

На правах рукописи

**МУСИЕНКО
ПАВЕЛ ЕВГЕНЬЕВИЧ**

**СПИНАЛЬНО-СТВОЛОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНТЕГРАТИВНОГО
КОНТРОЛЯ ПОЗЫ И ЛОКОМОЦИИ**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Санкт-Петербург
2014

Работа выполнена в лаборатории физиологии движений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П.Павлова Российской академии наук

Научный консультант: Доктор биологических наук, профессор
Герасименко Юрий Петрович

Официальные оппоненты: Академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Веселкин Николай Петрович
Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М.Сеченова РАН, Санкт-Петербург
Доктор медицинских наук, профессор
Мушкин Александр Юрьевич
Санкт-Петербургский научно-исследовательский
институт фтизиопульмонологии
Минздрава России
Доктор биологических наук, профессор
Фролов Александр Алексеевич
Институт высшей нервной деятельности и
нейрофизиологии РАН, Москва

Ведущая организация: **Государственный научный центр РФ –
Институт медико-биологических проблем РАН,
г. Москва**

Защита диссертации состоится «___»_____ 2014 года в
_____ часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций при Институте физиологии им. И.П.Павлова
РАН (Д 002.020.01). 199034, Санкт-Петербург, наб.Макарова, д.6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им.
И.П.Павлова РАН.

Автореферат разослан «___»_____ 2014 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук

Н.Э. Ордян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ. Активное перемещение в пространстве является жизненно важной двигательной задачей. Все его компоненты, включая стояние, инициацию и выбор направления локомоции, преодоление препятствий, реакцию на возмущающие воздействия, требуют тонкой координации между движениями конечностей и туловища, эффективного контроля мышечного тонуса, позы тела и поддержания равновесия (Bolton, Misiaszek, 2009). Нарушение любой из составляющих этого контроля при заболеваниях и травмах нервной системы приводит к тяжелым двигательным расстройствам, резко ограничивающим уровень жизни пациентов и имеющим высокую социальную значимость.

Многие двигательные центры ЦНС от коры головного мозга до спинного мозга участвуют в поддержании позы тела при стоянии и ходьбе (Horak, Macpherson, 1996; Jacobs, Horak, 2007; Karayannidou et al., 2009). Тем не менее, не вполне ясно распределение постуральных функций между этими центрами и значение каждого из них (Lyalka et al., 2005; Macpherson et al., 1997). Вместе с тем установлено, что децеребрированные животные способны стоять и ходить, не теряя равновесия (Bard, Macht, 1958; Magnus, 1924). Отсюда следует, что автоматический контроль позы и локомоции осуществляется на уровне ствола и спинного мозга и не требует обязательного участия высших нервных центров (Mori, 1987; Deliagina et al., 2006). Мало изучена, однако, конкретная роль стволовых и спинальных нейронных сетей в регуляции позы, а также механизмы взаимосвязи двух условно разделяемых систем локомоторного и постурального контроля.

Нарушение супраспинальных влияний по-разному действует на локомоторную и постуральную функции. Спинальная моторная система, лишенная сигналов от головного мозга, может управлять локомоторной активностью (Forsberg, Grillner, 1973), но до последнего времени не было показано, что спинализированные животные обладают достаточными постуральными способностями для поддержания равновесия (Macpherson et

al., 1997). Считается, что спинной мозг содержит нейронные сети, способные генерировать ритмический локомоторный паттерн, тогда как постуральный контроль требует участия центров ствола и переднего мозга (Macpherson et al., 1997; Deliagina et al., 2006). В то же время, известно, что с помощью специальных тренировок у спинальных животных можно в определенной степени восстановить функцию поддержки веса тела при передвижении (Barbeau, Rossignol, 1987; Lovely et al., 1990). На основании этих данных предполагается, что базовые механизмы постурального контроля, интеграции позы и локомоции осуществляются нейронными сетями спинного мозга, нисходящие импульсы от стволовых центров активируют и корректируют их работу (Deliagina et al., 2008), а знание природы влияний супраспинальных систем позволит развить эффективные методы искусственного управления спинальными нейрональными механизмами при патологии (Musienko et al., 2009).

Представляют теоретический интерес экспериментальные исследования роли отдельных центров ствола, нисходящих супраспинальных систем и спинальных сетей в управлении позой и локомоцией, а также выяснение сенсомоторных интегративных механизмов этих двух неразделимых в условиях гравитации составляющих активного перемещения в пространстве. Кроме фундаментального, изучение методов возможной замены естественных супраспинальных импульсов искусственными воздействиями имеет прикладное значение для разработки эффективных нейрореабилитационных подходов при заболеваниях и травмах нервной системы, сопровождающихся нарушениями локомоторной и постуральной функций.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ. Целью настоящей работы являлось исследование спинальных и стволовых механизмов интегративного постурально-локомоторного контроля и методов их восстановления при нейромоторных расстройствах.

Эта цель предусматривала решение следующих основных задач:

1. Изучить функциональное значение отдельных моторных центров ствола, нисходящих нейромедиаторных систем и спинальных нейронных сетей в управлении позой при стоянии и локомоторной активности.
2. Выявить сенсомоторные механизмы интеграции локомоторной и постуральной систем.
3. Найти методы искусственной активации нейронных сетей спинного мозга при нарушении супраспинального контроля.
4. Разработать эффективные нейрореабилитационные алгоритмы тренировки постуральной и локомоторной функций при заболеваниях и травмах нервной системы.
5. Исследовать возможности восстановления произвольного двигательного контроля за счет образования новых нейрональных связей в обход повреждения спинного мозга.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА. Впервые получены экспериментальные данные о том, что спинной мозг содержит нейронные сети, ответственные за генерацию постуральных реакций при стоянии, за контроль направления локомоторной активности и динамический баланс при ходьбе, а также выявлена возможность активации этих сетей электрической и химической стимуляцией.

Получены приоритетные данные о рефлексорных механизмах интегративного контроля позы и локомоции при активном передвижении, функционирующих на основе специфических соматосенсорных сигналов от конечностей и туловища.

Проведено детальное нейрофармакологическое картирование, в результате чего впервые создан обширный каталог функциональных связей между воздействием на моноаминовые рецепторные системы и специфическими аспектами локомоторного и постурального контроля. Отработаны подходы выбора взаимодополняющих комбинаций лекарственных веществ, которые позволили предложить и экспериментально апробировать сочетания

химических препаратов, эффективно замещающих нисходящие супраспинальные влияния в контроле локомоции и позы после повреждения спинного мозга.

Разработан приоритетный алгоритм мультисистемной нейрореабилитации, включающий мультисегментную электрическую стимуляцию спинного мозга, фармакологическое воздействие на несколько нейрорецепторов и тренировку специфических двигательных задач с использованием робототехнического постурального нейропротеза. Экспериментально доказано, что данный алгоритм является эффективным для активации нейропластических процессов в нейронных сетях спинного мозга ниже уровня повреждения, а также направления их в сторону двигательного реобучения и адаптации в условиях нарушенного моторного контроля.

Впервые установлено, что искусственно направляемая нейропластичность при проведении комплексных нейрореабилитационных мероприятий затрагивает не только спинальные сети, а имеет системный многоуровневый характер. Показано, что структурная и функциональная перестройка нейронных центров ствола мозга и их спинальных проекций вносит свой вклад в компенсацию передачи информации в обход повреждения и обеспечивает постепенное восстановление произвольного двигательного контроля.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1.Спинной мозг содержит высокоинтегрированные нейронные сети, ответственные за генерацию постуральных реакций при стоянии, за контроль мышечного тонуса и баланса при ходьбе. В норме работа этих сетей активируется и модулируется сигналами из головного мозга, которые при патологии могут быть заменены искусственной электрической и химической стимуляцией.

2.Динамический постуральный контроль при ходьбе может достигаться интеграцией нейронных механизмов, работающих в различные фазы локомоторного цикла на основе соматосенсорной информации от

конечностей и туловища. Эти механизмы компенсируют отклонение из состояния равновесия, обеспечивая стандартное медиолатеральное положение конечностей относительно туловища, регулируя биомеханическую жесткость конечностей и уровень тонической активности мышц спины.

3. При спинальном повреждении комбинация электрической стимуляции спинного мозга, фармакологической стимуляции нейрорецепторов и тренировки специфических двигательных задач активизирует и направляет нейропластические процессы в спинном мозге. Структурная и функциональная перестройка нейронных центров ствола мозга и их спинальных проекций вносит вклад в компенсацию передачи информации в обход повреждения с постепенным восстановлением постуральной, локомоторной функций и их произвольного контроля.

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ.

Теоретическое значение проведенной работы состоит в расширении представлений о системе постурального контроля при различных формах двигательного поведения. Обнаруженные механизмы регуляции динамического баланса при ходьбе свидетельствуют о наличии тесной интеграции локомоторных и постуральных нейронных сетей, существовании единой системы их управления как одного из примеров общего принципа интеграционного контроля сенсомоторных функций нервной системой. Установлено, что, благодаря глубокой интеграции и согласованной работе между различными нейронными сетями ствола и спинного мозга, нервная система обладает высокой пластичностью, которая играет важнейшую роль в обучении новым навыкам и в восстановлении двигательного управления при патологии.

Разработанные в процессе работы методы мультисистемной нейрореабилитации и робототехнические технологии могут быть использованы в создании нейропротезов для лечения больных с повреждениями спинного мозга. Метод многокомпонентной электрической и

химической стимуляции (приоритет на патент от 30.06.2009 № 2411589) применялся в разработке имплантируемых биосовместимых мультиэлектродных и хемотродных интерфейсов (приоритет на патент от 23.12.2011 № 20130303873) для стимуляции спинного мозга при нейромоторных заболеваниях.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Материалы исследований докладывались: на V Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности (Москва, 2009); XXI Съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010); III Всероссийской с международным участием конференции по управлению движением (Великие Луки, 2010); VI Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности (Москва, 2011); IV Всероссийской с международным участием конференции по управлению движением (Москва, 2012); VII Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности (Москва, 2013); 36th Annual Meeting of International Society for Neuroscience (Atlanta, 2006); 37th Annual Meeting of International Society for Neuroscience (San Diego 2007); 38th Annual Meeting of International Society for Neuroscience (Washington, 2008); 39th Annual Meeting of International Society for Neuroscience (Chicago, 2009); NCCR Neural Plasticity and Repair, Meeting, (Berlingen, 2009); 6th International Forum of European Neuroscience (Geneva, 2008); 40th Annual Meeting of International Society for Neuroscience (San Diego, 2010); 41th Annual Meeting of International Society for Neuroscience (Washington, 2011); 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, 2012); 6th International Conference on Neural Engineering (San Diego, 2013); 43th Annual Meeting of International Society for Neuroscience (San Diego, 2013).

ПУБЛИКАЦИИ. По материалам диссертации опубликовано 85 научных работ, включая 24 статьи в рецензируемых журналах. Получено 6 патентов на изобретения.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД ДИССЕРТАНТА. Все результаты, представленные на защиту, получены лично диссертантом или при его непосредственном участии. Автор выполнял постановку целей и задач исследований, разработку экспериментальных моделей и опытных установок, проведение экспериментов, обработку и интерпретацию результатов.

СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической главы, четырех глав собственных экспериментальных исследований и их обсуждения, общего обсуждения, выводов и списка цитированной литературы из 509 наименований. Диссертация изложена на 340 страницах, содержит 82 рисунка и 2 таблицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основные экспериментальные модели

Острые модели децеребрированных и спинализированных животных

Децеребрированные (n=34 кошки, n=15 кроликов) и спинализированные (n=17 кроликов) модели были использованы для проведения острых опытов. Перерезка, проведенная на разных уровнях головного мозга устраняла влияние от переднего мозга и вышележащих центров ствола, для того чтобы исследовать свойства и возможности стволового нейронального аппарата в контроле позы и локомоции (Рис. 1, 3, 4). Перерезка спинного мозга (T7-9, T12) позволяла изучать собственно спинальные нейрональные механизмы. Уровень децеребрации и полнота спинализации проверялись после опыта при диссекции.

Хронические модели повреждения спинного и головного мозга

Для изучения двигательных способностей парализованных животных и возможностей различных методов нейрореабилитации применялись экспериментальные модели крыс нескольких линий (Sprague Dawley, Lewis)

с поражением головного мозга (ишемический инсульт) и повреждениями спинного мозга различной степени выраженности и локализаций. Под общим наркозом и в стерильных условиях выполнялись полная перерезка спинного мозга на грудном уровне T7-T8 (n=44), правосторонняя латеральная гемисекция на уровне шейного отдела C7 (n=5), две латеральные гемисекции (n=46), произведенные на противоположных сторонах и на разных спинальных уровнях (T7 и T10). Ишемическое поражение коры головного мозга (n=5) было индуцировано введением сосудосуживающего препарата эндотелина-1 (ЕТ-1, 0,3 мкг/мкл, Sigma-Aldrich). Степень и расположение повреждений спинного и головного мозга проверялись гистологически после окончания эксперимента.

Методы стимуляции

Стимуляция спинного мозга

В острых экспериментах на кошках и кроликах осуществляли эпидуральную стимуляцию (ЭС) дорсальной поверхности спинного мозга (L5, L7) с оптимальными для вызова шагания параметрами (3-5 Гц, 0.2-0.5 мс, 100-300 мкА). В хронических опытах на крысах под общим наркозом и в стерильных условиях имплантировали проволочные электроды из нержавеющей стали с тефлоновым покрытием (AS632; Cooper Wire) на уровне спинальных сегментов L2 и S1. Использовали стимулятор фирмы A-M Systems, модель 2100.

