

На правах рукописи

МУСИЕНКО Павел Евгеньевич

СПИНАЛЬНО-СТВОЛОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ
ИНТЕГРАТИВНОГО КОНТРОЛЯ ПОЗЫ И ЛОКОМОЦИИ

03.03.01- физиология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор биологических наук
профессор Ю.П. Герасименко

Санкт-Петербург

2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ПОЗА И ЛОКОМОЦИЯ: СПИНАЛЬНО-СТВОЛОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ И МЕТОДЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРИ ПАТОЛОГИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	12
Традиционная схема нейронального контроля локомоции и позы	12
Экспериментальная нейрореабилитация	33
Глава 2. ОБЩАЯ МЕТОДОЛОГИЯ	43
Основные экспериментальные модели	43
Методы стимуляции	46
Методы регистрации	48
Анализ нейрофизиологических данных	50
Нейроморфологический анализ и иммуногистохимия	52
Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ СТВОЛА И СПИННОГО МОЗГА В ПОСТУРАЛЬНОМ И ЛОКОМОТОРНОМ КОНТРОЛЕ	55
Спинальные и стволовые механизмы регуляции направления локомоции	55
Постуральные способности кроликов с разными уровнями децеребрации и эффекты стимуляции ствола мозга	80
Активация спинальных постуральных рефлексов электрической и химической стимуляцией спинного мозга	100
Глава 4. НЕЙРОРЕЦЕПТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЛОКОМОЦИИ И ПОЗЫ	129

Определение модуляций паттернов шагания	133
Исследование специфической роли серотониновых рецепторов	139
Исследование специфической роли дофаминовых рецепторов	142
Исследование специфической роли норадреналиновых рецепторов	145
Одновременное воздействие на несколько моноаминергических систем	148
Глава 5. МУЛЬТИСИСТЕМНАЯ НЕЙРОРЕАБИЛИТАЦИЯ ПОСТУРАЛЬНОЙ И ЛОКОМОТОРНОЙ ФУНКЦИЙ	162
Универсальный робототехнический интерфейс для исследования, активации и тренировки локомоции и позы после нейромоторных нарушений	162
Восстановление произвольного двигательного контроля за счет образования новых нейрональных связей в обход повреждения спинного мозга	184
Глава 6. МЕХАНИЗМЫ СЕНСОМОТОРНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ЛОКОМОЦИИ И ПОЗЫ	202
Соматосенсорный контроль баланса при локомоции	202
Нейрональные механизмы интеграции позы и локомоции	223
Глава 7. ОБЩЕЕ ОБСУЖДЕНИЕ	257
Спинально-стволовые механизмы управления позой, локомоцией и их сенсомоторной интеграцией	257
Реобучение нейронных сетей спинного мозга контролю постуральной и локомоторной функции при патологии	270
ВЫВОДЫ	284
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	288

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ:

ЭС	– эпидуральная стимуляция спинного мозга
АФР	– афференты флексорного рефлекса
СЛГ	– спинальный локомоторный генератор
5-НТ	– 5-гидрокситриптофан (серотонин)
NA	– норадреналин
DA	– дофамин
ЭМГ	– электромиографическая активность
ПСМ	– повреждение спинного мозга
МЛО	– мезенцефалическая локомоторная область
ВОП	– вентральная область покрышки
СМ	– спинной мозг
ПВТ	– поддержка веса тела
Ф/Э	– флексия (сгибание)/экстензия (разгибание)
КСП	– кортико-спинальные пути

ВВЕДЕНИЕ

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., 2009b). 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 разработать 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.

Цели 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 рефлекторных 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. Оработаны 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.

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 активирует 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 доказывают наличие тесной интеграции

локомоторных и постуральных нейронных сетей, существование 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 повреждением спинного мозга. Метод многокомпонентной электрохимической 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 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.

Глава 1.

ПОЗА И ЛОКОМОЦИЯ: СПИНАЛЬНО-СТВОЛОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ И МЕТОДЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРИ ПАТОЛОГИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ТРАДИЦИОННАЯ СХЕМА НЕЙРОНАЛЬНОГО КОНТРОЛЯ ЛОКОМОЦИИ И ПОЗЫ

Как у бипедальных, так и квадрипедальных животных для инициации и окончания локомоторной активности необходим плавный переход между стоянием и ходьбой (Gurfinkel, Shik, 1973; Mori, 1987; Mori, Takakusaki, 1988). Такой переход возможен только в случае тесной интеграции нейрональных механизмов, лежащих в основе постурального и локомоторного контроля (Mori, 1989). Более ста лет назад британский физиолог и нейробиолог Чарльз Шеррингтон сформулировал проблему, связанную с такой интеграцией, как “поза, словно тень, следует за движением” (Sherrington, 1906; 1910). Исследования, проведенные впоследствии на различных моделях, подтвердили, что активная локомоция не только требует пропульсивной активности за счет циклического вовлечения отдельных сегментов конечностей (Шик, 1976; Mori et al., 1989), но сопровождается тонкой координацией между движениями конечностей и туловища, эффективным контролем мышечного тонуса, позы тела и поддержания равновесия (Mori, 1987; Misiasek et al., 2006). Наряду с этим большинство научных работ преимущественно фокусировались либо на изучении локомоции (Grillner, 1981; Grillner, Wallen, 1985; Rossignol, 1996), либо позы (Roberts, 1978; Macpherson et al., 1997). Поэтому, несмотря на значительный прогресс в изучении различных аспектов локомоторного и постурального нейроконтроля, интегративные механизмы взаимосвязи этих двух неразделимых в условиях гравитации функций до последнего времени оставались малоизученными.

Развитие представлений о регуляции локомоции и позы

На протяжении долгого времени ученые интересовались тем, как животные и человек перемещаются в пространстве. Подходы первых исследователей базировались на имеющихся в их арсенале средствах научного поиска, которые не давали возможности заглянуть вглубь механизмов нейронального контроля, однако позволили описать основные закономерности двигательных актов в норме и патологии. Еще в XVII веке французский философ и естествоиспытатель Рене Декарт обосновал представление о рефлексе как общем принципе нервной деятельности и ее детерминированности внешними стимулами. В XVIII веке итальянский физик и анатом Луиджи Гальвани первым исследовал электрические явления при мышечном сокращении, разработав теорию, согласно которой мышцы и нервы электрически заряжены («животное электричество»), таким образом, став одним из основоположников электрофизиологии. В конце XVIII начале XIX веков чешский анатом и физиолог Иржи Прохаска выдвинул представление о чувствительных и двигательных нервах, ввел в физиологию термин «рефлекс». С использованием фотографической съёмки в работах английского и американского фотографа Майбриджа впервые проведён кинематический анализ локомоторной активности разных видов животных (Muybridge, 1887). Немецкий врач М.Г.Ромберг в середине XIX века ввел в клиническую практику используемое в неврологии по сей день исследование устойчивости тела при стоянии, которая страдает (симптом Ромберга) при поражении мозжечка, расстройствах функции вестибулярного анализатора, нарушении глубокой чувствительности вследствие поражения спинного мозга и некоторых других заболеваний.

Основы современных представлений о механизмах регуляции двигательной активности были заложены в середине XIX - начале XX веков в работах М.Холла и И.П.Мюллера, которые описали компоненты рефлекторной дуги и развили рефлекторную теорию деятельности спинного мозга. Отечественному физиологу И.М.Сеченову принадлежит честь

открытия явления торможения в центральной нервной системе (1862г), благодаря чему в дальнейшем стало возможным создание учения о координации рефлекторных актов. Идея о рефлекторном механизме деятельности головного мозга получила развитие в работе Сеченова "Рефлексы головного мозга", опубликованной в 1863 году. Уже тогда И.М. Сеченов (Сеченов, 1890) высказал мысль, что спинной мозг содержит все элементы, необходимые для координации мышц, а головной мозг управляет работой спинальных нервных центров, подчиняя себе не ту или иную мышечную группу, а нервную механику локомоции. На основе детального изучения кинематической структуры отдельного локомоторного цикла Филиппсон (Philippson, 1905) дал первое научное объяснение механизма генерации шагательного движения, предложив гипотезу цепного рефлекса, в которой ключевая роль уделялась рецепции от стопы. Ч.Шеррингтон также склонялся в пользу рефлекторной природы локомоции, считая, что основное значение имеют проприоцептивные рефлексы (Sherrington, 1910). В экспериментах на децеребрированных и спинализованных кошках он показал, что такие животные способны выполнять рудиментарные шагательные движения в условиях отсутствия связи между головным и спинным мозгом (Sherrington, 1906, 1910). Это было экспериментальным доказательством того, что программа локомоторной активности действительно вырабатывается на спинальном уровне. Позже, в аналогичных опытах Браун (Brown, 1911, 1913, 1914) обнаружил, что в течение нескольких секунд после спинализации в области грудных сегментов задние конечности осуществляют альтернирующие движения, даже после пересечения всех дорсальных корешков каудальнее повреждения спинного мозга. При этом мышцы-антагонисты одного сустава работают поочередно. Основываясь на таких результатах, Браун высказал гипотезу об устройстве нервного аппарата, управляющего локомоторными движениями конечности, согласно которой последний

состоит из двух полуцентров: сгибательного и разгибательного, активирующих соответствующие мышцы.

Первые фундаментальные работы, посвященные постуральному контролю, были проведены голландским физиологом и фармакологом Рудольфом Магнусом в начале прошлого века (Magnus, 1924). Развивая исследования И.М.Сеченова о собственной чувствительности мышц, Магнус открыл и всесторонне изучил большую группу рефлексов, обеспечивающих распределение тонуса скелетной мускулатуры и возможность поддержания определенного положения тела в пространстве. В частности, были описаны установочные рефлексы (тонические рефлексы Магнуса – Клейна), контролирующие положение тела и его равновесие, согласующие постановку туловища и конечностей с положением головы. Было экспериментально доказано, что в стволе головного мозга расположена сложная система рефлекторных центров, управляющих сохранением положения тела в пространстве (статические рефлексы), а также реакциями, которыми организм отвечает на активные и пассивные движения и которые компенсируют происходящие при этом смещения (статокинетические рефлексы).

Научная деятельность последующих десятилетий XX века, направленная на исследование спинальных рефлекторных механизмов, морфологической и функциональной организации спинного мозга, во многом определила дальнейшее развитие нейрофизиологии двигательного поведения. К таким фундаментальным трудам следует отнести: работу о рефлекторной активности спинного мозга (Creed et al., 1932); подробное исследование волоконного состава периферических нервов, позволившее классифицировать их по порогу электрического раздражения и скорости проведения возбуждения (Erlanger, Gasser, 1937; Lloyd, Chang, 1948); осуществление точных измерений синаптических процессов в мотонейронах с помощью моносинаптического тестирования (Lloyd, 1943); открытие клеток Реншоу (Renshaw, 1945); разработку гипотезы о

сервомеханизме системы регуляции движений посредством гамма-петли (Merton, 1953); применение метода внутриклеточного отведения для прямой регистрации активности спинальных нейронов (Eccles, 1953); установление пластинчатого строения серого вещества спинного мозга (Rexed, 1954).

В 60-е годы прошлого века изучение механизмов локомоции и позы получило сильный импульс благодаря открытию возможных путей управления локомоторной ритмикой в условиях эксперимента на животных, а также исследованию функциональных принципов постурального контроля при стоянии человека. Московская научная группа под руководством М.Л.Шика (Шик и др. 1966а) показала, что тоническая электрическая стимуляция среднего мозга у преколликкулярно децеребрированной кошки вызывает ходьбу, и сила стимуляции определяет характер движений. Обнаружение этого факта значительно расширило возможности исследователей и позволило в достаточно короткие сроки продвинуться вперёд в понимании механизмов инициации локомоторной активности, особенностей супраспинального контроля, межконечностной координации во время ходьбы. Другой московский коллектив исследователей под руководством В.С. Гурфинкеля впервые предложил (Бабский с соавт., 1955) и начал активно использовать стабилографический метод, в результате чего был сделан огромный вклад в изучение механизмов поддержания вертикального положения тела человека (Гурфинкель с соавт., 1965; Гурфинкель, 1977).

Вскоре был обнаружен ещё один способ инициации локомоции: системное внутривенное введение ДОФА (Будакова, 1973; Grillner, 1969) и других норадренергических агонистов (Forssberg, Grillner, 1973). С помощью данного метода можно было вызывать локомоторную ритмику даже у острого спинализированного животного. Это дало возможность достигнуть значительного прогресса в изучении спинальных механизмов. Работы на острой децеребрированной модели с электрической и фармакологической стимуляцией ствола мозга позволили японскому

нейрофизиологу Ш.Мори с коллегами обнаружить нейрональные центры головного мозга, активирующие и тормозящие возбудимость экстензорных мышц при двигательной активности (Mori, 1989), продвинуться в понимании нейрофармакологических механизмов регуляции локомоции и постурального тонуса.

Большой вклад в развитие представлений об устройстве системы регуляции движений внесли модельные и кибернетические исследования. Н.А.Бернштейн развил принцип обратной связи и сенсорных коррекций, перейдя от классической рефлекторной дуги к рефлекторному кольцу (Бернштейн, 1947). Была разработана теория уровневой организации движений, позволяющая разложить сложный двигательный акт на отдельные компоненты, а также выявить состояние мозговых уровней, их роль в регуляции движений. Предложено существование мышечных синергий (одновременной активации нескольких мышечных групп при одном нейрональном сигнале) как нейронной стратегии упрощения управления сложными двигательными актами (Bernstein, 1967). Позднее последователи и ученики во многом дополнили и развили его теории (Цетлин, 1969; Gelfand, Tsetlin, 1971), а также нашли им реальное практическое применение, например, в разработке двигательных протезов. Сформировавшееся в 60-х годах под влиянием идей кибернетики и теории автоматического регулирования представление о ведущей роли сенсорных коррекций в управлении движениями в последующие годы столкнулось с серьёзными трудностями в объяснении нарастающего числа экспериментов, обнаруживающих роль программных механизмов. В дальнейшем систему регуляции движениями стали понимать как единство программных принципов управления и управления по афферентной обратной связи (Tatton, Bruce, 1981).

Важным шагом явились исследования, в которых было обнаружено, что при локомоторной активности, возникающей спонтанно или после применения вышеупомянутых методов, даже у обездвиженных

кураризированных животных в двигательных нервах наблюдается специфическая ритмическая активность – фиктивная локомоция (Баев с соавт., 1979; Edgerton et al., 1976). Так как такой экспериментальный подход обеспечивал относительную неподвижность спинного мозга, предоставилась замечательная возможность для изучения центральных механизмов программирования локомоторных движений с помощью микроэлектродных клеточных отведений. Наряду с экспериментами *in vivo*, с конца 50-х годов прошлого века по настоящее время наблюдается нарастающий интерес к исследованию *in vitro* нейронального контроля локомоции и позы низших позвоночных (Grillner, Wallen, 1985; Orlovsky et al., 1999; Zelenin et al., 2000) и беспозвоночных животных (Arshavsky et al., 1985; Satterlie, Spencer, 1985). Изолированные препараты, помещённые в физиологический раствор, спонтанно, при электрической или фармакологической стимуляции, могли генерировать паттерны, лежащие в основе двигательного поведения, а относительная неподвижность препарата позволяла использовать микроэлектродную регистрацию нейрональной активности. Изобретение метода локальной фиксации потенциала «Патч-кламп» (Neher, Sakmann, 1976) позволило регистрировать изменения потенциала и токов на мембране с различных типов клеток, получая записи с минимальным уровнем шума. В результате появилась возможность регистрации токов с одиночных каналов, что применялось для изучения их проводимости и кинетики.

Благодаря этим методическим успехам были детально изучены биофизические и фармакологические свойства клеток нейрональной сети, генерирующей двигательную активность (Grillner, 2006; Grillner, Jessell, 2006). Появились сведения о функционировании нейронных сетей, рецепторных и ионных механизмах межнейронных взаимодействий (Shapovalov, 1997; Batueva et al., 1999; Veselkin et al., 2000). Данные, полученные на “простых” экспериментальных моделях, способствовали формулированию современных представлений о командных и

координирующих системах, о центральных генераторах двигательных паттернов (Orlovsky et al., 1999).

Принципы управления локомоции и позы

Современная схема регуляции локомоторной активности объединяет в себе идеи программного управления и управления по афферентной обратной связи (Stein, 1978; Баев, 1983; Rossignol, 1996; Orlovsky, Deliagina, 1999). Центральным элементом этой схемы является спинальный локомоторный генератор (СЛГ). Он представляет из себя специализированную нейрональную сеть спинного мозга, вырабатывающую исходную локомоторную программу. Каждая конечность (Баев, 1983), а возможно, и каждый сустав (Grillner, Zangger, 1979; Grillner, 1981), управляется своим отдельным генератором, который может поочерёдно активировать сгибательные и разгибательные мотонейроны даже в отсутствие циклического афферентного или супраспинального потока импульсов. Активация спинального генератора осуществляется специфическими нисходящими командными нейронами. Сигналы, поступающие от командных нейронов, сравнительно просто организованы и представляют собой тонический поток импульсов. Интенсивность тонического нисходящего потока, частота импульсации и количество активных командных нейронов определяют уровень активации генератора. В свою очередь, от уровня активации зависит интенсивность и частота локомоторных движений. В основе межконечностной координации лежит взаимодействие различных генераторов, которое осуществляется с помощью координирующих нейронов и определяется интенсивностью тонического нисходящего потока. Спинальный локомоторный автоматизм подвержен мощному корректирующему влиянию со стороны периферических афферентов и быстропроводящих нисходящих систем. Импульсация, поступающая по афферентным входам и быстропроводящим нисходящим волокнам, содержит фазный компонент и оказывает влияние

на работу как нейронов генератора, так и мотонейронов. Это позволяет эффективно видоизменять не только фазу и амплитуду всего движения конечности, но и активность отдельных мышц.

Постуральный контроль может осуществляться по принципу обратной связи (feedback mode) (Бернштейн, 1966; Анохин, 1975; Deliagina and Orlovsky 2002), компенсирующей отклонения от оптимальной позы, и по принципу упреждения или прямой связи (feedforward mode), использующейся для стабилизации последовательности произвольных движений (Козловская, 1976; Gahery, Ioffe et al., 1980; Horak, Macpherson, 1995). Существуют две крупные концепции относительно функциональной организации системы регуляции позы, работающей по принципу обратной связи.

В концепции децентрализованного контроля, базирующейся на классических исследованиях Магнуса (1924, 1926), любая поза тела рассматривается как результат взаимодействия между множеством рефлексов (статических рефлексов стояния, установочных рефлексов, статокинетических рефлексов, сегментарных, межсегментарных и генерализованных), которые дополняют или противодействуют друг другу. В последние годы на разных экспериментальных моделях были обнаружены доказательства, поддерживающие концепцию децентрализованного контроля (Deliagina et al., 1998; Deliagina, Fagerstedt, 2000; Pavlova, Deliagina, 2002; Deliagina, Orlovsky, 2002; Beloozerova et al., 2003).

Согласно концепции централизованного контроля (Levin, 1996), на основе информации о положении головы и тела, приносимой различными сенсорными системами (вестибулярной, зрительной, соматосенсорной), вырабатывается общая характеристика позы тела (позиция центра масс или ориентация продольной оси тела) (Гурфинкель, Бабакова 1995; Гурфинкель, Левик 1999; Feldman, Levin, 1995). Если текущая поза отличается от оптимальной, к моторным центрам отправляются команды для вызова корректирующих движений (Massion, 1994; Horak, Macpherson 1995;

Massion et al., 1997; Massion, Dufosse, 1998), которые восстанавливают равновесное состояние в нормальных условиях гравитационного поля Земли. Результаты исследований, проведенных во время космических полетов или в условиях, моделирующих невесомость (Козловская, 2007), показали, что устранение гравитации приводит к функциональным и структурным нарушениям моторной системы (Kozlovskaya et al., 1983, 1988), развитию гипогравитационной атаксии, мышечной атрофии и атонии постуральных (экстензорных) мышц, существенному уменьшению их участия в локомоторной активности (Kozlovskaya et al., 2007).

Роль стволовых моторных центров в управлении локомоции и позы

В соответствии с современными представлениями, инициация работы СЛГ осуществляется супраспинальными командами. В экспериментальных условиях возможна искусственная активация генератора посредством электрического раздражения различных структур ствола мозга. К ним относятся субталамическая область (Waller, 1940; Орловский, 1969), среднемозговая область (Шик с соавт., 1966а), бульбарная область (Шик, Ягодницын, 1977). Нейроны локомоторных областей активируют генератор не напрямую (Garcia-Rill et al., 1983; Shefchyk et al., 1984; Baev et al., 1988), а действуют через нейроны с длинными аксонами, которые находятся в вентро- и дорсомедиальных зонах продолговатого мозга и моста (Орловский, 1970; Kawahara et al., 1985; Jordan, 1986). Раздражение парамедиальной области ретикулярной формации способно вызывать шагание (Steeves et al., 1986; Березовский с соавт., 1989), тем не менее вызвать локомоцию прямым раздражением нисходящих ретикулоспинальных путей не удалось. Опыты с локальными перерезками белого вещества спинного мозга показали, что вызов шагания кошки при стимуляции мезэнцефалической локомоторной области (МЛО) прекращается только при повреждении вентролатерального отдела (Steeves, Jordan, 1980), тогда как обширные разрушения дорсолатеральной,

дорсальной и вентромедиальной областей не устраняло локомоторную активность. Многие исследования свидетельствуют (Орловский, 1970; Шик, 1976), что нейроны медиальной понтомедуллярной ретикулярной формации объединяют влияния от различных областей мозга, участвующих в вызове локомоции, и формируют инициирующие работу СЛГ нисходящие сигналы. Эти сигналы распространяются по моноаминергическим ретикулоспинальным волокнам вентролатерального канатика спинного мозга. Доказательством ключевой роли медиальной ретикулярной формации служат данные о прекращении локомоции при охлаждении данной структуры (Орловский, 1970). Также на это указывает то, что стимуляция вентральных отделов медиальной ретикулярной формации может облегчать локомоцию, вызванную раздражением МЛО (Mori, 1987).

Кроме инициации локомоции, супраспинальные двигательные центры выполняют большое количество других функций, связанных с локомоторным контролем (Баев, 1983; Orlovsky et al., 1999), которые осуществляются через быстропроводящие нисходящие системы (кортико-, рубро-, ретикуло-, вестибуло-спинальную). К таким функциям относятся: координация локомоторной активности с иными типами движений, зрительными, слуховыми и другими сигналами и, вероятно, поддержание равновесия во время локомоции. Модулирующее влияние на работу быстропроводящих нисходящих систем оказывают различные структуры головного мозга и, в первую очередь, мозжечок (Аршавский с соавт., 1984; Armstrong, 1986). Эти структуры получают информацию, как о перемещении отдельных конечностей, так и об активности спинальных локомоторных центров. На основе такой информации формируются корректирующие сигналы, которые и передаются к спинальным центрам по быстропроводящим нисходящим волокнам.

Постуральная активность мышц находится под контролем постоянных влияний, исходящих из структур ствола мозга и мозжечка, активируемых либо рефлекторно с различных сенсорных входов (вестибулярный,

зрительный, соматосенсорный), или центрально – из моторной коры. Роль различных структур головного мозга в постуральном контроле во многом не выяснена. Большинство работ посвящены корковым механизмам регуляции позы (Иоффе, 1991; Ioffe et al., 1988; Gurfinkel, Elner, 1988; Horak, Macpherson, 1996; Beloozerova et al., 2003), роли мозжечка (Hore, Vilis, 1984; Dichgans, Diener, 1986; Horak, Diener, 1994) и базальных ганглиев (Dietz et al., 1988, 1992; Шаповалова с соавт., 1984; Horak, Frank, 1996; Takakusaki et al., 2004). Проблема стволовых механизмов постурального контроля освещена в литературе ограниченно.

Как показали исследования на децеребрированных животных (Magnus, 1924; Bard, Macht, 1958), такой препарат может поддерживать равновесие во время стояния и ходьбы. Данный факт свидетельствует, что базовые механизмы регуляции позы находятся ниже уровня децеребрации: в стволе головного мозга, мозжечке и спинном мозге. Вовлечение ствола и мозжечка в контроль тонуса антигравитационной экстензорной мускулатуры было установлено в экспериментах с электрической стимуляцией специфических отделов мозга (dorsal tegmental field, ventral tegmental field в стволе, hook bundle в мозжечке) (Mori, 1987, 1989; Asanome et al., 1998). Эксперименты с регистрацией клеточной активности ретикуло-спинальных и вестибуло-спинальных нейронов при локомоции на наклоняемом тредбане установили, что нейрональная активность существенно зависит от угла наклона (Matsuyama et al., 2000). Остается неизвестным, связаны ли эти эффекты на наклоны с генерацией указанными нейронами постуральных коррекций, или они обусловлены модуляцией их активности в ответ на постуральные ответы, генерируемые спинальным нейронными сетями.

Роль спинальных нейронных сетей в контроле локомоции и позы

До последнего времени считалось, что спинальный аппарат содержит нейронные сети, способные генерировать локомоторный паттерн, тогда как поддержание позы и баланса требует участия центров ствола и переднего

мозга (Сафьянц, 1976; Macpherson et al., 1997, Deliagina et al., 2006). В связи с этим накоплен богатый экспериментальный материал в первую очередь по исследованию локомоторных сетей спинного мозга и практически отсутствуют работы по спинальным постуральным механизмам.

Структурно-функциональная организация спинальных локомоторных сетей во многих аспектах еще остается неясной. Большое количество исследовательских лабораторий разных стран продолжает вести активное изучение этого вопроса, который на сегодняшний день является дискуссионным. Тем не менее, существует объемный научный материал, в определенной степени раскрывающий закономерности работы СЛГ, его структурные элементы, а также анатомическое расположение в пределах спинного мозга.

Согласно гипотезе Брауна, два полуцентра локомоторного генератора каждой конечности – сгибательный и разгибательный – связаны между собой взаимотормозящими связями, и активность одного полуцентра сопровождается торможением другого (Brown, 1913, 1914). По мнению Брауна, накопление утомления в активном полуцентре приводит к прекращению его работы и переключению активности к другому полуцентру. При этом не уточнялось, из каких нейрональных элементов построены эти полуцентры – мотонейронов или промежуточных нейронов.

Дальнейшее развитие эта гипотеза получила в работах Янковской и Лундберга (Jankowska et al., 1965, 1967a, 1967b), выполненных на спинальных кошках, которым вводили ДОФА. У таких животных в ответ на стимуляцию афферентов флексорного рефлекса (АФР) появлялись поздние длительные разряды в ипсилатеральных сгибательных и контралатеральных разгибательных нервах задних конечностей. Отведение активности отдельных промежуточных нейронов поясничного отдела спинного мозга показало, что интернейроны со сходными временными параметрами импульсной активности расположены в латеральных участках промежуточного вещества и вентрального рога. По характеру ответов на

стимуляцию ипси- и контралатеральных АФР все исследованные интернейроны были разделены на три группы (Jankowska et al., 1967b). Первую группу составляли интернейроны, поздний ответ в которых возникал при стимуляции ипсилатеральных и тормозился со стороны контралатеральных АФР. Ко второй группе были отнесены интернейроны с противоположным характером реакции. Интернейроны третьей группы активировались с большим скрытым периодом со стороны ипси- и контралатеральных АФР. Авторы отождествили интернейроны первых двух групп со сгибательным и разгибательным полуцентрами Брауна, тем самым, постулируя устройство СЛГ на основе интернейронных сетей (Lundberg, 1969a, 1969b). Интернейроны третьей группы, по мнению авторов, ответственны за деполяризацию терминалей первичных афферентов при поздних разрядах.

Последующие исследования не только подтвердили предположение о том, что генератор построен на основе интернейронной сети, но и дополнили его рядом новых данных. Анализ активности отдельных промежуточных нейронов пояснично-крестцового отдела проводился при реальной локомоции мезэнцефалических (Орловский, Фельдман, 1972a), при фиктивной локомоции спинальных (Edgerton et al., 1975, 1976) и таламических (Баев с соавт., 1979) кошек. Во всех исследованиях были обнаружены интернейроны, активировавшиеся либо в фазе сгибания, либо в фазе разгибания, таким образом модулируясь в ритме реальной или фиктивной локомоции. Примечательно, что они располагались примерно в том же месте, где Янковская обнаружила интернейроны, активирующиеся при стимуляции АФР, а именно в промежуточной и вентролатеральной зоне серого вещества (Орловский, Фельдман, 1972a; Edgerton et al., 1975) L5-L7 спинномозговых сегментов (Баев с соавт., 1979).

Секей и Цей (Szekely, Czeh, 1967) в экспериментах на амфибиях показали, что при микростимуляции плечевого отдела спинного мозга сокращение одной и той же мышцы можно вызвать из различных зон. Эти зоны

разделены областями, раздражение которых приводит к сокращению других мышц передней конечности. На основании указанных данных было сделано предположение о том, что колонны мотонейронов плечевого отдела разделены на группы, каждая из которых включает в себя мотонейроны нескольких мышц в различных комбинациях. Гипотеза, в основе которой лежит активация групп мотонейронов с временным сдвигом, получила название «объединение микроциклов». Однако авторы не оговаривали возможные пути координации активности многих микроциклов в единый цикл. Позднее это представление было развито Клингом и Секем в гипотезу «однорядного кольца» (Kling, Szekely, 1968). Согласно ей, однонаправленное распространение возбуждения по кольцу может осуществляться посредством тормозных координирующих механизмов.

Все предложенные взгляды на устройство СЛГ содержат слабые стороны и между ними есть точки соприкосновения. Это привело к попыткам объединить их в единую гипотезу «многорядного многослойного кольца». Распространение активности в этом случае происходит по замкнутой траектории интернейронных цепей, вдоль которой мотонейроны всех мышц конечности расположены в порядке их работы в цикле шага (Шик, 1976).

В хронических экспериментах на спинальных кошках установлено, что локомоторная активность может инициироваться, если перерезка осуществляется роstralнее L4 сегмента (Afelt et al., 1970). При более каудальных перерезках локомоция не вызывалась. В острых опытах с использованием ДОФА для инициации ходьбы ритмика пропадала, если перерезку делали каудальнее L5 сегмента (Grillner, Zangger, 1979). Также были проведены острые и хронические экспериментальные исследования на кошках (Langlet et al., 2005) с осуществлением двух перерезок спинного мозга (первой на уровне Th13 сегмента, а второй на разных уровнях поясничного утолщения) с последующим применением клонидина (норадренергического агониста, который инициирует локомоцию задних конечностей). Результаты показали, что после второй перерезки на L2 или

ростральной части L3 сегментов локомоцию можно инициировать фармакологически, тогда как перерезка на уровне каудальной части L3 или на уровне L4 сегментов полностью устраняла возможность локомоции, даже после нескольких недель интенсивной тренировки на тредбане. На основании этого авторы сделали вывод, что средние поясничные сегменты (L3, L4, L5) являются наиболее существенными для проявления спинальной локомоции, несмотря на то, что все мотонейронные ядра мышц задних конечностей находятся каудальнее L4 сегмента. Наибольшая значимость средних поясничных сегментов для проявления локомоции подтверждается также экспериментами других авторов на разных моделях животных (Deliagina et al., 1983; Kiehn, Kjaerulff, 1998; Marcoux, Rossignol, 2000; Cazalets, 2000).

Одной из важных функций локомоторной системы является регуляция направления шагательных движений отдельных конечностей относительно оси тела. Шаги в различных направлениях часто используются человеком и животными для поддержания равновесия при стоянии и локомоции (Chvatal et al., 2011; Karayannidou et al., 2009). Механизмы контроля направления локомоторных движений мало изучены. Согласно одной из гипотез, общая нейронная сеть спинного мозга управляет различными направлениями ходьбы (Grillner, 1981; Lamb and Yang, 2000; Hoogkamer et al., 2014) через смену модуляторных влияний (Marder and Calabres, 1996). Эти модуляторные влияния могут обеспечиваться внутриспинальными механизмами, сенсорным входом или супраспинальными сигналами (Getting, 1989). Например, при фиктивном плавании ламприи различные концентрации N-methyl-D-aspartate (NMDA), приложенные к различным отделам спинного мозга, вызывали изменение в интерсегментной координации (Matsushima and Grillner, 1992). Если ростральные сегменты спинного мозга ламприи перфузировались большей концентрацией NMDA в сравнении с каудальными сегментами, то фиктивное плавание было сходно с плаванием вперед. Если каудальные отделы перфузировались

более высокой концентрацией, то фиктивное плавание трансформировалось в плавание назад. Другие нейромодуляторы (серотонин, ГАМК) также могли модулировать интерсегментарную координацию (Matsushima and Grillner 1992; Tegnér et al. 1993).

Исследования, направленные на изучение инфраструктуры СЛГ, были проведены на *in vitro* препаратах низших позвоночных (Whelan et al., 2000) и препаратах генетически модифицированных мышей (Kiehn, 2011). Эти работы позволили получить объективную информацию о возможных клеточных элементах спинальных локомоторных сетей (Butt et al., 2002; Kiehn, 2006; Gosgnach et al., 2006). Было установлено, что в основе генерации ритма могут лежать V2a, V3 и Hb9 - глутаматергические интернейроны (Kiehn, 2011). Межконечностная координация осуществляется с участием V0v – глутаматергических и V0d – GABA/глицинергических комиссуральных интернейронов, а координация между мышцами антагонистами - V1 связанными клетками Реншоу и V1 связанными rIa GABA/глицинергические интернейронами (Kiehn, 2011). На моделях млекопитающих были получены электрофизиологические данные о том, что нейроны, вовлеченные в генерацию локомоторного ритма, в основном расположены в вентральных отделах серого вещества спинного мозга (пластины VII, VIII, и X) (Tresch, Kiehn 1999). Это было подтверждено в работах с микроперерезками спинного мозга (Bracci et al., 1996; Kjaerulff, Kiehn, 1996). Предложено, что СЛГ не просто генерирует альтернирующую активность сгибателей и разгибателей, но выдает более деликатный паттерн, который последовательно начинает и оканчивает активность соответствующих мышц в определенный момент. Эта идея была развита в гипотезу о модулярной структуре СЛГ, в которой отделы локомоторной сети “модули” контролируют определенные группы мотонейронов (Grillner, 1981). Такая гипотеза перекликается с аналитическими и экспериментальными результатами, предлагающими концепцию моторных примитивов (Tresch et al., 1999; Bizzi et al., 2008), в

которой сенсорно обусловленные линейные комбинации небольших наборов мышечных синергий (Bernstein, 1967) могут лежать в основе генерации различных локомоторных паттернов, функциональных движений (Mussa-Ivaldi, 2004; Flash, Hochner, 2005) и, возможно, постурально обусловленных двигательных механизмов. Концептуально, эти синергии могут быть очень полезными, поскольку значительно уменьшают или устраняют необходимость контроля всех элементов нейронных сетей супраспинальными сигналами, тем самым снижая вычислительную "нагрузку" супраспинальных центров (Mussa-Ivaldi, 2004; Ingram et al., 2008).

Афферентный контроль

Окружающая среда насыщена различного рода неожиданностями и опасностями. И именно афферентная обратная связь помогает животным выживать в непрестанно изменяющихся внешних условиях, адаптируя центральную двигательную программу под конкретную двигательную задачу.

Когда животное ходит или стоит, необходим достаточно высокий тонус разгибателей для переноса его веса. Постуральный тонус значительно увеличивается перед самым началом ходьбы нисходящими супраспинальными сигналами (Mori et al., 1992) и поддерживается дальше с участием афферентного входа (Whelan, 1996). Как оказалось, большое значение в этом играет изменение центральных эффектов сенсорных входов ("reflex reversal") о растяжении и нагрузке экстензоров, которое происходит с началом локомоции (DiiCaprio, Clarak, 1981; Bassler, 1983, 1986; Lacquaniti et al., 1991; Latash, Gurfinkel, 1976; Gurfinkel et al. 1992; Pearson, Collins, 1993). Например, стимуляция Ib афферентов, происходящих от рецепторов Гольджи разгибателей, вместо подавляющего действия, начинает активировать экстензорную активность в результате задействования олигосинаптических путей (Gossard et al., 1994). Другим

примером являются афференты Ia, которые также начинают стимулировать экстензорную активность по олигосинаптическим рефлекторным путям (Guertin et al., 1995).

Многочисленные эксперименты на различных моделях животных показали, что наибольшему изменению в ответ на афферентный вход при ходьбе подвержена активность разгибателей во время фазы опоры (Whelan, 1996). В соответствии с этим, при увеличении скорости локомоции, длительность опоры уменьшается при относительной неизменности переноса (Grillner, 1981; Rossignol, 1996; Мусиенко с соавт., 2005). При подъеме кошки по наклонной плоскости пропульсивная сила движения также изменяется за счёт работы разгибательных мышц: амплитуды ЭМГ активности экстензоров возрастают, тогда как амплитуды ЭМГ флексоров не изменяются (Pierotti et al., 1989).

Многими исследователями подтверждается важная роль кожной чувствительности в регуляции локомоторной активности (Sherrington, 1906; Magnus, 1926; Engberg, 1964; Whelan, 1996). Показано, что ответ на стимуляцию кожного нерва зависит от силы раздражения, его локализации, а также от фазы локомоторного цикла, в которое это раздражение наносилось (Duysens, Pearson, 1976; Duysens, 1977; Duysens, Stein, 1978; Grillner, Rossignol, 1978). Вероятно, экстероцептивный вход играет роль тонкого механизма, помогающего реагировать максимально адекватно на разнообразные раздражения при локомоции. Стимуляция кожных афферентов от различных зон конечности может приводить к сложным паттернам двигательного поведения, которые являются очень важными в функциональном отношении. Например, стимуляция кожи тыла стопы в начале переноса приводит к вполне координированному двигательному паттерну, напоминающему переступание через препятствие, помогающему животному не потерять равновесия в данном случае (Forssberg, 1979). Многими работами доказана также большая роль экстероцептивного афферентного входа в тоническом контроле локомоторной активности

(Kniffki et al., 1981; Fleshman et al., 1984; Rossignol, 1996).

Адаптация момента перехода от фазы опоры к фазе переноса под определённую двигательную задачу (например, при изменении скорости локомоции) также происходит с мощным участием сенсорного влияния, особенно от проприоцепторов, сигнализирующих о позиции тазобедренного сустава (Anderson, Grillner, 1981; Kriellaars et al. 1994). Другой важный фактор, влияющий на инициацию переноса и активности флексоров – уменьшение нагрузки на конечность и расслабление экстензоров в конце опорной фазы (Duysens, Pearson, 1980). Немаловажно также контралатеральное влияние, обеспечивающее межконечностную координацию и поддержание равновесия (Orlovsky et al. 1999).

На переход от фазы переноса к фазе опоры афферентный вход воздействует в меньшей степени (Orlovsky et al., 1999). Как было отмечено (Engberg, Lundberg, 1969), экстензорная активность предшествует (на 20-50 мс) приземлению лапы, поэтому контакт стопы с опорной поверхностью нельзя считать фактором, играющим роль пускового механизма. То что вспышки ЭМГ активности сгибателей менее вариабельны по сравнению с экстензорными ЭМГ вспышками (Pearson, Rossignol, 1991), подтверждает большую «ригидность» той части СЛГ, которая генерирует флексорную активность во время локомоторного цикла.

Восстановление спинальной локомоции кошки требует интенсивной ежедневной тренировки на тредбане (Edgerton et al., 1997). В ближайшие дни после спинализации для вызова ходьбы во время тренировки необходима дополнительная механическая стимуляция промежности или основания хвоста (Rossignol et al., 2002c). Через несколько недель шагательные движения задних конечностей иницируются прикосновением к движущейся ленте тредбана. Всё это демонстрирует, что афферентный вход очень важен, если не необходим, для разработки локомоторной функции у спинального животного. После спинализации степень влияния афферентного входа на СЛГ возрастает (Мусиенко с соавт., 2005), в

определенной степени заменяя нисходящие супраспинальные влияния.

В хронических опытах на спинальных кошках исследовались различные сенсорные каналы на предмет их участия в контроле характеристик ходьбы при отсутствии супраспинального контроля. Было обнаружено, что состояние тазобедренного сустава имеет ключевое значение (Grillner, Rossignol, 1978), так как сгибание в этом суставе предотвращает ходьбу, а разгибание стимулирует её (Pearson, Rossignol, 1991). Этот эффект мог быть обусловлен проприоцептивным входом от мышц, действующих на бедро, или суставными афферентами (Grillner, Rossignol, 1978; Rossignol and Julien, 1980). Доказано также особое значение проприоцепторов, активирующихся при нагрузке экстензоров голени (Hiebert et al., 1994, 1996).

Большинством работ по данной тематике признаётся наиболее высокая значимость экстероцептивного афферентного входа в спинальной локомоции. Механическое раздражение тыла стопы (щипком или при контакте с препятствием) во время фазы переноса приводило к хорошо организованному ответу, состоящему из сгибания колена с быстрым отдергиванием стопы, за которым следовало сгибание голени и бедра с постановкой стопы впереди препятствия (Forssberg et al., 1977). При нанесении местного анестетика на тыл стопы такого эффекта не наблюдалось (Forssberg et al., 1977; Prochazka et al., 1978). Во время фазы опоры этот эффект также не вызывался. Экстероцептивный вход от подошвенной поверхности стопы и подушечек лап имеет сильный возбуждающий эффект на экстензорную активность после очень короткого подавляющего эффекта. Именно это важное влияние, вероятно, используется в обеспечении положительной обратной связи во время фазы опоры и отсрочки переносной фазы (Rossignol et al., 2002c; Duysens, Pearson, 1976). Эксперименты с перерезками кожных нервов стопы (Bouyer, Rossignol, 1998, 2001) установили, что в условиях интактного спинного мозга перерезки кожных нервов приводят к моторному дефициту (подволакивание стопы), который компенсируется в течение нескольких

дней. После спинализации, несмотря на интенсивные тренировки на тредбане, восстановления не происходило.

Таким образом, анализ литературы подтверждает значительную роль афферентного входа в моторном контроле и восстановлении двигательной функции после ПСМ. Многие вопросы, однако, до последнего времени оставались неизученными. К ним относятся сенсорные механизмы регуляции направления локомоции, соматосенсорные механизмы управления балансом при ходьбе, сенсомоторные рефлекторные механизмы интеграции локомоции и позы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ НЕЙРОРЕАБИЛИТАЦИЯ

Травматические повреждения спинного мозга (ПСМ) сопровождаются тяжелыми расстройствами локомоторной и постуральной функций, имеют существенные негативные социальные и экономические последствия. По оценкам, около 2,5 миллиона людей живут с хроническим повреждением спинного мозга (Thuret et al., 2006). Поэтому разработка способов нейрореабилитации таких больных является весьма актуальной задачей. Продолжается развитие различных методик, которые направлены на активацию нейрональной пластичности после травм путем усиления регенерации и спрутинга аксонов у грызунов с экспериментальным ПСМ (Thuret et al., 2006). Хотя некоторые из восстановительных методик могут применяться и для человека, клинические данные об их эффективности остаются недостаточными (Courtine et al., 2007). Вместе с тем, значительный успех достигнут при использовании у пациентов с неполным ПСМ активной реабилитационной терапии (Dietz, Harkema, 2004), разработанной в исследованиях на животных (Edgerton et al., 1997). Подход основывается на тренировке нейронных сетей спинного мозга, которые могут генерировать организованные паттерны ритмической активности. Хотя наличие таких сетей у человека было косвенно продемонстрировано (Dimitrijevic et al., 1998; Герасименко, 2002), их подавленное состояние

после тяжелых ПСМ снижает или устраняет возможность активации спинальных двигательных механизмов и восстановления функции шагания, даже при проведении локомоторных тренировок. Тем не менее, как экспериментальные, так и клинические данные показали обнадеживающие результаты, свидетельствующие о возможности вызывать высокий уровень активности спинальных механизмов, которые могут лечь в основу нейрореабилитации и двигательных тренировок при параличах у животных и людей с тяжелыми ПСМ (Harkema, 2008). Эти стратегии основываются на способности электрических и фармакологических воздействий вызывать особые физиологические состояния нейронных сетей.

Электрическая стимуляция спинного мозга

В последние годы сделаны успешные попытки искусственной активации спинальных сетей, отвечающих за вызов локомоции и функциональных движений конечностей. В острых опытах на спинальных лягушках и крысах показано, что большое количество различных двигательных паттернов в задних конечностях может быть вызвано электрической стимуляцией определенных отделов серого вещества спинного мозга (Giszter et al., 1993; Tresch, Bizzi, 1999). Было установлено, что электрическая стимуляция (ЭС) дорсальной поверхности поясничных или крестцовых спинальных сегментов спинного мозга может активировать спинальные сети и приводить к улучшению функции ходьбы у крыс, кошек и человека (Gerasimenko et al., 2008). Локомоция по движущейся ленте тредбана вызывалась при тонической ЭС у взрослых хронических спинальных крыс (Ichiyama et al., 2008; Lavrov et al., 2009) и децеребрированных кошек (Iwahara et al., 1991; Герасименко с соавт., 2003; Мусиенко с соавт., 2005). В острых и хронических экспериментах на кошках была разработана методика микростимуляции поясничного утолщения (Prochazka, Mushahwar, 2001; Mushahwar et al., 2004). Посредством стимуляции определенных зон вентрального квадранта спинного мозга удавалось вызывать

целенаправленное сокращение отдельных мышц или мышечных групп. У спинальных животных такая стимуляция инициировала более генерализованные ответы и в некоторых случаях ходьбу с частичной поддержкой веса тела (Guevremont et al., 2006). Хотя интраспинальная микроstimуляция дает преимущество более близкого расположения электрода к мотонейронам и интернейронам, введение множественных проникающих электродов в спинной мозг представляет собой сложную процедуру, которая может нанести значительный ущерб тканям. Данный подход может оказаться сложным для использования у амбулаторных пациентов, особенно в течение длительных периодов, как того требует клиническое применение. Электрическая стимуляция дорсальной поверхности спинного мозга является менее инвазивным подходом, который имеет большое клиническое значение и более приемлем для пациентов с ПСМ. Локомоторную активность парализованных конечностей у пациентов с тяжелым ПСМ удавалось вызвать в ответ на ЭС поясничных сегментов (Shapkov et al., 1996; Dimitrijevic et al., 1998; Shapkov, Shapkova, 1998). Клинические работы, в которых ЭС использовалась во время регулярных тренировок (Carhart et al., 2004), дают возможность полагать, что такой подход эффективно стимулирует нейропластические изменения способствует восстановлению локомоторной функции, в том числе у пациентов с тяжелыми формами ПСМ и полной моторной пlegии (Harkema et al., 2011).

Механизмы, лежащие в основе активации локомоторной активности при помощи стимуляции спинного мозга, не до конца ясны (Gerasimenko et al., 2008). Не было исследовано, может ли данный подход использоваться и для восстановления способностей поддержания веса тела и равновесия. Электрофизиологические записи (Gerasimenko et al., 2006) и компьютерное моделирование (Holsheimer, 1998; Rattay et al., 2000) позволяют предположить, что электрическая стимуляция включает спинальные сети в первую очередь путем вовлечения волокон корешков спинномозговых

нервов у их входа в спинной мозг и, возможно, проприоспинальных путей. При спокойном стоянии ЭС вызывает три отдельных рефлекторных ответа в мышцах нижних конечностей, которые могут быть классифицированы на основе их латентностей (Мусиенко с соавт., 2005; Gerasimenko et al., 2008): 1 - ранний ответ, появляющийся при стимуляции более каудальных сегментов, возникает в результате прямой стимуляции мотонейронов и/или их аксонов; 2 - средний ответ, опосредованный моносинаптическими связями между Ia волокнами и мотонейронами (Courtine et al., 2007; Gerasimenko et al., 2006); 3 - поздний ответ с длительным латентным периодом, природа которого не выяснена, но связывается с полисинаптической активацией нейрональных сетей (Gerasimenko et al., 2006; Lavrov et al., 2008a, 2008b). Предполагается, что ЭС вовлекает толстые афферентные волокна, контактирующие с мультисенсорными интернейронами (Musienko et al., 2009b, 2012a), которые способствуют пропуску сенсорной информации из афферентных проводящих путей группы Ib и II (Schomburg et al., 1999) и могут вызывать координированные билатеральные двигательные ответы в сгибательных и разгибательных мышцах (Rossignol et al., 2006). Дальнейшее экспериментальное изучение механизмов действия ЭС на нейронные сети позволит оптимизировать использование данного подхода при создании эффективных имплантационных технологий для применения в клинической практике.

Химическая стимуляция спинного мозга

Супраспинальные центры действуют на нейронные сети спинного мозга через нисходящие аксоны, которые достигают спинального уровня и оказывают влияние на специфические пресинаптические и постсинаптические рецепторы (Jordan et al., 2008; Jacobs et al., 1993). Одной из важнейших нисходящих нейрорецепторных систем является моноаминергическая. На спинальных нейронах распределены подтипы рецепторов к различным моноаминам - серотонину (5HT), норадреналину

(NA), дофамину (DA). Модулирующее воздействие моноаминергической системы имеет большое значение в управлении поведением животных и человека. Так, спинальные нейронные сети, которые генерируют локомоторный паттерн, преимущественно состоят из возбуждающих глутаматергических и тормозных глицинергических нейронов (Grillner, 2006), но успешная локомоция во многом зависит от скоординированного высвобождения серотонина, норадреналина, и дофамина в различных отделах спинного мозга (Jordan et al., 2008). Установлена важность альфа-2 NA рецепторов в контроле спинальной локомоции кошек (Chau et al., 1998a,b; Giroux et al., 2001), DA 1,5 рецепторов у спинальных мышей (Lapointe, Guertin, 2007). Ауторадиографические исследования также показали, что рецепторы к моноаминам (альфа-1, альфа-2 NA и 5HT) задействованы в механизмах, регулирующих спинальную локомоцию в ближайшее время после спинализации. Было обнаружено, что комбинированное использование ЭС спинного мозга и 5HT2 агониста квипазина приводило к значимому восстановлению локомоторной активности (Gerasimenko et al., 2007).

Моноаминергическая модуляция не ограничивается внутрисинаптической передачей, но также может осуществляться вне синапсов посредством объемной передачи “volume transmission” (Zoli et al., 1999; Agnati et al., 2010). Моноамины легко покидают синаптическую щель и проникают во внесинаптические рецепторы, связанные с G-белком и расположенные на соседних клетках (Agnati et al., 2010). Такая передача сигнала изменяет свойства нейронов и может действовать в течение минут-часов (Raymond et al., 2001). Таким образом, объемная передача сигнала дает логическое обоснование важной роли моноаминов в модуляции когнитивных, сенсомоторных и других функций, осуществляемых нейронными сетями головного и спинного мозга (Agnati, Fuxe, 2000), а также объясняет концептуальный механизм некоторых терапевтических эффектов этих фармакологических агентов (Zoli et al., 1999). Например,

серотонинергическая фармакотерапия демонстрирует большой потенциал в области восстановления локомоции после повреждения спинного мозга (Chau et al., 1998a; Landry et al., 2006; Courtine et al., 2009). В многочисленных клинических исследованиях с различной степенью доказательности (I-IV) показано, что агонист NA рецепторов клонидин и антагонист 5НТ рецепторов ципрогептадин может улучшать локомоторную функцию и скорость ходьбы у пациентов с тяжелым повреждением спинного мозга (Stewart et al., 1991; Remy-Neris et al., 1999; Wainberg et al., 1990). Хотя улучшение локомоции были ниже по сравнению с результатами при локомоторных тренировках на тредбане. В исследованиях со степенью доказательности I (Domingo et al., 2012) было установлено, что влияние L-Допы на локомоторную функцию не отличался от плацебо эффекта. Значение большинства подтипов моноаминовых рецепторов в спинальных механизмах контроля позы и локомоции до последнего времени оставалось неизученным.

Важным вопросом, связанным с объемной передачей сигнала является необходимость обеспечения специфичности сигнала для достижения модуляции определенных функций (Agnati et al., 2010). Концептуально, нейромодуляторная специфичность может быть достигнута, если цепи снабжены специальным аппаратом распознавания, таким как нейрональные рецепторы. Действительно, различные моноаминовые рецепторы показывают способность к модуляции поведения, в том числе, локомоции (Jordan et al., 2008; Courtine et al., 2009; Guertin, 2009). Однако возможности моноаминергических путей регулировать различные функциональные характеристики сложного поведения посредством конкретных рецепторов во многом остаются не исследованными. Такое функциональное картирование требует наличия четкого аналитического инструментария, а также подходящей экспериментальной модели для соотнесения активности нейронных рецепторов с конкретными свойствами двигательного паттерна. В этом отношении спинальные локомоторные цепи имеют ключевые

преимущества, поскольку при их активации генерируется сложное поведение с многомерными составляющими, которые можно оценивать с высокой точностью (Courtine et al., 2009). В частности, эпидуральная электрическая стимуляция дорсальной поверхности пояснично-крестцовых сегментов вызывает воспроизводимые локомоторные паттерны спинальных крыс, которые могут быть зарегистрированы *in vivo* на протяжении многих сеансов записи (Lavrov et al., 2008; Courtine et al., 2009).

Сказанное выше доказывает, что посредством фармакологических воздействий можно целенаправленно влиять на спинальные механизмы регуляции движений. Однако требуется проведение систематических исследований роли большинства подтипов моноаминовых рецепторов в контроле локомоторной и постуральной функций. Такие исследования, кроме фундаментального значения, могли бы быть полезными для разработки биосовместимых спинномозговых имплантатов для хронической электростимуляции и введения селективных фармакологических агентов (Musienko et al., 2009b).

Тренировка и нейропластичность двигательных сетей

Анатомические и нейрофизиологические исследования на животных (Hou et al., 2008) и человеке (Calancie et al., 2005; Dietz et al., 2009) позволяют предположить, что после ПСМ разорванные аксональные волокна дегенерируют, создавая свободные от синапсов области, которые частично занимаются прорастающими интраспинальными волокнами. Эти новые синаптические связи, вероятно, приводят к образованию аберрантных цепей, которые могут неправильно направлять нейронную информацию к несоответствующим двигательным сетям при выполнении движений (Fong, et al., 2009; Maegele et al., 2002).

Возможно ли использовать потенциал спинальных сетей в контроле двигательного поведения в условиях изоляции от головного мозга? Многие клинические работы подтверждают высокую эффективность использования

активной реабилитационной терапии на тредбане у пациентов с повреждениями спинного мозга (Dobkin et al., 1995; Dietz, Harkema, 2004; Hicks et al., 2005). Хронические опыты на кошках показали, что через несколько недель после полной поперечной перерезки спинного мозга в области каудальных грудных сегментов при специальной тренировке на тредбане животные могут ходить задними конечностями по движущейся ленте, в то время как передние конечности опираются на неподвижную платформу (Rossignol et al., 2000). Кинематический и миографический паттерн при этом был принципиально сходен с нормальным. Тем не менее, отсутствовал произвольный контроль движений и наблюдался явный дефицит постуральных коррекций, а также искажение в синхронизации работы сгибателей разных суставов. Последнее приводило к различной степени подволакивания стопы и иногда к прекращению ритмики (De Leon et al., 1999a). Обязательным условием восстановления адекватного локомоторного паттерна являлись интенсивные и регулярные тренировки ходьбы задних конечностей на движущемся тредбане с обучающе-принудительной постановкой стопы (Smith et al., 1982; Edgerton et al., 1983; Lovely et al., 1986; Barbeau, Rossignol, 1987; Rossignol et al., 2000). Без подобной тренировки спонтанного восстановления не происходило (De Leon et al., 1998a, 1998b). С помощью аналогичных тренировок по обучению стоянию можно также добиться определённой степени улучшения функции поддержки веса тела (Edgerton et al., 1991, 1997; Hodgson et al., 1994).

В современной литературе существуют некоторые данные о различных типах биохимических изменений, возникающих после спинализации, а также инициируемых процессом тренировки. Например, стрихнин, антагонист глицина, быстро восстанавливал способность к ходьбе кошек, у которых тренировали функцию стояния. Вместе с тем, то же самое не имело подобного эффекта на кошках, у которых тренировали функцию ходьбы (De Leon, 1999c). На этом основании авторы сделали вывод, что животные, у которых тренируется функция стояния, возможно, имеют высокий уровень

глицинергического ингибирования, который может быть уменьшен с помощью тренировки. Похожие результаты были получены Робинсоном и Голдбергером (Robinson, Goldberger, 1986), которые показали, что уровни глутаматдекарбоксилазы (GAD67) увеличиваются в дорсальном роге серого вещества спинного мозга и вокруг центрального канала через год после спинализации, подтверждая высокий уровень глицинергического ингибирования (Tillakaratne et al., 2000).

Следовательно, существует возможность обучения спинного мозга. Дополнительным подтверждением этого является «эволюция» локомоторных способностей спинализированного животного после прекращения тренировки (De Leon et al., 1999b). Локомоторные способности сохранялись больше 6 недель после прекращения, но затем начинали ухудшаться и значительно деградировали к 12 неделе. Возобновление тренировок в течении одной недели приводило к восстановлению до исходного уровня. Недавние работы свидетельствуют также о том, что, чем раньше начать тренировку животного после спинализации, тем скорость и качество восстановления локомоции будет выше. Известно, что норадренергические агонисты могут вызывать локомоцию спинальных животных в острый период после перерезки (Будакова, 1973; Grillner, 1969; Forssberg, Grillner, 1973). Россигнол и соавторы использовали этот подход при интенсивных ежедневных тренировках в первую неделю после спинализации в то время, когда кошки проявляли небольшую способность к спонтанной локомоции. С помощью таких тренировок после введения $\alpha 2$ -норадренергического агониста (клонидина), кошки могли ходить с плантарной постановкой стопы и поддержкой веса тела уже через неделю после спинализации (Rossignol et al., 1998; Chau et al., 1998a, 1998b).

Изложенные данные доказывают, что нейрональные сети спинного мозга учатся избирательно тем двигательным задачам, которые тренируются. На основе этого была сформулирована концепция «пластичности, зависящей от

активности» («activity-dependent plasticity»): сходно с тем, как повторяемая активация синапсов может изменить их свойства от миллисекунд до месяцев (Hebb, 1949), повторяемое воздействие на определенные сенсорные и моторные пути при специфических двигательных тренировках селективно улучшает работу этих нейрональных путей и в результате восстанавливает способности к выполнению тренируемых двигательных актов (Cai et al., 2006; Edgerton et al., 2008). Согласно этой концепции, существует нейрональная пластичность, зависящая от типа и качества тренируемой двигательной функции. Это подчеркивает ключевое значение сенсорной информации, которая определяет функциональную перестройку спинальных сетей во время тренировок, и необходимость оптимизации нейрореабилитационных программ, в которые будет заложено как воздействие на постуральный, так и локомоторный компоненты моторного контроля. До последнего времени, однако, отсутствовала методика, которая в полной мере объединяет тренировку обеих функций. Поэтому требуется дальнейшее исследование и развитие универсальных подходов для двигательной тренировки после заболеваний и травм нервной системы.

Таким образом, функциональная роль ствола и спинного мозга в локомоторном контроле и особенно в поддержании позы тела при стоянии и ходьбе во многом остается неясной. Не изученными являются механизмы взаимосвязи систем локомоторного и постурального контроля. На решение этих принципиальных вопросов и направлена настоящая работа. В последующих главах последовательно разбираются наши собственные исследования последних 10 лет, в которых изучались спинальные и стволовые механизмы регуляции локомоции, позы, и их сенсомоторная интеграция, а также новые экспериментальные подходы восстановления утраченных двигательных функций после повреждения спинного мозга и других нейромоторных заболеваний.

Глава 2.

ОБЩАЯ МЕТОДОЛОГИЯ

В данном разделе излагается общая методология проведенных опытов, описываются основные экспериментальные модели, методы стимуляции нервной системы, регистрации данных, нейроморфологические подходы и принципиальные алгоритмы анализа, которые использовались в работе. Дополнительные методики по отдельным направлениям исследований изложены в соответствующих экспериментальных главах.

ОСНОВНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ

Все процедуры проводились согласно Директивы Совета Европейского сообщества (от 24 ноября 1986 года, 86/609/ ЕЕС), при соблюдении «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденным приказом МЗ СССР №775 от 12.08.1977, в соответствии с законом «О защите животных от жестокого обращения» гл.IV, ст. 10, 4679/11 ГК от 01.12.1999 и протоколом, одобренным Комитетом по Содержанию Животных Института Физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Острые экспериментальные модели децеребрированных и спинализированных животных

Данные модели были использованы для проведения острых опытов на кошке и кролике. Децеребрация, проведенная на разных уровнях головного мозга, позволяет устранить влияние от переднего мозга и вышележащих центров ствола, для того чтобы исследовать свойства и возможности нейронального аппарата, находящегося ниже уровня перерезки. После проведения децеребрации не требуется наркотизация животного, что является важным достоинством модели и условием, разрешенным в соответствующих документах комиссий по работе с животными (Silverman et al. 2005).

Животному вводили пропофол (средняя доза 10 мг/кг внутривенно) для вводного наркоза, интубировали трахею, после чего следовало ингаляционное введение изофлюрана (1,5-2,5%) с кислородом. Уровень анестезии контролировался тестами на чувствительность лап при механическом давлении на кожу, а также путем проверки размеров и реакционной способности зрачков. Перед проведением децеребрации, у наркотизированного животного проводилась трахеостомия и перевязка сонных артерий. Далее череп фиксировался в стереотаксической установке, трепанировался, открывался доступ к четверохолмиям среднего мозга. В зависимости от задачи опытов, перерезка осуществлялась под разным углом по отношению к нейрональным структурам – анатомическим ориентирам на дорсальной и вентральной поверхности головного мозга: верхние (colliculus superior) и нижние холмы (colliculus inferior), зрительный тракт (tractus opticus), глазодвигательный нерв (n.oculomotorius), пирамиды и т.д. (Рис. 11).

Для проведения всех последующих процедур животное располагали в металлической раме (Рис. 1, 12, 57). Голова и позвоночный столб жестко фиксировались. Ламинэктомия выполнялась на нижнем поясничном уровне для последующего проведения эпидуральной стимуляции. Дополнительные ламинэктомии выполнялись на грудном или верхнем поясничном уровне. В отдельных экспериментах они использовались для поперечного рассечения спинного мозга (Th7-9;Th12) под местной анестезией (ксилокаин). В других опытах через ростральную ламинэктомию вводилась интратекальная канюля (силиконовая трубка длиной 200 мм, внешний диаметр = 0.7 мм, заполненная раствором Рингера) под твердую мозговую оболочку каудально до нижних поясничных сегментов. Затем канюля использовалась для введения медицинских препаратов.

Действие анестезии прекращалось после хирургических вмешательств, а эксперименты начинались через 2-3 ч после децеребрации. В ходе эксперимента непрерывно отслеживались показатели частоты дыхательных

движений, частоты сердечных сокращений, среднего артериального давления, электрокардиограммы, ректальной температуры, которая поддерживалась на уровне 37-38°C. Снятие показаний состояния децеребрированных животных начиналось при хирургических манипуляциях и продолжалось в течение всего опыта. Уровень децеребрации проверялся после опыта при диссекции ствола головного мозга.

*Хронические экспериментальные модели повреждения спинного и
головного мозга*

Для изучения двигательных способностей парализованных животных и возможностей различных подходов нейрореабилитации были использованы экспериментальные модели крыс нескольких линий для разных исследований (Sprague Dawley, Lewis) с повреждением головного мозга (ишемический инсульт) и спинного мозга различной степени выраженности и локализаций. Под общим наркозом и в стерильных условиях выполнялись полная перерезка спинного мозга на грудном уровне T7-T8, правосторонняя латеральная гемисекция на уровне шейного отдела (C7), две латеральные гемисекции, произведенные на противоположных сторонах и на разных спинальных уровнях (T7 и T10). Ишемическое поражение коры головного мозга было индуцировано путем введения сосудосуживающего препарата эндотелина-1 (ET-1, 0,3 мкг/мкл, Sigma-Aldrich) в 14 мест левой части двигательной коры головного мозга (области, отвечающие за передние и задние конечности). Вводили препарат объемом 500 нл на глубину 1,2 мм со скоростью 6 нл/с. После каждой инъекции иглу оставляли в месте введения на 3 минуты, после чего осторожно вынимали ее (Zorner et al., 2010). 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 эпидуральную стимуляцию с оптимальными для вызова шагания параметрами (частота стимуляции 3-5 Гц, длительность стимула 0,5 мс, сила тока 100-300 мкА) выполняли шариковым электродом (диаметр 0.5 мм), закрепленным на микроманипуляторе, который подводился к нужному сегменту дорсальной поверхности спинного мозга. В экспериментах с изучением ходьбы при незакрепленном тазе эпидуральный электрод подшивался к твердой мозговой оболочке необходимого спинального сегмента. Индифферентный электрод имплантировался в паравертебральные мышцы. Для стимуляции использовался стимулятор фирмы A-M Systems, модель 2100.

