

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

Вещицкий Александр Александрович

**Исследование морфофункциональной архитектуры сенсомоторных
нейронных сетей спинного мозга кошки, обеспечивающих ходьбу в
разных направлениях**

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
2018**

Актуальность проблемы.

Передвижение в пространстве является неотъемлемой частью успешного существования животного в окружающей его среде. Активное перемещение сопровождается выполнением сложнейших двигательных задач, таких как координированная ходьба, поддержание веса тела, контроль скорости и направления передвижения (Gerasimenkoetal., 2005, 2006; Edgertonetal., 2008; Musienkoetal., 2009, 2010). Главным центром инициации двигательной активности конечностей у млекопитающих является мезэнцефалическая локомоторная область (МЛО) (Shik, Orlovsky, 1976), тонически возбуждающая специализированную спинальную нейронную сеть, называемую локомоторным центральным генератором паттерна (ЦГП) (Cazaletsetal., 1995; Dimitrijevicetal., 1998; Duysens, Crommert, 1998; Bogachevaetal., 2009; Musienkoetal., 2009, 2010, 2012; Frigon, 2011). Данные сети могут быть запущены в обход МЛО посредством электрической эпидуральной стимуляции (ЭС) спинного мозга (Iwaharaetal., 1992; Gerasimenkoetal., 2003, 2005, 2008; Musienkoetal., 2007, 2009, 2012; Lavrovetal., 2015). При изучении ходьбы кошки в разных направлениях было выявлено, что стимуляция МЛО приводит к квадропедальной локомоции, ориентированной только вперед, в то время как ЭС спинного мозга способна инициировать шагательные движения, направленные в разные стороны (в том числе и назад), в зависимости от ориентации ленты тредбана и, соответственно, афферентного тока импульсов от рецепторов конечностей (Musienkoetal., 2012). Согласно, современным представлением локомоторный ЦГП состоит из двух уровней: генерирующих ритм и паттерн активации мышц (Lafreniere-Roula, McCrea, 2005; Rybaketal., 2006 а, б; Brownstone, Wilson, 2008; McCrea, Rybak, 2008; Guertin, 2009; Rybaketal., 2015), однако моррофункциональная организация данных нейронных сетей во многом неясна. Существует масса вопросов относительно клеточного состава и функционального значения отдельных элементов спинальных сетей, их распределения в спинном мозге, связей между нейронами, возможного влияния на нейронные сети при заболеваниях и травмах нервной системы.

Цели и задачи исследования.

Целью настоящего исследования является изучение моррофункциональной организации сенсомоторных нейронных сетей спинного мозга кошки, контролирующих ходьбу в направлении вперед и назад.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить сегменты пояснично-крестцового утолщения спинного мозга кошки, электрическая эпидуральная стимуляция которых вызывает ходьбу задних конечностей в направлении вперед и назад.
2. Выявить распределение маркера c-Fos в пояснично-крестцовом утолщении спинного мозга кошки после локомоции задних конечностей в направлении вперед и назад, вызванной электрической эпидуральной стимуляцией.
3. Исследовать паттерны распределения интернейронов, маркированных разными кальций-связывающими белками.

Научная новизна работы.

Проведено подробное картирование спинного мозга кошки, позволившее выявить границы пояснично-крестцового утолщения, в пределах которых посредством электрической эпидуральной стимуляции возможен вызов ходьбы в направлении вперед и назад. В сером веществе пояснично-крестцовых сегментов впервые описано распределение локомоторных нейронных сетей, активируемых электрической эпидуральной стимуляцией и обеспечивающих ходьбу задних конечностей в направлении вперед и назад. На основе полученных данных и для их анализа был разработан новый метод деления серого вещества спинного мозга на функциональные зоны, алгоритм построения карт плотности имmunопозитивных нейронов и способ визуализации областей колокализации нейронов, выявленных разными маркерами. Впервые подробно описано ламинарное и региональное распределение нейронов, иммунопозитивных к кальций-связывающим белкам (кальбиндину, кальретинину и парвальбумину) в сегментах L1-S1 спинного мозга кошки.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Нейронные сети, обеспечивающие ходьбу задних конечностей в разных направлениях (вперед и назад), по-разному распределены вдоль ростро каудальной оси пояснично-крестцового утолщения спинного мозга.
2. Паттерн распределения интернейронов, экспрессирующих ген раннего ответа *c-fos* после эпидуральной стимуляции, определяется направлением вызванной локомоции.
3. Центромедиальная область серого вещества спинного мозга, характеризующаяся наибольшим числом нейронов, активируемых в ходе вызванной локомоции задних конечностей, содержит кластеры интернейронов, иммунопозитивных к кальций-связывающим белкам (кальбиндину, кальретинину и парвальбумину).

Теоретическая и практическая значимость работы.

Картирование пояснично-крестцового утолщения спинного мозга (сегменты L3-S1) посредством эпидуральной электрической стимуляции, позволило определить

зоны, электрическое воздействие на которые вызывает ходьбу в разных направлениях (вперед и назад), а также опосредует качество вызываемой ходьбы. Полученные данные могут быть использованы для создания наиболее оптимальной пространственной конфигурации расположения электродов в спинальных имплантатах. Данная задача является актуальной, так как небольшие по размеру импланты обладают ограниченным пространством под отделенные друг от друга проводящие элементы и активные точки стимуляции.

С помощью иммуногистохимического метода выявления продукта экспрессии раннего гена *c-fos* визуализированы нейронные сети спинного мозга, участвующие в одном случае в реализации ходьбы вперед, а в другом – назад. Полученные данные расширяют имеющиеся представления об организации спинальных локомоторных сетей, и в совокупности с основными принципами локомоторного контроля могут быть перенесены и использованы в области современной робототехники и протезирования.

Подробным образом описано распределение в пояснично-крестцовом отделе спинного мозга трех наиболее изучаемых кальций-связывающих белков (кальбинина, кальретинина и парвальбумина), тем самым выявлена посегментная и ламинарная локализация различных функциональных типов нейронов. Настоящая работа может быть использована в качестве отправной точки для определения основных морфологических свойств интересующих популяций спинальных нейронов.

Апробация работы.

Основные положения и результаты диссертации были представлены на 11 российских и международных конференциях: I научной конференции с международным участием, посвященной 70-летию Ярославской государственной медицинской академии (Ярославль, 2014); Neuronus 2015 IBRO&IRUNNeuroscienceForum (Poland, Klarow, 2015); всероссийской конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, (Санкт-Петербург – Колтуши, 2015); международной научной конференции Научного Парка СПбГУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину», (Санкт-Петербург, 2015); XII международной междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2016); VI всероссийской с международным участием конференции по управлению движениями «MotorControl-2016» (Казань, 2016); II научной конференции с международным участием, посвященной 70-летию Ярославской государственной медицинской академии (Ярославль, 2016); FENSRegionalMeeting (Hungary, Pécs, 2017);

the XIX international conference on neuroinformatics «Advances in neural computation, machine learning, and cognitive research, studies in computational intelligence» (Russia, Moscow, 2017); XIII международной междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2017); XXIII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017).

Публикации.

Основное содержание диссертации отражено в 20 публикациях, из них 5 научные статьи в рецензируемых журналах и 15 тезисов.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение), выводов и списка литературы. Работа изложена на 249 страницах печатного текста, содержит 6 таблиц и иллюстрирована 65 рисунком. В списке литературы приведено 564 источника.

Материал и методы исследования.

Исследование проведено на 17 нормально пигментированных беспородных взрослых кошках и 3 котятах. Постановка опытов осуществлялась на острой модели взрослого децеребрированного животного. Все хирургические процедуры проводили под общим наркозом (смесь изофлюрана (2-4%) и кислорода). Затем интубировали трахею, уровень анестезии поддерживали ингаляционно. Голову, позвоночник и таз фиксировали на жесткой раме стереотаксической установки. Посредством трепанации черепа и последующего удаления коры открывали доступ к четверохолмиям среднего мозга, после чего производили перерезку ствола на преколликулярно-постмаммиллярном уровне. Для остановки кровотечения после децеребрации в черепной коробке устанавливали плотную тампонаду. Для последующей эпидуральной стимуляции спинного мозга производили ламинэктомию на уровне 4-5 поясничных позвонков. Последующие эксперименты начинали через 2-3 часа (период покоя). Для предотвращения развития отека воспалительных процессов, в течение всего эксперимента каждые 60 минут внутримышечно вводили по 0,5 мл преднизолона.