Стимуляция нейронных центров головного мозга

В острых опытах для вызова локомоции на кошках стимулировали (30 Гц, 0,5-1 мс, 50-200 мкА) мезенцефалическую локомоторную область (МЛО). В острых опытах на кроликах также применяли стимуляцию МЛО и вентральной области покрышки (ВОП) (Рис. 1). В хронических опытах осуществляли поверхностную стимуляцию сенсомоторной коры головного мозга имплантированными эпидуральными электродами.

Методы регистрации

Регистрация электромиографической активности

Биполярные электромиографические (ЭМГ) электроды имплантировали билатерально в мышцы задних конечностей. ЭМГ сигналы усиливались дифференциальным усилителем (А-М Systems Model 1700) в диапазоне от 30 Гц до 10 кГц и оцифровывались с помощью аналого-цифрового преобразователя фирмы National Instruments.

Регистрация силовых опорных реакций

Для регистрации силовых ответов при стоянии и ходьбе использовали сенсоры нескольких типов (тензодатчики 1002K, VISHAY, биомеханический стабиланализатор 2 кГц, HE6X6, АМТИ), которые располагались на опорной поверхности или под лентой тредбана.

Регистрация кинематики движений

Кинематику движений записывали одновременно с другими сигналами. Для этого производили видеорегистрацию с применением Vicon System (эксперименты на крысах), нескольких обычных камер (эксперименты на кошке) и/или использовали механические датчики (потенциометры и акселерометры) перемещения сегментов тела при ходьбе и стоянии.

Анализ нейрофизиологических данных

Сигналы от ЭМГ электродов, силовых и потенциометрических датчиков усиливались, оцифровывались и записывались на компьютерный диск с помощью программного обеспечения сбора и анализа данных (National Instrument, LabView, Power-1401/Spike-2, Cambridge Electronic Design). ЭМГ сигналы были выпрямлены и сглажены. Регистрировали минимум 10 циклов шага левой и правой задней конечности. В общей сложности для каждой лапы и каждого цикла шага рассчитывалось более 100 параметров. Эти параметры предоставляли целостное количественное описание локомоторных паттернов от общих особенностей походки до тонких деталей движения конечностей. Различные экспериментальные условия были связаны с существенной модуляцией паттернов шагания, что отражалось в

модификации большей части вычисляемых параметров. Для оценки наиболее важных и воспроизводимых модуляций паттернов в разных условиях и при разных воздействиях применялась многоступенчатая статистическая методика, основанная на анализе главных компонент (Courtine et al., 2009).

Количественные характеристики (средние значения $\pm$ стандартная ошибка) вычисляли стандартными статистическими программами (Microsoft Excel 2007, SPSS 13.0). Коэффициенты корреляции Пирсона использовали для выявления связи между парами переменных. Дисперсионный анализ (повторные измерения ANOVA) и двусторонний критерий Стьюдента применяли для проверки различий между нормально распределёнными данными (тест Колмогорова-Смирнова) в разных экспериментальных условиях. Вычисления с непараметрическим критерием (Уилкоксона и Крускала-Уоллиса) выполняли при распределении, отличном от нормального.

Нейроморфологический анализ и иммуногистохимия

Исследования нейрональных путей выполнялись путем введения ретроградного красителя Fastblue (FB) билатерально в L1-L2 спинальные сегменты. Чтобы проследить аксональные проекции двигательной коры, вводился антероградный краситель биотинилированный декстран амин (BDA) в левую двигательную кору. С целью проведения c-fos экспериментов, крыс перфузировали после 45-минутной сессии локомоторной активности. Для иммуногистохимических исследований срезы инкубировали в сыворотке, содержащей антитела: анти-c-fos кролика (1:2000, Santa Cruz Biotechnologies, США), анти - GFAP (1:1000, Dako, USA), анти - 5HT (1:5000, Sigma Aldrich, Германия) или мышинные анти-синаптофизин (1:1000, Millipore, США). Иммунореакции визуализировали с помощью вторичных антител, меченых Alexa fluor 488 или 555. BDA-меченые волокна выявляли стрептавидин-пероксидазой хрена. Fastblue- и c-fos- положительные нейроны подсчитывали с применением программного обеспечения для анализа изображений. Плотность волокон измеряли в 5 конфокальных стеках

изображений каждой области во всех крысах, полученных с помощью стандартных настроек изображения и анализируемых специально написанными программами. Изображения получали с использованием лазерного конфокального сканирующего микроскопа в LAS AF интерфейсе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

СПИНАЛЬНО-СТВОЛОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ УПРАВЛЕНИЯ ПОЗОЙ, ЛОКОМОЦИЕЙ И ИХ СЕНСОМОТОРНОЙ ИНТЕГРАЦИЕЙ

Постуральные и локомоторные сети спинного мозга и ствола

У четвероногих животных основное, наиболее распространенное, положение тела с ориентацией спины вверх поддерживается постуральной системой. Эта замкнутая система регуляции приводится в действие сенсорными сигналами и компенсирует отклонения от желаемой ориентации тела, производя корректирующие двигательные реакции (Deliagina et al., 2006; Horak et al., 1996; Massion 1994, 1998).

Роль стволовых и спинальных нейронных сетей в постуральном контроле (Musienko et al., 2008, 2010) изучалась в острых экспериментах на кроликах (Рис. 1, 2). Установлено, что после удаления передних отделов мозга преаммиллярные (Рис.1 Б1) кролики выполняют сходные с интактными (n=10) позные коррекции, которые обусловлены соматосенсорными сигналами от конечностей и видом возмущающего воздействия (Рис. 1А). Реакции на латеральные наклоны и толчки были аналогичны наблюдаемым у интактных животных, но их интенсивность снижена (Рис. 1В). При спонтанном выпрямлении из лежачего положения преаммиллярные кролики принимали нормальное положение медленнее, чем интактные. Сенсорная стимуляция активировала установочные рефлексy. Особую важность зоны ствола мозга между пре- и постаммиллярной перерезками (1 и 2 на Рис. 1Б) в постуральном контроле подтверждают полученные данные на постаммиллярно децеребрированных кроликах (n=5), которые утрачивали способность к самостоятельным коррекциям позы. Две

структуры в данной области - черная субстанция и красное ядро (SN и NR на Рис. 1Б) – связаны с моторным контролем (Massion, 1967; Takakusaki et al., 2003, 2004), а их повреждение может быть причиной наблюдаемых

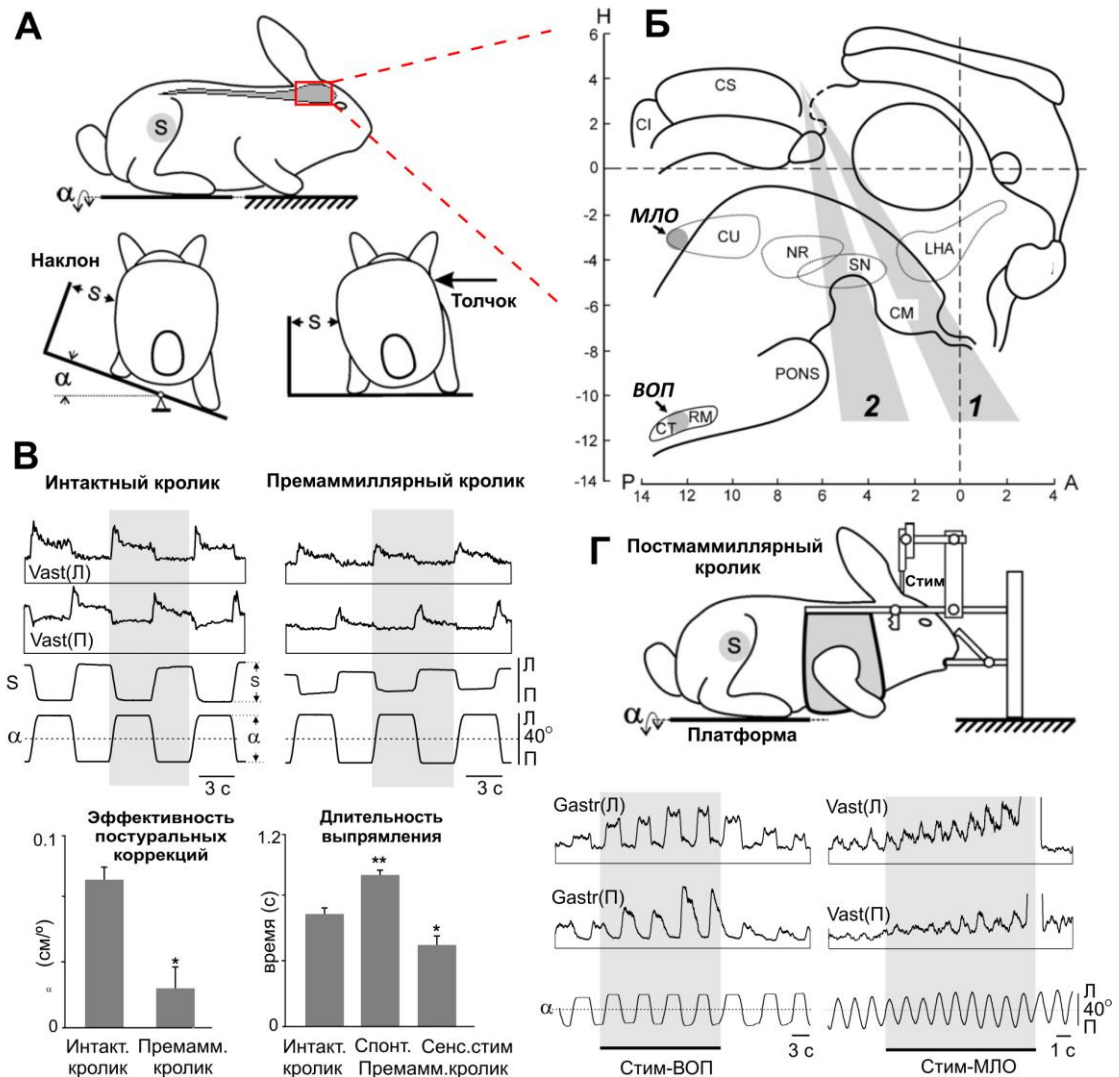


Рис.1. Постуральные способности децереброванных кроликов. (А) Экспериментальная установка. (Б) Уровни децеребрации и зоны стимуляции ствола мозга в сагиттальной плоскости. Перерезки ствола проводились на преколликварно-премаммилярном уровне (линии среза располагались в сером секторе 1) или преколликварно-постмаммилярном уровне (сектор 2). Мозговые структуры: CI, colliculus inferior; CM, corpus mammillaris; CS, colliculus superior; CT, corpus trapezoides; CU, area cuneiformis; LHA, lateral hypothalamic area; NR, nucleus ruber; SN, substantia nigra; RM, nucleus raphe magnus. Серые круглые зоны обозначают эффективные области стимуляции ствола: МЛО, мезенцефалическая локомоторная область; ВОП, вентральная область покрышки. (В) Сравнение эффективности коррекций при наклонах и длительности выпрямления из лежачего положения в сидячее у intactных и премаммилярно децереброванных кроликов. (Г) Активация постурального контроля у постмаммилярных кроликов стимуляцией ВОП и МЛО. M.Vastus lateralis (Vast), m.Gastrocnemius lateralis (Gast).

двигательных дисфункций. Дополнительная электрическая стимуляция МЛО или ВОП восстанавливала постуральный контроль. Увеличивался тонус

разгибательных мышц задних конечностей, усиливались реакции на возмущающие воздействия (Рис. 1Б,Г).