В хронических опытах на крысах под общим наркозом и в стерильных условиях выполнялась частичная ламинэктомия на уровне спинальных сегментов L2 и S1 (Рис. 31Б). Между позвонками и твердой мозговой оболочкой проводилась тонкая проволока из нержавеющей стали с тефлоновым покрытием (AS632; Cooner Wire). После удаления небольшого участка тефлонового покрытия (1 мм), обращенного к спинному мозгу, и обнажения проволоки из нержавеющей стали получались стимулирующие электроды, которые закреплялись по средней линии спинного мозга на уровне L2 и S1. Общий земляной кабель (из такой же проволоки, с удалением 1 см тефлона на дистальном конце) вводили подкожно в средней области спины. Проволоки от спинного мозга проводились под кожей и подключались к коннектору, прикрепленному к черепу крысы микровинтами. Правильное расположение эпидуральных электродов проверялось во время диссекции крыс после проведения экспериментов.

Стимуляция нейронных центров головного мозга

В острых опытах для вызова локомоции на кошках использовалась стимуляция мезенцефалической области (МЛО) (Рис. 1, 11). Для этого

биполярный электрод (две изолированных (за исключением кончиков) проволоки (150 мкм), с расстоянием 0,5 мм между ними) вводился в область ствола мозга (стереотаксические координаты Хорсли-Кларка P2, R/L4, H0) с помощью микроманипулятора (Рис. 1А). Стимуляция включалась через 2-3 с после начала движения ленты тредбана, использовались следующие параметры: частота 30 Гц, длительность импульса 0,5-1 мс, ток 50-200 мкА.

В острых опытах на кроликах также применялась стимуляция мезенцефалической локомоторной области, и вентральной области покрышки (ВОП). Стимулирующие электроды располагались на микроманипуляторе, с помощью которого подводились к определенным зонам ствола. Электрод ВОП вводился в ствол головного мозга по средней линии, на уровне верхнего двухолмия, под углом 75-80 ° по отношению к горизонтальной плоскости, на глубину 17-18 мм (стереотаксические координаты Хорсли-Кларка P12.5, R/L0, H11). Электрод МЛО был установлен вертикально, на расстоянии 3 мм латерально к средней линии, между верхним и нижним двухолмием, на глубине около 5 мм (стереотаксические координаты Хорсли-Кларка P12.5, R/L3, H3).

В конце эксперимента производились электролитические повреждения пропусканием короткого импульса тока 1 мА через стимулирующий электрод. Ствол мозга удалялся и помещался в 10% раствор формалина. После фиксации в формалине макроскопически определялся уровень децеребрации, и делались фронтальные замороженные срезы толщиной 40 мкм, которые окрашивались по Нисслю. Расположение кончика электрода определяли микроскопически, опираясь на стереотаксические атласы мозга кролика (Fifkova, Marsala, 1967; Sawyer et al., 1954).

В хронических опытах осуществлялась поверхностная стимуляция головного мозга (Рис. 56А). Для этого выполнялась локальная трепанация черепа, и имплантировался монополярный электрод эпидурально над левой двигательной корой.

МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ

Регистрация электромиографической активности

Биполярные электромиографические (ЭМГ) электроды (проволоки AS632; Cooner Wire, Chatsworth, CA, диаметром 0,2 мм с тефлоновым покрытием из нержавеющей стали) имплантировались билатерально в икроножную мышцу (*m.gastrocnemius lateralis*, Gast, разгибательная мышца лодыжки), латеральную широкую мышцу бедра (*m.vastus lateralis*, Vast, разгибатель колена), в дистальный отдел полусухожильной мышцы (*m.semitendinosus*, ST, сгибатель колена, разгибатель бедра), большеберцовую мышцу (*m.tibialis*, Tib, сгибательная мышца голени), приводящую мышцу бедра (*m.adductor femoris*, Add, разгибательная и приводящая мышца бедра), в среднюю ягодичную мышцу (*m.gluteus medius*, Glut, разгибательная и отводящая мышца бедра).

Регистрация силовых опорных реакций

Для регистрации силовых опорных реакций использовались сенсоры силовых нагрузок нескольких типов, которые располагались на опорной поверхности или под лентой тредбана. Таким образом, при касании лапы поверхности опоры или ленты тредбана появлялась возможность регистрировать контактные силы при стоянии и ходьбе. В острых экспериментах на децеребрированных животных регистрировались вертикальные силы тензодатчиками под левой и правой лапой (1002K, VISHAY) (Рис. 57). В хронических опытах на крысах регистрировались моменты и противодействующая сила реакции опоры в вертикальном, переднезаднем и медиолатеральном направлениях биомеханическим стабиллоанализатором (2 kHz; HE6X6; AMTI, США), расположенным под лентой тредбана или в середине треков (прямая и изогнутая дорожка) (Рис. 40). Для вычисления перемещения центра давления стопы использовался Vicon BodyBuilder (Vicon).

Регистрация кинематики движений

Одновременно с другими сигналами производили регистрацию кинематики движений животного. Для этого выполнялась видеорегистрация с использованием Vicon System (эксперименты на крысах), нескольких обычных камер (эксперименты на кошке) и/или механических датчиков (потенциометры и акселерометры) для регистрации перемещения сегментов тела при ходьбе и стоянии (Рис. 12 и Рис. 57, 62).

Трехмерные видеозаписи (200 Гц) делались системой захвата движений (Vicon, Оксфорд, Великобритания). 12 инфракрасных T10 камер использовались для отслеживания смещения светоотражающих маркеров, прикрепленных билатерально на лопатке, гребне подвздошной кости (таз), большом вертеле (бедро), наружном мыщелке (колени), латеральной лодыжке (голень), дистальном конце пятой плюсневой кости (плюсна), и на кончике лапы (пальцы) (Рисунок 31А). Nexus (Vicon, Оксфорд, Великобритания) использовался для получения 3-D координат маркеров. Тело было смоделировано как взаимосвязанная цепь жестких сегментов (рис. 31 А).

Механические сенсоры регистрировали отклонение лап в сагиттальной и фронтальной плоскостях, поясничного отдела в латеральном и вертикальном направлении, положения опорной поверхности при наклонах и горизонтальных перемещениях. Сигналы механических датчиков усиливались и оцифровывались с частотой дискретизации 1 кГц.

Видеозаписи анализировались кадр за кадром. С помощью вида сзади (Рис. 1А, Видео-1) и/или вида сбоку (Рис. 1В, Видео-2) легко определялось, была ли стопа на опорной поверхности (т.е. в фазе опоры своего шагового цикла) или была поднята (т.е. находилась в фазе переноса). В фазе опоры вертикальная координата стопы $Z = 0$ и траектория стопы могут быть полностью охарактеризованы двумя координатами, X и Y (Рис. 1В). Сетка координат, которая компенсировала искажения перспективы, применялась к

изображению области тредбана (Рис. 1В). С помощью этой сетки координаты стопы измерялись в последовательных кадрах.

*Регистрация мультиклеточной активности головного мозга с
применением TDT системы*

Для регистрации активности нейронов коры головного мозга в хронических экспериментах на крысах имплантировались микро-проводочные матрицы (TDT, NeuroNexus, 16 или 32 канала записи) стереотаксически в V слой области задней конечности левой двигательной коры (Рис. 56В-Д). Записи проводились через 5-7 дней после данной процедуры. Нейронные сигналы были получены (24,4 кГц) с рабочей нейрофизиологической станции (TDT), синхронизированной с кинематическими записями.

АНАЛИЗ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ДАННЫХ

В острых опытах на кошках и кроликах сигналы от ЭМГ электродов, силовых и потенциометрических датчиков усиливались, оцифровывались с частотой дискретизации 5 кГц (ЭМГ) и 1 кГц (датчики), а затем записывались на компьютерный диск с помощью программного обеспечения сбора и анализа данных (National Instrument, LabView, Power-1401/Spike-2, CambridgeElectronic Design, Кембридж, Великобритания). ЭМГ сигналы были выправлены и сглажены. Во время локомоции, вызванной стимуляцией спинного мозга, ЭМГ сигналы содержали сильные ответы на каждый стимулирующий импульс. Данные ответы исключались во время анализа с помощью специально написанной программы. ЭМГ сигналы усреднялись для каждого из 100 интервалов цикла шага, который был нормализован до 1.0 (в последовательности 5-20 шагов). Начало фазы переноса принималось за начало цикла.

В хронических экспериментах на крысах регистрировались минимум 10 циклов шага левой и правой задней конечности при конкретном условии. В общей сложности, для каждой конечности 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. Список параметров изображен в Таблице 1.

Параметры	#	Пояснения	Параметры	#	Пояснения
Кинематика			ЭМГ		
Углы суставов и осцилляции сегментов конечностей			Амплитуда		
дистальные	66	абдукция/аддукция стопы	дистальный	129	Интеграл MG ЭМГ пачки
вся конечность	65	медиолатеральные осцилляции всей конечности	дистальный	128	Средняя амплитуда MG ЭМГ пачки
дистально	64	угол плюснефаланг.сустава	проксимальный	127	Интеграл VL ЭМГ пачки
	63	угол голеностоп.сустава		126	Средняя амплитуда VL ЭМГ пачки
	62	угол коленного сустава	дистальный	125	Интеграл TA ЭМГ пачки
проксимально	61	угол тазобедр.сустава		124	Средняя амплитуда TA ЭМГ пачки
вся конечность	60	Осцилляции всей конечности	проксимальный	123	Интеграл ST ЭМГ пачки
дистально	59	Осцилляции пальцев		122	Средняя амплитуда ST ЭМГ пачки
	58	Осцилляции стопы	Длительность		
	57	Осцилляции всей конечности	дистальный	121	MG ЭМГ пачка
	56	Осцилляции бедра	проксимальный	120	VL ЭМГ пачка
проксимально	55	Осцилляции таза	дистальный	119	TA ЭМГ пачка
Аддукция	54	абдукция стопы	проксимальный	118	ST ЭМГ пачка
дистально	53	абдукция всей конечности	Временные характеристики (относительно длительности цикла шага, от контакта стопы до контакта стопы)		
вся конечность	52	угол плюснефаланг.сустава	дистальный	117	Относительный конец MG ЭМГ пачки
Экстензия	51	угол голеностоп.сустава	проксимальный	116	Относительный конец VL ЭМГ пачки
дистально	50	угол коленного сустава	дистальный	115	Относительный конец TA ЭМГ пачки
	49	угол тазобедр.сустава	проксимальный	114	Относительный конец ST ЭМГ пачки
Аддукция	48	абдукция стопы	дистальный	113	Относительное начало MG ЭМГ пачки
дистально	47	Аддукция всей конечности	проксимальный	112	Относительное начало VL ЭМГ пачки
вся конечность	46	угол плюснефаланг.сустава	дистальный	111	Относительное начало TA ЭМГ пачки
Флексия	45	угол голеностоп.сустава	проксимальный	110	Относительное начало ST ЭМГ пачки
дистально	44	угол коленного сустава	Кинетика		
	43	угол тазобедр.сустава		109	Уровень поддержки веса тела (ПВТ)
проксимально	42	Осцилляции всей конечности		108	Вертикальные силы
вся конечность	41	Осцилляции пальцев		107	Медиолатеральные силы
дистально	40	Осцилляции стопы	Кинематика		
Вперед	39	Осцилляции всей конечности	Координация		
	38	Осцилляции бедра	дистальный	106	Временное отставание между перед.полож.стопы и осцилляциями пальцев
	37	Осцилляции таза		105	Временное отставание между задним полож.стопы и осцилляциями пальцев
проксимально	36	Осцилляции всей конечности		104	Временное отставание между перед.полож.конечности и осцилляциями стопы
вся конечность	35	Осцилляции пальцев	Относительная связь	103	Временное отставание между перед.полож.конечности и осцилляциями стопы
дистально	34	Осцилляции стопы		102	Временное отставание между перед.полож.бедра и осцилляциями конечности
Назад	33	Осцилляции всей конечности		101	Временное отставание между задним полож.бедра и осцилляциями конечности
	32	Осцилляция бедра		100	Временное отставание между пред.полож.таза и осцилляциями бедра
проксимально	31	Осцилляции таза	проксимальный	99	Временное отставание между задним полож.таза и осцилляциями бедра
Стабильность			дистальный	98	Корреляции между осцилляциями голеностоп. и плюснефаланг.суставов
	30	Медиолат.ротации бедра		97	Корреляции между осцилляциями коленного и голеностопного суставов
	29	вариабельность в скорости сагитальных осцилляций туловища	проксимальный	96	Корреляции между осцилляциями тазобедр. и коленного суставов
Осцилляции туловища и таза	28	вариабельность сагитальных осцилляций туловища	дистальный	95	Корреляции между осцилляциями стопы и пальцев
	27	Амплитуда вертикальных осцилляций таза		94	Корреляции между осцилляциями конечности и стопы
	26	Минимальная вертикальная позиция таза		93	Корреляции между осцилляциями конечности и бедра
	25	Максимальная вертикальная позиция таза	проксимальный	92	Корреляции между осцилляциями таза и бедра
Площадь опоры	24	Ширина опоры	дистальный	91	Временная взаимосвязь между осцилляциями стопы и пальцев
	23	Позиция стопы в начале опоры по отношению к туловищу	Фурье (FFT) преобразование	90	Временная взаимосвязь между осцилляциями конечности и стопы
Траектория конечной точки конечности (плюснефаланг. сустава)				89	Временная взаимосвязь между осцилляциями конечности и бедра
	22	Относит. длительность подвоякивания лапы (%от цикла шага)	Анализ Глав. Комп.	88	Временная взаимосвязь между осцилляциями таза и бедра
	21	Подволакивание конечностей	Скорость	87	Уровень линейной взаимосвязи между осцилляциями сегментов конечн.
	20	Ориентации вектора скорости в начале переноса	дистальный	86	Угловая скорость плюснефаланг.сустава
	19	Скорость конечной точки стопы		85	Угловая скорость голоночного сустава
	18	Ускорение в начале переноса	Амплитуда	84	Угловая скорость коленного сустава
	17	Относительное время макс. Скорости во время переноса	проксимальный	83	Угловая скорость тазобедренного сустава
	16	максимальная скорость в переносную фазу	вся конечность	82	Скорость осцилляций всей конечности
	15	Высота шага	дистальный	81	Угловая скорость плюснефаланг.сустава
	14	Минимальное переднее положение		80	Угловая скорость голоночного сустава
	13	Максимальное заднее положение	Максимум	79	Угловая скорость коленного сустава
	12	Амплитуда в сагитальном направлении	проксимальный	78	Угловая скорость тазобедренного сустава
	11	Длина 3D перемещения конечности	вся конечность	77	Скорость осцилляций всей конечности
	10	Длина шага	дистальный	76	Угловая скорость плюснефаланг.сустава
	9	Макс расстояние между конечностями		75	Угловая скорость голоночного сустава
Временные свойства ходьбы			Минимум	74	Угловая скорость коленного сустава
	8	Длительность переноса	проксимальный	73	Угловая скорость тазобедренного сустава
	7	Относит.длительность опоры(%от цикла шага)	вся конечность	72	Скорость осцилляций всей конечности
	6	Длительность опоры	Сходство с кинематикой здорового животного		
	5	Длительность цикла шага	дистальный	71	Угол плюснефаланг.сустава
	4	Межконеч.координация(кросс-корреляция)		70	Угол голеностопного сустава
Вариабельность			Кросс-корреляция (значение r)	69	Угол коленного сустава
	3	Повторяемость траектории конечной точки конечности	проксимальный	68	Угол тазобедренного сустава
	2	Вариабельность суставных углов	вся конечность	67	Осцилляции всей конечности
	1	Временные свойства ходьбы			

Таблица 1. Список параметров кинематического, кинетического и электромиографического паттернов двигательной активности, которые использовались для последующего анализа.

Различные экспериментальные условия паттерны шагания существенно модулировались, что отражалось в модификации большей части вычисленных параметров. Чтобы оценить наиболее важные и воспроизводимые модуляции паттернов в разных условиях и при разных воздействиях, была использована многоступенчатая статистическая методика, основанная на анализе главных компонент (ГК). Такой аналитический подход более подробно описан в исследовании главы 4 Нейрофармакологические механизмы регуляции позы и локомоции. Этапы анализа, методы, типичные результаты суммированы на рисунке 31. Анализ ГК применялся для данных, полученных из всех отдельных циклов шагания для всех крыс одновременно.

Количественные характеристики (средние значения $\pm$ стандартная ошибка) вычисляли с помощью стандартных статистических программ. Коэффициенты корреляции Пирсона применялись для выявления связи между парами переменных. Повторные измерения ANOVA (дисперсионный анализ) и двусторонний критерий Стьюдента были использованы для проверки различий между нормально распределёнными данными (тест Колмогорова-Смирнова) при различных экспериментальных условиях. Непараметрические критерии (Уилкоксона и Крускала-Уоллиса) применялись при распределении отличном от нормального. Различия при $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$ обозначены на рисунках одной, двумя и тремя звездочками соответственно.

НЕЙРОМОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ИММУНОГИСТОХИМИЯ

Исследование нейрональных путей выполнялось путем введения ретроградного трейсера Fastblue (FB) (2% в 0,1 М фосфатного буфера и 2% диметилсульфоксида) билатерально в L1-L2 спинальные сегменты (Courtine et al., 2008). В общей сложности 1,2 мкл вводилось под давлением в более чем 6 мест (глубина 1,5 мм). Чтобы проследить аксональные проекции двигательной коры, вводился антероградный краситель биотинилированный

декстран амин (BDA) (10% в 0,01 М Натрий-фосфатном буфере, PBS) в левую двигательную кору в более чем 6 участков, охватывающих область задней конечности (координаты - 1 мм ростокаудально и - 1,75 мм медиолатерально от Брегмы, глубина 1,5 мм). Через 18 дней крыс перфузировали раствором Рингера, содержащим 100 000 МЕ/л гепарина и 0,25% NaNO₂, затем 4% параформальдегидом, pH 7,4 с содержанием 5% сахарозы. Для проведения cfos экспериментов, крысы перфузировались через 60 минут после 45 минутной сессии локомоторной активности (Courtine et al., 2009). Локомоция проводилась по прямой дорожке (прямому треку, Рис. 40, 49) для интактных и тренируемых на дорожке крыс, а также для тренируемых на тредбане и нетренируемых крыс, чтобы обеспечить стабильную ходьбу у всех животных. Передний мозг, ствол мозга, спинной мозг препарировали, оставляли в параформальдегиде на ночь, затем перекладывали в 30% сахарозу на фосфатном буфере. Через 4 дня ткань замораживали. Затем срезы толщиной 40 мкм были получены на криостате (Leica, CM 1950).

Для иммуногистохимических экспериментов срезы инкубировали в сыворотке, содержащей анти-cfos кролика (1:2000, Santa Cruz Biotechnologies, США), анти - GFAP (1:1000, Dako, USA), или анти - 5HT (1:5000, Sigma Aldrich, Германия), или мышинные анти-синаптофизин (1:1000, Millipore, США) антитела. Иммунореакции визуализировали с помощью вторичных антител, меченных Alexa fluor® 488 или 555. BDA-меченные волокна определяли стрептавидин-пероксидазой хрена (1:200) в 0,1 М PBS-Triton (1%). Усиление тирамидового сигнала Cyanine 3 использовалось при разведении 1:100 в течение 1 минуты.

Fastblue- и cfos- положительные нейроны подсчитывали с помощью программного обеспечения для анализа изображений на 5 равномерно распределенных кусочках, разделенных на 1,2 мм и центрированных на промежутке между T8 и T9. Плотность волокон измеряли в 5 конфокальных стеках изображений в каждой области во всех крысах, полученных при

стандартных настройках изображения и анализируемых специально написанными программами (Quiroga et al., 2004). Конфокальные изображения на выходе разделялись на квадратные области исследования (ОИ), и плотность вычислялась в пределах каждой ОИ как отношение количества исследуемых волокон (количество пикселей) к площади ОИ. Файлы были отфильтрованы по цвету и переведены в двоичную систему по порогу интенсивности. Пороговые значения устанавливались эмпирически и поддерживались в срезах, животных и группах. Сравнение компьютеризированного и ручного подсчета не показало различия между двумя методами. Ручной подсчет волокон проводился на срезах спинного мозга, наложенных по 5 вертикальным линиям. Волокна, пересекающие эти линии в пределах серого вещества, отмечались и суммировались. Ручной и компьютеризированный расчет выполнялся машинально. Получение изображения осуществлялось с использованием лазерного конфокального сканирующего микроскопа в LAS AF интерфейсе.

Глава 3.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ СТВОЛА И СПИННОГО МОЗГА В ПОСТУРАЛЬНОМ И ЛОКОМОТОРНОМ КОНТРОЛЕ

*С использованием классических экспериментальных моделей после удаления переднего мозга и полной спинальной перерезки изучались различные аспекты регуляции локомоторной и поструральной функций. На основе анализа двигательных способностей после повреждения или стимуляции тех или иных отделов центральной нервной системы делался вывод о их функциональной роли в контроле позы и локомоции.*¹

СПИНАЛЬНЫЕ И СТВОЛОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ КОНТРОЛЯ НАПРАВЛЕНИЯ ЛОКОМОТОРНОЙ АКТИВНОСТИ

Одной из важных задач локомоторной системы является управление направлением шагательных движений отдельных конечностей относительно передне-задней оси тела. Большинство двуногих и четвероногих животных, кроме хождения вперед, также способны пятиться назад и двигаться боком (Stein et al., 1986; Buford and Smith, 1990; Buford et al., 1990; Rossignol, 1996; Deliagina et al., 1997; Zelenin et al., 2011). Шаги в медиолатеральном направлении, отклоняющиеся от основного направления движения вперед, используются для коррекции нарушения равновесия при ходьбе (Karayannidou et al., 2009a; Musienko et al., 2012c). Шаги с латеральной составляющей также могут быть вызваны большими поструральными отклонениями при стоянии (Karayannidou et al., 2009a,b). Механизмы, контролирующие направление шагов, не изучены. *Цель данного исследования состоит* в оценке функциональной организации системы контроля направления шагания и роли различных уровней ЦНС. Для этого

¹ Работа проводилась совместно с лабораторией проф. Т.Делягиной Каролинского института, Стокгольм, Швеция.

мы сравнили локомоцию децеребрированных кошек, вызванную стимуляцией ствола мозга и стимуляцией спинного мозга (СМ).

Известно, что электрическая стимуляция мезэнцефалической локомоторной области (МЛО) вызывает локомоцию у децеребрированных кошек (Shik et al., 1966; Shik and Orlovsky, 1976; Jordan, 1986; Garcia-Rill and Skinner, 1987a,b). Такая стимуляция активирует локомоторные механизмы ствола мозга и СМ (Arshavsky et al., 1986). Локомоция у децеребрированных кошек также может быть вызвана стимуляцией дорсальной поверхности СМ (Iwahara et al., 1992; Musienko et al., 2007, 2012). Стимуляция СМ вызывает локомоцию у спинальных животных (Gerasimenko et al., 2003), активируя спинальные механизмы шагания (контроллеры конечностей; Orlovsky et al., 1999) через афференты задних корешков (Gerasimenko et al., 2005). Таким образом, можно предположить, что стимуляция СМ у децеребрированных кошек в основном активирует спинальные контроллеры конечностей, и в значительно меньшей степени воздействует на супраспинальные механизмы.

В настоящем исследовании сравнивалась локомоция по ленте тредбана, движущейся в разных направлениях, при стимуляции МЛО и СМ. Было обнаружено, что стимуляция СМ вызывает хорошо скоординированные шагательные движения, противоположные движению ленты тредбана. Стимуляция МЛО, напротив, вызвала скоординированные шагательные движения, только когда лента тредбана двигалась назад. Эти данные позволяют предположить, что стимуляция СМ активирует контроллеры конечности, и они генерируют шагательные движения в различных направлениях на основе сенсорных входящих сигналов, поступающих от конечности в опорную фазу локомоторного цикла. МЛО, напротив, активирует одну из множества форм работы спинальных контроллеров конечностей, а именно, ходьбу вперед.

Методы

Эксперименты были проведены на 9 взрослых кошках (вес 2,2 – 4 кг). Последовательность хирургических процедур, контроль состояния животных, обработка регистрируемых сигналов и анализ данных описаны в главе 2 Общая методология.

Схема эксперимента

Схема эксперимента представлена на Рисунке 1. Голова децеребрированного животного, позвоночный столб и таз были жестко зафиксированы в стереотаксической установке (рис. 1А), чтобы обеспечить прямую конфигурацию туловища, которая аналогична конфигурации интактных кошек при ходьбе вперед, но отличается от конфигурации при ходьбе назад (Buford et al., 1990). Однако для стандартизации условий сравнения, обеспечивалась одинаковая «позная конфигурация» для всех локомоторных тестов. Под передними конечностями не было поддерживающей опоры. Во время вызванной локомоции задних конечностей, передние конечности обычно не двигались ритмически, или производили слабые шагательные движения в воздухе. Задние конечности были расположены на тредбане с двумя отдельными лентами (левой и правой), движущимися с одинаковой скоростью (0.5 м/с), далее они именуются «лентой тредбана». Ленты тредбана могли быть ориентированы под разными углами (α) по отношению к продольной оси тела; были использованы шесть значений α : 0° , 45°П , 45°Л , 90°П , 90°Л и 180° . Для каждой ориентации вектор скорости тредбана обозначен стрелкой на рисунке 1. Кроме того, проверялись способности кошки выполнять шагание на месте при остановке тредбана, а также в воздухе (при отсутствии поддержки под задними конечностями).

Локомоция вызывалась стимуляцией МЛО, либо СМ (Рис. 1А). Стимуляция начиналась через 2-3 с после начала движения ленты тредбана. Использовались параметры, которые были оптимальными в предыдущих исследованиях (Shik et al., 1966; Musienko et al., 2007,2012). Для каждого

локомоторного теста вид сзади и вид сбоку при ходьбе кошки записывались двумя видеокамерами (25 кадров в секунду), которые были синхронизированы с ЭМГ записями. Кроме того, в тестах с ходьбой вперед и назад записывались переднезадние движения конечности (с помощью двух механических сенсоров, один из которых для правой лапы (П-Лапа) показан на Рис. 1А), а также вертикальные силы, развиваемые каждой конечностью (с помощью двух силовых платформ, расположенных под левой и правой движущимися лентами (силовая платформа, СП, на Рис. 1А).

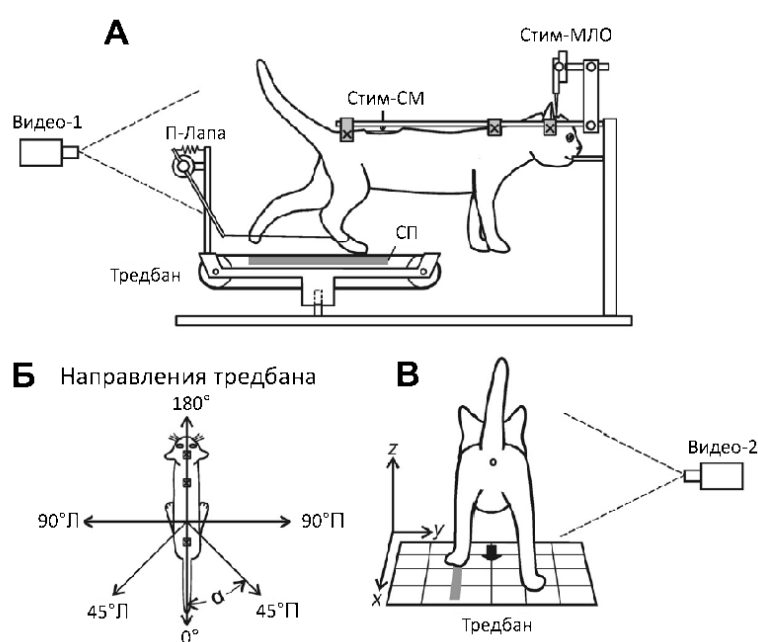


Рис. 1. Схема эксперимента и установки

Если не было смещения стопы по отношению к движущейся ленте, траектория стопы в опору была прямой линией, параллельной вектору скорости (Рис. 1В, толстая серая линия), с равными расстояниями между точками. Такие результаты рассматривались как свидетельство адаптации шагания к движению ленты тредбана. Если же случалось смещение стопы при опоре, траектория стопы отклонялась от вектора скорости ленты тредбана, указывая на то, что шаг не был адаптирован к движению ленты тредбана. Чтобы вычислить количественно отклонение траектории стопы от вектора скорости, для каждого шага мы определяли «аппроксимированную траекторию опоры» (линия, соединяющая начальное

и конечное положение стопы в опорную фазу локомоторного цикла), а затем вычисляли угол между этой линией и вектором скорости (*О-С угол*). В фазе переноса стопа была поднята над поверхностью, но ее вертикальная координата *Z* не могла быть точно измерена нашими методами. Таким образом, траекторию стопы во время переноса можно было охарактеризовать только ориентировочно в *X/Y* координатах.

Результаты

Угол ленты тредбана 0°

Стимуляция МЛО и СМ.

Ходьба вперед (угол ленты тредбана $\alpha = 0^\circ$, Рис. 1Б), вызванная стимуляцией МЛО, показана на Рисунке 2А, а вызванная стимуляцией СМ на Рисунке 2Б. Два локомоторных паттерна были схожи. В обоих случаях шагательные движения конечности были довольно однородны, длительность цикла шага составляла 0,7-0,8 с, пиковая контактная сила $\sim 0,7$ кг, одинаковая длина шага. Шагание правой и левой конечностью проходило антифазно.

ЭМГ паттерны были также похожи в обоих тестах: мышцы с функцией разгибания (Gast, Add, Glut) активировались в фазе опоры конечностей, а сгибательная мышца (Tib) была активна в фазе переноса. ЭМГ сигналы при локомоции, вызванной стимуляцией СМ, содержали сильные коротколатентные ответы на стимулирующие импульсы, возникающие при частоте 5 Гц (Рис. 2Б; Рис. 8Б,Г,Е, 9Г). Рисунок 7 (0°) показывает среднее ЭМГ при вызванной стимуляцией МЛО (А) и при вызванной стимуляцией СМ (Б) ходьбе вперед. Можно заметить, что ЭМГ паттерны в основном одинаковы.

Рисунок 3А показывает траекторию правой стопы в *X/Y* координатах (Рис. 1В) во время цикла одного шага ходьбы вперед, вызванной стимуляцией МЛО. В фазе опоры (черные заполненные кружочки 1-11) стопа двигалась из крайней передней позиции в крайнюю заднюю позицию по прямой

траектории, параллельно вектору скорости (большая черная стрелка) и оси тела (толстая серая линия), на скорости, равной скорости движения ленты тредбана. В фазе переноса стопа быстро возвращалась в крайнюю переднюю позицию (белые кружочки, 12-28).

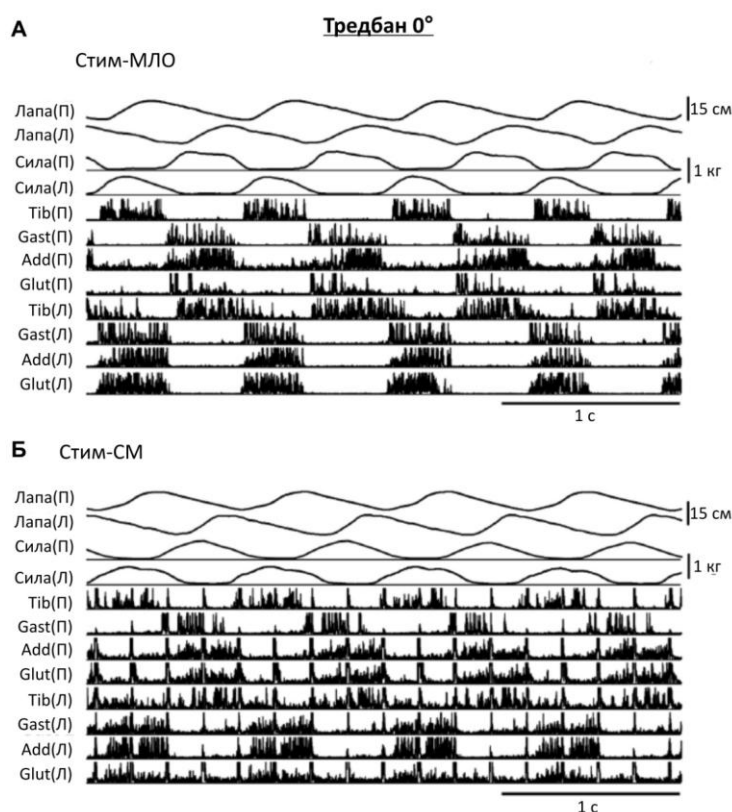


Рис. 2. Кинематический, ЭМГ паттерн и силовые ответы во время локомоции, вызванной стимуляцией мезенцефалической локомоторной области (А) и спинного мозга (Б), при угле ленты тредбана $\alpha=0^\circ$

Чтобы оценить изменчивость шагательных движений конечности в последовательных шагах, мы усреднили траекторию опоры при помощи прямой линии, соединяющей начальное и финальное положение опоры. Рисунок 3Б показывает усредненную траекторию опоры для 10 последовательных шагов правой конечности; ортогональные полосы показывают удвоенное среднее отклонение значений для X и Y координат, в начальном и конечном положении опоры. В каждой траектории Y значение этих двух позиций было одним и тем же, что указывает на параллельность этой траектории вектору скорости и оси тела. Среднее значение угла O-C

Параллельное расположение траектории опоры и вектора скорости при ходьбе вперед, вызванной стимуляцией МЛО и СМ, позволяет предположить, что стопа касалась одного и того же места на движущейся ленте тредбана все время в фазе опоры. По этой причине можно рассматривать ходьбу вперед, как форму локомоции, хорошо адаптированную к движению ленты тредбана.

Угол ленты тредбана 90°

Стимуляция МЛО

Локомоция, вызванная стимуляцией МЛО, по ленте тредбана, двигающейся вбок, имела некоторые характеристики, схожие с характеристиками ходьбы вперед: продолжительность цикла шага 0,7-0,9 с и шаги противоположных конечностей чередовались. Длина шага ведущей (выполняющей шаг в сторону) конечности была немного больше, чем задней (или ведомой, выполняющей шаг внутрь) конечности ($17,9 \pm 3,0$ см против $16,1 \pm 3,1$ см соответственно). Наблюдалась большая изменчивость направления шага и амплитуды. Конечности часто сталкивались друг с другом, вызывая дополнительные искажения в шагании.

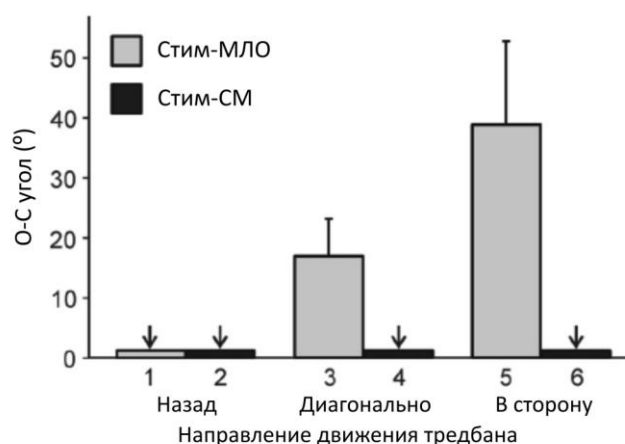


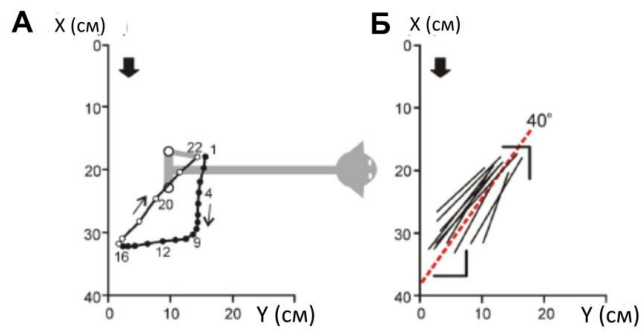
Рис. 4 Усредненное значение угла О-С во время локомоции, вызванной стимуляцией мезенцефалической локомоторной области и спинного мозга, при разных направлениях движения ленты тредбана

На Рисунке 5А показана траектория левой стопы во время цикла одного шага ходьбы по ленте тредбана, при $\alpha = 90^\circ R$. В фазе опоры стопа двигалась

от начального положения опоры (точка 1) вправо со скоростью движения ленты тредбана (точки 1-5), позволяя предположить, что такое движение было вызвано движением ленты тредбана. Стопа замедлялась (точки 5-8), а затем начала двигаться назад, несмотря на движение ленты тредбана вправо (точки 8-16). Предполагается, что это движение было вызвано активным сокращением мышц конечности. После достижения конечного положения опоры (точка 16), начиналась фаза переноса, и стопа быстро возвращалась в свое начальное положение (точка 22). Форма траектории опоры в различных циклах значительно изменялась, от двухсекционной формы (одна секция параллельна вектору скорости тредбана, а вторая параллельна оси туловища, обе показаны на Рис. 5А) до односекционной формы траектории, расположенной между осью тела и вектором скорости тредбана (показано на Рис. 6А). На Рисунке 5Б показаны усредненные траектории опоры (см. Методы) для 10 последовательных шагов левой конечности; ортогональные полосы показывают удвоенное среднее отклонение значений для X и Y координат в начальном и конечном положении опоры. Видна большая изменчивость этих траекторий. Все траектории были значительно наклонены по отношению к вектору скорости. Средний О-С угол траектории опоры составлял $40 \pm 15^\circ$ (красная прерывистая линия) $39 \pm 14^\circ$ (Рис. 4, столбец 5; Таблица 2, столбец 90°). Этот факт позволяет предположить, что во время фазы опоры стопы касались различных мест на движущейся ленте тредбана, то есть конечности скользили на опорной поверхности, поскольку направление активного движения ног отличалось от движения опорной поверхности. По этой причине мы считаем ходьбу, вызванную стимуляцией МЛО, формой локомоции, мало адаптированной к боковому движению ленты тредбана (Таблица 2, столбец 90°). Вполне вероятно, что контроллеры конечности скорее генерировали двигательные паттерны ходьбы вперед, нежели паттерны боковой ходьбы, что и вызвало колоссальное искажение шагательных движения (см. Обсуждение).

Тредбан 90°

Стим-МЛО



Стим-СМ

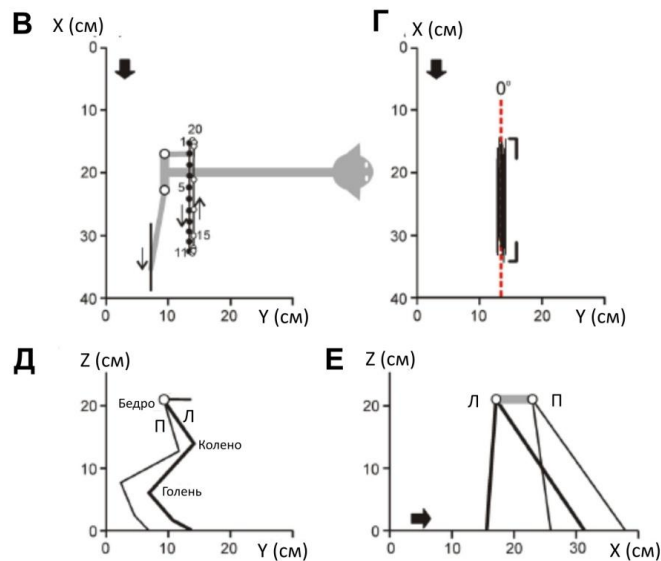


Рис. 5. Локомоция, вызванная стимуляцией мезенцефалической локомоторной области и спинного мозга, при угле ленты тредбана $\alpha=90^\circ$. (А, В) Последовательные позиции левой конечности в фазу опоры локомоторного цикла (40 мс интервал между точками). (Б, Г) Усредненные траектории опоры для 10 последовательных шагов левой конечности и значение угла О-С между линией усредненной опоры и вектором скорости. (Д) Положение ведущей (левой) и задней (правой) конечностей в середине опоры в координатах Y и Z. (Е) Крайние положения левой и правой конечностей в фазе опоры в координатах X и Y.

Стимуляция СМ

Ходьба, вызванная стимуляцией СМ, по ленте тредбана, движущейся вбок, имела некоторые характеристики, похожие на характеристики ходьбы, вызванной стимуляцией МЛО: продолжительность цикла шага была 0,7-0,8

с, шаги противоположных конечностей чередовались, движения конечностей были ассиметричны, с более длинными шагами ведущей конечности (14.0 ± 1.4 см) и короткими задней (10.2 ± 0.8 см). Кроме того, конечности могли сталкиваться. Тем не менее, локомоторные движения конечностей при стимуляции СМ были гораздо более последовательными, чем при стимуляции МЛО.

На Рисунке 5В показана траектория левой стопы в цикле одного шага локомоции, вызванной стимуляцией СМ, при движении ленты тредбана вправо. В фазе опоры (точки 1-11) стопа двигалась вправо из начального положения опоры (точка 1) к конечному положению опоры (точка 11) по прямой траектории, параллельно вектору скорости и перпендикулярно оси тела со скоростью, равной скорости движения ленты. В фазе переноса стопа быстро возвращалась в крайнее переднее положение (точки 12-20). Кроме того, на Рисунке 5В показана усредненная траектория опоры правой стопы, которая была также параллельна вектору скорости. Важно отметить, что между траекториями опоры правой и левой стопы было некоторое расстояние (~ 7 см). Из-за этого расстояния левая конечность выполняла латеральные шаги в более ростральном положении, чем правая (рис. 5Д), что позволило конечностям уменьшить столкновения друг с другом.

Стимуляция	Направление тредбана			
	0°	45°	90°	180°
МЛО	100% (4/4)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/4)
СМ	100% (7/7)	100% (4/4)	100% (4/4)	57% (4/7)

Табл. 2. Пропорции животных с ходьбой, адаптированной к разным направлениям движения тредбана, при стимуляции МЛО и СМ. Кошка рассматривалась адаптированной к определенному направлению тредбана, если среднее значение О-С угла было меньше 5°.

На Рисунке 5Е показаны крайние положения ведущей (левой) и задней (правой) конечностей в фазе опоры (в координатах X и Y). Заметна значительная асимметрия в шагательных движениях двух конечностей.

На Рисунке 5Г показана усредненная траектория опоры левой стопы, полученная во время ходьбы, вызванной стимуляцией СМ, по движущейся вправо ленте тредбана. Изменчивость траекторий значительно меньше, чем при стимуляции МЛО (Рис. 5Б). Все траектории опоры были параллельны вектору скорости; среднее значение угла О-С у кошки 4 составляло 0° (красная прерывистая линия). Подобные результаты были получены у всех испытуемых кошек (Рис. 5, столбец 6; Таблица 2, столбец 90°). По этой причине можно заключить, что локомоция, вызванная стимуляцией СМ, хорошо адаптирована к движению ленты тредбана вбок, может называться боковой ходьбой. Поразительная разница между МЛО и СМ ходьбой также проявляется в различных ЭМГ паттернах (см. ниже).

Угол ленты тредбана 45°

Стимуляция МЛО

Большинство характеристик вызванной стимуляцией МЛО ходьбы на тредбане при $\alpha = 45^\circ$ были подобны полученным при $\alpha = 90^\circ$: продолжительность цикла шага составляла 0,7-0,8 с, шаги противоположных конечностей чередовались, и движения конечности были симметричны (амплитуда шага ведущей конечности составляла 17.0 ± 3.1 см против 16.8 ± 1.93 см задней конечности). Наблюдалась большая изменчивость направления шага и амплитуды. Конечности часто сталкивались друг с другом, вызывая дополнительные искажения в шагании.

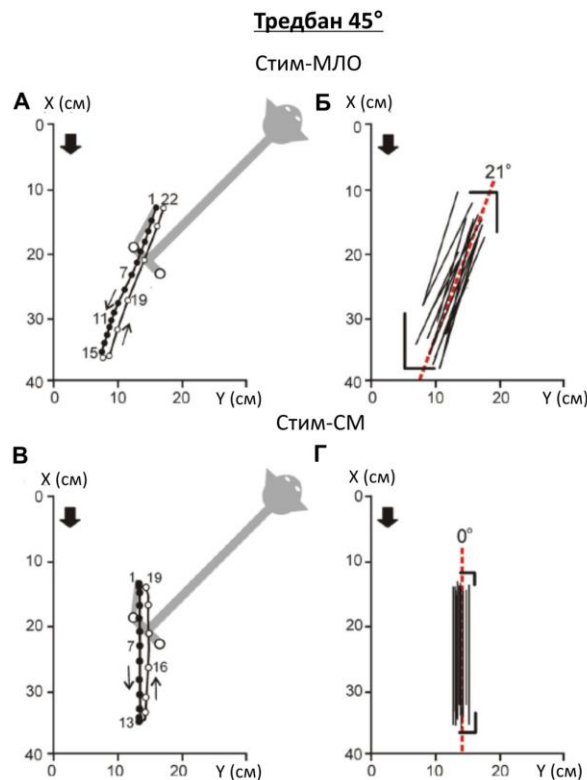


Рис. 6. Локомоция, вызванная стимуляцией мезенцефалической локомоторной области и спинного мозга при угле ленты тредбана $\alpha=45^\circ$. (А, В) Последовательные позиции левой конечности в фазу опоры локомоторного цикла (40 мс интервал между точками). (Б, Г) Усредненные траектории опоры для 10 последовательных шагов левой конечности и значение угла $O-C$ между линией усредненной опоры и вектором скорости.

На Рисунке 6А показан пример траектории левой стопы в цикле одного шага (угол тредбана $\alpha = 45^\circ$). В фазе опоры стопа двигалась из крайнего переднего положения (точка 1) в крайнее заднее положение (точка 15) по почти прямолинейной траектории. Угол этой траектории относительно оси тела составлял 24° . Движение стопы вдоль траектории было неравномерным, с повышенной скоростью в середине фазы опоры. В фазе переноса стопа перемещалась из крайнего заднего положения (точка 15) в крайнее переднее (точка 22), которое было близко к стартовому положению (точка 1).

Форма траектории опоры при $\alpha=45^\circ$ была также изменчивой, как и при $\alpha=90^\circ$. На Рисунке 6Б показаны усредненные траектории опоры 10

последовательных шагов левой конечности. Видна сильная изменчивость траекторий. Но все отдельные траектории были наклонены относительно вектора скорости. Средний угол траектории опоры относительно этого вектора составлял $17 \pm 6^\circ$ (красная прерывистая линия). Аналогичные результаты были получены у всех исследованных кошек (Рис. 4, столбец 3, Таблица 2, столбец 45°). Эти данные показывают, что в фазе опоры стопа скользила по опорной поверхности. По этой причине можно заключить, что ходьба, вызванная стимуляцией МЛО, слабо адаптирована к движению тредбана (Таблица 2, столбец 45°).

Стимуляция СМ

Ходьба, вызванная стимуляцией СМ, по тредбану при $\alpha = 45^\circ$, в некоторых аспектах была подобна ходьбе, вызванной стимуляцией МЛО: продолжительность цикла шага составляла 0,7-0,8 с, шаги противоположных конечностей чередовались, и движения конечности были асимметричными, с более длинными шагами ведущей конечности (15.5 ± 1.0 см) и более короткими задней (10.7 ± 0.9 см). Наблюдалась большая изменчивость направления шага и амплитуды. Также конечности могли сталкиваться друг с другом. Однако двигательные паттерны были гораздо более однородны при стимуляции СМ, чем при стимуляции МЛО, как было показано для боковой ходьбы, вызванной стимуляцией СМ (см. выше).

На Рисунке 6, В и Г показана траектория левой стопы одного из шагов (В) и 10 усредненных траекторий (Г) (угол тредбана $\alpha=45^\circ$ R). Изменчивость траекторий была гораздо меньшей, чем при стимуляции МЛО (Рис. 6Б). Все траектории опоры были параллельны вектору скорости; средний угол траектории опоры составлял 0° (красная прерывистая линия). Похожие результаты были получены у всех испытуемых кошек (Рис. 4, столбец 4; Таблица 2, столбец 45°)

Таким образом, также как и при 90° , можно заключить, что локомоция, вызванная стимуляцией СМ, хорошо адаптирована к движению ленты тредбана на 45° , и может называться диагональной ходьбой. Поразительная

разница между МЛО и СМ ходьбой также проявлялась в различных ЭМГ паттернах (см. ниже).

*Сравнение ЭМГ паттернов локомоции, вызванной МЛО и СМ
стимуляцией, при углах тредбана в 0, 45 и 90°*

На Рисунке 7 показана усредненная активность в четырех мышцах правой конечности в зависимости от фазы шага. Записи проводились в пяти тестах с различным направлением ленты тредбана. Локомоция была вызвана стимуляцией МЛО (А) и стимуляцией СМ (Б). Структуры локомоторного цикла при ходьбе вперед (угол тредбана 0°), вызванной стимуляцией МЛО и СМ, были похожи: перенос прекращался в фазе 0,35-0,38. Как при ходьбе, вызванной стимуляцией МЛО, так и при ходьбе, вызванной стимуляцией СМ, при углах тредбана 45 и 90° структура цикла

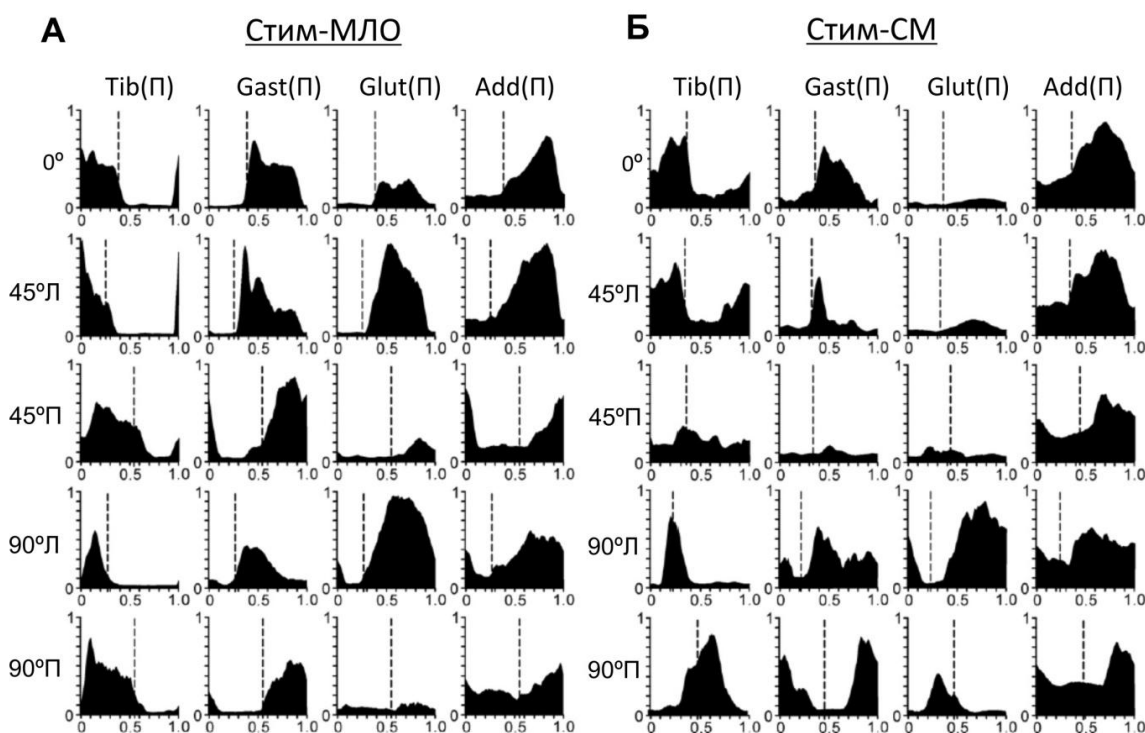


*Рис. 7 Усредненные паттерны ЭМГ активности задних конечностей при
разных значениях угла (α) ленты тредбана*

ведущей и задней конечности отличались. Перенос был длиннее (до 0,54) в задней конечности (Рис. 7А,Б 45°П, 90°П) и короче (до 0,25) в ведущей конечности (Рис. 7А,Б, 45°Л, 90°Л). Эти изменения в структуре цикла

наиболее вероятно были вызваны столкновениями конечностей. Подобные результаты были получены у всех восьми тестируемых кошек.

Стимуляция МЛО

Из Рисунка 7А видно, что фаза активности отдельных мышц в цикле шага лишь слабо зависела от направления движения тредбана: ЭМГ пачки Tib-R были привязаны к фазе переноса правой конечности, тогда как ЭМГ пачки Gast-П, Glut-П и Add-П в основном ограничивались фазой опоры. Напротив, амплитуда ЭМГ активности зависела от направления тредбана, особенно в Glut-П, в которой активность была значительно больше в ведущей конечности ($\alpha = 45^\circ\text{Л}$ и 90°Л), чем в задней конечности ($\alpha = 45^\circ\text{П}$ и 90°П). Подобная, но более слабая зависимость наблюдалась и в Add-П. Сходные ЭМГ паттерны наблюдались у всех кошек.

Стимуляция СМ

Рисунок 7Б показывает усредненную ЭМГ активность при локомоции, вызванной стимуляцией СМ. ЭМГ сигналы при ходьбе вперед ($\alpha = 0^\circ$) были в основном похожи на те, которые обнаруживались при локомоции, вызванной стимуляцией МЛО (Рис. 7А): ЭМГ пачки Tib-П были привязаны к фазе переноса правой конечности, тогда как ЭМГ пачки Gast-П, Glut-П и Add-П в основном ограничивались фазой опоры. Однако ЭМГ сигналы при ходьбе в других направлениях значительно отличались. Основное отличие заключалось в том, что активность мышц при ходьбе, вызванной стимуляцией СМ, была гораздо менее ограничена определенной фазой цикла шага. Например, Tib-П была активна в основном при переносе правой конечности при $\alpha = 0^\circ$ и 45°Л , в конце переноса и начале опоры при $\alpha = 90^\circ\text{Л}$, а также в конце переноса и в опору при $\alpha = 45^\circ\text{П}$, 90°П . Аналогично, Gast-П имела пиковую активность в начале переноса при $\alpha = 0^\circ$, 45°Л , 45°П , и 90°Л , и в поздней опоре и раннем переносе при $\alpha = 90^\circ\text{П}$. Glut-П была активна в опоре при $\alpha = 0^\circ$, 45°Л , и 90°Л , и переносе при $\alpha = 45^\circ\text{П}$ и 90°П .

Можно также увидеть, что направление тредбана влияло на ЭМГ амплитуду (например, в Glut-П, Gast-П).

Подводя итог, необходимо отметить, что при локомоции, вызванной стимуляцией МЛО, ЭМГ паттерны при ходьбе во всех направлениях были в основном аналогичны паттернам при ходьбе вперед. При диагональном и боковом движении ленты тредбана эти ЭМГ паттерны приводили к движениям конечностей, которые не соответствовали направлению ленты тредбана. Напротив, при локомоции, вызванной стимуляцией СМ, движения конечностей соответствовали направлению движения ленты тредбана.

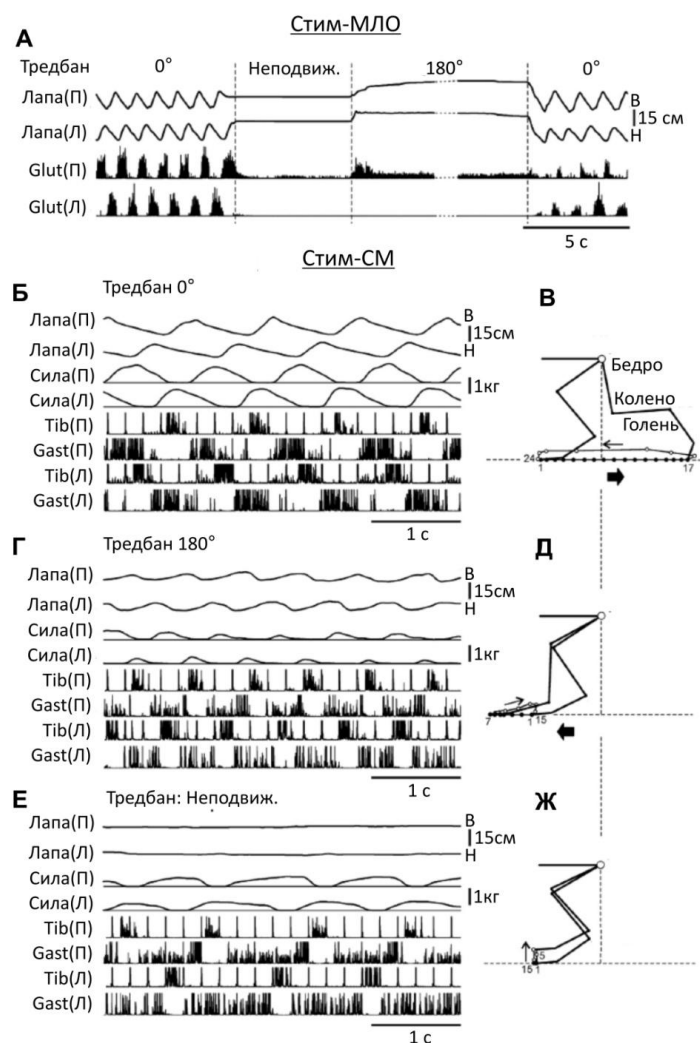


Рис. 8. Локомоторные эффекты при стимуляции мезенцефалической локомоторной области и спинного мозга в различных условиях опоры. Право(П), лево (Л), вперед (В), назад (Н).

Шагание назад, на месте и в воздухе

На Рисунке 8А показан пример эффектов стимуляции МЛО в различных условиях опоры. Изначально лента тредбана двигалась назад ($\alpha = 0^\circ$), кошка шла вперед. Затем лента тредбана остановилась, шагательные движения прекратились. После этого лента тредбана стала двигаться вперед ($\alpha = 180^\circ$), шагательные движения отсутствовали. Наконец, лента тредбана двигалась назад ($\alpha = 0^\circ$), и ходьба вперед возобновлялась. При стимуляции МЛО у всех четырех тестируемых кошек ходьбы назад (при $\alpha = 180^\circ$) не наблюдалось, так же как и шагания на месте.

Рисунок 8Б-Ж показывает эффекты стимуляции СМ в различных условиях опоры. Как и стимуляция МЛО (Рис. 8А), стимуляция СМ вызывала ходьбу вперед ($\alpha = 0^\circ$; Рис. 8Б, В). Но, в отличие от стимуляции МЛО, стимуляция СМ вызывала ходьбу назад ($\alpha = 180^\circ$; Рис. 8Г,Д). Шагательные движения конечностей были достаточно равномерны, с продолжительностью цикла шага 0,6 – 0,7 с, длиной шага 7 -11 см, т.е., гораздо короче, чем при движении вперед. Пиковая контактная сила (0,3 – 0,5 кг) также была меньше, чем при ходьбе вперед. Правая и левая конечности шагали в противофазе. Эти характеристики локомоторных паттернов движения назад похожи на описанные ранее для интактных (Buford and Smith, 1990; Buford et al., 1990; Zelenin et al., 2011) и децеребрированных кошек (Musienko et al., 2007).

На Рисунке 8Д показан вид сбоку траектории левой стопы во время одного цикла шага ходьбы назад. В фазе опоры (черные заполненные кружки, 1-7) стопа передвигалась из крайнего заднего положения в крайнее переднее положение. В фазе переноса стопа быстро возвращалась в крайнее заднее положение (белые кружки, 7-15). Можно заметить, что локомоторные движения конечностей выполнялись в гораздо более ретроградном положении по отношению к телу, по сравнению с движениями при ходьбе вперед (Рис. 8В, Д). Траектории опоры оказались параллельны вектору скорости ленты тредбана и оси тела (данные не показаны). Это

позволяет предположить, что ходьба назад хорошо адаптирована к движению ленты тредбана. Ходьба назад наблюдалась у четырех из семи испытуемых животных (Таблица 2, столбец 180°).

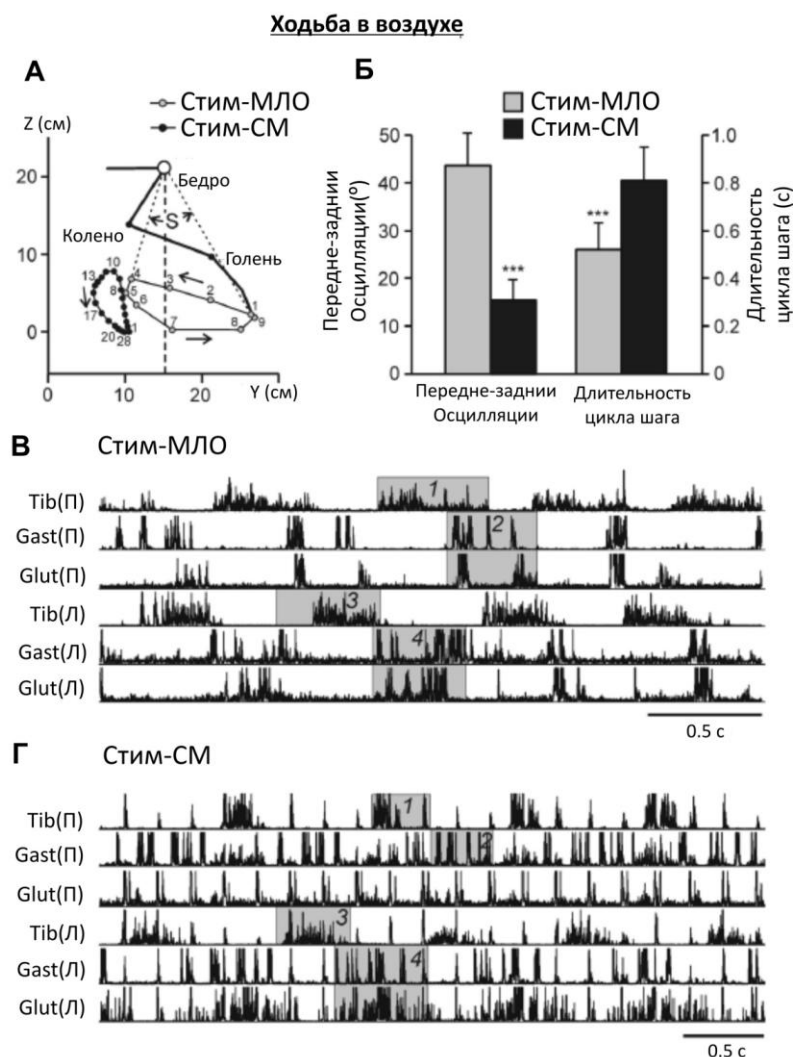


Рис. 9. Локомоторные эффекты при стимуляции мезенцефалической локомоторной области и спинного мозга в воздухе

Если лента тредбана не двигалась, то стимуляция СМ вызывала «шагание на месте» (Рис. 8 Е,Ж), имеющее следующие характеристики: (1) попеременная ЭМГ активность правой и левой конечностей (период ~ 1 с), (2) реципрокные сгибательные и разгибательные пачки в каждой конечности, (3) вертикальные колебания стопы, вызывающие силовые опорные реакции, и (4) отсутствие горизонтального смещения стопы во время цикла движения (Рис. 8Ж). Шагание на месте наблюдалось у четырех из шести испытуемых кошек. У двух кошек наблюдалось шагание на месте

только одной конечностью. У всех четырех кошек характеристики шагания на месте были сходны.