Вызов локомоции экспериментального животного осуществляли с помощью закрепленного на микроманипуляторе шарикового электрода (диаметр 0,5 мм), подключенного к стимулятору (A-M Systems, model 2100). Электрод устанавливали на твердую оболочку спинного мозга в область ламинэктомии. На уровне с пятого по седьмой поясничный сегмент находили точку приложения электрода, при оптимальных параметрах стимуляции которым (частота стимуляции 5 Гц, длительность стимула 0,2-0,5 мс, сила тока 220-300 мкА) у животного вызывали поочередные шагательные

движения задних конечностей по ленте тредбана (скорость 0,5 м/с) в направлении вперед или назад.

Исследование спинальных нейронных сетей, задействованных в контроле локомоции в разных направлениях, проводили с помощью иммуногистохимического метода визуализации продукта экспрессии раннего гена *c-fos*. Экспериментальный протокол состоял из 18-22 стимуляционных сессий по 1-2 минуты, во время которых животное осуществляло шагательные движения по ленте тредбана. Период отдыха между сессиями составлял 2-4 минуты. Общее время всех стимуляционных сессий и периодов между ними составляло 1,5-2 часа – оптимальное для достижения максимальной концентрации белка c-Fos в ядрах активных нейронов.

Регистрацию электрической активности мышц задних конечностей проводили после имплантации биполярных электромиографических (ЭМГ) электродов билатерально в икроножную мышцу (*m. gastrocnemius lateralis*, разгибательная мышца лодыжки) и большеберцовую мышцу (*m. tibialis*, сгибательная мышца голени). Сигналы от ЭМГ электродов были дифференциально усилены (A-M Systems, model 1700, с частотой пропускания 30 Гц–5 кГц), их дальнейший анализ проводили в программном комплексе MATLAB R2017b. Регистрацию силовых опорных реакций осуществляли с помощью сенсоров силовых нагрузок (1002K, VISHAY), располагаемых под лентой тредбана. Регистрацию кинематики движений проводили: 1) с помощью потенциометров, прикрепленных к лодыжке экспериментального животного, 2) посредством двусторонней видеорегистрации (стандартные видеокамеры, 25 кадр/сек) располагались сзади и сбоку). Анализ полученных видеозаписей осуществляли покадрово в программном комплексе VirtualDubMod 1.5.10.1, позволяющему выявлять угловые изменения в суставах задней конечности, возникающие при сгибании и разгибании бедра, колена и лодыжки в различные моменты локомоторного цикла – периоды переносы и опоры.

Через 15-20 минут после окончания эксперимента под глубоким наркозом (5% изофлюран) проводили транскардиальную перфузию. Для предупреждения свертываемости крови и образования тромбов за 10 минут до начала перфузии внутримышечно вводили гепарин (0,5 мл/кг). Промывку сосудов от форменных элементов крови осуществляли физиологическим раствором (0,9% натрия хлорид, 700-800 мл/кг, pH 7,4, 25°C), фиксацию – 4% раствором параформальдегида на 0,01 М фосфатном буфере (pH 7,4, 600-700 мл/кг, 25°C).

По окончании перфузии проводили анатомическое препарирование в ходе которого обеспечивали доступ к дорзальным корешкам и спинномозговым ганглиям,

по которым определяли границы сегментов, включающим корешковую часть и прилежащую к ней рострально бескорешковую. На основе данных о границах сегментов определяли точное положение ламинэктомии и точки приложения эпидурального электрода.

По выявленным границам сегментов производили транссецию спинного мозга, и отдельные его элементы последовательно перемещали в 20% и 30% растворы сахарозы (на 0,1М фосфатном буфере) до насыщения (1-3 дня). На замораживающем микротоме (Reichert, Германия) готовили срезы толщиной 50 мкм.

Выявление продукта экспрессии гена *c-fos* и кальций-связывающих белков (кальбинина, кальретинина и парвальбумина) осуществляли с помощью стандартного непрямого имmunогистохимического метода на фронтальных и горизонтальных свободноплавающих срезах сегментов L1-S1.

Цифровую обработку срезов антителами проводили на компьютерной установке, оснащенной световым микроскопом Olympus CX31 (Olympus Corporation, Japan), программным комплексом digiCamControl и камерой Nikon (D3200, Nikon Corporation, Japan) и на компьютерной установке, оснащенной флуоресцентным микроскопом Olympus BX43 (Olympus Corporation, Japan), программным комплексом VideoZavr (версия 2.3) и черно-белой камерой (VideoZavr VZ-18C23-B). Морфологический анализ оцифрованных изображений срезов производили в программной среде ImageJ Fiji.

Для построения изображений, отражающих суммарный паттерн распределения имmunопозитивных нейронов в среде ImageJ Fiji каждый имmunопозитивный нейрон метили точкой фиксированного размера (20 пикселей), а границу между серым и белым веществом обрисовывали контуром. В дальнейшем, на основе положения реперных точек (области протрузии белого вещества в серое), оконтуренные изображения объединяли в одно (Total-изображение), получая суммарный паттерн сегментарного распределения имmunопозитивных нейронов. В программном комплексе ImageJ Fiji на Total-изображениях точки, маркирующие имmunопозитивные нейроны, размывали по методу Гаусса (диаметр 125 пикселей). Полученные черно-белые изображения переводили в псевдоцвет, где градиент зелено-красного маркировал плотность распределения нейронов, от минимального к максимальному, соответственно.

Для выявления в сером веществе областей колокализации нейронов, имmunопозитивных к разным маркерам, Total-изображения с черно-белым градиентом инвертировали по цветам и придавали бело-черному градиенту разные значения: красный – для FOS+ клеток, зеленый – для нейронов, имmunопозитивных к кальций-

связывающим белкам. Далее, на основе реперных точек два Total-изображения (черно-красное и черно-зеленое) объединяли в одно, используя режим «перекрытия» слоев, получая таким образом черно-желтые градиентные изображения, отражающие зоны серого вещества, в которых наблюдается пересечение двух градиентов (красного и зеленого). Для получения зелено-красного градиента, отражающего степень перекрытия двух меток, черно-желтое изображение обесцвечивали, инвертировали цвета и придавали полученному черно-белому градиенту соответствующие значения.

Обработку данных проводили с использованием пакета статистических программ Prism7 (GraphPad Software, Inc.) Статистический анализ данных проводили с помощью непараметрического критерия Стьюдента.

Результаты исследования.

Вызов локомоции в направлении вперед и назад при эпидуральной стимуляции различных пояснично-крестцовых сегментов спинного мозга. Для оценки способности вызова локомоции в направлениях вперед (ХВ) и назад (ХН) при ЭС разных сегментов поясничного и крестцового отделов, провели картирование спинного мозга (L2-S2) (Рис. 1). При ЭС сегмента L2 у всех исследуемых животных (n=3) не наблюдалось инициации ходьбы ни в одном из направлений. ЭС сегмента L3 у 67% животных (n=3) вызывала локомоцию вперед, но ни у одного – ходьбу назад. ЭС сегментов L4 (n=7), L5 (n=12), L6 (n=10), L7 (n=8), S1 (n=5) и S2 (n=3) вызывала локомоцию вперед у всех тестируемых кошек. Однако, стимуляция сегментов L4, S1 и S2 не инициировала локомоцию назад ни у одного из животных. Ходьба назад была выявлена только при ЭС сегментов L5 (каудальной части)-L7. В сегменте L5 стимуляция вызывала ходьбу назад у 40% животных (n=5). Стимуляция ростральной части сегмента L6 вызывала ходьбу назад у 50% животных (n=6), средней – у 67% (n=6) и каудальной – у 86% (n=7). Стимуляция ростральной части сегмента L7 вызывала ходьбу назад только у 29% кошек (n=7), а каудальной – у 20% (n=5). Таким образом, область спинного мозга, ЭС которой вызывает оба вида ходьбы (ХВ и ХН), занимает достаточно узкую часть пояснично-крестцового отдела (сегменты L5-L7).