После спинализации животные теряют латеральную стабильность (Macpherson et al., 1997). Исследования на спинальной модели кролика (n=17) показали (Рис.2А), что причиной этого является нарушение тонической активности постуральных рефлексов, приводимых в действие соматосенсорными сигналами от ипсилатеральной и, в меньшей степени,

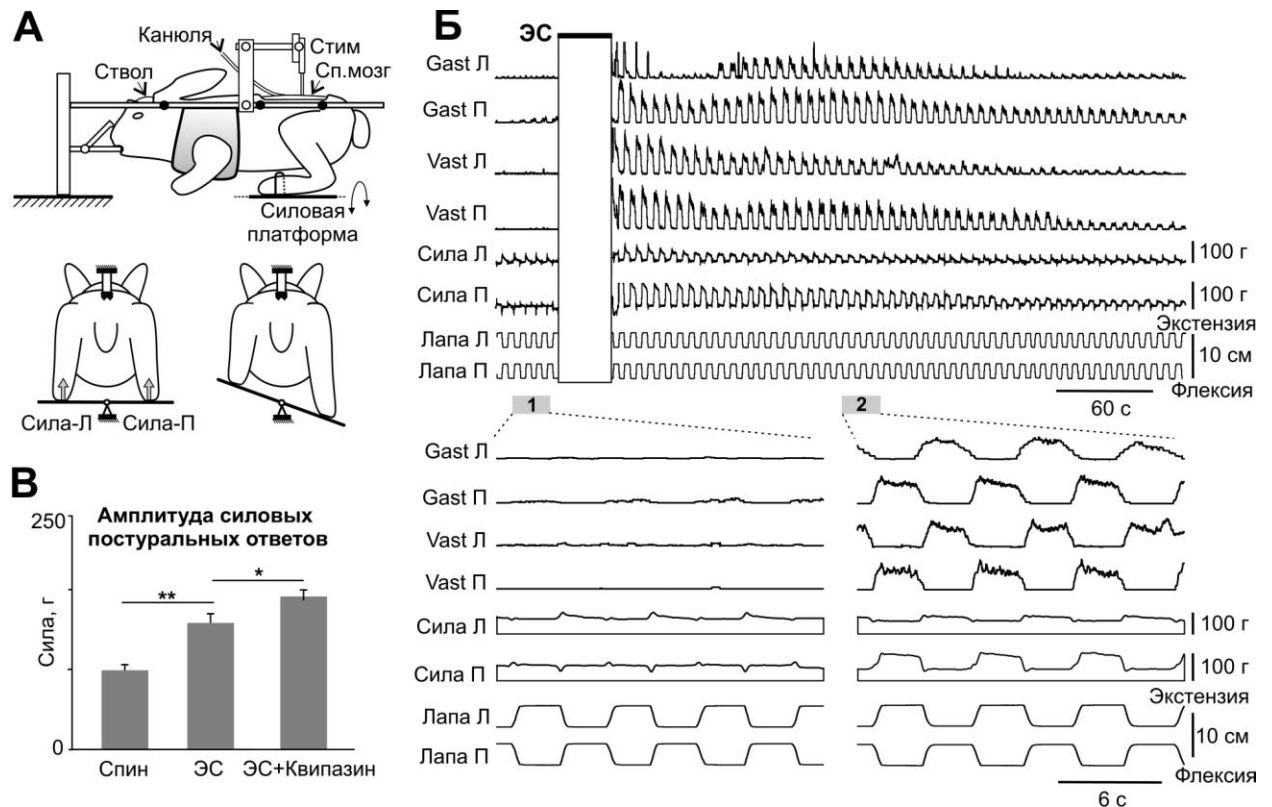


Рис. 2. (А) Схема экспериментальной установки. (Б) Усиление ЭМГ и силовых постуральных рефлексов конечностей спинального кролика после эпидуральной стимуляции L7 сегмента (ЭС). (В) Увеличение амплитуды силовых постуральных ответов после применения ЭС и комбинации ЭС с квипазином.

контралатеральной конечности (Musienko et al., 2010). Обнаружено, что эти постуральные реакции, характерные и для интактных животных, осуществляются на уровне спинного мозга. Лежащие в основе спинальные рефлексы подавлены и искажены после спинализации, но их перенастройку и восстановление можно быстро осуществить тонической ЭС (Рис. 2Б). Постстимуляционные эффекты ЭС на постуральные рефлексы еще более усиливались путем интратекального введения агониста серотониновых

рецепторов квипазина в область пояснично-крестцового утолщения (Рис. 2В).

Проведенные исследования подтверждают, что базовые механизмы регуляции позы осуществляются на уровне ствола и спинного мозга, а также являются доказательством способности спинальных сетей самостоятельно выполнять постуральный контроль с учетом фазного афферентного входа от опорно-двигательного аппарата в условиях дополнительной тонической стимуляции, которая заменяет сигналы из стволовых центров.

Шаги в различных направлениях часто используются человеком и животными для поддержания равновесия при стоянии и локомоции (Chvatal et al., 2011; Karayannidou et al., 2009). Децеребрированные и спинальные животные (Мусиенко с соавт., 2005; Courtine et al., 2009) ходят назад, вперед и в сторону в зависимости от направления движения тредбана. У кошек, идущих вперед, шаг, отклоняющийся от направления движения (например, влево или вправо) вызывается для коррекции отклонений из состояния равновесия (Karayannidou et al., 2009).

Функциональная организация системы контроля направления движений исследовалась на модели децеребрированной кошки ($n=9$) при различных направлениях ленты тредбана относительно оси тела ($0, \pm 45, \pm 90$, и 180°). Для каждого направления сравнивалась локомоторная активность, вызванная при стимуляции ствола мозга (стим-МЛО на Рис. 3А) и локомоция, вызванная стимуляцией спинного мозга (СМ). Обнаружено, что стимуляция СМ вызывает хорошо координированную ходьбу в различных направлениях движения ленты тредбана. Напротив, стимуляция ствола вызывала только ходьбу вперед по тредбану, движущемуся назад. При других направлениях ходьба отсутствовала или была плохо адаптирована к движению опорной поверхности (Musienko et al., 2012).

На основе полученных экспериментальных данных предлагается гипотеза о контроле направления шага (Рис. 3Б,В). Контроллер конечности (Orlovsky et al., 1999) включает два принципиальных механизма. Один контролирует

вертикальный компонент шага (поднятие и опускание конечности), а другой – горизонтальный компонент (перенос конечности из одной крайней точки в другую). Последний содержит нейронные сети, генерирующие горизонтальные компоненты шага в различных направлениях (для упрощения на Рис. 3 показаны только сети, генерирующие шаги в четырех направлениях: «вперед», «назад», «вправо», «влево»). Эти сети получают сенсорные входные импульсы, сигнализирующие о движении конечности в опорную фазу локомоторного цикла; достижение крайнего положения запускает перенос конечности.

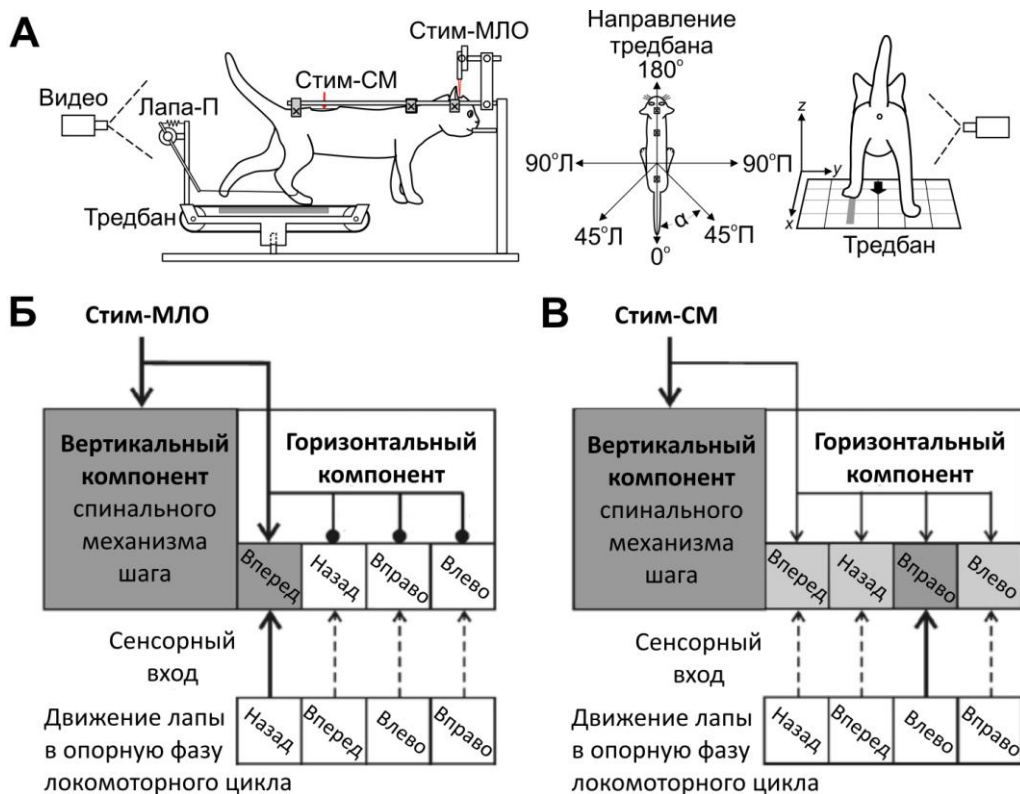


Рис.3. Базовые механизмы контроля направления ходьбы. (А) Схема эксперимента. (Б) Вызов ходьбы при стимуляции мезенцефалической локомоторной области. Черные кружочки обозначают тормозящие связи, которые не являются необходимыми для функционирования модели. (В) Вызов ходьбы при стимуляции спинного мозга. Активация определенного механизма обозначена серым, субпороговая активация – светло-серым, торможение – белым.

Стимуляция МЛО (Рис. 3Б) активирует механизм, генерирующий вертикальный компонент шага, выбирает и активирует сеть “вперед” горизонтального компонента, которая перемещает конечность вперед во время переноса, назад во время опоры, и, вероятно, тормозит все другие сети («назад», «вправо» и «влево»). Сенсорные входные импульсы,

сигнализирующие об отклонении конечности назад во время фазы опоры, помогают запустить перенос конечности. Таким образом, стимуляция МЛО вызывает шагание вперед независимо от направления движения ленты тредбана и ее можно рассматривать как стволочный командный центр для локомоции вперед, что является основной формой передвижения у двуногих и четвероногих животных.

Стимуляция СМ (Рис. 3В) активирует механизм, генерирующий вертикальный компонент шага. Она также вызывает подпороговую активацию всех сетей, генерирующих горизонтальный компонент. Благодаря движению ленты тредбана (например, «влево»), конечность достигает крайнее левое положение, и сенсорный входящий импульс активирует сеть «вправо», что приводит к шагу вправо. Например, афферентный вход сигнализирует об абдукции левой конечности, и аддукция может быть использована для запуска переноса в противоположном направлении. Таким образом, стимуляция непосредственно спинного мозга активирует компоненты спинальных нейронных сетей – контроллеры конечности, которые способны генерировать шагательные движения в различных направлениях.

Нейрональные механизмы динамического контроля баланса при ходьбе

Латеральная устойчивость является важнейшим аспектом контроля положения тела при ходьбе у животных и человека, которая требует высокого уровня интеграции активности работы постуральной и локомоторной систем. Показано, что постмамиллярно децеребрированные кошки (n=15) при дополнительной тонической электрической стимуляции спинного мозга эффективно контролируют латеральную устойчивость при ходьбе (Рис. 4) (Musienko et al., 2012). Это означает, что нейронные сети ствола, мозжечка и спинного мозга могут эффективно управлять динамическим балансом при активном передвижении. Разработанная экспериментальная модель исключала возможное участие вестибулярного, зрительного входов и шейно-тонических рефлексов в фазном контроле

динамического равновесия (Рис. 4А), поэтому коррекции баланса полностью базировались на интеграции соматосенсорной информации, поступающей от двигающихся задних конечностей и туловища.

Обнаружено, что у интактных и децеребрированных кошек происходит постоянная дестабилизация центра масс за счет регулярного отклонения туловища в цикле шага. Положение стопы при ходьбе меняется в rostro-каудальном и медιο-латеральном направлениях (Рис. 4Б), приводя к вариабельности ширины шага (Рис. 4В). Ширина шага после децеребрации, однако, коррелировала с пиковыми (P-P) латеральными отклонениями таза, сходно с интактными животными. Таким образом, за счет точного позиционирования стопы и регулировки ширины шага центр масс задней части тела преимущественно оставался между позицией левой и правой стопы и не смещался за пределы площади опоры, что поддерживало латеральную стабильность (Рис. 4Б).

Раздельно регистрируемые силы под левой и правой лапой, преимущественно вертикальные, представляют собой суммарную величину, отражающую активность всех мышц каждой конечности в опорную фазу локомоторного цикла. Их можно рассматривать как корректирующие кинетические антигравитационные двигательные ответы всей левой или правой лапы, возникающие вслед за соответствующей латеральной дестабилизацией баланса при ходьбе. Так же как у интактных ($P < 0.05$; $r = 0.93 \pm 0.02$), у децеребрированных кошек была обнаружена высокая корреляция между продолжающимся смещением таза и соответствующими силовыми опорными реакциями ($P < 0.05$; $r = 0.74 \pm 0.1$). Выявлена задержка между латеральным отклонением туловища и силовыми опорными реакциями, которые участвовали в восстановлении равновесия (d на Рис. 4В). Эта задержка, как и амплитуда циклических латеральных отклонений тела были значимо больше у децеребрированных кошек в сравнении с интактными (Рис. 4В).

Таким образом, тоническая ЭС спинного мозга у постмамиллярно децеребрированных животных, лишенных вестибулярного и других супраспинальных сенсорных входов, вызывала ходьбу с поддержкой веса тела и активным контролем баланса. Когда прилагалась продолжительная латеральная сила, стратегии поддержания баланса включали перераспределение активности абдукторов-аддукторов и силовых опорных реакций между левой и правой конечностями, корректировки экстензорной и флексорной фаз локомоторного цикла. Восстановление после неожиданного падения приводило к коактивации сгибательных и разгибательных мышц и изменению паттерна и времени активности абдукторов. Сильный активирующий эффект ЭС спинного мозга на поддержание равновесия при локомоции подтверждает ключевую роль спинальных сетей в постуральном контроле при активном передвижении в пространстве.