Если тредбан, поддерживающий конечности убирали, то как стимуляция МЛО, так и стимуляция СМ могли вызывать «шагание в воздухе», но характеристики движений конечности при этих условиях сильно различались. На Рисунке 9А показан один цикл шагания в воздухе у одной кошки при стимуляции МЛО и СМ. Можно заметить, что амплитуда отклонений конечности (угол между крайним передним и крайним задним положением, S) была гораздо больше при стимуляции МЛО, чем при стимуляции СМ, тогда как продолжительность шагательного цикла при стимуляции МЛО была короче. Усреднив по всем кошкам, демонстрирующим шагание в воздухе, мы увидели, что эти значения сильно различаются: амплитуда отклонений составляла $44 \pm 15^\circ$ против $16 \pm 5^\circ$, продолжительность цикла составляла 0.51 ± 0.11 с против 0.81 ± 0.22 с (Рис. 9Б). ЭМГ паттерны шагания в воздухе при этих двух условиях тоже различались. Чередование сгибательных и разгибательных всплесков активности в каждой конечности было четче при стимуляции МЛО, чем при стимуляции СМ (Рис. 9, В и Г). При стимуляции СМ иногда наблюдались синфазные всплески в антагонистических мышцах. Шагание в воздухе было вызвано стимуляцией МЛО у трех из четырех испытуемых кошек, а стимуляцией СМ у трех из шести кошек.

Обсуждение

В настоящем исследовании сравнивалась локомоция у децеребрированных кошек, вызванная стимуляцией МЛО и СМ. Стимуляция МЛО действует на стволовые локомоторные сети, которые через нисходящие проводящие пути активируют и модулируют отдельные спинальные контроллеры (Arshavsky et al., 1986; Orlovsky et al., 1999). Напротив, стимуляция спинного мозга может сразу активировать контроллеры конечностей (как продемонстрировано на спинальных животных; Barthelemy et al., 2007; Courtine et al., 2009). Однако нельзя

исключать того, что стимуляция СМ у децеребрированных животных, через восходящие проводящие пути, воздействует на нейронные сети ствола мозга, которые посылают команды спинному мозгу (спино-бульбо-спинальная петля). Тем не менее, вполне вероятно, что локомоция, вызванная стимуляцией МЛЮ, и локомоция, вызванная стимуляцией СМ, сильно различаются в своем участии в спинальных и супраспинальных механизмах активации и модуляции контроллеров конечностей. Сравнение локомоции вперед, вызванной стимуляцией МЛЮ и стимуляцией СМ, у децеребрированных кошек впервые было сделано Iwahara с соавторами (1991). Они продемонстрировали близкое подобие двух локомоторных паттернов. Однако в настоящем исследовании было найдено поразительное различие между двумя паттернами, когда сравнивали локомоцию не только вперед, но и в других направлениях.

Обнаружено, что ходьба при стимуляции СМ может быть ориентирована в разных направлениях относительно продольной оси тела в зависимости от направления движения ленты тредбана. Таким образом, направление шагания определялось внешними условиями. Подобные результаты были получены также у хронических спинальных крыс, шагающих по ленте тредбана, которая двигалась назад, вперед, или вбок (Courtine et al., 2009; Shah et al., 2012). Локомоция назад, вызванная стимуляцией СМ, также наблюдалась у спинальных и децеребрированных кошек (Gerasimenko et al., 2005; Musienko et al., 2007).

Было выявлено, что шагание, вызванное стимуляцией СМ, может выполняться не только в основных плоскостях тела и направлениях (вперед, назад и вбок), но и также по диагональной плоскости (45°; Рис. 6). Этот факт позволяет предположить, что каждый контроллер конечности может генерировать непрерывный спектр форм локомоции, различающихся по направлению шагания, а не несколько отдельных форм. Такая точка зрения поддерживается данными (Lamb and Yang, 2000; Pang and Yang, 2002), что младенцы (чьи механизмы управления конечностями расположены на

нижних уровнях ЦНС) способны шагать в различных направлениях, без явных различий в ЭМГ паттернах и временных параметрах шагания, так как направление шагания постепенно изменялось. Большое разнообразие направлений шагания характерно для многих видов, животных, имеющих конечности, например, для ракообразных (Larimer, 1976; Ayers and Clarac, 1978).

В отличие от стимуляции СМ, стимуляция МЛЮ вызывает координированные шагательные движения, только если лента тредбана движется в переднезаднем направлении (Рис. 2А). При движении ленты тредбана под любым другим углом шагательные движения были колоссально искажены, либо отсутствовали (Рис. 5А, 6А, 8А). Анализ этих искажений позволяет предположить, что контроллеры конечностей, при активации от МЛЮ, генерируют двигательные команды для шагания вперед, и не имеют отношения к движению ленты тредбана.

Эти предположения получили поддержку в экспериментах с шаганием в воздухе. При шагании в воздухе, вызванном стимуляцией МЛЮ, контроллеры конечностей генерируют отклонения конечностей с большой передне - задней составляющей (Рис. 9А, Б), сравнимые с длиной шага при ходьбе вперед по ленте тредбана (Рис. 2А). Мы предполагаем, что спинальные сети, генерирующие такую передне-заднюю составляющую, активируются вызванными стимуляцией МЛЮ супраспинальными командами и во время локомоции по тредбану, таким образом определяя направление ходьбы вперед.

Напротив, при шагании в воздухе, во время стимуляции СМ, контроллер конечности генерирует гораздо меньшие отклонения конечностей, без большой составляющей в передне-заднем направлении (Рис. 9А,Б) или в любом другом горизонтальном направлении. Горизонтальная составляющая, практически отсутствовала при шагании на месте (Рис. 8Е). Таким образом, сама по себе стимуляция СМ не вызывает никакой направленности в траектории конечности. Большая горизонтальная

составляющая в отклонении конечности появляется только после расположения конечности на движущейся ленте тредбана, где направление движения ленты (отслеживаемое сенсорными входящими сигналами при опоре) определяет направление шагания. Это отличалось от кошек, получающих стимуляцию МЛО, у которых направление шагания вперед определяется супраспинальными командами.

Таким образом, МЛО можно рассматривать как командный центр управления локомоцией вперед. Эта форма локомоции жизненно важна для животных и человека, как основная форма передвижения. Предполагается, что функция супраспинальных команд, инициированных стимуляцией МЛО и передаваемых по нисходящим путям, состоит в выборе и активации только одной из множества форм функционирования контроллеров конечности, а именно, движения вперед. Точка зрения о том, что различные двигательные паттерны могут производиться одними и теми же сетями, выдающими подходящий модуляторный механизм, рассматривалась многими авторами (Gelfand et al., 1988; Marder and Calabrese, 1996; Shah et al., 2012). Можно предположить, что некоторые другие формы локомоции (например, ходьба назад и в сторону) также имеют свои командные центры.

Как показано в настоящем исследовании, ходьба в различных направлениях, вызванная стимуляцией СМ, сопровождается значительными изменениями в паттерне движений конечности и мышечной активности. Во-первых, при шагании, которое включает в себя латеральный компонент (ходьба вбок и по диагонали), ведущая и задняя конечности имеют разные двигательные паттерны, в том числе, амплитуду шага и профили ЭМГ (Рис. 5В, 7Б). Во-вторых, функциональная роль отдельных мышц может измениться радикально в зависимости от направления шагания. Например, аддуктор правого бедра (Рис. 7Б, Add-II) может участвовать в переносе правой конечности во время ходьбы вправо. Участие данной мышцы в переносе конечности или в опоре конечности может постепенно изменяться, когда меняется направление шагания, как, например, в Glut-II (Рис. 7Б, Glut-

П при $\alpha = 0, 45, \text{ и } 90^\circ$). Постепенные изменения в ЭМГ паттернах при ходьбе в различных направлениях были ранее продемонстрированы у младенцев человека (Lamb and Yang, 2000; Pang and Yang, 2002).

Анализ ходьбы вперед у спинальных кошек показал набор нейронных механизмов, отвечающих за переход из одной фазы цикла шага в другую (например, Grillner and Rossignol, 1978). Критической точкой в цикле шага является начало фазы переноса. Наиболее важным фактором для запуска переноса является достижение конечностью определенного каудального положения (например, критический угол разгибания бедра). Другие факторы включают в себя разгрузку конечности, влияния от котралатеральной конечности, влияния от центральных генераторов паттернов (Grillner, 1973,1975; Grillner and Zangger, 1979; Orlovsky et al., 1999) и т.д. Результаты настоящего исследования позволяют расширить эту концепцию генерации переноса в другие направления шагания, и предположить, что начало переноса определяется афферентами, сигнализирующими о критическом отклонении конечности в фазе опоры. Например, во время ходьбы вбок афферент сигнализирует об аддукции, и абдукция может быть использована для запуска переноса в противоположном направлении.

На основе полученных экспериментальных данных предлагается гипотеза о контроле направления шага (Рис. 10А). Контроллер конечности (Orlovsky et al., 1999) включает два принципиальных механизма, один – генерирующий вертикальный компонент шага (поднятие и опускание конечности), а другой – генерирующий горизонтальный компонент (перенос конечности из одной крайней точки в другую). Последний включает в себя нейронные сети, генерирующие горизонтальные компоненты шага в различных направлениях (для упрощения, Рис. 10 показывает только сети, генерирующие шаги в четырех направлениях: «вперед», «назад», «вправо», «влево»). Эти сети получают сенсорные входные импульсы,

сигнализирующие о движении конечности в опоре; достижение крайнего положения запускает перенос конечности.

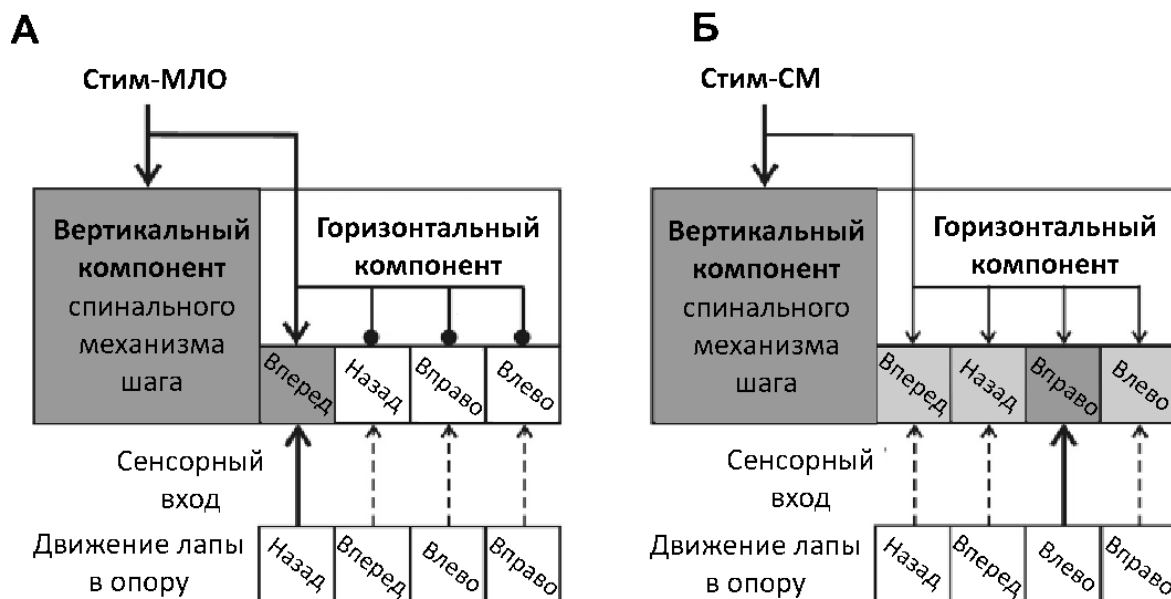


Рис.10. Базовые механизмы контроля направления ходьбы. А. Вызов ходьбы при стимуляции мезенцефалической локомоторной области. Черные кружочки обозначают тормозящие связи, которые не являются необходимы для функционирования модели. Б. Вызов ходьбы при стимуляции спинного мозга. Активация определенного механизма обозначена серым, субпороговая активация – светло-серым, торможение – белым. Объяснения в тексте.

Стимуляция МЛО (Рис. 10А) активирует механизм, генерирующий вертикальный компонент шага, выбирает и активирует сеть “вперед” горизонтального компонента, которая будет перемещать конечность вперед во время переноса и назад во время опоры и, вероятно, тормозит все другие сети («назад», «вправо» и «влево»). Сенсорные входные импульсы, сигнализирующие об отклонении конечности назад во время опоры, помогают запустить перенос конечности. Таким образом, стимуляция МЛО вызывает шагание вперед независимо от направления движения ленты тредбана.

Стимуляция СМ (Рис. 10Б) активирует механизм, который генерирует вертикальный компонент шага. Она также вызывает подпороговую активацию всех сетей, генерирующих горизонтальный компонент. Благодаря движению ленты тредбана (например, «влево»), конечность достигает крайнего левого положения, и сенсорный входящий импульс активирует сеть «вправо», что приведет к шагу вправо. Таким образом, стимуляция СМ вызывает шагание в направлении, противоположном движению ленты тредбана.

ПОСТУРАЛЬНЫЕ СПОСОБНОСТИ КРОЛИКОВ С РАЗНЫМИ УРОВНЯМИ ДЕЦЕРЕБРАЦИИ И ЭФФЕКТЫ СТИМУЛЯЦИИ СТВОЛА

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

Децеребрированные животные (кошки и кролики) способны стоять и ходить, не теряя равновесия (Bard, Macht, 1958; Magnus 1924). Из этого факта следует, что значительная часть системы управления положением тела и равновесием расположена ниже уровня децеребрации, то есть в стволе головного мозга, мозжечке и спинном мозге. Но способность децеребрированных животных поддерживать равновесие, то есть правильно реагировать на различные отклонения тела, не была исследована систематически. Этот вопрос изучался в настоящей работе в ходе проведения экспериментов на кроликах.

Первой целью исследования было охарактеризовать постуральные способности у децеребрированных кроликов. Поскольку уровень децеребрации, как известно, сильно влияет на двигательную активность животного, в том числе на мышечный тонус, интенсивность рефлекторных

реакций, и спонтанные движения (Bard, Macht, 1958; Orlovsky, 1969), мы исследовали постуральную способность животных, децеребрированных на различном ростро-каудальном уровне, премамиллярном и постмамиллярном (см. ниже).

У интактных четвероногих животных боковой наклон опорной поверхности вызывает корректирующие движения, которые восстанавливают положение туловища с ориентацией спины вверх. Функциональная организация системы постурального контроля, которая генерирует эти корректирующие движения у кроликов и кошек, была проанализирована в предыдущих исследованиях (Beloozerova et al., 2003a; Deliagina et al., 2006). Установлено, что эта система состоит из двух относительно независимых подсистем, ответственных за стабилизацию передней и задней частей туловища, соответственно. Каждая из подсистем приводится в действие соматосенсорным входным сигналом от конечностей соответствующего пояса. В настоящем исследовании изучалась подсистема задних конечностей у децеребрированных кроликов. С этой целью мы сравнили до и после децеребрации двигательные реакции на латеральные наклоны платформы, на которую опираются задние конечности.

Другой важной постуральной задачей является компенсация смещения туловища во фронтальной плоскости, вызванного латеральной силой, приложенной к телу. Интактные четвероногие легко корректируют положение тела при стоянии, и не падают под воздействием латеральных толчков, даже когда приложенная сила достаточно велика (Kato et al., 1985; Karayannidou et al., 2005a). В настоящем исследовании оценивалась работа механизма задних конечностей путем сравнения двигательных ответов на латеральные толчки у кроликов до и после децеребрации.

Система постурального контроля взаимодействует с другими моторными системами. В частности, она обеспечивает постуральную поддержку произвольных движений туловища и конечностей (Massion, 1988). Важнейшей функцией постуральной системы является поддержание

равновесия при инициации и во время локомоции (Mori, 1987; Orlovsky et al., 1999). *Вторая цель* настоящего исследования состояла в изучении влияния активации локомоторной системы на постуральную систему. Для этого были описаны эффекты электрической стимуляции мезенцефалической локомоторной области (МЛО) (Jordan et al., 1998; Shik et al., 1966) на постуральные способности у постмамиллярных кроликов.

Важным условием проявления постуральной активности является достаточный тонус антигравитационных (разгибательных) мышц (Edgerton et al., 2001; Massion, 1994). Увеличение тонуса разгибателей у децеребрированных животных может быть вызвано стимуляцией вентральной области покрышки (ВОП) медиальной части ствола мозга (Mori et al., 1982). *Третьей целью* данного исследования было изучение влияния стимуляции ВОП на мышечный тонус и способность выполнять постуральные коррекции положения тела у постмамиллярных кроликов.

Методы

Эксперименты проведены на 15 взрослых новозеландских кроликах (весом 2,5 – 3 кг). Сначала делались необходимые регистрации на интактных животных. Затем кроликов децеребировали на разных уровнях ствола мозга (рис. 11А): премамиллярном (1) и постмамиллярном (2). Стимуляция ствола головного мозга (МЛО и ВОП) применялась для активации постуральной системы у животных децеребрированных на постмамиллярном уровне (рис. 11А). Последовательность хирургических процедур, контроль состояния животных, обработка регистрируемых сигналов и анализ данных описаны в главе 2 Общая методология.

Схема эксперимента

На децеребрированных кроликах проводилось два типа экспериментов. В первом животные не фиксировались (рис. 12А). Задние конечности стояли на наклоняемой платформе (Р), передние занимали стационарное положение. Во втором типе экспериментов для стимуляции структур ствола

мозга (МЛО и ВОП) голова животного фиксировалась в стереотаксическом устройстве (рис. 12Б). Задние конечности стояли на наклоняемой

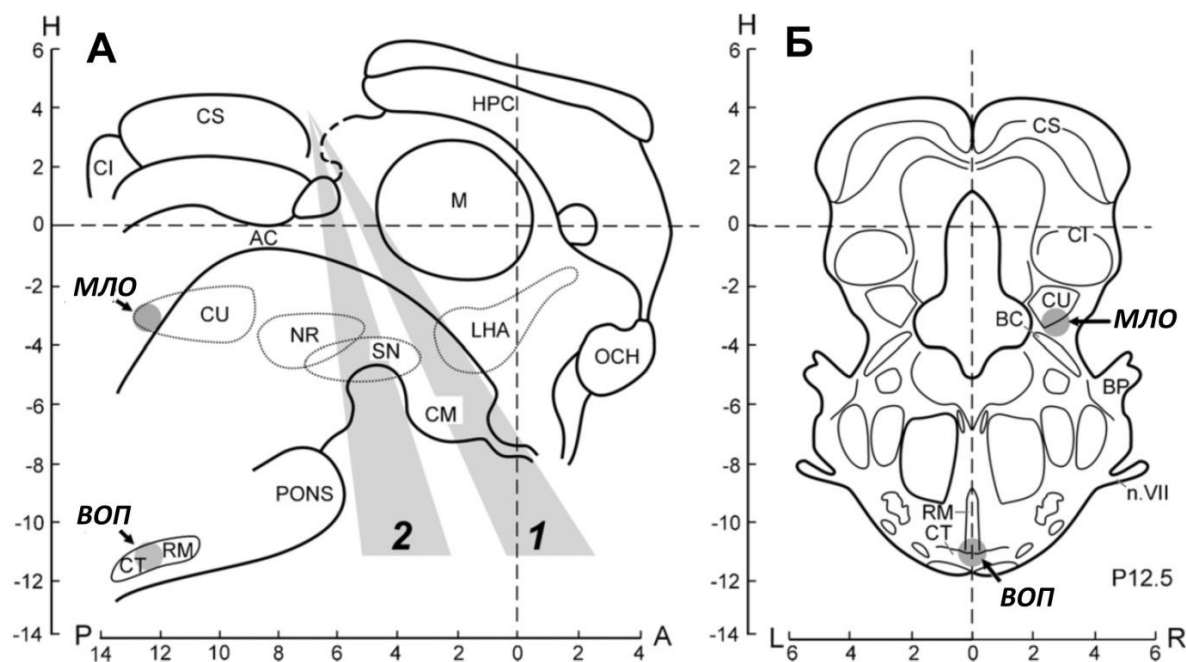


Рис.11. Уровни децеребрации и зоны стимуляции ствола мозга. (А) Среднесагиттальная плоскость. (Б) Фронтальная плоскость (координаты по Horsley-Clarke, переднезадний уровень P12.5). Перерезки ствола проводились на преколликкулярно-премаммилярном уровне (линии среза располагались в сером секторе 1) или преколликкулярно-постмаммилярном уровне (сектор 2). Мозговые структуры: AC, aquaeductus cerebri; BC, brachium conjunctivum; BP, brachium pontis; CI, colliculus inferior; CM, corpus mammillaris; CS, colliculus superior; CT, corpus trapezoides; CU, area cuneiformis; HPC, hippocampus; LHA, lateral hypothalamic area; M, massa intermedia; n.VII, nervus facialis; NR, nucleus ruber; OCH, optic chiasma; SN, substantia nigra; RM, nucleus raphe magnus. Структуры, обозначенные пунктирной линией располагаются в парасагиттальных плоскостях (LR 1–4). (На основе стереотаксических атласов мозга кролика) (Fifkova, Marsala 1967; Sawyer et al. 1954). Серые круглые зоны обозначают эффективные области стимуляции ствола: МЛО, мезенцефалическая локомоторная область; ВОП, вентральная область покрышки.

платформе, в то время как передние конечности были подвешены. В каждом из двух типов экспериментов применялись два теста на постуральную реакцию во время стояния: латеральные наклоны и латеральные толчки. Амплитуда наклонов платформы составлял 40° (рис. 12Г). Были использованы два типа траекторий наклонов: синусоидальная траектория (рис. 19Б) с частотой 1 Гц и трапецевидная траектория (рис. 15А,Б, 17 и 19Г) с переходом между стационарными (экстремальными) положениями за 0,5 – 1,5 с и удержанием каждого положения в течение 1,5 – 3 с. Симметричность наклонов по отношению к горизонтальному положению соблюдалась во всех экспериментах.

Латеральные толчки применялись в медиально-латеральном направлении по отношению к поясничной области туловища (рис. 12Д) с помощью толкателя (инструмент цилиндрической формы, диаметром 1,5 см, длиной 10 см) с датчиком силы, расположенном на стороне, обращенной к кролику. Этот датчик применялся для измерения времени приложения толчка. Каждый толчок длился 150 – 200 мс. В процессе толкания туловище смещалось на несколько сантиметров в медиально-латеральном направлении, после чего толкатель убирался.

Механический датчик (S), расположенный на хвостовой части туловища (рис. 12), измерял латеральные смещения этой области тела по отношению к опорной платформе. Эти смещения позволили охарактеризовать постуральные коррекции, генерируемые в ответ на латеральные толчки; у незафиксированных животных они показывали постуральные коррекции, обусловленные наклонами платформы (рис. 12Г) (Beloozerova et al., 2003). ЭМГ мышц задних конечностей записывались синхронно с сигналами механических датчиков в ходе проведения постуральных тестов. Для оценки постурального контроля в тестах с наклонами мы рассчитали коэффициент усиления постуральных рефлексов, рассчитываемый как $G = S_{pp}/\alpha_{pp}$ (см/ $^\circ$), где « α_{pp} » - амплитуда наклона платформы, а S_{pp} амплитуда постуральной коррекции.

Для описания конфигурации тела стоящего кролика проводилась одновременная видеозапись (25 кадров/с) сбоку и снизу (с использованием прозрачной горизонтальной платформы и зеркала). Для описания выпрямительного поведения кролика размещали на боку, а затем отпускали. Последовательность движений, направленных на принятия положения стоя, записывалась на видео. Кроме того, производилась видеозапись последовательности локомоторных движений.

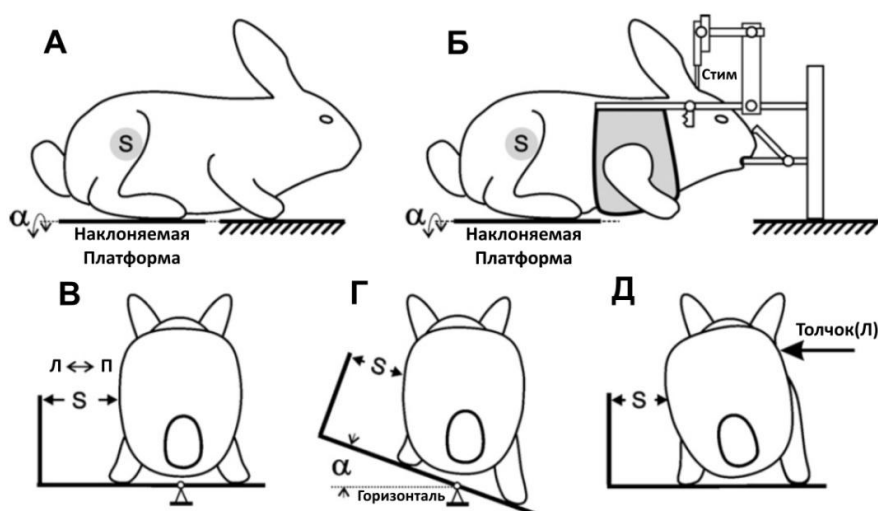


Рис. 12. Схема эксперимента и установки.

Интактные кролики, выбранные для децеребрации, использовались в качестве контрольных подопытных животных. До децеребрации они были тестированы при латеральных наклонах и толчках в нефиксированном положении. Также были записаны на видео основное положение тела и вставание из бокового положения.

Результаты

Постуральные способности у преаммиллярных кроликов

У 10 кроликов перерезка ствола мозга была выполнена на преаммиллярном уровне (плоскость рассечения была расположена в секторе 1 на рис. 11А). Характерной особенностью преаммиллярных кроликов было периодическое увеличение или уменьшение уровня возбудимости, которое отражалось в спонтанных изменениях их двигательной активности, в том числе постуральной и локомоторной

(Orlovsky et al., 1969). Эта периодичность была выражена сильнее у животных с более роstralными перерезками. Постуральные способности исследовались в периоды повышенной возбудимости.

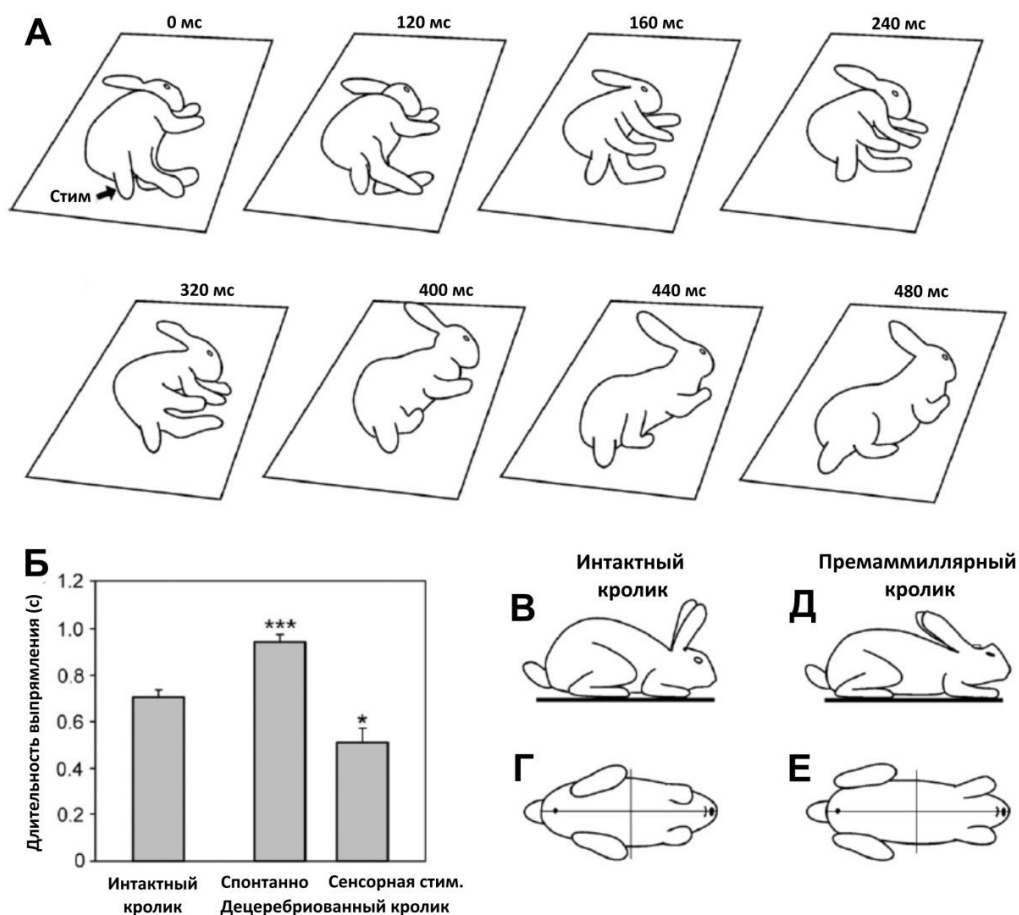


Рис. 13. Сравнение конфигурации позы тела и выпрямления при вставании у премаммиллярно децеребрированных и интактных кроликов. (А) Последовательность изменения постуральной конфигурации тела при выпрямлении премаммиллярного кролика. (Б) Длительность выпрямления у интактных ($n=10$) и премаммиллярных ($n=8$) кроликов. Типичная конфигурация позы тела при стоянии интактных (В-Г) и децеребрированных кроликов (Д-Е).

При размещении на боку, четвероногие демонстрируют рефлекс выпрямления и быстро приходят в основную позу стояния (Magnus, 1924). Премаммиллярные кролики могли вставать из лежачего положения с помощью последовательности рефлексов выпрямления. Один из возможных

паттернов выпрямления показан на рис. 13А. Последовательность начиналась с вентрального сгибания туловища, сопровождаемого движением верхних конечностей по отношению друг к другу (кадр 160 мс). Постепенно голова поворачивалась в свое нормальное положение (160-310 мс). Затем поднималось туловище и возвращалось в свое нормальное положение (400-440 мс). Движения выпрямления прекращались, когда кролик принимал нормальное положение при стоянии (480 мс).

Сходный паттерн выпрямления наблюдался и у интактных кроликов. Продолжительность выпрямления у интактных животных, в среднем, была короче, чем у децеребрированных. Тем не менее, выпрямление у децеребрированных животных могло быть значительно ускорено с помощью экстероцептивной стимуляции, например, щипания хвоста (рис. 13Б). Поэтому предполагается, что нейрональные механизмы для этого типа постуральных реакций могут нормально функционировать после децеребрации, если обеспечивается достаточный возбуждающий сигнал.

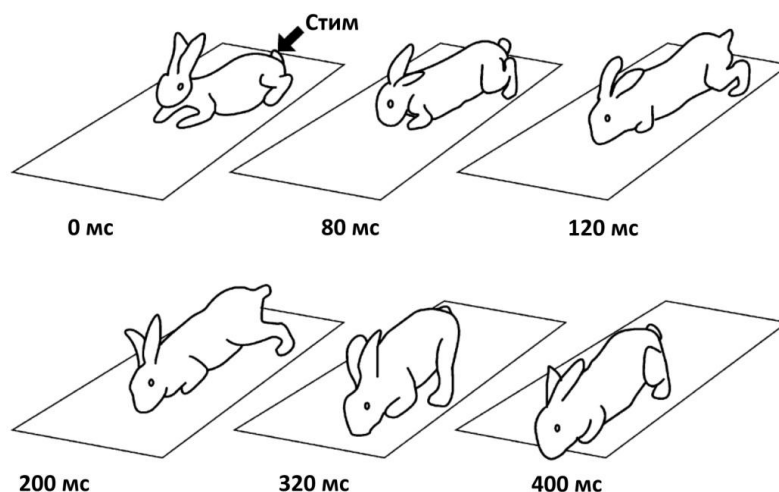


Рис. 14. Локомоция преаммиллярного кролика с поддержанием равновесия при механической стимуляции хвоста.

В стоячем положении постуральная конфигурация преаммиллярных кроликов была, в основном, похожа на конфигурацию интактных кроликов, как показано на рис. 13В-Е. Различия были следующими: (1) большее расстояние между передней и задней конечностями (в основном из-за

каудального отклонения задних конечностей), что приводило к более распростертому положению туловища, и (2) уменьшение углов стоп по отношению к туловищу. Эти различия предполагали некоторые искажения в распределении постурального тонуса между различными мышцами конечностей и туловища у преаммиллярных кроликов.

В периоды спонтанного увеличения моторной активности преаммиллярные кролики демонстрировали приступы спонтанной локомоции, либо в ответ на сенсорные стимулы. Рисунок 14 показывает последовательные положения кролика в течение одного цикла локомоции, вызванного щипанием хвоста. Кролик демонстрирует галоп с синхронным движением обеих задних конечностей. На рис. 14 также видно, что при движении кролик поддерживал равновесие. Когда кролики наталкивались на препятствия во время движения, они могли сохранять равновесие и менять направление движения. Это было характерно для всех преаммиллярных кроликов. Данные наблюдения позволяют предположить, что у преаммиллярных кроликов основные постуральные механизмы функционируют при локомоторной активности.

При размещении на наклоняемой платформе (рис. 12А и В) преаммиллярные кролики поддерживали равновесие так же, как интактные (Beloozerova et al., 2003). Наклон платформы вызывал разгибание конечности, находящейся на движущейся вниз стороне и сгибание конечности с противоположной стороны (как схематично показано на рис. 12D). Эти движения конечностей приводили к перемещению туловища в направлении, противоположном направлению наклона (постуральная коррекция, S). На рис. 15 показаны постуральные коррекции и ЭМГ ответы интактных кроликов (А) и тех же кроликов после децеребрация (Б). В обоих случаях смещения туловища (S) были в противофазе к наклонам (α), что указывает на присутствие постуральных коррекций. Амплитуда коррекции, однако, была значительно меньше у децереброванных животных. ЭМГ реакции разгибателя бедра m. Vastus у децереброванных кроликов также

находились в правильной фазе (активация при ипсилатеральном наклоне), но по сравнению с интактными уменьшились по амплитуде.

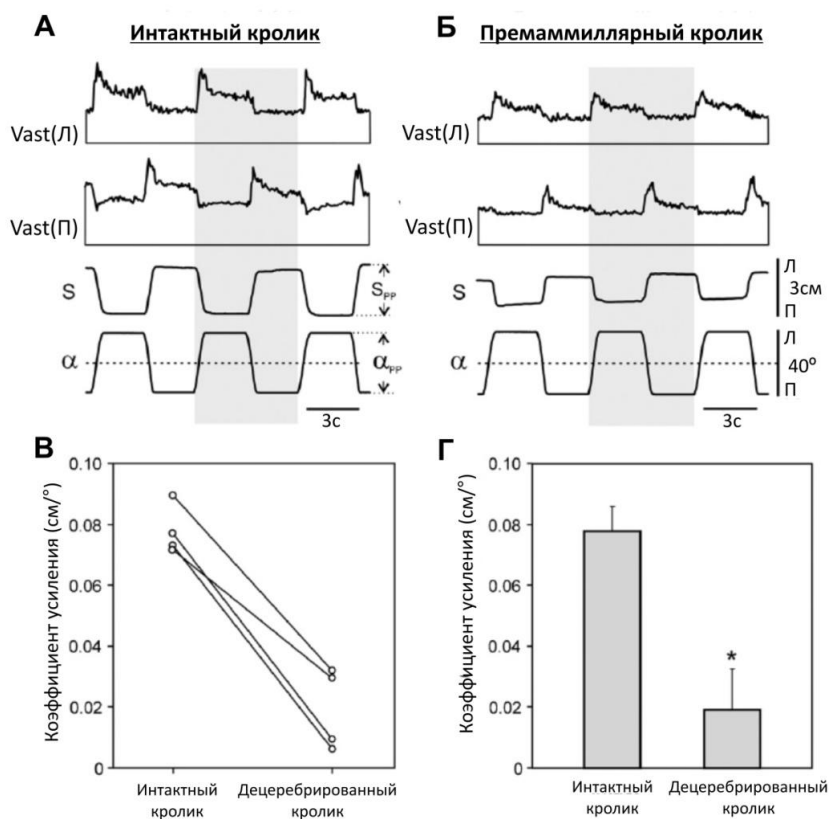


Рис. 15. Сравнение постуральных ответов при наклонах опоры у интактных и преаммиллярных кроликов. Пояснения в тексте.

Мы рассчитали коэффициент усиления постуральных рефлексов (см. методы) для 4 кроликов, испытываемых до и после децеребрации. После децеребрации коэффициент усиления значительно сократился у отдельных животных (рис. 15В) и в целом по группе (рис. 15Г). Различие было статистически значимым. В тестах с латеральными толчками децеребрированные кролики поддерживали равновесие таким же образом, как интактные кролики. На рис. 16 показан эффект толкания интактного кролика (А) и того же кролика после децеребрация (Б). В обоих случаях толкание влево вызвало смещение туловища влево на 1,5 см с последующей постуральной коррекцией и быстрым возвратом в исходное положение. Паттерны ЭМГ ответов были качественно похожи, с последовательной активацией левого и правого разгибателя бедра, m.Vastus; вспышке

активности справа предшествовало торможение. Активность разгибателя слева противодействовала смещению туловища влево и инициировала коррекционное движение вправо. Смещение вправо компенсировалось активностью правого разгибателя. ЭМГ ответы у децеребрированного кролика были меньше по амплитуде и медленнее. Это было характерно для всех тестируемых животных (рис. 16В и Г).

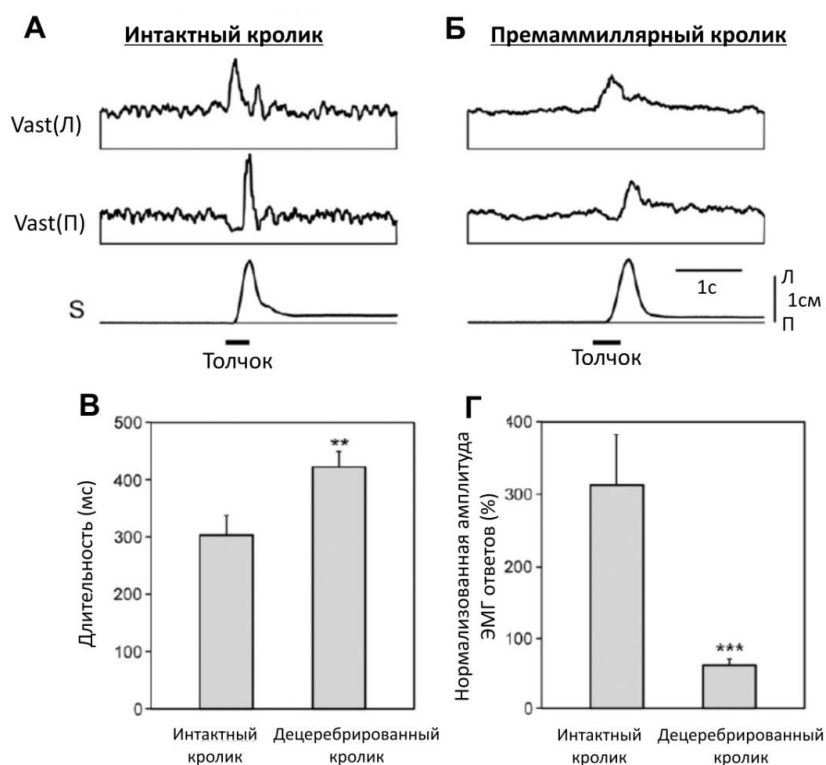


Рис. 16. Сравнение постральных ответов при боковых толчках у интактных и преаммилярных кроликов. Пояснения в тексте.

Спонтанное периодическое изменение уровня возбудимости у преаммилярных кроликов (см. выше) отражалось на их постральных способностях, как показано на рис. 17. На пике активности кролик хорошо компенсировал наклоны и латеральные смещения тела (S) в противофазе к наклонам платформы, что указывает на присутствие постральных коррекций (рис. 17А). Через три минуты статическая составляющая смещения тела заметно снизилась (рис. 17Б). Еще через несколько минут регистрировались только слабые коррекции (рис. 17В). Наконец, когда активность кролика достигла минимума, смещение тела происходило в

одной фазе с наклоном (рис. 17Г). В этом случае постуральные коррекции не происходили, и тело пассивно качалось синхронно с каждым наклоном платформы. Можно также заметить постепенное уменьшение ЭМГ ответов (от А до Г). Тем не менее, во всех случаях ЭМГ ответы проявлялись в правильных фазах (активация при ипсилатеральном наклоне). Похожие периодические изменения постуральных реакций (ЭМГ и значения S) наблюдались у всех премаммиллярных кроликов.

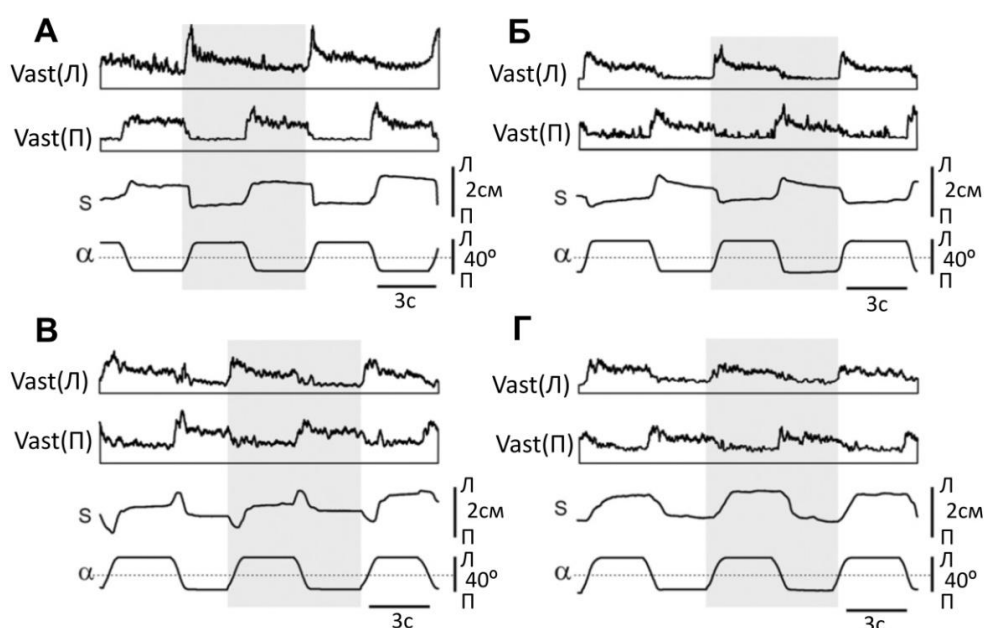


Рис. 17. Спонтанные изменения двигательных ответов на наклоны у премаммиллярного кролика. Последовательные регистрации в А-Г были сделаны с перерывом в несколько минут.

Активация постуральных способностей постмамиллярных кроликов стимуляцией нейрональных центров ствола мозга

Постмамиллярные кролики ($n = 5$) значительно отличались от премаммиллярных. Лежа на боку, они не демонстрировали рефлексов выпрямления. При расположении их дорсальной стороной вверх, они не могли оставаться в стоячем положении и поддерживать равновесие. Таким образом, можно сделать вывод, что постуральные механизмы не функционируют у постмамиллярных кроликов. Далее постуральные механизмы задних конечностей активировались стимуляцией структур

ствола головного мозга (МЛО и ВОП). Для этого голова животного была зафиксирована в стереотаксическом устройстве, которое позволяло установить стимулирующий электрод в МЛО или ВОП (см. Главу 2 Общая методология и рис. 11). Задние конечности располагались на наклоняемой платформе, тогда как передние конечности подвешивались (рис. 12Б). Тонус мышц-разгибателей задних конечностей у постмамиллярных кроликов обычно был достаточным для поддержки веса тела.

Стимуляция МЛО проводилась у 4 постмамиллярных кроликов. Первоначально было найдено оптимальное место для стимуляции, в котором хорошо скоординированные локомоторные движения вызывались минимальным током. Это проиллюстрировано на рис. 18А, который показывает последовательные положения кролика в течение одного локомоторного цикла. Стимуляция вызывала синхронные движения задних конечностей (галоп, рис. 18А) с синхронными всплесками активности в разгибателях (рис. 18Б), и переменным движением передних конечностей. Такой паттерн, характерный также для интактных кроликов (Beloozerova et al., 2003), наблюдался у всех постмамиллярных животных.

Локомоторные движения были вызваны стимуляцией (30 Гц, 0,2 мс, 300-600 мкА) в ограниченной области под нижним холмиком четверохолмия (рис. 11). Изучение срезов ствола головного мозга показало, что "мезенцефалическая локомоторная область" у кроликов соответствовала клиновидному ядру среднего мозга (nucleus cuneiformis) и располагалась в зоне (P12.5, L3, H-3) по координатам Хорсли-Кларка согласно стереотаксическому атласу мозга кролика (Fifkova, Marsala, 1967; Sawyer et al., 1954).

Положение стимулирующего электрода (оптимальное для вызова локомоции) было затем использовано в постуральных тестах. Сила стимуляции, однако, была уменьшена в 1,5-2 раза, что позволило значительно продлить период, предшествующий инициации локомоции (до

10-15 с) и выполнить несколько поструральных тестов (латеральные наклоны или толчки) до начала локомоции.

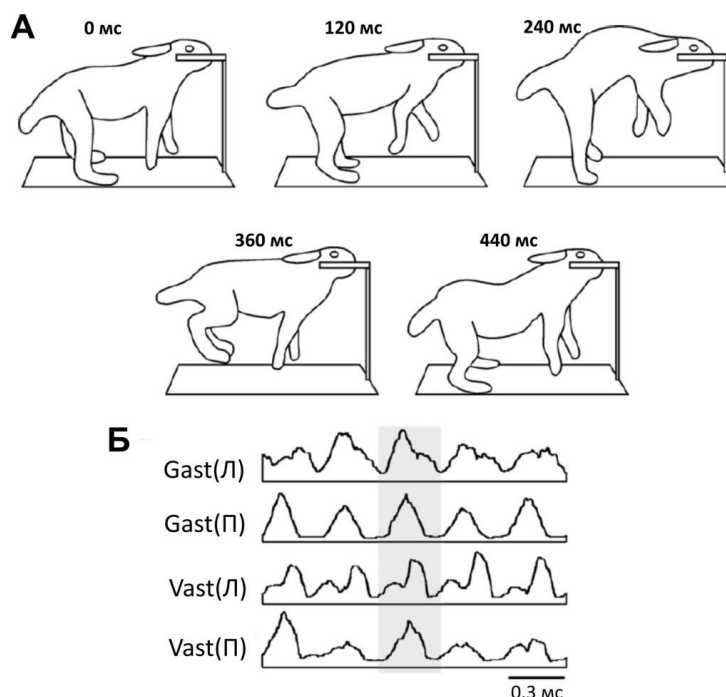


Рис. 18. Локомоция постмамиллярного кролика при стимуляции МЛО. (А) Последовательность движений кролика в течение локомоторного цикла. Голова животного была зафиксирована в стереотаксической установке. (Б) ЭМГ активность экстензоров задних конечностей при локомоции.

В большинстве испытаний стимуляция МЛО вызывала постепенное повышение тонуса мышц-разгибателей конечностей, что предшествовало локомоции, как показано на рис. 19А. Локомоторная активность прекращалась при выключении стимуляции. Примерно в половине испытаний наблюдалось постепенное ослабление активности разгибателей после остановки локомоции, как, например, в разгибателе бедра (m.Vastus (L) на рис. 19А).

У постмамиллярных кроликов ЭМГ ответы на наклоны были слабы, но они могли быть увеличены путем стимуляции МЛО (показано на рис. 19Б). Стимуляция МЛО в период, предшествующий локомоторной активности, приводила к постепенному усилению ЭМГ ответов на наклоны. Временной паттерн этих реакций был характерен для поструральных реакций на

наклоны – активация мышц-разгибателей при ипсилатеральных наклонах. В некоторых исследованиях усиление реакций на наклон наблюдалось также в течение 10-20 с после прекращения локомоции.

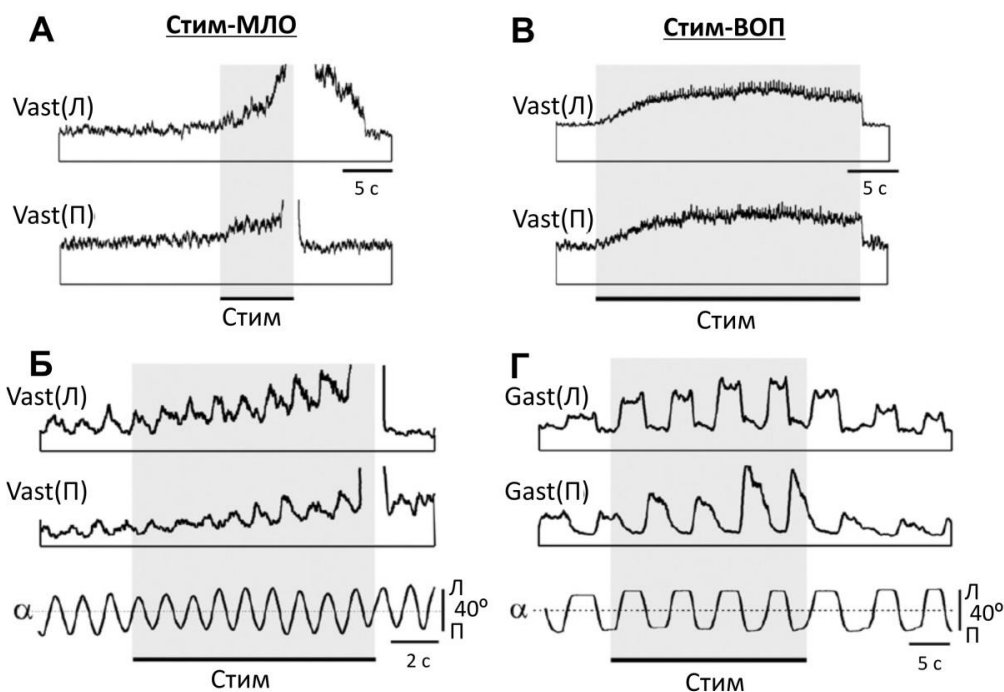


Рис. 19. Активация постурального тонуса (А,В) и постуральных ответов на наклоны опоры (Б,Г) у постмамиллярного кролика стимуляцией МЛО и ВОП.

Также ЭМГ ответы постмамиллярных кроликов на латеральные толчки были очень слабыми. Стимуляция МЛО значительно усилила эти реакции (рис. 20А и Б). Временной паттерн этих ответов был характерен для постуральных реакций на толчки (см. рис. 16А).

Стимуляция ВОП проводилась у 3 постмамиллярных кроликов. Область эффективного воздействия была расположена на глубине 17-18 мм от дорсальной поверхности ствола мозга (координаты по Хорсли-Кларку (P12.5, LR0, H-11)). Эта область соответствует большому ядру шва (nucleus raphe magnus) продолговатого мозга (Fifkova, Marsala 1967; Sawyer et al., 1954).

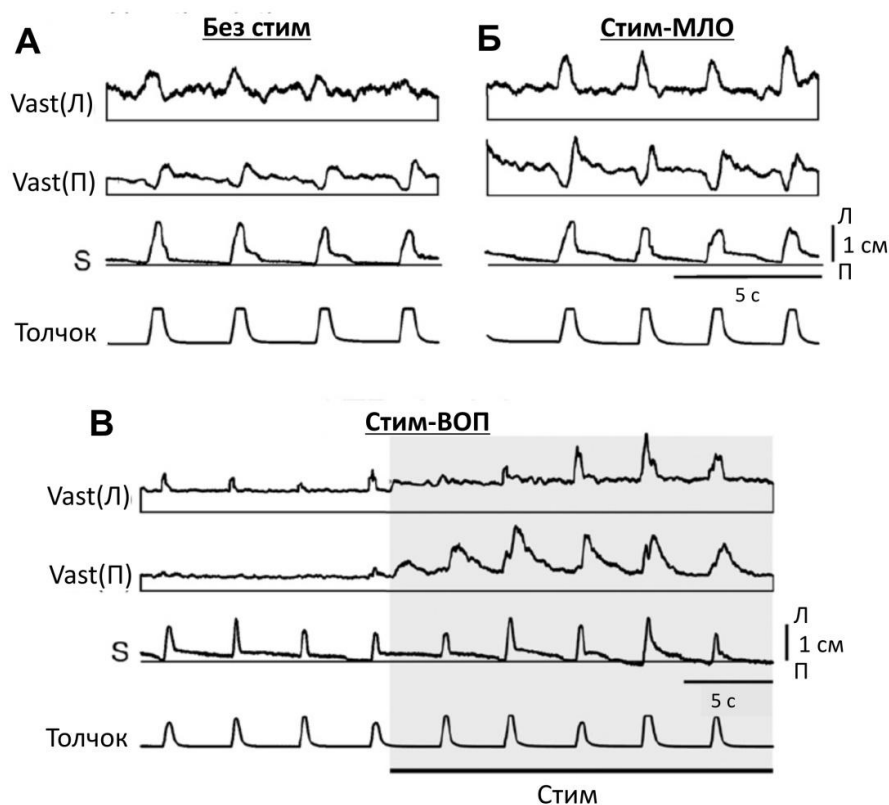


Рис. 20. Активация постуральных ответов на боковые толчки у постмаммилярного кролика стимуляцией МЛО (А, Б) и ВОП (В).

Электрическая стимуляция ВОП (50-100 Гц, 0,2 мс, 100-300мкА) значительно улучшила тонус мышц-разгибателей, как показано на рис. 19В. В постуральных тестах на наклоняемой платформе стимуляция ВОП значительно усиливала ЭМГ ответы на наклоны (рис. 19Г). Временной паттерн ответов был типичным для постуральных реакций – активации разгибателей с помощью ипсилатеральных наклонов. Кроме того, при стимуляции ВОП значительно увеличились ЭМГ ответы на латеральные толчки (рис. 20В). Временной паттерн этих ответов был также характерен для постуральных реакций на данный тип возмущающих воздействий (см. рис. 16А).

Обсуждение

Постуральные способности у премаммилярных кроликов

Четвероногие животные, децеребрированные на премаммилярном (или более ростральном) уровне способны стоять и ходить, не теряя равновесия.

В отличие от них животные, децеребрированные на постмамиллярном уровне, не могут поддерживать равновесие (Bard, Macht, 1958; Magnus, 1924). Таким образом, важная часть механизмов, ответственных за поддержание нормальной позы тела, сохраняется у премамиллярных животных. Постуральные способности у этих животных, однако, подробно не описывались ранее. В частности, оставалось неясным, вызывала ли децеребрация постуральный дефицит, и были ли постуральные коррекции у децеребрированных животных слабее и/или медленнее чем у интактных. Это важно для лучшего понимания функциональной организации постурального контроля, а также для характеристики распределения постуральной функции в ЦНС.

У четвероногих животных при стоянии самой сложной постуральной задачей является поддержание латеральной стабильности, так как площадь опоры в поперечной плоскости, как правило, более ограничена, чем в сагиттальной плоскости (рис. 13Г). Равновесие в поперечной плоскости (стабилизация положения тела дорсальной стороной вверх) поддерживается с помощью замкнутой системы регулирования. У нормальных субъектов эта система компенсирует широкий спектр отклонений положения тела (Deliagina et al., 2006; Horak et al., 1996). Функциональная организация этой системы была проанализирована в предыдущих экспериментах на кроликах и кошках (Beloozerova et al., 2004; Deliagina et al., 2006). Обнаружено, что нормальное положение спиной вверх передней и задней половины тела, поддерживаются двумя различными механизмами, которые приводятся в активность соматосенсорными входными сигналами передних или задних конечностей и при определенных условиях могут работать независимо друг от друга.

Для характеристики работы постуральной системы у децеребрированных кроликов в настоящем исследовании использовались три различных теста (постуральные отклонения). Для изучения постуральных механизмов задних конечностей применялись латеральные наклоны и латеральные толчки,

прикладываемые к задней части туловища, тогда как расположение кролика на боку позволило охарактеризовать сложную последовательность рефлексов выпрямления, которые требуют скоординированной активности передних и задних конечностей.

Было обнаружено, что обычно во всех этих тестах преаммиллярные кролики были способны компенсировать отклонения положения тела. Тем не менее, даже в периоды повышенной возбудимости постуральные способности у преаммиллярных кроликов не были такими же, как у интактных. (1) В тесте с латеральными наклонами коэффициент усиления постуральных рефлексов сократился в четыре раза по сравнению с контрольными интактными животными (рис. 15Г). (2) В тесте с латеральными толчками значение ЭМГ ответов было меньше в пять раз (рис. 16Г). (3) В тесте с выпрямлением время, необходимое на принятие нормального положения, увеличилось на 25% по сравнению с контрольной группой. Тем не менее, это время могло быть значительно уменьшено, даже по сравнению с показателями контрольной группы, с помощью экстероцептивной стимуляции, например, используя щипание хвоста (рис. 13Б).

В совокупности эти данные позволяют предположить, что после децеребрации на преаммиллярном уровне постуральные механизмы поддержания поперечной устойчивости остаются неповрежденными, но уровень их активности значительно снижается. Вполне вероятно, что возбуждающий сигнал, который они получают от стволовых структур мозга, недостаточен, чтобы полностью активировать их. Кроме того, преаммиллярные кролики могли сохранять равновесие во время ходьбы (рис. 14), что предполагает наличие динамического контроля равновесия, а также тесное взаимодействие постуральных и локомоторных механизмов (Misiaszek, 2006).

Интересным является обнаруженный факт периодического изменения в уровне возбудимости преаммиллярных кроликов, аналогичное описано у

премамиллярных кошек (Orlovsky et al., 1969). Природа этого явления, однако, остается неясной. Эта периодичность в уровне возбудимости может быть вызвана колебанием входного сигнала в постуральные и локомоторные центры из какого-то неизвестного источника. Одними из возможных вариантов являются нейроны черной субстанции (substantia nigra pars reticulata), проецирующиеся к МЛО и постуральным центрам (Takakusaki et al., 2003, 2004). Однако экспериментальные данные о периодической активности этих нейронов у премамиллярных животных отсутствуют.

Активация постуральных механизмов у постмамиллярных кроликов

Исследование подтвердило предыдущие заключения (Magnus, 1924; Shik et al., 1966) о том, что у постмамиллярных четвероногих животных постуральная система не функционирует. Постмамиллярные кролики не демонстрировали рефлекс выпрямления, не могли поддерживать равновесие при стоянии и генерировать корректирующие движения в ответ на латеральные толчки и наклоны. Это может быть вызвано двумя основными причинами: (1) структуры головного мозга, расположенные между двумя уровнями децеребрации, пре- и постмамиллярным, содержат конкретные нейронные сети (компоненты постуральных рефлексов), которые необходимы для работы замкнутых механизмов постурального контроля. (2) Эти структуры обеспечивают постуральные механизмы неспецифическим, тоническим возбуждающим сигналом, который необходим для их активации.

Наличие слабого ЭМГ ответа на наклоны и толчки с временным паттерном, характерным для контрольной группы, поддерживает вторую гипотезу. Для проверки этих гипотез в настоящем исследовании мы тонически стимулировали две области ствола мозга, которые, как известно, влияют на постуральную систему, МЛО и ВОП (Gossard et al., 1994; Mori et al., 1982; Mori, 1987), и исследовали постуральный контроль путем

применения латеральных наклонов и латеральных толчков задней части тела. Было обнаружено, что стимуляция МЛО в период, предшествующий началу локомоции, вызывала улучшение мышечного тонуса разгибателей, а также усиление ЭМГ ответов на наклоны и толчки. Аналогично, стимуляция ВОП вызывала улучшение тонуса мышц-разгибателей и усиление реакций на наклоны и толчки (рис. 19 и 20).

Наши данные убедительно свидетельствуют о том, что значительная часть постуральных механизмов задних конечностей, компенсирующих латеральные наклоны и латеральные толчки при стоянии, сохраняется у постмамиллярных кроликов и может быть активирована с помощью тонического сигнала. В связи с этим, постуральная система имеет важную общую черту с локомоторной системой, в которой удаление структур между пре- и постмамиллярными уровнями также оказывает сильное влияние, а именно, полное исчезновение спонтанного локомоторного поведения, при этом локомоция может быть вызвана стимуляцией МЛО (Jordan, 1998; Orlovsky et al., 1999; Shik et al., 1966).

В настоящее время не ясно, какая из структур, расположенных между двумя уровнями, отвечает за активацию постуральной и локомоторной систем. Две структуры в этой области - красное ядро (red nucleus) и черная субстанция (substantia nigra) - как известно, связаны с моторной функцией (Massion, 1967; Takakusaki et al., 2003, 2004). В частности, экспериментальные данные показывают, что ретикулярная часть черной субстанции (substantia nigra pars reticulata) принимает участие в регуляции мышечного тонуса и инициации локомоции (Takakusaki et al., 2003, 2004).

В норме работа замкнутых (closed-loop) постуральных механизмов основывается, главным образом, на сомато-сенсорной информации, поступающей от механорецепторов конечностей, а не от вестибулярного и визуального входов (Beloozerova et al., 2003a; Duysens et al., 2000; Inglis, Macpherson, 1995; Stapley et al., 2002). Соответствующие афференты конечностей дают начало двум петлям постуральных рефлексов,

спинальной и спинно-супраспинальной (Deliagina et al., 2006; Fung, Macpherson, 1999; Horak, Macpherson, 1996; Jacobs, Horak, 2007; Lyalka et al., 2005). Последняя петля включает в себя механизмы ствола мозга и переднего мозга. Результаты настоящего исследования убедительно показывают, что петля, включающая структуры переднего мозга, не является необходимой для постурального контроля по принципу обратной связи.

АКТИВАЦИЯ ПОСТУРАЛЬНЫХ РЕФЛЕКСОВ У СПИНАЛЬНЫХ КРОЛИКОВ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ И ХИМИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ

Как спинальные механизмы, так и супраспинальные двигательные центры участвуют в поддержании позы тела (Beloozerova et al., 2003b, 2005; Horak, Macpherson 1996; Jacobs, Horak, 2007). Специфическая роль спинального и супраспинального уровня постуральной системы не ясна (Lyalka et al., 2005, 2008, 2009; Macpherson et al., 1997, 2007; Stapley et al., 2006). Кроме фундаментального значения, выяснение отношений между спинальным и супраспинальным постуральными механизмами важно и для понимания последствий повреждений спинного мозга (ПСМ).

Из исследований с перерезками спинного мозга четвероногих животных известно, что спинализация на уровне нижнего грудного отдела вызывает серьезные нарушения постурального контроля. Такие животные теряют способность поддерживать латеральную стабильность задних конечностей при стоянии и ходьбе, которая не восстанавливается с течением времени (см., например, Edgerton et al., 2001; Grillner, 1973; Lyalka et al., 2009b; Pratt et al., 1994; Rossignol et al., 1999). Существует несколько гипотез, объясняющих эти наблюдения. На одном полюсе находится гипотеза о том, что механизм спинальных рефлексов является достаточным для поддержания основного положения тела, хотя и требует супраспинального возбуждающего сигнала для активации. На другом полюсе находится

гипотеза, согласно которой единственной функцией спинальных сетей является превращение конкретных фазовых супраспинальных команд в двигательные паттерны постуральной коррекции. Этот принцип лежит в основе постурального контроля у миноги (Deliagina et al., 2008). Возможным способом проверки этих гипотез является замена недостающих супраспинальных возбуждающих сигналов искусственными воздействиями, например, путем тонической стимуляции спинного мозга ниже уровня расщепления. Этот подход был использован в настоящем исследовании.

Ранее установлено, что эпидуральная электростимуляция (ЭС), применяемая на дорсальной поверхности поясничного отдела спинного мозга, может вызвать ходьбу задних конечностей при острой и хронической спинализации животных с тяжелыми нарушениями локомоторных функций (Gerasimenko et al., 2003; Musienko et al., 2005). У спинальных больных ЭС может также вызвать движения, подобные шагательным (Dimitrijevic et al., 1998; Minassian et al., 2007). Можно ли также с помощью ЭС активировать спинальные компоненты постуральной системы? В данной работе этот вопрос рассмотрен на примере экспериментальной модели кролика.

