

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Баженова Елена Юрьевна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
ОБ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ
РАБОТЫ

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ
СОМАТОВИСЦЕРАЛЬНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ЛОКОМОТОРНОЙ И
МОЧЕВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМ**

Специальности: 03.03.01 – физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Научные руководители:

к.б.н. Меркульева Н.С.

д.м.н. Мусиенко П.Е.

Санкт-Петербург

2020

Оглавление:

Актуальность темы исследования	3
Цель и задачи исследования	3
Научная новизна	4
Положения, выносимые на защиту.....	5
Теоретическая и практическая значимость	5
Материалы и методы	5
Основные результаты и обсуждения	10
Выводы	28
Апробация работы	19
Список литературы	20

Актуальность темы исследования

Основная задача нижних мочевыводящих путей (НМП) – обеспечить три основных физиологических процесса: накопление, удержание и выведение мочи. Эти процессы обеспечиваются за счет работы мочевого пузыря и зоны эвакуации мочи: шейки мочевого пузыря, уретры и наружного сфинктера уретры. Эти анатомические структуры подчиняются системе нервного контроля на уровне головного и спинного мозга и периферических нервов. (Fryetal., 2005). Повреждение этой системы на любом из уровней приводит к развитию нейрогенной дисфункции нижних мочевыводящих путей. Понятие нейрогенный мочевой пузырь – это симптомокомплекс, который характеризуется разнообразными формами нарушений резервуарной и эвакуаторной функций нижних мочевыводящих путей вследствие поражения нервной системы на разных уровнях: от коры головного мозга до интрамурального аппарата собственно мочевого пузыря.

Одной из основных причин возникновения нейрогенной дисфункции нижних мочевыводящих путей является травма спинного мозга. Высокая социально-экономическая значимость проблемы обусловлена распространенностью данной патологии. По данным Всемирной организации здравоохранения, число лиц с поражением спинного мозга составляет около 30 человек на 100 тыс. населения. Из-за нарушения уродинамики, нейрогенный мочевой пузырь может способствовать поражению верхних мочевыводящих путей вплоть до развития хронической болезни почек. Таким образом, очевидна необходимость развития новых методик лечения заболеваний нижних мочевыводящих путей, что требует проведения соответствующих экспериментальных исследований.

Недавние работы показали, что локомоторная тренировка в сочетании с электрической стимуляцией приводит к восстановлению у парализованных спинальных животных и человека не только сенсомоторных функций (ходьба, мышечный тонус, поддержка веса тела и баланса), но и функций висцеральных систем, в частности, функции мочевого пузыря (Horstetal., 2010, 2011; Narkemaetal., 2011). Механизмы такого интегративного сомато-висцерального контроля на уровне спинного мозга требуют изучения, что имеет не только фундаментальное, но и практическое значение, в частности, для разработки концепции реабилитации спинальных больных.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – изучение нейронных механизмов, обеспечивающих соматовисцеральную интеграцию локомоторной и мочевыделительной систем.

Для достижения этой цели были поставлены следующие *задачи*:

1. Разработать острую децеребрированную модель кошки для исследования интеграции сенсорной и мочевыделительной систем.
2. Изучить взаимосвязь между активностью детрузора мочевого пузыря, наружного сфинктера уретры, мышц конечностей во время локомоторных и висцеральных тестов на острой децеребрированной модели кошки.
3. Провести сравнительный анализ распределения спинальных висцеральных нейронов, активированных при локомоторной активности кошки, методом иммуногистохимического выявления продукта гена раннего ответа *c-fos*.
4. Разработать хроническую модель крысы с одновременной регистрацией электромиографических и цистометрических сигналов от нижних мочевыводящих путей вместе с электромиографическими и кинематическими двигательными паттернами задних конечностей.
5. Исследовать эффекты электростимуляции распределенных ростокаудально спинальных нейронных сетей для нейромодуляции детрузорной и сфинктерной активности на хронической модели крысы.

Научная новизна

Созданы две новые модели для изучения механизмов интеграции функции нижних мочевыводящих путей и спинальных локомоторных сетей: (1) острая модель децеребрированной кошки с одновременной регистрацией электромиографических (ЭМГ) и цистометрических сигналов от нижних мочевыводящих путей вместе с электромиографическими и кинематическими двигательными паттернами задних конечностей; (2) хроническая модель крысы с одновременной регистрацией электромиографических и цистометрических сигналов от нижних мочевыводящих путей вместе с электромиографическими и кинематическими двигательными паттернами задних конечностей. С помощью данных моделей проведено картирование нейронных сетей спинного мозга путем сайт-специфической стимуляции его люмбо-сакральных сегментов, а также нейроморфологическое исследование паттерна распределения в спинальных нейронах раннего гена *c-fos*. С учётом полученных данных, в частности, выявлена взаимосвязь между топикой активированных нейронных сетей и локализацией в сером веществе нейронов, контролирующей работу стопы. Это позволило провести отдельное исследование, посвящённое активации висцеральных спинальных нейронов в ходе двух локомоторных паттернов, в разной степени активирующих рецепторы стопы (ходьба вперёд и ходьба назад). Показано, что при

ходьбе назад активируется большее число висцеральных нейронов спинного мозга, чем при ходьбе вперёд.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Существует тесная взаимосвязь активности локомоторного аппарата и мочевыделительной системы.
2. Локомоция приводит к активации висцеральных нейрональных популяций спинного мозга.
3. Электростимуляция распределенных ростокаудально сенсомоторных и висцеральных нейронных сетей спинного мозга может использоваться для нейромодуляции активности мышц нижних мочевыводящих путей.

Теоретическая и практическая значимость работы

Созданные экспериментальные модели позволяют изучать тонкие физиологические механизмы взаимодействия мочевыделительной и двигательной систем на уровне спинного мозга. Полученные данные позволяют предсказывать вектор изменения функционирования нижних мочевыделительных путей при нарушении спинального контроля, например, при травме спинного мозга. Результаты данной работы могут быть также использованы при разработке и оптимизации новых стратегий нейрореабилитации, основанных на сочетании эпидуральной стимуляции спинного мозга и локомоторной тренировки. Полученные результаты могут лечь в основу метода комплексного восстановления работы сенсомоторной и мочевыделительной систем при поражении спинного мозга.

Методы и материалы

Острая модель децеребрированной кошки

Исследование было проведено на 15 взрослых кошках весом от 2,5-4,0 кг. Восемь животных использовали для регистрации электромиографической активности нижних мочевых путей и конечностей, семь животных – для иммуногистохимического выявления продукта гена *c-fos*.

Хирургические процедуры и децеребрация

Все хирургические процедуры и децеребрацию проводили под общим ингаляционным наркозом (смесь изофлюрана (1,5-3%) и кислорода). Для регистрации электрической активности мышц задних конечностей и мышц нижних мочевыводящих путей были имплантированы биполярные электромиографические электроды: в икроножную мышцу (*m. gastrocnemius lateralis*, разгибательная мышца голеностопного сустава), большеберцовую мышцу (*m. tibialis*, сгибательная мышца голеностопного сустава), мышцу мочевого пузыря – детрузор и во

внешний сфинктер уретры (гибкие провода из нержавеющей стали с тефлоновой изоляцией 0,2 мм; AS632, CooperWire, Chatsworth, CA). В мочевой пузырь был также имплантирован катетер (Perifix 401, 18G), который был подключен к датчику давления (MLT0670, AU).