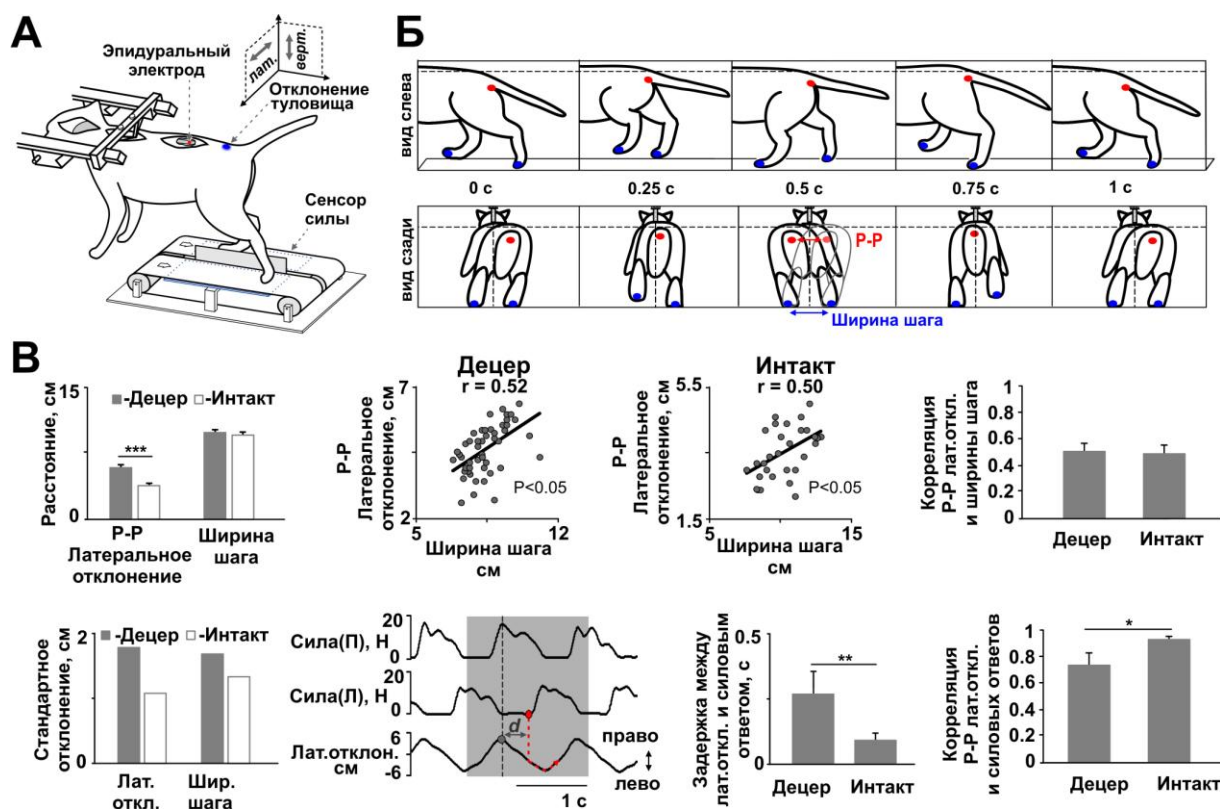


Рис. 4. (А) Экспериментальная модель и установка для изучения баланса при локомоции. (Б) Динамическая дестабилизация задних конечностей и туловища при свободной ходьбе. (В) Сравнение двигательных ответов, связанных с поддержанием равновесия при передвижении у децеребрированных и интактных кошек.

Тем не менее, настоящие данные также свидетельствуют о том, что нейронные сети ствола, мозжечка и переднего мозга активно участвуют в

обработке проприоцептивной и экстероцептивной информации, обеспечивая необходимый уровень тонического и модуляторного супраспинального контроля спинальных сетей. Уменьшение скорости и качества постуральных адаптаций при ходьбе (Рис. 4В) у децеребрированных по сравнению с интактными животными, а также у спинальных по сравнению с децеребрированными и интактными (Мусиенко с соавт., 2013) доказывает важную роль супраспинальных интегративных механизмов контроля позы и локомоции. Относительное вовлечение спинальных и супраспинальных нейронных сетей, так же как специфическая роль отдельных афферентных систем в регуляции баланса при ходьбе, требует дальнейшего изучения.

В следующей серии экспериментов были использованы два дестабилизирующих фактора – короткий боковой толчок и постоянный боковой наклон тредбана ($n=10$). Установлено, что толчок (Рис. 5А *Тест 1*) вызывает значительное изгибание и скручивание туловища, изменения модели локомоции, латеральные и медиальные компенсирующие шаги, но не приводит к падению (Musienko et al., 2013). Благодаря постуральным реакциям, локомоция с нормальной конфигурацией восстанавливалась. Обнаружено, что децеребрированные кошки могут сохранять равновесие на тредбане с боковым наклоном (Рис. 5А *Тест 2*). Постуральная адаптация в этих условиях была основана на трансформации симметричного локомоторного паттерна в асимметричный с разной функциональной длиной правой и левой конечности.

Исследование контроля равновесия при локомоции является сложной проблемой из-за большого количества различных механизмов, работающих одновременно. Используя редуцированный препарат децеребрированной кошки, в настоящей работе удалось выделить по отдельности некоторые из этих механизмов. Применялся целый ряд экспериментальных тестов, селективно воздействующих на специфические сенсорные входы и рефлекторные пути (Рис. 5А). С помощью этого был проведен детальный

анализ деятельности нейронных механизмов конечностей и туловища, участвующих в постуральном контроле при локомоции (Рис. 5Б-Д).

Независимо от латерального положения стоп (по отношению к туловищу) в начале фазы переноса (D_0 , D_1 , D_2 , и т.д), положение стоп в момент постановки стопы всегда одно и то же (D_0 на Рис. 5Б1) благодаря работе *механизма постуральных коррекций при переносе конечности (МПК)*. Таким образом, траектории переноса, которые начинаются в разных точках, заканчиваются в стандартной точке и приводят к стандартной траектории опоры. Траектория переноса может корректироваться благодаря сенсорной обратной связи от самой конечности, сигнализирующей о текущем значении отведения или приведения, как было показано с помощью оттягивания конечности латеральной силой в переносную фазу (Рис. 5А *Тест 3*, Рис. 5Б2). Предполагается, что контролируемой переменной в МПК является угол во фронтальной плоскости между конечностью и туловищем (γ на Рис. 5Б). Стабилизируя этот угол в конце фазы переноса, МПК обеспечивает постоянную латеральность траектории опоры (D_0). Это относится к ходьбе не только по горизонтальной поверхности, но и по поверхности с различными углами наклона (α) (Рис. 5Б3).

После того как конечность перенесена вперед, начинает действовать *механизм постуральных коррекций при опоре конечности (МОК)* (Рис. 5 В, Рис. 5А *Тест 4*). Он основывается на рефлекторных реакциях к изменению угла тазобедренного сустава во фронтальной плоскости. Увеличение или уменьшение угла γ ($\Delta\gamma$ на Рис. 5 В) вызывает, соответственно, активизацию приводящих или отводящих мышц, что восстанавливает начальный угол бедра (красная стрелка на Рис. 5В). МОК обусловлен сенсорной обратной связью от конечностей, сигнализирующей об угле γ . Наиболее вероятными афферентами, обеспечивающими эту информацию, являются рецепторы растяжения приводящих и отводящих мышц.

Механизм компенсации нагрузки конечности (МКНК) также действует во время фазы опоры (Рис. 5 Г, Рис. 5А *Тесты 2, 5*). Он активизирует мышцы-

разгибатели при нагрузке и сгибании конечности (Orlovsky, 1972; Pratt, 1995; Duysens et al., 2000). Наиболее вероятными афферентами, дающими информацию для МКНК, являются рецепторы растяжения и сухожильные органы Гольджи мышц-разгибателей.

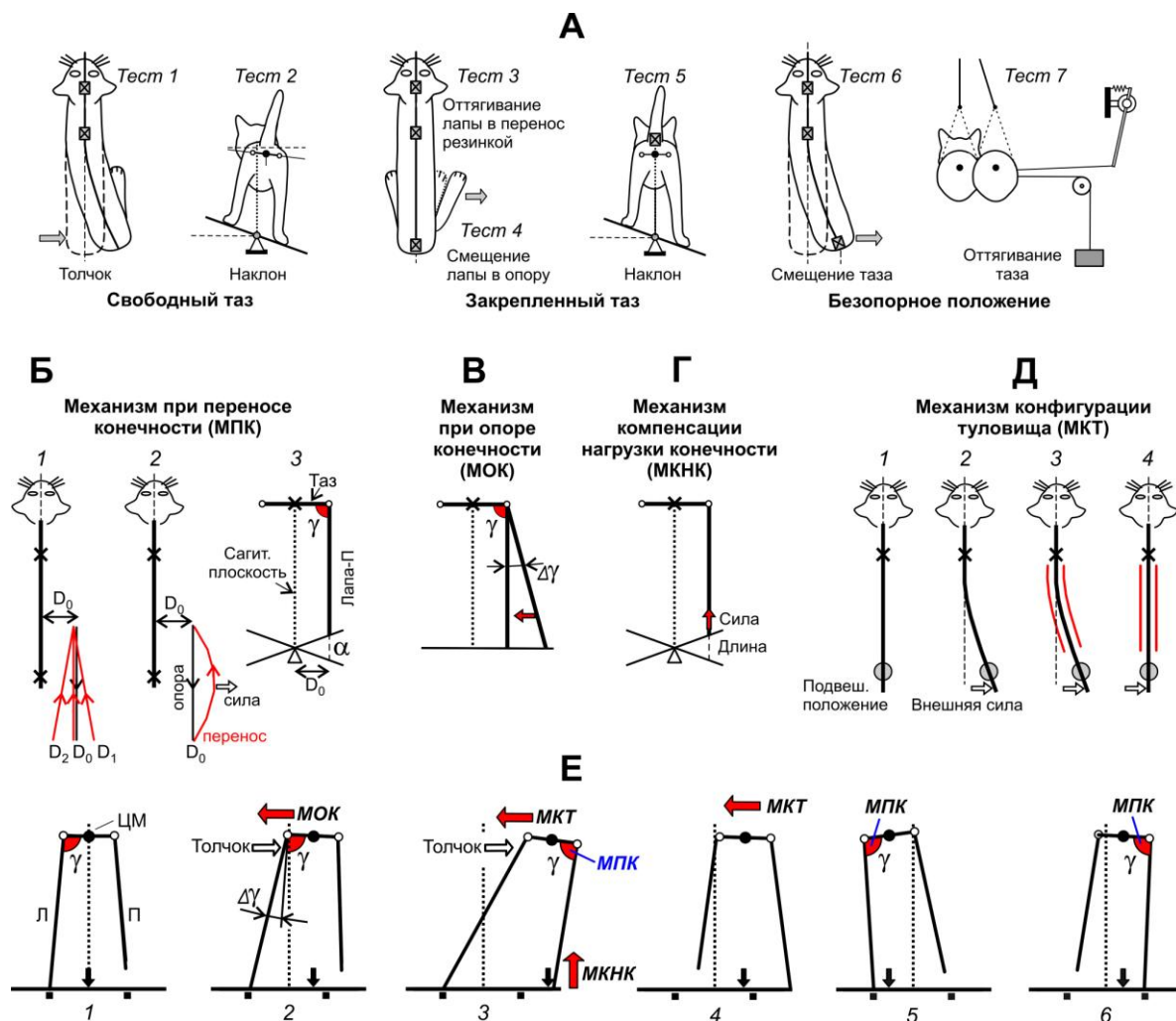


Рис. 5. А. Экспериментальные тесты для изучения динамического баланса Б-Д. Четыре базовых механизма пострального контроля при локомоции. Е. Интеграция механизмов конечностей и туловища при ходьбе в ответ на латеральное возмущающее воздействие.

Механизм конфигурации туловища (МКТ) схематически изображен на Рис. 5Д. Эта схема основывается на двух обнаруженных фактах – симметричной активации мышц спины при любом изгибе туловища и выпрямлении туловища при активации этих мышц. Симметричная тоническая деятельность мышц спины обеспечивает прямую ось туловища при спокойной локомоции (Рис. 5 Д1). Приложение внешней силы (Рис. 5 Д2, Рис. 5А Тесты 6-7) изгибает тело. МКТ получает сенсорную информацию, сигнализирующую об

этом изгибе. Такой афферентный вход может исходить от рецепторов растяжения мышц спины. Это вызывает значительную двустороннюю активацию мышц спины (красные линии на Рис. 5Д3) и увеличение жесткости туловища (Hu et al., 2009). Последнее приводит к выпрямлению переднезадней оси тела (Рис. 5Д4).

Последовательная интеграция постуральных механизмов конечностей и туловища при латеральном возмущающем воздействии показана на Рис. 5Е. 1 – Нормальная конфигурация задних конечностей при локомоции. 2 – Толчок вправо вызывает отклонение таза вправо (ЦМ, центр масс на Рис. 5Е), сопровождающееся абдукцией ($\Delta\gamma$) опорной (левой) конечности по отношению к туловищу. Такая абдукция запускает постуральные механизмы конечности в опору (МОК), которые противодействуют и уменьшают степень латерального отклонения таза. 3 – В то же время правая конечность, благодаря активности постуральных механизмов конечностей в перенос (МПК), перемещается вперед и приземляется со стандартным углом (γ) по отношению к тазу. Однако, из-за изгибания туловища, правая конечность приземляется в значительно более латеральном положении по сравнению с опорным положением при нормальном шаге (показано маленькими черными квадратами под прямой на Рис. 5Е). После приземления правой конечности начинают действовать механизмы компенсации нагрузки конечности (МКНК). Также изгиб туловища, вызванный латеральным толчком, активирует механизмы конфигурации туловища (МКТ), которые приводят к выпрямлению (3, 4) во время опорной фазы правой конечности. Поскольку прямолинейная конфигурация туловища восстанавливалась, в результате работы МПК левая и правая конечности приземлялись в последующих шагах в нормальное медиолатеральное положение (5 и 6). Таким образом, благодаря согласованной работе постуральных механизмов конечностей и туловища, восстанавливалась исходная конфигурация позы тела при ходьбе.

