, что хаотический разброс ответов на последовательные предъявления сигнала у нейронов слуховой системы действительно существует. При исследовании спонтанной активности нейронов слухового пути амфибий совершенно четко доказано существование медленных хаотических колебаний возбудимости нейронов, проявляющихся, в частности, в непропорционально резком возрастании фактора Фано (отношение дисперсии числа ответов к его среднему значению) при увеличении длительности участка анализа [31]. Для оценки variability ответов на повторяющиеся отрезки сигнала также можно использовать достаточно простой параметр, соответствующий фактору Фано и равный отношению дисперсии числа импульсов на предъявляемый отрезок к среднему числу ответов на этот сигнал. Проведенные нами ранее исследования [32,33] показали, что при действии изолированных отрезков тона указанное отношение может быть существенно больше единицы, т.е. хаотическое изменение ответов на последовательные предъявления сигнала в действительности существует. Применительно к нашей задаче следует оценить данный параметр, рассматривая последовательные участки модуляции как отдельные отрезки. Сопоставление этого параметра с характером кривых восстановления возбудимости может пролить свет на одну из возможных причин наличия локальных максимумов.

Еще одной причиной превышения АКФ над САКФ при некоторых значениях задержки может явиться существование в реакции нейрона периодичности, не связанной с периодом предъявления модулирующих отрезков. Наиболее ярко этот эффект наблюдается в случае воспроизведения клеткой периодичности несущей частоты. В регистрируемой САКФ такое воспроизведение не может отражаться, поскольку в

наших экспериментах несущая частота была не синхронизирована с началом модулирующих отрезков. В то же время на обычной автокорреляции проявляются максимумы, соответствующие периоду несущей частоты. У амфибий этот эффект может быть заметен только для низкочастотных периферических нейронов и в данной работе мы его не наблюдали. Однако в некоторых случаях обычная функция автокорреляции проявляла признаки периодичности притом, что в смещенной функции периодичность не наблюдалась (см. рис. 1б). Этот факт может свидетельствовать о существовании фиксированного периода в импульсации клетки, не связанного с периодом следования отрезков модуляции. Как уже указывалось, эта периодичность может определяться просто короткой, но жестко выраженной рефрактерностью.

Представляет интерес сопоставить поведение оцененной предложенным методом кривой восстановления возбудимости после генерации импульса с автокорреляционной функцией импульсации нейрона в отсутствие внешних стимулов. К сожалению, такое сопоставление можно проводить только для клеток с выраженной спонтанной активностью, причем таковые составляют весьма малую часть нейронов полукруглого тора [24]. Однако имеющиеся к настоящему времени немногочисленные данные свидетельствуют о прямой связи максимума автокорреляционной функции спонтанной активности клетки и локального максимума использованной в данной работе функции, описывающей динамику постспайкового восстановления возбудимости при действии звуковых сигналов.

Сложный и часто немонотонный ход постспайкового восстановления возбудимости можно было отметить и в работах, посвященных анализу параметров спонтанной активности клеток слухового пути [24,34] и других нейронных элементах головного мозга [35]. Интересно, что в большинстве нейронов коры постспайковое подавление возбудимости обычно оказывается весьма непродолжительным и мало влияет на статистические характеристики импульсации [10]. В то же время спонтанно активные клетки в корковом представительстве вибриссы крысы характеризовались выраженным локальным (после краткого рефрактерного периода) максимумом распределения межимпульсных интервалов [36]. В значительном большинстве случаев за этим максимумом следовал локальный минимум, за которым иногда следовал еще один максимум с последующим медленным выходом на уровень, соответствующий пуассоновскому распределению. Такое поведение соответствует данным, приведенным нами на рис 4. Можно

отметить, что функции, подобные тем, которые иллюстрированы рис. 4, были получены и в модельных экспериментах [37].

В заключение отметим, что метод оценки постспайковых изменений возбудимости, примененный в настоящей работе, лишен большинства недостатков, присущих более ранним используемым нами методическим приемам, и демонстрирует весь ход исследуемого процесса, включая как малые, так и большие задержки ответа после генерации потенциала действия. Заметим, что тот же подход может быть использован и при исследовании реакции на последовательно предъявляемые отдельные сигналы. В этом случае также следует сопоставить сумму автокорреляционных функций всех предъявляемых отрезков с функцией, характеризующей корреляцию ответов на каждое предъявление с ответами на все остальные предъявления сигнала.