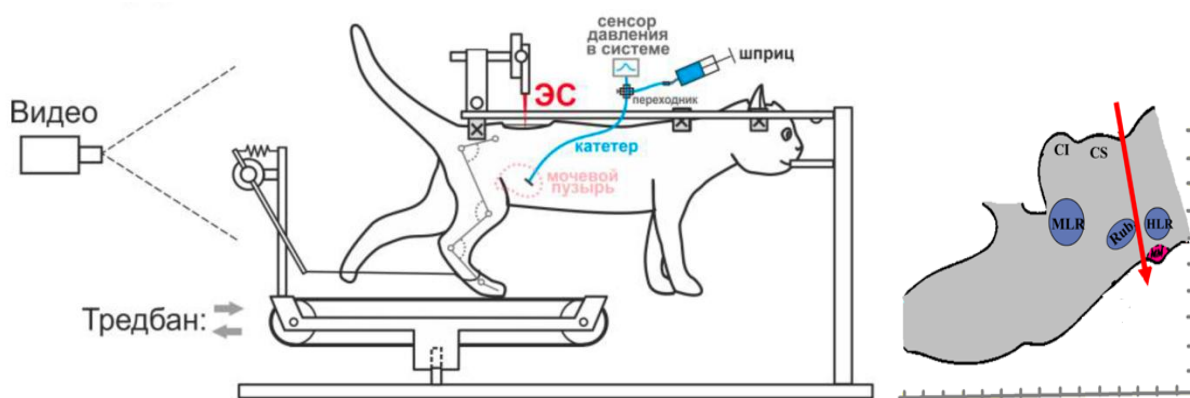


Рис. 1. Модель децеребрированной кошки (слева) и уровень децеребрации на изображении сагиттального среза ствола (справа). ЭС – эпидуральная стимуляция, MLR – мезенцефалическая локомоторная область, Rub – красное ядро, HLR – гипоталамическая локомоторная область, CS – верхнее двуххолмие. CI – нижнее двуххолмие, ММ – мамиллярные тела.

Во время децеребрации ствол головного мозга отсекался преколликкулярно-постмамиллярном уровне (Рис.1), согласно ранее разработанному протоколу (по: Шик и др, 1966). Для получения доступа к поверхности спинного мозга с целью проведения эпидуральной стимуляции (ЭС), производили ламинэктомию на уровне 4-5 люмбальных позвонков.

Локомоторные и висцеральные тесты

Эксперименты начинали через 2-3 ч после завершения хирургических процедур. Локомоторные тесты подразделялись на 2 типа: 1) активная локомоция; 2) пассивная локомоция. В первом случае, локомоцию вызывали эпидуральной стимуляцией люмбальных сегментов L5-L7 с помощью шарикового электрода шириной 0,5 мм (использовались следующие параметры стимуляции: частота стимуляции 5 Гц, длительность стимула 0,3-0,5 мс, сила тока 220-300 мкА). Для вызова определённого локомоторного паттерна (ходьба вперёд или назад) проводили предварительное картирование люмбального отдела, в поиске оптимальной точки стимуляции. Во втором случае, задние конечности животного перемещали вручную вперед и назад, имитируя реальные двигательные движения, по разработанной ранее схеме (Gerasimenko et al., 2009). Скорость движения тредбана составляла 0,45 м/с.

Для запуска экспрессии гена раннего ответа *c-fos* в нейронах спинного мозга, вызывали длительную (в течение 1,5-2,0 ч) локомоцию животного, состоящую из коротких сеансов (по 1-2 минуты с перерывами по 4-5 мин. У трёх животных вызывали ходьбу вперёд (ХВ) (кошки ХВ1, ХВ2, ХВ3), у трёх – ходьбу назад (ХН) (кошки ХН1, ХН2, ХН3). Контрольное животное было подвергнуто тем же хирургическим процедурам, но период эпидуральной стимуляции и

период двигательной активности были значительно короче – 30 минут. В течение этого периода животное ходило как вперед, так и назад.

Во время висцеральной части эксперимента через приводящий катетер с помощью шприцевого насоса (ZOOMED SN-1600 V, RU) вводили 0,9% физиологический раствор комнатной температуры и измеряли внутрипузырное давление (регистрировали цистометрический сигнал). Одновременно проводили регистрацию электромиографической активности детрузора и наружного сфинктера уретры (НСФУ); а также регистрировали урофлуометрический сигнал. Параллельные изменения четырёх сигналов позволяли точно определять эпизоды уродинамического цикла (наполнение мочевого пузыря, удержание мочи, изгнание мочи).

Анализ нейрофизиологических данных

Для сопоставления активности мочевыделительной и локомоторных систем проводили одновременную регистрацию кинематической и ЭМГ активности конечностей, ЭМГ активности и цистометрического сигнала от нижних мочевыводящих путей.

Регистрацию кинематики движений проводили: 1) с помощью потенциометров, прикрепленных к лодыжке экспериментального животного; 2) посредством трёхсторонней видеорегистрации (25 кадр/сек, видеокамеры располагались сзади, слева и справа от животного). В первом случае, выявляли основные характеристики локомоторного цикла для каждой из лап: длину шага, длительность целого локомоторного цикла, длительность опорной фазы, длительность фазы переноса, частоту шага. Во втором случае, оценивали углы отклонения в основных суставах конечностей при сгибании и разгибании бедра, колена и лодыжки в разные моменты локомоторного цикла, используя программный комплекс VirtualDubMod 1.5.10.1.

При анализе ЭМГ активности оценивали интегральную амплитуду ответа (в мВ) во время разных фаз локомоторного и мочевыделительного циклов. При анализе цистометрического сигнала (в мм.рт.ст.) оценивали приращение внутрипузырного давления при наполнении мочевого пузыря и при различных локомоторных тестах. Все сигналы анализировали в программе MatLab (ver2.0).

Перфузия и гистологическая обработка материала

После окончания эксперимента, с целью определения точной локализации точек стимуляции, и для последующего морфологического исследования, проводили перфузионную фиксацию материала и последующую диссекцию. Перфузию последовательно растворами NaCl и 4% параформальдегида проводили транскардиально под глубоким наркозом (5% изофлюран). По окончании перфузии, спинной мозг люмбо-сакрального отдела выделяли из позвоночного канала и делили на сегменты в соответствии с положением дорсальных корешков

(Shkorbatovaetal., 2019). На замораживающем микротоме изготавливали поперечные срезы сакрального сегмента S2 толщиной 50 мкм. У каждого животного брали для иммуногистохимического выявления гена *c-fos* использовано по пять равноотстоящих друг от друга срезов. Выявление продукта экспрессии гена *c-fos* осуществляли с помощью стандартного непрямого иммуногистохимического метода (Merkulyevaetal., 2018).

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программе Prism7 (GraphPadSoftware, Inc.). Статистический анализ данных проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни и критерия иерархической линейной модели (Aartsetal., 2014).

Хроническая модель крысы

Для изучения тонких механизмов влияния ЭС на симпатические, парасимпатические и соматические нейронные сети, контролирующие рефлекторную активность НМП, была создана хроническая модель крысы (**Рис. 2**). Исследования выполнены на 12 взрослых самцах линии Вистар (масса тела 300-350 г). Спустя 4 недели после проведения хирургических процедур проводили тестирование на бодрствующих крысах, помещенных в прозрачную пластмассовую коробку; кабель от записывающего и стимулирующего оборудования был прикреплён к коннектору на голове.

Хирургические процедуры

Имплантацию ЭМГ электродов в детрузор, наружный сфинктер и мышцы конечностей: икроножную мышцу (*m. gastrocnemiuslateralis*), большеберцовую мышцу (*m. tibialis*) проводили по методике, описанной выше. Для хронической имплантации эпидуральных электродов была выполнена частичная ламинэктомия; провода из нержавеющей стали с тефлоновым покрытием (AS632, CoonerWire, Chatsworth CA) были проведены под дугами позвонков внутри позвоночного канала до коннектора, закреплённого на черепе. В мочевой пузырь имплантировали катетер (IntramedicPolyethyleneTubing ID. 0,28 мм OD. 0,61 мм), следя за тем, чтобы его свободный конец не касался стенок мочевого пузыря. Поступление жидкости в мочевой пузырь через катетер обеспечивали с помощью канюли, установленной на свободном конце катетера (**Рис. 2**).

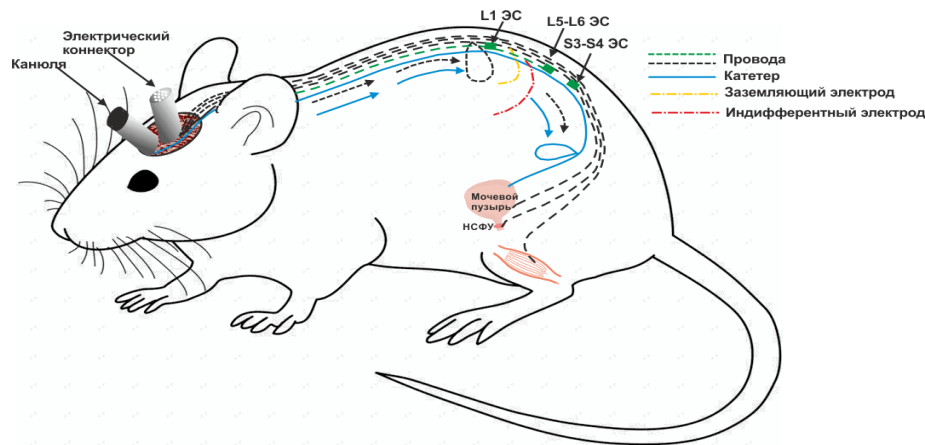


Рис. 2. Хроническая модель крысы для изучения механизмов соматовисцеральной интеграции. ЭС – эпидуральная стимуляция, L1, L5-L6 – люмбальные сегменты СМ, S3-S4 – сакральные сегменты СМ.