Интеграцией четырех описанных механизмов (МПК, МОК, МКНК, МКТ), можно объяснить постуральные коррекции при ходьбе во время

исследованных тестов с латеральными толчками и наклонами опоры – аналогами естественных ситуаций ходьбы по неровной поверхности, столкновений животных между собой или с неживыми объектами. Очевидно, что система контроля баланса значительно сложнее и существуют другие механизмы, которые необходимо изучать в дальнейшем.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ИНТЕГРАТИВНОГО КОНТРОЛЯ ПОСТУРАЛЬНОЙ И ЛОКОМОТОРНОЙ ФУНКЦИИ ПРИ ПАТОЛОГИИ

Замена супраспинальных сигналов

электрической и химической стимуляцией спинного мозга

Тоническая электрическая стимуляция (ЭС) дорсальной поверхности спинного мозга, как было обнаружено при проведении настоящей работы, является эффективным методом воздействия не только на локомоторные (Iwahara et al., 1991; Герасименко с соавт., 2002; Мусиенко с соавт., 2005), но и на постуральные спинальные нейронные сети (Musienko et al., 2010, 2012; Мусиенко с соавт., 2013). Эффект улучшения постуральных и локомоторных способностей парализованных животных, по-видимому, основан на схожих механизмах (Lavrov et al., 2008, Musienko et al., 2012). В отдельной экспериментальной серии (Capogrosso et al., 2013) было проведено компьютерное моделирование электрической стимуляции сенсомоторных сетей спинного мозга крыс. Также исследовалась структура рефлекторного ответа на ЭС при электрофизиологических и фармакологических *in-vivo* тестах, которые подавляли отдельные группы сенсорных волокон и/или синаптическую передачу. В результате была экспериментально подтверждена гипотеза о том, что в основе механизма действия ЭС лежит стимуляция спинальных сенсорных путей, а именно транссинаптический доступ к спинальным сетям через первичную активацию миелинизированных сенсорных волокон групп Ia, Ib, II дорсальных корешков и дорсальных канатиков спинного мозга.

Спинальные нейронные сети обладают своим рецепторным аппаратом распознавания, на который оказывается специфическое функциональное воздействие по моноаминергическим проводящим путям (Agnati et al., 2010). В настоящем исследовании на хронических спинальных крысах (n=39) проведен детальный анализ и количественная оценка нейробиомеханических изменений, характеризующих хорошо контролируемое локомоторное поведение *in vivo* в ответ на активацию или ингибирование ряда серотониновых (5-HT), дофаминовых (DA) и норадреналиновых (NA) рецепторов (Musienko et al., 2011). Установлены четкие связи между воздействием на моноаминергические пути и модуляцией конкретных локомоторных подфункций (Рис. 6).

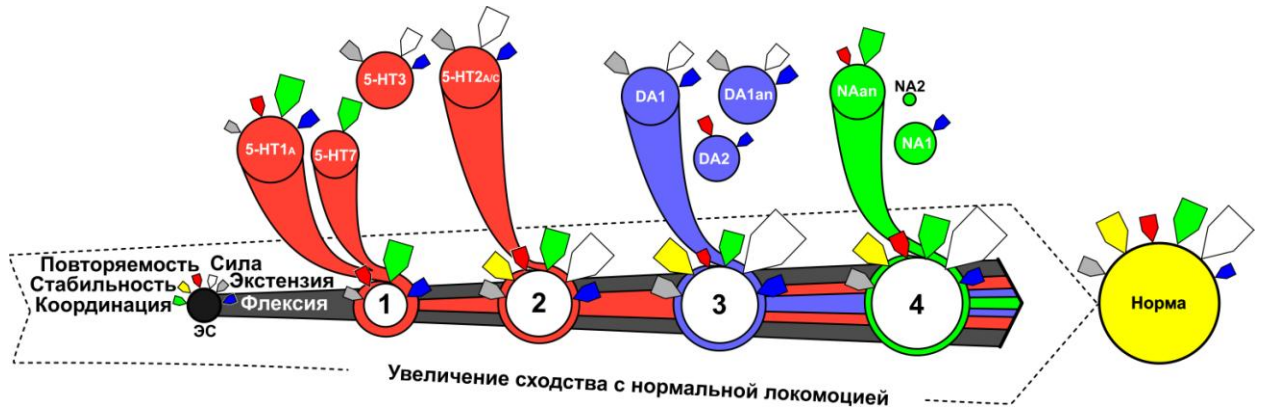


Рис. 6. Обобщающая схема модуляции специфических двигательных функций спинальных крыс воздействием на отдельные моноаминовые рецепторные системы и их комбинации: 1 (5-HT_{1A}+5-HT₇), 2 (5-HT_{1A}+5-HT₇+5-HT_{2AC}), 3 (5-HT_{1A}+5-HT₇+5-HT_{2AC}+DA₁), 4 (5-HT_{1A}+5-HT₇+5-HT_{2AC}+DA₁+NA_{a2}). Степень модуляции двигательных функций пропорциональна размеру разноцветных стрелок (обозначают функциональные группы параметров: экстензию, флексию, стабильность, повторяемость, координацию, силу) и размеру круглых зон (общая характеристика локомоторной активности и уровень сходства ее с нормой).

Обнаружено, что каждый из моноаминовых рецепторов модулирует широкий, но индивидуальный спектр кинематических, кинетических и миографических характеристик, которые отражены на функциональных картах конкретных рецепторов. Данный каталог функций использован для выявления оптимальных фармакологических комбинаций, стимулирующих двигательную активность у парализованных крыс (Рис. 6). С помощью такого подхода удалось селективно заменять супраспинальные сигналы, нацеленные на преимущественную модуляцию постуральных или локомоторных

характеристик, введением лекарств – специфических агонистов или антагонистов моноаминовых рецепторов. Качество локомоторной активности было достаточно высоким при активации 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов, а модуляция NA α ₂ улучшала координацию и стабильность локомоторного паттерна. Однако для восстановления постуральных свойств была необходима дополнительная активация DA₁ и 5-HT_{2A/C} рецепторов (Рис. 6). Одновременная модуляция нескольких рецепторов приводила к дополнительным эффектам изменений двигательных функций, в том числе, суммации их действия и синергии (Musienko et al., 2011). Специфическое взаимодействие различных рецепторных систем в формировании итогового моторного паттерна является отражением интегративных процессов, которые осуществляются на спинальном уровне при участии нисходящих сигналов от головного мозга (Hochman et al., 2001; Grillner, 2006; Jordan et al., 2008).

В совокупности эти данные поддерживают точку зрения, согласно которой спинальная двигательная инфраструктура состоит из широко распространенных, гетерогенных, но высоко интегрированных систем нейронных сетей и рецепторов, которые могут генерировать спектр двигательных паттернов при активации в различных сочетаниях (Giszter et al., 2007). В нормальных условиях, глутаматергические и моноаминергические проводящие пути, берущие свое начало из ствола мозга, активируют и модулируют эти спинальные сети (Hagglund et al., 2010; Jordan et al., 2008). Мульти сегментная электрическая и мультирецепторная фармакологическая стимуляция, воздействуя на специфические аспекты движения, при совместном применении оказывают синергичное действие и могут эффективно компенсировать утраченные активирующие и модулирующие супраспинальные команды после тяжелого повреждения спинного мозга (Courtine et al., 2009). С целью использования данного подхода адресного воздействия на спинальные нейронные сети были созданы электрохимические спинальные нейропротезы, представляющие из себя

вживляемые биосовместимые мультиэлектродные и хемотродные интерфейсы (Musienko et al., 2009; Larmagnac et al., 2011).

Универсальное робототехническое устройство для исследования, активации, тренировки постуральных и локомоторных сетей

Заболевания и травмы ЦНС могут приводить к разной степени нарушений локомоции и/или способности поддержания равновесия. Однако технические ограничения существующих подходов (Nessler et al., 2005; Frey et al., 2006; Winter et al., 1993) препятствуют проведению раздельного обследования и нейрореабилитации этих подфункций. В исследовании данного раздела было разработано и протестировано универсальное роботизированное устройство, представляющее из себя систему поддержки веса тела и предназначенное для автономного исследования, активации и тренировки локомоторных и постуральных нейронных сетей (Dominici et al., 2012). Технология основана на использовании мягких эластических силовых приводов и спиралей, которые устраняют инерционные влияния силовых воздействий на экспериментальное животное и дают возможность ее использования для поведенческих экспериментов (Pratt et al., 1995; Vallery et al., 2008; Dominici et al., 2012). Робот обеспечивает контроль перемещения во фронтальной, сагиттальной, горизонтальной плоскостях, а также вокруг вертикальной оси, причем сила воздействия на животное по различным осям может меняться в зависимости от его собственных двигательных способностей и экспериментальной задачи (Рис. 8Б).

В режиме исследования роботизированная система позволяла получить подробную характеристику локомоторных паттернов и динамического равновесия в норме ($n=7$), после повреждения спинного мозга (ПСМ) ($n=10$) и инсульта ($n=5$). В режиме активации устройство использовалось в качестве постурального нейропротеза, который активирует локомоторные способности, включая ходьбу по ровной поверхности после полного ПСМ, ходьбу по лестнице при половинном поражении спинного мозга (синдром

Броун-Секара) и точное позиционирование лапы вскоре после инсульта (Рис. 7А).

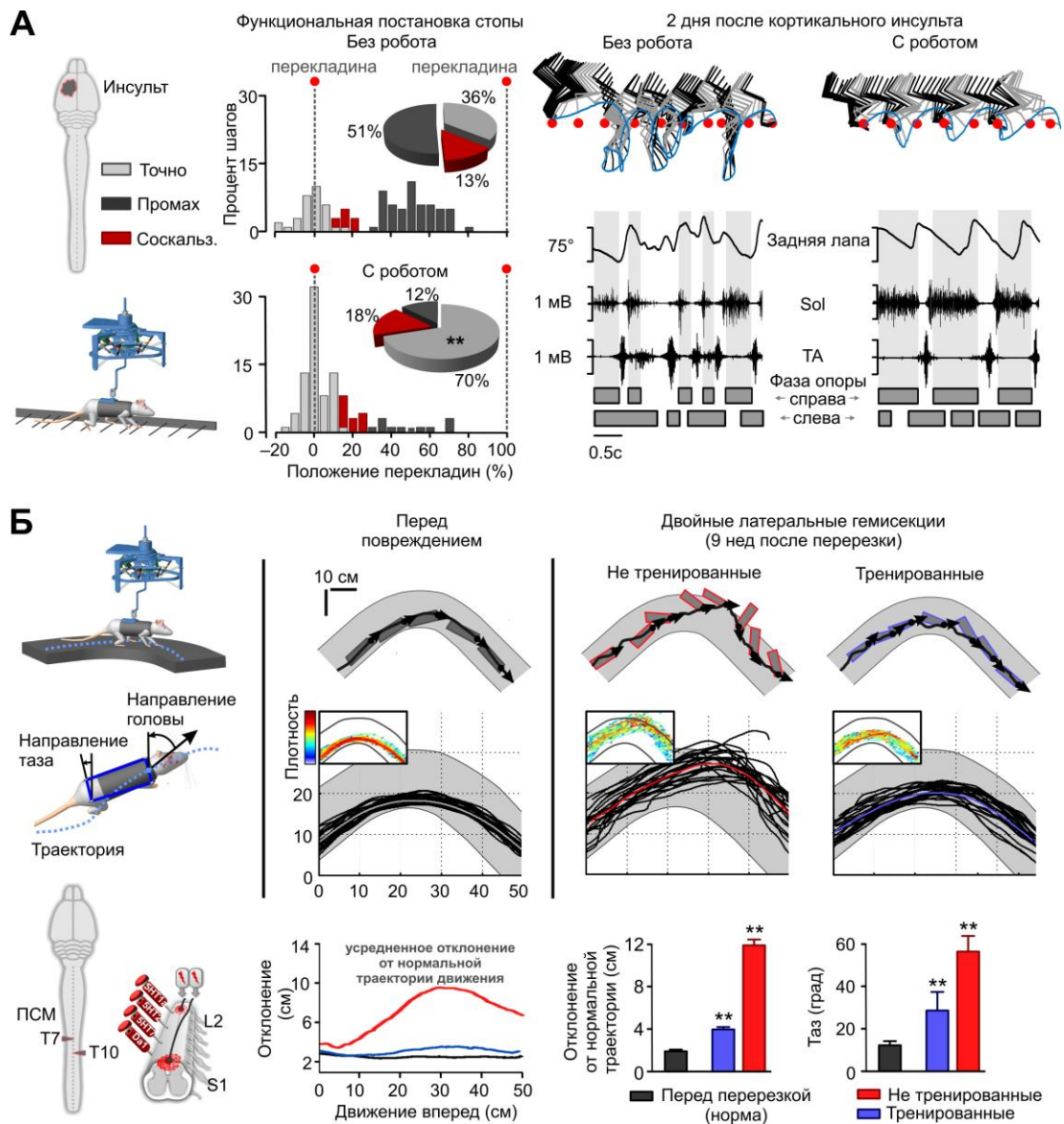


Рис. 7. (А) Активация двигательных способностей при ходьбе по нерегулярно расположенным перекладинам при помощи робототехнического интерфейса у крыс с односторонним инсультом. (Б) Эффект тренировки с помощью роботизированного устройства после тяжелого ПКСМ. *M. soleus* (Sol), *m. Tibialis anterior* (Tib).