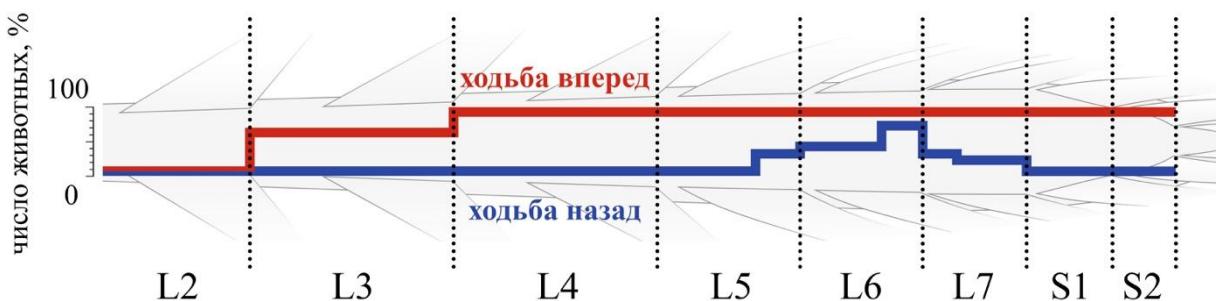


Рис. 1. Картирование спинного мозга. По оси ординат – процентное выражение числа животных, ЭС спинного мозга которых в обозначенном сегменте вызывала ходьбу

вперед (красная линия) и назад (синяя линия), по оси абсцисс – номера сегментов спинного мозга.

Впервые инициация ходьбы у кошки, вызванная посредством ЭС спинного мозга, была продемонстрирована T. Iwahara с коллегами в 1992. В своей работе они описывают возможность запуска ХВ задних конечностей стимуляцией любого из сегментов L1-S1, но не более каудальных. В нашей работе мы определили, что у десеребрированной кошки активация ХВ возникает при стимуляции сходного, но несколько смешённого каудально более узкого участка спинного мозга – сегментов L3-S2. Этот сдвиг может быть объяснён, с одной стороны, особенностями стимуляции, с другой, разными подходами в определении границ сегментов, которые априори дают несколько разные результаты

Особенности кинематики локомоторных движений при ходьбе в разных направлениях, вызванной эпидуральной стимуляцией различных пояснично-крестцовых сегментов спинного мозга. Мы провели сравнение кинематических особенностей локомоторных движений при ХВ, вызванной ЭС на трех уровнях спинного мозга: сегментах L4-L5, L6 и L7-S1; анализ кинематики локомоторных движений во время ХН проводили только при стимуляции L6 сегмента (оптимального для вызова ХН).

В [Таблица 1](#) для ХВ отображены средние значения углов в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах при максимальном сгибании задней конечности во время фазы переноса и максимальном разгибании во время фазы опоры. Так, было выявлено, что в зависимости от точки стимуляции спинного мозга кинематические характеристики ходьбы значительно варьируют. Наименьшие значения углов во всех трех суставах наблюдаются при ЭС сегментов L4-L5. При стимуляции сегмента L6 исследуемые показатели несколько выше. Наибольшая амплитуда движений конечности была выявлена при ЭС сегментов L7-S1. Полученные данные позволяют предположить, что при ЭС ростральных сегментов (L4-L5) преобладает активность мышц сгибателей, а при стимуляции каудальных (L7-S1) – активность мышц разгибателей. Поскольку в ростральных и каудальных сегментах поясничного утолщения преобладают мотонейронные пулы, иннервирующие мышцы сгибатели и разгибатели, соответственно (Vanderhorst, Holstege, 1997), вероятно, ЭС определенного сегмента не только активирует локомоторные сети, но и повышает возбудимость мотонейронов, локализованных вблизи точки стимуляции.

Вне зависимости от уровня ЭС средние значения длины шага при вызванной ХВ одинаковы (Рис.2А). При стимуляции сегментов L7-S1 средние значения углов в суставах значительно больше, чем при стимуляции сегментов L4-L5 (Рис.2 В). Стабильность локомоторных движений задних конечностей при ЭС сегментов L4-S1 достаточно высока, однако при стимуляции сегмента L6 она достоверно ниже ($p=0,04$) (Рис.2 Б). Среднее значение коэффициента асимметрии длины шага низкое при ЭС каждого уровня спинного мозга, что говорит об одинаковой длине шага задних конечностей и симметричности локомоторных движений в целом (Рис.2 Г).

Таблица 1. Значения углов в суставах задних конечностей при максимальном сгибании во время фазы переноса и максимальном разгибании во время фазы опоры. Представлены средние значения углов ($^{\circ}$) \pm стандартная ошибка.

Фаза	Сустав	ЭС	К1	К2	К3	К4
Перенос	Тазобедренный сустав	L4-L5	36,6 \pm 0,4	32,2 \pm 0,3	53,4 \pm 0,6	32,8 \pm 0,9
		L6	43,5 \pm 0,2	37,1 \pm 0,5	57,5 \pm 1	38,9 \pm 0,8
		L7-S1	41,5 \pm 0,6***	40,8 \pm 0,3***	61,4 \pm 1***	40,9 \pm 0,7***
	Коленный сустав	L4-L5	35,9 \pm 0,6	36,4 \pm 1,1	55,4 \pm 0,9	37,9 \pm 0,4
		L6	38,8 \pm 0,9	38,2 \pm 0,4	56,1 \pm 0,3	47 \pm 1
		L7-S1	40,3 \pm 0,5***	40,8 \pm 0,2**	60,6 \pm 2*	50 \pm 1,4***
Опора	Голеностопный сустав	L4-L5	42,5 \pm 1,2	44,7 \pm 1	73,4 \pm 0,7	34,6 \pm 0,4
		L6	58 \pm 1,4	46,7 \pm 0,7	76,3 \pm 1,8	42,4 \pm 0,6
		L7-S1	45,6 \pm 1,1*	52,3 \pm 1,3***	82,7 \pm 1,5***	44,2 \pm 0,3***
	Тазобедренный сустав	L4-L5	85,7 \pm 0,4	94,8 \pm 0,6	102,1 \pm 0,8	74,2 \pm 0,4
		L6	93,7 \pm 0,7	105,4 \pm 0,8	112,3 \pm 1	80,1 \pm 0,7
		L7-S1	100,4 \pm 0,3***	122,3 \pm 1***	118,7 \pm 0,8***	107,5 \pm 1,2***
Опора	Коленный сустав	L4-L5	87 \pm 0,4	96,4 \pm 0,3	107,9 \pm 0,7	64,8 \pm 0,3
		L6	92,7 \pm 1,7	117,3 \pm 0,5	120,1 \pm 0,7	80,9 \pm 0,5
		L7-S1	105,2 \pm 0,7***	126,2 \pm 0,4***	121,8 \pm 0,8***	104,9 \pm 0,5***
	Голеностопный сустав	L4-L5	133,2 \pm 1,2	155,3 \pm 2,7	124 \pm 0,6	122 \pm 0,5
		L6	138,7 \pm 1,5	172 \pm 0,7	135,6 \pm 1	126 \pm 1,4
		L7-S1	138,2 \pm 0,4***	179,4 \pm 2,7***	143,9 \pm 0,8***	134,7 \pm 0,7***

Звездочками обозначена значимость различий между параметрами ХВ при ЭС сегментов L4-L5 и L7-S1: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$.

При ХН во время фазы переноса и опоры задние конечности выполняли движения в противоположном направлении относительно ХВ (Рис. 3). Так, во время фазы опоры, конечность двигалась из крайней постериорной позиции (E1) в крайнюю антериорную (E3). Во время фазы переноса конечность возвращалась в крайнюю постериорную позицию (E1). В отличие от ХВ, при ХН локомоторные движения выполнялись задними конечностями в более ростральной позиции относительно тела.