Картирование вызванной активности висцеральных и сенсомоторных сетей спинного мозга

Для изучения спинальных нейронных сетей, контролирующих сенсомоторную и висцеральную активность, регистрировали вызванные потенциалы мышц в ответ на эпидуральную стимуляцию разных отделов спинного мозга. Активация висцеральных путей осуществлялась стимуляцией на уровне позвонка V12 в области спинальных сегментов L1 (Hou, Rabchevsky, 2014). Для активации парасимпатических и соматических висцеральных нейрональных популяций стимулировали на уровне позвонков VL1-VL2 в области сегментов L5-L6 (Ishigooka et al. 2000). Также осуществляли эпидуральную стимуляцию на уровне позвонков VL2-VL3 в области сегментов S3-S4 и спинальных корешков, несущих афферентные и эфферентные волокна к/от многих вышележащих сегментов.

Стимуляцию (частота 1 Гц, сила тока 50-800 мкА, с шагом 50 мкА, по 10 импульсов для каждой амплитуды стимуляции, длительность импульса 0,2 мс) осуществляли с помощью проволочных электродов, имплантированных на 3 уровня спинного мозга (Рис. 2). Во время стимуляции животное находилось в коробке без движения. Сигналы ЭМГ дифференциально усиливались (А-М Systems USA, модель 1700, полоса пропускания 10 Гц - 5 кГц) и оцифровывались на частоте 20 кГц с помощью платы National Instrument A/D. Сигнал от НСФУ фильтровали полосовым фильтром в диапазоне 100–2000 Гц; полосовая фильтрация 0-0,1 Гц и 10-40 Гц применялась к сигналам цистометрии и детрузора соответственно. Сигналы анализировали в программе MatLab (ver2.0). Вызванные потенциалы позволяли анализировать степень рекрутирования спинномозговых систем, ответственных за контроль НМПи задних конечностей (Hou and Rabchevsky, 2014).

Уродинамическое тестирование

Для оценки накопительной и эвакуаторной функции НМП, оценивали объем накопления (объем введенного физиологического раствора для начала мочеиспускания) и продолжительность активности НСФУ (Abud, 2015) во время мочеиспускания, вызванного непрерывной инфузией мочевого пузыря, соединённого катетером синфузионным насосом (ZOOMED SN-1600 V, RU). Скорость инфузии (0,9% раствор NaCl, RT) во время тестирования составляла 18 мл/ч. Проводили по 3-4 цикла инфузии.

Локомоторное тестирование

Для проверки влияния локомоции на активность НМП, оценивали ЭМГ сигналы от детрузора и НСФУ при ходьбе по неподвижной дорожке. Для анализа выбирали участки записи, содержащей свободную локомоцию длительностью не менее 3 шагов левой и правой лапой; у каждого животного взято в анализ 10-20 участков интереса.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программе Prism7 (GraphPadSoftware, Inc.). Анализ проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни и критерия иерархической линейной модели (Aartsetal., 2014). Уровень критерия для определения статистической разницы был установлен на уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения

Активность нижних мочевыводящих путей во время локомоторных тестов острой децеребрированной кошки

Включение эпидуральной стимуляции с оптимальными параметрами инициировало шагательные движения задних конечностей вперед или назад, в зависимости от направления беговой дорожки, через несколько секунд после включения. Активация мочевыделительных путей при запуске локомоции визуализировалась как на цистометрическом сигнале, так и на ЭМГ сигнале детрузора и наружного сфинктера уретры (**Рис. 3**).

По окончании ЭС локомоция прекращалась, и активность мочевыделительной системы также возвращалась к исходному уровню. Для исключения неспецифического воздействия на мочевыделительную систему ЭС, также проанализирован сигнал мышц НМП во время пассивной локомоции. Как и в случае локомоции, вызванной ЭС, ЭМГ сигналы НМП не только усиливались при локомоции, но и отражали локомоторный ритм (**Рис. 4**).

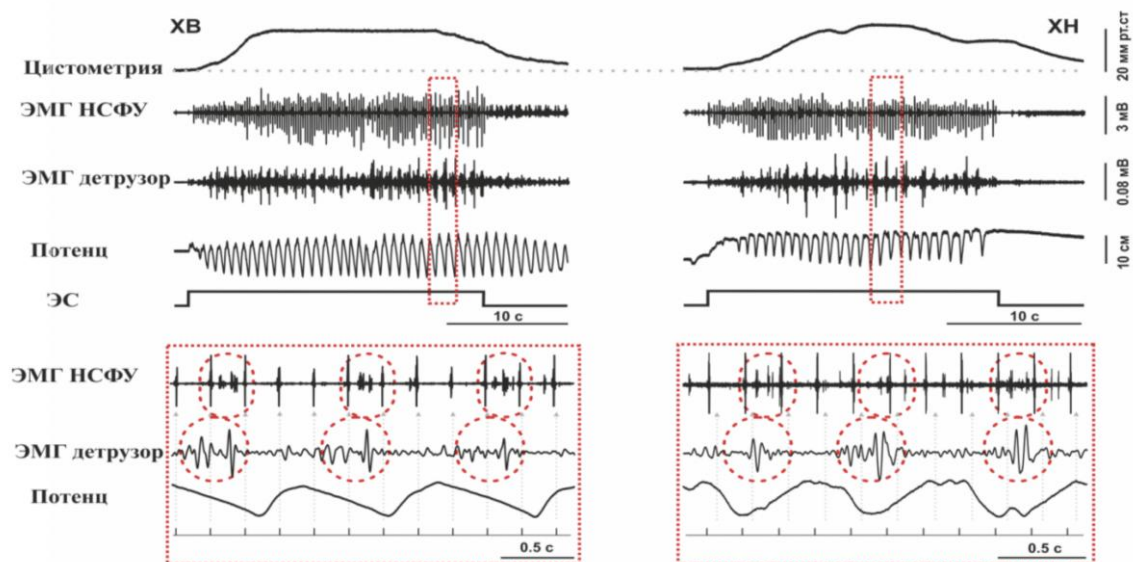


Рис. 3. Активность нижних мочевыводящих путей при активной ходьбе в разных направлениях, вызванной эпидуральной стимуляцией спинного мозга. ХВ – ходьба вперед; ХН – ходьба назад; Цистометрия – цистометрическая кривая; НСФУ – наружный сфинктер уретры; Потенц – потенциометрическая кривая; ЭС – эпидуральная стимуляция.

Таким образом, паттерны активации мочевого пузыря и задних конечностей показывают, что спинальные нейронные сети, контролирующие работу детрузора мочевого пузыря и наружного сфинктера уретры, ритмически активируются при локомоторной активности.