Другим возможным способом активации спинальных сетей ниже уровня расщепления является воздействие на эту область различными фармакологическими средствами. Этот подход был успешно использован для активации СЛГ задних конечностей (Rossignol et al., 1998, 2001). Было показано, что эти два подхода (электрическую и фармакологическую стимуляцию) можно при желании совмещать для активации хорошо координированной ходьбы (Courtine et al., 2009; Gerasimenko et al., 2007). Также было обнаружено, что применение серотонинергетических препаратов восстанавливает постуральные рефлексy конечностей у хронических кроликов с обширными ПСМ (Lyalka et al., 2008, 2009b).

В настоящей работе описываются постуральные рефлексy конечностей у децеребрированных кроликов, исчезновение этих рефлексов после спинализации, и их частичное восстановление, вызванное отдельно ЭС,

отдельно применением квиспазина (агониста 5-HT рецепторов) и ЭС совместно с применением квиспазина.

Методы

Эксперименты проведены на 17 взрослых особях новозеландских кроликов (весом 2,5 – 3,5 кг). Под общим наркозом вживлялись ЭМГ электроды в мышцы задних конечностей (см. Гл. 2 Общая методология), осуществлялась ламинэктомия. Первая ламинэктомия была проведена на нижнем поясничном уровне, где на дорсальной стороне спинного мозга устанавливался шариковый электрод для проведения эпидуральной стимуляции ($d = 0.5$ мм). Вторая ламинэктомия была проведена на нижнем грудном и верхнем поясничном уровне для последующего поперечного рассечения спинного мозга на уровне T12, что осуществлялось под местной анестезией (ксилокаин). Позже через это отверстие под твердую мозговую оболочку была введена интратекальная канюля (силиконовая трубка длиной 200 мм, наружным диаметром = 0.7 мм, заполненная раствором Рингера) и протянута каудально до нижних поясничных сегментов. Канюля использовалась для введения химических препаратов. Затем животное децеребрировали на преколликкулярно-постмамиллярном уровне (Musienko et al., 2008). После децеребрации действие анестезии прекращалось.

Схема эксперимента представлена на рис. 21. Голову и позвоночный столб децеребрированного кролика крепко фиксировали в нескольких точках, а передняя часть туловища была подвешена с помощью специального подвесного устройства. Задние конечности были частично зафиксированы и расположены на горизонтальной платформе. Конфигурация конечностей была аналогична наблюдаемой у интактных кроликов в стоячем положении, когда бедро, колено и лодыжка изогнуты под углом около 25, 60 и 50°, соответственно (Beloozerova et al., 2003a). Дистальные части каждой стопы были мягко зафиксированы к платформе

так, чтобы расстояние между стопами (11 см) совпадало с расстоянием, наблюдаемым при стоянии у нормальных кроликов такого размера.

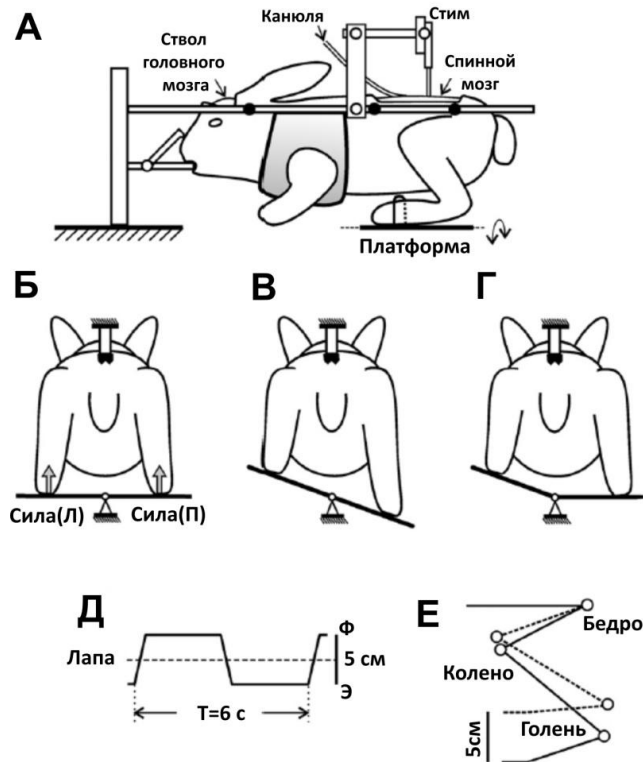


Рис. 21. Схема эксперимента и установки

Схема эксперимента

Вся платформа, или ее правая, или левая части по отдельности могли периодически наклоняться путем поворота вокруг срединной оси (рис. 21, Б-Г), что приводило к почти вертикальным перемещениям дистальной точки соответствующей конечности. Поскольку положение проксимальной точки было зафиксировано, наклоны платформы вызывали пассивные движения сгибания/разгибания (флексии/экстензии (Ф/Э)) в суставах конечностей, что приводило к соответствующему изменению функциональной длины конечности. В тестах с наклоном только одной части платформы мы могли отдельно активировать сенсорные входы каждой конечности. При наклоне всей платформы две конечности действовали противофазно (рис. 21В), так же как и у обычных кроликов, поддерживающих равновесие на наклоняемой платформе (Beloozerova et al., 2003a). В этом тесте рефлекторные механизмы обеих конечностей были

активированы, и их возможное взаимодействие можно оценить путем сравнения с рефлексам, вызываемыми движениями одной конечности.

Траектория наклона платформы и, следовательно, траектория перемещения стопы была трапециевидной (рис. 21Д), что выявляет как динамические, так и статические компоненты постуральных рефлексов конечностей. Расстояние между двумя крайними положениями (верхнее и нижнее) составляло 5 см; эти положения были симметричны относительно горизонтального положения платформы. Каждое положение удерживали в течение примерно 2,5 с, а переходы между ними занимали около 0,5 с. Как показала видеозапись, вынужденные смещения стопы (межпиковая амплитуда 5 см) вызывали движения Ф/Э в тазобедренных, коленных и голеностопных суставах, с величиной около 10° (рис. 21Е). Эти Ф/Э движения конечностей повторялись периодически ($T=6$ с).

Углы наклона левой и правой частей платформы контролировались с помощью механических датчиков, они были формализованы и записаны как изменения в вертикальном положении стопы (рис. 21Д). Силовые опорные реакции под конечностями измерялись с помощью датчиков силы (рис. 21Б).

Эпидуральная электрическая стимуляция спинного мозга осуществлялась с помощью электрода, расположенного на дорсальной поверхности спинного мозга в L5-L7 сегментах, близко к средней линии. Квипазин (концентрация: 5 ммоль, объем болюса: 100 мкл) вводили в субарахноидальное пространство спинного мозга через входное отверстие канюли (Lyalka et al., 2008). Последующие болюсные инъекции физиологического раствора (100 мкл) были сделаны, чтобы протолкнуть препарат из «мертвого» пространства канюли – 80 мкл. Положение канюли проверялось при диссекции животного после опыта. Во всех случаях кончик был размещен в L5-L7 сегментах.

Протокол эксперимента

Каждое децеребрированное животное подвергалось трем основным испытаниям. В первом тесте рефлексы конечностей были записаны перед спинализацией. Это было сделано для противофазных Ф/Э движений двух конечностей и (в части экспериментов) также для Ф/Э движений каждой из конечностей по отдельности. Во втором тесте рефлексы конечностей были записаны после спинализации. В третьем тесте был рассмотрен результат ЭС на постуральные рефлексы конечностей спинальных животных. Кроме того, для некоторых спинальных животных описывается воздействие на рефлексы конечностей, вызванное применением квиспина отдельно и совместно с ЭС. Для оценки пассивной силы ее значение было измерено при Ф/Э движениях конечностей в течение нескольких минут сразу после окончания опыта на мертвом животном.

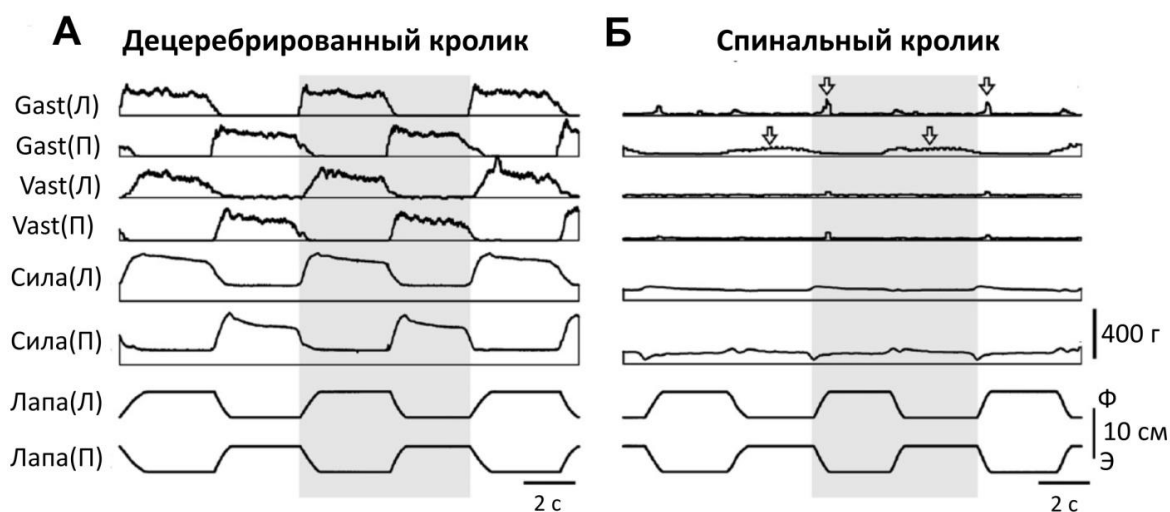


Рис. 22. Эффект спинализации на постуральные рефлексы у децеребрированного кролика. (А) ЭМГ и силовые ответы при наклонах опоры до и (Б) после спинализации. Стрелки показывают ответы низкой амплитуды в ряде мышц после перерезки спинного мозга.

Результаты

Постуральные рефлексы конечностей у децеребрированных кроликов

У всех тестируемых децеребрированных кроликов ($n = 17$) рефлекторные реакции на противофазные флексорные/экстензорные движения двух

конечностей (постуральные рефлексy конечностей) были хорошо выражены, как показано на рис. 22А. Флексия каждой конечности сопровождалась активацией ее разгибательной мышцы, латеральной икроножной мышцы (Gast) и широкой мышцы бедра (Vast), а также увеличением силы, развиваемой конечностью. Реакции обычно содержали как динамические, так и статические компоненты (см. также рис. 25, А и Б). С другой стороны, экстензия конечности вызывала не только практически полную инактивацию ее мышц-разгибателей, но также значительное снижение силы. Эти реакции сохранялись при повторном периодическом применении Ф/Э стимулов. Усредненные значения динамических и статических компонентов реакций силы были 680 ± 195 и 545 ± 110 г соответственно (*Децер* на рис. 23, А и Б). Эти величины были намного больше, чем соответствующие величины, измеренные после умерщвления животного (109 ± 10 и 93 ± 8 г, *Пассивная сила* на рис. 23А и Б). Это позволяет предположить, что вклад пассивной силы в постуральные реакции у децеребрированных животных незначителен, и его можно не учитывать.

Для всех пяти изучаемых мышц (Gast, Vast, Grac, St и TA), мы качественно охарактеризовали паттерн ЭМГ ответов, т. е. фазу ЭМГ в цикле Ф/Э движений ипсилатеральной конечности. Было использовано четыре категории: 1) активация мышцы с помощью флексии ипсилатеральной конечности, 2) активация с помощью экстензии конечности, 3) активация с помощью как флексии, так и экстензии и 4) отсутствие реакции на Ф/Э стимулы. На рис. 24 первый столбец (*Децер*) показывает соотношение различных категорий реакций в каждом конкретном типе мышц, которые были записаны у семи децеребрированных кроликов до спинализации. В подавляющем большинстве случаев, Gast и Vast были активированы при флексии конечности (93 и 86% случаев соответственно). Grac наиболее часто была активирована при флексии (70%), а в 20% случаев при экстензии. Реакции St были менее равномерными: эта мышца была

активирована при флексии конечности в 54% случаев и при ее экстензии в 38% случаях. ТА наиболее часто активировалась при флексии конечности (80%) и реже при ее экстензии (20%).

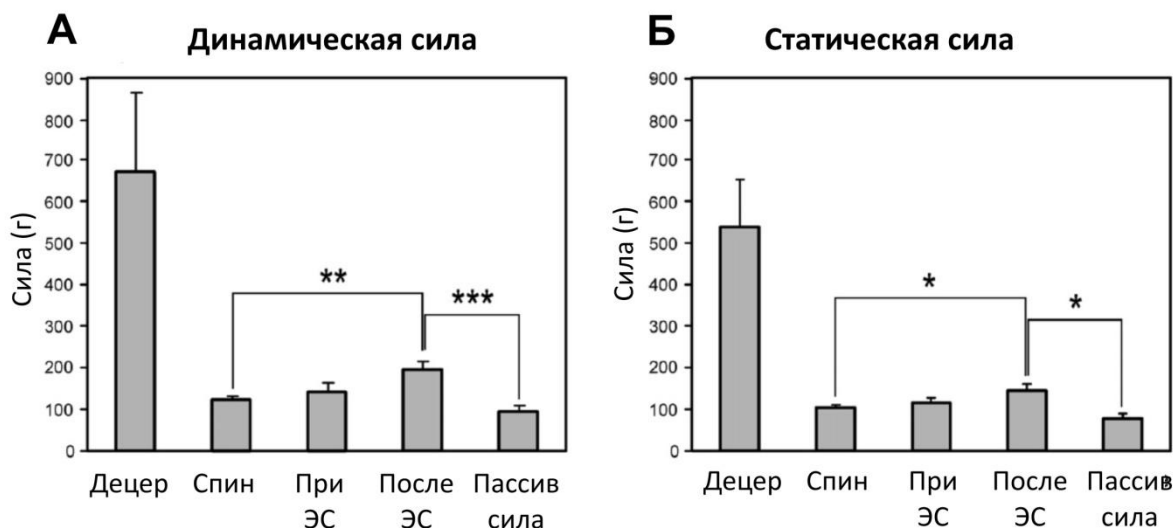


Рис. 23. Динамические (А) и статические (Б) силовые ответы в разных экспериментальных условиях. Амплитуды сил измерялись перед спинализацией (Децер, $n=9$ кроликов); после спинализации (Спин, $n=7$); во время стимуляции (при ЭС, $n=7$) после стимуляции (после ЭС, $n=7$); пассивная сила (Пассив, $n=5$). Уровень значимости: $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$.

Для выявления участия сенсорных входов каждой конечности в образование этих рефлекторных реакций мы сравнили результаты трех тестов: противофазные Ф/Э движения обеих конечностей (Ипси/Контра тест), движения только одной исследуемой конечности (Ипси-тест) и движение противоположной конечности (Контра-тест). Примеры силовых и ЭМГ ответов Gastr, полученные в этих тестах у одного из кроликов, показаны на рис. 25А и Б. Когда Ф/Э стимулы применялись только к одной исследуемой конечности, реакции незначительно уменьшились по сравнению с билатеральным применением Ф/Э стимулов. В противоположность этому, Ф/Э движения противоположной конечности вызывали очень слабые реакции в исследуемой конечности.

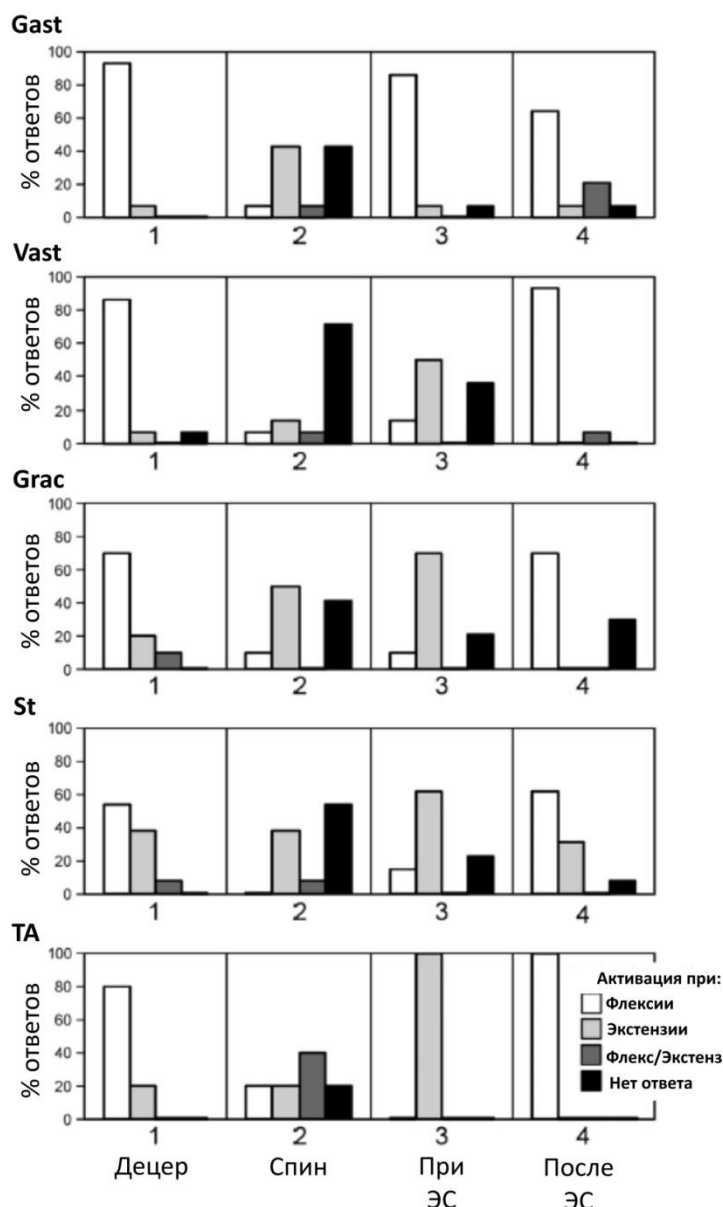


Рис. 24. ЭМГ паттерн ответов в различных мышцах на противофазные Ф/Э движения обеих конечностей. Объяснения в тексте. Количество тестированных животных: Gast ($n = 7$); Vast ($n = 7$); Grac ($n = 5$); St ($n = 7$); TA ($n = 3$). По оси Y показывается пропорция различных категорий ответов. Gast, gastrocnemius lateralis; Vast, vastus lateralis; Grac, gracilis; St, semitendinosus; TA, tibialis anterior.

Аналогичные результаты были получены во всех экспериментах, в которых оценивалось влияние соматосенсорной информации отдельных конечностей на генерацию постуральных рефлексов конечностей (рис. 25, В-3). Чтобы количественно охарактеризовать силовые и ЭМГ ответы в

Ипси/Контра и Ипси тестах, мы измерили динамический компонент реакции (его пиковое значение в начале цикла движения) и статический компонент (значение реакции сразу перед его быстрым уменьшением в середине цикла движения). Эти компоненты силового ответа ($F_{\text{дин}}$ и $F_{\text{стат}}$) показаны на рис. 25А. Для того чтобы охарактеризовать низкий уровень активности в Контра тесте, мы использовали два значения: максимальная активность в сгибательной и разгибательной части цикла движения (F_{ϕ} и F_{ψ} на рис.25А). Значения ответов были усреднены от 5 до 6 последовательных циклов в данном испытании, а затем и во всех экспериментах ($n = 6$). Усредненные силовые и ЭМГ ответы в различных мышцах показаны на рис. 25, В-З. Можно заметить, что существенных различий между ответами в Ипси/Контра и Ипси тестах не было. ЭМГ, и силовые ответы в Контра тесте были намного меньше, чем в Ипси и Ипси/Контра тестах. Кроме того, не обнаружено существенного различия между уровнями активности в сгибательных и разгибательных частях цикла. Эти данные показывают, что постуральные рефлексy в исследуемой конечности генерируются в основном в ответ на соматосенсорной входной сигнал той же самой конечности.

Влияние спинализации на постуральные рефлексy

Перерезка спинного мозга на уровне T12 оказала огромное влияние на постуральные рефлексy конечностей. Это показано на рис. 22Б для кролика, чьи рефлексy до спинализации показаны на рис. 22А. Спинализация привела к полному исчезновению рефлексорных ЭМГ ответов как в левой, так и в правой широкой мышце бедра (*Vast*), тогда как очень незначительные ответы сохранились в латеральной икроножной мышце (*Gast*) (динамические в левой, статические в правой конечности, обозначены стрелочками). Рефлексорные силовые ответы также практически полностью исчезли в обеих конечностях.

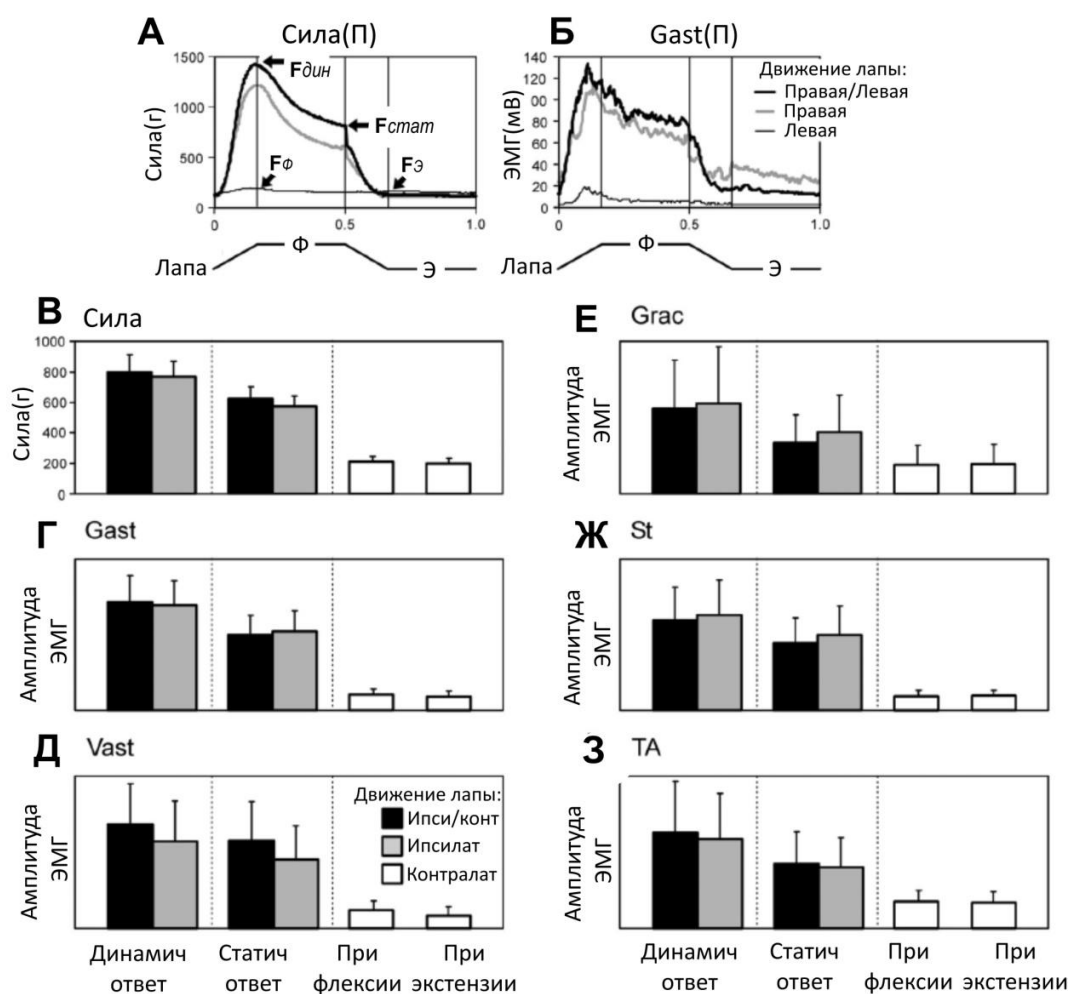


Рис. 25. Участие сенсорных входов от ипси- и контралатеральной конечности в генерации постуральных рефлексов. А и Б: пример силовых и ЭМГ (в разгибателе голени $Gast(П)$), вызванных антифазными Ф/Э движениями обеих конечностей, только правой конечности, или только левой конечности). В-З: силовые и ЭМГ ответы в $Gast$, $Vast$, $Grac$, St , и TA , зарегистрированные в Ипси/Контра, Ипси и контра тестах. В, Г и Д: $n=6$; Е: $n=3$, Ж: $n=5$, З: $n=4$.

Аналогичные результаты, то есть значительная редукция рефлексорных силовых ответов и выраженное снижение или полное исчезновение ЭМГ ответов, наблюдалось после спинализации у всех кроликов ($n = 17$). На рисунке 23, А и Б показаны средние значения динамических и статических компонентов силового ответа, наблюдаемые после спинализации ($Спин$ на рис. 23): 122 ± 9 и 105 ± 8 г, соответственно, что практически не отличалось

от показателей пассивной силы (109 ± 10 и 93 ± 8 г, соответственно) (рис. 23).

Спинализация вызвала не только резкое снижение или полное исчезновение ЭМГ ответов на противофазные Ф/Э движения конечностей, но и изменение паттернов сохранившихся реакций. Чтобы охарактеризовать эти паттерны, мы использовали те же четыре категории, что и перед спинализацией (см. выше по тексту). На рис. 24 второй столбец (*Спин*) показывает соотношение различных типов ЭМГ ответов в каждом конкретном типе мышцы, которые были записаны у спинализированных кроликов. Реакция в латеральной икроножной мышце (Gast), как правило, либо отсутствовала (43% случаев), либо была реверсирована, по сравнению с соответствующей до спинализации, т.е. латеральная икроножная мышца у спинальных кроликов активировалась при экстензии конечности (43% случаев). Широкая мышца бедра (Vast) у спинальных кроликов обычно не реагировала (71% случаев). Реакция тонкой мышцы (Grac) либо отсутствовала (43% случаев), либо была реверсирована (50%). Полусухожильная мышца либо активировалась при экстензии (разгибании) конечности (38% случаев), либо не демонстрировала реакцию (54%). Реакции передней большеберцовой мышцы (TA) были очень разнообразны: эта мышца активировалась при флексии конечности (20%), экстензии (20%), при флексии и экстензии (40%), либо не активировалась (20%).

Влияние ЭС на рефлекс конечностей

Пост-стимуляционные эффекты. Основным результатом этого исследования было то, что за ЭС спинальных кроликов последовало длительное повышение рефлекторных ЭМГ и силовых ответов на Ф/Э движения конечностей, с паттерном очень близким к наблюдаемому до спинализации. Пример этих эффектов показан на рис. 26. До стимуляции движения конечностей вызывали либо очень маленькие, либо не вызывали совсем ЭМГ и силовые ответы (рис. 26, А и Б). После чего была выполнена

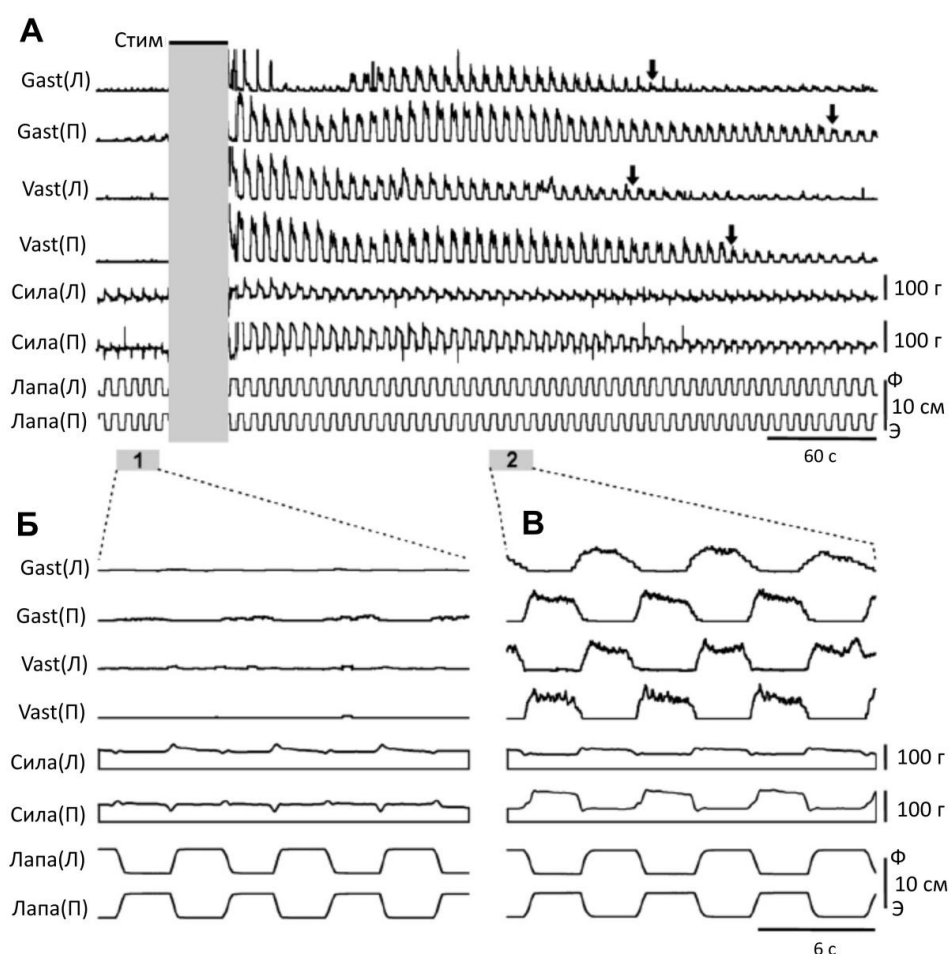


Рис. 26. Усиление постуральных рефлексов конечностей после эпидуральной стимуляции (ЭС). (А) Стимуляция (Стим) дорсальной поверхности спинного мозга на уровне L7 сегмента приводит к усилению рефлекторных ЭМГ и силовых ответов на Ф/Э противофазные движения в обеих конечностях. Отрезок данных, отмеченных 1 (до ЭС) и 2 (после ЭС) в (А) представлен в (Б) и (В). Стрелки показывают длительность постстимуляционного эффекта в разных мышцах.

стимуляции дорсальной поверхности спинного мозга на уровне L7 (продолжительность сессии, 40 с; длительность импульса 2 мс, частота, 3 импульса в секунду; ток, 450 мкА). После прекращения ЭС флексия каждой конечности вызвало активацию латеральной икроножной мышцы (Gast) и широкой мышцы бедра (Vast) этой конечности, а также увеличение силы, развиваемой конечностью (рис. 26, А и В). Эти ЭМГ и силовые ответы сохранялись в течение длительного периода времени после прекращения

стимуляции. Для каждой отдельной мышцы мы определили этот период как время, необходимое для пятикратного снижения пачек ЭМГ (относительно значения пачек непосредственно после прекращения стимуляции). В примере, показанном на рис. 26А, длительность пост-ЭС восстановления колебалась от 220 с (в левой широкой мышце бедра - Vast) до 330 с (в правой латеральной икроножной мышце - Gast).

Постстимуляционные эффекты ЭС, то есть длительное улучшение силовых и ЭМГ ответов, наблюдались у всех спинальных кроликов, при условии, что стимуляция применялась на уровне L7 и параметры стимуляции были аналогичны, указанным ранее. Как правило, восстановление длилось 50-100 с (см. рис. 28А, 29В и 30В). Как динамические, так и статические компоненты силового ответа после стимуляции увеличились примерно на 60% и 40%, соответственно (после ЭС на рис. 23) по сравнению с аналогичными до стимуляции (*спин* на рис. 23), но они были все же значительно меньше, чем проявляемые до спинализации (*децер* на рис. 23).

Паттерны ЭМГ ответов в различных типах мышц, наблюдаемые после прекращения стимуляции, были очень похожи на паттерны, наблюдаемые у децеребрированных кроликов до спинализации. На рис. 23 в четвертом столбце (*После ЭС*) показано соотношение различных категорий ЭМГ ответов каждого конкретного типа мышц, которые наблюдались у спинальных кроликов в период постстимуляционного восстановления. Во всех исследованных мышцах наиболее распространенной категорией ответов была активация мышц при сгибании конечностей, которая была также характерна для кроликов до спинализации (*Децер* на рис. 24).

При применении Ф/Э стимулов только к одной конечности во всех случаях ($n = 5$) восстановленные реакции в этой конечности сохранялись практически неизменными по сравнению с билатеральным применением Ф/Э стимулов. Это позволяет предположить, что у спинальных кроликов постуральные рефлексы конечности генерируются в ответ на

соматосенсорную информацию, получаемую от ипсилатеральной конечности, как показано на децеребрированных кроликах (см. выше).

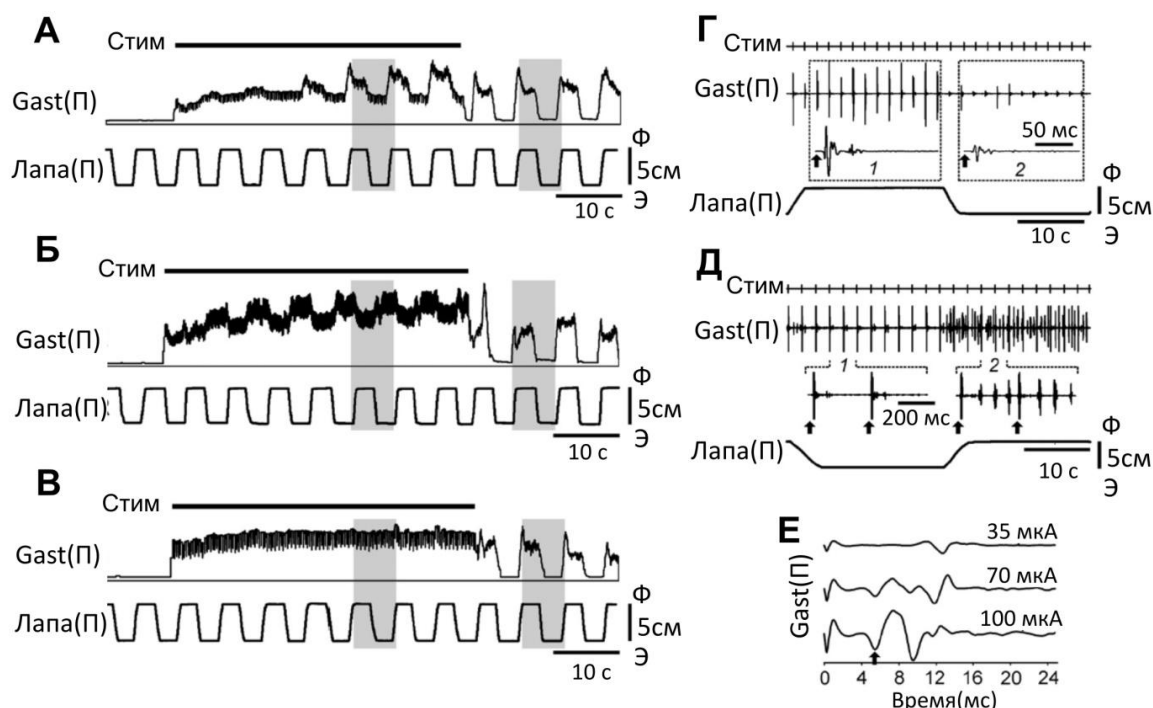


Рис. 27. Ответы в правом разгибателе голени *Gast* на антифазные Ф/Э движения при эпидуральной стимуляции. А-В: Различные паттерны ответов в *Gast*: активация при флексии конечности (А); активация при экстензии конечности (Б); отсутствие ответов (В). Г-Е: Структура ЭМГ ответов, вызванных Ф/Э движениями. Пояснения в тексте.

Эффекты во время стимуляции. Во время стимуляции происходило постепенное увеличение тонической активности разгибателей, которая достигала плато на 10-20 с после начала ЭС (рис. 27, А-В). Противофазные Ф/Э движения конечностей вызывали ЭМГ ответы в большинстве мышц, но реакции во время ЭС, как правило, были ниже, чем после ЭС (рис. 27, А-В). Аналогичным образом, ЭС не вызвала значительных изменений в значении силовых ответов по сравнению с наблюдаемыми ответами перед ЭС (рис. 23).

Эффекты, возникавшие при ЭС, как правило, осложнялись тем, что ЭМГ и силовые ответы синхронизировались стимулирующими импульсами (3 Гц) и величина этих синхронизированных реакций могла быть

модулирована Ф/Э движениями конечностей. Это проиллюстрировано на рис. 27Г. ЭМГ латеральной икроножной мышцы (Gast) содержала ритмические импульсы, которые шли с латентностью в несколько миллисекунд относительно стимулирующих импульсов; их амплитуда была большой, когда конечность была согнута, и маленькой, когда конечность была разогнута. Рисунок 27Д показывает случай, когда ЭМГ латеральной икроножной мышцы (Gast) содержала как синхронизированные реакции, так и несинхронизированную активность. Последняя модулировалась при Ф/Э движениях и присутствовала, когда конечность была согнута. Синхронизированные реакции имели сложную форму и состояли из нескольких компонентов (рис. 27Е). Задержки этих компонентов варьировались от 4 до 10 мс и их относительные значения зависели от силы стимуляции.

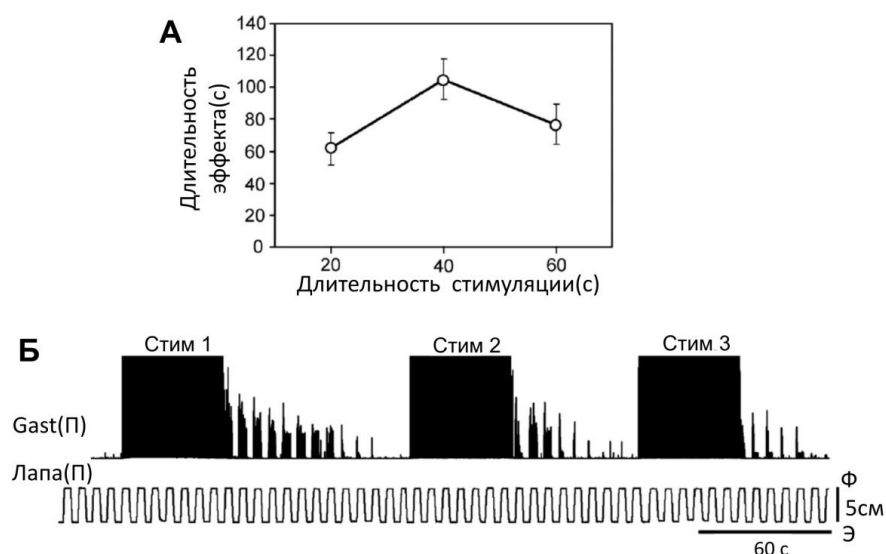


Рис. 28. Эффект длительности стимуляции (А) и повторной стимуляции (В) на усиление постуральных рефлексов после стимуляции.

Для классификации ЭМГ ответов в отдельных мышцах во время ЭС мы использовали те же четыре категории, как и при других условиях (см. выше). На рис. 24 в третьем столбце (При ЭС) показан ЭМГ паттерн и доля различных категорий ответов в каждом конкретном типе мышц, которые наблюдались у всех кроликов при ЭС. Очевидно, что большинство мышц

(четыре из пяти) были активированы преимущественно экстензией конечности. Это сильно отличается от паттерна постуральных рефлексов конечности (активация большинства мышц конечности при флексии), который наблюдался не только у децеребрированных кроликов перед спинализацией (*Децер*), но и у спинальных кроликов после прекращения стимуляции (*После ЭС*) (рис. 24).

Роль различных характеристик ЭС

Параметры стимуляции. Параметры стимуляции были важны, но не были критичны для проявления основного эффекта ЭС пост-стимуляционного восстановления рефлексов конечностей. Мы обнаружили, что оптимальные частоты находились в диапазоне 3-5 импульсов в секунду. Более низкие частоты были менее эффективны (необходим был ток большей амплитуды), в то время как более высокие частоты (10 и 50 импульсов в секунду), могли иногда вызывать ритмические подобные локомоторным вспышки в ЭМГ. В нескольких начальных экспериментах мы использовали импульсы тока длительностью 0,2 мс. Позже было обнаружено, что длительность 2 мс была более эффективной, и использовали эту длительность импульса во всех последующих экспериментах. Чтобы установить оптимальную силу тока в каждом эксперименте, мы сначала определяли пороговую силу тока (которая вызывала моторные реакции задних конечностей), а затем использовали силу тока в три-пять раз сильнее, величина которой обычно находилась в диапазоне 100-500 мкА.

Пост-стимуляционные эффекты ЭС (длительность пост-стимуляционного восстановления рефлекторных реакций и степень восстановления силовых и ЭМГ ответов) зависели от продолжительности ЭС. Мы качественно охарактеризовали, как этот фактор влияет на продолжительность восстановления рефлексов на примере трех кроликов. Было установлено, что оптимальная продолжительность стимуляции составляла около 40 с, а

при более продолжительной или менее продолжительной стимуляции длительность пост-ЭС восстановления рефлексов снижалась (рис. 28А). Продолжительность пост-ЭС восстановления также снижалась при повторяющейся стимуляции, если период повторения был меньше нескольких минут, как показано на рис. 28Б.

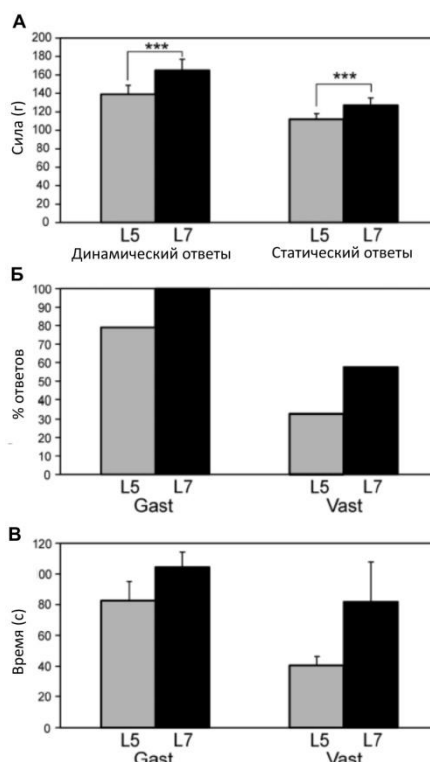


Рис. 29. Сравнение постстимуляционных ЭМГ и силовых эффектов, вызванных стимуляцией L5 и L7 сегментов спинного мозга.

Положение электрода. В поперечной плоскости стимулирующий электрод был всегда расположен близко к средней линии, чтобы избежать левой/правой асимметрии эффекта стимуляции. Чтобы оценить роль rostrocaudального положения электрода, сравнивались эффекты стимуляции двух различных сегментов, L5 и L7, у четырех кроликов. Применялись идентичные стимулы к каждой из этих двух точек, билатерально записывались ЭМГ (Gast и Vast) и силовые ответы. Как показано на рис. 29А, пост-ЭС восстановление динамической и статической составляющей силовых ответов (среднее значение $\pm$ стандартная ошибка, $n = 12$) было значительно больше при стимуляции L7, чем при стимуляции L5. Как

показано на рис. 29В, восстановление ЭМГ ответов чаще возникало после стимуляции L7, чем после стимуляции L5 (для Gast, 100% против 79%, для Vast, 58% против 33%, соответственно). Наконец, как показано на рис. 29С, период пост-ЭС восстановления был длиннее в обеих мышцах при стимуляции L7, чем при стимуляции L5. По причине своей высокой эффективности, стимуляция L7 использовалась в большинстве экспериментов настоящего исследования.

Влияние квиспазина на рефлекс конечности

Влияние квиспазина изучалось на восьми спинальных кроликах. Рисунок 30А-С показывает основные характеристики пост-ЭС реакций на Ф/Э стимулы в этой группе животных при двух условиях: когда проводилась только ЭС и когда она выполнялась в течение 1-2 ч после применения квиспазина. Квиспазин вызывал умеренное увеличение динамических и статических компонентов силовых ответов (рис. 30А) и значительное (в два-четыре раза) увеличение ЭМГ ответов (рис. 30Б). Квиспазин также вызывал более чем двукратное увеличение длительности пост-ЭС восстановления рефлексов (рис. 30В).

Для классификации ЭМГ ответов отдельных мышц (Gast и Vast) в экспериментах с применением квиспазина мы использовали те же четыре категории, что и в других экспериментах (см. выше по тексту). Рисунок 30 D и E показывает ЭМГ паттерны - то есть соотношение различных категорий ответов в Gast и Vast, проявляемых всеми восемью кроликами в различных условиях. Перед ЭС и перед введением квиспазина (*столбец 1*) мышцы чаще всего не активировались при применении Ф/Э стимулов. Перед ЭС и после введения квиспазина (*столбец 2*), около 60% мышц ответили на Ф/Э стимулы, превалировала активации при флексии конечности. Во время ЭС и перед введением квиспазина (*столбец 3*) активация при флексии конечностей преобладала в Gast, а при экстензии – в Vast. Этот паттерн практически не изменился после применения квиспазина (*столбец 4*). Наконец, квиспазин практически не оказывал

влияния на ЭМГ паттерн после ЭС: обе мышцы были активированы при флексии конечности (сравните *столбцы 5 и 6*), хотя постральные реакции под действием квиспазина восстанавливались сильнее (рис. 30, А-В).

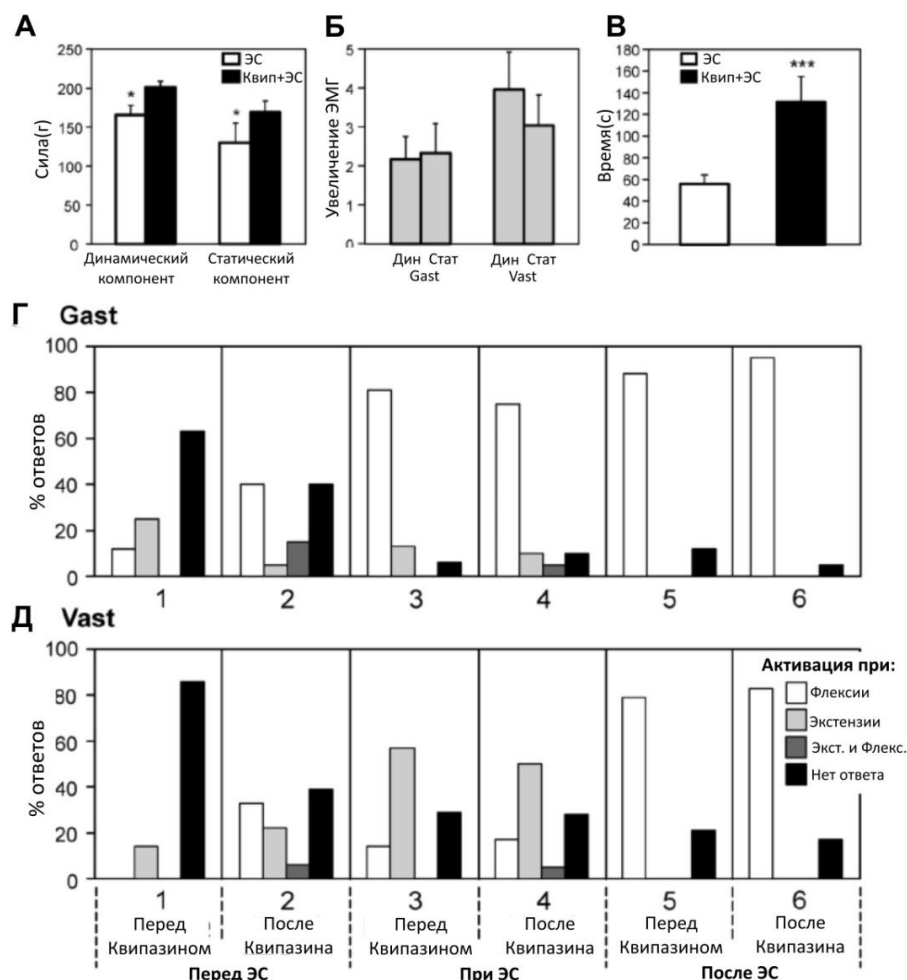


Рис. 30. Эффекты введения квиспазина. (А) и (Б) Эффекты квиспазина на силовые и ЭМГ ответы. (В) Длительность периодов постстимуляционных эффектов усиления постральных рефлексов. (Г),(Д) Паттерн ЭМГ ответов на Ф/Э движения конечностей в Vast и Gast. По оси Y показывается пропорция различных категорий ответов.

Обсуждение

Восстановление рефлексов спинальных конечностей с помощью электрической стимуляции спинного мозга

Полный разрыв спинного мозга у млекопитающих вызывает спинальный шок. Характерной особенностью начального периода спинального шока является резкое снижение или полное исчезновение мышечного тонуса и

многочисленных рефлексов конечностей. Позднее происходит частичное восстановление и реорганизация рефлексов, сопровождаемое развитием спастичности (Ditunno et al., 2004; Harkema, 2008; Ko et al., 1999; Valero-Cabre et al., 2004).

В настоящем исследовании рассматривался вопрос о том, возможно ли восстановление спинальных рефлекторных механизмов в начальном периоде спинального шока при помощи электрической стимуляции спинного мозга ниже поражения. Использовалась техника эпидуральной электростимуляции (ЭС) дорсальной поверхности спинного мозга в поясничном отделе. Ранее этот метод успешно применялся для активизации локомоторных сетей у спинальных животных (Gerasimenko et al., 2008). Конкретная цель данного исследования заключалась в активации рефлексов, ответственных за постуральный контроль. Чтобы вызвать эти рефлексy, задние конечности децеребрированного кролика с зафиксированным позвоночным столбом располагались на платформе. Периодические латеральные наклоны платформы вызывали противофазные движения флексии-экстензии (Ф/Э) конечностей с амплитудой и конфигурацией, аналогичными тем, которые изучались в более ранних исследованиях, где интактные кролики поддерживали равновесие на периодически наклоняемой платформе (Beloozerova et al., 2003a).

У децеребрированных кроликов перед спинализацией такие Ф/Э движения вызывали энергичные рефлекторные реакции, включая активацию разгибательных мышц лодыжки, колена, бедра (Gast, Vast, Grac) в сгибаемой конечности, что приводило к значительному увеличению силы этой конечности (рис. 22-24). Увеличение ЭМГ разгибателей и увеличение силовых опорных реакций под лапами при сгибании конечности говорит о стабилизирующем постуральном эффекте. Таким образом, эти рефлекторные реакции можно называть "постуральными рефлексами конечностей". Коактивация мышц-разгибателей и некоторых бифункциональных мышц, в частности, St, является характерной чертой

постуральных реакций на боковые наклоны у интактных кроликов (Beloozerova et al., 2003a; Deliagina et al., 2000). У децеребрированных кроликов сгибание конечности также было связано с активацией мышц-сгибателей лодыжки (ТА). Активация ТА вместе с мышцами-разгибателями не наблюдалась у интактных кроликов. Это позволяет предположить, что мышечная синергия постуральных рефлексов конечностей, сформированная у децеребрированных кроликов, несколько отличается от нормальной постуральной синергии.

После спинализации силовые ответы на сгибание конечности, практически, отсутствовали (не отличались от пассивной силы; Рис. 23). ЭМГ ответы либо исчезли, либо их величина значительно снижалась. Более того, многие из остаточных реакций в мышцах-разгибателях демонстрировали обратный паттерн – эти мышцы активировались не при сгибании конечности, как у децеребрированных кроликов, а при разгибании (рис. 24), что свидетельствовало о дестабилизации постуральных эффектов. Таким образом, спинализация приводит к нарушению постуральных рефлексов конечностей. Похожие результаты – резкое снижение величины ЭМГ ответов на наклоны, а также появление ответов в неправильных фазах – наблюдались у бодрствующих кроликов с тяжелым ПСМ при тестировании на наклоняемой платформе (Lyalka et al., 2008, 2009a,b).

Основной результат этого исследования заключается в выявлении восстановления у спинальных кроликов рефлексов конечностей при ЭС как в период стимуляции, так и в течение длительного периода (до нескольких минут) после нее. Однако паттерны восстановленных рефлексов существенно различаются в эти два периода.

В пост-ЭС период восстановления все мышцы (Gast, Vast, Grac, St и ТА) были активированы при сгибании конечности. Этот паттерн подобен тому, который был продемонстрирован децеребрированными кроликами до спинализации (рис. 24), что позволяет предположить и восстановление постуральных рефлексов конечностей после ЭС. ЭМГ и силовые ответы

содержали как динамические, так и статические компоненты (рис. 25). Присутствие статических компонентов позволяет предположить, что ЭС привела к восстановлению разгибательного тонуса. Тем не менее, величина восстановленных рефлексов конечности у спинальных кроликов была значительно меньше, чем у децеребрированных (рис. 23).

Во время ЭС большинство мышц (Vast, Grac, St и TA) продемонстрировали обратный паттерн постуральных реакций – то есть, они активировались при разгибании конечности, и только одна мышца (Gast) активировалась при сгибании конечности (рис. 24). В общем, во время стимуляции ЭМГ ответы были слабее, более сложными и переменными (из-за синхронизации импульсов ЭС), чем те, которые наблюдались в период восстановления после ЭС. Увеличения силовых ответов во время ЭС не наблюдалось (рис. 23). Так как активация мышц-разгибателей при их сокращении может оказывать дестабилизирующее постуральное воздействие, рефлекторные реакции, восстановленные во время ЭС, не могут рассматриваться как постуральные рефлексы конечностей. Эти результаты показывают, что ЭС может восстанавливать две различные группы рефлексов конечностей, с преобладающими мышечными реакциями либо на экстензию конечности (не постуральные рефлексы, восстановленные во время ЭС), либо на флексию конечности (постуральные рефлексы конечностей, восстановленные после ЭС).

Таким образом, спинной мозг содержит сети, отвечающие за возникновение постуральных рефлексов конечностей. Можно предположить, что у интактных кроликов конкретный супраспинальный тонический сигнал используется для выбора и активации этих сетей. Полученные данные свидетельствуют о том, что ЭС частично заменяет этот супраспинальный сигнал (отсутствующий после спинализации), что приводит к активации рефлекторных механизмов системы постурального контроля, находящейся в спинном мозге. Низкая эффективность постуральных рефлексов конечностей у спинальных животных может быть

вызвана двумя причинами: 1) недостаточная активация спинальных постуральных сетей при помощи ЭС и 2) отсутствие супраспинальных корректирующих команд, которые дополняют спинальные постуральные рефлексy.

Сенсорное происхождение рефлекторных реакций

В предыдущих исследованиях была описана функциональная организация постуральной системы кошек и кроликов, ответственная за латеральную стабильность, а также влияние различных типов повреждения спинного мозга на эту систему (Beloozerova et al., 2003a; Deliagina et al., 2000, 2006b; Lyalka et al., 2005, 2009a,b). Было показано, что система состоит из трех относительно независимых подсистем, которые стабилизируют ориентацию головы, передней части туловища, а также его задней части (Beloozerova et al., 2003a; Deliagina et al., 2000, 2006b). Стабилизирующие туловище подсистемы управляются соматосенсорными входами соответствующих конечностей, а рефлекторные механизмы отдельных конечностей играют важную роль в генерации постуральных коррекций (Beloozerova et al., 2003a; Deliagina et al., 2006b). Было также показано, что обширные ПСМ приводят к сильному нарушению этой системы (Lyalka et al., 2005, 2009a,b).

Различные группы афферентов конечностей могут отвечать за постуральные реакции у нормальных кроликов, сохраняющих равновесие на наклоняемой платформе (Duysens et al. 2000; Horak and Macpherson 1996). К ним относятся и рецепторы растяжения (мышечные веретена) и рецепторы нагрузки (сухожильные органы Гольджи, рецепторы давления на стопе). Постуральные рефлексy конечностей, вызванные противофазными Ф/Э движениями всей конечности у децеребрированных кроликов (активация мышц-разгибателей при сгибании конечности и нагрузке; рис. 22А), были в основном похожи не только на рефлексy нормальных кроликов, но и на те, которые были вызваны мультисуставными движениями одной конечности у децеребрированных кошек (Hyngstrom et al., 2008). Утверждается, что

наиболее вероятным источником этих реакций был входной сигнал от рецепторов растяжения мышц-веретен, который передается группой Ia и группой II афферентов.

Вполне вероятно, что постуральные рефлексy конечностей, которые мы наблюдали у спинальных животных в пост-ЭС период восстановления (активация мышц-разгибателей при сгибании и нагрузке на конечность; рис.26С), были вызваны прежде всего входным сигналом от рецепторов растяжения мышц-разгибателей, в то время как входной сигнал от рецепторов нагрузки играет второстепенную роль. Во-первых, величина силы, созданной конечностью, была относительно мала по сравнению с силой у стоящих интактных животных (Beloozerova et al. 2003a). Эта сила кажется недостаточной для того, чтобы вызвать значительную реакцию в сухожильных органах Гольджи (Matthews, 1972). Во-вторых, у животных в состоянии покоя основным эффектом активации 1b волокон этих рецепторов является торможение мотонейронов мышц-разгибателей (Matthews, 1972). Чтобы вызвать их возбуждение, необходимо полное изменение 1b рефлексов. Такое изменение рефлекса наблюдалось при локомоции, вызванной не только стимуляцией мезэнцефалической локомоторной области децеребрированных кошек, но и применением фармакологической стимуляции спинальных кошек (Gossard et al., 1994).

Остается неясным, однако же, включают ли в себя пост-ЭС эффекты, в дополнение к восстановлению рефлексов конечностей, также изменение 1b рефлексов. Ответ на этот вопрос важен для понимания возможного участия рефлексов конечностей в постуральном контроле. Например, в задаче поддержания равновесия на наклоняемой платформе, обратная связь, основывающаяся на рецепторах растяжения, будет способствовать латеральной стабильности за счет увеличения жесткости конечности, когда та сгибается под действием нагрузки. С другой стороны, обратная связь, основывающаяся на рецепторах нагрузки, может привести к разгибанию нагруженной конечности, что способствует поддержанию нормального

положения тела на наклонной плоскости (для обсуждения см. Lyalka et al., 2008, 2009; Musienko et al., 2008).

Во время ЭС наблюдались обратные реакции – то есть, активация мышц-разгибателей при их пассивном укорочении. Аfferентный источник этих реакций неясен. Маловероятно, что активация мышц была вызвана их собственными веретенами и сухожильными аfferентами. Более вероятно, что активация была вызвана аfferентами антагонистических мышц.

У четвероногих животных латеральная стабильность задней части тела основывается не только на активности рефлекторных механизмов отдельных конечностей, но и на их взаимодействии из-за взаимного влияния, вызванного перекрестными рефлексами (Deliagina et al. 2006b). В настоящем исследовании, однако, не было выявлено значительного межконечностного влияния у децеребрированных кроликов и спинальных кроликов, которым проводилась ЭС. Можно заключить, что постуральные рефлексы конечностей были вызваны входными сигналами от аfferентов ипсилатеральной конечности. Этот факт позволяет предположить, что ЭС не восстанавливает перекрестные рефлексы, участвующие в поддержании латеральной стабильности у интактных кроликов.

Сочетание ЭС с применением кvipазина

Известно, что серотонинергические препараты способствуют активации некоторых спинальных механизмов, связанных с постуральным контролем. Как продемонстрировано Miller et al. (1996), возбудимость мышц-разгибателей у острых спинальных кошек может быть увеличена с помощью 1-(2,5-диметокси-4-иодофенил)-2-аминопропан (DOI, 5-HT₂ агонист). Наши последние исследования (Lyalka et al., 2008) показали, что как серотонин, так и кvipазин (препарат широкого действия, но преимущественно 5-HT₂ агонист), при введении в поясничную область спинного мозга хронических кроликов с частичным ПСМ способствовали восстановлению постуральных рефлексов конечностей.

В настоящем исследовании мы рассмотрели вопрос о том, эффективен ли квивазин также для острых спинальных кроликов, и может ли он увеличить эффект от ЭС. Было установлено, что квивазин, применяемый отдельно, мог способствовать восстановлению рефлексов конечностей, в том числе, рефлексов, задействованных в постуральных реакциях (активация мышцы-разгибателя при флексии конечности и нагрузки) и не постуральных (обратных) реакций (рис. 30, Г и Д). Таким образом, активация рефлексов конечностей квивазином была менее селективной, чем пост-ЭС активация.

При применении квивазина в сочетании с ЭС основной эффект от ЭС (т.е. пост-ЭС восстановление постуральных рефлексов конечностей) значительно увеличился (рис. 30, А-В), несмотря на то, что сам квивазин восстанавливал как нормальные, так и обратные реакции (сравнение в столбцах 1 и 2 на рис.30, Г и Д).

Структуры, отвечающие за эффекты ЭС

Специфические нейронные группы, которые отвечают за эффекты ЭС не известны. Вероятные нейронные структуры, активируемые с помощью ЭС, были рассмотрены в работах, посвященных локомоторным эффектам ЭС у крысы (Gerasimenko et al., 2006, 2008; Lavrov et al., 2006). Было обнаружено, что ЭМГ ответы были частично синхронизированы ЭС импульсами и содержали три компонента (ранний, средний и поздний), с латентной задержкой примерно в 3, 5 и 9 мс соответственно. Было высказано мнение, что начальный компонент отражал прямое возбуждение моторных аксонов или мотонейронов, в то время как средний и поздний компоненты отражали моно-и полисинаптическое возбуждение мотонейронов.

В настоящем исследовании обнаружено, что синхронизированные ЭМГ ответы во время ЭС также состояли из нескольких компонентов с их задержкой в пределах 4 – 10 мс (рис. 27Е). По аналогии с исследованиями на крысах и кошках (Мусиенко и др., 2005; Gerasimenko et al., 2006), самый начальный компонент может быть связан с прямым возбуждением мотонейронов (или их аксонов), а поздние компоненты могут быть

отнесены к их моно- и полисинаптическому возбуждению. Несинхронизированный компонент ЭМГ ответа (*Часть 2* на рис. 27Д), скорее всего, был результатом активности в полисинаптическом проводящем пути. Этот вопрос, однако, требует дальнейшего изучения.

Как показано в настоящем исследовании, эффекты ЭС продлились дольше, чем сама ЭС. Кроме того, эффекты после прекращения ЭС, как правило, были гораздо более однородными и заметными, чем эффекты во время ЭС. Наша интерпретация этих результатов состоит в том, что существуют две различные спинальные сети, активируемые с помощью ЭС. Первая сеть аккумулирует тонический эффект ЭС и вызывает длительную активацию постуральных рефлексов конечностей. Вторая сеть активна во время ЭС. Она не участвует в активации постуральных рефлексов конечностей, а, скорее, искажает нормальное функционирование первой сети. Можно предположить, что вторая сеть участвует в локомоторных эффектах ЭС (Gerasimenko et al., 2008).

В настоящем исследовании сравнивалась эффективность стимуляции на уровне L5 и L7 сегментов. Обнаружено, что стимуляция на уровне L7 была более эффективна (рис. 29). Этот результат позволяет предположить, что нейронные сети, вызывающие восстановление постуральных рефлексов конечностей, распределены неравномерно в поясничном отделе спинного мозга. Конкретное rostrocaudальное распределение пулов мотонейронов у кроликов (Portal et al., 1991) также может вносить вклад в различия между сегментами. Аналогичный вывод был сделан для нейронных сетей, ответственных за локомоторные эффекты (Gerasimenko et al., 2007a; Ichiyama et al., 2005).

Итак, настоящее исследование показало, что постуральные сети присутствуют в спинном мозге кролика, но они не активны у спинальных животных из-за отсутствия супраспинального возбуждающего сигнала. ЭС может частично заменить этот возбуждающий сигнал и в определенной степени активизировать спинальные постуральные сети.