В режиме тренировки робототехнический нейропротез в сочетании с электрической и химической стимуляцией спинного мозга способствовал восстановлению локомоции с поддержкой веса тела, контроля направления ходьбы и способностей сохранения равновесия у парализованных крыс (Рис. 7Б). Тренировка в таких условиях позволяла давать дозированную нагрузку, стимулируя нейропластические процессы и постепенно обучая нейронные сети новым задачам. Обнаружена систематическая корреляция между

восстановлением постуральной стабильности и улучшенным локомоторным контролем задних конечностей. Это подчеркивает существенную роль потока постурально обусловленных афферентных сигналов от рецепторов растяжения и нагрузки туловища, бедра и голеностопного сустава, которые играют важное значение в координации локомоции (Peearson, 2004). Нормализация с помощью робота сенсорной обратной связи и ее модуляции при конкретной двигательной задаче вносило вклад в восстановление управления ходьбой.

Восстановление произвольного двигательного контроля методами мультисистемной нейрореабилитации

После спинальной травмы хронический паралич и обездвиженность со временем приводят к деградации нейрональных сетей спинного мозга, патологическому спрутингу, появлению нефункциональных связей между нейронами (Hou et al., 2008; Courtine et al., 2009). Как подтвердили наши исследования, при параличе развивается многосторонняя структурная и функциональная перестройка спинальных сетей, сопровождающаяся возникновением аберрантных межнейронных связей, нарушением сенсорной иннервации, проприоспинальных проекций и рефлекторной активности (Beauparlant et al., 2013). Такая неуправляемая нейропластичность ведет к еще большему прогрессированию деградации локомоторной и постуральной функций. Сопоставление экспериментальных данных на крысах с клиническими данными показало, что сходная динамика имеет место и у спинальных пациентов (Beauparlant et al., 2013).

Для улучшения моторной функции после тяжелой вертеброспинальной травмы требуются искусственные влияния, направляющие нейропластические процессы (Edgerton et al., 2001; Dietz, 2010). В экспериментах данного раздела исследовалась возможность восстановления произвольного двигательного контроля за счет образования новых нейронных связей в обход повреждения спинного мозга (Van den Brand et al., 2012). Для этого применялся комплексный подход мультисистемной

нейрореабилитации (Musienko et al., 2012). В дополнение к электрической и химической стимуляции, для тренировки нейронных сетей был использован роботизированный постуральный нейропротез, который работал в режиме активации супраспинально опосредованных движений у крыс с тяжелым параличом (Рис. 8). В ходе тренировок при желании и готовности выполнять данную задачу, животные могли произвольно двигаться вперед.

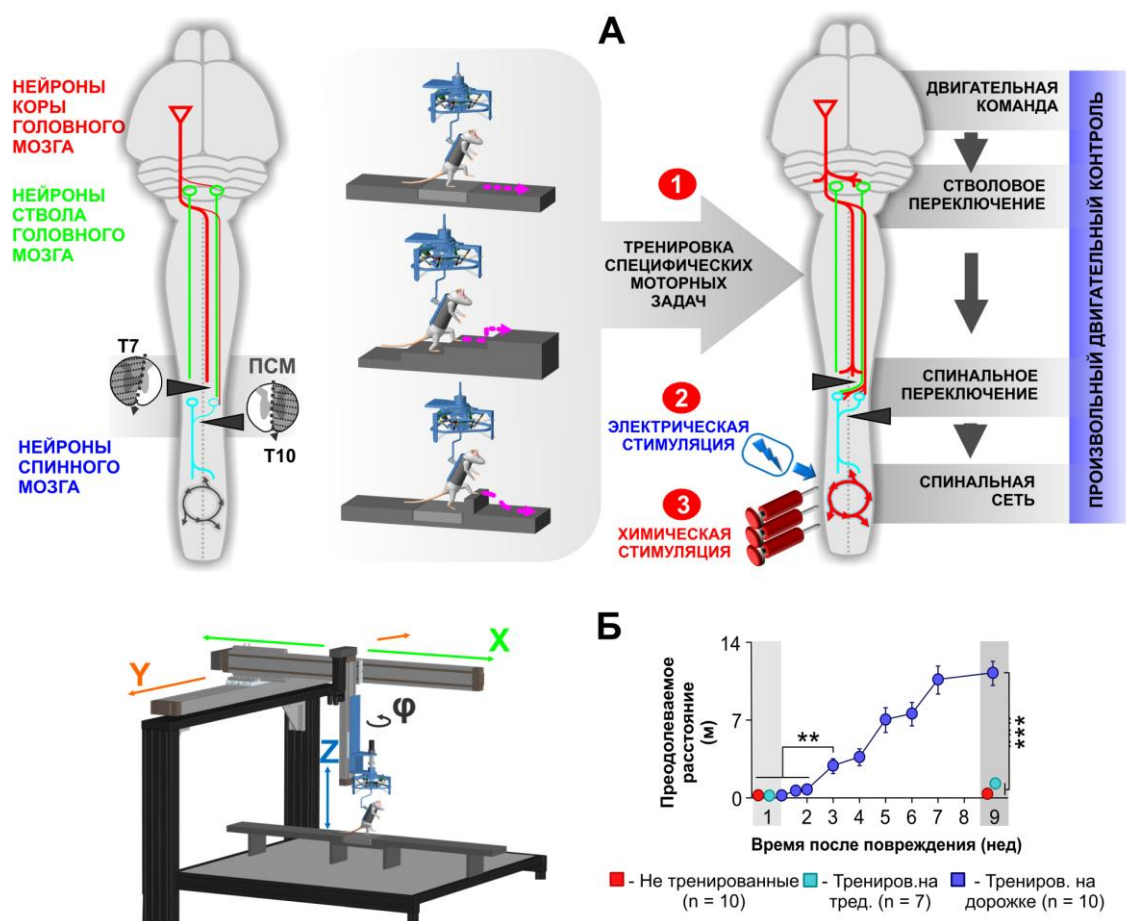


Рис. 8. (А) Мультисистемная нейрореабилитация инициирует многоуровневые нейропластические изменения и восстанавливает произвольный двигательный контроль за счет образования новых обходных связей в спинном мозге и стволе головного мозга. (Б) Схема робототехнического интерфейса поддержки веса тела и эффект тренировок.

После проведения левой латеральной гемисекции (перерезки всей левой половины спинного мозга) с дополнительным повреждением правого дорсального канатика на уровне Т7 и правой латеральной гемисекции на Т10 прерывались все прямые супраспинальные проводящие пути (Рис. 8А), но оставался промежуточный участок неповрежденной ткани между гемисекциями. Такое повреждение приводило к полному параличу задних конечностей без проявления каких-либо признаков восстановления более чем

через 2 месяца после поражения. Аналогично, у пациентов с клинически полным ПСМ часто выявляется сохранение проводимости через поврежденный участок спинного мозга (Kakulas, 1999). Таким образом, выбранная экспериментальная модель функционально сопоставима с ПСМ у человека, предоставляя хорошо контролируемые условия для исследования механизмов, лежащих в основе восстановления (Courtine et al., 2008).

Для активации пояснично-крестцовых нейронных сетей и перевода в высоко функциональное состояние применялась тоническая (40 Гц) эпидуральная электрическая стимуляция L2 и S1 сегментов спинного мозга, и систематически вводилась комбинация из агонистов рецепторов серотонина (5HT_{1A}, 5HT₇ и 5HT_{2A/C}) и агониста рецепторов дофамина (DA₁). За счет увеличения общего уровня спинальной возбудимости, такое электрохимическое воздействие позволяет сенсорной информации стать источником управления шаганием (Courtine et al., 2009; Musienko et al., 2011). Данный подход восстанавливал координированную, хотя и произвольную, бипедальную ходьбу по движущейся ленте тредбана уже на 7 день после получения травмы.

Разработана мультисистемная нейрореабилитационная программа тренировки. Она включала, во-первых, улучшение функциональности пояснично-крестцовых сетей с помощью локомоторных тренировок на тредбане при электрохимической стимуляции (Рис. 8A2-3). Во-вторых, содействовали восстановлению супраспинально опосредованных движений (ходьба по дорожке, переступание через препятствие, лестница) с помощью роботизированного постурального устройства (Рис. 8A1). Робот применялся для того, чтобы помочь крысам активно задействовать свои парализованные задние конечности и бипедально идти по направлению к заданной цели. Крыс (n = 10) тренировали ежедневно по 30 минут, комбинируя обе парадигмы тренировки. Первые произвольные шаги появлялись после 2 - 3 недель тренировок (P < 0,01). Когда произвольные движения восстановились, постепенно увеличивалась относительная продолжительность тренировки в

робототехническом нейропротезе. На пятой – шестой неделе после получения ПСМ все крысы могли инициировать и поддерживать бипедальную локомоцию с полной поддержкой веса тела в течение продолжительных периодов времени при электрохимической стимуляции (Рис. 8Б).

Выяснялось, вызовет ли тренировка шагания только на тредбане ($n=7$) в сочетании с электрохимической стимуляцией также восстановление произвольной локомоции на свободной поверхности (дорожке). Как оказалось, такая автоматизированная тренировка не восстановила локомоцию по дорожке (Рис. 8Б), несмотря на повторяемые испытания в течение 4 – 8 сессий на протяжении 9 недель после получения травмы ($P < 0.001$).

С целью дальнейшего повышения участия супраспинального контроля вводились тесты со ступенями и препятствием, для преодоления которых требуется произвольно опосредованная регулировка ходьбы (Drew et al., 2008). После 2-3 дополнительных недель тренируемые на свободной поверхности крысы демонстрировали бипедальный бег по ступеням и преодоление препятствий.

Анатомические исследования показали, что в основе восстановления произвольного контроля локомоции у крыс лежит глубокое ремоделирование супраспинальных и интраспинальных нейрональных связей. Проводили нейроморфологические исследования с применением ретроградного красителя (Fastblue, FB на Рис. 9А) трактов от спинальных нейронных сетей, располагающихся на уровне L1/L2 поясничных позвонков. Обнаружено значительное увеличение ($P < 0.05$) количества (Рис. 9Б,В) меченых нейронов промежуточных и вентральных пластинок T8/T9 сегментов спинного мозга между верхней и нижней гемисекциями, как у тренируемых на тредбане, так и у крыс, тренируемых в робототизированном нейропротезе, по сравнению с не тренированными животными. Анализ активность-зависимого c-fos маркера после продолжительной локомоции по поверхности подтвердил, что меченые нейроны были активны при ходьбе (Рис. 9Е). Количество c-fos

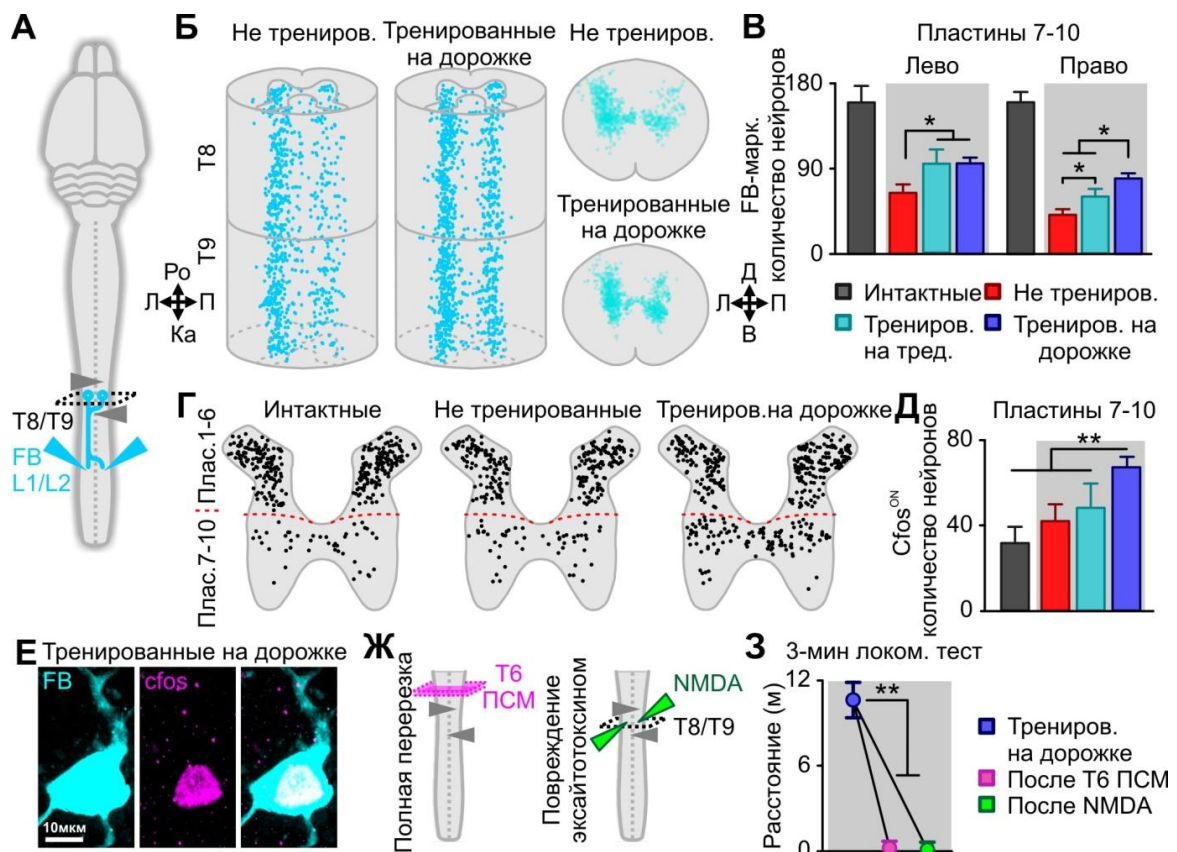


Рис. 9. Мультисистемная нейрореабилитация способствует формированию внутриспинальных связей в обход повреждения.