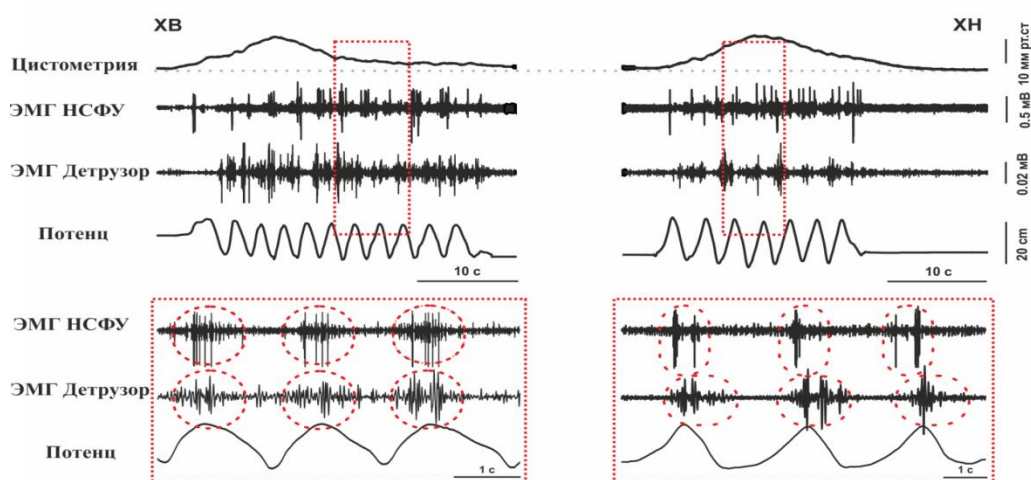


Рис. 4. Активность нижних мочевых путей при ходьбе в разных направлениях во время пассивной локомоции. ХВ – ходьба вперед; ХН – ходьба назад; Цистометрия – цистометрическая кривая; НСФУ – наружный сфинктер уретры; Потенц – потенциометрическая кривая.

Двигательная активность конечностей децеребрированной кошки при мочеиспускании

В тесте с контролируемым мочеиспусканием проверялись висцеро-соматические влияния. Через уретральный катетер вводилась жидкость в МП, при поступлении которой возрастало давление в мочевом пузыре и сокращение детрузора. При этом регистрировалось также двигательная активность конечностей и давление лап на тредбан. При дальнейшем введении

жидкости в МП и росте внутрипузырного давления возникало более активное движение лап с последующим мочеиспусканием, что было видно по смещению вверх урофлоуметрической (Uroflow) кривой (**Рис. 5**).

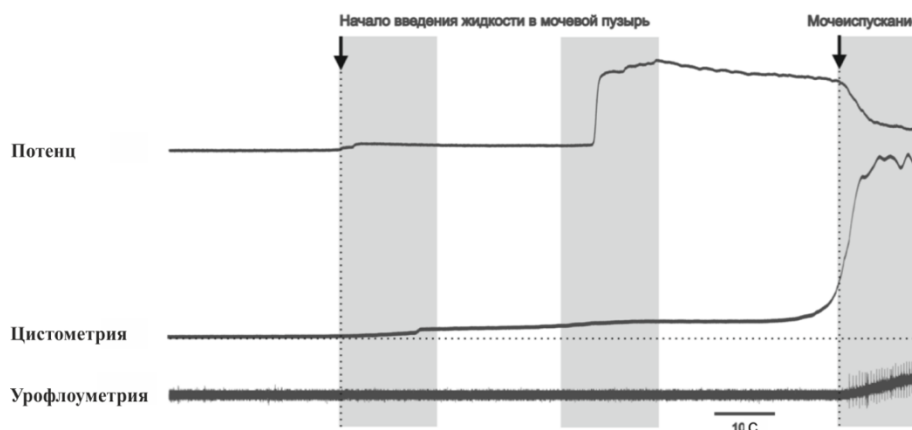


Рис. 5. Тест на висцеро-соматические взаимодействия. Введение жидкости в мочевой пузырь вызывает увеличение внутрипузырного давления (Цистометрия) и затем движение задней конечности с давлением на опорную поверхность (Потенци). При дальнейшем увеличении внутрипузырного давления возникает более активное движение лап и мочеиспускание, что видно по смещению вверх урофлоуметрической кривой (Урофлоуметрия). Потенци – потенциометрическая кривая. Урофлоуметрия – урофлоуметрическая кривая. Цистометрия – цистометрическая кривая.

Распределение *c-fos*-иммунопозитивных нейронов в сером веществе сакрального отдела спинного мозга кошки

Взаимосвязь паттернов активации мочевого пузыря и задних конечностей предполагает, что спинальная висцеральная сеть стала активной во время ходьбы. Чтобы получить прямое доказательство этого, в спинальном сегменте S2 выявлен паттерн распределения активированных локомоцией нейронов, с использованием техники иммуногистохимического мечения продукта гена раннего ответа *c-fos*, экспрессия которого коррелирует с уровнем нейрональной активности (Lee et al., 2003). Было выбрано два локомоторных теста: ходьба вперёд и ходьба назад, которые имеют различное распределение управляющих нейронных сетей в спинном мозге (Merkulyeva et al., 2018).

У животных обеих групп иммунопозитивные ядра выявлены не только в пределах локомоторных отделов спинного мозга, но и в разных областях серого вещества сегмента S2 (**Рис. 6. А**). Для доказательства принадлежности данных областей к нейронным сетям, ответственным за висцеральный контроль, проводили добавочное мечение серого вещества антителами к NO-синтазе (NOS) и Ca²⁺-связывающему белку кальретинину, маркирующими определённые популяции висцеральных нейронов: преганглионарные парасимпатические нейроны и нейроны дорзальной серой комиссуры (DGC) (Ren, Ruda, 1994), а также сопоставляли паттерны распределения *c-fos*-иммунопозитивных нейронов с паттернами распределения нейронов,

маркированных в ходе прямого ретроградного трейсирования (эти паттерны взяты из данных литературы (VanderhorstandHolstege, 1997) (**Рис. 6. Б-В**).

В результате сопоставления нескольких паттернов, была создана схема деления серого вещества сакрального отдела спинного мозга (**Рис.6. Г**). В её основу было также положено геометрическое деление серого вещества, предложенное (М. Matsushita., 1970) и используемое нами для создания схемы функционального деления люмбального отдела спинного мозга (Merkulyevaetal., 2018). Согласно схеме, популяции висцеральных нейронов локализованы главным образом в трёх областях: 1) области, расположенной дорзальнеецентрального канала (РС, периканальная область), соответствующей DGC; 2) центрлатеральной области (CL), соответствующей части сакрального парасимпатического ядра (SPN), содержащей парасимпатические нейроны, контролирующие работу мочевого пузыря, и 3) вентролатеральной области (VL), соответствующей части SPN, контролирующей работу толстой кишки (Morganetal., 1979; Nadelhaftetal., 1980; deGroatetal., 1981, 1982). Как видно на рисунке, локализация *c-fos*-иммунопозитивных нейронов соответствует локализации парасимпатических преганглионарных нейронов.

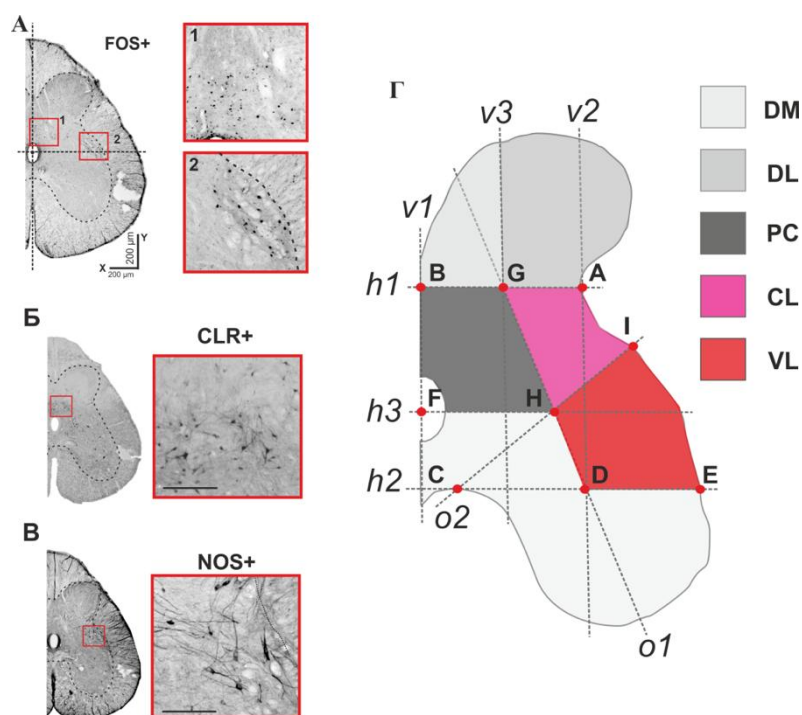


Рис. 6. Распределение *FOS*⁺ нейронов (А), *CLR*⁺ нейронов (Б) и *NOS*⁺ нейронов (В) на поперечном срезе сегмента S2. Группы нейронов, меченных кальретицином (*CLR*⁺), *NO*-синтазой (*NOS*⁺), и *FOS*⁺ клеток представлены в увеличенных вставках. Схема деления серого вещества СМ (Г). Буквами v1, v2, v3, h1, h2, h3, o1 и o2 – показаны основные линии. Буквы А-І – обозначают основные точки. DM – дорсолатеральная область, DL – дорсомедиальная область, РС – периканальная, CL – центрлатеральная область, VL – вентролатеральная область.