Предположительно, нейронные сети у интактных животных, скорее всего, активируются тоническими супраспинальными сигналами. При активации эти сети генерируют соответствующие рефлексy конечностей, необходимые для выполнения постуральных задач (постуральные рефлексy конечностей). У интактных животных они участвуют в генерации постуральных коррекций. Эффекты ЭС могут быть увеличены путем применения квилпазина, но это увеличение не является достаточным для полного восстановления постуральной функции у спинальных животных. Поэтому требуется дальнейший поиск других факторов, способствующих активации спинальных постуральных рефлексов.

Глава 4.

НЕЙРОРЕЦЕПТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЛОКОМОЦИИ И ПОЗЫ У СПИНАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Введение

Нисходящие моноаминергические системы оказывают важнейшее действие на нейронные сети спинного мозга через рецепторы, находящиеся на спинальных нейронах. Их можно подразделить на три группы: рецепторы к серотонину (5-НТ), норадреналину (НА) и дофамину (ДА). Функциональные отношения между определенными рецепторами и управлением процессом ходьбы, мышечного тонуса и позы плохо изучены. Чтобы выявить эти отношения, в настоящей работе на отдельные рецепторы к моноаминам воздействовали специфическими фармакологическими препаратами при локомоторной активности, вызванной электрической стимуляцией спинного мозга (ЭС) спинализированных крыс. В результате детального анализа выяснялись нейрофармакологические механизмы контроля спинальных нейронных сетей нисходящими системами головного мозга.

Основной целью исследования являлось выяснение способа манипуляции различными системами рецепторов для управления сложным процессом движения у парализованных животных. Мы основывались на многогранной и адаптивной природе двигательных сетей для того, чтобы изучить возможности моноаминергических систем в модуляции ходьбы с желаемыми свойствами. *Во-первых*, выяснялось, какие специфические свойства двигательных паттернов модулируются различными 5-НТ, НА и ДА рецепторами. *Во-вторых*, проверялась гипотеза, что такая нейрорецепторная модуляция ходьбы может быть использована для

предсказания взаимодействий при одновременной стимуляции различных рецепторов к моноаминам.²

Методы

Эксперименты проведены на 39 взрослых самках крыс линии Sprague Dawley (вес тела – 300 г), которым проводилась спинализация на Th7 и вживление двух эпидуральных электродов на уровне L2 и S1 сегментов спинного мозга. Последовательность хирургических процедур, контроль состояния животных, регистрация и обработка сигналов описаны в главе 2 Общая методология.

Протокол опытов

Период восстановления после хирургического вмешательства для всех испытуемых крыс составлял 5 недель для достижения стабильного уровня возбудимости в спинальных сетях, и стабильной ходьбы, вызываемой ЭС (Lavrov et al., 2008). Крепление передней части тела использовалось для установки крыс на движущейся ленте тредбана и для частичного поддержания их массы тела при бипедальной локомоции (см. рис. 31). Автоматизированная и сервоуправляемая система поддержки веса тела (Robomedica) измеряла и обеспечивала оптимальную поддержку веса тела крысы, необходимую для шагания. ЭС использовалась для инициации локомоции и осуществлялась между активным электродом (L2 или S1) и индифферентным электродом, расположенным подкожно на латеральной поверхности тела. Частота и интенсивность стимуляции были подобраны (40 Гц, 0,2 мс, 50-200 мкА) для получения оптимального эффекта активации спинальных локомоторных сетей. Все экспериментальные испытания проводились по одному и тому же протоколу (рис. 31В). Сначала регистрировались 10 последовательных циклов шагания во время ходьбы

² Работа проводилась совместно с лабораторией экспериментальной нейрореабилитации проф. G.Courtine, Университет Цюриха, Швейцария

по движущейся ленте тредбана (13 см/с), вызванной эпидуральной стимуляцией двух сегментов спинного мозга (L2+S1). Затем изучались эффекты отдельных фармакологических средств и их комбинаций. Когда эффект фармакологического средства достигал своего пика (через 10-15 минут после введения), также регистрировались 10 последовательных циклов шагания в тех же экспериментальных условиях, что и до введения лекарства.

Экспериментальные группы

Группа 1. Чтобы определить эффективные и безопасные дозы фармакологического модулирования шагания, а также длительность эффекта препаратов, в первой группе крыс (n=14) применяли различные концентрации селективных агонистов и антагонистов для исследования влияния на серотониновые, дофаминовые и норадреналиновые рецепторы. Видеозаписи на тредбане проводились до введения препарата и через регулярные промежутки времени от 10 минут до 2 часов после его введения. Эти экспериментальные данные были использованы для определения оптимальной концентрации лекарств и времени после введения для тестирования крыс 2-й группы.

Группа 2. После завершения предварительных испытаний в первой группе экспериментальные записи проводились во второй группе крыс (n=7), в которой подробно исследовался вклад серотониновых, дофаминовых и норадреналиновых рецепторов в модуляцию паттернов шагания. В общей сложности были протестированы 16 фармакологических средств. Испытания проводились через день в течение 4 недель (31 день), начиная с 5 недели после хирургического вмешательства (см. рис. 31). Каждая сессия тестирования состояла из серии 10-20 шагов с ЭС и 10-20 шагов с ЭС после применения одого или нескольких фармакологических средств (см. рис. 31А). В течение следующего после испытания дня крысы восстанавливались. Эффект любого используемого в данном эксперименте фармакологического средства полностью исчезал за время, отведенное на

восстановление. Тестирование влияния агонистов и антагонистов на различные рецепторы было случайным по отношению к дням и крысам.

Группа 3. На основании результатов, полученных в группе 2, далее мы испытывали эффекты отдельных лекарств и комбинаций нескольких агонистов или антагонистов рецепторов к серотонину, дофамину и норадреналину на модуляции двигательных паттернов ($n=7$). Испытания проводились в течение 2-3 недель, начиная с 5 недели после хирургического вмешательства (см. рис. 31А). Только один препарат или одна комбинация препаратов проходили испытание на каждой крысе в данный день тестирования. Различные комбинации препарата были выбраны случайным образом по отношению к дням и крысам.

Группа 4. Для получения репрезентативной базы шагательных характеристик интактных животных проводились испытания бипедальной локомоции по движущейся ленте тредбана восьми крыс без повреждения спинного мозга.

Фармакологическое воздействие

Исследовались серотониновые, дофаминовые и норадреналиновые рецепторы, которые, как было доказано ранее, участвуют в генерации или модуляции локомоций у млекопитающих (Chau et al., 1998a; Madriaga et al., 2004; Guertin and Steuer, 2005; Gerasimenko et al., 2007; Lapointe and Guertin, 2008; Courtine et al., 2009; Liu et al., 2009). Были подобраны агонисты и антагонисты к различным тестируемым рецепторам, основываясь на результатах предыдущих исследований (см. Результаты). Эти фармакологические средства имеют селективную степень аффинности («родства») с определенными подтипами рецепторов. Были использованы комбинации агонистов и антагонистов, когда это представлялось возможным, для увеличения селективной активации определенного рецептора (например, 5-HT_{1A} and 5-HT₇). Тем не менее, абсолютно селективную активацию одного подтипа трудно достичь фармакологически, и это ограничение необходимо учитывать при интерпретации

представленных результатов. Стоит отметить, однако, что мы получили воспроизводимое картирование локомоторных функций конкретных рецепторов всех исследуемых крыс, что говорит о надежности функциональных связей между определенными рецепторами и паттернами модуляции ходьбы. Применялось подкожное (8-OHDPAT) или внутрибрюшинное (все остальные) введение препаратов. Большинство антагонистических препаратов не оказывало или оказывало ограниченное воздействие на локомоцию, вызванную ЭС спинного мозга крыс, что и ожидалось из-за прерывания нисходящих моноаминергических путей. Чтобы установить, все ли рецепторы спинного мозга были блокированы вследствие инъекции каждого конкретного антагониста, за данными исследованиями последовали систематические инъекции соответствующего агониста, которые во всех случаях не смогли модулировать локомоцию (данные не показаны). В комбинациях агонистов и антагонистов применялись концентрации лекарств, идентичные тем, которые использовались для препаратов по отдельности.

Анализ данных

В результате сбора экспериментальных данных получали по 10 последовательных локомоторных циклов левой и правой задней конечности при непрерывной последовательности шагания по движущейся ленте тредбана каждой крысой при всех условиях. В случае отсутствия шагательных движений в определенных условиях производилась запись 10 секунд, которая потом анализировалась. В общей сложности для каждой конечности и каждого цикла шага в настоящем исследовании рассчитывалось 129 параметров (Табл. 1), включая количественную оценку шагания, кинематику, кинетику и ЭМГ характеристики, в соответствии с методами, описанными подробно ранее (Courtine et al., 2005, 2008, 2009). Эти параметры предоставляли целостное количественное описание локомоторных паттернов, от общих особенностей походки до тонких деталей движения конечностей и координации. Для прямого сравнения

различных экспериментальных условий все вычисленные параметры были нормализованы к измеренным перед введением химических препаратов (то есть, когда локомоция генерировалась только при ЭС).

Фармакологические средства, используемые в данном исследовании, как правило, существенно модулировали паттерны шагания. Это оказывалось очевидным, поскольку модифицировалась большая часть из 129 вычисленных параметров. Чтобы оценить наиболее важные и воспроизводимые модуляции паттернов, вызванных применением различных препаратов, была создана многоступенчатая статистическая методика, основанная на анализе главных компонент (ГК) (Courtine et al., 2009). Этапы анализа подробнее описаны далее в результатах. Анализ главных компонент (ГК) применялся для данных, полученных из всех отдельных циклов шагания каждой крысы, а также всех крыс совместно, как указано в тексте и на рисунках (Рис. 31Ж). Для анализа данных использовался метод корреляции, который приводит среднее значение данных к 0 и стандартное отклонение к 1. Этот способ позволял сравнивать переменные с сильно различающимися значениями (большие с малыми), а также различными стандартными отклонениями. Были выделены Главные Компоненты и вычислена метка ГК по каждой из трех осей для количественного выражения различия между условиями.

В подавляющем большинстве случаев, ГК1 отличал локомоцию, вызванную ЭС (контроль), или ЭС совместно с действием антагонистического препарата, от локомоции, вызванной ЭС совместно с активацией испытываемого рецептора агонистом (см. рис. 33). Кроме NA_2 рецепторов, ГК2 и ГК3 относились к уникальным особенностям ходьбы и/или естественной изменчивости шага и, следовательно, не рассматривались в дальнейшем анализе.

Переменные, которые показали самый высокий коэффициент нагрузки (0,6 или более) на ГК1 (т.е. корреляции между каждой переменной и ГК, которая объяснила самый большой процент колебания данных) определили

параметры, на которые приходится наибольшее количество эффектов, вызванных препаратами, и были использованы для построения функциональных карт. Затем выделялись категории локомоторных подфункций для перегруппировки взаимосвязанных параметров в функциональные кластеры. Такой кластерный анализ позволил нам разработать подкарты, которые показывают специально модулируемые функции для каждого рецептора и косвенную степень их модуляции. Так как было вычислено большое количество параметров, выделялись только те переменные, которые показали наибольшие факторные нагрузки во всех экспериментах (рис. 34). Все данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка. Повторные измерения ANOVA были использованы для проверки различий между локомоторными параметрами, зарегистрированными до и после инъекций препаратов.

Результаты

Алгоритм определения модуляций паттернов шагания

Полная перерезка спинного мозга на среднегрудном уровне ($\approx T7$) приводила к необратимому повреждению всех супраспинальных входов к нейронным сетям ниже перерезки. Для достижения стабильного уровня возбудимости спинальных сетей при ЭС (Lavrov et al., 2006, 2008) крысам давали восстановиться перед началом экспериментальных записей в течение 5 недель вслед за перерезкой (рис. 31В). В последующие 4 недели (6-9 недели после спинализации) крысы демонстрировали отсутствие (рис. 31Г) или ограниченную спонтанную локомоторную активность задних конечностей (рис. 31Д) при поддержке их в бипедальном положении на движущейся ленте требана (13 см/с) (рис. 31А). Тоническая ЭС (40 Гц, 0,2 мс, 50-200 мкА), применяемая на дорсальной поверхности спинного мозга в области S1 и L2 сегментов (рис. 31Б), вызывала непрерывную локомоцию задних конечностей на движущейся ленте требана всех исследуемых крыс (рис. 31Е).

Фармакологическое действие на отдельные рецепторы приводило к четким и выразительным эффектам модуляции различных аспектов двигательной активности. При воздействии на другие рецепторы к моноаминам довольно трудно было определиться с вызываемыми феноменами. Поэтому была специально разработана новая пятиступенчатая методика, основанная на математическом анализе главных компонент (ГК). Такой подход позволял количественно и объективно оценить специфические модуляции паттернов шагания. Для демонстрации и объяснения базового алгоритма анализа далее количественно оценивались специфические эффекты, вызываемые ЭС в сравнении со спонтанной локомоцией (рис. 31Ж).

Шаг 1

Было определено в общей сложности 129 параметров (Табл. 1), подробно количественно описывающих кинематические, кинетические и ЭМГ характеристики паттернов шагания задних конечностей каждой крысы (Courtine et al., 2009).

Шаг 2

Анализ ГК был применен ко всем вычисленным параметрам как для каждой крысы отдельно, так и для всех крыс совместно. С помощью такого анализа создавались новые переменные (ГК), которые линейно комбинируют исходные переменные для увеличения количества объяснимых дисперсий для каждого последующего ГК.

Шаг 3

После визуализации циклов ходьбы в 3-D пространстве, образованном новыми переменными ГК1-3 (37% объяснимой дисперсии) (рис. 31Ж, Шаг 2), становится очевидна разница между спонтанной локомоцией и локомоцией, вызванной ЭС (все крысы и сессии) (рис. 31Ж, Шаг 3). Точки данных, относящиеся к ЭС, сгруппированы в определенном месте, что подчеркивает повторяемость электрически стимулируемых паттернов шагания по времени проведения исследования (5-8 недель) и среди всех

крыс (n = 7). Для сравнения, распределение точек данных, относящихся к спонтанной локомоции, демонстрирует широкое разнообразие движений (от полного паралича (рис. 31Г) до случайных плантарных шагов (рис. 31Д)).

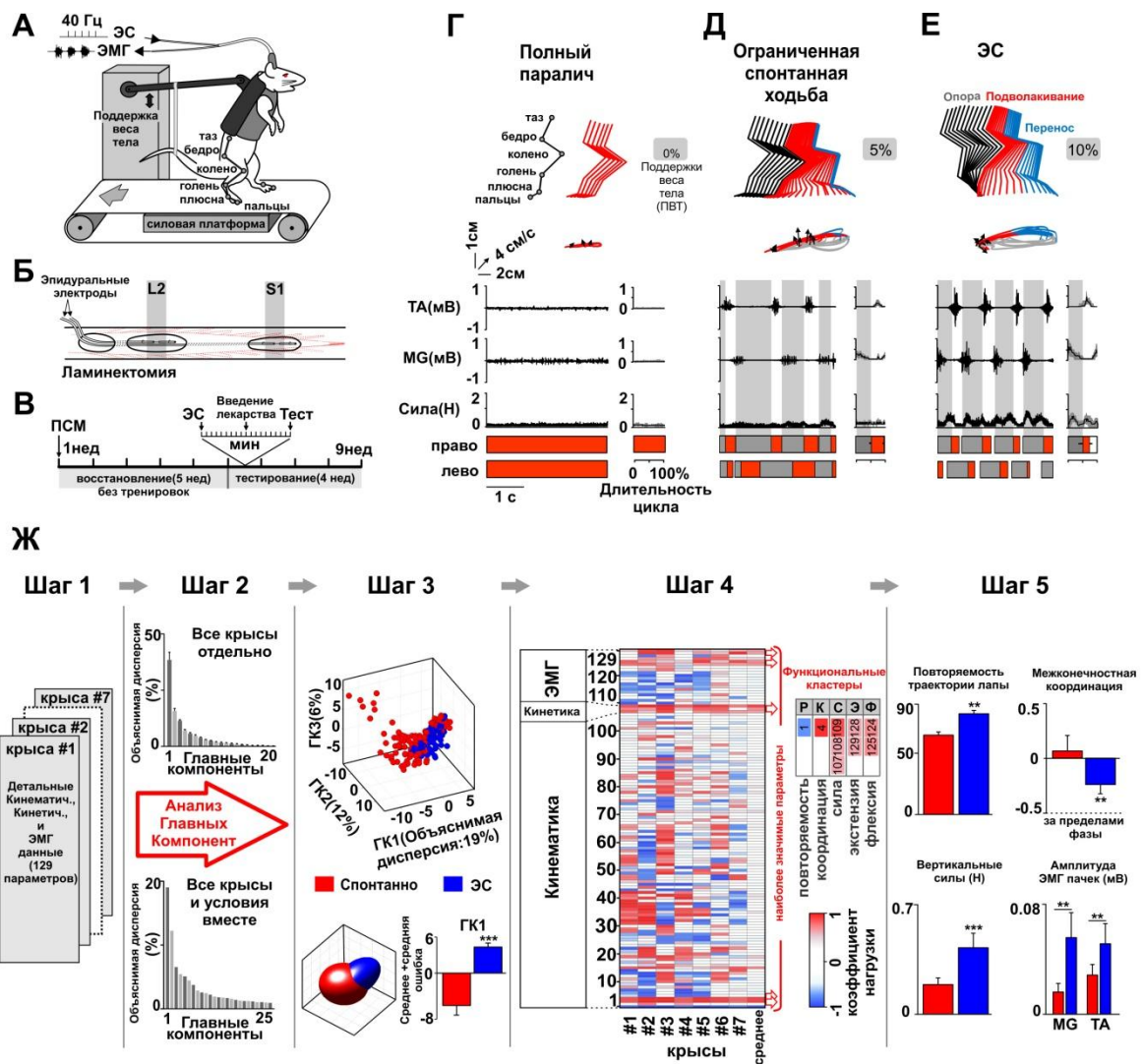


Рис. 31. Схема экспериментальной модели (А-Б), последовательность эксперимента (В), спонтанная и ЭС вызванная локомоторная активность стинальной крысы (Г-Е), алгоритм определения специфических модуляций паттернов шагания (Ж).

Шаг 4

Для отдельных крыс мы вычислили корреляции (коэффициент нагрузки) между измеряемым параметром и ГК1, на которые приходится большая часть дисперсии ($39 \pm 9\%$), отражая тем самым модуляции, вызванные ЭС. Для сравнения: ГК2 и ГК3 относились к различиям в исполнении шагов

между крысами и пошаговой изменчивости. Затем мы визуализировали эти результаты на кодирующих цветных картах (рис. 31Ж, Шаг 4). Хотя большое количество параметров модулировались за счет сравнения локомоций, вызванных ЭС, со спонтанным шаганием каждой крысы ($p < 0,05$) (рис. 31Ж, Шаг 4, цветные области), только несколько переменных последовательно изменились в одном направлении для всех крыс (рис. 31Ж, Шаг 4, последний столбец, *среднее*). Эти статистически вычисленные переменные затем были сгруппированы в функциональные кластеры (рис. 31Ж Шаг 4, правая таблица), которые выделяют локомоторные и постуральные подфункции, специфически модулированные у всех крыс, перенесших ЭС, независимо от своеобразных характеристик походки или двигательных шагательных способностей. Всего выделялось семь подфункций: 1-суммарное качество локомоции по сравнению с ходьбой интактных крыс (локомоция), 2-повторяемость, 3-координация, 4-уровень разгибания (экстензия) и 5-уровень сгибания (флексия), 6-силовые опорные реакции (сила) и 7-устойчивость и поддержка веса тела (стабильность).

Шаг 5

Переменные, связанные с выявленными функциональными кластерами, были представлены для иллюстрации уровня модуляции (рис. 31Ж, Шаг 5). Анализ показал, что по сравнению со спонтанной локомоцией, ЭС положительно влияет на уровень экстензии, флексии, координацию, повторяемость и силу. Модуляция этих локомоторных подфункций демонстрируется увеличением ЭМГ активности в дистальных разгибательных и сгибательных мышцах, увеличением вертикальных сил, высоты шага, повторяемости конечной точки траектории конечности, а также улучшением межконечностной координации.

Далее такой же метод анализа был использован для выявления конкретных функциональных связей между различными нейрорецепторными системами и модуляцией паттернов ходьбы спинализированных крыс при ЭС.

Исследование специфической роли серотониновых рецепторов

Рецепторы 5-HT_{1A} (Courtine et al., 2009), 5-HT_{2A/2C} (Courtine et al., 2009), 5-HT₃ (Guertin and Steuer, 2005), и 5-HT₇ (Liu et al., 2009) являются основными изучавшимися рецепторами к серотонину, на которые воздействовали для модуляции и/или генерации локомоции у грызунов (Jordan et al., 2008). Чтобы оценить их специфические функции, мы фармакологически воздействовали на нейронные проводящие пути, используя в оптимальных концентрациях специфические агонисты и антагонисты этих рецепторов. Хотя антагонисты 5-HT рецепторов иногда модифицировали инициированную ЭС локомоцию, не было обнаружено ни одного повторяющегося эффекта (среди всех крыс и циклов шагания) (см. рис. 33А-Г). В свою очередь, стимуляция рецепторов 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃, или 5-HT₇ каждый раз вызывала значительные и специфические изменения в паттернах шагания ($p < 0.005$) (рис. 33А-Г).

5-HT_{1A}

У крыс, которым предварительно вводили 5-HT₇ антагонист SB269970 [(R)-3-[2-[2-(4-метилпиперидин-1-ил)этил]пирролидин-1-сульфонил] фенол гидрохлорид] (5-7 мг/кг), введение 5-HT_{1A/7} агониста 8-OHDPAT (0.05 мг/кг) значительно влияло на модуляцию паттернов шагания, генерированного ЭС (рис. 32 А,Б, 33А). Эффекты характеризовались улучшением межконечностной координации (рис. 34А₂), снижением кинематической изменчивости (рис. 34А₄,В₄), увеличением уровня поддержки веса тела (рис. 34В₂) и силовых опорных реакций (рис. 34В₁), а также общим улучшением локомоции и усилением уровня флексии конечностей (рис. 33А). Последнее четко проявлялось в увеличении сгибания всех суставов (рис. 35А), снижении волочения лапы (рис. 34А₆), повышенной ЭМГ активность мышц-сгибателей по сравнению с результатами применения только ЭС (рис. 34Б₃).

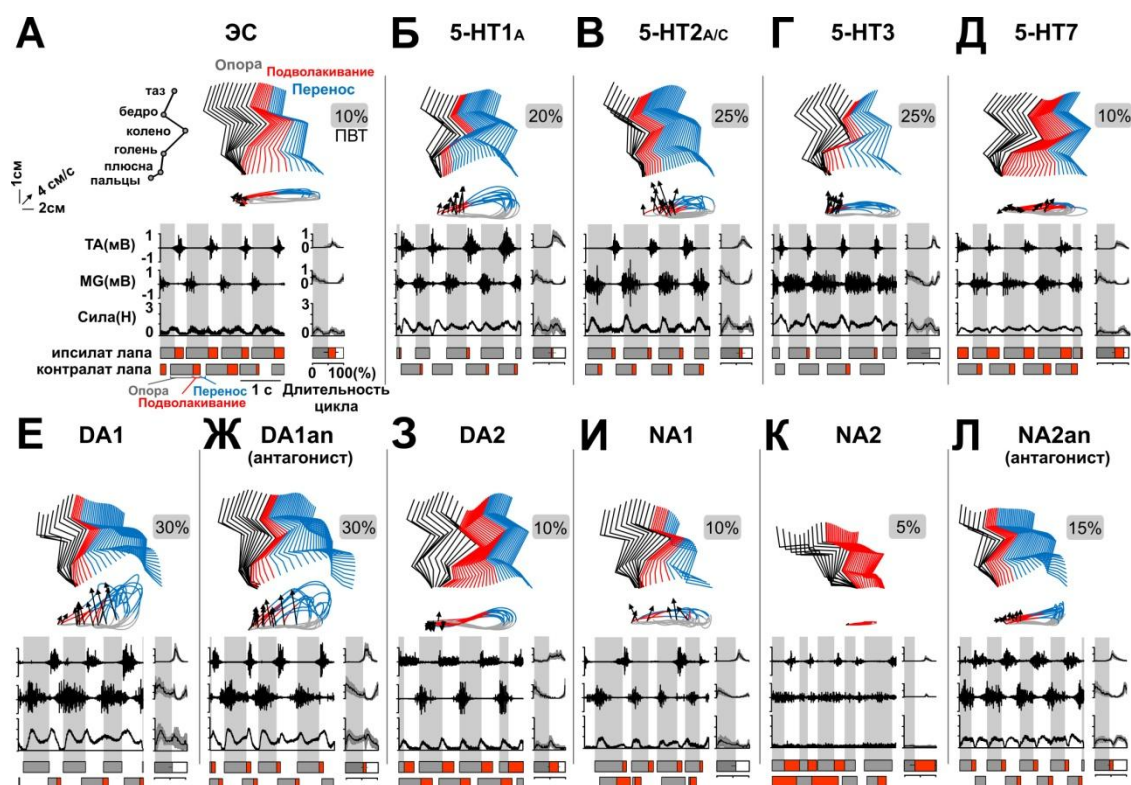


Рис. 32. Специфические изменения двигательного паттерна спинальной крысы при воздействии на отдельные моноаминовые рецепторы.

5-HT_{2A/C}

В результате активации 5-HT_{2A/C} рецепторов с помощью квипазина (0.2 мг/кг) было отмечено усиление разгибания, особенно в дистальных суставах (рис. 32В, 35А). Происходило увеличение продолжительности фазы опоры (рис. 34А1), длительность (рис. 34Б2) и амплитуда (рис. 34Б4) пачек ЭМГ активности в дистальных мышцах-разгибателях значительно увеличились, произошло улучшение функции поддержки веса тела (рис. 34В2), сопровождаемое трехкратным увеличением вертикальных сил (рис. 34В1). Наблюдалось также усиление флексорных мотонейронных пулов (рис. 34Б3). Таким образом, активация 5-HT_{2A/C} рецепторов существенно влияла на уровень постурального тонуса, усиливала поддержку веса тела, активность разгибателей и сгибателей конечности (рис. 33Б). 5-HT_{2A/C} антагонист кетанзерин [3-(2-[4-(4-флюоробензоил)-1-пиперидинил]этил)-2,4(1Н,3Н)-хиназолинедион (+)-тартра] (2-4 мг/кг) не оказывал систематического влияния на локомоцию, вызванную ЭС.

5-HT₃

Большинство локомоторных характеристик, сгруппированных в ГК1 при активации 5-HT_{2A/C} рецепторов, были также обнаружены при введении 5-HT₃ агониста SR 57227A [4-амино-1-(6-хлоро-2-пиридил) – пиперидин гидрохлорид] (1,5 мг/кг) (рис. 32Г, 33В). В дополнение к заметному усилению компонентов разгибания конечности (рис. 34Б2, Б4) и характеристик весовой нагрузки (рис. 34В1, В2), активация 5-HT₃ рецепторов значительно снизила изменчивость походки со временем и подволакивание лапы (рис. 34А₆). Кроме того, увеличение продолжительности пачек ЭМГ в дистальных мышцах-разгибателях, что также наблюдалось при активации 5-HT_{2A/C} рецепторов, было особенно заметно при стимуляции 5-HT₃ рецепторов (рис. 32Г, 34Б2). 5-HT₃ антагонист ондансетрон [1,2,3,9-тетрагидро-9-метил-3-[(2-метил-1Н-имидазол-1-ил)-метил]-4Н-карбазол-4-один гидрохлорид] (3-5 мг/кг) не оказывал систематического воздействия на локомоцию, вызванную ЭС (рис. 33В).

5-HT₇

Введение 5-HT_{1A} антагониста WAY 100,635 [N-[2 - [4 - (2-метоксифенил)-1-пиперазинил]этил]-N-(2-пиридил) циклогексанкарбокс-йамид] (0,5 мг/кг) до введения 8-OHDPAT для активации 5-HT₇ рецепторов приводило к небольшим изменениям в паттернах шагания. Несколько характеристик, сгруппированных в ГК1, связаны с улучшением ритмичности и координации (рис. 33Г, 4 А₂, А₈). Это неожиданно слабое воздействие на активацию 5-HT₇ рецепторов возможно связано с умеренной аффинностью 8-OHDPAT к 5-HT₇ рецепторам (Liu et al., 2009).

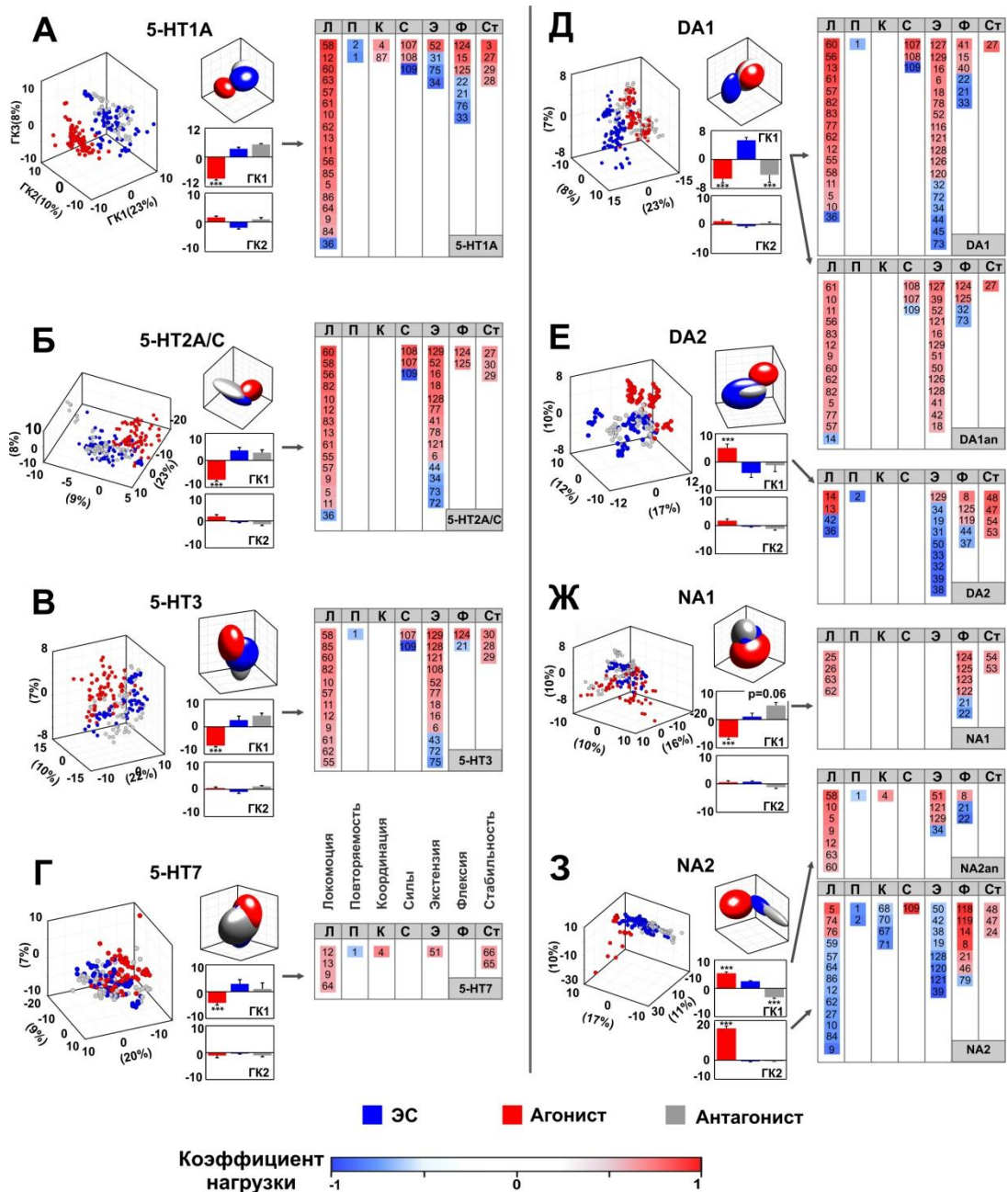


Рис. 33. Рецептор-специфические модуляции двигательных свойств, относящихся к отдельным функциональным кластерам при локомоции спинальной крысы. Пояснение в тексте.

Исследование специфической роли дофаминовых рецепторов

Дофамин оказывает мощное действие на локомоцию спинализированных мышей через DA₁ рецепторы (Lapointe et al., 2009). В ходе исследований *in vitro* на новорожденных мышах также было выдвинуто предположение о важной роли DA₂ рецепторов (Madriaga et al., 2004), которое, однако, не было подтверждено в ходе исследований на взрослых спинализированных

особых *in vivo* (Lapointe et al., 2009). Нами было исследовано специфическое влияние этих рецепторов на локомоторное поведение спинальных крыс.

DA₁

Активация DA₁-подобных рецепторов с помощью R-(+) - 6-хлор-7,8 - дигидрокси-1-фенил-2,3,4,5-тетрагидро-1 Н-3-бензазепин гидробромид (SKF-81297) (0,15-0,2 мг/кг) заметно усиливала импульсацию мотонейронов к мышцам-разгибателям и мышцам-сгибателям вместе с выраженными изменениями кинематики задних конечностей в позициях «опоры» и «переноса» (рис. 32Е). Длительность фазы опоры (рис. 34А₁) и пачек ЭМГ при разгибании (рис. 34Б₂) увеличивалась, а вертикальные силовые опорные реакции возрастали в два-три раза выше по сравнению с показателями локомоции, вызванной только ЭС (рис. 34В₁). При переносе наблюдалось значительное увеличение амплитуды колебаний конечности (длина шага) (рис. 34А₈), что было связано с увеличением скорости перемещения конечности (рис. 34А₇), более высоким поднятием лапы (рис. 34А₅), и уменьшением уровня ее подволакивания (рис. 34А₆). Это выраженное, но неспецифическое улучшение локомоции с уклоном в сторону увеличения разгибания заметно при изучении распределения модулированных переменных в каждом функциональной кластере, связанном с DA₁ рецепторами (рис. 33Д).

DA₁ антагонист

При оптимальной концентрации (0,1-0,15 мг/кг) селективный DA₁ антагонист R-(+)-7-хлор-8-гидрокси-3-метил-1-фенил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-3-бензазепин, гидрохлорид (SCH-23390) модулировал паттерны шагания сходным образом, как DA₁ агонист (сравните рис. 32Е, Ж, а также 3-Д участок и функциональный кластер на рис. 33Д). Хотя анализ ГК определил незначительные различия между двумя вмешательствами (рис. 35А, 36А), модулированные параметры и степень их проявления при введении агонистов или антагонистов DA₁ рецепторов были удивительно похожи (рис. 34А-В). О получении подобных агонистических результатов действия

антагониста SCH-23390 на крыс уже упоминалось ранее (Wachtel and White, 1995).

DA_2

DA_2 антагонист этиклоприд (0,9-1,8 мг/кг) не показал систематического воздействия на локомоцию, вызванную ЭС (рис. 33Е). В отличие от результатов предыдущих наблюдений за поведением спинализированных мышей (Lapointe et al., 2009), нами были обнаружены значительные ($p < 0,001$) (рис. 33Е) изменения в паттернах шагания после введения DA_2 -агониста квинпиrolа (0,15-0,2 мг/кг) (рис. 32 З). Применение этого

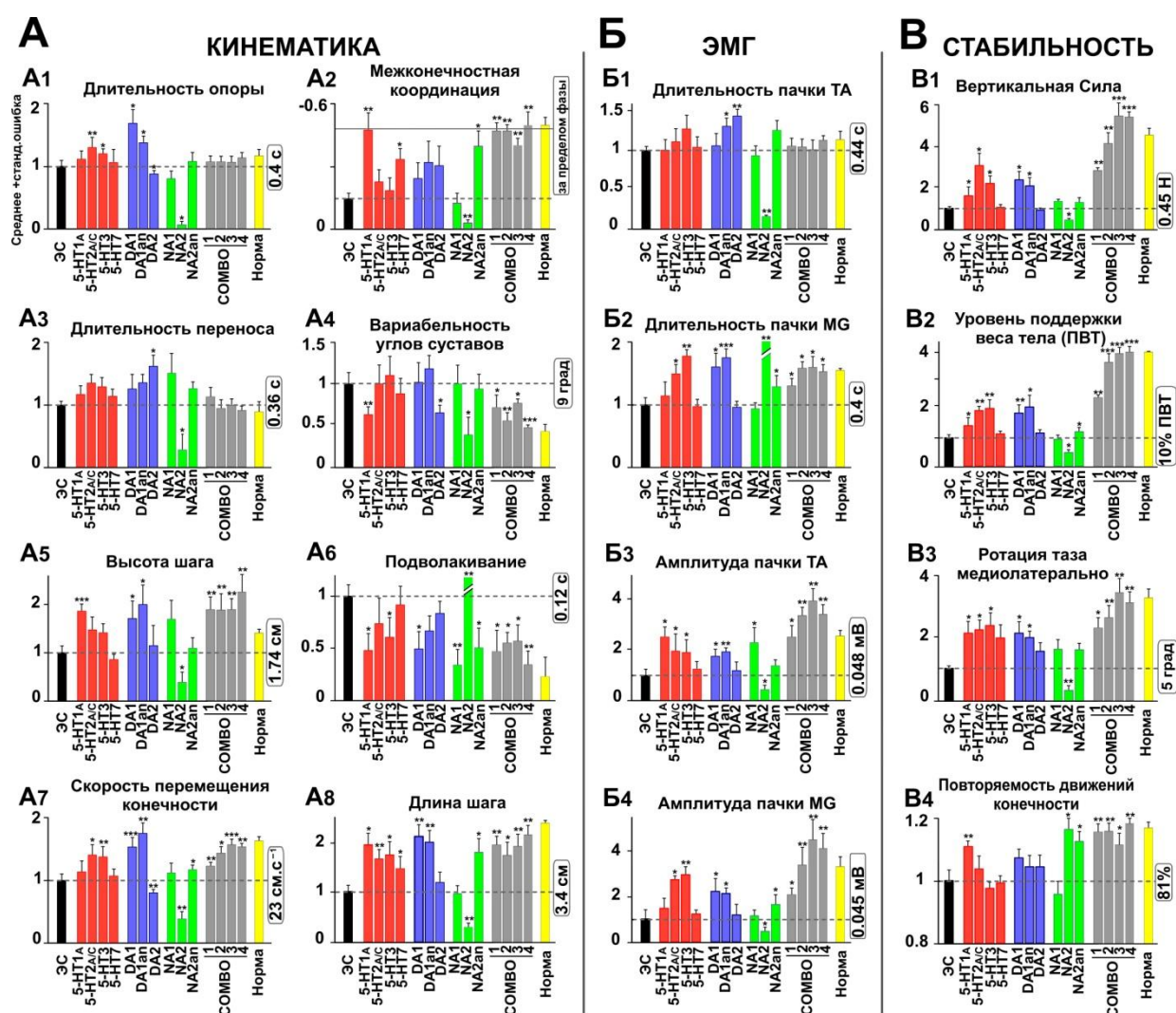


Рис. 34. Селективные кинематические, кинетические и ЭМГ характеристики локомоторных паттернов при модуляции отдельных рецепторов или их комбинаций ($n=7$ крыс) у спинальных и интактных(норма) животных.

фармакологического агента привело к явному облегчению сгибания и улучшению устойчивости ходьбы, но также к заметному снижению сгибания задних конечностей (рис. 33Е). Активация DA₂-подобных рецепторов увеличила длительность фазы переноса (рис. 34А₃) и пачек ЭМГ в мышцах-сгибателях (рис. 34Б₁). Кроме того, применение DA₂ агонистов сократило изменчивость кинематики суставных углов (рис. 34Б₄), увеличило стабильность локомоции, повторяемость траектории движения конечности (рис. 34В₄).

Исследование специфической роли норадреналиновых рецепторов

Хотя предыдущие исследования показали ограниченную способность $\alpha 1$ норадреналиновых рецепторов (NA₁) вызывать локомоцию (Chau et al. 1998b), значительное облегчение локомоции под действием $\alpha 2$ адренергического (NA₂) агониста – клонидина было неоднократно продемонстрировано на спинализированных кошках (Grillner and Zangger, 1979; Chau et al. 1998b).

NA₁

NA₁ агонист метоксамин (2-2,5 мг/кг) вызывал умеренные и переменные изменения в паттернах шагания спинализированных крыс, хотя некоторые характеристики, по существу, связанные с усилением флексии, последовательно сгруппированы в ГК1 ($p < 0,05$) (рис. 32И, 33Ж). Активация NA₁ рецепторов вызвала сокращение продолжительности волочения лапы (рис. 34А₆), что было связано с повышением ЭМГ активности в дистальных мышцах-сгибателях (рис. 34Б₃). NA₁ антагонист празозин (3 мг/кг) несколько изменял ходьбу нескольких крыс, но не вызвал значимых модуляций (рис. 33 Ж).

NA₂

В отличие от усиления шагательной способности спинализированных кошек, применение NA₂ агониста клонидина (0,4-0,5 мг/кг) приводило к нарушению ходьбы, инициированной ЭС, у спинализированных крыс.

Активация NA_2 рецепторов изменяла непрерывную локомоцию в паттерны шагания, характеризующиеся прыжками ($n=3$) (рис. 32К), или полным параличом ($n=4$). Клонидин также снижал продолжительность (рис. 34В₁) и амплитуду ($p < 0,05$) (рис. 34Б₃) пачек ЭМГ в сгибателях, изменял ритмические паттерны сгибательных пулов мотонейронов в более тонические паттерны активности (рис. 34Б₂). Как следствие, большое количество параметров походки изменялось (рис. 33 З), демонстрируя общее подавление локомоторной функции после введения клонидина спинализированным крысам (рис. 34А-В). Применение клонидина в низких дозах также приводило к подавлению или значительному ухудшению локомоторной ЭМГ активности у людей с тяжелыми травмами спинного мозга (Dietz et al., 1995).

NA_2 антагонист

NA_2 антагонист йохимбин (0,4-0,5 мг/кг), напротив, улучшал локомоцию (рис. 32Л), модулируя различные параметры противоположно клонидину (ГК1, $p < 0,001$) (рис. 33 З). Блокировка NA_2 рецепторов приводила к уменьшению волочения лапы (рис. 34А₆) и существенному улучшению стабильности траекторий движения конечностей (рис. 34В₄), а также межконечностной координации (рис. 34А₂). Более того, по сравнению с локомоцией, вызванной ЭС, амплитуда (рис. 34Б₄) и продолжительность (рис. 34Б₂) пачек ЭМГ дистальных мышц-разгибателей увеличились. Кластерный анализ показал, что NA_2 антагонисты принципиально улучшили повторяемость шагательных движений и некоторые параметры, характеризующие разгибание задних конечностей.

Функциональные карты регулировки конкретных рецепторов

Приведенные выше результаты показывают, что каждый из исследованных рецепторов к моноаминам может вызывать конкретные и повторяющиеся изменения в кинематике, кинетике и ЭМГ характеристиках локомоции, вызванной ЭС, независимо от своеобразных характеристик походки, присущих каждому животному (рис. 33А-З). Эти сложные тонко-

регулируемые паттерны могут быть визуализированы на целостных функциональных картах, на которых отмечаются как параметры, присущие широкому кругу рецепторов, так и характерные только для конкретных рецепторов. Чтобы точно определить уникальную способность каждого рецептора модулировать процесс шагания, мы применили анализ ГК для всех циклов шагания при всех действующих одновременно условиях.

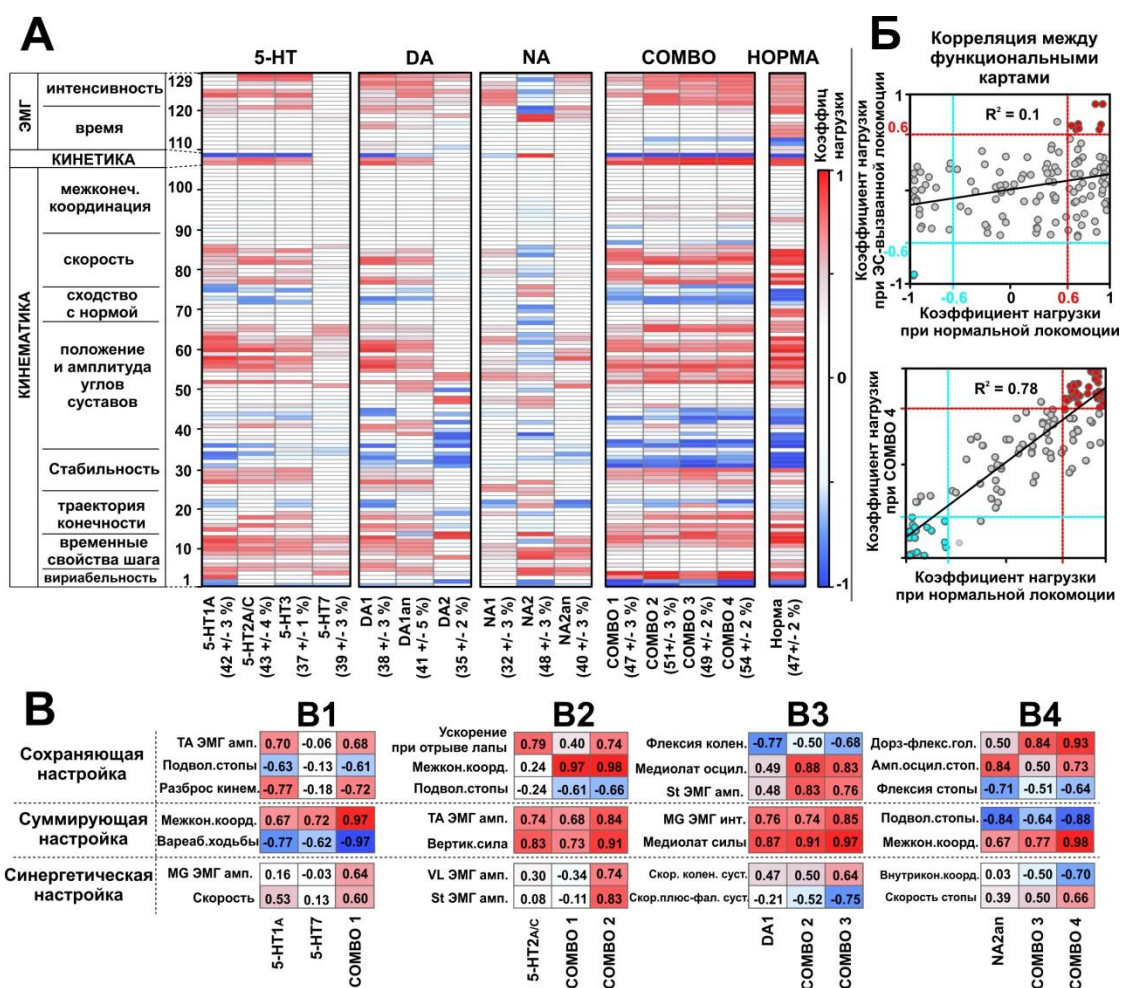


Рис. 35. Функциональные карты, показывающие модуляции двигательных паттернов при воздействии на различные моноаминовые рецепторы и их комбинации.

При укладке в 3D пространство, созданное ГК1-3 ($47 \pm 3\%$ объяснимой дисперсии), каждое экспериментальное условие занимало четко выраженное пространственное положение ($p < 0.05$) (рис. 36А), подтверждая тем самым, что исследованные серотонинергические, допаминергические и норадренергические нейронные проводящие пути

способствуют активации уникального шагательного поведения. В таком представлении пространственное расстояние между точками данных было пропорционально степени различия между паттернами походки: чем сильнее способность данного рецептора модулировать вызванную при ЭС ходьбу (рис. 36В), тем больше расстояние между точками данных, связанных с конкретным условием по сравнению с точками данных, связанными только с ЭС локомоцией (рис. 36А). Кроме того, преимущественные модуляции разгибания и постурального тонуса, вызванные 5-HT_{2A/C}, 5-HT₃, DA₁ агонистами и DA₁ антагонистом, противоположны модуляции сгибания и/или локомоторной ритмике, вызванными 5-HT_{1A}, 5-HT₇, и DA₂ агонистами, находят свое отражение в соответствующем пространственном расположении (рис. 36А).

Одновременное воздействие на несколько моноаминергических систем

Далее мы исследовали возможность функциональной регулировки паттернов ходьбы при манипуляции несколькими рецепторами к моноаминам одновременно. В частности, мы стремились определить полезные функциональные принципы, которые могли бы предсказать взаимодействие между 5-HT, DA и NA нейронными проводящими путями с целью создания эффективных фармакологических комбинаций, способствующих успешной активизации шагания после повреждения спинного мозга. С этой целью мы выбрали фармакологические средства, которые показали мощные модуляционные эффекты (рис. 36В) наряду с высокой степенью специфичности (рис. 35А). Чтобы избежать мешающих факторов, связанных с различными лекарственными взаимодействиями и изменением концентрации, эти эксперименты проводились с использованием оптимальных доз, определённых при стимуляции каждого пути отдельно. Данное исследование проводилось во второй группе спинализированных крыс ($n = 7$), которые не тренировались на движущейся

ленте тредбана до тестирования (т.е. через 5 недель после рассечения спинного мозга) (рис. 31А).

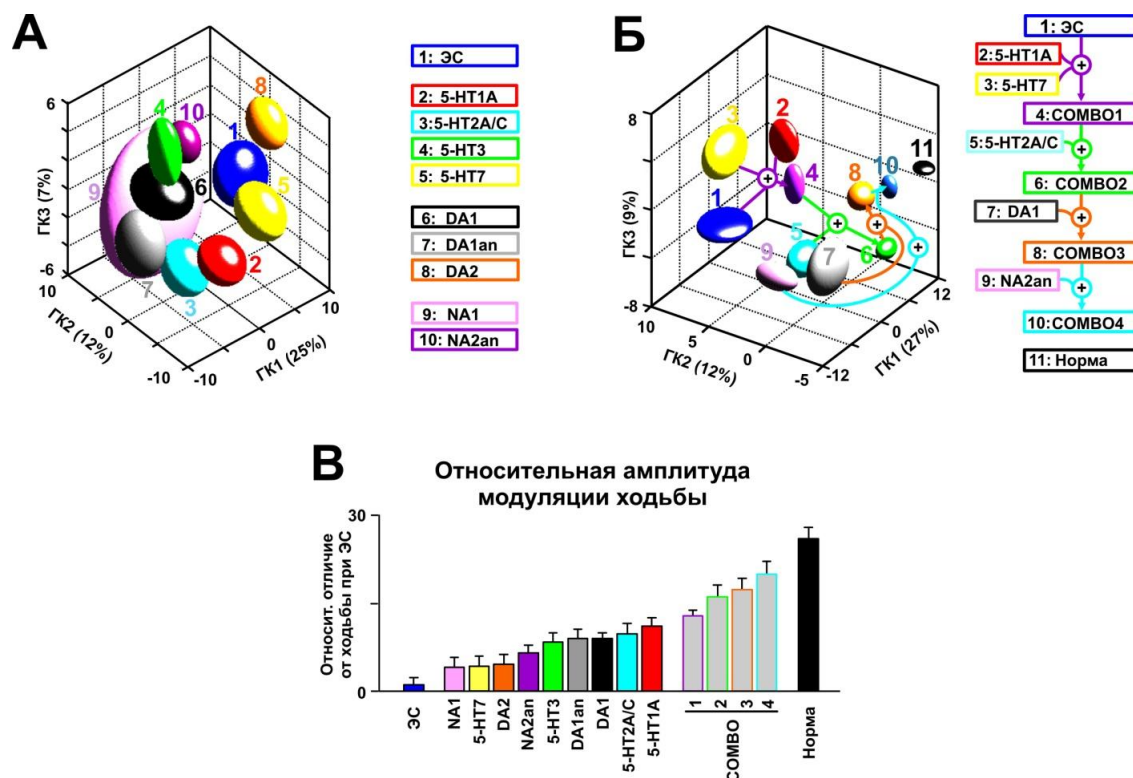


Рис. 36. Интерактивные моноаминергические стратегии обеспечивают специфические изменения *in-vivo* функционального состояние двигательных нейронных сетей спинного мозга. (А) Статистическая репрезентация различий локомоторных паттернов спинальной крысы в контроле (1) и после введение лекарств, модулирующих отдельные рецепторы (2-10). (Б) Приближение локомоторного паттерна спинальной крысы от контроля (1) к локомоции интактного животного (11) за счет одновременной модуляции нескольких моноаминергических систем (2-10). (В) Относительные амплитуды модуляций локомоторных паттернов при воздействии на отдельные рецепторы и их комбинации. Количественные значения были вычислены для каждой из крыс ($n=7$ крыс) как расстояние между контролем и конкретным воздействием на моноаминовые рецепторы в 3D математическом пространстве, построенном в осях ГК1-3, когда анализ ГК применялся на все условия одновременно.

Комбинация 1 (5-HT_{1A} + 5-HT₇)

Сначала нами было установлено, что активация 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов с помощью 8-OHDPAT улучшила паттерны шагания по сравнению с активацией каждого этого рецептора отдельно ($p < 0,01$) (рис. 36Б, 37А,Б). При комбинаторном воздействии модуляция оригинальных функциональных карт конкретного рецептора (рис. 35А) может быть дифференцирована на три новые схемы регулировки (Рис. 38Б). (1) «Сохраняющая» регулировка характеризовала набор параметров, модуляция которых была одинакова при активации одного и при активации нескольких рецепторов (рис. 35В₁). Например, сокращение продолжительности волочения лапы (рис. 34А₆), а также увеличение ЭМГ активности дистальных мышц-сгибателей (рис. 34В₃), вызванные активацией 5-HT_{1A}, также наблюдались при дополнительной стимуляции 5-HT₇ рецептора. Величины этих модуляций сходны в обоих случаях. (2) «Суммирующая» регулировка определяла переменные, независимо модулируемые 5-HT_{1A} и 5-HT₇, амплитуды которых увеличились при комбинированном воздействии, о чем свидетельствует межконечностная координация (рис. 35В₁) и изменчивость походки (рис. 35В₁). (3) «Синергетическая» или взаимоусиливающая регулировка описывала переменные, которые не изменялись или показали слабые изменения во время активации одного рецептора, но стабильно модулировались при активации нескольких рецепторов одновременно. Например, скорость перемещения конечности (рис. 35В₁) и ЭМГ активность в дистальной мышце-разгибателе (рис. 35В₁) значительно ($p < 0,05$) увеличились при комбинированной активации 5-HT_{1A} and 5-HT₇ по сравнению с локомоцией, вызванной только ЭС (рис. 34А₇,Б₄).

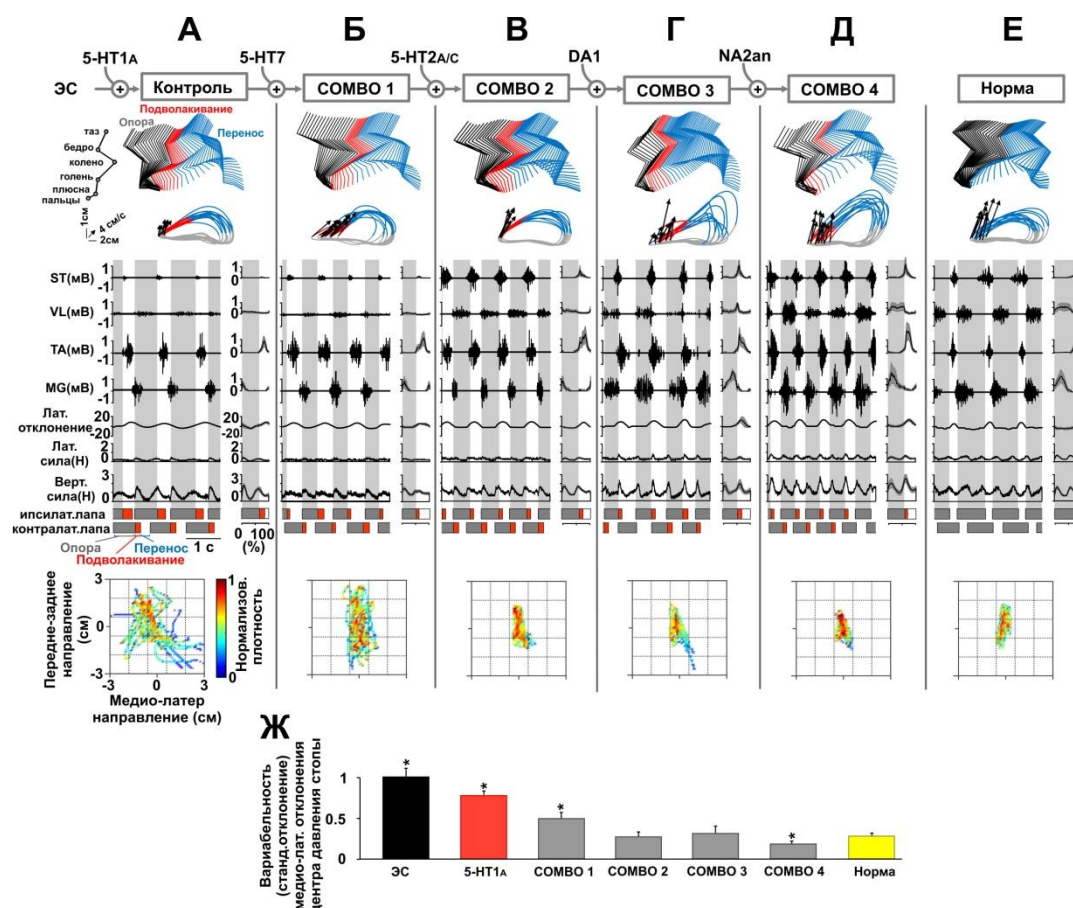


Рис. 37. Изменение локомоторных и постуральных свойств двигательного паттерна спинальных крыс при одновременной манипуляции несколькими моноаминергическими системами.

Комбинация 2 (5-HT_{1A} + 5-HT₇ + 5-HT_{2A/C})

Основываясь на мощном воздействии активации 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов на сгибание и ритмичность локомоции, но слабом на постуральный тонус и разгибание, мы усиливали разгибание, способности поддержки веса тела путем дополнительной активации 5-HT_{2A/C} рецепторов кветпазином (рис. 37В). Модуляционная специфичность каждого серотонинергического проводящего пути хорошо сохранилась при такой комбинаторной активации. «Сохраняющая» регулировка (рис. 35В₂), вызванная активацией 5-HT_{1A/7} рецепторов, очевидно, оказывала влияние на улучшение межконечностной координации (рис. 34А₂, 35В₂) и сокращение продолжительности волочения стопы (рис. 34А₆, 36В₂), в то время как стимуляция 5-HT_{2A/C} рецепторов привела к увеличению ускорения

перемещения конечности при отталкивании от опоры (рис. 35B₂). Кроме того, «суммирующая» регулировка (рис. 35B₂) компонентов, таких как силовые опорные реакции (рис. 34B₁, 35B₂) и дистальная сгибательная активность (рис. 34B₃, 35B₂), позволила спинализированным крысам непрерывно передвигаться по движущейся ленте тредбана, демонстрируя существенный уровень поддержки веса тела (рис. 34B₂) и высокую повторяемость конечной точки траектории при переносе конечности (рис. 34B₄).

Одновременная активация 5-HT_{1A}, 5-HT₇, и 5-HT_{2A/C} рецепторов вызвала значительное увеличение ЭМГ активности проксимальных мышц-разгибателей и сгибателей (рис. 35B₂, 37B) по сравнению с шаганием, вызванным только ЭС. Таким образом, наблюдалась и «синергетическая» регулировка, возникающая при такой комбинации. Кроме того, комбинация 2 стала причиной заметных изменений в параметрах, относящихся к динамическому контролю равновесия. Такое комбинаторное воздействие позволило спинализированным крысам восстановить способность твердо стабилизировать свои задние конечности в медиолатеральном направлении во время опоры (рис. 37B), а также быстро выполнить движение отведения-приведения конечности во время переноса, чтобы поставить стопу на опору при касании лапы (рис. 37B). Регистрировалось увеличение силовых опорных реакций в медиолатеральном направлении (рис. 37B), что было связано со значительным ($p < 0,01$) (рис. 37Ж) снижением центра давления стопы, смещенного в медиолатеральном направлении. В совокупности эти результаты показывают, что комбинация 2 опосредовано улучшила функциональные состояния спинальных сетей по сравнению с комбинацией 1 ($p < 0,01$).

Комбинация 3 (5-HT_{1A} + 5-HT₇ + 5-HT_{2A/C} + DA₁)

Чтобы достичь более высоких показателей постурального контроля и уровней поддержки веса тела (ПВТ на рис. 31, 32) был добавлен DA₁ агонист SKF-81297. Отдельное введение этого препарата приводило к

увеличению активности сгибательных и разгибательных мотонейронных пулов при введении индивидуально (рис. 32Е). В сочетании с 5-НТ_{1A/7} и 5-НТ_{2A/C} агонистами дополнительная активации DA₁ рецепторов значительно увеличила вертикальную ($p < 0,05$) (рис. 34B₁) и медиолатеральную ($p < 0,05$) (рис. 34B₃) силы, а также весовую нагрузку ($p < 0,05$) (рис. 34B₂). Такое увеличение, однако, привело к возникновению коротких последовательностей шагов, при которых траектории конечности и межконечностная координации были нестабильными (рис. 37Г). Таким образом, в то время как способности поддержки веса тела были выше при использовании комбинации 3, при комбинации 2 вызывались более стабильные паттерны шагания.

Комбинация 4 (5-НТ_{1A} + 5-НТ₇ + 5-НТ_{2A/2C} + DA₁ + NA₂an)

Для большей эффективности комбинации 3 далее мы выбрали NA₂ антагонист йохимбин, который понижал изменчивость перемещения суставных углов при ходьбе, улучшал согласованность работы отдельных сегментов одной конечности, а также повышал уровень межконечностной координации (рис. 32Л). В сочетании с 5-НТ и DA агонистами стабилизирующий эффект, вызванный йохимбином, был еще более очевиден, чем при локомоции, генерируемой только ЭС (рис. 37Д).

При сравнении с комбинацией 3, дополнительная блокада NA₂ рецепторов значительно уменьшила изменчивость кинематики задних конечностей ($p < 0,01$) (рис. 34A₄, B₄) и в дальнейшем увеличила стабильность паттернов шагания, в том числе, положительно повлияла на компоненты, относящиеся к равновесию (рис. 37Ж) и к тонким движениям дистальных конечностей ($p < 0,01$) (рис. 35B₄). Сравнивая локомоторные состояния, опосредованные комбинацией 4, с другими комбинациями, следует отметить, что комбинация 4 способствовала получению шагательных паттернов, которые показали наибольшую степень сходства с характеристиками, отличающими бипедальную локомоцию здоровых крыс (рис. 35Б, 37Д,Е).

Полученные результаты показывают, что подробное функциональное картирование функций 5-HT, DA и NA рецепторов может быть использовано для формирования интерактивных моноаминергических стратегий, способствующих достижению конкретных функциональных состояний двигательного контроля, в том числе успешной локомоции по движущейся ленте тредбана с поддержкой веса тела, у крыс с полным повреждением спинного мозга. Статистические репрезентации модуляций, вызванных фармакологическим воздействием, показали постепенное слияние паттернов шагания (рис. 36Б) и функциональных карт модуляции локомоции спинализированных крыс (рис. 35А) с соответствующими паттернами и картами здоровых крыс при манипуляциях со все большим числом конкретных моноаминергических путей. Хотя различия между паттернами шагания спинализированных и здоровых крыс сохранялись (рис. 37, 36А), функциональные карты, относящиеся к локомоции, вызванной ЭС совместно с полным комбинаторным моноаминергическим подходом (комбинация 4), сильно коррелировали с функциональными картами шагательных паттернов здоровых крыс (рис. 35Б).

Обсуждение

Исследования настоящей главы демонстрируют, что серотониновые, дофаминовые и норадренергические рецепторы можно модулировать фармакологически для вызова локомоции со специфическими свойствами у спинализированных крыс. Используя этот каталог моноаминергических функций, мы могли предсказывать оптимальные фармакологические комбинации, которые позволили у парализованных спинальных крыс добиваться высокого уровня двигательных способностей, включая координированную ходьбу с нормальным уровнем поддержки веса тела и частичным поддержанием равновесия.