Написание работы поддержано грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 16-04-01066.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. Г. Бибиков, *Биофизика* **20**, 887 (1975).
2. R. P. Gaumont, D. O. Kim, and C. E. Molnar, *J. Acoust. Soc. Am.* **74**, 1392 (1983).
3. Н. Г. Бибиков и Г. А. Иваницкий, *Биофизика* **30**, 141 (1985).
4. Н. Г. Бибиков, *Успехи физиол. наук* **41** (3), 72 (2010).
5. E. de Boer and P. Kuypers, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **15**, 169 (1968).
6. J. J. Eggermont, *Hear. Res.* **271**, 123 (2011).
7. Н. Г. Бибиков, *Биофизика* **49** (1), 107 (2004).
8. S. E. Shore, *Hear. Res.* **82**, 31 (1995).
9. Н. Г. Бибиков и А. Б. Дымов, *Биофизика* **52** (6), 1073 (2007).
10. Н. Г. Бибиков и И. Н. Пигарев, *Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова* **99** (3), 348 (2013).
11. D. H. Louage, M. van der Heijden, and P. X. Joris, *J. Neurophysiol.* **91**, 2051 (2004).
12. Н. Г. Бибиков, в сб. *Труды 14-й Всеросс. конф. «Нейроинформатика»* (МИФИ-Пресс, М., 2012), т. 3, с. 84.
13. Н. Г. Бибиков и С. В. Низамов, *Биофизика* **54** (5), 921 (2009).
14. Н. Г. Бибиков, *Биофизика* **60** (3), 409 (2015).
15. Н. Г. Бибиков, *Журн. высш. нерв. деятельности им. И. П. Павлова* **67** (2), 218 (2017).
16. H. M. Kaplan, *Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **28**, 1541 (1969).
17. M. A. Suckow, L. A. Terril, C. F. Grigdesby, and P. A. March, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **63** (1), 39 (1999).
18. M. Zimmermann, *Neurosci. Lett.* **73**, 1 (1987).
19. P. X. Joris, D. H. Louage, L. Cardoen, and M. van der Heijden, *Hear. Res.* **216–217**, 19 (2006).
20. Н. Г. Бибиков, *Сенсорные системы* **3** (3), 364 (1990).
21. Н. Г. Бибиков, *Биофизика* **51** (2), 324 (2006).
22. Н. Г. Бибиков, О. Б. Овчинников и С. В. Низамов, *Биофизика* **46** (3), 545 (2001).
23. N. G. Bibikov, *Acustica* **31** (2), 310 (1974).
24. N. G. Bibikov, *IBRO Report* **2**, 54 (2017).
25. J. Johnston, S. J. Griffin, and C. Baker, *J. Physiol.* **586**, 3493 (2008).
26. V. P. Bean, *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 451 (2007).
27. J. H. Kim, C. Kushmerick, and H. von Gersdorf, *J. Neurosci.* **30** (46), 15479 (2010).
28. Y. Kim and L. O. Trussell, *J. Neurophys.* **97** (2), 1705 (2007).
29. H. Sun and S. H. Wu, *Brain Res.* **1226**, 70 (2008).
30. S. Chen and Y. Yaari, *J. Physiol.* **586** (5), 1351 (2008).
31. Н. Г. Бибиков и А. Б. Дымов, *Сенсорные системы* **23** (3), 246 (2009).
32. Н. Г. Бибиков, *Сенсорные системы* **25** (2), 131 (2011).
33. Н. Г. Бибиков, *Нейрофизиология (Киев)* **46** (1), 18 (2014).
34. Н. Г. Бибиков, *Журн. эволюц. биохимии и физиологии* **49** (6) 417 (2013).
35. C. M. Bower, J. D. Kocsis, and S. G. Waxman, *Neuroscience* **21**, 585 (1987).
36. G. B. Stanley and R. M. Webber, *J. Comp. Neurosci.* **15**, 321 (2003).
37. W. Truccolo, U. T. Eden, M. R. Fellows, et al., *J. Neurophysiol.* **93**, 1074 (2005).

Evaluation of Postspike Changes in Neuronal Excitability by Comparing Usual and Shuffled Autocorrelation Functions

N.G. Bibikov and S.V. Nizamov

Andreyev Acoustical Institute, ul. Shvernika 4, Moscow, 117036 Russia

Responses of single neurons in the dorsal (cochlear) medullary nucleus and midbrain auditory center (torus semicircularis) of grass frog (*Rana temporaria*) to tonal signals amplitudemodulated by repeating segments of low-frequency noise were studied. The autocorrelation function of this response to whole presentation and also shuffled autocorrelation function were derived. In the latter, the impulse response to each segment was correlated with responses to all other segments excluding its own. After the required normalization, this function differs from the initial autocorrelation in absence of postspike changes in excitability. The dependence of the ratio of these two functions on the delay directly demonstrates the time course of the postspike change in excitability of the investigated cell. The majority of the second-order neurons, located in the dorsal nucleus of the medulla oblongata were characterized only with the brief intervals of absolute and relative refractoriness. However, even in this nucleus, cells with marked facilitation of excitability immediately after the refractory period were seen. In the torus semicircularis, neurons with a rather complex dynamics of the postspike excitability were found. For these cells the comparatively long postspike decrease in excitability was usually interrupted by intervals in which the sensitivity of the neuron was significantly higher than normal. Our data demonstrate that spike generation has a marked effect on the subsequent activity in brainstem auditory units. This effect could play an important role in the formation of the temporary pattern of neuronal responses to auditory signals.

Keywords: auditory pathway, refractoriness, shuffled autocorrelation, temporal coding, tailless amphibians