Сравнение различных локомоторных паттернов показало, что паттерны распределения *c-fos*-иммунопозитивных нейронов при ходьбе в разных направлениях (ходьбе вперёд и ходьбе

назад) не являются идентичными; наибольшие различия показаны для области VL, в которой при ходьбе назад выявлено большее число меченых клеток ($5,37 \pm 0,68\%$ против $10,46 \pm 0,89\%$; $p = 0,0022$) (Рис.7). На основании этих данных мы можем предположить, что наибольшее число интегративных висцеро-соматических нейронов связаны с активностью сакрального парасимпатического ядра. В сегменте S2, помимо висцеральных сетей, также локализовано представительство стопы (VanderhorstandHolstege, 1997). При этом известно, что эффект соматовисцерального влияния наблюдается у пациентов с нейрогенным мочевого пузырем после травмы спинного мозга: электрическая стимуляция соматических афферентных нервов в стопе увеличивала объем мочевого пузыря (Chenetal., 2015).

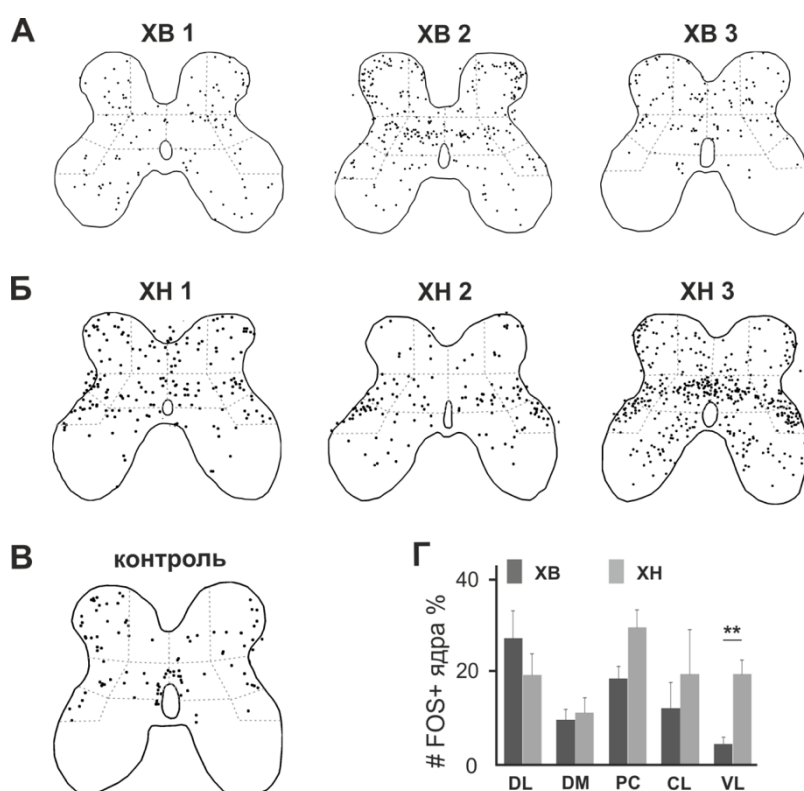


Рис. 7. Распределение *c-fos*-иммунопозитивных (*FOS* +) клеток в сером веществе спинного мозга. Общий вид сакральных срезов с *FOS* + клетками, у животных, ходящих вперед (А), ходящих назад (Б), и у контрольного животного (В). Тонкие пунктирные линии очерчивают границы областей интереса. Процентное количество ядер *FOS* + в областях интереса (DL, DM, PC, CL и VL) у кошек, ходящих ХВ и ХН. ** - $p < 0,01$. Г - процентное количество ядер *FOS* + в интересующих областях (DL, DM, PC, CL и VL) у кошек, ходящих ХВ и ХН. ** - $p < 0,01$. DM – дорсолатеральная область, DL – дорсомедиальная область, PC – периканальная, CL – центрлатеральная область, VL – вентролатеральная область.

Двигательная активность конечностей при мочеиспускании хронической модели крысы

Для проверки работоспособности созданной хронической животной модели и оценки висцеросоматических влияний проведено тестирование функции НМП. Как видно на Рис.8, наполнение мочевого пузыря вызывает постепенный прирост цистометрического сигнала и усиление активности НСФУ и детрузора непосредственно перед и во время мочеиспускания. Сигнал цистометрии постепенно нарастал по амплитуде одновременно с возникновением детрузорной активности. Кроме регистрируемых висцеральных сигналов при

уродинамическом цикле (Abudetal., 2015) тоническая активность во время мочеиспускания была обнаружена в экстензорной икроножной мышце.

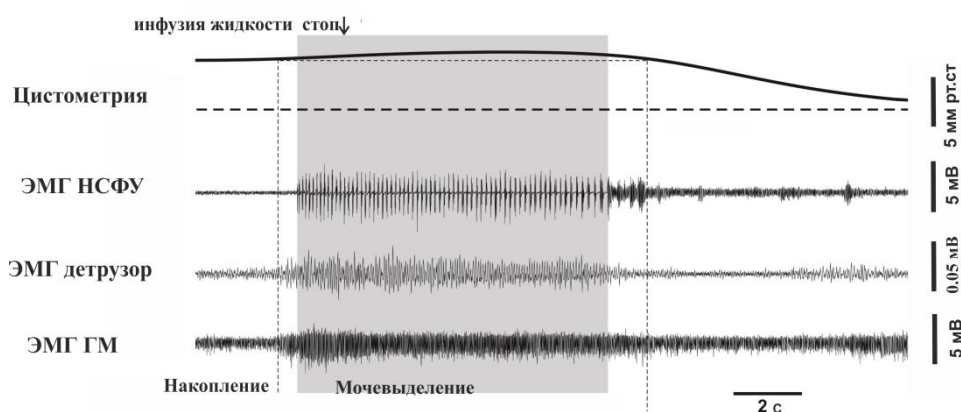


Рис. 8. Цистометрия и сигналы НСФУ, детрузора и ГМ во время мочеиспускания. Мочеиспускание (левый край серой области) сопровождается повышением внутрипузырного давления (сигнал цистометрии), активностью НСФУ и увеличением тонической активности мышц детрузора и ГМ. Цисто - цистометрия, НСФУ - наружный сфинктер уретры, ГМ - икроножная мышца.

Активность нижних мочевыводящих путей во время локомоторных тестов хронической модели крысы

Во время локомоторного теста (свободное перемещение животного по плоской поверхности) выявлено приращение ЭМГ активности НСФУ и детрузора; приращение происходит сразу после начала локомоции и завершается по её окончании (**Рис.9 А**). Прирост активности детрузора на ЭМГ составлял от 171% до 291% ($238 \pm 32\%$), для НСФУ - от 141% до 304% ($225 \pm 53\%$). Прирост активности ЭМГ мышцы ТА варьировал от 260% до 1260% ($590 \pm 280\%$) (**Рис.9В**).