Сравнение величин суставных углов при ХВ и ХН, вызванных из одного сегмента (L6), показало, что средние значения углов в тазобедренном и голеностопном суставах в фазе переноса одинаковы для ХВ и ХН при стимуляции сегмента L6, в коленном – значительно выше ($p=0,002$) для ХН (Рис.2 Д). Во время фазы переноса

средние значения углов в тазобедренном и голеностопном суставах при XН значительно ниже, чем при XB ($p=0,002$), а в коленном – выше(Рис.2Е).Также было показано, что при XН диапазон значений углов в суставах в ходе локомоторного цикла значительно ниже ($p=0,0001$) и, как результат, длина шага значительно короче ($p=0,036$) по сравнению с XB при ЭС L6 (Рис.2 А, В). Одним из важнейших афферентных сигналов, участвующих в запуске фазы переноса во время XB является активация мышечных веретен мышц сгибателей бедра во время фазы опоры (Rossignol et al., 2006). Полагаем, что во время XН афферентные сигналы о сгибании бедра (от мышечных веретен разгибателей бедра) в конце фазы опоры могут участвовать в инициации фазы переноса.

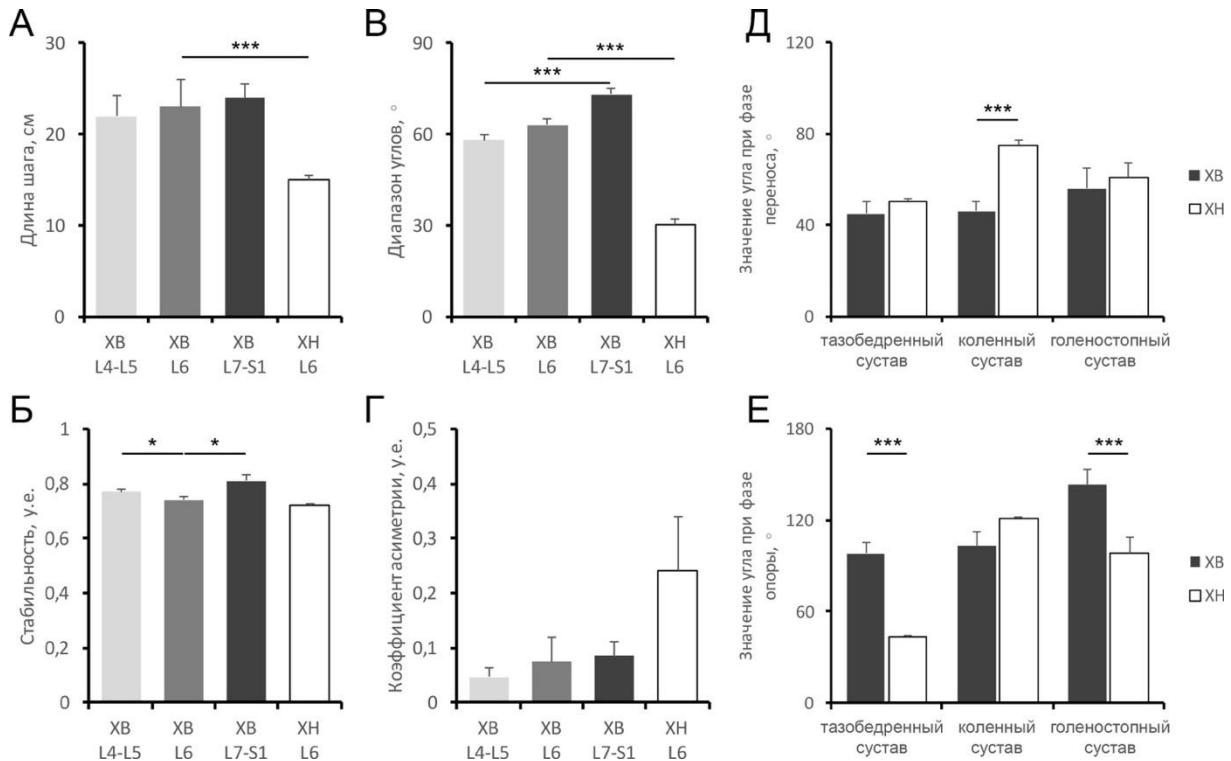


Рис.2. Сравнение кинематических характеристик между XB, вызванной ЭС разных уровней спинного мозга (L4-L5, L6, L7-S1), и XН. А – длина шага; Б – стабильность локомоторного паттерна конечности (коэффициент самоподобия); В – диапазон углов в суставах задних конечностей во время локомоторного цикла; Г – асимметрия в длине шага между правой и левой конечностью (коэффициент асимметрии); Д – значения углов в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах при максимальном сгибании задней конечности во время фазы переноса; Е – значения углов в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах при максимальном сгибании задней конечности во время фазы максимальном разгибании во время фазы опоры. Представлены средние значения + стандартная ошибка. * – $p<0,05$; *** – $p<0,001$.

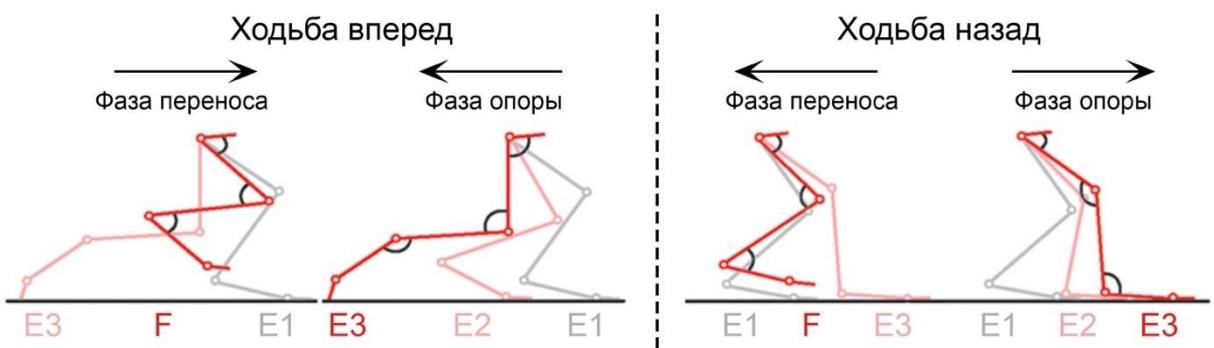


Рис. 3. Положения суставов задних конечностей в разные фазы локомоторного цикла (E1, E2, E3, F) при ХВ и ХН. Стрелками обозначено направление движения конечности.

Таким образом, мотонейронные пулы, иннервирующие мышцы разгибатели, и афференты от них могут представлять собой элементы сетей, определяющих движение шага в горизонтальной плоскости при ХН (Musienko et al., 2012). Данные элементы содержатся в сегментах L6-L7, стимуляция которых вызывает ХН (Hamm et al., 1985; Vanderhorst, Holstege, 1997).

Стабильность локомоторных движений и симметричность в длине шага между левой и правой лапами задних конечностей при ХН ниже, чем при ХВ (Рис.2 Б, Г). Данные результаты с одной стороны могут быть объяснены спецификой мышечного аппарата, для которого не характерны формируемые паттерны, с другой – слабым развитием локомоторных сетей, контролирующих ходьбу назад.

Распределение c-Fos-иммунопозитивных (FOS+) нейронов по функциональным областям серого вещества при вызванной ходьбе в разных направлениях.

С помощью модифицированного метода геометрического деления серого вещества (Рис. 4 Аадаптирован по Matsushita, 1970) были проанализированы поперечные срезы спинного мозга животных с вызванной ХВ ($n=3$) и ХН ($n=3$) после иммуногистохимического выявления белка c-Fos (Рис. 4Б). Подсчет FOS+ нейронов осуществлялся левой и правой половинами серого вещества в каждой из 6 зон интереса: дорзолатеральной(ДЛ), дорзомедиальной (ДМ), центролатеральной(ЦЛ), центромедиальной (ЦМ), вентролатеральной(ВЛ) и вентромедиальной (ВМ).

Процентное распределение FOS+ нейронов в каждой из 6 зон интереса по сегментам L4-S1 у животных обеих групп схоже (Рис. 4 В). Наибольшая доля FOS+ нейронов приходится на зоны их кластеризации – ДЛ и ЦМ (соответственно, $31\pm9\%$ и $21\pm4\%$ для ХВ, $28\pm7\%$ и $23\pm8\%$ для ХН). Зоны ДМ и ЦЛ содержат меньшее количество FOS+ нейронов – соответственно, $18\pm9\%$ и $21\pm4\%$ для ХВ и $13\pm6\%$ и $23\pm8\%$ для ХН. Меньше всего клеток представлено вentralной части серого вещества – ВМ и ВЛ (соответственно, $7\pm4\%$ и $9\pm5\%$ для ХВ, $7\pm4\%$ и $11\pm5\%$ для ХН). У животных группы

ХН в сегментах L6 и L7 количество FOS+ нейронов в зонах ЦЛ ($p=0,019$; $p=0,036$), ЦМ ($p=0,042$; $p=0,002$) и ВЛ ($p=0,031$; $p=0,007$) значительно выше, чем у кошек группы ХН. Также, у ХН животных значительно больше FOS+ нейронов в зонах ДЛ ($p=0,001$) и ВМ ($p=0,005$) в сегменте L6. Таким образом, было выявлено, что участок спинного мозга (L6-L7), с которого ЭС вызывается ходьба назад, содержит значительно больше FOS+ нейронов.