Каждый моноаминовый рецептор модулирует уникальные особенности паттернов шагания in vivo

Нейронные сети обладают своим аппаратом распознавания, на который оказывается специфическое функциональное воздействие по моноаминергическим проводящим путям (Agnati et al., 2010). Предшествующие исследования представили ограниченную информацию о конкретных уровнях регуляции, достижение которых возможно с помощью моноаминергических стимуляций (Chau et al., 1998b; Liu and Jordan, 2005; Landry et al., 2006; Lapointe and Guertin, 2008). В настоящем исследовании были получены детальные функциональные данные и произведены сложные статистические расчеты для количественной оценки нейробиомеханических изменений, характеризующих хорошо контролируемое локомоторное поведение *in vivo* в ответ на активацию или ингибирование ряда серотониновых, дофаминовых и норадреналиновых рецепторов. Этот системный и комплексный подход позволил установить четкие связи между моноаминергическими путями и модуляцией конкретных локомоторных подфункций (Рис. 38А).

Наше всестороннее картирование подтверждает выдающуюся роль 5-HT_{1A} рецепторов в облегчении локомоции (Antri et al., 2003; Courtine et al., 2009). Показано, что 5-HT_{1A} рецепторы заметно улучшают внутриконечностную и межконечностную координацию, повторяемость шагания, а также усиливают сгибательный компонент моторного паттерна. Активация 5-HT₇ рецепторов привела к похожей регуляции шагания (рис. 38А), но уровень этой модуляции был ниже, чем ожидалось (Liu et al., 2009). Это общее улучшение ритмичности, координации и сгибания согласуется с электрофизиологическими *in vitro* исследованиями (Liu and Jordan, 2005) на мышцах и иммуногистохимическим анализом (Noga et al., 2009) на кошке, которые продемонстрировали преимущественную локализацию 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов в верхних поясничных сегментах. Предполагается, что именно там находится основные нейронные сети управления локомоторной

активностью (Kiehn, 2006). Более ростральную локализацию имеют и сгибательные мотонейронные пулы.

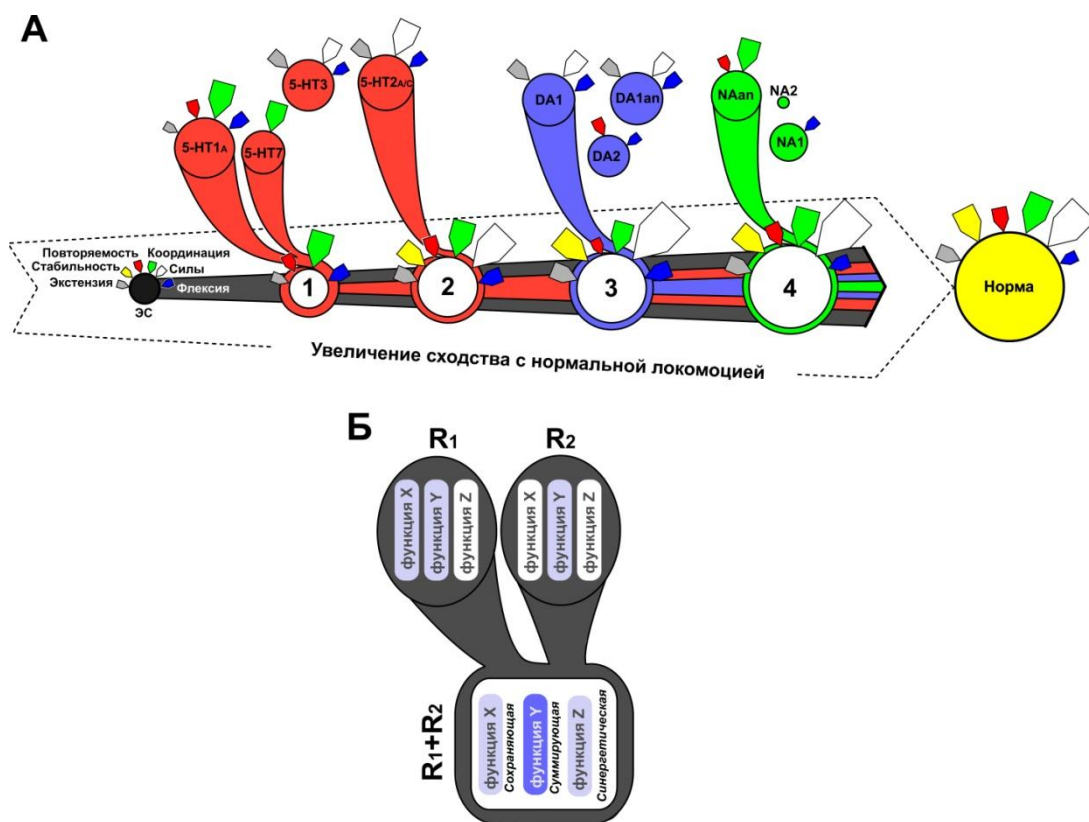


Рис. 38. Обобщающая схема модуляции специфических двигательных функций спинальных крыс воздействием на отдельные моноаминовые рецепторы и их комбинации

Было обнаружено, что активация $5\text{-HT}_{2A/C}$ рецепторов сильно увеличивала экстензию и способности поддержки веса тела, но незначительно влияла на ритмические компоненты (рис. 38А). Это функциональное действие $5\text{-HT}_{2A/C}$ рецепторов на паттерны походки соответствует их преимущественному влиянию на свойства разгибательных мотонейронов и на группу интернейронов, которые формируют моторный выход в нижнем пояснично-крестцовом сегменте (Okado et al., 1988; Liu and Jordan, 2005). Тем не менее, Jordan с соавторами (2008) предположили, что клетки, обладающие $5\text{-HT}_{2A/C}$ рецепторами, имеют отношение к генерации локомоторного ритма.

Активация 5-HT₃ рецепторов привела к аналогичной модуляции экстензии, с дополнительным специфическим воздействием на длительность разгибательных локомоторных пачек (рис. 38А). Хотя дорсально расположенные 5-HT₃ рецепторы в основном участвуют в обработке информации о боли, эти же рецепторы были обнаружены в большом количестве в вентральном и промежуточном сером веществе поясничных сегментов (Morales et al., 1998). Такой паттерн распределения в зонах, имеющих важнейшее значение для контроля двигательной функции, может объяснять их сильную способность модулировать локомоцию (Guertin and Steuer, 2005).

Также мы обнаружили мощное, но довольно неспецифическое улучшение локомоторной активности при активации DA₁ рецепторов (рис. 38А). Это согласуется с выявленным ранее широким действием этого дофаминергического проводящего пути на уровень возбудимости мотонейронов и синаптическую эффективность нейронов вентрального рога (Han et al., 2007) и, вероятно, прямой стимуляцией спиннальных локомоторных интернейрональных сетей (Lapointe et al., 2009).

В отличие от исследований спинализированных мышей *in vivo* (Lapointe et al., 2009), но в соответствии с исследования *in vitro* на препарате новорожденных мышей (Madriaga et al., 2004) мы смогли обнаружить повторяющиеся паттерны модуляции, связанные с активацией DA₂-подобных рецепторов. Данная регуловка была ортогональна по отношению к той, которая относится к DA₁-подобным рецепторам (рис. 38А). В ее основе лежит предположение о том, что, как и во многих областях мозга, DA₁ и DA₂-подобные рецепторы выполняют дополнительные функции в модуляции спинальных двигательных сетей.

Наконец, в противоположность данным, полученным при исследовании кошек (Chau et al., 1998a; Delivet-Mongrain et al., 2008), было показано, что активация α2-адренорецепторов приводила к подавлению ЭС вызванной локомоции у спинализированных крыс, в то время как блокировка этого

проводящего пути систематически улучшала координацию и увеличивала стабильность ходьбы (рис. 38А). Нисходящие норадренергические проводящие пути существенно модулируют передачу сигналов в спинальных рефлекторных путях. В частности, активация $\alpha 2$ -адренорецепторов заметно снижает возбудимость полисинаптических рефлекторных цепей (Chau et al., 1998b), которые играют определяющую роль в обеспечении локомоции при электрической стимуляции (Lavrov et al., 2006, 2008). Модуляция этих рефлекторных путей может объяснить наблюдаемые изменения локомоции при активации и блокировке $\alpha 2$ -адренорецепторов. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить основные механизмы и выяснить причины различий между функциями норадреналиновых рецепторов у кошек и крыс.

В совокупности эти результаты не только подтверждают предыдущие выводы и количественные оценки, но и значительно расширяют современные концептуальные представления, раскрывая специфические функции моноаминовых рецепторов в управлении процессом шагания *in vivo*. Данное нейрофармакологическое картирование является первым обширным каталогом функциональных связей между моноаминовыми рецепторными системами и модуляцией определенных свойств сложного моторного поведения у млекопитающих.

*Многомерная моноаминергическая регулировка паттернов шагания у
спинализированных крыс*

Проведенное картирование использовано для адаптации фармакологических смесей, которые могли бы воздействовать на конкретные функции рецепторов, чтобы восстановить локомоцию, близкую к оптимальной у спинализированных крыс (рис. 38А). В частности, мы стремились разработать план комбинаторного вмешательства, основываясь на выявленных функциях моноаминовых рецепторов. Например, активация 5-НТ_{1А} и 5-НТ₇ способствует получению локомоторной активности с

хорошо выраженным флексорным компонентам, но ограниченным постуральным тонусом и уровнем поддержки веса тела, как и предполагалось на основе данных об отдельных функциях регулировки этих рецепторов (рис. 38А). Их действие было дополнено 5-НТ_{2A/C} агонистом, который существенно увеличивал силовые опорные реакции и экстензорный компонент, при индивидуальном введении. Суммация 5-НТ_{2A/C} и 5-НТ_{1A/7} эффектов воздействий была выявлена при одновременной активации этих рецепторов.

Следуя данной логике далее, мы смогли управлять до пяти серотонинергическими, дофаминергическими и норадренергическими путями для полного восстановления уровня поддержки веса тела при локомоции с частичным поддержанием динамического равновесия у спинализированных крыс. Во всех описанных экспериментах результаты суммирования функций регулировки конкретных рецепторов были поразительными и получали свое выражение в паттернах ходьбы (рис. 38А). Предлагаемый системный уровень понимания моноаминергических функций регулировки обеспечивает средства прогнозирования оптимальных комбинации для достижения желаемых модуляций сенсомоторных сетей с целью улучшения двигательной функции парализованных субъектов до уровня близкого к норме.

*Взаимодействие между моноаминовыми рецепторными системами при
управлении спинальной локомоцией*

С помощью проведения подробного статистического анализа, было обнаружено, что одновременная манипуляция несколькими моноаминовыми рецепторами эффективно модулирует локомоторную функцию (Рис. 35В, 38А,Б). Созданы схемы прогнозируемой регулировки, названные «сохраняющая», «суммарная» и «синергетическая». (1) *Сохраняющая* регулировка характеризует модуляции свойств двигательного паттерна, относящихся к данным моноаминовым рецепторам, которые были

сохранены при комбинаторной стимуляции. (2) Если происходило частичное перекрытие паттернов модуляции конкретных рецепторов, их одновременная активация была вызвана *суммарной* регулировкой тех характеристик, которые модулировались активацией каждого рецептора индивидуально. (3) Наконец, было обнаружено, что манипуляции несколькими рецепторными системами одновременно могут способствовать *синергическим* регулировкам локомоции. При использовании комбинаторного подхода некоторые параметры стали постепенно регулироваться, в то время как при независимой стимуляции проводящих путей регуловка не происходила или проходила очень слабо.

В совокупности, полученные результаты согласуются с последними данными, которые показали локализацию 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} и 5-HT₇ рецепторов на общих нейронных сетях с различной плотностью распределения в ростокаудальных сегментах спинного мозга (Noga et al., 2009). Это подтверждает мнение о том, что нисходящие моноаминергические системы при активации в различных комбинациях параллельно модулируют, но высоко интегрированные двигательные сети спинного мозга (Hochman et al., 2001; Grillner, 2006; Jordan et al. 2008; Courtine et al., 2009; Hagglund et al., 2010), которые могут генерировать целый ряд различных паттернов ходьбы с различным распределением мышечного тонуса, уровнем поддержки веса тела и латеральной стабильности (рис. 38).

Клинические перспективы фармакотерапии моноаминергическими препаратами

На сегодняшний день серотонинергическая и дофаминергическая фармакотерапия пациентов с повреждением спинного мозга не применяется систематически, хотя существуют доступные исходные вещества и агонисты, применение которых для лечения людей одобрено (Guertin et al., 2011). Благодаря взаимному усилению действия стимуляции

моноаминергических проводящих путей и электрической стимуляции нейронных сетей спинного мозга (Carhart et al., 2004; Harkema et al., 2009), нейрореабилитационные стратегии объединения комбинаторной фармакотерапии и имплантации спинальных электродов представляют собой актуальные инновационные решения для восстановления сенсомоторных функций у лиц, страдающих нейромоторными расстройствами (Fong et al., 2009; Musienko et al., 2009).

Глава 5.

МУЛЬТИСИСТЕМНАЯ НЕЙРОРЕАБИЛИТАЦИЯ ПОСТУРАЛЬНОЙ И ЛОКОМОТОРНОЙ ФУНКЦИЙ

Несмотря на то, что спинальные нейронные сети играют ключевую роль в двигательном контроле, повреждение спинного мозга приводит к тяжелому нарушению моторных функций и зачастую к полному параличу. Как заменить естественные супраспинальные импульсы искусственным влиянием, и какой комплекс нейрореабилитационных воздействий является более эффективным? Как разграничить и объективно оценить степень нарушения постуральной и пропульсивной составляющей активного передвижения в пространстве? Каким образом селективно тренировать баланс при разных формах локомоторного поведения? В какой мере нейропластические изменения после тяжелой травмы спинного мозга могут улучшить двигательные функции парализованных конечностей и возможно ли восстановить произвольный контроль за счет образования новых нейрональных связей в обход повреждения? Настоящая глава посвящена изучению этих вопросов.³

УНИВЕРСАЛЬНЫЙ РОБОТОТЕХНИЧЕСКИЙ ИНТЕРФЕЙС ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ, АКТИВАЦИИ И ТРЕНИРОВКИ ЛОКОМОЦИИ И ПОЗЫ ПОСЛЕ НЕЙРОМОТОРНЫХ НАРУШЕНИЙ

Нейромоторные нарушения, такие как повреждение спинного мозга (ПСМ) и инсульт, приводят к заметному ухудшению генерации двигательных паттернов и способности сохранять равновесие (Courtine et al., 2009; Harkema et al., 1997). Выделение этих подфункций имеет большое

³ Работа проводилась совместно с лабораторией экспериментальной нейрореабилитации проф. G.Courtine, Университет Цюриха, Швейцария

значение для оценки нарушений и последующей двигательной нейрореабилитации. Концептуально, нейрореабилитационные системы могут выступать в качестве нейропротеза, воздействующего как на пропульсивные свойства, так и на способности поддержания равновесия. В их основе должны быть подходы и устройства, которые содействуют обоим составляющим активного передвижения в пространстве в той степени, которая необходима для экспериментальных целей или специфических потребностей пациента.

Существующие системы, разработанные для компенсации нарушений движения и равновесия, основываются на пассивной пружинящей опоре, уравнивающих механизмах или системах с управлением по усилию, которые генерируют вертикальные силы на уровне туловища во время движения по ленте тредбана (Nessler et al., 2005; Frey et al., 2006). Однако эти подходы не лишены некоторых недостатков. Такие системы обеспечивают поддержку только в вертикальном направлении, тогда как для правильно уравновешенной локомоции необходимы точная регулировка движения туловища, практически, во всех направлениях (Winter et al., 1993). Кроме того, оптический поток, который значительно модулирует локомоцию (Warren et al., 2001), подавляется при шагании по ленте тредбана. Наконец, реабилитация на данных системах ограничивается шаганием по ленте тредбана, тогда как существует широкое разнообразие естественных локомоторных задач.

Недавно были разработаны роботизированные системы для преодоления этих ограничений. Например, система ZeroG (Musselman et al., 2011) обеспечивает вертикальную поддержку при хождении по земле, при помощи подъемного устройства, установленного на рельсовой тележке. Но рельсы ограничивают движения субъекта лишь в заданном направлении, а поддержка туловища обеспечивается вертикально. Система NaviGaitor (Hidler et al., 2011) позволяет передвигаться во всех направлениях с помощью подвесной линейной и многоосной системы, но массивность его

конструкции приводит к высокой инерции, что препятствует движению в нормальном темпе.

В настоящем разделе представляется многомерная система поддержки туловища, которая решает эти проблемы. Роботизированное устройство непрерывно и автономно содействует или вызывает пропульсивные движения и поддержание равновесия при четырех степенях свободы во время передвижения крыс по поверхности с большой площадью рабочего пространства. С использованием различных экспериментальных моделей повреждения спинного мозга и инсульта был установлен большой потенциал данного устройства для исследования, активации и тренировки генерации паттернов и равновесия в процессе естественной ходьбы, охватывающий широкий спектр различных локомоторных задач.

Методы

Локомоторные задачи

В общей сложности 7 локомоторных задач использовалось в данных экспериментах: бипедальная локомоция по движущейся ленте тредбана (13 см/с), бипедальная локомоция по прямому треку (дорожке), квадрипедальная ходьба по прямому треку, латеральные смещения во время квадрипедальной ходьбы по прямому треку, квадрипедальная ходьба по несимметрично расположенным круглым перекладинам, квадрипедальная ходьба по ступеням лестницы, квадрипедальная ходьба и управление курсом по изогнутому на 90 градусов треку. Характеристики задач и размеры, а также особенности построенных по специальному проекту треков изображены на рисунке 40.

Хирургические процедуры

Выполнялись две хирургические операции. Сначала в выбранные мышцы задних конечностей крыс были имплантированы биполярные внутримышечные ЭМГ электроды (AS632; Cooner Wire, Чатсуорт, Калифорния). Для некоторых экспериментов электроды были также имплантированы по средней линии спинного мозга на уровне L2 и S1

эпидурально (см. Гл.2. Общая методология, Рис. 31В). После имплантации крысы восстанавливались в течение 2 недель. Затем регистрировалось поведение интактных крыс, после чего выполнялось второе хирургическое вмешательство, в ходе которого животные получали ПСМ или инсульт. Выполнялись ПСМ нескольких вариантов: полная перерезка спинного мозга на грудном уровне T7, правосторонняя латеральная гемисекция на уровне шейного отдела (C7) или две латеральных гемисекции, произведенные на противоположных сторонах в разных спинальных сегментах (T7 и T10). Ишемический инсульт коры головного мозга вызывался инъекциями сосудосуживающего препарата эндотелина-1 (ET-1, 0,3 мкг.мкл⁻¹, Sigma-Aldrich) в 14 мест левой двигательной коры головного мозга (в области, отвечающие за передние и задние конечности). Для этого препарат объемом 500 нл вводился на глубину 1,2 мм со скоростью 6 нл/с. После каждой инъекции иглу оставляли в месте введения на 3 минуты и затем осторожно вынимали (Zorner et al., 2010). Степень и локализация повреждений проверялись при диссекции по окончании эксперимента и гистологически.

Поведенческие тренировки крыс

В течение 1-2 недель крыс приучали носить специально сделанный жакет при свободном перемещении по трекам. Затем с животными ежедневно проводились 1 или 2 тренировочные сессии, пока они не пересекали треки с постоянной скоростью. Положительное подкрепление (вознаграждение пищей) использовалось для поощрения выполнения требуемых от крыс задач. Крысы тренировались передвигаться по лестнице с регулярно расположенными перекладинами. При тестировании последовательности перекладин были несимметричны и разнообразны, чтобы избежать привыкания к определенной модели (Zorner et al., 2010) расположения перекладин.

Факторы, активирующие двигательный контроль

Чтобы вызвать локомоцию у парализованных крыс, применялись эпидуральная электрическая стимуляция и смесь моноаминергических

агонистов (Musienko et al., 2011). Прямоугольные импульсы (продолжительностью 0,2 мс) применялись с частотой 40 Гц с помощью двух стимуляторов (AM-Systems, Вашингтон, США), подключенных к L2 и S1 электродам (50-200 мкА). Крысам также систематически вводили агонисты серотониновых и допаминовых рецепторов 5HT1A/7 (8-ОН-ДРАТ, 0.05-0.1 мг/кг), 5HT2A/C (квипазин, 0.2-0.3 мг/кг) и DA1 (SKF-81297, 0.15-0.2 мг/кг) (Musienko et al., 2011).

Протоколы испытаний

Как правило, для каждой крысы в каждом экспериментальном условии записывались 10 локомоторных циклов (по тредбану) и 10 испытаний (по треку). Крысы для испытаний с роботом и без него отбирались случайным образом. Животные носили специальный жакет при всех тестах для обеспечения одинаковых условий испытаний. При использовании электрической и фармакологической стимуляции для улучшения локомоции, запись делалась через 10 минут после введения препарата.

Нейрореабилитационная тренировка

30-минутные сессии тренировок проводились с крысами 6 дней в неделю, начиная с 12 дня после экспериментальных повреждений ЦНС. Тренировки проводились 7 недель. Локомоция активировалась электрической и фармакологической стимуляцией. Во время тренировочных сессий крысы тренировались квадрипедальной локомоции по прямому горизонтальному треку, по лестнице, по изогнутому на 90 градусов треку (Рис. 40). Регулировалась относительная продолжительность выполнения каждой задачи в зависимости от текущих способностей животных. Например, до 4-5 недели крысы демонстрировали лишь несколько движений по изогнутому треку, после чего началось восстановление контроля равновесия.

Методы регистрации кинематики, кинетики движений и ЭМГ активности, а также статистический анализ, используемый в работе, подробно описаны в Главе 2 Общая методология, а также на Рис. 31Ж.

Результаты

Схема и свойства роботизированного устройства

Для обеспечения поддержки и коррекций положения туловища животных в 4 независимых степенях свободы была сконструирована роботизированная система. Три приводных модуля линейного перемещения использовались для определения рабочего пространства в декартовой системе координат, в которой крысы могут перемещаться в направлениях X, Y, Z. Первые две оси (X и Y на Рис. 39А) используются для движений в горизонтальной плоскости и покрывают площадь в 1,2 м². Третья ось (Z на Рис. 39А) обеспечивает субъект исследования поддержкой, противодействующей силе тяжести, и позволяет совершать вертикальные движения в диапазоне до 35 см. На оконечности этой декартовой структуры расположен четвертый двигатель, который производит вращение (300 градусов) вокруг вертикальной оси (Рисунок 39А, ф). Такая последовательная конфигурация обеспечивает большую рабочую область, в которой силы могут быть применены к субъекту, для предотвращения наклонов в горизонтальных направлениях.

Целью было создание очень гибкой роботизированной системы, способной направлять крыс по любой желаемой траектории, но которая также будет вести себя транспарентно, т.е. позволять крысам свободно ходить по всей рабочей области не «чувствуя» робота. Чтобы получить эту транспарентность, силы взаимодействия между субъектом и роботом должны быть сокращены до минимума. Передвижная масса робота значительно больше (> 60 кг) веса крысы (< 0.25 кг). При использовании стандартных жестких датчиков силы и силового управления отделить инерцию робота от крысы невозможно из-за теоретических ограничений стабильности для силового управления (Colgate, Hogan, 1989). Следовательно, прямое соединение между роботом и объектом вызвало бы значительные силы взаимодействия, которые могли мешать естественным движениям крысы. Чтобы защитить значительно более легкий субъект от

инерционности роботизированной системы, Pratt с соавторами (Pratt et al., 1995) предложили присоединить привод к субъекту с помощью гибкого промежуточного элемента - серии упругих приводов. При этом силы и моменты взаимодействия могут быть измерены непосредственно путем контроля деформации промежуточного элемента.

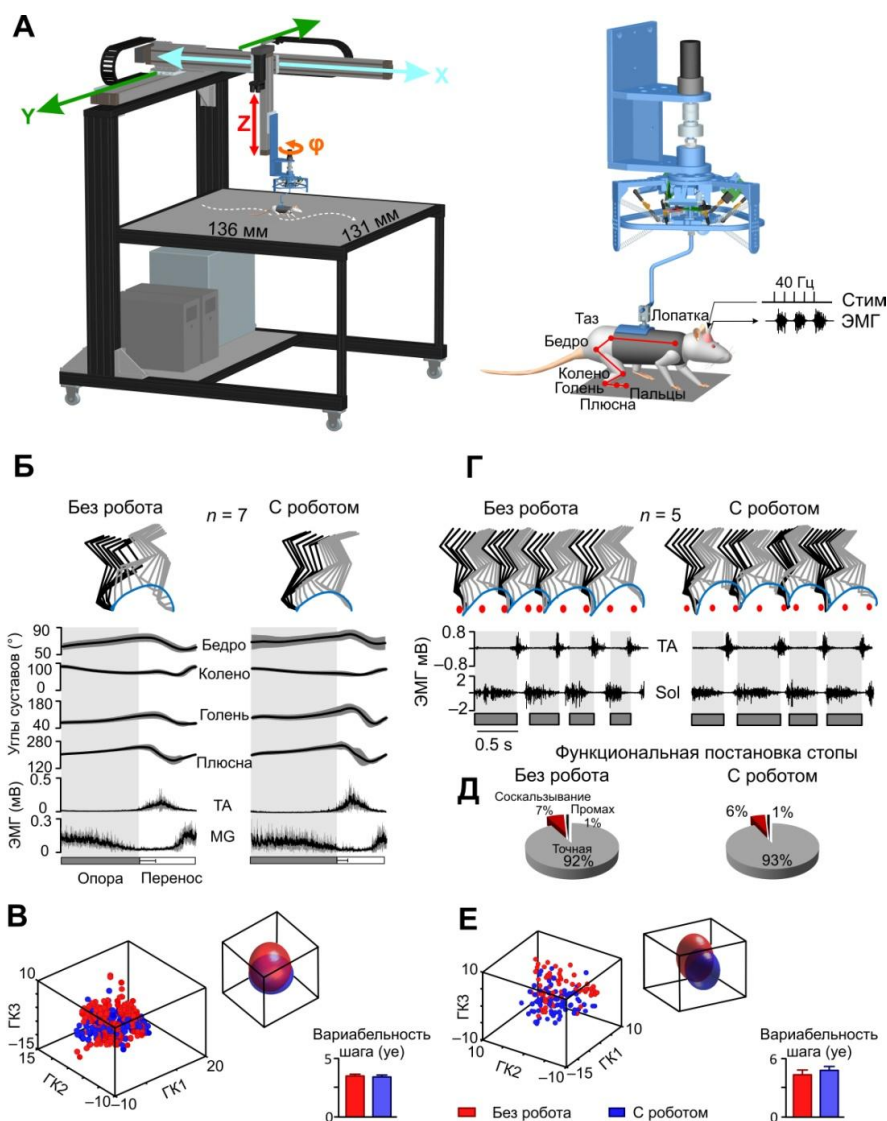


Рис. 39. Принципиальный дизайн и транспарентность робототехнического интерфейса при движении интактных крыс. Условные единицы (уе).

Концепция упругих приводов использовалась до этого только для индивидуальных приводов, то есть одной степени свободы. Для оптимального использования данной концепции в нашем роботизированном устройстве все четыре приводных модуля должны быть одновременно

разъединены, чтобы все деформируемые элементы находились как можно ближе к крысе. Для этого идея была продолжена в нескольких направлениях. Разработан легкий, с низким коэффициентом трения (<10 г), промежуточный модуль, состоящий из базовой платформы и трех выступающих элементов, формирующих каркас, подвешенной на пружине платформы в этом каркасе и Дельта конструкции, которая ограничивает незадействованные степени свободы (т.е. наклоны крыс) (Рис. 39А). Подвесная система соединена с каркасом с помощью шести линейных пружин. Дополнительная пара пружин прикрепляется к вращаемому валу в центре подвесной платформы, обеспечивая упругость элемента по вертикальной оси. Такая конфигурация отделяет инерционность последовательного модуля от подвесной платформы по 4 движущимся степеням свободы (Dominici et al., 2012).

Дельта конструкция позволяет производить измерения смещения подвесной платформы, а значит и деформацию пружин по каждой степени свободы, что обеспечивает измерения моментов и сил взаимодействия. Четыре бесконтактных магнитных датчика располагаются в местах соединений Дельта конструкции. Расположение рабочего органа по отношению к последовательному роботу вычисляется путем объединения информации от этих трех угловых датчиков и прямой кинематической модели Дельта конструкции. Относительное положение платформы кодирует длину пружины и тем самым моменты и силы взаимодействия, которые являются производными от линейных характеристик пружины.

Эти силы и моменты используются в петле регулирования силы робота. Стратегия управления реализована в MATLAB / Simulink и выполняется в режиме реального времени на рабочем столе компьютера. Компьютер обменивается данными с моторными приводами и получает информацию, поступающую от датчиков. Он также осуществляет обмен информацией со вторым компьютером, на котором запущен пользовательский интерфейс для онлайн изменения контрольных параметров робота.

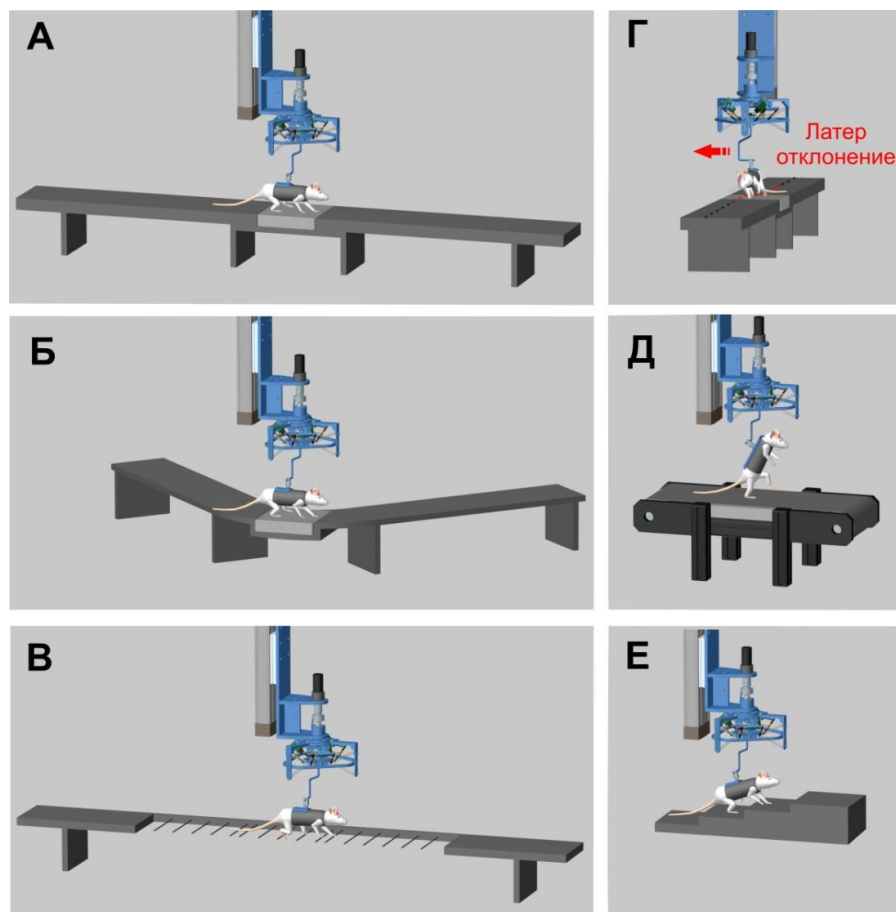


Рис. 40. Моторные задачи и особенности треков для тестирования в робототехнической установке

Таким образом, разработанная многомерная система поддержки веса тела основана на трех робототехнических принципах (Dominici et al., 2012). (I) Во-первых, был разработан большой последовательный роботизированный модуль, состоящий из трех осей линейного перемещения, задающих Декартову систему координат (x , y , z), а также оси вращения (ϕ , рис. 39А). (II) Во-вторых, параллельное Дельта соединение предупреждало опрокидывание и позволяло производить замеры положения крысы. (III) И, в-третьих, для устранения влияния инерции массивной роботизированной конструкции от рабочего органа, была изготовлена подвесная система с пружинным механизмом, который генерирует силы, направленные по каждой из четырех степеней свободы последовательной конструкции (рис. 39А). Эта подвесная система использует преимущества высокой эффективности последовательных эластичных приводов для получения

транспарентных и «самоосязующих» устройств (Pratt et al., 1995; Vallery et al., 2008). Все вместе – это роботизированное устройство, которое позволяет в режиме реального времени контролировать перемещения тела (движение вперед и латеральную стабильность), поддержку веса тела (ПВТ) и равновесие в четырех степенях свободы, которые можно непрерывно регулировать, от жесткого конроля до мягкого управления с высокой точностью или нулевого контроля с полной свободой действия для объекта исследования (Dominici et al., 2012).

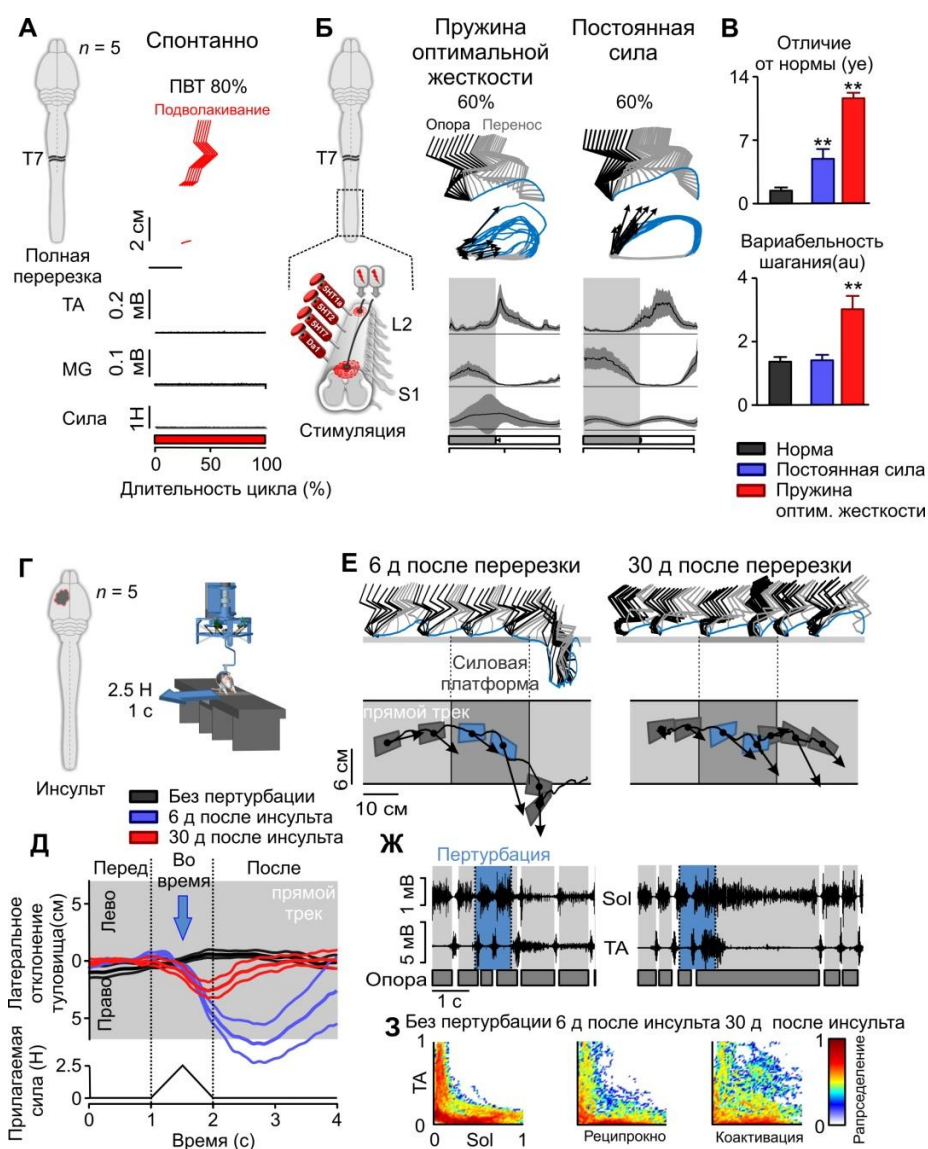


Рис. 41. Изучение локомоторной и поструральной функции с помощью робототехнического интерфейса.

Чтобы продемонстрировать прозрачность разработанного роботизированного устройства, мы сравнили кинематику и мышечную активность, характеризующие передвижения здоровых крыс ($n = 7$) идущих по прямому треку с использованием устройства и без него (рис. 39Б и 40). В результате проведенного подробного анализа нами не были выявлены значительные различия между двумя условиями ($P > 0.3$, рис. 39В). Это указывает на то, что массивность устройства не оказывает влияния на ходьбу. Данные результаты были подтверждены при проведении испытаний, включающих хождение по горизонтальной лестнице-перекладинам ($n = 5$) (рис. 39Г). Даже при таких сложных условиях, точное расположение лапы ($P > 0.4$, рис. 39Д) и характеристики ходьбы практически не изменялись при использовании роботизированного устройства ($P > 0.3$, рис. 39Е).

Оценка генерации двигательного паттерна и равновесия

Первая задача состояла в установлении функциональных возможностей роботизированного устройства для исследования генерации двигательного паттерна, равновесия и для оценки степени расстройств этих функций. Большинство систем поддержки веса тела (ПВТ) основаны на пассивных пружинных механизмах и обеспечивают поддержку тела, противодействующую силе тяжести, которая пропорциональна вертикальному положению субъекта. Хотя с помощью специальных кинематических конфигураций можно достичь автономности положения тела и постоянной силовой поддержки (Nessler et al., 2005), эти пассивные системы не могут компенсировать быстрые движения. Наша роботизированная система может применять хорошо управляемые вертикальные силовые контуры, которые в состоянии имитировать пружинящие условия или среду с пониженной гравитацией.

Такая широкая функциональность была использована для сравнения воздействия двух систем ПВТ, пружинящей и постоянной силы, на генерацию локомоторного паттерна у крыс с полным ПСМ ($n = 5$, рис. 41).

Для активации спинальных нейронных сетей применялась эпидуральная электрическая стимуляция в сочетании с введением комбинации моноаминергических агонистов (Courtine et al., 2009) (рис. 41А,Б). Значение коэффициента жесткости пружины было настроено оптимально для содействия шаганию. Был обеспечен точно такой же уровень поддержки при условии постоянной силы. ПВТ с постоянной силой показало значительное улучшение качества и стабильности характеристик ходьбы ($P < 0.01$, рис. 41Б,В) по сравнению с пружинящей ПВТ, а также вызвала локомоторные паттерны, схожие с аналогичными у здоровых крыс ($P < 0.01$, рис. 41В).

У человека (Harkema et al., 2011) и животных (Courtine et al., 2009; Timoszyk et al., 2005) при шагании информация о поддержке веса тела интерпретируется пояснично-крестцовым отделом спинного мозга. Мы исследовали, определяет ли входной сигнал весовой нагрузки также качество ходьбы у крыс с полным ПСМ ($n=4$). Уменьшение уровня постоянной силы привело к градуированным изменениям в кинематике задних конечностей, в силовых ответах и мышечной активности ($P < 0.01$; рис. 42 В-Д), что подтверждает способность пояснично-крестцовых сетей трансформировать информацию о поддержке веса тела в специфические локомоторные паттерны. Однако мы обнаружили перевернутую U-образную зависимость ($R^2 = 0,87$, рис. 42В) между качеством ходьбы и уровнем ПВТ. Эти результаты подчеркивают важность оптимальных условий ПВТ с постоянной силой для восстановления при тренировках у пациентов с нарушениями ходьбы.

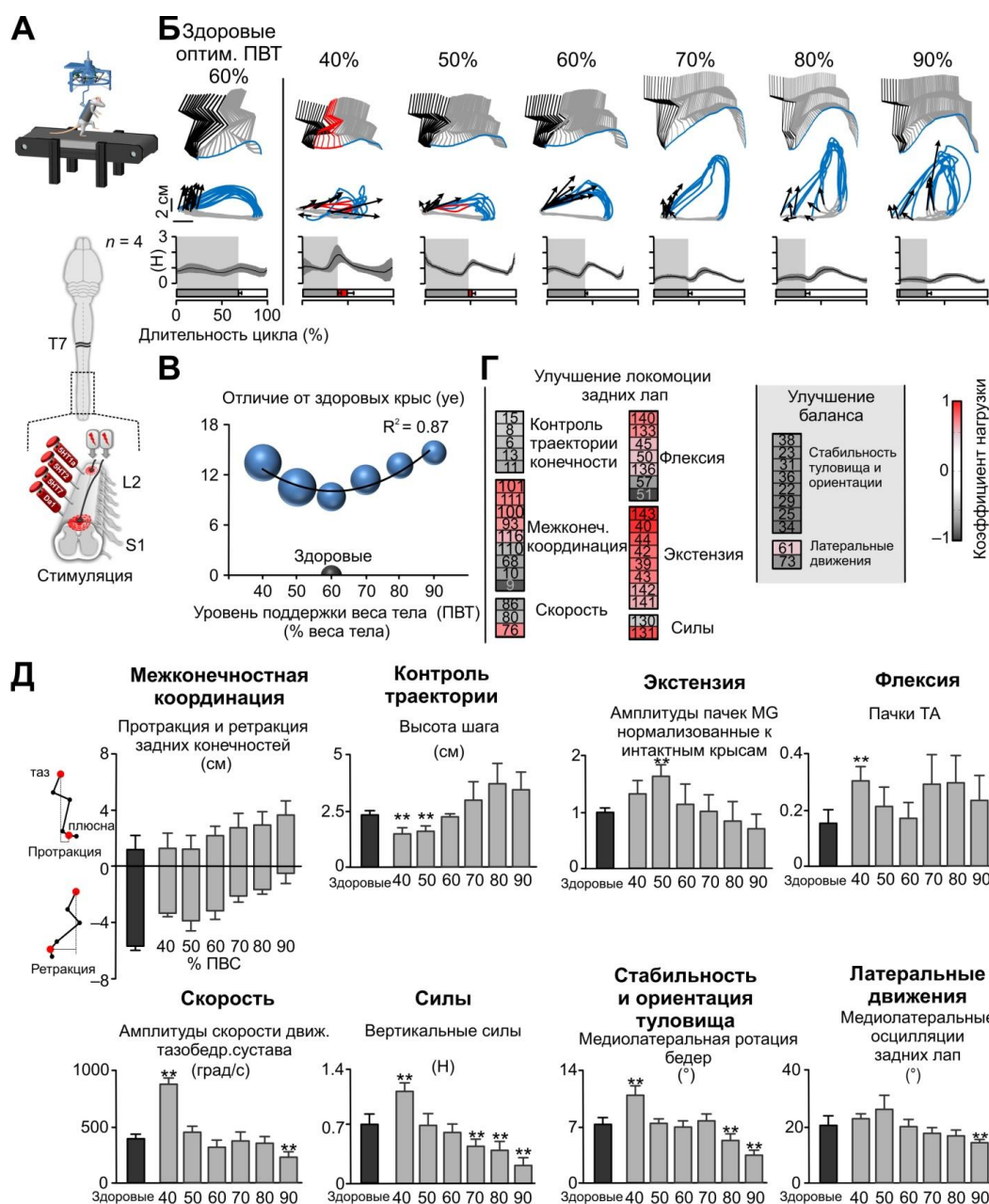


Рис. 42. Исследование влияния уровня поддержки веса тела на локомоторную функцию с помощью робототехнического устройства.

Односторонний кортикальный инсульт незначительно влияет на локомоцию у крыс, но наблюдения за поведением животных позволяет предположить наличие у крыс нарушений функции поддержания равновесия (Zörner et al., 2011). Чтобы продемонстрировать нарушение равновесия после инсульта, мы использовали возможность робота прикладывать любую силу в любое время с любой инициированной степенью свободы в режиме управления с нулевой силой. В частности, мы

применили внезапный треугольный контур силы (2,5 Н, рис. 41Г, Д) в медиолатеральном направлении (ось Y, толчок вправо) в течение 1 с, когда крыса свободно передвигалась по прямому треку. Вскоре после левостороннего инсульта (6 день) крысы не могли компенсировать, спровоцированное отклонение. Они демонстрировали значительное отклонения вправо ($P < 0,002$, рис. 41Д, Е) и часто падали с трека (доля ошибок $56\% \pm 39\%$ (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)). После 1 месяца восстановления крысы отвечали на толчки контролируемой совместной активацией мышц-разгибателей и сгибателей (рис. 41Ж, З), с последующей длительной активностью мышц-разгибателей противоположной пораженной стороны ($360\% \pm 80\%$, $p < 0,001$, рис. 41Ж, З). Такая мышечная синергия стабилизировала туловище и задние конечности (рис. 41 Д,Е) и вызывала значительные медиолатеральные силы ($P < 0.001$, 0.60 ± 0.07 Н на 6 день в сравнении с 1.54 ± 0.18 Н на 30 день после инсульта), которые восстанавливали локомоторную траекторию. В совокупности эти результаты показывают, что в режиме исследования роботизированное устройство обеспечивает эвристические условия для оценки генерации двигательных паттернов и равновесия при нейромоторных нарушениях.

*Двигательный контроль после нейромоторных нарушений с помощью
роботизированного устройства*

Для обеспечения регулируемой помощи в пропульсивном движении тела вперед и восстановлении постуральной стабильности роботизированное устройство было использовано как локомоторный и/или постуральный нейропротез. Предполагалось, что это откроет неожиданные локомоторные способности, которые скрыты за нарушениями локомоции, баланса или того и другого.

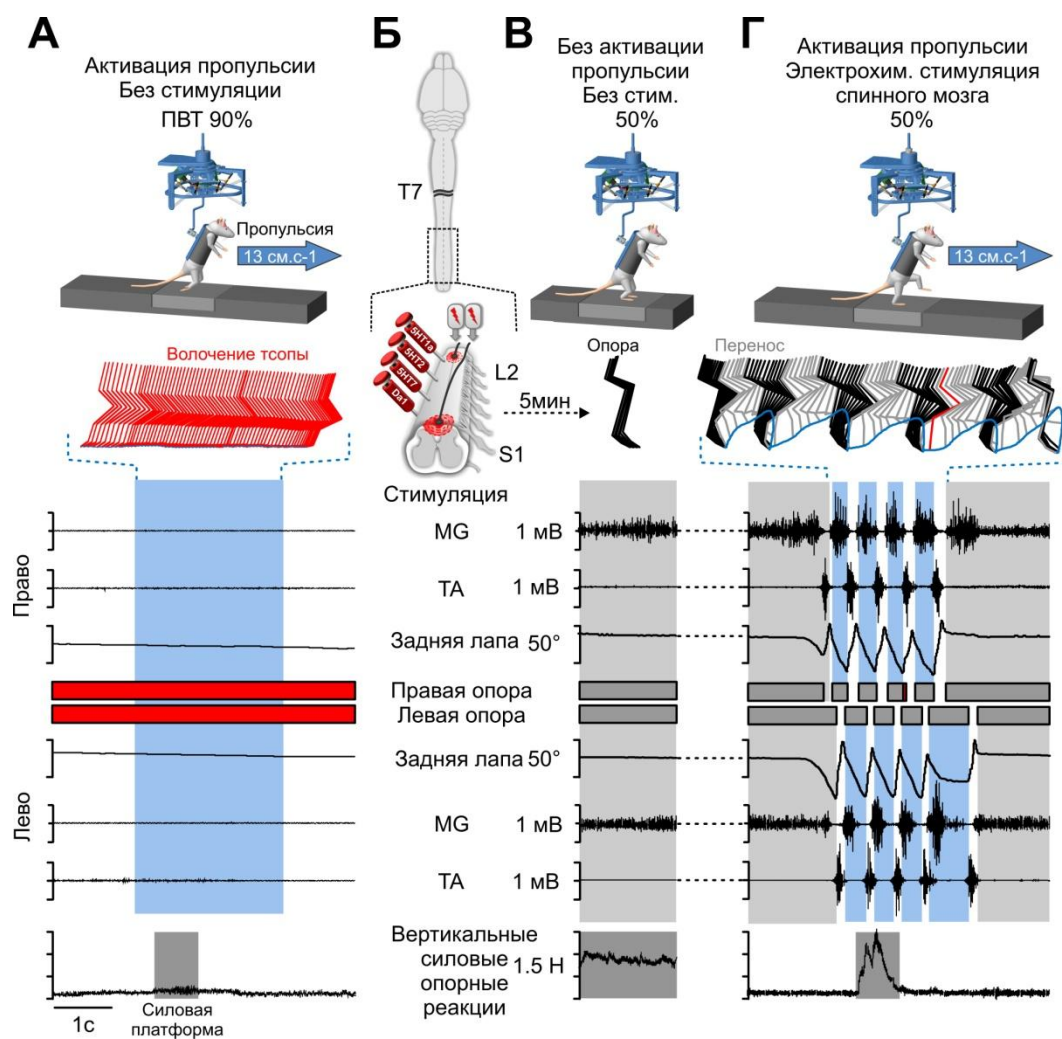


Рис. 43. Активация локомоции при помощи робототехнического интерфейса у спинальных крыс. Описания в тексте.

Электрическая и фармакологическая стимуляция активировала локомоцию у крыс с полным ПСМ (рис. 43 А,Б), но крысы не могли прикладывать силы, достаточные для того, чтобы продвигать собственное тело по ровной поверхности. Вместо этого они демонстрировали тоническую активность в мышцах-разгибателях, поведенчески выраженную в стоянии (рис. 43 В). Чтобы компенсировать отсутствие движения, мы настроили устройство таким образом, чтобы оно выступало в качестве двигательного нейропротеза, который перемещал крыс вперед (ось x, 13 см/с), обеспечивая при этом вертикальную поддержку постоянной силы ($60\% \pm 10$ ПБТ). После того, как мы инициировали движение с помощью роботизированной системы, крысы плавно перешли от спокойного стояния

к стабильной локомоции (рис. 43Г). Ритмические движения прекращались мгновенно после того, как двигательный протез переставал передвигать крыс вперед.

Крысы с односторонним кортикальным инсультом демонстрируют значительные нарушения размещения лапы противоположной пораженной стороне при пересечении лестницы с горизонтально расположенными перекладинами (Zörner et al., 2010) (рис. 44). Такие нарушения относят к потере зрительно-моторного управления, что в значительной степени вызвано повреждением двигательной коры головного мозга (Drew et al., 2008). Мы проверили гипотезу о том, что нарушенная способность поддержания равновесия (рис. 41Г-3) также может способствовать изменению навыков локомоции после кортикального инсульта. Роботизированное устройство было настроено так, чтобы оно выступало в качестве нейропротеза. В данном режиме активации робот обеспечивал поддержку с постоянной силой в вертикальном направлении (ось Z, $27\% \pm 4\%$ ПВТ) и жесткую опору в латеральных направлениях (оси Y и вращения). Роботизированный постуральный нейропротез мгновенно активировал способность крыс точно располагать заднюю лапу, противоположной пораженной стороне, на нерегулярно расположенные ступеньки лестницы ($P < 0.002$, рис. 44Б,В). Анализ показал, что робот значительно сократил количество промахов и смещений ($P < 0,01$, рис. 44), что коррелировало с улучшением постуральной стабильности ($P < 0.01$, рис. 45).

Способность роботизированного постурального нейропротеза активировать двигательный контроль оценивался у крыс с латеральной гемисекцией спинного мозга на уровне C7 ($n=5$). Через десять дней после поражения крысы волочили заднюю конечность пораженной стороны при локомоции, особенно при восхождении по лестнице (рис. 46). Без поддержки робота они наталкивались на ступени и редко ступали на них (рис. 46Б,Г). Роботизированный постуральный нейропротез мгновенно активировал координированное плантарное шагание, как при

горизонтальной ходьбе ($32\% \pm 4\%$ от ПВТ), так и при восхождении по лестнице ($28\% \pm 3\%$ от ПВТ; рис. 46Б,В). Роботизированная поддержка восстановила ориентацию туловища и стабильность, что коррелировало с практически нормальной кинематикой задних конечностей и точным расположением задней лапы пораженной стороны на ступени ($P < 0.001$, Рис. 46 Г).

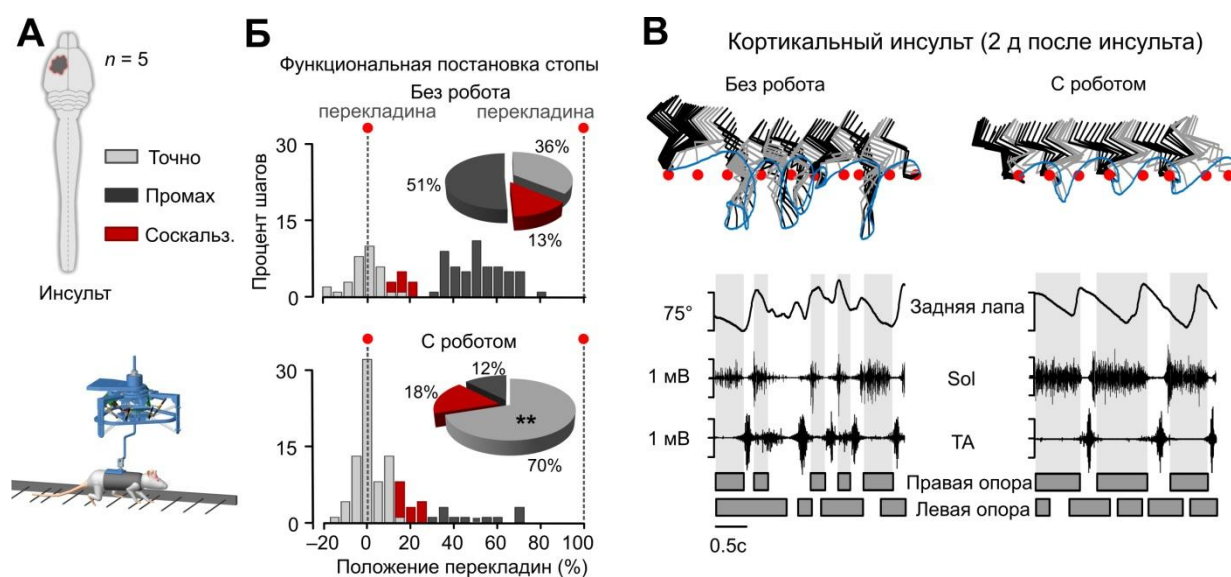


Рис. 44. Активация локомоторных способностей при ходьбе по нерегулярно расположенным перекладинам при помощи робототехнического интерфейса у крыс с односторонним инсультом.

Затем мы исследовали возможности роботизированного постурального нейропротеза в активации двигательного контроля вскоре после более тяжелого ПСМ – две латеральных гемисекции спинного мозга на противоположных сторонах и на разных уровнях (T7 и T10, рис. 46 Д). Такое ПСМ полностью прерывало прямой супраспинальный входной сигнал, приводя тем самым к постоянному параличу (Courtine et al. 2008) задних конечностей (рис. 46 Д). Чтобы активировать локомоцию уже на 12 день после ПСМ мы применяли электрическую и фармакологическую стимуляцию. Без роботизированной поддержки крысы демонстрировали ритмические движения задних конечностей, но не могли производить

плантарные шаги ($91\% \pm 7\%$ волочения) и часто падали латерально во время ходьбы (рис. 46 Д).

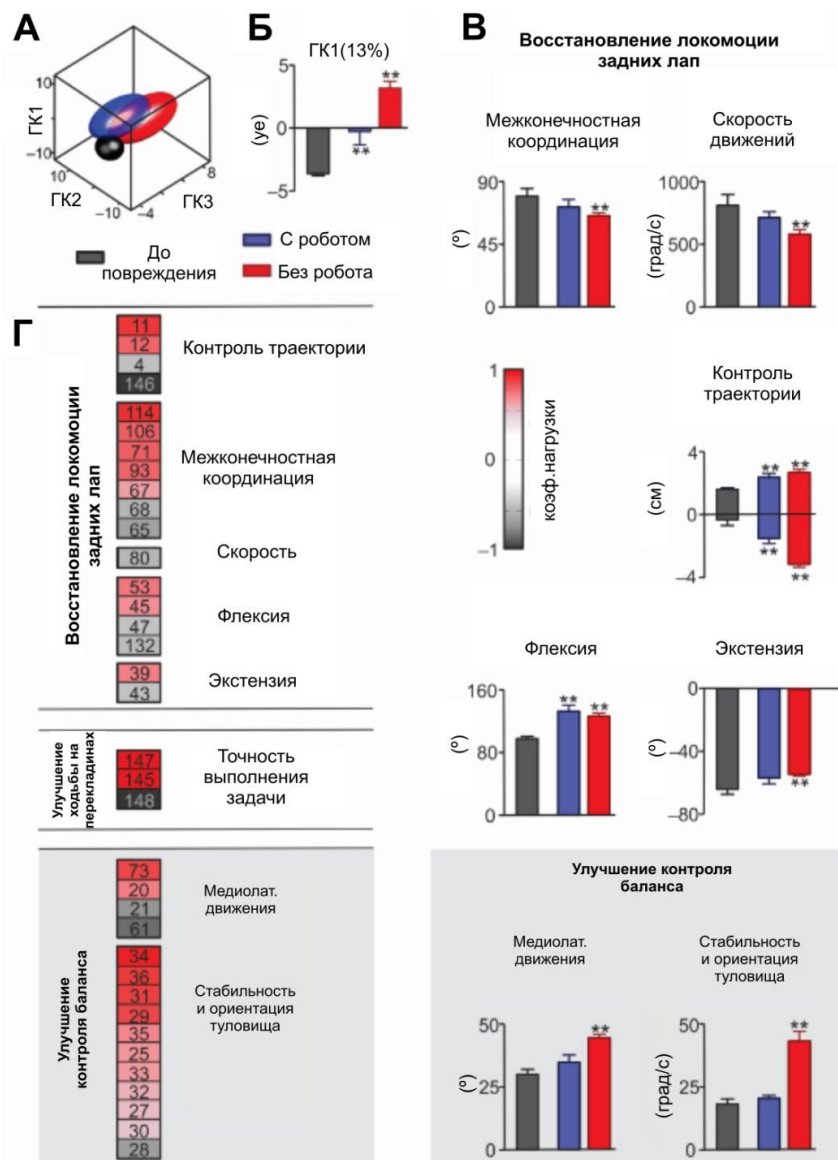


Рис. 45. Улучшение количественных характеристик локомоции крыс с односторонним инсультом, уменьшение количества промахов и смещений, коррелирующее с улучшением постуральной стабильности при использовании робототехнического интерфейса.

С помощью роботизированного постурального нейбропротеза все испытуемые крысы ($n=5$) продемонстрировали билатеральные плантарные шаги с поддержкой веса тела (рис. 46 Д). Несмотря на прерывание прямых супраспинальных путей, крысы немедленно восстановили способность точно располагать задние лапы на лестнице ($P < 0,001$, рис. 46). Другими

словами, парализованные крысы показали паттерны шагания, которые были почти неотличимы от паттернов здоровых крыс, как во время горизонтального передвижения, так и при восхождении по лестнице (рис. 46 Д-Ж). Для обеих задач, улучшение локомоции задних конечностей коррелировало с активированным роботом восстановлением постуральной стабильности туловища. В совокупности эти результаты показывают, что в режиме активации роботизированное устройство мгновенно восстанавливает развитые локомоторные способности выполнять широкий круг моторных задач при естественной ходьбе после умеренных и тяжелых нейромоторных нарушений.

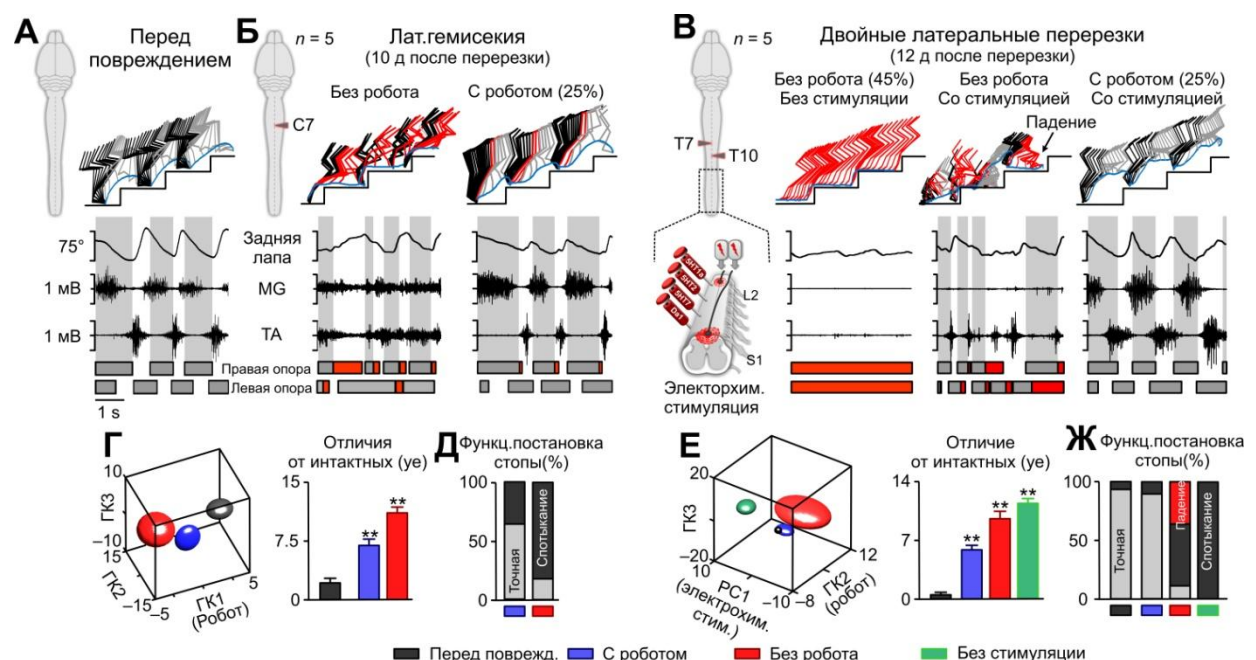


Рис. 46. Активация локомоторных способностей крыс с ПСМ разной тяжести при ходьбе по лестнице во время использования робототехнического интерфейса.