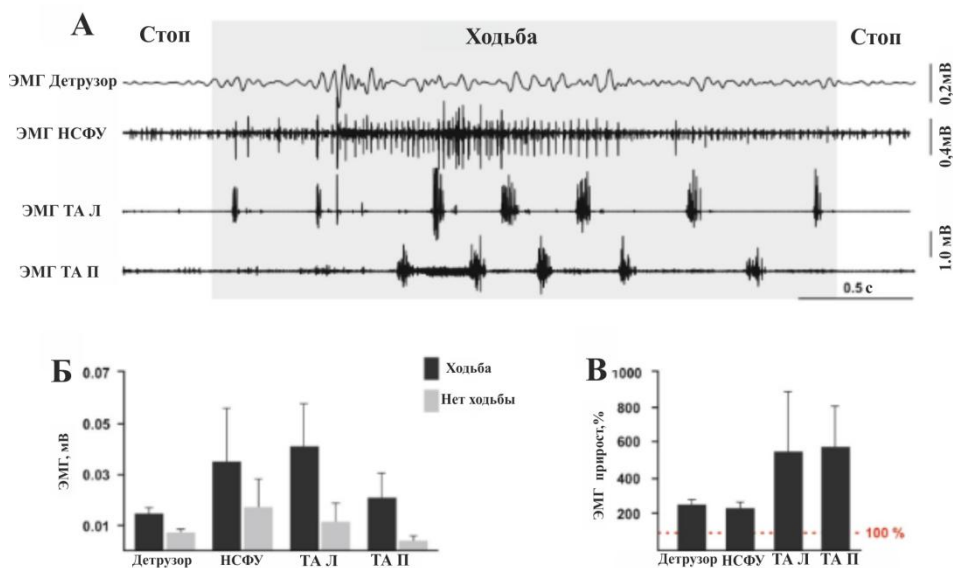


Рис. 9. Активность нижних мочевыводящих путей при ходьбе крысы (хроническая модель) (А). Разница между сигналами ЭМГ активности мышц НМП и мышц конечностей (ТА) при ходьбе и покое (Б). Уровень усредненного приращения сигналов ЭМГ активности мышц НМП и мышц конечностей (В).

Полученные данные на хронической модели крысы, как и результаты эксперимента на острой модели, свидетельствуют о существовании тесной взаимосвязи между активностью локомоторных и висцеральных спинальных сетей.

Функциональное картирование спинного мозга крысы

Проведен анализ рефлекторной активности мышц НМП и задних конечностей на хронической модели при эпидуральной стимуляции разных отделов спинного мозга. Как было сказано выше, стимулировали три области, содержащие симпатические висцеральные нейроны (верхне-люмбальный отдел), парасимпатические и соматические висцеральные нейрональные популяции (нижне-люмбальный отдел), и сакральный отдел в области сегментов S3-S4 и спинальных корешков, несущих афферентные и эфферентные волокна к/от многих вышележащих сегментов, в которых преимущественно располагаются сенсомоторные нейронные пути.

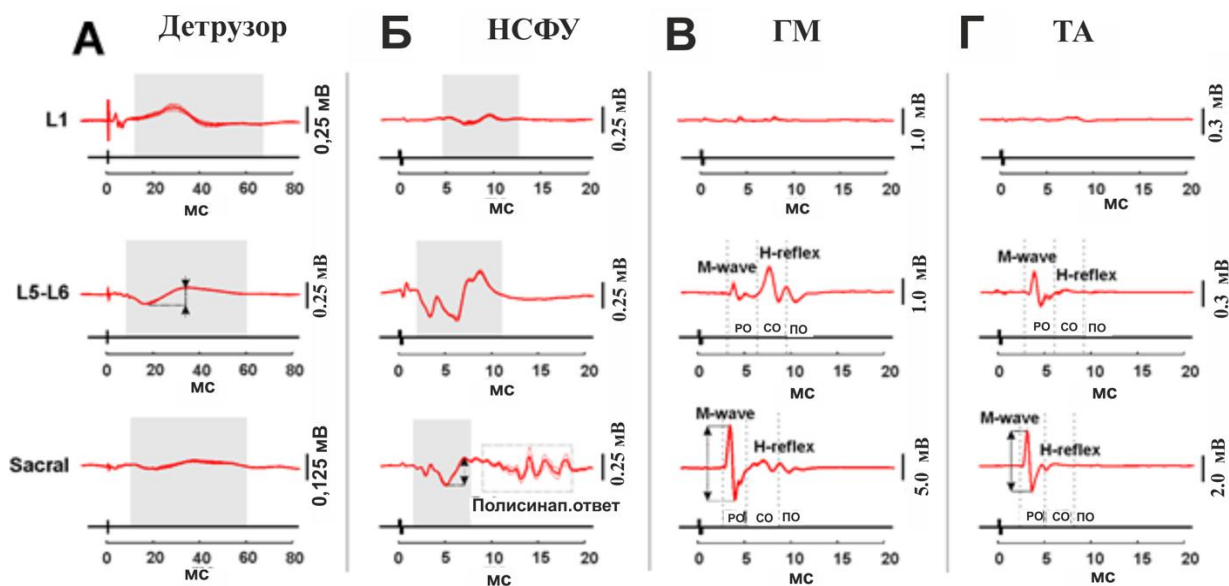


Рис. 10. Средние вызванные потенциалы от детрузора (А), НСФУ (Б), ГМ (В) и ТА (Г) ($n = 10$ импульсов стимуляции с частотой 1 Гц) во время ЭС при максимальной интенсивности верхнего поясничного отдела (L1), нижнего поясничного (L5-L6) и крестцового отдела спинного мозга через 4 недели после операции. Серые области показывают вызванные потенциалы в детрузоре, и НСФУ во время стимуляции спинного мозга. Рефлекторная активность ГМ и ТА была разделена на ранний ответ (РО), средний ответ (СО) и поздний ответ (ПО) серыми пунктирными линиями. Рассчитанная задержка ответов соответствует левому краю серой области для детрузора и НСФУ и серой пунктирной линии для раннего ответа (РО) и среднего ответа (СО) ГМ и ТА. Амплитуда ответа обозначена двусторонней стрелкой между пунктирными линиями.

Эпидуральная стимуляция верхне-люмбального отдела вызывала значительный ответ детрузора и слабый ответ НСФУ; ответы мышц задних конечностей (икроножной и большеберцовой) были менее выражены и отмечались не у всех животных. Латентность ответов детрузора была значительно больше, чем у НСФУ ($10,27 \pm 0,50$ и $3,77 \pm 0,29$ мс, $p < 0,01$) (Рис.10). Вызванный потенциал детрузора представлен медленной волной длительностью 20-40 мс, состоящей из

положительных и отрицательных пиков; ответы НСФУ короче и могли содержать несколько положительных и отрицательных волн. В обеих мышцах наблюдаемые ответы были стабильными, и их амплитуда постепенно увеличивалась с увеличением силы стимуляции (Рис.11).

Эпидуральная стимуляция ниже-люмбального отдела приводила к явным ответам во всех регистрируемых мышцах. Как и в предыдущем случае, латентный период вызванного потенциала детрузора был больше, чем у НСФУ ($7,21 \pm 0,23$ мс и $1,71 \pm 0,20$ мс; $p < 0,01$). Латентные периоды ответов обеих мышц НМП были короче ($p < 0,01$), чем ответы на стимуляцию верхне-люмбального отдела (Рис. 10). Вызванный потенциал детрузора представлял собой медленную волну, состоящую из отрицательного и положительного компонентов; вызванный потенциал НСФУ содержал одну, или несколько пар положительных и отрицательных пиков. Форма вызванных ответов детрузора и НСФУ была стабильной, а их амплитуда возрастала по мере увеличения амплитуды стимуляции; по достижении субмаксимального уровня стимуляции, амплитуда или уменьшалась, или прекращалась приращать (Рис.11).

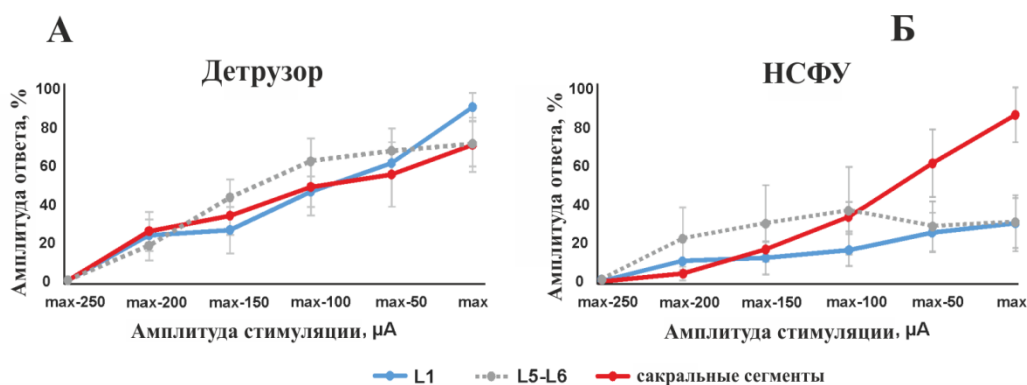


Рис. 11 А, Б Кривые рекрутирования нормализованных ответов детрузора (А) и НСФУ (Б) во время стимуляции верхнего поясничного, нижнего поясничного и крестцового отделов.