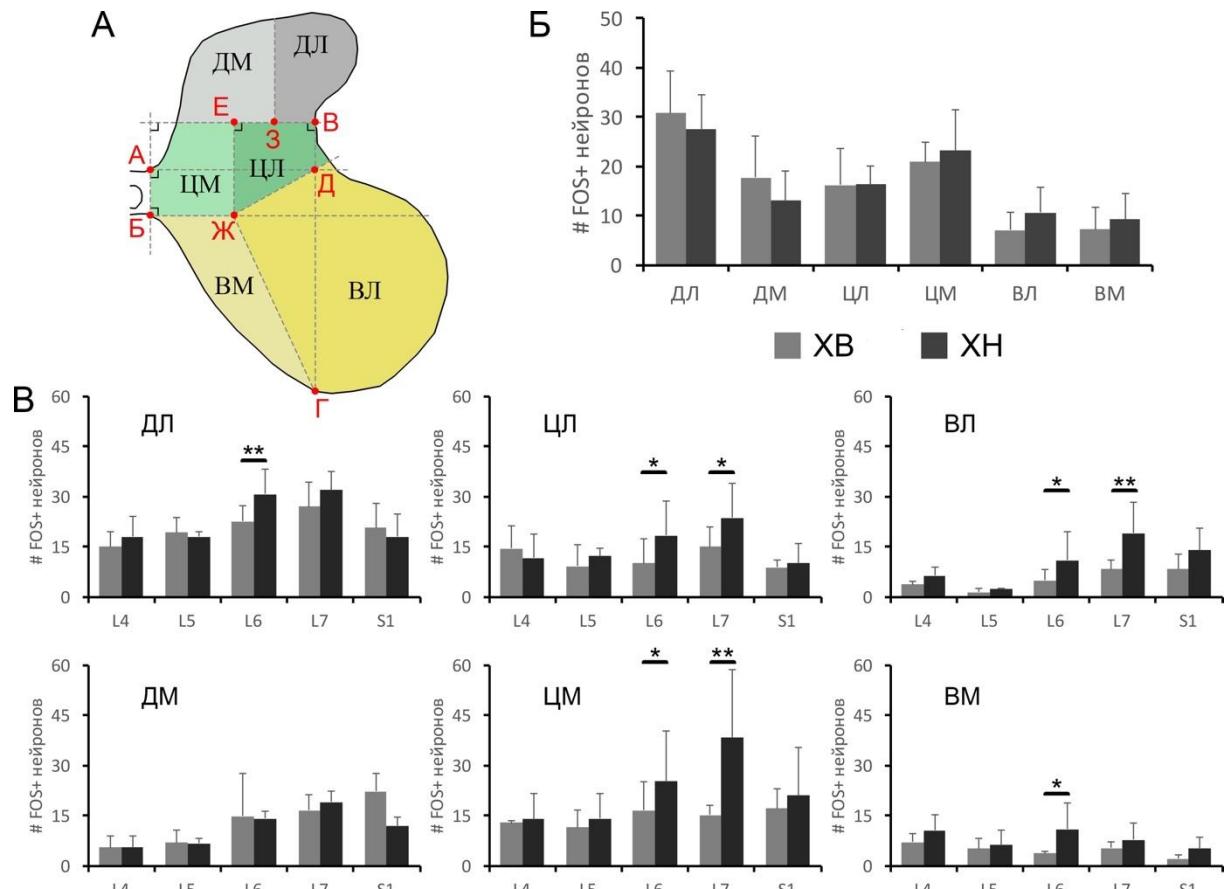


Рис. 4. Распределение FOS+ нейронов в сером веществе сегментов L4-S1. А – модифицированный алгоритм деления серого вещества на зоны интереса; Б – среднее процентное число FOS+ нейронов в зонах интереса у животных групп XB и XH; В – среднее число FOS+ нейронов в каждой зоне интереса серого вещества. Для всех графиков представлены среднее значение + стандартное отклонение, по оси ординат – процентное (А) и абсолютное (В) число FOS+ нейронов, по оси абсцисс – зоны интереса (А) и номера сегментов (Б). * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$.

Ранее (Musienko et al., 2012) была предложена гипотеза о контроле направления шага: локомоторная система включает в себя два основных механизма, один генерирует вертикальный компонент шага (поднятие и опускание конечности), другой – горизонтальный компонент (перенос конечности от одной точки к другой). Последний включает в себя сети, управляющие направлением шага в разные стороны (вперед, назад, влево, вправо). Данные сети получают сенсорную информацию о движении конечности во время фазы опоры – при достижении конечностью крайней

точки запускается фаза переноса (Pearson, Duysens, 1976). В рамках двухуровневой модели локомоторного ЦГП (Rybak et al., 2015), можно предположить, что вертикальный компонент включает в себя ритм-генерирующий уровень и часть паттерн-генерирующего, в то время как сети горизонтального компонента принадлежат к паттерн-образующему слою. Объединив данные, полученные при картировании спинного мозга ЭС и при выявлении активированных нейронных сетей путем визуализации белка c-Fos, мы полагаем, что сети, генерирующие горизонтальный компонент для ХВ распределены по всему пояснично-крестцовому утолщению спинного мозга, в то время как для ХН – только в сегментах L6-L7. Таким образом, для активации ХН, ЭС должна быть приложена к сегментам L6-L7, в то время как широко распространенные сети, генерирующие вертикальный и горизонтальный компонент ХВ могут быть активированы ЭС любого сегмента от L3 до S2. При этом, сети, генерирующие вертикальный компонент для обоих видов ходьбы распространены в пояснично-крестцовом утолщении достаточно широко. Данное предположение может объяснить схожий паттерн распределения FOS+ нейронов при ХВ и ХН. Так, FOS+ нейроны, генерирующие горизонтальный компонент для ХВ, распределены по всему пояснично-крестцовому отделу спинного мозга, а совокупность нейронов, генерирующих горизонтальный компонент для ХН, сконцентрирована только в L6-L7, в связи с чем число FOS+ нейронов в этих сегментах значительно выше, чем у животных с ХВ.

Распределение нейронов, имmunопозитивных к кальций-связывающим белкам. Спинальный контроль локомоции обеспечивается разнородной популяцией интернейронов серого вещества (Kiehn, 2006). В настоящем исследовании по выявлению FOS+ нейронов было установлено, что при локомоции, вызванной ЭС, специфические сети нейронов активируются во всех областях серого вещества. Однако, вопрос о том, какие именно типы интернейронов формируют сети, способные обеспечивать локомоторную активность и ее модуляцию, остается открытым. Интернейроны, экспрессирующие специфические кальций-связывающие белки имеют разные паттерны электрической активности (Hof, Nimchinsky, 1992; Heizmann, 1993; Baizer, Baker, 2005), что определяет их функциональные особенности, поэтому иммуногистохимический метод может быть использован для визуализации функционально разных типов интернейронов. В связи с этим, мы провели выявление нейронов, иммунопозитивных к парвальбумину (ПРВ+), кальбиндину (КЛБ+) и кальретинину (КЛР+), и дали детальное описание ламинарного и регионального

распределения ПРВ+, КЛБ+ и КЛР+ нейронов серого вещества спинного мозга (сегменты L1-S1).