Тренировка с помощью роботизированного устройства после вызывающего паралич ПСМ

Наконец, мы использовали режим активации роботизированного устройства для повышения функциональных возможностей при регулярных нейрореабилитационных мероприятиях – схема управления, которая получила название «режим тренировки». В течение 8 недель через день мы

проводили 30-минутные локомоторные тренировочные сессии у крыс с половинными перерезками спинного мозга с противоположных сторон. Роботизированный постуральный нейропротез обеспечивал поддержку, противодействующую силе тяжести (z ось), но не прикладывал силы в других направлениях (x,y и ϕ оси). Локомоция активировалась с помощью

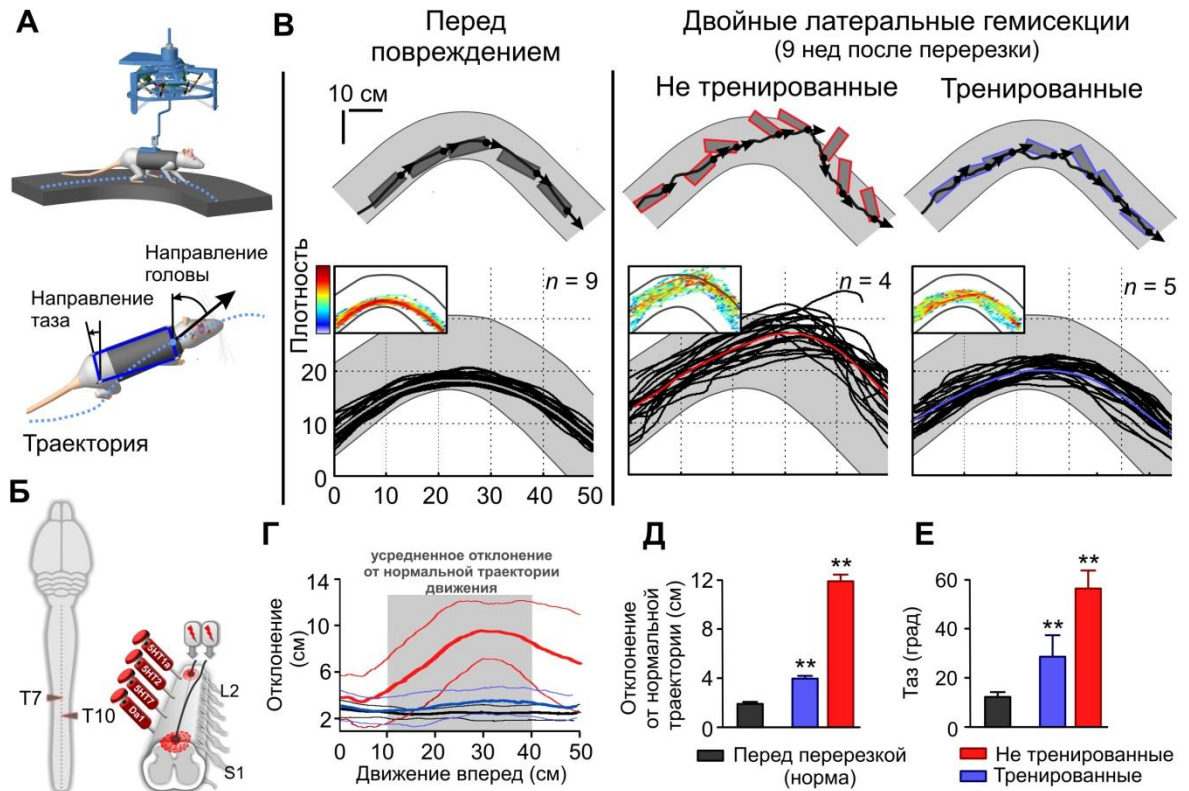


Рис. 47. Эффект тренировки с помощью роботизированного устройства после тяжелого ПСМ

электрической и фармакологической стимуляции (Рис. 47). На 9 неделе после поражения спинного мозга не тренированные крысы демонстрировали шаги с поддержкой веса тела, но не смогли управлять инерцией и балансом тела во время локомоции по изогнутому треку с помощью робота ($P < 0.001$, рис. 47 В-Д). В отличие от них тренированные крысы смогли следовать изогнутому курсу (рис. 47 В-Е), сохраняя при этом уравновешенные движения туловища ($P < 0.001$, рис. 47 В,Е). Эти результаты показывают, что в режиме тренировки роботизированное устройство заметно улучшает локомоторные способности у крыс после вызывающего паралич ПСМ.

Обсуждение

В настоящей работе представлено роботизированное устройство для исследования, активации, тренировки локомоторных паттернов и контроля равновесия в различных условиях естественной ходьбы крыс с нейромоторными нарушениями. Чтобы устранить инерцию массивной роботизированной конструкции, была разработана многомерная эластичная система декомпозиции, которая позволяет производить силовое управление с высокой точностью. Данное роботизированное устройство эффективно решало основные проблемы существующих систем поддержки веса тела грызунов и человека, такие как, поддержка тела лишь в одном направлении, высокая инерция и возможность шагания только по ленте тредбана. Предлагаемые методы и концепция проверена на крысах с различными ПСМ и инсультами. На основе полученных результатов мы считаем, что подобные многомерные системы поддержки туловища существенно улучшат реабилитацию, направленную на восстановление ходьбы у людей с нейромоторными нарушениями.

Исследование локомоторных функций у животных часто зависит от визуальных систем (Basso et al., 1996) количественной оценки или анализа (Zörner et al., 2010) одной переменной, которым не только не хватает объективности, но и которые не охватывают многомерные корреляционные структуры стратегий (Musienko et al., 2011) локомоторного контроля. Здесь мы совместили роботизированные инструменты измерения со сложным нейробиомеханическим и статистическим анализом. Вместе эти модели обеспечивают средства для точной и объективной оценки контроля и взаимодействия между ходьбой и равновесием у животных. Будущие исследования на животных и человеке могут использовать эти аналитические инструменты для оценки функционального восстановления при терапевтических воздействиях.

Выступая в качестве постурального и локомоторного нейропротеза, роботизированное устройство мгновенно активирует развитые

двигательные навыки у крыс с ПСМ или инсультом. Обнаружена корреляция между восстановленной с помощью робота постуральной стабильностью, равновесием и улучшенным двигательным контролем задних конечностей. Такие функциональные улучшения подчеркивают важность расширения существующих сегодня систем поддержки туловища, которые являются одномерными, до многомерных. Сходным образом роботизированные экзоскелеты, которые обеспечивают многомерную поддержку, противодействующую силе тяжести, активируют расширенное восстановление верхних конечностей у пациентов, перенесших инсульт (Kwakkel et al., 2008) и улучшение локомоции у людей с частичным ПСМ (Duschau-Wicke et al., 2010). Эти результаты показывают, что концепция активируемого роботом двигательного контроля имеет большое значение для повышения функционального восстановления после нарушений ЦНС.

Роботизированный постуральный нейропротез не только обеспечивал многомерную поддержку туловища, но и также восстанавливал ориентацию конечностей и туловища. Следовательно, поток афферентных входных сигналов рецепторов растяжения и нагрузки от бедра и голеностопного сустава, которые играют существенную роль в координации локомоции (Pearson, 2004), приближался к норме. Предполагается, что восстановление важной сенсорной обратной связи и ее модуляции при конкретной задаче вносит существенный вклад в восстановление управления ходьбой. Так, роботизированный постуральный нейропротез усиливал экстензию бедра при ходьбе по ступеням по сравнению с горизонтальной локомоцией. Эта афферентная информация оказалась достаточной для того, чтобы содействовать увеличению высоты шага и точности положения лапы на ступени. Аналогичным образом, модуляция рецепторов давления и растяжения мышц голени и туловища при ходьбе по изогнутому треку привела к ассиметричным силовым паттернам, которые обеспечивали поддержание равновесия. Такие сенсомоторные процессы улучшались с помощью тренировок. В совокупности эти данные подтверждают и

расширяют современные представления о способности сенсорной информации выступать в качестве источника управления локомоцией после потери супраспинальных стимулов (Courtine et al., 2009; Harkema et al., 2011).

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПРОИЗВОЛЬНОГО ДВИГАТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ ЗА СЧЕТ ОБРАЗОВАНИЯ НОВЫХ НЕЙРОННЫХ СВЯЗЕЙ В ОБХОД ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА

Локомоторные тренировки, использующие проприоцептивную информацию для активации двигательных реакций (Barbeau et al., 1987; Wernig et al., 1992, 1995) приводят к нейропластическим изменениям, способным существенно восстановить ходьбу после тяжелого, но не полного повреждения спинного мозга (ПСМ) (Wernig et al., 1995). Недавние исследования показали, что в сочетании с эпидуральной электрической стимуляцией пояснично-крестцовых сегментов двигательные тренировки также могут восстановить супраспинально опосредованные движения при полной моторной параплегии (Courtine et al., 2009; Harkema et al., 2011). Целью настоящего исследования являлась разработка мульти-системной нейрореабилитационной программы, которая в полной мере использует возможности данной концепции. Мы предположили, что после полного повреждения прямых супраспинальных входных сигналов, роботизированный постуральный интерфейс будет способствовать более активному использованию парализованных задних конечностей головным мозгом. И при регулярном выполнении двигательных задач спинальными нейронными сетями, активированными электрохимической стимуляцией (Musienko et al., 2011), помимо нейронного аппарата спинного мозга, будет также восстанавливаться супраспинальное управление локомоцией путем обширного ремоделирования сохранившихся нейронных сетей.

Методы

Эксперименты проведены на взрослых самках крыс линии Lewis (вес тела – 200 – 220 гр). До хирургической процедуры в течение 1-2 недель крыс (не тренируемых и тренируемых) приучали носить специально сделанный жакет при свободном перемещении по треку. Затем крыс тренировали в течение еще 1- 2 недель ходить бипедально. Все крысы быстро освоили эту задачу. Как правило, они производили последовательные паттерны шагания в течение 1-2 сессий. Положительное подкрепление (вознаграждение пищей) использовалось для поощрения выполнения требуемых от крыс задач.

Основные хирургические процедуры были изложены в Гл.2 Общая методология (Courtine et al., 2008, 2009; Musienko et al., 2011). Кратко, под общим наркозом в стерильных условиях в мышцы задних конечностей были имплантированы биполярные ЭМГ электроды. Два стимулирующих электрода подшивались к твердой оболочке по средней линии спинного мозга на уровне L2 и S1. Затем крысы получили левую латеральную гемисекцию (половинная перерезка всей левой половины спинного мозга и перерезка правого дорсального канатика) на уровне T7 и правую латеральную гемисекцию на T10. Для T7 пере-гемисекции мы стремились билатерально прервать задние столбы, сохраняя при этом вентральные проводящие пути на контралатеральной стороне (Рис. 48). Полнота гемисекций оценивалась по 30-мкм продольным срезам инкубированными в сыворотке, содержащей anti-GFAP (1:1000, Dako, США) антитела. Кроме того, подтверждалось отсутствие BDA-меченых кортикоспинальных аксонов в заднем столбе T8 спинального сегмента в поперечном сечении.

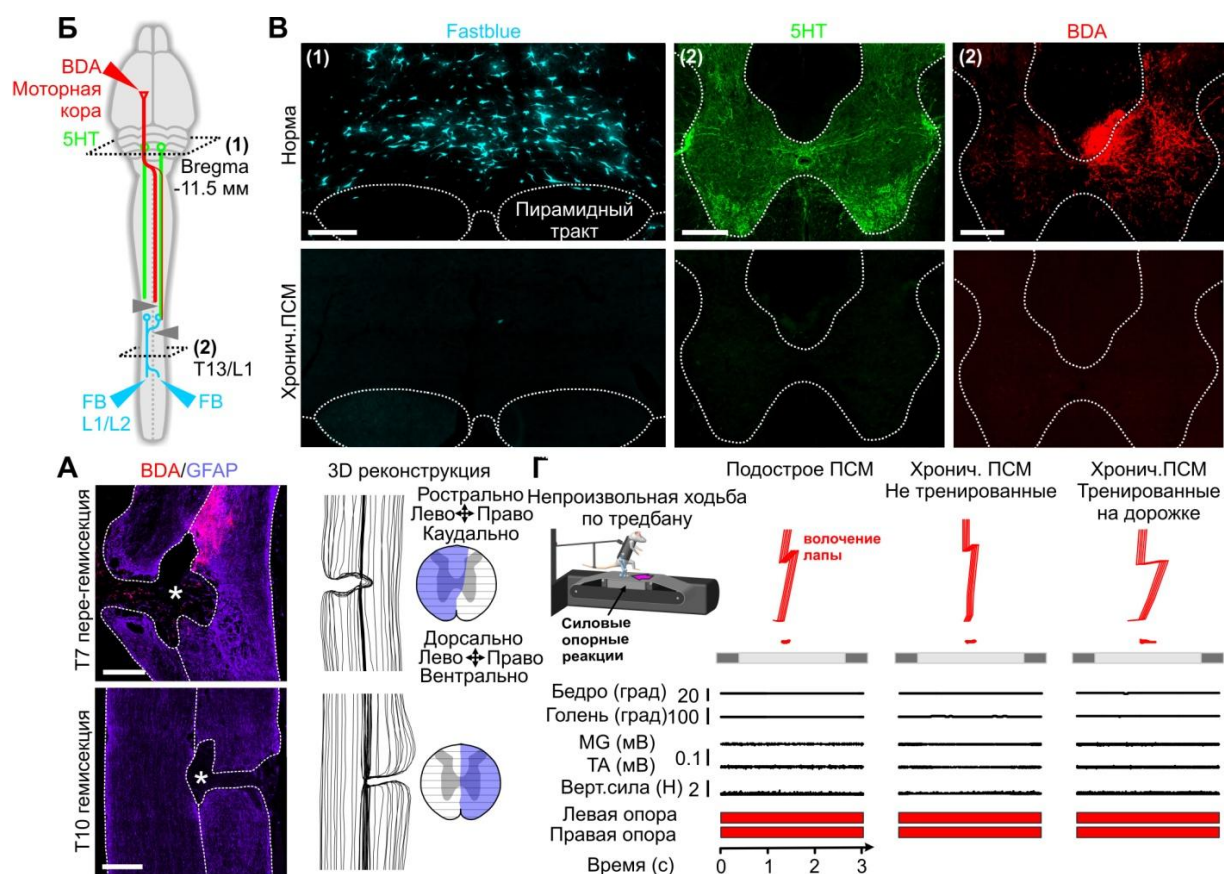


Рис. 48. Повреждение противоположных половин спинного мозга на уровне разных сегментов вызывает перерыв прямых супраспинальных путей и ведет к перманентному параличу задних конечностей

Мультисистемная нейрореабилитация

За десять минут до тренировки крысам систематически вводили интраперитонеально квипазин (агонист 5- HT_{2A/C} рецепторов, 0.2 - 0.3 мг/кг), SKF-82197 (агонист D₁, 0.1 - 0.2 мг/кг), и 8-OH-DPAT (агонист 5- HT_{1A/7}, 0.05 - 0.2 мг/кг). Во время тренировки производили монополярную электрическую стимуляцию (0.2 мс, 100-300 мкА, 40Гц) L2 и S1 сегментов спинного мозга. Локомоторная тренировка проводилась бипедально на движущейся ленте тредбана (9 см/с) с вертикальной роботизированной поддержкой, а также на дорожке при помощи роботизированного постурального устройства (Рис. 39, 49). Содержание каждой тренировки сопоставлялось с фактическими возможностями крыс и текущими целям, как указано на рисунке 49. Позитивное подкрепление использовалось для поощрения выполнения требуемых от крыс задач. Дополнительную группу

крыс тренировали с той же продолжительностью и частотой тренировок, но реабилитация ограничивалась тренировкой на тредбане. Этих крыс тренировали бипедальной локомоции по поверхности при помощи роботизированного постурального устройства в течение 2 недель до ПСМ. Их так же, как и других крыс, испытывали через 1 и 9 недель после поражения. В конце тренировочного периода, тренируемые на тредбане крысы упражнялись в локомоции по поверхности с помощью роботизированного постурального устройства по 10 минут ежедневно, в течение 4-8 сессий. Это делалось для того, чтобы убедиться, что отсутствие у них способности инициировать и поддерживать локомоцию не зависит от специфичности задачи.

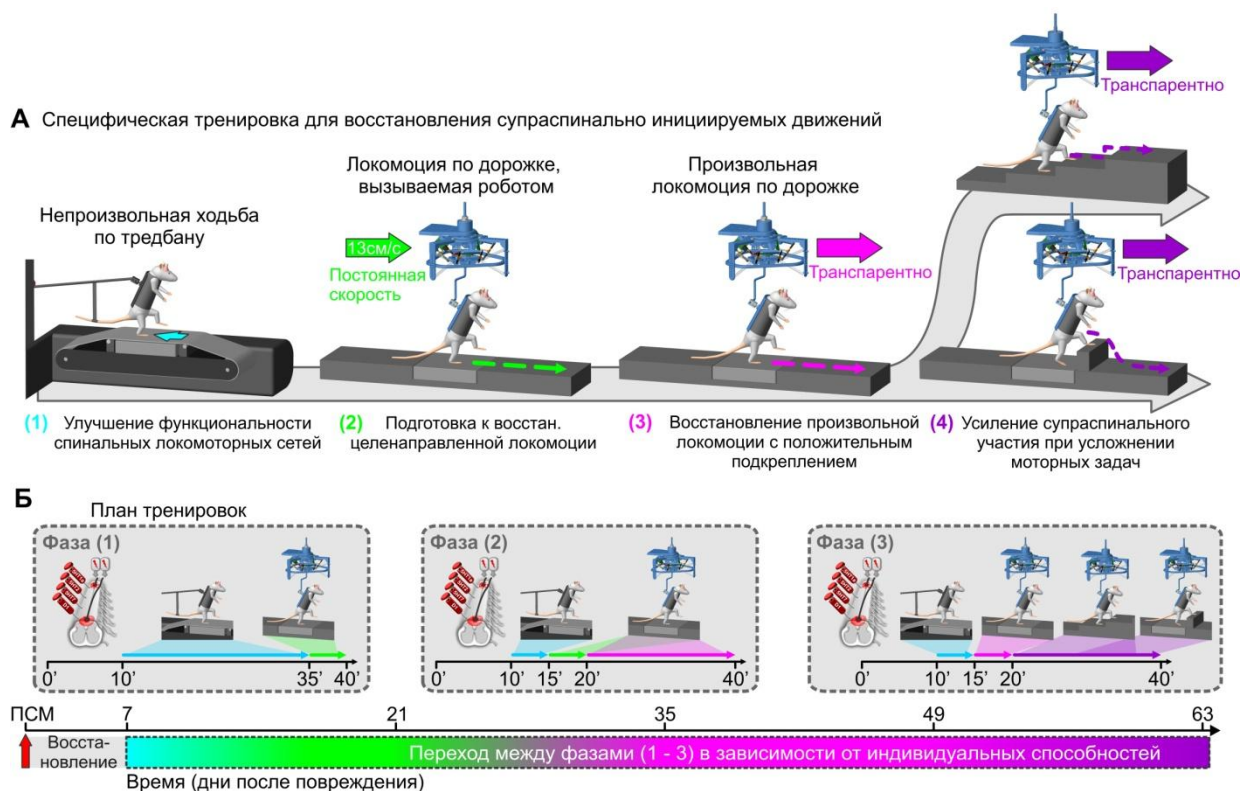


Рис. 49. Концептуальный дизайн мультисистемной нейрореабилитации

Стимуляция головного мозга

Монополярный электрод был имплантирован эпидурально над левой двигательной корой задней конечности (Рис. 56А). Пачка стимулов (0.2 мс, продолжительность импульса - 10 мс, 300 Гц, 0.5 -1.5 мА) прикладывалась во время бипедального стояния. Испытания проводились при воздействии

электрохимической стимуляции и без нее. Полный размах амплитуды и латентный период вызванных ответов были рассчитаны по ЭМГ записи левой ТА мышцы.

Регистрация модуляции нейронов моторной коры

На 60-70 день после ПСМ, микропроволочная матрица (16 или 32 канала записи) была имплантирована стереотаксически в V слой области задней конечности левой двигательной коры (Рис. 56В). Записи проводились через 5-7 дней после процедуры. Нейронные сигналы были получены (24,4 кГц) с рабочей нейрофизиологической станции, синхронизированной с кинематическими записями. Последующий сортинг спайков проводился с помощью суперпарамагнитной группировки в кластеры (Quiroga et al., 2004). Кластеры настраивались вручную на основе установленных принципов (Lewicki, 1998) для идентификации отдельных единиц. Модуляции анализировались в экспериментальных сессиях по отдельности. Использовались два рекуррентных поведения для оценки значимости модуляции: (1) инициация – определялось как начало фазы переноса после предыдущего покоя; (2) коррекция – определялось как начало фазы переноса после нерегулярной ходьбы. С помощью теста Колмогорова-Смирнова, основанного на двойной выборке, мы сравнивали частоту спайковых разрядов (оцененную в окне 250 мс) в последовательных односекундных периодах, охватывающих инициацию и коррекцию, для определения значимости модуляции (Carmel et al., 2010).

Микроинъекции NMDA и мусцимола

Чтобы произвести абляцию T8-T9 нейронов, вводился N-метил-D-аспартат (NMDA, 1% в dH₂O) в 14 мест (глубиной 1 мм, общим объемом 3 мкл), охватывающих спинальные сегменты T8-T9. В течение 5 дней после поражения над крысами проводили испытания. Абляции нейронов была проверена при вскрытии на срезах тканей, окрашенных мышинными anti-NeuN (1:500, Chemicon, США) антителами. Чтобы инактивировать

двигательную кору, интра-кортикально вводился агонист γ -Аминomásляной кислоты (GABA), мусцимол (800 нл, 4.5 мг/кг). За пять дней до экспериментов стереотаксически имплантировался катетер (наружный диаметр 0,61 мм, внутренний диаметр 0,28 мм) в левую двигательную кору, на глубину 1,5 мм (Рис. 56 В,Г). Правильное размещение катетера было проверено на срезах тканей, окрашенных по технологии люминесцентной NISSL визуализации (Invitrogen, США) при вскрытии.

Методы регистрации кинематики, кинетики движений и ЭМГ активности, нейроморфологические процедуры, а также статистический анализ, используемый в работе, более подробно описаны в Главе 2 Общая методология и рис. 31 Ж.

Результаты и обсуждение

После проведения левой латеральной пере-гемисекции на уровне T7 и правой латеральной гемисекции на T10 прерывались все прямые супраспинальные проводящие пути (Рис. 48 А-В) (Van den Brand et al., 2012), 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 (Рис. 48 Г). 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 из спящего в высоко функциональное состояние (Musienko et al., 2012) применялась тоническая (40 Гц) эпидуральная электрическая стимуляция L2 и S1 сегментов спинного мозга (Courtine et al. 2009) и систематически

локомоции ни в одном направлении (Рис. 50 Б). Все тестированные крысы ($n = 27$) не смогли инициировать локомоцию задних конечностей по поверхности на 7 день после получения травмы ($P < 0.001$) (Рис. 50 В).

Была разработана мультисистемная нейрореабилитационная программа тренировки (см. методы). Во-первых, улучшалась функциональность пояснично-крестцовых сетей с помощью локомоторных тренировок на тредбане при электрохимической стимуляции (Courtine et al., 2009). Во-вторых, мы стремились содействовать восстановлению супраспинально опосредованных движений с помощью роботизированного постурального устройства. Робот использовался не только для того, чтобы содействовать, но также, чтобы заставить крыс активно использовать свои парализованные задние конечности и бипедально идти по направлению к цели.

Крыс ($n = 10$) тренировали ежедневно по 30 минут, используя комбинацию обеих указанных парадигм тренировки, начиная с 7 – 8 дня после получения травмы (рис. 49). Первые произвольные шаги появлялись после 2 - 3 недель тренировок ($P < 0,01$) (рис. 50 Г). Когда произвольные движения восстановились, постепенно увеличивалась относительная продолжительность тренировки в робототехническом нейропротезе (рис. 49). 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. 49, 50 В и Г). Кинематический анализ показал, что крысы, тренируемые в роботе, использовали стратегию управления, аналогичную той, которую используют интактные животные при локомоции (Рис. 50, А и В). Чтобы измерить степень восстановления, стандартный клинический тест 6-минутной ходьбы (Guyatt et al., 1985) был адаптирован к бипедальному шаганию крыс. Тренируемые в роботизированном нейропротезе животные с параличом, вызванным ПСМ, преодолевали расстояние в 21 м за 3 минуты (Рис. 50 Г).

Проверялось, вызовет ли тренировка шагания только на тредбане в сочетании с электрохимической стимуляцией также восстановление произвольной локомоции на свободной поверхности ($n = 7$ крыс). Как оказалось, автоматизированная тренировка не восстановила локомоцию по дорожке, несмотря на повторяемые испытания в течение 4 – 8 сессий на протяжении 9 недель после получения травмы ($P < 0.001$) (Рис. 50 В и Г).

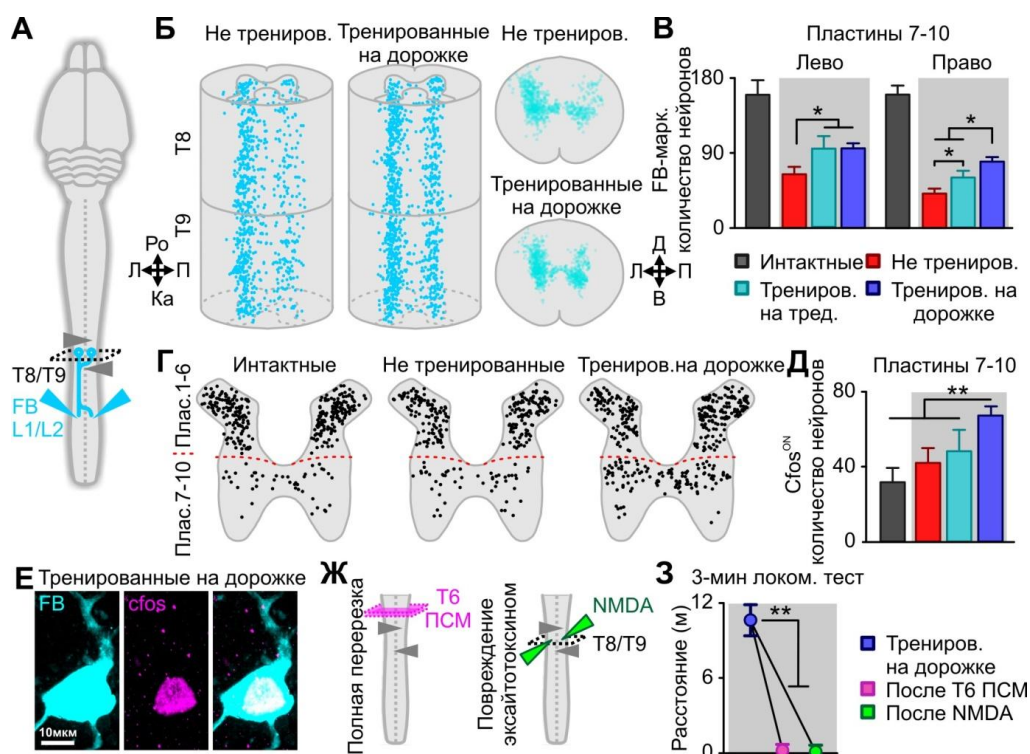


Рис. 51. Мультисистемная нейрореабилитация способствует формированию внутриспинальных связей в обход повреждения

Для 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 ровной поверхности (дорожке) крысы демонстрировали бипедальный бег по ступеням и преодоление препятствий (Рис. 50 В).

Анатомические исследования показали, что в основе восстановления произвольного контроля локомоции у крыс лежит глубокое ремоделирование супраспинальных и интраспинальных нейрональных

связей. Сначала проводились нейроморфологические исследования с применением ретроградных трейсеров трактов от спинальных локомоторных центров, располагающихся на уровне L1/L2 поясничных позвонков (Рис. 51А). Было обнаружено значительное увеличение количества ($P < 0.05$) (Рис. 51 Б и 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, тренированных 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. 51Е). Количество c-fos ядер в областях, богатых нейронами, ретроградно мечеными из L1/L2 локомоторных центров, было больше у крыс, тренированных в работе, чем у других групп ($P < 0.01$) (Рис. 51, Г и 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, была произведена абляция T8/T9 нейронов путем инфузии сохраняющего аксоны эксайтотоксина N-метил- D-аспаргиновой кислоты (NMDA) (Courtine et al., 2008) (Рис. 51 Ж). После введения NMDA восстановленный произвольный контроль локомоции нарушался ($P < 0.01$) (Рис. 51 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 от T8/T9 нейронов ($P < 0.01$) (Рис. 51 Ж и З).

Проекция левой моторной коры к задней конечности маркировалась инъекциями биотинилированного декстран амина (BDA) (Рис. 52 А). 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

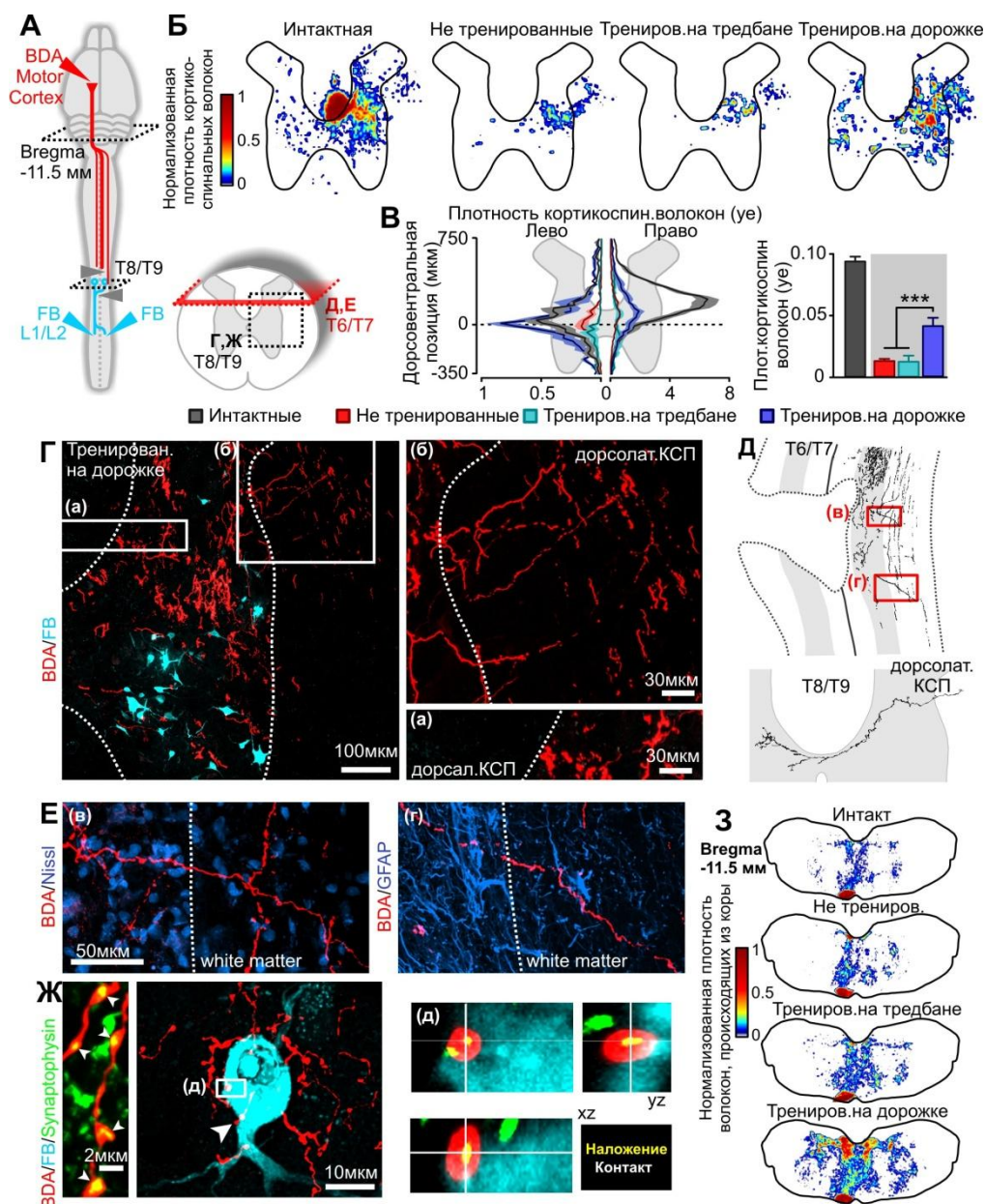


Рис. 52. Мультисистемная нейрореабилитация приводит к обширному remodelированию спинальных и стволовых проекций моторной коры.

канатике спинного мозга (Рис. 53 Д). Поэтому не тренированные крысы показали очень небольшое количество меченных КСП в сегментах T8/T9 (Рис. 52 Б и В, Рис. 53 Д). У крыс, которых тренировали только на тредбане, также не было значительных изменений в плотности грудных КСП проекций (Рис. 52 Б и В, Рис. 53 Д). Тогда как у тренированных произвольной ходьбе крыс было обнаружено восстановление $45 \pm 7\%$ от плотности билатеральных волокон до поражения (Рис. 52 Б - Г). Эти КСП аксоны ответвлялись от правого дорсолатерального канатика спинного

мозга (Рис. 52 Г) и обильно иннервировали правое и, что более неожиданно, левое серое вещество сегментов T8/T9 (Рис. 52 Д) (Rosenzweig et al., 2010).

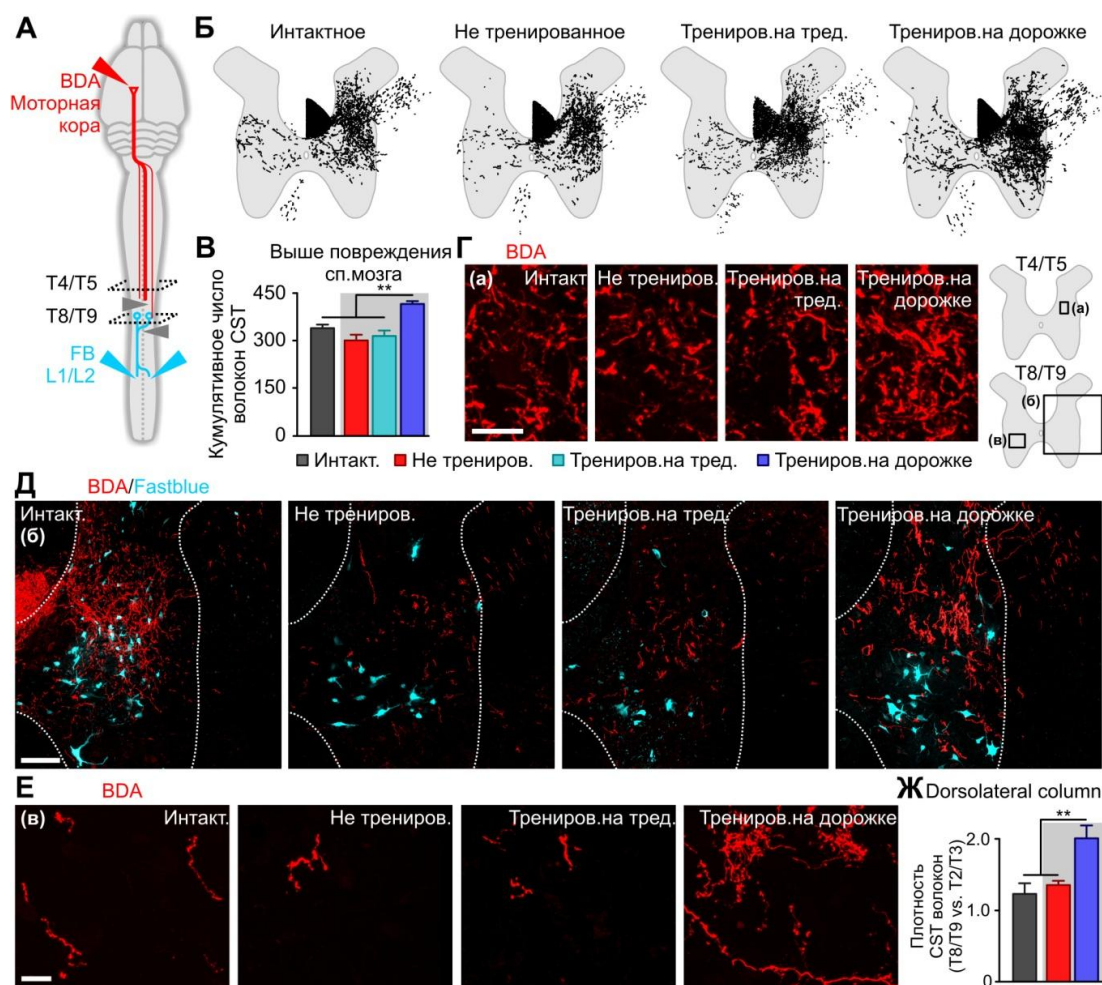


Рис. 53. Мультисистемная нейрореабилитация приводит к обширному ремоделированию кортикоспинальных проекций выше и ниже ПСМ.

Было обнаружено множественное распространение волокон КСП из серого вещества в месте поражения (T7) в правый дорсолатеральный канатик белого вещества (Рис. 52 Д и Е). На Рис. 52Д представлена 3D реконструкция волокон дорсального кортико-спинального тракта (DCST) 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 ($P < 0.01$) (Рис. 53 Ж). Грудные волокна КСП обошли пере-гемисекцию на T7 по правому дорсолатеральному спинномозговому канатику, проросли в серое вещество,

и пересекли среднюю линию (Рис. 52 Е). Эти волокна развили большую аксональную структуру с бутоноподобными набуханиями, позволяющими предположить наличие спрутинга в конечных древовидных структурах (Рис. 53 Е). Конфокальная микроскопия подтвердила, что грудные волокна КСП прорастают к синаптическим элементам, поскольку они колокализовались с синаптофизинем (рис. 52 Ж). Эти волокна установили контакты с релейными нейронами, ретроградно меченными от локомоторных центров пояснично-крестцового расширения спинного мозга на уровне L1/L2 позвонков (рис. 52 Ж).

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 не тренированными крысами, тренированными на тредбане и интактными крысами ($P < 0.01$) (Рис. 53 А - Г). Было обнаружено почти четырехкратное увеличение плотности кортикальных проекций в различных двигательных областях ствола мозга (Рис. 52 З и Рис. 54), в том числе, в левом и правом вестибулярных ядрах ($P < 0,01$), во всей 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 конкретных пластинок T8/T9 серотонинергической иннервации специфических пластинок серого вещества у тренируемых на дорожке крыс, и истощение 5НТ волокон у не тренируемых или тренируемых на тредбане животных ($P < 0.05$) (Рис. 55).

В совокупности нейроморфологический анализ показал, что автоматизированная тренировка, ограниченная тредбаном, не вызвала анатомических изменений в нисходящих проводящих путях, тогда как активная тренировка произвольной ходьбы на дорожке вызвала многоуровневую пластичность в системе аксонов, происходящих из коры и ствола мозга.

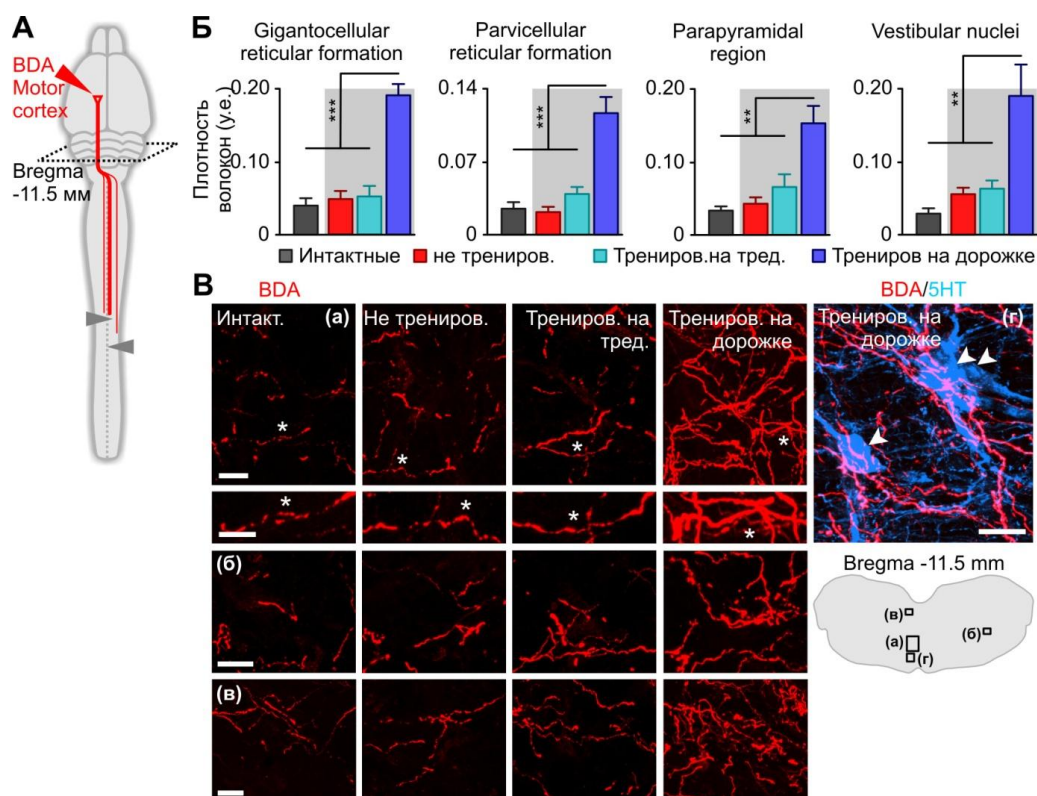


Рис. 54. Мультисистемная нейрореабилитация приводит к обширному ремоделированию аксональных проекций моторной коры к локомоторным областям ствола мозга.

Считается, что, в отличие от приматов, двигательная кора грызунов не является существенно важной для вызова локомоции (Courtine et al. 2007). Мы попытались показать, что вызванное тренировками ремоделирование проекций двигательной коры участвует в управлении произвольной ходьбой. Во-первых, имплантировались стимулирующие эпидуральные электроды на левую моторную кору, чтобы убедиться, что реорганизация нейронных проводящих путей восстанавливает проводимость через место поражения. До ПСМ применение пачек электрических стимулов малой

интенсивности (от 0,7 до 1,5 мА) вызывало интенсивные ответы в левой передней большеберцовой (ТА) мышце (Рис. 56 А). ПСМ безвозвратно устраняло эти ответы у не тренированных крыс ($P < 0.001$) (Рис. 56 А). В отличие от них, тренируемые на свободной дорожке крысы восстанавливали ответы ниже уровня поражения, в среднем около 10% от их амплитуды до поражения ($P < 0,001$) (Рис. 56 Б). Латентность этих

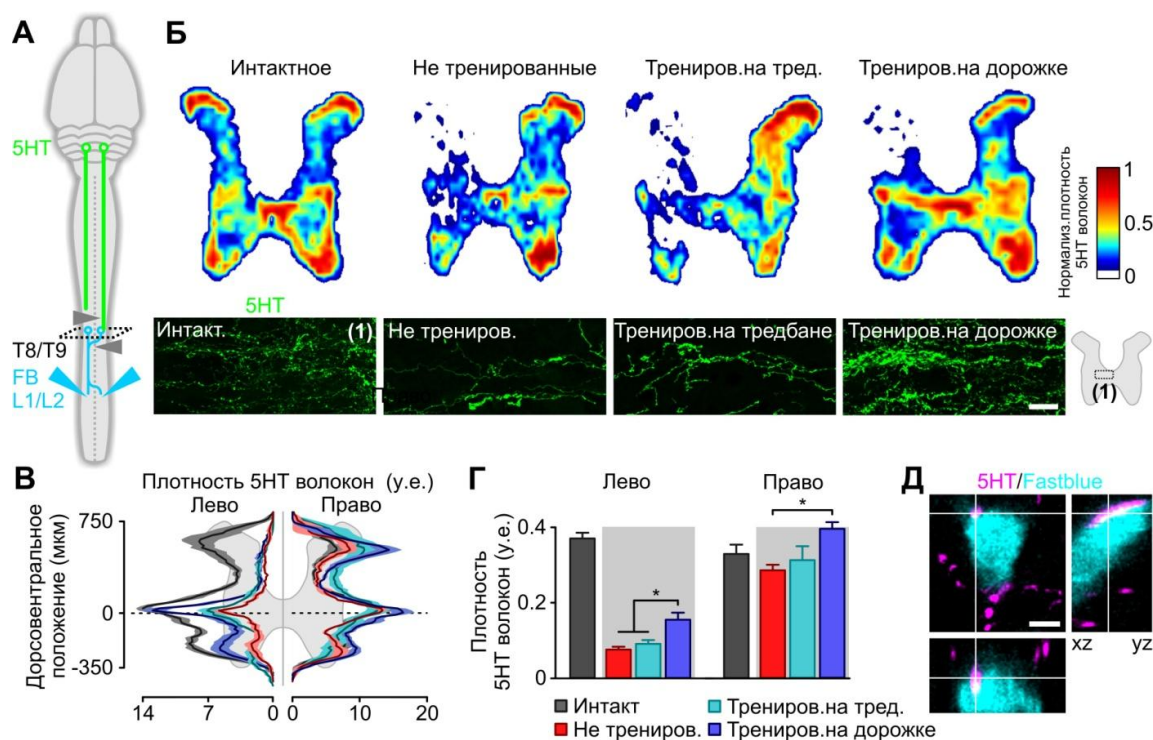


Рис. 55. Мультисистемная нейрореабилитация приводит к обширному ремоделированию серотонинергических нейрональных проекций, происходящих из ствола мозга

ответов была больше на 12 ± 3 мс ($P < 0.01$) (Рис. 56 А). Это позволяет предположить, что для передачи супраспинальных сигналов пулам мотонейронов задней конечности было необходимо большее количество синаптических передач. Амплитуда ответов существенно увеличивалась при электрохимической активации двигательной активности ($P < 0,01$) (Рис. 56 А и Б), что указывает на усиление передачи супраспинальной команды (Cowley et al., 2008). Во-вторых, имплантировалась микропроволочная матрица в районе КСП нейронов, проецирующихся к T8/T9 сегментам (Рис.

56 В) и записывались модуляции корковых нейронов при произвольной локомоции у тренированных на дорожке крыс ($n = 3$). Было обнаружено множество нейронов ($N = 17/24$ нейронов), чьи паттерны модуляции значительно ($P < 0,05$) (Рис. 56 Г) коррелировали с инициацией ходьбы, устойчивой локомоцией, и коррекционными движениями. Значительное количество нейронов двигательной коры (36 %) показало резкое увеличение частоты спайковых разрядов перед появлением любого явного движения или до начала мышечной активности, связанной с локомоцией (Рис. 56 Д). В-третьих, инактивировалась левая двигательная кора с помощью микроинъекции агониста γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) мусцимола (Рис. 56 Е). Мусцимол сразу подавлял произвольную локомоцию задних конечностей ($P < 0.01$) (Рис. 56 Ж), несмотря на остающуюся высокую функциональность пояснично-крестцовых нейронных сетей спинного мозга.

До настоящего времени считалось, что для функционального восстановления после ПСМ необходима регенерация разорванных волокон (Courtine et al., 2007; Alto et al., 2009). Несомненно, нейрорегенерация может иметь огромное значение, особенно после полного ПСМ. Однако не менее важный подход может основываться на высокой способности сохранившихся нейронных систем к реорганизации с помощью механизмов «пластичности при активности» (Wernig et al., 1992; Harkema et al., 2011; Edgerton et al., 2008). В соответствии с этим, мы создали условия для тренировок, которые не только позволили, но и заставили мозг построить заново множество релейных связей в спинном мозге и стволе, чтобы восстановить доступ к электрохимически активируемым пояснично-крестцовым нейронным сетям. Появляется все больше доказательств того, что активное обучение с естественными сенсорными сигналами заметно превосходит пассивную, управляемую роботом реабилитацию шагательных способностей у человека (Wernig et al., 1992; Wernig et al., 2005; Wirz et al., 2005; Cai et al., 2006; Edgerton et al., 2008; Harkema et al., 2011). Сходно с этим, в настоящей работе автоматизированная тренировка, ограниченная

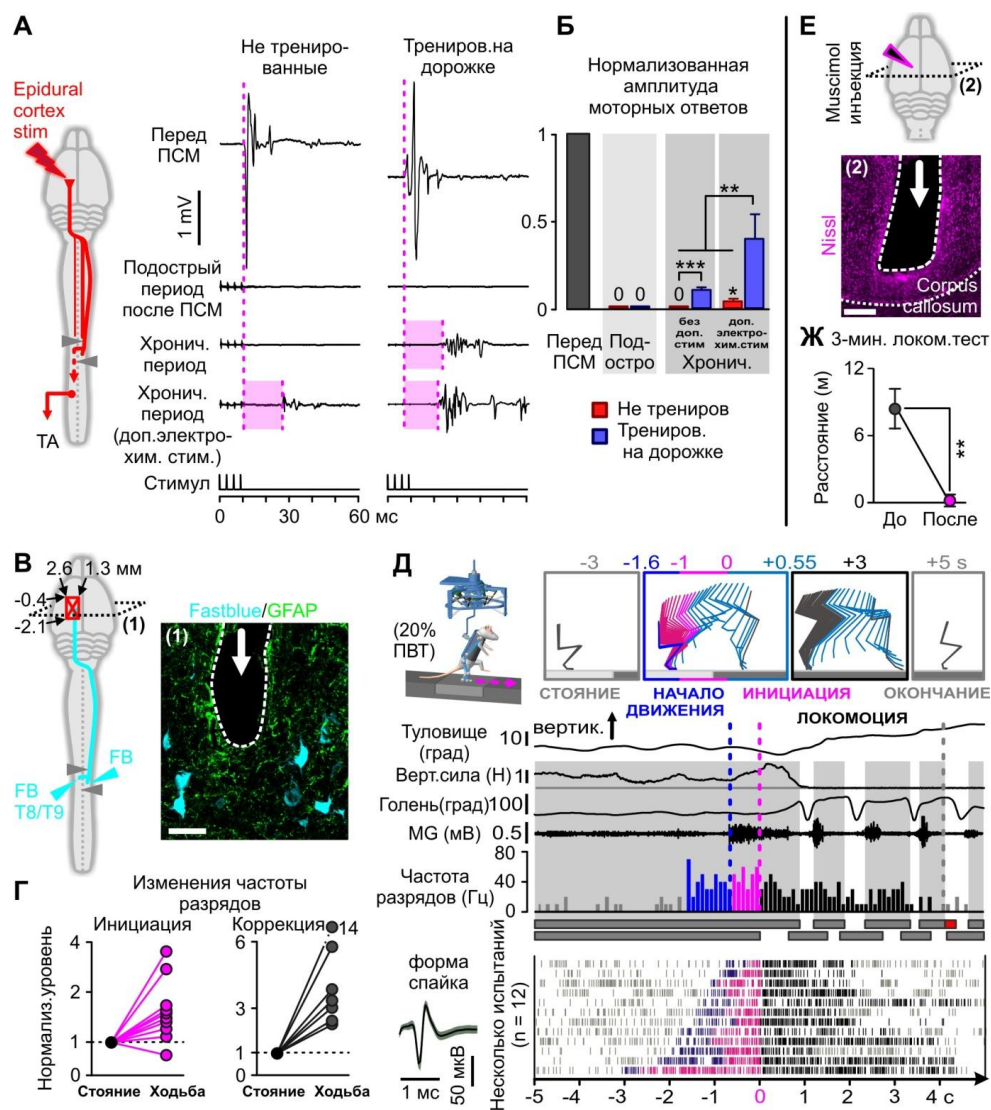


Рис. 56. Восстановление коркового двигательного контроля при произвольной ходьбе крыс, тренированных методами мультисистемной нейрореабилитации.

тредбаном, которая не задействует корковые нейроны, активировала пластичность ниже уровня повреждения, но не могла вызвать ремоделирование нисходящих проводящих путей. Тренируемые на тредбане крысы не восстанавливали супраспинальный контроль локомоции. В свою очередь, предлагаемая новая парадигма мультисистемной нейрореабилитации, включающая электрохимическую стимуляцию спинного мозга и тренировку в робототехническом нейропротезе, поддерживала активное участие крыс в процессе тренировки, а также вызывала корково-зависимый активный процесс нейрональной

пластичности, который восстанавливал произвольное управление локомоторным поведением разной сложности после ПСМ, исходно вызывавшему хронический паралич. Результаты работы подтверждают способность внутриспинальных сетей обходить место повреждения (Courtine et al., 2008, Bareyre et al., 2004) и расширяют наши представления о терапевтическом потенциале таких обходных сетей для восстановления функций после ПСМ. Предлагаемая парадигма тренировки в высоко функциональных состояниях для активации нейрональной пластичности и восстановления может привести к выявлению новых мероприятий, способных улучшить функции у пациентов с различными нейромоторными нарушениями (Musienko et al., 2009; Fuentes et al., 2009; Harkema et al., 2011).

Глава 6.

МЕХАНИЗМЫ СЕНСОМОТОРНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ЛОКОМОЦИИ И ПОЗЫ

В предыдущих главах показано, что локомоторная и поструральная функции могут эффективно контролироваться нейронными сетями ствола и спинного мозга, восстанавливаться после повреждения спинного мозга и других нейромоторных заболеваний. Но как осуществляется сенсомоторная интеграция этих двух неразделимых составляющих активного перемещения в пространстве? Где локализируются нейронные сети, ответственные за динамический контроль баланса при ходьбе? Каковы подлежащие рефлекторные и нейрональные механизмы? Этим вопросам посвящена данная глава.

СОМАТОСЕНСОРНЫЙ КОНТРОЛЬ БАЛАНСА ПРИ ХОДЬБЕ

Децеребрированные животные после удаления нейрональных структур выше постмамиллярной перерезки теряют способность стоять или ходить самостоятельно (Bard, Macht 1958; Magnus, 1924; Musienko et al., 2008). Локомоция с частичной поддержкой веса тела, однако, может быть вызвана и хорошо контролироваться тонической электрической стимуляцией ствола (Kazennikov et al., 1988; Shik et al., 1966) или спинного мозга (Gerasimenko et al., 2005). Адекватное продвижение вперед (пропульсия), осуществляющаяся задними конечностями в этих экспериментальных условиях, позволила подробно исследовать стволовые, спинальные и сенсорные механизмы локомоторного контроля (Gerasimenko et al., 2008; Shik, Orlovsky 1976; Whelan, 1996). Поскольку туловище животных искусственно поддерживалось вертикально и/или латерально, способности поддерживать равновесие при локомоции не были исследованы.

Успешная ходьба требует тесной координации между туловищем и конечностями для того, чтобы перемещать тело вперед (пропульсия), так же

как сохранять динамическое равновесие (баланс). Поскольку масса тела смещается от шага к шагу при нормальной ходьбе (Hof, 2008; Misiaszek, 2006a), для поддержания баланса при локомоции необходим динамический контроль центра масс в пределах критичного диапазона равновесия, что должно быть тесно интегрировано в контроль локомоторной активности. Результаты исследований на экспериментальных моделях при стоянии (Deliagina et al., 2006; Honeycutt et al., 2009) показали, что регуляция позы тела и баланса зависит от мультисенсорной системы, которая иерархично организована (Bernstein, 1967; Roberts, 1978). Эта замкнутая контролирующая система управляется сенсорными сигналами обратной связи и компенсирует отклонения тела от желаемого положения посредством вызова корректирующих двигательных ответов (Deliagina et al., 2006; Horak, Macpherson, 1996; Massion, 1994). При стоянии постуральная система восстанавливает равновесие смещением центра масс ближе к центру опоры, что достигается силовыми опорными реакциями, производимыми конечностями по отношению к опорной поверхности (Macpherson, 1988a, 1988b; Moor et al., 1988). Ситуация меняется при ходьбе, когда равновесие должно поддерживаться динамически при активном передвижении вперед (Karayannidou et al., 2009a). Хотя баланс является ключевым элементом успешного локомоторного поведения, изучению нейронального контроля баланса при ходьбе до последнего времени не уделялось должного внимания. Недавние исследования на интактных кошках показали, что свойства локомоторного паттерна, такие как ширина шага и медиолатеральное положение стопы, ЭМГ активность экстензоров, абдукторов и аддукторов сильно зависит от постуральных условий в каждый момент от шага к шагу как во время, так и без дополнительного возмущающего воздействия (Karayannidou et al., 2009a; Misiaszek, 2006a). Нейрональные механизмы, связанные с такой постурально – локомоторной интеграцией, не идентифицированы. Передний мозг, ствол и спинной мозг, по всей видимости, вовлечены в этот

процесс, но конкретная роль разных уровней центральной нервной системы не определена (Deliagina et al., 2006).

Тоническая электрическая стимуляция мезенцефалической локомоторной области у постмамиллярно децеребрированных животных сначала вызывает вставание животного, за которым следует ходьба по движущемуся тредбану с поддержкой веса тела (Mori, 1987; Mori et al., 1983; Shik et al., 1966). Такая двигательная реакция сопровождается увеличением тонуса антигравитационной мускулатуры и улучшением способностей выполнять постуральные коррекции во время возмущающих воздействий при стоянии, которое предшествует инициации локомоторной активности (Musienko et al., 2008). Это подтверждает, что нейрональный контроль позы и локомоции высоко интегрирован ниже уровня децеребрации и может быть обеспечен нейронными сетями ствола и спинного мозга. В какой степени моторные и соматосенсорные механизмы могут контролировать позу и локомоцию, однако, оставалось неясными.

Тонической эпидуральной стимуляцией (ЭС) спинного мозга возможно вызывать локомоторную активность, которая эффективно контролируется соматосенсорной периферической обратной связью от двигающихся конечностей у децеребрированных (Gerasimenko et al., 2005; Iwahara et al., 1991) и спинализированных (Courtine et al., 2009; Musienko et al., 2007) животных. Предполагается, что электрическая стимуляция дорсальной поверхности спинного мозга влияет на спинальные локомоторные сети через прямую активацию афферентных волокон дорсальных корешков (Gerasimenko et al., 2006). Не понятно, однако, может ли активация соматосенсорного входа эпидуральной стимуляцией улучшать способности поддерживать позу и баланс при ходьбе. Постуральная система в норме зависит от ряда соединительных контролирующих петель, использующих зрительный, вестибулярный и соматосенсорный входы (Beloozerova et al., 2003; Deliagina et al., 2006; Macpherson et al., 1997), хотя в определенных условиях система разделяется на подсистемы, независимо контролирующие

голову и туловище (Barberini, Macpherson, 1998; Deliagina et al., 2006). Ориентация головы стабилизируется, в основном, вестибулярной и зрительной сенсорной информацией (Berthoz, Pozzo, 1988; Boyle, 2001), а соматосенсорные входы являются наиболее важными для стабилизации туловища при стоянии (Beloozerova et al., 2003; Deliagina et al., 2000). Специфическое вовлечение соматосенсорных сигналов, несущих проприоцептивную и экстероцептивную информацию от конечностей, в динамической регуляции равновесия при ходьбе не было исследовано.

В настоящей работе изучались способности нейронных сетей ствола и спинного мозга постмамиллярных кошек в обеспечении динамического баланса при ходьбе после изоляции от переднего мозга, вестибулярной и других супраспинальных нисходящих систем.

Методы

Исследование выполнено на 15 децеребрированных кошках (вес 2,2 – 4 кг). Голова животного и передняя часть туловища (T5-T7) жёстко закреплялись в стереотаксической установке, задняя часть тела и задние конечности свободно располагались на опорной поверхности. Постуральная функция оценивалась по общей конфигурации позы тела, способности к выпрямительным установочным рефлексам, мышечному тону конечностей, правильности и амплитуде постуральных реакций для сохранения равновесия при стоянии и ходьбе. Последовательность хирургических процедур, контроль состояния животных, обработка регистрируемых сигналов и анализ данных описаны в главе 2 Общая методология.

Результаты

Экспериментальная модель и установка для исследования поддержания равновесия

В экспериментах с различными уровнями децеребрации было установлено, что линия перерезки существенно отражается на двигательных

способностях. Субталамические животные с перерезками ростральнее передних холмов четверохолмия и маммиллярного тела, как правило, были способны к самостоятельному стоянию и ходьбе с поддержкой веса тела. Общая конфигурация позы тела, распределение мышечного тонуса конечностей были близки к норме. Характерным было возникновение спонтанной локомоции, что мешало проведению постуральных тестов (Шик, 76). Кошки с каудальными перерезками, проходящими через мост,

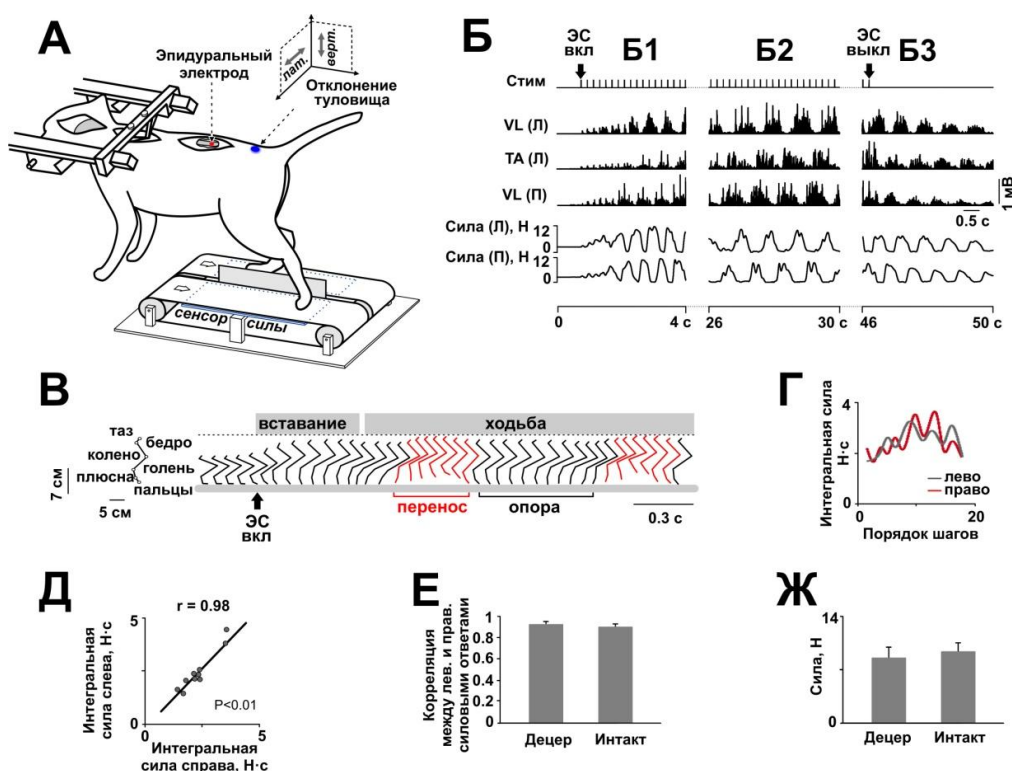


Рис. 57. Ходьба децеребрированной кошки с поддержкой веса тела при ЭС.

отличались неправильным распределением мышечного тонуса и децеребрационной ригидностью. Для дальнейшего изучения постурального контроля была выбрана преколликкулярная-постмамиллярная децеребрация (мезенцефалический препарат по Шик (Шик и др., 1966)). В этом случае наблюдалось нормальное распределение мышечного тонуса и отсутствие спонтанной локомоции. Исходно пониженные постуральные способности могли быть активированы стимуляцией спинного мозга. При стимуляции с частотой 0,5-1 Гц и невысокой амплитуде (50-100 мкА) усиливался мышечный тонус и постуральные ответы во время стояния животного.

Стимуляция с большей частотой (3-5 Гц) и амплитудой инициировала локомоторную активность.

Для изучения интегративного контроля позы и локомоции на данном препарате было разработано устройство для вызова и регистрации постуральных ответов (Рис. 57 А, Рис. 62). Установка состоит из электро-механического стенда-тредбана и комплекта датчиков для мониторинга функции поддержки веса тела. Тредбан располагается на оси, вокруг которой может быть наклоняем во фронтальной плоскости. Сенсорные платформы, находящиеся под каждой из двух лент тредбана, измеряют силовые опорные реакции - усилия, с которыми объект исследования воздействует на ленту при ходьбе или стоянии. С помощью серии механических сенсоров регистрируются перемещения туловища и конечностей животного в пространстве.

Ходьба с поддержкой веса тела, вызванная эпидуральной стимуляцией

Мезенцефалическая кошка была не способна к спонтанной ходьбе и стоянию, до стимуляции пассивно сидела или лежала на неподвижной ленте тредбана. Поскольку уровнем децеребрации каудальнее tractus opticus отключался зрительных вход, а жесткая фиксация головы и передней части тела устраняла вестибулярные и минимизировала проприоцептивные влияния от области шеи, предоставлялась возможность изучать специфическую роль соматосенсорных сигналов от конечностей и туловища в контроле позы при ходьбе.

Предыдущие исследования показали, что децеребрированные кошки способны ходить при электрической стимуляции спинного мозга. В этих исследованиях задняя часть тела искусственно фиксировалась жестким креплением в стереотаксе (Gerasimenko et al., 2005) или поддерживалась в специальной подвеске-гамаке (Iwahara et al., 1991). В данной работе задняя часть тела специально не поддерживалась (Рис. 57 А). Тоническая электрическая стимуляция спинного мозга в области L5 сегмента с частотой

5 Гц и амплитудой 100-300 мкА вызывала увеличение антигравитационного мышечного тонуса, силовых опорных реакций, вставание животного, переходящее при включении тредбана в ходьбу с полной поддержкой веса тела ($n = 7$ кошки, Рис. 57 Б) в течение длительных периодов времени (200 секунд и более) с альтернирующей ЭМГ активностью флексоров, экстензоров, силовых ответов слева-справа (Рис. 57 Б2 и В).