Ответы икроножной и большеберцовой мышц разделялись на два компонента: (1) ранний ответ или М-волна моторного аксона ($2,96 \pm 0,14$ мс и $2,91 \pm 0,18$ мс, для мышц ГМ и ТА соответственно); (2) средний ответ или первичная афферентная Н-волна ($5,49 \pm 0,56$ мс и $5,32 \pm 0,48$ мс, для ГМ и ТА соответственно). При увеличении силы стимуляции наблюдалось подавление Н-волны и усиление М-волны, что полностью отражает классическую картину поведения этих компонентов ответа (Hoffman et al., 1910; Gerasimenko et al., 2006).

Вызванный потенциал детрузора при эпидуральной стимуляции сакрального отдела состоял из медленной волны с отрицательными и положительными пиками; ответы НСФУ были быстрыми и короткими, содержали один или несколько положительных и отрицательных пиков. Латентный период вызванного ответа детрузора был больше, чем у НСФУ ($7,50 \pm 0,56$ мс

и $1,34 \pm 0,09$ мс; $p < 0,01$) (**Рис.10**). Все зарегистрированные мышцы имели значительно более короткие ($p < 0,01$) латентные периоды, чем при стимуляции люмбального отдела (**Рис.10**). Вызванные потенциалы мышц конечности были аналогичны таковым при стимуляции нижне-люмбального отдела, и состояли из М-волны (латентность $1,87 \pm 0,10$ мс и $1,96 \pm 0,06$ мс, для ГМ и ТА соответственно) и Н-волны (латентность $5,49 \pm 0,24$ мс и $5,43 \pm 0,23$ мс, для ГМ и ТА соответственно). Увеличение силы стимуляции (~ 450 мкА и выше) вызывала у всех животных полисинаптические ответы в НСФУ длительностью 7-10 мс.

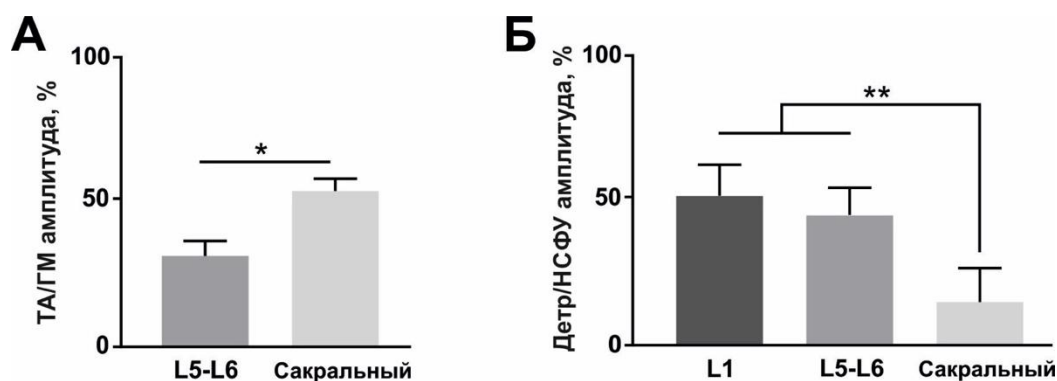


Рис. 12. А-Отношение амплитуд активности флексора (ТА) и экстензора (ГМ) при стимуляции нижнепоясничного (L5-L6) и сакрального отделов спинного мозга. Б - Отношение амплитуд активности детрузора (Детр) и наружного сфинктера уретры (НСФУ) при стимуляции верхнепоясничного (L1), нижне-поясничного (L5-L6) и сакрального отделов спинного мозга.

Полученные данные демонстрируют возможность сайт-специфической нейромодуляции не только мышц конечностей (**Рис. 12А**), но и системы НМП при ЭС верхне-поясничного, нижне-поясничного и крестцового отделов спинного мозга у хронических крыс (**Рис. 12Б**). Преимущественная активация детрузора происходит во время стимуляции верхнего поясничного (L1) и нижнего поясничного (L5-L6) сегментов спинного мозга, тогда как наружный сфинктер уретры больше активизируется сакральной стимуляцией.

Выводы

1. Эпидуральная стимуляция поясничного утолщения спинного мозга является эффективным методом согласованной активации локомоторной и мочевыделительной систем децеребрированной кошки.
2. На острой модели кошки и хронической модели крысы были получены нейрофизиологические данные о висцеро-соматических и сомато-висцеральных влияниях. Мочеиспускание меняет позу животного и вызывает двигательные ответы в задних конечностях. Активная и пассивная ходьба приводит к усилению активности мышц нижних мочевыводящих путей (детрузора мочевого пузыря и наружного сфинктера уретры); характер приращения этой активности отражает особенности сенсорного входа и моторного выхода мышц конечностей.

3. Ходьба в разных направлениях вызывает усиление синтеза продукта экспрессии гена раннего ответа *c-fos* не только в популяциях спинальных нейронов, контролирующих локомоцию, но и в зонах серого вещества, контролирующего мочеиспускание: сакральном парасимпатическом ядре и дорзальной серой комиссуре; распределение активированных нейронов отражает кинематические и миографические особенности локомоторного паттерна.

4. На хронической модели крысы проведено картирование функциональных зон спинного мозга эпидуральной стимуляцией люмбо-сакрального отдела. Выявлено, что электростимуляция распределенных ростокаудально сенсомоторных и висцеральных нейронных путей спинного мозга может использоваться не только для вызова двигательных ответов в конечностях, но и для нейромодуляции активности мышц нижних мочевыводящих путей.

Список публикаций по теме научно-квалификационной работы

1. Павлова Н.В., Богачева И.Н., Баженова Е.Ю., Горский О.В., Мошонкина Т.Р., Герасименко Ю.П. Восстановление двигательных функций у спинализированных крыс при электрической стимуляции спинного мозга и локомоторной тренировке. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, (2019). Т. 105, № 5, стр. 565-577
2. Попов А.А., Ляховецкий В.А., Меркульева Н.С., Горский О.В., Баженова Е.Ю., Мусиенко П.Е. (2019.) Кинематика локомоторных движений крыс в течение 7-дневного вывешивания. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*. Том 105, № 4, с. 447–455
3. Merkulyeva, N., Lyakhovetskii, V., Veshchitskii, A., Bazhenova, E., Gorskii, O., & Musienko, P. (2019). Activation of the spinal neuronal network responsible for visceral control during locomotion. *Experimental neurology*, 320, 112986.
4. Shkorbatova, P. Y., Lyakhovetskii, V. A., Merkulyeva, N.S., Veshchitskii, A. A., Bazhenova, E. Y., Laurens, J., & Musienko, P. E. (2019). Prediction algorithm of the cat spinal segments lengths and positions in relation to the vertebrae. *The Anatomical Record*, 302(9), 1628-1637.
5. Sysoev, Y., Bazhenova, E., Lyakhovetskii, V., Kovalev, G., Shkorbatova, P., Islamova, R., Pavlova, N., Gorskii, O., Merkulyeva, N., Shkarupa, D. & Musienko, P. (2020). Site-specific neuromodulation of detrusor and external urethral sphincter by epidural spinal cord stimulation. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 14.
6. Shkorbatova, P., Lyakhovetskii, V. A., Pavlova, N., Gorskii, O., Kalinina, D., & Bazhenova, E. Musienko, P. (2020). Mapping of the spinal sensorimotor network by transvertebral electrical stimulation. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 14, 74.
7. Ляховецкий В.А. Баженова Е.Ю., Павлова Н.В. Мусиенко П.Е. Скелетотопия и размеры сегментов пояснично-крестцового отдела спинного мозга кошки. *Международная научная конференция Научного Парка СПбГУ. Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину. Сборник тезисов. 10 – 12 ноября, 2015. С. 117.*
8. Баженова Е.Ю., Меркульева Н.С., Вещицкий А.А., Горский О.В., Павлова Н.С., Мусиенко П.Е. Исследование спинальных механизмов соматовисцеральной интеграции локомоторной и мочевыделительной систем. *Материалы XIII Международного Междисциплинарного Конгресса – Нейронаука для медицины и психологии. Судак, Крым, Россия, 30 мая – 10 июня 2017 года.*
9. Павлова Н.В., Богачева И.Н., Баженова Е.Ю., Горский О.В., Мошонкина Т.Р., Герасименко Ю.П., Исследование механизмов действия чрескожной электрической стимуляции спинного мозга на модели хронической спинализированной крысы. *Материалы XIII Международного*

Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» Судак, Крым, Россия, 30 мая - 10 июня 2017 года.