ядер, ретроградно меченых из L1/L2, было больше у крыс, тренированных в работе на дорожке, чем у других групп ($P < 0.01$) (Рис. 9 Г,Д). Из этого следует, что грудные нейроны могут играть ключевую роль в восстановлении произвольной локомоции (Courtine et al., 2008; Wernig, Müller, 1992; Cowley et al., 2008). Чтобы проверить эту гипотезу, было произведено повреждение T8/T9 нейронов путем инфузии сохраняющего аксоны эксайтотоксина N-метил- D-аспаргиновой кислоты (NMDA) (Courtine et al., 2008) (Рис. 9Ж). После введения NMDA восстановленный произвольный контроль локомоции нарушался ($P < 0.01$) (Рис. 9 З), несмотря на неизменную функциональность пояснично-крестцовых сетей. Сходно с этим, тренированные в постуральном нейропротезе крысы утрачивали произвольное управление локомоцией после полного прерывания супраспинального входа ($P < 0.01$) (Рис. 9 Ж и З).

Проекция левой моторной коры к задней конечности маркировалась инъекциями биотинилированного декстран амина (BDA) (Рис. 10А). Билатеральное прерывание заднего столба на уровне T7 пере-гемисекцией

сохранило только небольшую часть (1-2%) (Brösamle, Schwab, 1997) аксонов кортико-спинальных путей (КСП) (в правом дорсолатеральном канатике спинного мозга). Поэтому не тренированные крысы показали очень небольшое количество меченых КСП в сегментах T8/T9 (Рис. 10 Б и В, n=5 крыс в каждой группе). У крыс, которых тренировали только на тредбане, также не было значительных изменений в плотности грудных КСП проекций (Рис. 10 Б и В). У тренированных на дорожке крыс было обнаружено восстановление $45 \pm 7\%$ от плотности билатеральных волокон до поражения (Рис. 10 Б-Г). Эти КСП аксоны ответвлялись от правого дорсолатерального канатика спинного мозга (Рис. 10 Г) и обильно иннервировали правое и, что более неожиданно, левое серое вещество сегментов T8/T9 (Рис. 10 Д) (Rosenzweig et al., 2010).

Было обнаружено множественное распространение волокон КСП из серого вещества в месте поражения (T7) в правый дорсолатеральный канатик белого вещества (Рис. 10 Д, Е). На Рис. 10Д представлена 3D реконструкция волокон дорсального кортико-спинального тракта в продольном (наверху) и поперечном (внизу) направлении. Эти эктопические волокна, свидетельствующие о регенеративном спрутинге (Steward et al., 2003), привели к почти двукратному увеличению плотности КСП аксонов дорсолатерального спинномозгового канатика T8/T9 ($P < 0.01$). Грудные волокна КСП обошли пере-гемисекцию на T7 по правому дорсолатеральному спинномозговому канатику, проросли в серое вещество, и пересекли среднюю линию (Рис. 10 Д). Эти волокна развили большую аксональную структуру с бутоноподобными набуханиями, позволяющими предположить наличие спрутинга в конечных древовидных структурах. Конфокальная микроскопия подтвердила, что грудные волокна КСП прорастают к синаптическим элементам, поскольку они колокализовались с синаптофизинном (Рис. 10 Ж). Эти волокна установили контакты с релейными нейронами, ретроградно мечеными от нейронных сетей пояснично-

крестцового расширения спинного мозга на уровне L1/L2 позвонков (Рис. 10Ж).

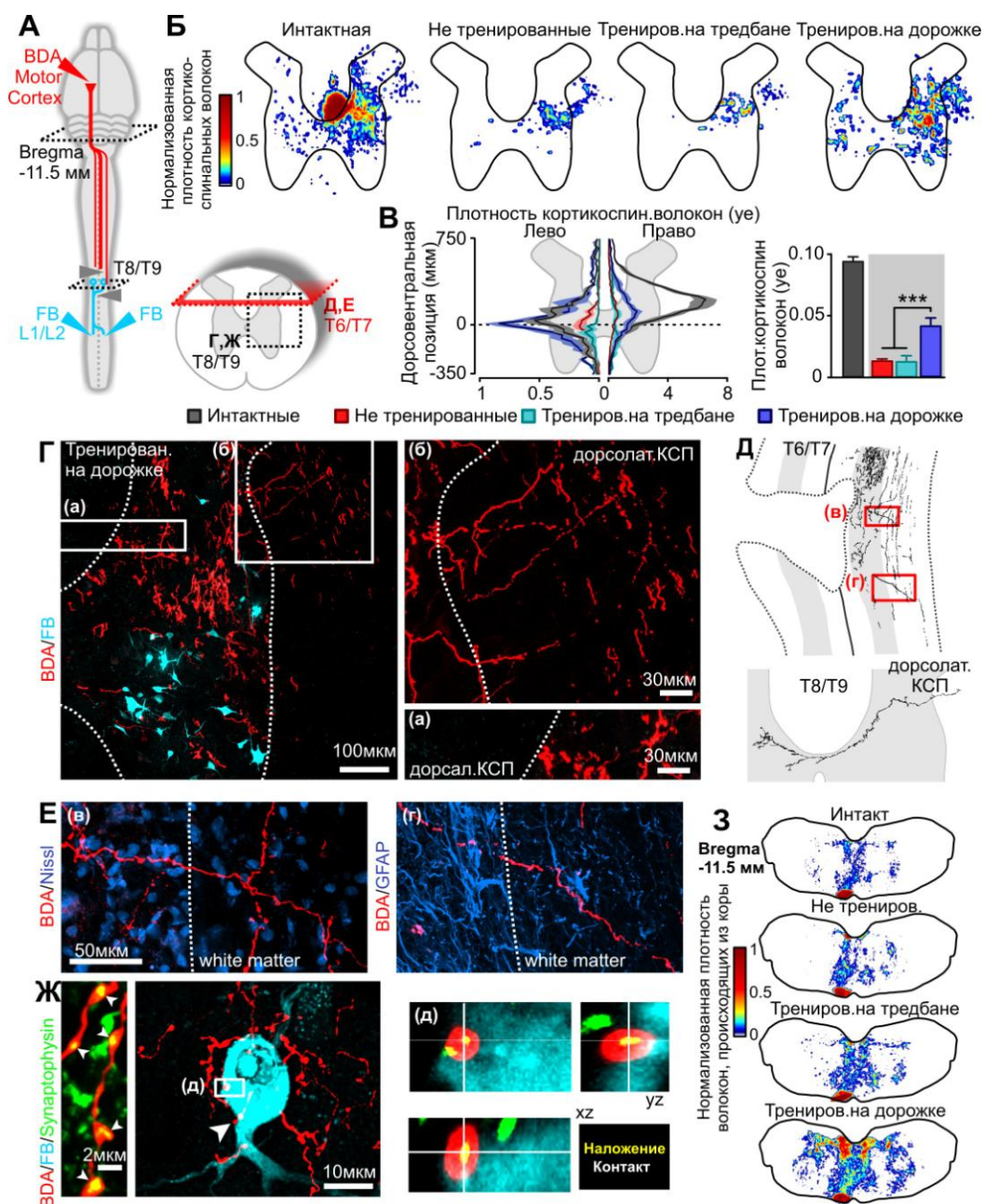


Рис. 10. Мультисистемная нейрореабилитация приводит к обширному ремоделированию спинальных и стволовых проекций моторной коры.

Ремоделирование аксональных проекций двигательной коры не было ограничено только сохраненным мостиком ткани в области между верхним и нижним ПСМ. Количественная оценка КСП волокон на уровне T4/T5 над местом поражения показала значительное билатеральное увеличение плотности аксонов у тренированных произвольной ходьбе животных, по сравнению с нетренированными крысами, тренированными на тредбане и

интактными крысами ($P < 0.01$). Было обнаружено почти четырехкратное увеличение плотности кортикальных проекций в различных двигательных областях ствола мозга (Рис. 10 З), в том числе, в левом и правом вестибулярных ядрах ($P < 0,01$), в ретикулярной формации ($P < 0,001$) и парапирамидальных областях ($P < 0.01$). Эти области мозга содержат ретикулоспинальные нейроны и серотонинергические нейроны, проецирующиеся в спинной мозг, которые вносят свой вклад в инициацию и поддержание локомоции (Hägglund et al., 2010; Liu, Jordan, 2005). Возможно, такая реорганизация нисходящих 5НТ волокон происходила при тренировках. Было выявлено практически полное восстановление серотонинергической иннервации специфических пластинок серого вещества на T8/T9 у тренированных на дорожке крыс и истощение 5НТ волокон у не тренированных или тренированных на treadmills животных ($P < 0.05$).

Управляемая нейропластичность при мультисистемной нейрореабилитацией коснулась не только спинальных сетей, но и других отделов нервной системы, иными словами, приобрела системный многоуровневый характер. Различные отделы ЦНС от спинного мозга до сенсомоторной коры адаптировались к работе в условия спинального повреждения, приведшего к параплегии (Рис. 8). Системная структурная и функциональная перестройки нейронных сетей при проведении комплексных нейрореабилитационных мероприятий вносили свой вклад в компенсацию передачи информации в обход повреждения по вновь сформированным путям с постепенным восстановлением постуральной и локомоторной функций и их произвольного двигательного контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе показана взаимосвязь сетей спинного и головного мозга при решении различных двигательных задач - выборе направления локомоторной активности, сохранении позы и равновесия при стоянии и активном передвижении в пространстве. Выявлены нейрональные механизмы интеграции позы и локомоции, как одного из примеров общего

принципа интеграционного контроля сенсомоторных функций нервной системой. Благодаря глубокой интеграции и согласованной работе различных нейронных сетей, нервная система обладает высокой пластичностью, играющей важнейшую роль в обучении новым навыкам и восстановлении двигательного контроля при патологии. При поражении одного из ее отделов вследствие травмы или заболевания другие отделы могут компенсировать утраченную функцию через ремоделирование нейронных сетей. Мультисистемная реабилитация является эффективным методом управления такой нейрональной пластичностью и искусственного воздействия на нейронные сети при патологии в ходе комплексных лечебных мероприятий. Таким образом, проведенные исследования открывают новые пути изучения моторного поведения и лечения двигательных расстройств.

ВЫВОДЫ

1. Спинной мозг содержит высокоинтегрированные нейронные сети, ответственные за генерацию локомоторной активности, постуральных реакций при стоянии, за контроль направления движений, мышечного тонуса и динамического баланса при ходьбе. В норме эти сети активируются тоническими сигналами из ствола мозга, включая мезенцефалическую локомоторную область и вентральную область покрышки продолговатого мозга. В отсутствии супраспинальных связей спинальные нейронные сети инактивированы.

2. Установлено, что после удаления передних отделов мозга децеребрированные кролики могут выполнять сходные с интактными животными позы коррекции, которые обусловлены соматосенсорными сигналами от конечностей и видом возмущающего воздействия - латеральными толчками и наклонами опоры. У спинальных кроликов постуральные реакции исчезают, но могут быть активированы электрической или фармакологической стимуляцией спинного мозга. Это подтверждает, что базовые механизмы регуляции позы осуществляются на уровне ствола и спинного мозга, а также является доказательством способности спинальных

сетей самостоятельно осуществлять постуральный контроль с учетом фазного афферентного входа от опорно-двигательного аппарата в условиях дополнительной тонической стимуляции, заменяющей сигналы из стволовых центров.

3. Стимуляция ствола и спинного мозга имеют различные эффекты вызова локомоторной активности в разных направлениях. В случае стимуляции мезенцефалической локомоторной области у децеребрированных животных вызывается только ходьба вперед. При эпидуральной стимуляции спинного мозга у децеребрированных и спинальных животных вызывается ходьба назад, вперед, латеральные и диагональные шаги, а выбор направления локомоторной активности определяется направлением движения ленты тредбана по отношению к туловищу. Обнаруженные факты доказывают, что нейронные сети спинного мозга осуществляют сенсомоторную интеграцию при локомоции в разных направлениях на основании афферентного входа, сигнализирующего о направлении и амплитуде отклонения конечности в фазе опоры. Мезенцефалическая локомоторная область является командным центром супраспинального контроля нейронных сетей спинного мозга, ответственных за ходьбу вперед, которая является основной формой передвижения у млекопитающих.

4. Динамический постуральный контроль при ходьбе достигается интеграцией целого ряда нейронных механизмов, работающих в различные фазы локомоторного цикла на основе соматосенсорной информации. В фазе переноса функционирует механизм, обеспечивающий стандартное медиолатеральное положение постановки конечности относительно туловища. В фазе опоры, при нарушениях, вызывающих изменения угла тазобедренного сустава во фронтальной плоскости, увеличение нагрузки или сгибания в суставах, включаются механизмы, уравнивающие искажения локомоторного паттерна за счет регуляции биомеханической жесткости конечностей. Механизм конфигурации туловища компенсирует

отклонения от продольной оси посредством билатеральной тонической активности мышц спины.