Кальбиндин. КЛБ+ нейроны представлены преимущественно в дорзальных рогах (пластины I-III) мелкими веретеновидными клетками, однако, в остальных пластинах было выявлено еще 10 морфотипов одиночных или сгруппированных в кластеры нейронов, иммунопозитивных к кальбиндину (Таблица 4). Наибольший интерес представили два специфических кластера клеток, локализованных на границе пластин VI и VII (в зонах ЦМ и ЦЛ). Медиально расположенный кластер состоит из средних по размеру КЛБ+ нейронов ($126 \pm 36 \text{ мкм}^2$, n=45), у которых наблюдается слабое ветвление дендритов (Рис. 5 А, м). Латеральный кластер сформирован более крупными клетками ($184 \pm 60 \text{ мкм}^2$, n=56), обладающими длинными дендритами (Рис. 5 А, н). При сопоставлении карт плотности КЛБ+ и FOS+ нейронов, было выявлено, что высокая степень колокализации между ними во всех анализируемых сегментах (L4-S1) помимо дорзальных рогов наблюдается только на границе между пластинами VI и VII в медиальной части промежуточного серого вещества (Рис. 5Б).

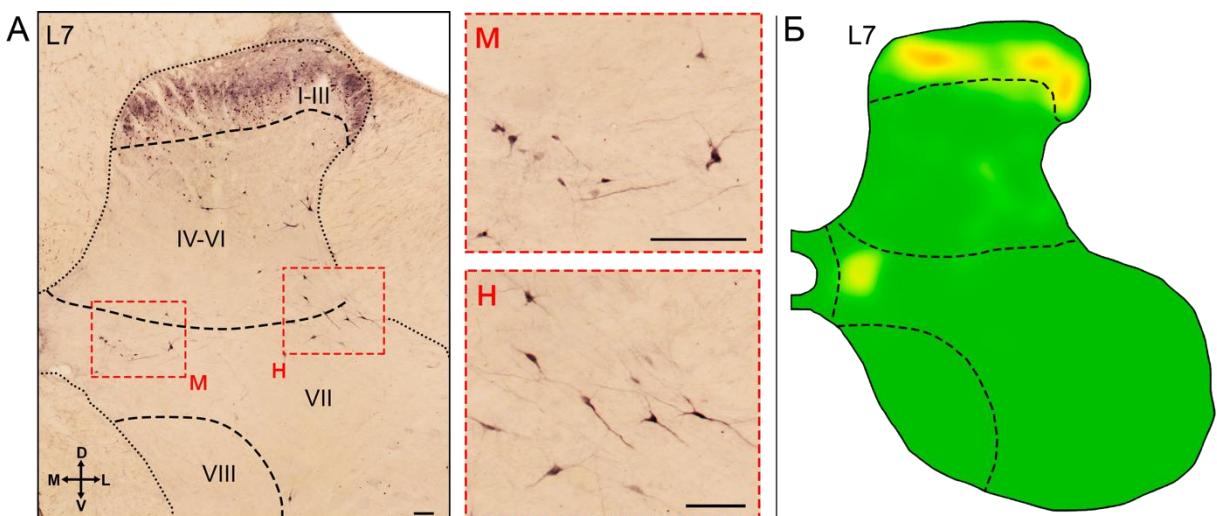


Рис. 5. Распределение КЛБ+ нейронов. А – локализация медиального и латерального кластеров нейронов на границе пластин VI и VIII; Б – сопоставление карт плотности КЛБ+ и FOS+ нейронов на примере сегмента L7 (зелено-красный градиент отражает степень колокализации разных маркеров от минимального к максимальному, соответственно).

В работах E. Jankowska с коллегами (1967 а, б), выполненных на спинальных кошках, в данной зоне были выявлены скопления интернейронов по-разному активируемые в ответ на стимуляцию афферентов сгибательного рефлекса. Данные типы интернейронов могут быть элементами локомоторного ЦГП, обеспечивающими реципрокные взаимодействия между мотонейронами антагонистами (Jankowska et al., 1967 б). У мышей схожими функциями обладает часть нейронов эмбрионального класса

V0, локализованная в медиальной части промежуточного серого вещества(Griener et al., 2015). Данные клетки имеют моносинаптические контакты с мотонейронами контралатеральной половины спинного мозга, благодаря чему участвуют в координации движений между левой и правой конечностью (Lanuza et al., 2004). Также у мышей на границе пластин VI, VIIи Х выявлена часть клеток V3 класса, связанные с формированием устойчивого и сбалансированного моторного ритма, обеспечивающего симметричность движения левой и правой конечностей (Zhang et al., 2008). В работе J.S. Riddell и M. Hadian (2000), в обозначенной области серого вещества сегментов L6-L7 спинного мозга кошки были выявлены скопления интернейронов, на которых сходится афферентная информация от мышечных афферентов группы II.

Таблица 2. Усредненная по всем животным и сегментам площадь сомы КЛБ+ нейронов ($\text{мкм}^2 \pm \text{стандартное отклонение}$). Мелкие нейроны – площадь сомы $<200 \text{ мкм}^2$, средние нейроны – площадь сомы $200-450 \text{ мкм}^2$, крупные нейроны – площадь сомы $>450 \text{ мкм}^2$.

Пластины	Сегменты	Особенности локализации	Тип нейронов	Площадь, мкм^2
Пластина I	L1-S1	—	Мелкие треугольные Мелкие овальные Мелкие веретеновидные	172±55 (n=56)
Пластины II-III	L1-S1	Вдоль кривизны дорзального рога	Мелкие веретеновидные	28±14 (n=2920)
		Дорзальная часть пластины IV	Мелкие веретеновидные	30±20 (n=400)
		Вдоль медиальной границы дорзального рога		
Пластины IV-VI	L1-S1	Вдоль латеральной границы дорзального рога В центральной части серого вещества на границе пластин IV-V	Мелкие мультиполлярные	138±65 (n=175)
	L1-L4	Дорзолатеральная граница пластины VII	Мелкие и средние мультиполлярные	147±56 (n=97)
	L1-S1	На границе пластин VI, VII и X В латеральной части на границе пластин VI и VII	Мелкие мультиполлярные	126±36 (n=45)
	L5-L7	Вентральная часть пластины VII	Средние мультиполлярные Средние веретеновидные и мультиполлярные	184±60 (n=56) 157±36 (n=17)
Пластина VIII	L5-S1	В пластине VIII На медиальной границе с белым веществом В вентральной комиссуре	Средние веретеновидные и мультиполлярные	238±46 (n=32)
Пластина X	L7-S1	—	Мелкие веретеновидные	—

Парвальбумин. Среди ПРВ+ нейронов было выявлено 6 морфотипов клеток (Таблица 3), локализованных во всех пластинах серого вещества кроме IXи X. Наибольший интерес представили скопления нейронов вентромедиальной части пластин V-VI в сегментах L5-S1 (Рис. 6 А, н) (в значительной степени колокализующихся с FOS+ нейронами, Рис. 6Б), положение которых сходно с таковым ядер Кларка, находящихся в более ростральных сегментах (L1-L4) и

характеризующихся ярко-окрашенным ПРВ+нейропилем (Рис. 6 А, м). Ядра Кларка исторически полагаются основным источником дорзального спиномозжечкового тракта, передающего сенсорную информацию от проприорецепторов задней части туловища и задних конечностей в мозжечок. Мы предположили, что кластеры ПРВ+ нейронов пластин V-VI в сегментах L5-S1, будучи гомологичными ядрам Кларка, также могут являться элементами общей спинальной проприоцептивной системы, в связи с чем было дополнительно проведено картирование ПРВ+ нейронов в пределах всего пояснично-крестцового отдела спинного мозга у новорождённых котят ($n=2$). Во всех исследуемых сегментах (L1-S1) спинного мозга новорожденных животных ПРВ+ нейропиль чётко обособлен в виде округлого образования, сосредоточенного в дорзомедиальной области промежуточного серого вещества. Вне зависимости от сегмента, форма и локализация этой области сходны с таковыми у ядер Кларка. В отличие от взрослых животных, у котят не выявлено снижения иммунореактивности в более каудальных сегментах. Напротив, на всем протяжении поясничного отдела иммунопозитивный нейропиль можно развит за счет толстых ПРВ+ волокон, приходящих с дорзальной поверхности и следующих в центральные рога. Полагаем, что проприоцептивные нейроны изначально закладываются в спинном мозге в виде единой системы, охватывающей весь поясничный отдел. Дальнейшее ее разбиение на подсистемы, по-видимому, связано с усложнением в ходе онтогенеза двигательных паттернов животного, для чего необходим более тонкий контроль со стороны нервной системы, и как следствие развитие мото- и интернейронного аппарата. В результате этого в пределах поясничного отдела происходит разделение общей проприоцептивной системы на морфологически различные составляющие: 1) ядра Кларка, локализующиеся в сегментах L1-L4 и 2) группы проприоцептивных нейронов сегментов L5-S1.