10. Баженова Е.Ю., Меркульева Н.С., Вещицкий А.А., Горский О.В., Павлова Н.С., Мусиенко П.Е. Distribution of c-fos positive neurons in the sacral spinal segments of the cat stepping in different directions. Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова 18-22 сентября 2017 г., г. Воронеж.
11. Баженова Е.Ю., Меркульева Н.С., Вещицкий А.А., Горский О.В., Павлова Н.С., Мусиенко П.Е. Исследование влияния локомоторной активности на работу мочевыделительной системы. Материалы Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Современные аспекты интегративной физиологии» Санкт-Петербург Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН. стр. 13–11 октября 2018 года.
12. Попов А. А., Ляховецкий В. А., Меркульева Н.С., Баженова Е. Ю., Горский О. В., Мусиенко П.Е. Влияние двигательной разгрузки задних конечностей в условиях 3-х и 7-дневного вывешивания на кинематику локомоторных движений крысы. Материалы Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Современные аспекты интегративной физиологии». Санкт-Петербург Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН стр. 82, 9–11 октября 2018 года.
13. Баженова Е.Ю., Меркульева Н.С., Ляховецкий В.А., Вещицкий А.А., Горский О.В., Павлова Н.С., Мусиенко П.Е. Особенности активации нижних мочевых путей при разных видах локомоции. Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», посвященной 170-летию со дня рождения И.П. Павлова Санкт-Петербург, 24–26 сентября 2019 года стр.25.
14. П. Ю. Шкорбатова, В. А. Ляховецкий, Н. С. Меркульева, А. А. Вещицкий, Н. В. Павлова, Е. Ю. Баженова, П. Е. Мусиенко Размеры поясничных и крестцовых сегментов спинного мозга кошки в постнатальном онтогенезе. Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», посвященной 170-летию со дня рождения И.П. Павлова. Санкт-Петербург, 24–26 сентября 2019 года стр. 273.

Список литературы

1. Шик М.Л., Северин Ф.В., Орловский Г.Н. Управление ходьбой и бегом посредством электрической стимуляции среднего мозга // Биофизика. – 1966а. – 11. – С.659-666.
2. Aarts E., Verhage M., Veenvliet J.V., Dolan C.V., Van Der Sluis S. A solution to dependency: using multilevel analysis to accommodate nested data // Nature Neuroscience. – 2014. – Vol. 17. – №. 4. – P. 491-496.
3. Abud, E. M., Ichiyama, R. M., Havton, L. A., and Chang, H. H. Spinal stimulation of the upper lumbar spinal cord modulates urethral sphincter activity in rats after spinal cord injury. // *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* – 2015. – 308. – P. 1032-1040.
4. Chen, G., Liao, L., Miao, D. Electrical stimulation of somatic afferent nerves in the foot increases bladder capacity in neurogenic bladder patients after sigmoid cystoplasty– // *BMC Urol.* 15 – P. 26. 2015.
5. Fry, C. H., C. Wu, and G. P. Sui. Electrophysiological properties of the bladder // *International Urogynecology Journal* 9.5. – 1998. – P. 291-298.
6. Gerasimenko YP, Lavrov IA, Courtine G, Ichiyama RM, Dy CJ, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR. Spinal cord reflexes induced by epidural spinal cord stimulation in normal awake rats // *J Neurosci Methods.* – 2006. – Vol.157. – P.253–263
7. Gerasimenko, Y., Musienko, P., Bogacheva, I., Moshonkina, T., Savochin, A., Lavrov, I., Roy, R.R., Edgerton, V.R. Propriospinal bypass of the serotonergic system that can facilitate stepping. // *J. Neurosci.Methods.* – 2009. – 29, P. 5681–5689.
8. de Groat, W.C., Nadelhaft, I., Milne, R.J., Booth, A.M., Morgan, C., Thor, K., Organization of the sacral parasympathetic reflex pathways to the urinary bladder and large intestine // *J. Auton. Nerv.Syst.*– 1981. – № 3, 135–160.

9. De Groat, W. C., Booth, A. M., Milne, R. J., Roppolo, J. R. Parasympathetic preganglionic neurons in the sacral spinal cord // *Journal of the autonomic nervous system.* – 1982. – № 5(1). P. 23-43.
10. Harkema S, Gerasimenko Y, Hodes J, Burdick J, Angeli C, Chen Y, Ferreira C, Willhite A, Rejc E, Grossman RG, Edgerton VR. Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study // *Lancet.* – 2011. – Vol.377. – P.1938–1947.
11. Horst, M., Van den Brand, R., Heutschi, J., Musienko, P., Gobet, R., Sulser, T., et al. Multi-systems neurorehabilitation improves bladder function after spinal cord injury // *J Urol.* 185. – 2011. P. 171.
12. Hoffman, P. Beitrage zur Kenntnis der menschlichen Reflexe mit besonderer Berücksichtigung der elektrischen Erscheinungen // *Arch F Physiol.* – 1910. P. – 223-256.
13. Hou, S., Rabchevsky, A. G. (2014). Autonomic consequences of spinal cord injury. // *Compr. Physiol.* – № 4. P. – 1419-53.
14. Ishigooka, M., Zermann, D.H., Doggweiler, R., Schmidt, R.A. Similarity of distributions of spinal c-Fos and plasma extravasation after acute chemical irritation of the bladder and the prostate // *J Urol.* – 2000. – P.164. – 1751-6.
15. Lee T. H., Jang M.H., Shin M.C., Lim B.V., Kim Y.P., Kim H., Choib H.H., Leec K.S., Kim E.H., Kim C.J. Dependence of rat hippocampal c-Fos expression on intensity and duration of exercise // *Life Sciences.* – 2003. – Vol. 72. – №. 12. – P. 1421-1436.
16. Matsushita M. The axonal pathways of spinal neurons in the cat // *Journal of Comparative Neurology.* – 1970. – Vol. 138. – №. 4. – P. 391-417.
17. Merkulyeva N., Veshchitskii A., Gorsky O., Pavlova N., Zelenin P., Gerasimenko Y., Deliagina T., Musienko P. Distribution of spinal neuronal networks controlling forward and backward locomotion // *Journal of Neuroscience.* – 2018. – Vol. 38. – №. 20. – P. 4695-4707.
18. Morgan, C., Nadelhaft, I., de Groat, W.C., Location of bladder preganglionic neurons within the sacral parasympathetic nucleus of the cat // *Neurosci. Lett.* – 1979. – № 14. P. 189–194.
19. Nadelhaft, I., de Groat, W.C., Morgan, C., 1980. Location and morphology of parasympathetic preganglionic neurons in the sacral spinal cord of the cat revealed by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase // *J. Comp. Neurol.* Vol. 193. P. 265–281.
20. Ren K., Ruda M.A. A comparative study of the calcium-binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord // *Brain Research Reviews.* – 1994. – Vol. 19. – №. 2. – P. 163-179.
21. Shkorbatova, P.Y., Lyakhovetskii, V.A., Merkulyeva, N.S., Veshchitskii, A.A., Bazhenova, E.Y., Laurens, J., Pavlova, N.V., Musienko, P.E. Prediction algorithm of the cat spinal segments lengths and positions in relation to the vertebrae // *Anat. Rec.* – 2019. Vol. 302. – P. 1628-1637.
22. Vanderhorst V.G.J.M., Holstege G. Organization of lumbosacral motoneuronal cell groups innervating hindlimb, pelvic floor, and axial muscles in the cat // *Journal of Comparative Neurology.* – 1997. – Vol. 382. – №. 1. – P. 46-76.
23. Kalsi, V., Apostolidis, A., Gonzales, G., Elneil, S., Dasgupta, P., & Fowler, C. J. Early effect on the overactive bladder symptoms following botulinum neurotoxin type A injections for detrusor overactivity. // *European urology.* – 2008. – №54(1). – P. 181-187.