5.Выявлена специфическая роль распределенных на нейронных сетях спинного мозга моноаминовых рецепторов (5-HT_{1A} , $5\text{-HT}_{2A/C}$, 5-HT_3 , 5-HT_7 , $\text{NA}\alpha_1$, $\text{NA}\alpha_2$, DA_1 , DA_2) в регуляции двигательного поведения спинальной крысы. Создан обширный каталог функциональных связей между моноаминовыми рецепторными системами и модуляцией постуральных и/или локомоторных свойств двигательного паттерна. Предложены комбинации химических препаратов, эффективно замещающие модулирующие супраспинальные сигналы в контроле локомоции и позы после повреждения спинного мозга.

6.На децеребрированных и спинальных животных доказана эффективность тонической электрической стимуляции спинного мозга для активации как локомоторной, так и постуральной функций. Механизм этих эффектов основан на транссинаптическом доступе к спинальным сетям через первичную активацию миелинизированных сенсорных волокон групп Ia, Ib, II дорсальных корешков и дорсальных канатиков спинного мозга. Выяснено, что сочетание мультисегментной электрической и мультирецепторной химической стимуляции имеет синергичный эффект для обеспечения высоко функционального состояния и управления спинальными нейронными сетями.

7.Предложена универсальная робототехническая технология поддержки веса тела, которая позволяет объективно разграничить постуральную и пропульсивную составляющую активного передвижения в пространстве, обеспечивая контроль перемещения тела одновременно во фронтальной, сагиттальной, горизонтальной плоскостях и вокруг вертикальной оси. Показано, что данное роботизированное устройство дает возможность изучать механизмы интеграции постуральной и локомоторной функции интактных животных в различных двигательных тестах, объективно

оценивать степень и характер двигательных нарушений при заболеваниях и травмах нервной системы.

8. На моделях парализованных животных с повреждением спинного мозга обнаружена высокая эффективность мультисистемной нейрореабилитации, включающей многокомпонентную электрическую, химическую стимуляцию и тренировку специфических двигательных задач в робототехническом постуральном нейропротезе, для активации нейропластических процессов нейронных сетей спинного мозга ниже уровня повреждения, а также направления их в сторону двигательного реобучения и адаптации в условиях нарушенного моторного контроля.

9. Установлено, что искусственно управляемая нейропластичность при проведении комплексных нейрореабилитационных мероприятий затрагивает не только спинальные сети, а имеет системный многоуровневый характер. Выявлена структурная и функциональная перестройка нейронных центров ствола мозга и их спинальных проекций, которая вносит свой вклад в компенсацию передачи информации в обход повреждения с постепенным восстановлением постуральной, локомоторной функций и их произвольного контроля. Благодаря глубокой интеграции и согласованной работе между различными нейронными сетями, нервная система обладает высокой пластичностью, которая играет важнейшую роль в обучении новым навыкам и восстановлении двигательного управления при патологии.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Мусиенко П.Е., Богачева И. Н., Герасименко Ю. П. Значение периферической обратной связи в генерации шагательных движений при эпидуральной стимуляции спинного мозга // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2005. – Т. 91. – № 12. – С. 1407-1420.

2. Богачева И.Н., Кучер В.И., Щербакова Н.А., Мусиенко П.Е., & Герасименко Ю.П. Математическое моделирование процессов формирования локомоторных паттернов при эпидуральной стимуляции спинного мозга с учетом периферической обратной связи // Биофизика. – 2005. – Т. 50. – № 6. – С. 1125-1130.
3. Никитин О.А., Богачева И.Н., Мусиенко П.Е., Савохин А.А., Герасименко Ю.П. Афферентная активация генератора шагательных движений у спинализированной кошки в ранний период после спинализации // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. – 2007. – № 6. – С. 22-33.
4. Мусиенко П.Е., Павлова Н.В., Селионов В.А., Герасименко Ю.П. Локомоция, вызванная эпидуральной стимуляцией у децеребрированной кошки, после повреждения спинного мозга // Биофизика. – 2009. – Т. 54. – № 2. – С.293-300.
5. Богачева И.Н., Никитин О.А., Мусиенко П.Е., Савохин А.А., Герасименко Ю.П. Механизмы формирования шагательной ритмики, вызванной эпидуральной стимуляцией спинного мозга у децеребрированных и спинализированных кошек // Биофизика. – 2009. – Т. 54, № 3. – С.529-536.
6. Богачева И.Н., Мусиенко П.Е., Щербакова Н.А., Мошонкина Т.Р., Савохин А.А., Герасименко Ю.П. Анализ локомоторной активности у децеребрированных кошек при электромагнитной и эпидуральной электрической стимуляции спинного мозга // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2012. – Т. 98, № 9. – С.1079-1093.
7. Мошонкина Т. Р., Мусиенко П. Е., Богачева И. Н., Щербакова Н. А., Никитин О.А., Савохин А.А., Герасименко Ю. Регуляция локомоторной активности при помощи эпидуральной и чрескожной электрической стимуляции спинного мозга у животных и человека // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2012, № 3. – С.129-137.

8. Герасименко Ю.П., Мусиенко П.Е., Мошонкина Т.Р., Эджертон Р.В. Роль серотонинэргической системы в регуляции спинальной локомоции // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. – 2012. – № 25. – С.7-18.
9. Мусиенко П.Е., Богачева И.Н., Савохин А.А., Килимник В.А., Горский О.В., Никитин О.А., Герасименко Ю.П. Инициация локомоторной активности у децеребрированных и спинальных кошек при неинвазивной чрескожной электрической стимуляции спинного мозга // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 8. – С.917-927.
10. Musienko P.E., Zelenin P.V., Lyalka V.F., Orlovsky G.N., Deliagina T.G. Postural performance in decerebrated rabbit // Behavioural Brain Research. – 2008. – Vol. 190, № 1. – P.124-134.
11. Lyalka V.F., Musienko P.E., Orlovsky G.N., Grillner S., and Deliagina T.G. Effect of intrathecal administration of serotonergic and noradrenergic drugs on postural performance in rabbits with spinal cord lesions // Journal of Neurophysiology. – 2008. – Vol. 100, № 2. – P.723-732.
12. Courtine G., Gerasimenko Y., van den Brand R., Yew A., Musienko P., Zhong H., Song B., Ao Y., Ichiyama R.M., Lavrov I., Roy R.R., Sofroniew M.V., Edgerton V.R. Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input // Nature Neuroscience. – 2009. – Vol. 12, № 10. – P.1333-1342.
13. Musienko P., van den Brand R., Maerzendorfer O., Larmagnac A., Courtine G. Combinatory electrical and pharmacological neuroprosthetic interfaces to regain motor function after spinal cord injury // Biomedical Engineering, IEEE Transactions on. – 2009. – Vol. 56, № 11. – P.2707-2711. Review.
14. 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 // The Journal of Neuroscience. – 2009. – Vol. 29, № 17. – P.5681-5689.

15. Musienko P.E., Zelenin P.V., Orlovsky G.N., Deliagina T.G. Facilitation of postural limb reflexes with epidural stimulation in spinal rabbits // *Journal of Neurophysiology*. – 2010. – Vol. 103, №2. – P.1080-1092.
16. Musienko P., van den Brand R., Marzendorfer O., Roy R.R., Gerasimenko Y., Edgerton V.R., Courtine G. Controlling specific locomotor behaviors through multidimensional monoaminergic modulation of spinal circuitries // *The Journal of Neuroscience*. – 2011. – Vol. 31, № 25. – P.9264-9278.
17. van den Brand R., Heutschi J., Barraud Q., DiGiovanna J., Bartholdi K., Huerlimann M., Friedli L., Vollenweider I., Moraud E.M., Duis S., Dominici N., Micera S., Musienko P., Courtine G. Restoring voluntary control of locomotion after paralyzing spinal cord injury // *Science*. – 2012. – Vol. 336, № 6085. – P.1182-1185.
18. Dominici N., Keller U., Vallery H., Friedli L., van den Brand R., Starkey M.L., Musienko P., Riener R., Courtine G. Versatile robotic interface to evaluate, enable and train locomotion and balance after neuromotor disorders // *Nature medicine*. – 2012. – Vol. 18, № 7. – P.1142-1147.
19. Musienko P., Courtine G., Tibbs J.E., Kilimnik V., Savochin A., Garfinkel A., Roy R.R., Edgerton VR, Gerasimenko Y. Somatosensory control of balance during locomotion in decerebrated cat // *Journal of Neurophysiology*. – 2012. – Vol. 107, № 8. – P.2072-2082.
20. Musienko P.E., Zelenin P.V., Lyalka V.F., Gerasimenko Y.P., Orlovsky G. N., & Deliagina T.G. Spinal and supraspinal control of the direction of stepping during locomotion // *The Journal of Neuroscience*. – 2012. – Vol. 32, № 48. – P.17442-17453.
21. Musienko P., Heutschi J., Friedli L., den Brand R.V., Courtine G. Multi-system neurorehabilitative strategies to restore motor functions following severe spinal cord injury // *Experimental Neurology*. – 2012. – Vol. 235, № 1. – P.100-109. Review.
22. Capogrosso M., Wenger N., Raspopovic S., Musienko P., Beauparlant J., Bassi Luciani L., Courtine G., Micera S. A computational model for epidural

electrical stimulation of spinal sensorimotor circuits // The Journal of Neuroscience. – 2013. – Vol. 33, № 49. – P.19326-19340.

23. Beauparlant J., van den Brand R., Barraud Q., Friedli L., Musienko P., Dietz V., Courtine G. Undirected compensatory plasticity contributes to neuronal dysfunction after severe spinal cord injury // Brain. – 2013. – Vol. 136, № 11. – P.3347-3361.
24. Borton D., Bonizzato M., Beauparlant J., Digiovanna J., Moraud E.M., Wenger N., Musienko P., Minev I.R., Lacour S.P., Millán J.D., Micera S., Courtine G. Corticospinal neuroprostheses to restore locomotion after spinal cord injury // Neuroscience Research. – 2014 – Vol. 78. – P.21-29. Review.

Публикации в материалах конференций и сборниках научных трудов:

1. Larmagnac A., Vörös J., Musienko P., Courtine G. Skin-like pdms-based multi-electrode array for epidural electrical stimulation to promote locomotion in paralyzed rats // В сборнике: IFMBE Proceedings Сер. "5th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering: 14a "18 Sept. 2011, Budapest, Hungary". – 2011 - P.1180-1181.
2. Zelenin P.V., Musienko P.E., Gerasimenko Y.P., Orlovsky G.N., Deliagina T.G. Mechanisms of balance control during locomotion // Neuroscience, SFN's Annual Meeting. San Diego, USA. – 2013. – Abstract № 832.06.
3. Moraud E.M., Wenger N., Gandar J., DiGiovanna J., Musienko P., Courtine G., Micera S. A real-time platform for studying the modulatory capacity of epidural stimulation after spinal cord injury // В сборнике: Neural Engineering (NER) Proceedings. 6th International IEEE/EMBS Conference. San Diego, USA. – 2013. – P.1449 – 1452.

Изобретения и патенты:

1. Пат. 2418319 Российская Федерация, МПК G 09 B 23/28, А 61 N 1/32. Способ моделирования и обучения лечению больных с хроническим поражением спинного мозга [Текст] / Герасименко Ю.П., Мусиенко П.Е., Мошонкина Т.Р., Макаровский А.Н.; заявитель и патентообладатель Учреждение Российской академии наук Институт физиологии им. И.П.

- Павлова РАН. - № 2008115819/14; заявл. 21.04.2008; опубл. 27.10.2009, Бюл. № 13. – 7 с.
2. Пат. 2393761 Российская Федерация, МПК А 61 В 5/04, А 61 В 5/024532. Способ исследования поддержания равновесия у децеребрированных животных [Текст] / Мусиенко П.Е., Килимник В.А., Мошонкина Т.Р., Герасименко Ю.П.; заявитель и патентообладатель Учреждение Российской академии наук Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН. - №2009107477/14; заявл. 30.06.2009; опубл. 02.03.2009, Бюл. № 19. – 10 с.
 3. Пат. 2411589 Российская Федерация, МПК G 09 В 23/28, А 61 N 1/32. Способ моделирования хронического поражения спинного мозга и обучение его лечению [Текст] / Герасименко Ю.П., Мусиенко П.Е., Мошонкина Т.Р., Макаровский А.Н., Эджерстон Р., Куртине Г.; заявитель и патентообладатель Учреждение Российской академии наук Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН. - № 2009125133/14; заявл. 30.06.2009; опубл. 10.02.2011, Бюл. № 4. – 9 с.
 4. Пат. 2466756 Российская Федерация, МПК А 61 N 1/32, G 09 В 23/28. Способ моделирования лечения больных с хроническим поражением спинного мозга на лабораторных животных [Текст] / Мусиенко П.Е., Савохин А.А., Никитин О.А., Герасименко Ю.П.; заявитель и патентообладатель Учреждение Российской академии наук Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН. - № 2011131805/14; заявл. 28.07.2011; опубл. 20.11.2012, Бюл. № 32. – 7 с.
 5. Pat. US20130303873-A1; WO2011157714-A1; EP2582289-A1, IPC A 61 В 5/04, А 61 N 1/05, H 05 K 1/00. PDMS-Based Stretchable Multi-Electrode and Chemotrode Array for Epidural and Subdural Neuronal Recording, Electrical Stimulation and Drug Delivery [Text] / Voeroes J., Courtine, G., Larmagnac A., Musienko P.; Patent Assignee ETH Zurich; University of Zurich. - № PCT/EP2011/059855; International Filing Date 14.06.2011; Publication Date 22.12.2011.