Таблица 3. Усредненная по всем животным и сегментам площадь сомы ПРВ+ нейронов ($\text{мкм}^2 \pm \text{стандартное отклонение}$). Мелкие нейроны – площадь сомы $<200 \text{ мкм}^2$, средние нейроны – площадь сомы $200-450 \text{ мкм}^2$, крупные нейроны – площадь сомы $>450 \text{ мкм}^2$.

Пластины	Сегменты	Особенности локализации	Тип нейронов	Площадь, мкм ²
Пластина I	L6-S1	—	Мелкие овальные (n=124)	42±4 (n=124)
Пластины II-III	L1-S1	—	Мелкие овальные (n=1479)	28±10 (n=1479)
	L1-L4	На границе пластин VI, VII и X	Мелкие овальные (n=151)	61±24 (n=151)
Пластины IV-VI	L5-S1	На границе пластин VI, VII и X	Мелкие мультиполлярные (n=1018)	93±40 (n=1018)
			Средние мультиполлярные (n=114)	283±91 (n=114)
Пластина VII	L1-S1	Вентральная часть пластины VII	Мелкие/средние мультиполлярные (n=254)	168±111 (n=254)
Пластины VIII	L1-S1	—	Мелкие мультиполлярные (n=539)	154±32 (n=539)
		—	Средние мультиполлярные (n=1305)	379±149 (n=1305)

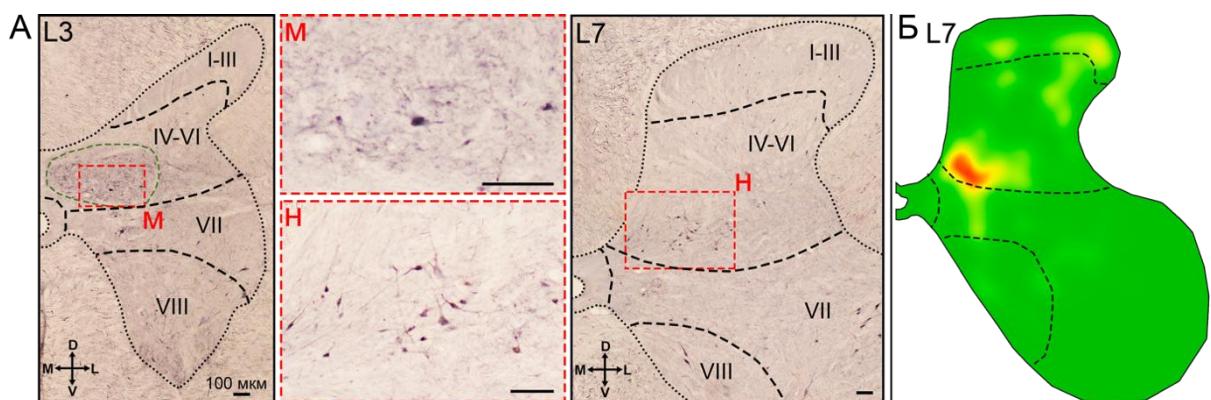


Рис. 6. Распределение PRB+ нейронов. А – локализация PRB+ нейронов в медиальной части пластин V-VI; Б – сопоставление карт плотности PRB+ и FOS+ нейронов на примере сегмента L7 (зелено-красный градиент отражает степень колокализации разных маркеров от минимального к максимальному, соответственно).

Кальретинин. КЛР+ нейроны представлены в сером веществе значительно шире: 20 морфотипами (Таблица 4). При этом распределение данных нейронов менее упорядочено, в связи с чем, специфических скоплений (как для кальбиндина и парвальбумина) выявлено не было (Рис. 7 А). При сопоставлении карт плотности данных нейронов с картами плотности FOS+ нейронов наибольшее пересечение помимо дорзальных рогов выявляется в медиальной части пластин VI (Рис. 7Б) – схожей области колокализации PRB+ и FOS+ нейронов. Согласно работе Y. Fu и коллег (2012), у мышей кальретинин метит 42% нейронов ядер Кларка и 33% – нейронов каудально расположенных поясничных прецеребеллярных ядер. Таким образом, некоторые выявленные в настоящем исследовании КЛР+ нейроны также как PRB+ могут участвовать в работе проприоцептивной системы.

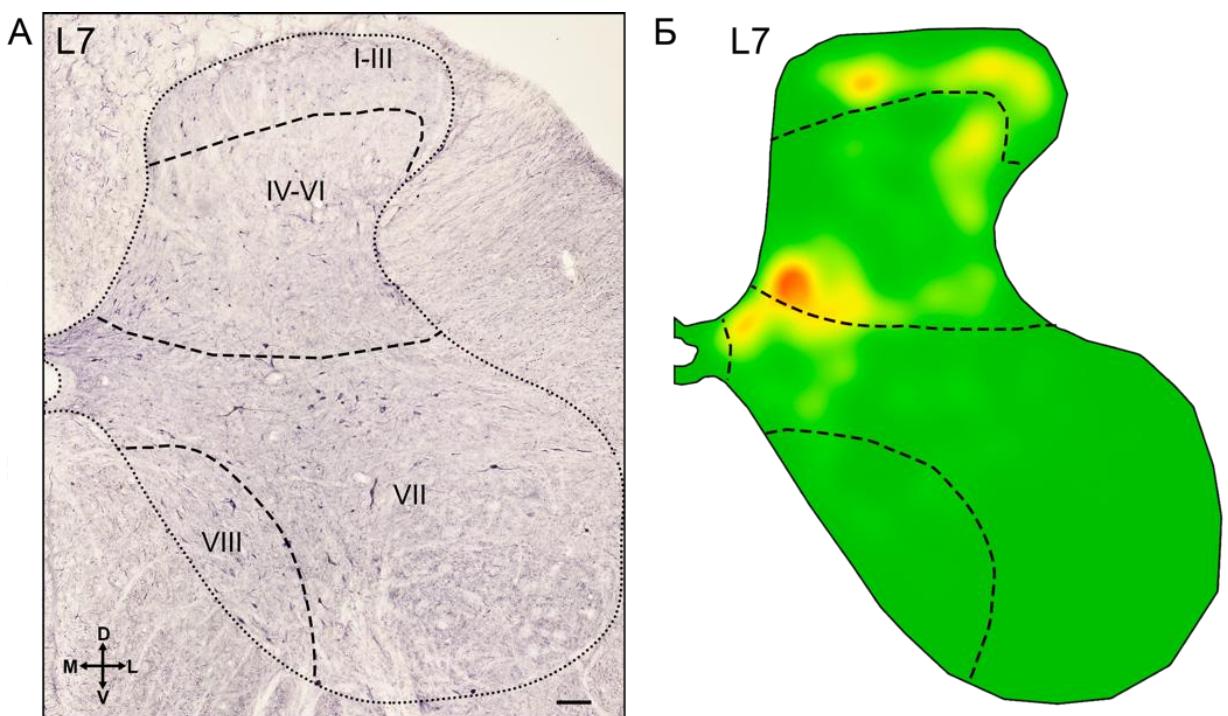


Рис. 7. Распределение КЛР+ нейронов. А – локализация КЛР+ нейронов в сером веществе спинного мозга; Б – сопоставление карт плотности КЛР+ и FOS+ нейронов на примере сегмента L7 (зелено-красный градиент отражает степень колокализации разных маркеров от минимального к максимальному, соответственно).

Таблица 4. Усредненная по всем животным и сегментам площадь сомы КЛР+ нейронов ($\text{мкм}^2 \pm \text{стандартное отклонение}$). Мелкие нейроны – площадь сомы $<200 \text{ мкм}^2$, средние нейроны – площадь сомы $200-450 \text{ мкм}^2$, крупные нейроны – площадь сомы $>450 \text{ мкм}^2$.

Пластины	Сегменты	Особенности локализации	Тип нейронов	Площадь, мкм^2
Пластина I	L1-S1	В медиальной половине пластины I	Мелкие веретеновидные	108 ± 69 (n=142)
	L1-S1	В области тракта Лиссажуэра	Мелкие овальные	92 ± 58 (n=126)
	L1-S1	На латеральной поверхности дорзального рога	Средние мультиполлярные	252 ± 126 (n=69)
Пластины II-III	L1-S1	Преимущественно в пластине II	Мелкие округлые	42 ± 21 (n=2898)
Пластина IV	L1-S1	—	Мелкие веретеновидные	82 ± 45 (n=219)
	L1-S1	—	Мелкие мультиполлярные	79 ± 35 (n=298)
	L1-S1	—	Средние мультиполлярные	393 ± 186 (n=47)
Пластины V-VI	L1-L4	На границе пластин VI, VII и X	Мелкие веретеновидные	80 ± 49 (n=828)
	L1-S1	В медиальной части пластин V-VI	Мелкие овальные	85 ± 49 (n=151)
	L1-S1	Латеральная граница пластины V с белым веществом	Средние мультиполлярные	260 ± 144 (n=54)
	L1-S1	—	Мелкие мультиполлярные	115 ± 52 (n=526)
	L1-S1	—	Крупные мультиполлярные	439 ± 213 (n=132)
Пластины VII-VIII	L1-L4	Дорзолатеральная граница пластины VII	Мелкие и средние мультиполлярные	153 ± 76 (n=627)
	L6-L7	—	Мелкие овальные	125 ± 31 (n=42)
		На границе пластин VI и VII	Мелкие и средние треугольные	209 ± 51 (n=38)
		—	—	—
	L1-S1	—	Мелкие мультиполлярные	140 ± 38 (n=1550)
Пластина X	L1-S1	—	Средние мультиполлярные	300 ± 68 (n=2041)
	L1-S1	—	Крупные мультиполлярные	771 ± 364 (n=1279)
	L5-L7	Вентральная часть пластины VII	Средние веретеновидные и мультиполлярные	160 ± 46 (n=81)
Пластина X	L1-S1	—	Мелкие овальные	82 ± 38 (n=341)

Выходы.

1. В ходе электрофизиологического картирования установлено, что нейронные сети кошки, обеспечивающие ходьбу задних конечностей в направлении вперёд, распространены в спинном мозге от сегмента L3 до сегмента S2. При этом нейронные сети, обеспечивающие ходьбу в направлении назад, распространены в значительно более узкой области: в сегментах L5-L7.
2. Исследование паттернов распределения нейронов, экспрессирующих ген раннего ответа *c-fos* во время вызванной эпидуральной стимуляцией ходьбой в разных

направлениях выявило отличия между ними: большее число активированных клеток в промежуточном сером веществе сегментов L6 и L7 во время ходьбы назад.

3. В промежуточном сером веществе спинного мозга выявлены близко расположенные скопления интернейронов нескольких типов, экспрессирующих кальций-связывающие белки кальбиндин, парвальбумин и кальретинин. Пространственная локализация этих скоплений совпадает с локусом промежуточного серого вещества, содержащей наибольшее число нейронов, активируемых в ходе вызванной локомоции.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

Статьи:

1. Меркульева Н.С., Михалкин А.А., **Вещицкий А.А.** Особенности распределения ацетилхолинэстеразы в заднелатеральном ядре таламуса кошки // Морфология. – 2015. – Т. 148. – №. 4. – С. 46–48.
2. Merkulyeva N., **Veshchitskii A.**, Makarov F., Gerasimenko Y., Musienko P. Distribution of 28 kDa calbindin-immunopositive neurons in the cat spinal cord // Frontiers in neuroanatomy. – 2016. – Vol. 9. – №. 166. – Р. 1–13.
3. Ляховецкий В.А. Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Герасименко Ю.П., Мусиенко П.Е. Математическая модель управления задними конечностями кошки при ходьбе назад // Биофизика. – 2016. – Т. 61. – №. 5. – С. 1001–1009.
4. Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Шкорбатова П.Ю., Шенкман Б.С., Мусиенко П.Е., Макаров Ф.Н. Морфометрические особенности ядра Кларка в ростральных сегментах поясничного отдела спинного мозга кошки // Морфология. – 2016. – Т. 150. – №. 5. – С. 18–23.
5. 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. – Р. 2951–17.

Тезисы:

1. **Вещицкий А.А.**, Михалкин А.А. Экспрессия ацетилхолинэстеразы в LP ядрах таламуса мозга 2-недельных котят. Современные проблемы нейробиологии // Материалы I научной конференции с международным участием, посвященной 70-летию Ярославской государственной медицинской академии, Ярославль. – 2014. – С. 11.
2. Mikhalkin A., Nikitina N., **Veschitskiy A.**, Merkulyeva N. Expression of the heavy-chain neurofilament proteins in the lateral geniculate nucleus of the cat // Neuronus 2015 IBRO & IRUN neuroscience forum, Poland, Klarow. – 2015. – Р. 116.
3. **Вещицкий А.А.**, Меркульева Н.С., Мусиенко П. Е. Популяция кальбиндиновых интернейронов серого вещества спинного мозга кошки // Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем. Материалы всероссийской конференции с международным участием, посвященная 90-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург – Колтуши. – 2015. – С. 42.
4. **Вещицкий А.А.**, Меркульева Н. С., Мусиенко П. Е. Распределение кальбиндин-иммунопозитивных нейронов в спинном мозге кошки // Материалы международной научной конференции Научного Парка СПбГУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину», Санкт-Петербург. – 2015. – С. 29.
5. **Вещицкий А.А.**, Меркульева Н. С., Мусиенко П. Е. Кластерная организация кальбиндин-иммунопозитивных нейронов спинного мозга кошки. Материалы XII международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии», Судак. – 2016. – С. 111.

6. Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Герасименко Ю. П., Мусиенко П.Е. Локализация нейронов спинного мозга кошки, активирующихся при вызванной локомоции // Материалы XII международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии», Судак. – 2016. – С. 276.
7. Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Герасименко Ю. П., Мусиенко П.Е. Распределение c-fos-иммунопозитивных нейронов в спинном мозге десеребрированных кошек при вызванной локомоции // Материалы VI всероссийской с международным участием конференции по управлению движениями «Motor Control-2016», Казань. – 2016. – С. 61.
8. Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Мусиенко П.Е. Иммуногистохимическое исследование локализации кальбиндиновых интернейронов в люмбосакральном отделе спинного мозга кошки // Материалы II научной конференции с международным участием, посвященной 70-летию Ярославской государственной медицинской академии, Ярославль. – 2016. – С. 31.
9. Павлова Н.В., Баженова Е.Ю., Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Шкорбатова П.Ю., Мусиенко П.Е. Цитохимические особенности нейронов ядра Кларка спинного мозга кошки // Материалы II научной конференции с международным участием, посвященной 70-летию Ярославской государственной медицинской академии, Ярославль. – 2016. – С. 38.
10. Merkulyeva N., **Veshchitskii A.**, Lyakhovetskii V., Musienko P. Relationships between the pattern of the c-fos-positive neurons and locomotion hindquaters properties in cats // FENS Regional Meeting, Hungary, Pécs. – 2017.
11. Fomin I., Mikhailov V., Bakhshiev A., Merkulyeva N., **Veshchitskii A.**, Musienko P. Detection of neurons on images of the histological slices using convolutional neural network // Selected papers from the XIX international conference on neuroinformatics «Advances in neural computation, machine learning, and cognitive research, studies in computational intelligence», Russia, Moscow. – 2017. – P. 85.
12. **Veshchitskii A.**, Merkulyeva N., Gorsky O., Musienko P. Analysis of spinal neuronal networks controlling forward and backward locomotion // FENS Regional Meeting, Hungary, Pécs. – 2017.
13. 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. – 2017. – С. 78.
14. Баженова Е.У., Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Горский О.В., Павлова Н.В., 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, Воронеж. – 2017. – С. 1628.
15. Попов А.А. Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Горский О.В., Туртикова О.В., Тыганов С.А., Шенкман Б.С., Мусиенко П.Е. Влияние опорного стимула на кинематику локомоторных движений в условиях моделируемой микрогравитации // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова, Воронеж. – 2017. – С. 286.