Хорошо координированная локомоция с поддержкой веса тела ассоциировалась с широким разбросом силовых опорных реакций как от опыта к опыту, так и внутри одного эксперимента (Рис. 57 Г). Последовательные силы слева и справа, однако, сильно коррелировали ($r = 0.98$, $n = 7$ кошки) как в пределах разброса шагательных циклов у всех кошек, так и от шага к шагу у одной кошки (Рис. 57 Г). Корреляции силовых ответов справа – слева у децеребрированных ($r = 0.94$, $p < 0.02$, $n = 4$ кошки) и интактных ($r = 0.90$, $p < 0.01$, $n = 4$ кошки) кошек были схожи (Рис. 57 Е). Усредненные амплитуды сил, генерируемые при ходьбе также не отличались существенно у децеребрированных и интактных животных (Рис. 57 Ж). Ходьба с поддержкой веса тела поддерживалась до 10-15 секунд после прекращения ЭС, градуально уменьшаясь (Рис. 57 Б3).

Динамический контроль баланса при локомоции

Ходьба с поддержкой веса тела кошки со свободным тазом требует латеральной стабильности. Хотя децеребрированные кошки ходили с поддержкой веса тела при ЭС, было не очевидно, достигалось ли это за счет пассивных механических свойств экспериментальной модели и установки, или децеребрированные кошки активно поддерживали баланс, используя нейрональные контролирующие механизмы, управляемые соматосенсорным входом, как наблюдалось у интактных животных (Karayannidou et al., 2009a). Для того чтобы проверить это, мы сравнили кинематику движений

туловища и задних конечностей при ходьбе интактных и децеребрированных кошек. В обеих группах задние конечности и туловище

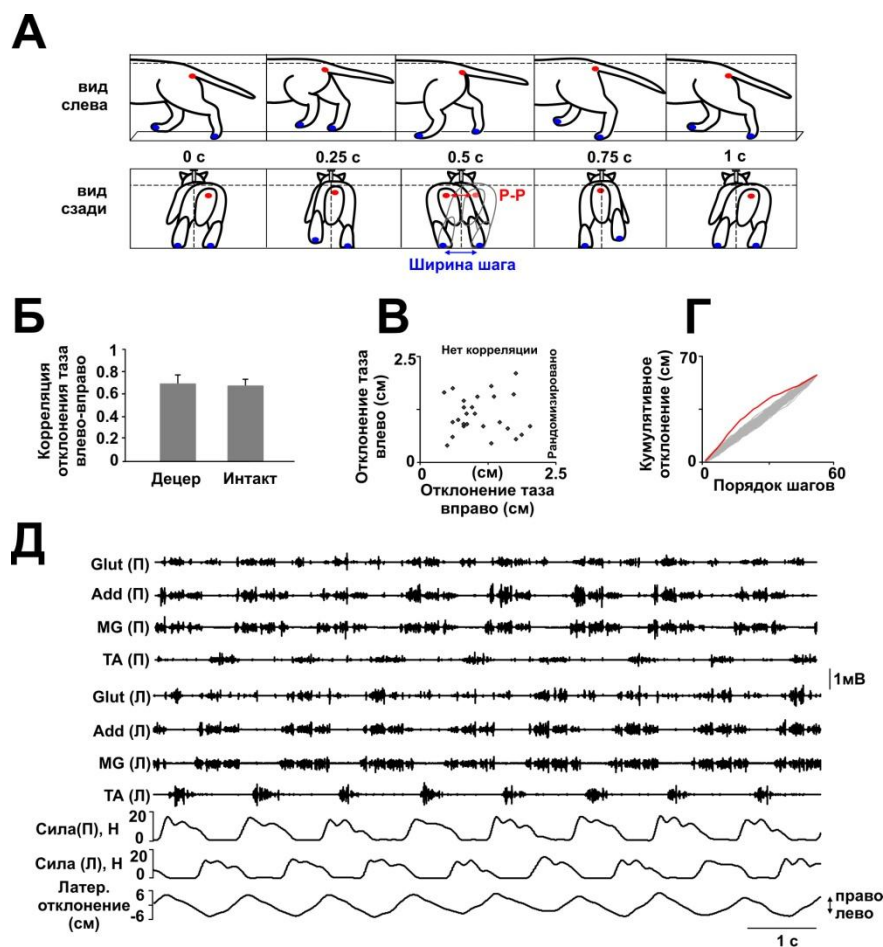


Рис. 58. Кинематический, кинетический и ЭМГ паттерн динамической дестабилизации задних конечностей и туловища при свободной ходьбе децеребрированных кошек.

отклонялись латерально и вертикально (Рис. 58 А). Была обнаружена сильная корреляция между максимальным латеральным отклонением таза слева и справа у децеребрированных ($P < 0.02$; $n = 4$ кошки, $r = 0.69 \pm 0.08$) и интактных ($P < 0.02$; $n = 4$ кошки, $r = 0.67 \pm 0.06$) животных (P - P , от пика до пика на Рис. 58). Для выяснения того, обусловлена ли сильная корреляция отклонений влево и вправо во время последовательных шагов активными контролирующими механизмами, проводился детальный анализ кинематики, ЭМГ активности и кинетики задней части тела при свободной ходьбе. Во-первых, мы сравнили кумулятивные отклонения туловища децеребрированной кошки влево и вправо, построенные в порядке их

появления в серии последовательных шагов (Рис. 58 Г) с кумулятивной последовательностью, в которой порядок шагов был рандомизирован (Рис. 58 В). Было обнаружено, что кумулятивные отклонения туловища децеребрированной кошки, построенные в порядке их появления (красная линия) при ходьбе, последовательно выпадают из диапазона после рандомизации (серая линия), проведенной с использованием метода Монте-Карло ($P < 0.001$, Рис. 58 В,Г) (Fishman, 1995). Данный факт говорит о том, что на поддержание равновесия не влияет величина ответов слева и справа, а скорее, баланс определяется высокой корреляцией между предшествующим и последующим двигательными реакциями. Это может свидетельствовать в пользу принципа регуляции по типу обратной связи, а также динамического процесса упреждения, лежащих в основе контроля равновесия при ходьбе. Другими словами, активация нейронных сетей ствола и спинного мозга, генерирующих моторный паттерн в текущем шаге, определяет двигательную команду, которая будет выполнена в шаге последующем.

Электромиографическая активность мышц задних конечностей при ходьбе децеребрированной кошки со свободным тазом была схожа с активностью мышц при ходьбе интактных кошек (Karayannidou et al., 2009a; Rasmussen et al., 1978). А именно, наблюдалась алтернирующая активность во флексорах (TA) и экстензорах (MG), активность абдукторов (Glut) и аддукторов (Add) преимущественно в экстензорную фазу локомоторного цикла. (Рис. 58 Д). Как показывалось ранее на мезэнцефалических кошках (Gambaryan et al., 1971), мышца m. Gluteus могла быть активна в фазу переноса или иметь отдельные пачки ЭМГ активности во время переноса и опоры. Такой паттерн активности мог быть обусловлен биомеханическими причинами, такими как фиксация роstralной части тела в стереотаксической раме и/или необходимостью латеральной ротации и абдукции бедра при переносе для контроля латерального отклонения туловища.

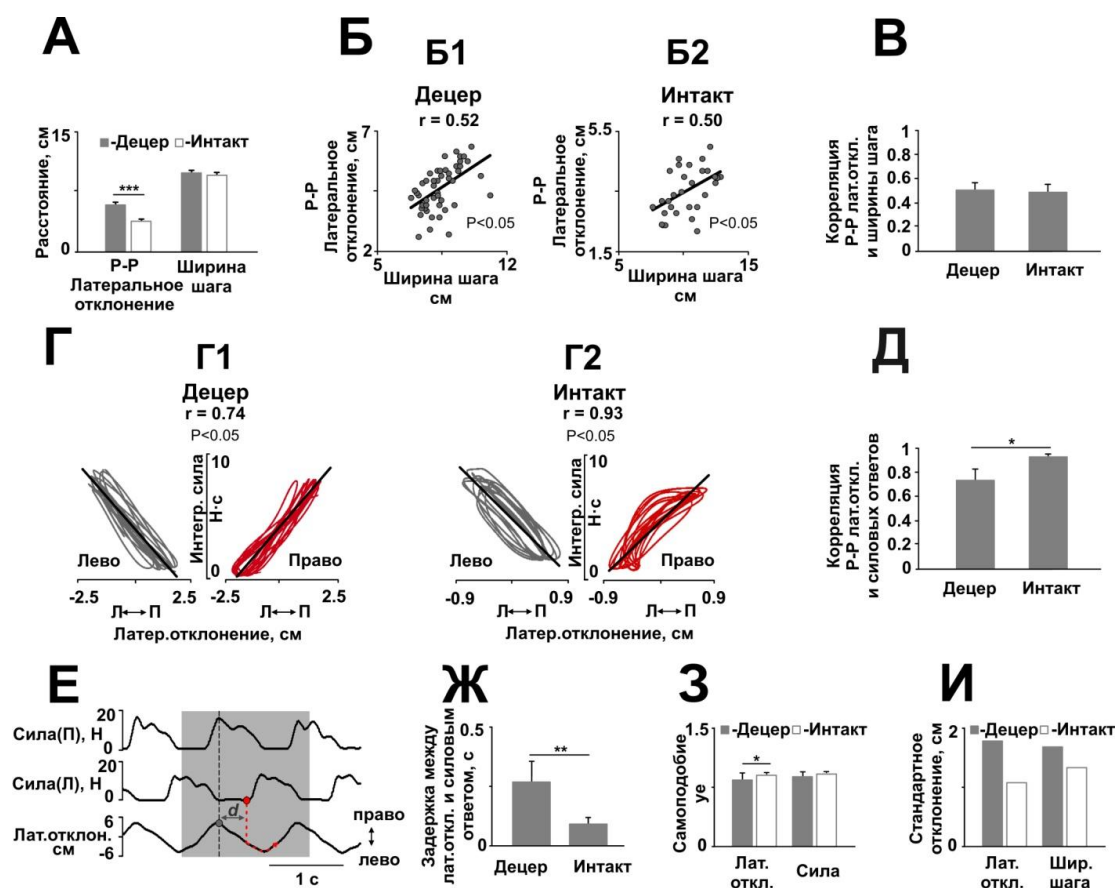


Рис. 59. Сравнение двигательных ответов, связанных с поддержанием баланса при ходьбе, у децеребрированных и интактных кошек.

Было обнаружено, что, как и у интактных, так и у децеребрированных кошек, стопа при ходьбе постоянно двигается в переднее-заднем и медио-латеральном направлениях (Рис. 58 А), приводя к вариабельности ширины шага (9.8 ± 2.6 см, $n = 4$ кошки; Рис. 59 А). Ширина шага также различалась у разных кошек, но коррелировала с Р-Р латеральными отклонениями таза ($P < 0.05$; $n = 4$, $r = 0.50 \pm 0.06$; Рис. 59, Б1 и В), сходно с интактными животными ($P < 0.05$; $n = 4$, $r = 0.49 \pm 0.07$; Рис. 59 Б2 и В). За счет точного позиционирования стопы и регулировки ширины шага центр масс (ЦМ) задней части тела преимущественно оставался между позицией левой и правой стопы и не смещался за пределы площади опоры, что поддерживало латеральную стабильность (Рис. 58 А).

Затем была исследована временная взаимосвязь между повторяющейся латеральной дестабилизацией тела и силовыми опорными реакциями слева

и справа при ходьбе с поддержкой веса тела, вызванной ЭС у децеребрированных кошек (Рис. 59 Г и Д). Регистрируемые силы под лапами, преимущественно вертикальные, представляют из себя суммарную величину, отражающую активность всех мышц в опорную фазу локомоторного цикла. В соответствии с этим мы использовали корректирующие кинетические антигравитационные двигательные ответы всей левой или правой лапы, возникающие вслед за соответствующей латеральной дестабилизацией баланса при ходьбе. Так же как у интактных кошек ($P < 0.05$; $n = 4$, $r = 0.93 \pm 0.02$; Рис. 59 Г2 и Д), у децеребрированных кошек была обнаружена высокая корреляция между продолжающимся смещением таза и соответствующими силовыми опорными реакциями ($P < 0.05$; $n = 4$, $r = 0.74 \pm 0.1$; Рис. 59 Г1 и Д). Хотя менее, чем у интактных кошек (Рис. 59 Д), амплитуда правых и левых ответов точно соответствовала продолжающимся изменениям и увеличению латерального отклонения таза. Следовательно, кинематика и кинетика задних конечностей и таза были высоко координированы при ходьбе у децеребрированных, так же как у интактных животных (Рис. 59 А–Д). Была также обнаружена задержка между латеральным отклонением туловища и силовыми опорными реакциями, которые участвовали в восстановлении равновесия (d на Рис. 59 Е). Эта задержка была значимо дольше у децеребрированных кошек в сравнении с интактными (Рис. 59 Ж), так же как и более высокие амплитуды циклических латеральных отклонений тела (Рис. 59 А). Более того, анализ «самоподобия» и стандартные отклонения регистрируемых величин у всех тестируемых животных показали существенно бóльшую вариабельность в латеральных отклонениях тела от шага к шагу ($P < 0.05$; Рис. 59 З и Н) и ширине шага (Рис. 59 З) у децеребрированных в сравнении с интактными кошками.

Адаптивные поструральные ответы на возмущающие воздействия при ходьбе

Следующим шагом исследовалось, может ли моторная система ствола и спинного мозга децеребрированных кошек контролировать баланс не только при спокойной локомоции, но и при возмущающих воздействиях, наносимых искусственно во время локомоторной активности. Прикладывалась продолжительная латеральная сила на область таза при продолжающейся ходьбе, вызванной ЭС ($n = 4$; Рис. 60). Такое воздействие отклоняло заднюю часть тела в сторону (7-20 см вправо на Рис. 60А) и препятствовало движениям таза в противоположную сторону (влево на Рис. 60А) на протяжении 15-20 секунд. Мы обнаружили, что децеребрированные кошки могут продолжать ходить в данных неудобных условиях и эффективно поддерживать латеральную стабильность благодаря специфическим и ассиметричным адаптациям моторного паттерна в левой и правой конечностях. Модуляции силовых ответов (Рис. 60 А–Г), ЭМГ активности и длительности шагательного цикла (Рис. 60 А, Б и Д–К) в обеих лапах длились на протяжении всего времени возмущающего воздействия. Силовые опорные реакции в контралатеральной возмущающему воздействию конечности были существенно редуцированы у четырех тестируемых кошек (Сила-Л на Рис. 60 Г; $P < 0.01$). Силовые опорные реакции ипсилатерально увеличивались (Сила-П на Рис. 60 А и Б) или не изменялись (не было существенных отличий по всем тестируемым кошкам, Рис. 60 В). Наблюдались изменения экстензорной и флексорной активности, так же как изменения в длительностях опорной и переносной фаз локомоторного цикла обеих лап во время отклонения животного (Рис. 60 А и Б). Фаза опоры была немного, но значимо по всем кошкам, длиннее на стороне отклонения (Рис. 60 Б и Д; $P < 0.01$). На контралатеральной стороне фаза переноса удлинялась, тогда как фаза опоры укорачивалась (Рис. 60 Б и Е; $P < 0.001$). У всех тестируемых кошек мы наблюдали билатеральную модуляцию активности аддукторов и абдукторов, что могло

вносить свой вклад в контроль медиалатерального отклонения задней части тела и поддержания баланса. Конкретно, активность абдуктора ипсилатерально отклонению увеличивалась (Glut (П) на Рис. 60 А, Б и Ж; $P < 0.01$), тогда как активность абдуктора контралатерально уменьшалась (Glut (Л) на Рис. 60 А, Б и И; $P < 0.001$). В дополнение к этому уменьшалась активность аддуктора ипсилатерально (Add (П) в Рис. 60 А, Б и З; $P < 0.001$). В четырех кошках билатеральные коррекции кинематических, ЭМГ и кинетических характеристик были достаточны для поддержания баланса задней части тела в ответ на существенное отклонение центра масс после приложения латеральной силы. Когда возмущающее воздействие прекращалось, через 2-3 шага кошки показывали локомоторный паттерн с

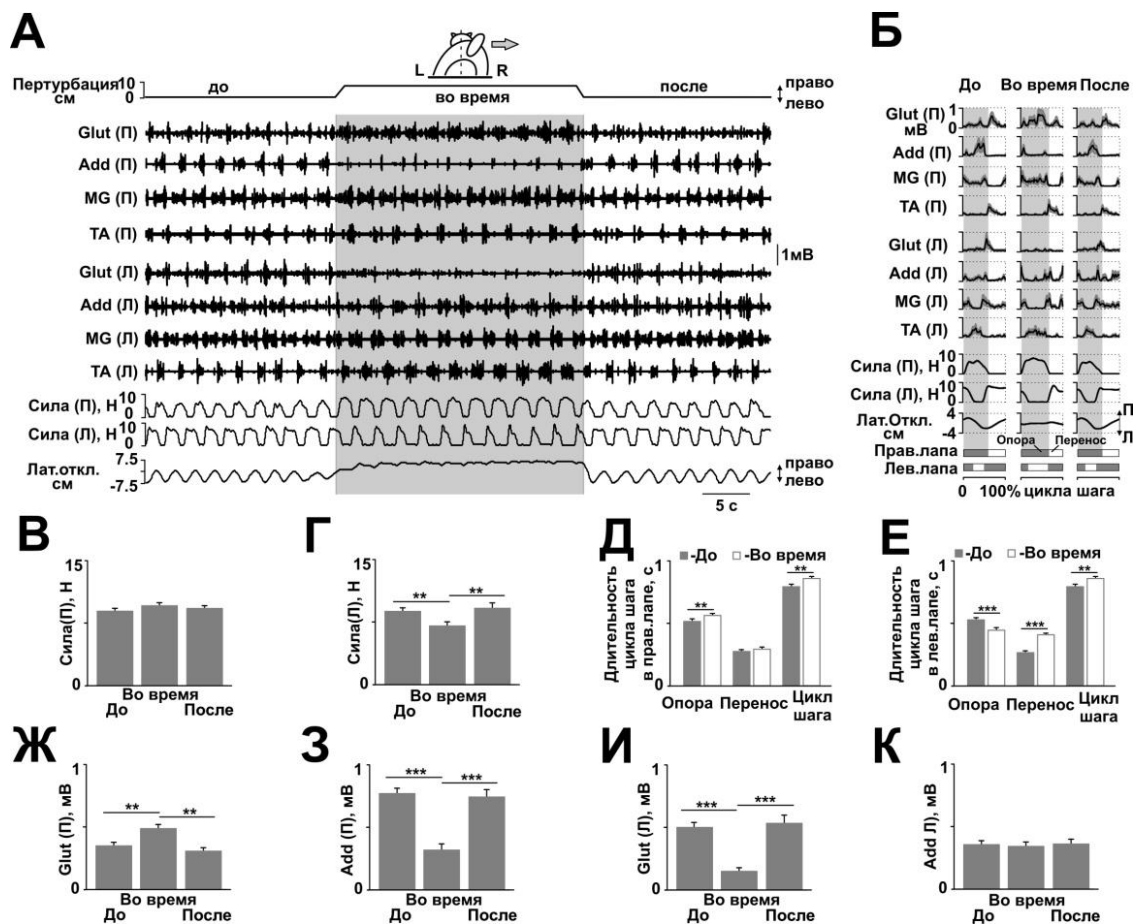


Рис. 60. Адаптивные поструральные ответы на продолжительную латеральную пертурбацию задней части тела при локомоции децеребрированных кошек.

ЭМГ активностью и силовыми опорными реакциями, которые не отличались существенно от ходьбы до отклонения (Рис. 60 А–К).

Затем мы тестировали способности децеребрированных кошек восстанавливать равновесие, необходимое для хорошо координированной ходьбы во время ЭС после резкого падения ($n = 4$ кошек; Рис. 61). Сначала таз кошки жестко фиксировался в стереотаксической раме дополнительными зажимами. После регистрации локомоторной активности в закрепленном состоянии (10-20 шагов) зажимы, удерживающие таз, были быстро ослаблены, что приводило к падению задней части тела (3–5 см вниз; Рис. 61 А и В), которая неожиданно оказывалась без дополнительной поддержки.

Ходьба в закрепленном состоянии характеризовалась хорошей координацией между левой и правой лапой, реципрокностью флексорной и экстензорной ЭМГ активностью (Рис. 61 А–В) сходно с тем, что наблюдалось у интактных животных (Rasmussen et al., 1978), аккуратной и четкой плантарной постановкой стопы и высокими амплитудами силовых опорных реакций во время опорной фазы (Рис. 61 Д). Абдукторы и аддукторы были активны в то же время, что и экстензорные мышцы (Restr на Рис. 61 А и Б). Резкая потеря поддержки таза приводила к временному падению задней части тела и спотыканию (Рис. 61 А и В), за которым следовали изменения в ЭМГ, кинетике и кинематике двигательной активности, позволяющими стабилизировать локомоторный паттерн и динамическое равновесие при ходьбе со свободным тазом. После двух-трех локомоторных циклов, сопровождающихся подволакиванием стопы и подхрамыванием животных на одну или обе лапы, плантарная ходьба с поддержкой веса тела восстанавливалась (Рис. 61 В). Двигательный паттерн, однако, все еще оставался вариабельным в течение нескольких шагов до полной стабилизации ходьбы. Такой стабилизационный период характеризовался уменьшением силовых опорных реакций и амплитуд пачек ЭМГ активности в экстензорах, абдукторах и аддукторах,

коактивацией флексоров и экстензоров (*Вскоре после падения* на Рис. 61 А, Б и Г). В дополнение, Glut был активен преимущественно в фазу переноса (Рис. 61 А и Б). Во время этих коррекций стопа ставилась на опору в более латеральном положении, таким образом поддерживая центр масс в пределах площади опоры. Регистрировалась также большая коактивация во флексорных и экстензорных мышцах (*Вскоре после падения* в Рис. 61 Г), что обеспечивало дополнительную жесткость и некоторую скованность конечностей. Такие временные корректирующие реакции возникали сразу после падения таза с фиксирующих зажимов и продолжались до тех пор, пока не восстанавливалась стабильная ходьба с поддержкой веса тела и баланса (Рис. 61 Д и 61 Б). Большинство качественных характеристик стабильной ходьбы были сходны в закрепленном и свободном состоянии (Рис. 58 Д, *Свобод.* в Рис. 61 Б), хотя амплитуды силовых опорных реакций были ниже, фаза опоры удлинялась, фаза переноса укорачивалась при ходьбе со свободным тазом (Рис. 61 Б, Д и Е).

В дополнение, постановка стопы и ширина шага были более вариабельными при свободной ходьбе (Рис. 61Ж) и сильно зависели от латеральных отклонений таза (Рис. 59 Б и В). Активный контроль баланса в свободном состоянии и необходимость адекватно реагировать на динамическую дестабилизацию туловища отражались на тонких характеристиках локомоторного паттерна, таких как реципрокность между различными мышечными группами в шагательном цикле, кинетические и кинематические параметры, которые были оптимальными для поддержания динамического равновесия при ходьбе.

Обсуждение

Результаты настоящего исследования демонстрируют, что, используя только соматосенсорный вход, в присутствии тонической стимуляции спинного мозга, постмамиллярно децеребрированные кошки могут ходить

с поддержкой веса тела и баланса, адаптировать свою латеральную стабильность при внешних возмущающих воздействиях.

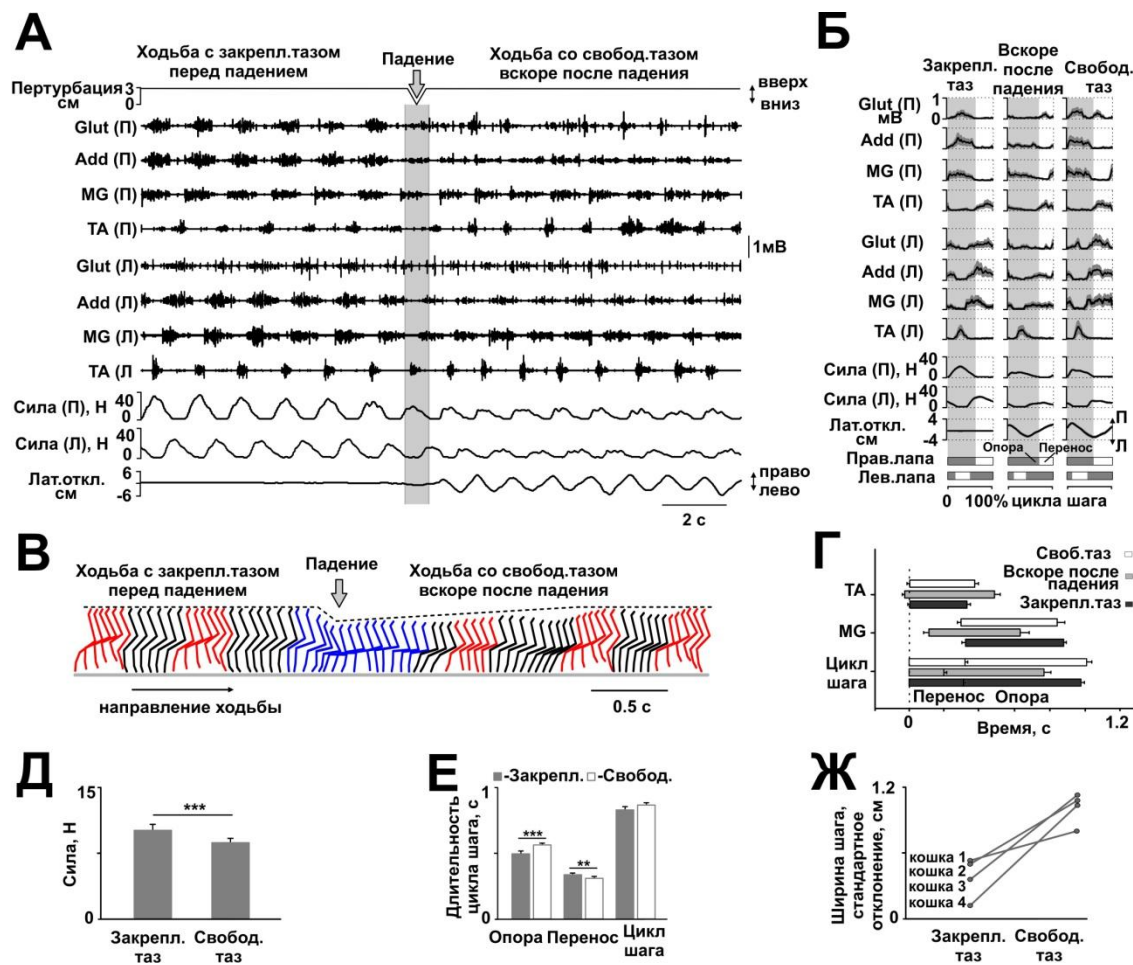


Рис. 61. Адаптивные поструральные ответы при падении задней части тела во время локомоции децереброванных кошек.

Соматосенсорный контроль баланса при локомоции

Работа показала, что уровень контроля баланса задних конечностей, необходимый для поддержания локомоции, может быть обеспечен соматосенсорными сигналами от конечностей и туловища. Уровень децеребрации, фиксация головы и шейно-грудного отдела позвоночника устраняли зрительный вход, а также функционально отключали вестибулярные и шейно-тонические рефлексy как возможные источники пострурального контроля. Используя динамические отклонения влево-вправо как меру динамической латеральной стабильности (Karayannidou et al., 2009a), обнаружено, что децереброванные кошки генерируют

постуральные коррекции, необходимые для поддержания баланса. В дополнение, 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. Более того, восстановление после неожиданного падения приводили к коактивации сгибательных и разгибательных мышц, изменению паттерна и времени активности абдукторов. Сравнение свободной ходьбы с ходьбой при закреплённом тазе дополнительно показало решающее значение соматосенсорной информации, происходящей от задней части тела в специфической модуляции тонких особенностей локомоторного паттерна, необходимых для поддержания динамического равновесия при продолжающейся дестабилизации центра масс во время свободной ходьбы с поддержкой веса тела (Рис. 61).

Для поддержания баланса во время локомоции должны быть тесно связанные механизмы взаимодействий сил, создаваемых множеством комбинаций мышц, каждая из которых генерирует уникальный вектор силы. Вероятно, это осуществляется непрерывной регуляцией уровня активности мышц, обычно относимых к категориям флексоры-экстензоры и абдукторы-аддукторы. Любое изменение вовлечения комбинации моторных пулов и уровня активности последних будет отражаться на конечных векторах сил, проявляющихся в работе всей задней части тела. В настоящем исследовании мы не можем точно интерпретировать амплитуду этих векторов по отношению к определенным мышцам, но ясно, что все эти мышцы модулируются при возмущающих воздействиях и при спокойной локомоции. Интересно, что при спокойной локомоции происходит коактивация Glut, Add, и MG мышц каждой конечности, хотя анатомически эти мышцы могут быть рассмотрены как имеющие разные эффекты на движения вперед-назад и медиолатерально.

Несмотря на то, что вестибулярная и другие супраспинальные системы в норме являются важным источником контроля баланса при ходьбе и стоянии (Beloozerova et al., 2005; Matsuyama, Drew, 2000; Zelenin et al., 2010), наши результаты показывают, что соматосенсорный вход является достаточным для выполнения таких сложных моторных задач с удивительным уровнем точности. Хотя децеребрированные кошки успешно поддерживали равновесие при локомоции длительные периоды времени, используя только кожную (Bolton, Misiaszek, 2009) и проприоцептивную соматосенсорную информацию от задних конечностей, постуральные коррекции были медленнее и относительно менее стабильны, чем у интактных кошек. Поэтому результаты не исключают участие центров переднего мозга (Karayannidou et al., 2009a), так же как вестибулярного и других супраспинальных сенсорных входов, в тонкой настройке нейронных сетей нижних уровней при поддержании баланса у интактных кошек.

Контроль баланса при ходьбе нейронными сетями спинного мозга

Сходно с контролем баланса у интактных животных (Misiaszek, 2006a, 2006b; Karayannidou et al., 2009a), постуральные коррекции у децеребрированных кошек достигаются различными путями, включающими перераспределение активности аддукторов и абдукторов, сгибательных и разгибательных мышц, что приводит к точной постановке стопы и модуляции силовых опорных реакций. Наши данные подтверждают, что такая сложная задача может выполняться соматосенсорными сетями спинного мозга и ствола. Эти результаты согласуются с недавними модельными исследованиями, показавшими, что сонсомоторный контроль баланса при сложном поведении животных, сопровождающемся движением во многих суставах одновременно, может достигаться пластичной нейрональной стратегией обратной связи на уровне ствола и спинного мозга (Lockhart, Ting, 2007; Misiaszek, 2006b).

Выполнение той или иной постуральной задачи во время локомоции и даже свободная ходьба с ежесекундно меняющимся положением центра масс требует динамичной адаптации локомоторного паттерна (Hof, 2008). В настоящем исследовании на децеребрированной модели получены данные, позволяющие полагать, что эта адаптация возникает не только в ответ на выведение из состояния равновесия (по механизму обратной связи, feedback control), но и по принципу упреждения или прямой связи (feedforward control), подготавливая последующий локомоторный цикл. Нейрональные механизмы, задействованные в таких сложных физиологических феноменах тонкой интеграции локомоторной и постуральной систем, осуществляющихся на уровне спинного мозга и ствола, требуют дальнейшего изучения.

Настоящая работа не определяет специфическую локализацию нейронных сетей, необходимых для генерации этих продолжающихся адаптивных ответов на изменения постуральных условий. Например, хотя соматосенсорный вход является источником согласованных адаптивных сигналов от рецепторов разных модальностей и локализаций в конечности, остается неясным, могут ли все эти сигналы полностью обрабатываться нейронными сетями спинного мозга или необходимо участие нейронального аппарата ствола мозга. Действительно, сенсомоторные петли, включающие различные моторные ядра ствола и мозжечок, участвуют в регуляции позы и локомоции (Armstrong, 1986; Arshavsky et al., 1983; Whelan, 1996). Однако, на основе многих экспериментов на хронических спинальных животных (Barbeau and Rossignol 1987; Lovely et al. 1990; Lyalka et al., 2012) известно, что постуральный контроль при стоянии и ходьбе в определенной степени может выполняться самими нейронными сетями пояснично-крестцового расширения спинного мозга. В отдельной серии экспериментов, которая была выполнена нами на острых спинализированных кошках, обнаружено наличие шагательных движений на месте, а также эпизоды локомоторного поведения с частичной

регуляцией равновесия на движущемся тредбане при тонической электрической стимуляции спинного мозга и сенсорном механическом раздражении в области хвоста (Мусяненко с соавт., 2013а). Как и в случае децеребрированной кошки, двигательные ответы у спинальной кошки коррелировали с отклонением тела и были достаточны для коррекции равновесия. Хотя эффективность таких постуральных коррекций, мышечный тонус, силовые опорные реакции были существенно ниже, чем у децеребрированных животных с интактным спинным мозгом.

В совокупности наши исследования на различных децеребрированных и спинальных экспериментальных моделях демонстрируют, что спинальные сети, получающие только соматосенсорный афферентный вход от конечностей, способны осуществлять постуральный контроль при стоянии (Muienko et al., 2010) и локомоции (Muienko et al., 2011, 2012, 2013), если эти сети активированы неспецифическими тоническими сигналами. Следовательно, подавление постуральных способностей после нарушения супраспинального контроля скорее обусловлено уменьшением уровня возбудимости спинальных сетей, нежели отсутствием способностей этих сетей корректно отвечать на соматосенсорные сигналы, связанные с поддержанием баланса во время стояния и ходьбы.

Взаимодействие тонической эпидуральной стимуляции спинного мозга и соматосенсорного контроля динамического баланса

Полученные данные подтверждают, что, когда спинной мозг тонически стимулируется эпидуральными электродами, нервная система децеребрированной кошки может обработать получаемую соматосенсорную информацию для динамической корректировки двигательных команд, требующихся для поддержания локомоции с поддержкой веса тела. Локомоторная активность постмамиллярных кошек также может быть вызвана стимуляцией мезенцефалической локомоторной области (Shik, Orlovsky, 1976), которая связана с ретикулоспинальными

нейронами в мосту и продолговатом мозге. Последние, в свою очередь, проецируются в спинальные нейрональные сети (Jordan et al., 2008). В случае ЭС, два механизма могут быть рассмотрены: прямая активация спинальных локомоторно-постуральных сетей и непрямая активация через спинально-стволовую петлю (Musienko et al., 2007). Предшествующие эксперименты показали, что после полной перерезки спинного мозга ЭС активирует локомоцию (Musienko et al., 2009b) или постуральные рефлексы (Musienko et al., 2010) через прямое действие на внутриспинальные моторные сети. При интактном или частично поврежденном спинном мозге, однако, системы ствола могут играть роль в обработке соматосенсорных входов для коррекции и стабилизации моторных паттернов.

Но как тоническая стимуляция спинного мозга активирует спинальные сети? Хотя механизмы, лежащие в основе усиления двигательной активности при ЭС до конца не ясны (Gerasimenko et al., 2008), нейрофизиологические регистрации (Gaunt et al., 2006; Gerasimenko et al., 2006) и компьютерная симуляция (Rattay et al., 2000) подтверждают, что одним из механизмов действия ЭС является вовлечение в активность волокон дорсальных корешков, несущих сомато-сенсорные сигналы от конечностей, в месте их входов в спинной мозг (Gerasimenko et al., 2008; Musienko et al., 2011b). Сенсорные входы через систему афферентов флексорного рефлекса имеют широкий доступ к спинальным сетям и, как показывалось ранее, могут инициировать локомоцию у млекопитающих (Jankowska et al., 1967a, 1967b; Kostyuk, 1983; Sherrington, 1910). Локомоция и поза, обеспечиваемая ЭС, может иметь сходные механизмы. Хотя требуются дополнительные экспериментальные подтверждения, ЭС, вероятнее всего, увеличивает возбудимость спинальных сетей, что лежит в основе ее механизма действия, активирующего постуральные и локомоторные нейрональные механизмы (Edgerton et al., 2008). С этой точки зрения, данные настоящего исследования и разработка спинальных нейропротезов для стимуляции

спинного мозга имеют важное прикладное значение для развития эффективной технологии восстановления функционального стояния и ходьбы с поддержкой веса тела и баланса у пациентов с вертеброспинальной патологией (Fong et al., 2009; Harkema et al., 2011; Musienko et al., 2009с).

НЕЙРОНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНТЕГРАЦИИ ПОЗЫ И ЛОКОМОЦИИ

Кошки и другие четвероногие животные сохраняют при локомоции базовую ориентацию тела спиной вверх. Поддержание этой ориентации (т.е. латеральной устойчивости) имеет решающее значение для стабильной локомоции. Постуральную конфигурацию и равновесие тела при локомоции могут нарушить многие факторы; реакции на некоторые из них изучались на интактных кошках (см. обзор в Deliagina et al., 2012). Эти исследования показали, что идущая кошка компенсирует перемещение тела в поперечной плоскости, вызванное коротким боковым толчком, приложенным к туловищу (Karayannidou et al., 2009a). Кошка также способна идти и поддерживать равновесие на неустойчивом основании, например, при боковом перемещении или падении поддерживающей платформы (Misiaszek, 2006; Marple-Horvat et al., 1993). Кошка может приспособить шагательные движения к условиям окружающей среды и при хождении по наклонной опорной поверхности (Matsuyama, Drew, 2000; Karayannidou et al., 2009b). Однако нейрональные механизмы, лежащие в основе постуральных реакций на эти дестабилизирующие факторы, остаются неустановленными. В частности, не понятно, какие структуры ЦНС задействованы в постуральных реакциях на различные нарушения равновесия при локомоции.

Анализ системы управления равновесием при локомоции является сложной проблемой из-за огромного количества одновременно действующих моторных центров и механизмов контроля. Одним из

возможных подходов к этой проблеме является математическое моделирование, но для реалистического моделирования требуются детальные знания о соответствующих рефлекторных механизмах и нейронных цепях (Ekeberg, Pearson, 2005; Pearson et al., 2006).

Другой подход состоит в использовании редуцированных экспериментальных моделей, в которых уменьшено количество контрольных механизмов (Musienko et al., 2012c). *В первой части данного исследования* анализировалась способность идущей децеребрированной кошки компенсировать два дестабилизирующих фактора, а именно короткий боковой толчок в хвостовую часть туловища и длительный боковой наклон тредбана. Было обнаружено, что децеребрированная кошка может преодолевать эти дестабилизирующие факторы, генерируя постуральные реакции, подобные тем, что наблюдались у интактных кошек (Karayannidou et al., 2009a,b). Таким образом, этот экспериментальный препарат может быть использован как удобная модель для изучения различных механизмов, помогающих контролировать равновесие во время локомоции.

Во второй части данного исследования изучались нейронные механизмы, контролирующие реакции отдельных конечностей на постуральные отклонения, а также механизмы контроля реакций туловища на эти отклонения. Предполагается, что комбинация этих постуральных механизмов конечностей и туловища позволяет всей системе сохранять равновесие при локомоции. Эти механизмы взаимодействуют с механизмами генерации локомоции (Grillner, Rossignol, 1978).

У децеребрированных кошек можно вызвать локомоцию двумя способами, а именно: путем электрической стимуляции мезэнцефалической локомоторной области (МЛО) (Shik et al., 1966; Shik, Orlovsky, 1976; Jordan, 1986; Garcia-Rill, Skinner, 1987a,b) и эпидуральной электрической стимуляцией спинного мозга (СМ) по дорсальной средней линии (Iwahara et al., 1991; Musienko et al., 2007; 2012b). Как показано в Главе 3,

локомоторные механизмы, приводимые в действие из этих двух источников, различаются (Musienko et al., 2012b). Чтобы установить, является ли данное отличие решающим для действия механизмов контроля конечностей и туловища в сохранении баланса при ходьбе, мы сравнили действие этих механизмов при локомоции, вызванной стимуляцией МЛЮ и спинного мозга. Было установлено, что действие постуральных механизмов конечностей и туловища, а также их способность компенсировать действие дестабилизирующих факторов, были подобны в этих двух ситуациях, то есть различия в вызванных локомоторных механизмах не играют существенной роли в поддержании равновесия при ходьбе⁴.

Методы

Эксперименты проводились на 10 взрослых кошках (весом 2,1-2,9 кг). Последовательность хирургических процедур, контроль состояния животных, обработка регистрируемых сигналов и анализ данных описаны в главе 2 Общая методология.

Биполярные электромиографические (ЭМГ) электроды (гибкие провода из нержавеющей стали толщиной 0,2 мм с тефлоновой изоляцией) были имплантированы билатерально в *m.gastrocnemius lateralis* (Gast, разгибатель голени), *m.tibialis anterior* (Tib, сгибатель голени), *m.adductor femoris* (Add, разгибатель и аддуктор бедра) и *m.gluteus medius* (Glut, разгибатель и абдуктор бедра), как было описано ранее (Gerasimenko et al. 2009). Причина, по которой регистрировались именно эти мышцы, состоит в том, что Gast и Tib участвуют в продольной составляющей шага, а Glut и Add также задействованы в боковой составляющей. В 3 экспериментах записывались показания некоторых других мышц задних конечностей: *m.gracilis* (Grac, разгибатель и аддуктор бедра) и *m.vastus medialis* (Vast, разгибатель колена), а также *m.sartorius*, *m.iliopsoas*, *m.rectus femoris*, *m.caudofemoralis*. В 3

⁴ Работа проводилась совместно с лабораторией проф. Т.Делягиной Каролинского института, Стокгольм, Швеция.

экспериментах регистрировалась ЭМГ активность мышц спины (*m.erector spinae* и *multifidus*) на уровне пятого-шестого поясничных позвонков.

Схема эксперимента

Схема эксперимента (Рис. 62) во многих отношениях была подобна той, что использовалась в исследовании на модели кошки в Главе 3 (Musienko et al., 2012b). Было проведено три типа экспериментов. В экспериментах типа 1 (для изучения способности идущей децеребрированной кошки компенсировать дестабилизирующие факторы) голова и ростральная часть позвоночного столба (на уровне 3-го грудного позвонка) фиксировались в жесткой раме, а каудальная часть позвоночного столба и таз оставались свободными (Рис. 62 А). Передние конечности ни на что не опирались, а задние располагались на тредбане с двумя отдельными лентами (для правой и левой конечности), которые двигались с одинаковой скоростью (0,5 м/с) (далее – «лента тредбана»). Лента двигалась назад по отношению к животному. В этих экспериментах равновесие задней части тела при локомоции сохранялось благодаря деятельности нейронных постуральных механизмов задних конечностей и туловища кошки.

В экспериментах типа 2 (посвященных анализу постуральных механизмов конечностей) в жесткой раме фиксировались не только голова и ростральная часть позвоночного столба, но и таз (Рис. 62 Д). Расстояние между дорожкой тредбана и фиксированным тазом составляло 21-25 см (в зависимости от размера животного), что определяло полусогнутое положение конечностей во время положения, типичного для ходьбы.

В экспериментах типа 3 (посвященных анализу постуральных механизмов туловища), заднюю часть туловища кошки со свободным тазом подвешивали в гамаке, тредбан убирали, и задние конечности выполняли шаги в воздухе (Рис. 62 И).

Чтобы исследовать контроль равновесия при локомоции и раскрыть лежащие в его основе нейронные механизмы, было проведено семь тестов. В экспериментах типа 1 выполнялось два теста. В *Тесте 1* (Рис. 62 Б) в

область тазобедренного сустава в латерально-медиальном направлении прикладывались короткие силовые импульсы (толчки). Толчки наносились в разные фазы шагательного цикла, через каждые 5-10 шагов. Случаи слишком сильных толчков, вызывавших боковое смещение опорной конечности, исключались из дальнейшего анализа. В *Тесте 2* тредбан под кошкой периодически наклоняли в поперечной плоскости между двумя стационарными положениями ($\pm 20^\circ$ относительно горизонта; угол α на Рис. 62А и Г). Переход от одного стационарного положения к другому длился 2-3 с, и каждое положение сохранялось в течение 8-12 с (как на Рис. 66А).

В *экспериментах типа 2* проводилось три теста. В *Тесте 3* мы производили быстрое латеральное (или медиальное) смещение опорной поверхности под одной из конечностей. С этой целью под соответствующей частью дорожки тредбана располагалась небольшая пластина (10x20 см), продольная ось которой была перпендикулярна вектору скорости тредбана. Когда конечность наступала на пластину, ее быстро перемещали в новое, более латеральное или медиальное положение (Transl на Рис. 62 Е, см. также Рис. 62 А); конечность продолжала поддерживать тело в этом новом латеральном положении. В *Тесте 4* мы прикладывали постоянную латеральную (или медиальную) силу (0,15-0,2 кг) к дистальной части конечности с помощью эластичной резинки длиной 20 см (Pull на Рис. 62 Е, см. также Рис. 68 А). Прилагаемая сила не вызывала смещения конечности при опоре, но вызывала значительное латеральное или медиальное отклонение конечности при переносе. В *Тесте 5* тредбан под кошкой периодически наклоняли (на $\pm 20^\circ$) в поперечной плоскости (α на Рис. 62 З) с той же временной структурой, как и в *Тесте 2*. Поскольку в *экспериментах Типа 2* таз был жестко фиксирован, наклон вызывал нагрузку конечности, опора которой перемещалась вверх, и разгрузку противоположной конечности.

В *экспериментах типа 3* выполнялись два вида тестов. В *Тесте 6* латеральный перенос крепления таза во время шагания в воздухе вызывал

латеральный изгиб туловища (Рис. 62 К). В *Тесте 7* мы изучали, как активация локомоторных механизмов влияла на положение туловища. С этой целью вызывали боковой изгиб туловища, прикладывая к тазу постоянную боковую силу (Рис. 62 Л и М), а затем вызывали локомоцию.

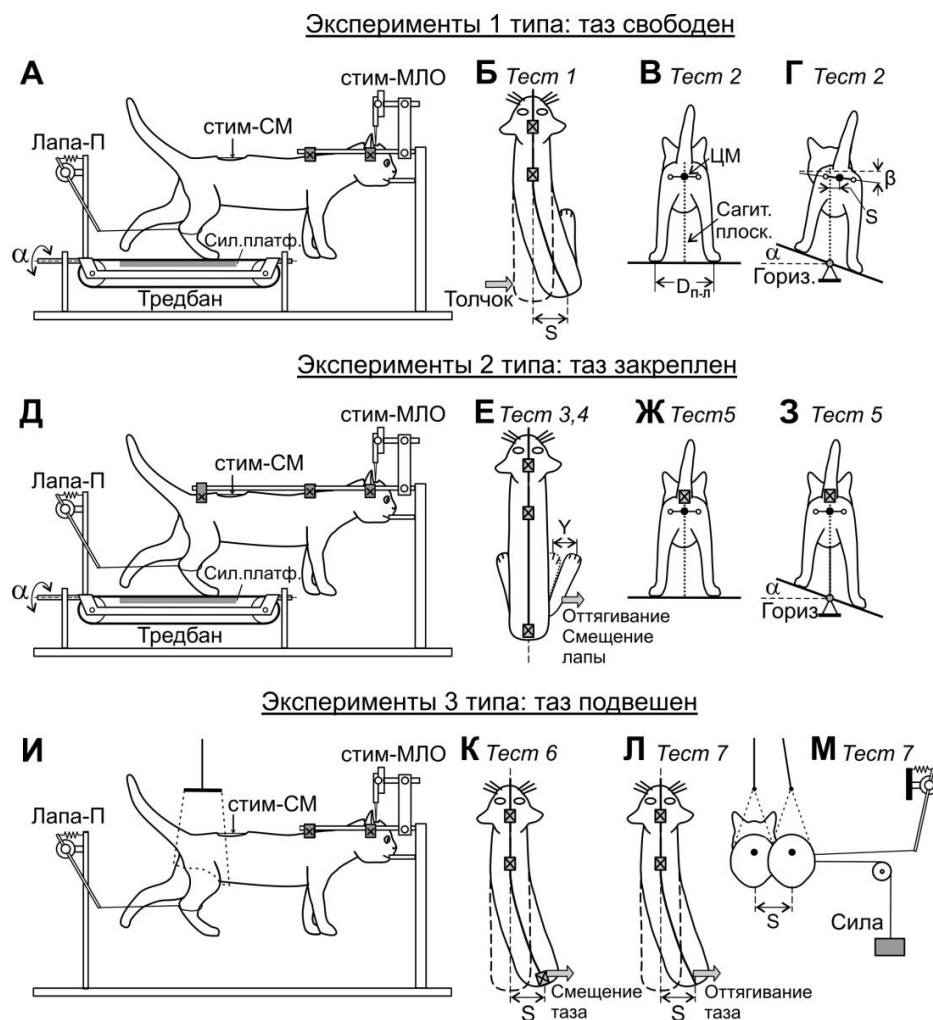


Рис. 62. Схема разных типов эксперимента, тестов и установки. Центр масс (ЦМ). Смещение таза медиолатерально (S). Угол наклона тредбана (α). Угол наклона таза (β). Расстояние между левой и правой лапой (D).

Локомоция вызывалась стимуляцией МЛО, либо СМ. В случае стимуляции МЛО в область ствола головного мозга с помощью микроманипулятора вводился биполярный электрод (два изолированных, за исключением кончиков, провода толщиной 150 мкм, находящихся на расстоянии 0,5 мм друг от друга) (координаты Хорсли-Кларка P2, R/L4, H0) (стим-МЛО на Рис. 62 А, Д и И). Мы использовали следующие параметры

стимуляции: частота 30 импульсов в секунду (имп/с); длительность импульса 0,5-1 мс; ток 50-200 мкА. Для эпидуральной стимуляции СМ шариковый электрод (диаметр=0,5 мм) размещался на твердой оболочке дорсальной поверхности спинного мозга на уровне 5-го поясничного позвонка (SC-stim на Рис. 62 А, Д и И). Мы использовали следующие параметры стимуляции: частота 5 Гц, длительность импульса 0,2-0,5 мс; ток 100-300 мкА.

В каждом тесте вид идущей кошки сбоку и сзади записывался двумя видеокамерами (25 или 50 кадров/с). Кроме того, во всех тестах мы записывали передне-задние локомоторные движения конечностей (с помощью двух механических датчиков, один из которых, Лапа-П, показан на Рис. 62 А, Д и И), а также вертикальные силы, которые создавались каждой из конечностей (с помощью двух нагрузочных пластин, расположенных под левой и правой частями движущейся дорожки, FР на Рис. 62 А и Д). В *Тестах 1, 2, 6 и 7* боковые движения таза в горизонтальной плоскости (S на Рис. 62 Б, Г, К, Л и М) записывались специальным датчиком (Рис. 62 М). Подобный датчик использовался для наблюдения за латеральным положением стоп в *Тестах 3 и 4* (Рис. 62 Д). В *Тестах 2 и 5* наклон тазобедренного сустава (угол α на Рис. 62А, Г и 3) контролировался с помощью механического датчика. Видеозапись, регистрация ЭМГ механических датчиков синхронизировались.

Анализ данных

Видеозаписи анализировались пошагово. По виду сзади оценивались приблизительное положение центра масс (ЦМ) задней части тела (координаты ануса), проекция ЦМ на горизонтальную плоскость, ширина шага, а также положение двух маркеров на латеральных частях тазовых костей. Последние использовались для расчета угла наклона таза (β на Рис. 62 Г). По заднему и/или боковому виду было легко определить, находилась ли стопа на земле (т.е. находится ли конечность в фазе опоры цикла шага), или она была поднята (т.е. конечность находится в переносной фазе цикла).

Во время фазы опоры вертикальная координата стопы соответствовала $Z=0$, и траекторию стопы можно полностью охарактеризовать двумя координатами, X и Y (Рис. 67 и 68). На изображение зоны тредбана наносилась координатная сетка (которая компенсирует искажение перспективы). С помощью этой сетки в последовательных кадрах измерялись координаты стопы. Во время фазы переноса стопы поднималась над землей, но наши методы не позволяли точно измерить ее вертикальную координату Z . Таким образом, траекторию стопы в фазе переноса можно было охарактеризовать лишь приблизительно в координатах X/Y .

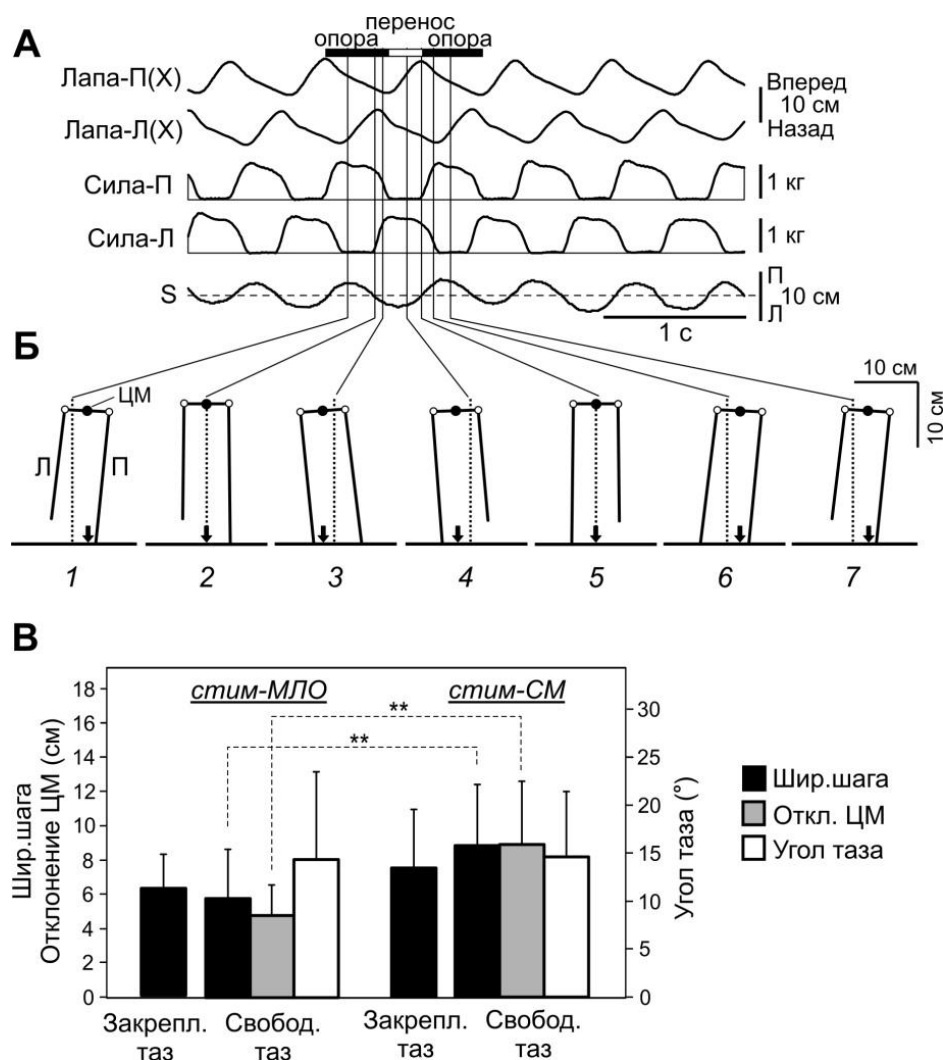


Рис. 63. Спокойная ходьба нефиксированной кошки по горизонтальному тредбану.

Результаты

Способности децеребрированных кошек компенсировать дестабилизирующие факторы

Для эксперимента №1 (таз свободен, Рисунок 62А), мы использовали кошек ($n=6$), показывающих хорошо координированную ходьбу на горизонтальном тредбане с поддержкой задней части тела и равновесия.

Спокойная ходьба. Рисунок 63 А иллюстрирует эксперимент типа 1, т.е. спокойную ходьбу со свободным тазом, вызванную МЛЮ стимуляцией у кошки 4. Альтернирующие шагательные движения и силовые опорные реакции правой и левой лапы были похожи. При локомоции, наблюдались горизонтальные осцилляции таза, обусловленные ходьбой (S) с межпиковым расстоянием около 7 см. Кроме этого, при видео регистрации сзади обнаружены вертикальные осцилляции с меньшим межпиковым расстоянием (около 2 см, не показано).

Рисунок 63 В показывает конфигурацию задних конечностей во фронтальной плоскости (основано на видео регистрации), наблюдаемой в различные временные моменты (1-7). На рисунке 63А показаны временные моменты, соответствующие фазам опоры (St) и переноса (Tr) правой лапы. В данной конкретной кошке ширина опоры ($D_{П-Л}$ на Рис. 62 В) была близка к ширине таза (около 7 см) и оси правой и левой лап (т.е. линии, соединяющие стопу и тазобедренный сустав) были почти перпендикулярны к тазу и параллельны друг к другу. На рисунке 63 Б можно видеть, что таз производит периодические наклоны вправо (на панели 1, 6 и 7) и влево (на панели 3, 4) в силу его ротации вокруг продольной оси тела (угол β на рисунке 1D). Межпиковые расстояния этих ротационных осцилляций были довольно маленькими (*Угол таза* на Рис. 63 С). На рисунке 63Б также видно, что при локомоции ЦМ задней части тела (ЦМ на рисунке 62 В) и его проекция на опорную поверхность (отмечено стрелкой) характеризуется латеральными осцилляциями при ходьбе. Эти осцилляции отражают

предупреждающие поструральные коррекции, которые приводят к тому, что ЦМ толкается в сторону опорной лапы перед подъемом переносимой стопы (McIlroy, Maki, 1999). Из рисунка 63А видно, что проекция ЦМ всегда оказывается в пределах ширины шага (также называемой площадью опоры), которая является важным условием поструральной стабильности (Hof *et al.*, 2010).

Основные характеристики локомоции, описанные выше у кошки 4, наблюдались и у других животных. Сравнение этих характеристик при локомоции, вызванной МЛО и СМ стимуляцией, представлено на рисунке 63В. Можно видеть, что ширина шага и межпиковое расстояние латеральных СОМ отклонений (СОМ displ) были больше при локомоции, вызванной СМ стимуляцией (различия были статистически значимы), тогда как амплитуды ротации таза были схожи. Не было обнаружено отличий также между шириной шага в условиях свободного и закрепленного таза.

Реакции на латеральные толчки

Эти эксперименты проводились на кошках со свободным тазом (Тест 1, Рис. 62Б). Было обнаружено, что кошки могут поддерживать баланс во время локомоции, несмотря на сильные латеральные толчки, которые смещали их таз на 5-10 см. Наблюдались два типа реакций, в зависимости от фазы и направления бокового толчка, а именно латеральный или медиальные шаги.

Латеральный шаг. Пример этого типа реакции показан на рисунке 64А. Горизонтальные черные полосы (St-I и St-II) отображают латеральное расположение стопы (расстояние от сагиттальной плоскости закрепленной передней части тела) для левой и правой конечностей в фазах опоры, построенное относительно времени. Фазы переноса (Tr) отображаются тонкими линиями, соединяющими толстые черные полосы. Кривая β показывает наклон таза, а кривая S показывает его латеральную позицию (Рис. 62 Б).

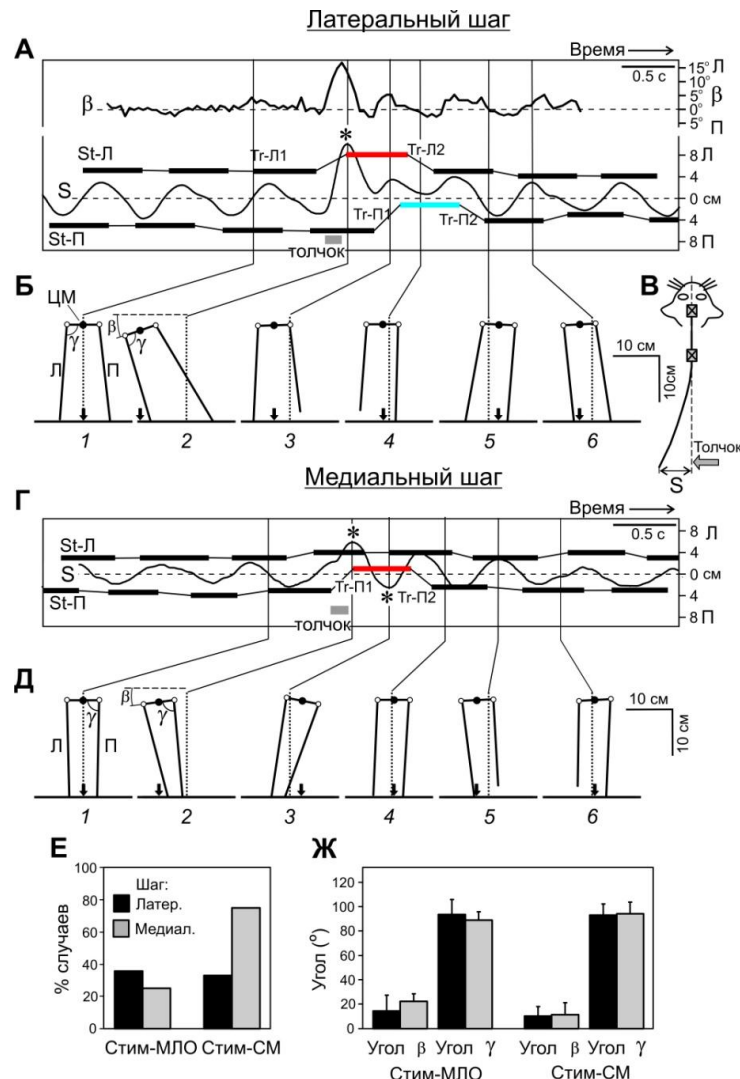


Рис. 64. Эффект латеральных толчков. Опорная фаза (St), переносная фаза (Tr) цикла шага.

Толчок влево, который прикладывался к тазу в фазу переноса контралатеральной (левой) конечности, приводил к значительному смещению таза влево; на пике смещения проекция ЦМ оказывалась за пределами области опоры (этот момент отмечен звездочками на рисунке 64А). Поскольку ростральная часть позвоночного столба была жестко закреплена, отклонения таза влево (S), вызванное толчком, сопровождалось латеральным изгибом толовища (рисунок 64В). Толчок также вызывал наклон таза (β на Рис. 64А) из-за его ротации вокруг продольной оси тела; наклон был связан со скручиванием туловища.

Такой толчок влево вызывал также значительные изменения в локомоторном паттерне конечностей. Левая конечность переносилась (Tr-L1) и приземлялась намного более латерально, чем при обычном шаге, что приводило к более латеральной траектории стоп при последующей опорной фазе (красная полоска на Рис. 64 А). Во время следующей переносной фазы (Tr-L2) близкое к нормальному положение стопы восстанавливалось. В правой конечности реакция на толчок была значительно более задержанной: она возникала только в следующем шаге (Tr-P1), и конечность переносилась в более медиальное положение, чем при обычном шаге, что приводило к более медиальной траектории стопы в последующей опорной фазе шага (синяя полоска на Рис. 64 А). Во время фазы опоры (Tr-P2) последующего шага, правая конечность возвращалась к близкому к нормальному латеральному положению при опоре. Однако, в большинстве случаев латеральных шагов, латеральная позиция шагающей конечности на стороне толчка значимо не изменялась (Рис. 65 А,Б).

Существует две возможные причины постановки левой конечности в более латеральное положение: (1) латеральное движение таза вместе с конечностью и (2) латеральное движение конечности относительно таза (за счет абдукции конечности). Для выяснения участия этих двух факторов на рисунке 64Б мы сравнили конфигурацию задних конечностей при обычном шаге (панель 1) и шаге после возмущающего воздействия в момент максимального отклонения таза, вызванного толчком (панель 2). Видно, что угол γ между тазом и левой конечностью (в момент контакта с опорой) в обоих случаях был почти одинаковый (около 90°). Этот результат подтверждает, что латеральные отклонения таза (скорее, чем абдукция конечности) была основной причиной латерального приземления конечности при шаге во время возмущающего воздействия.

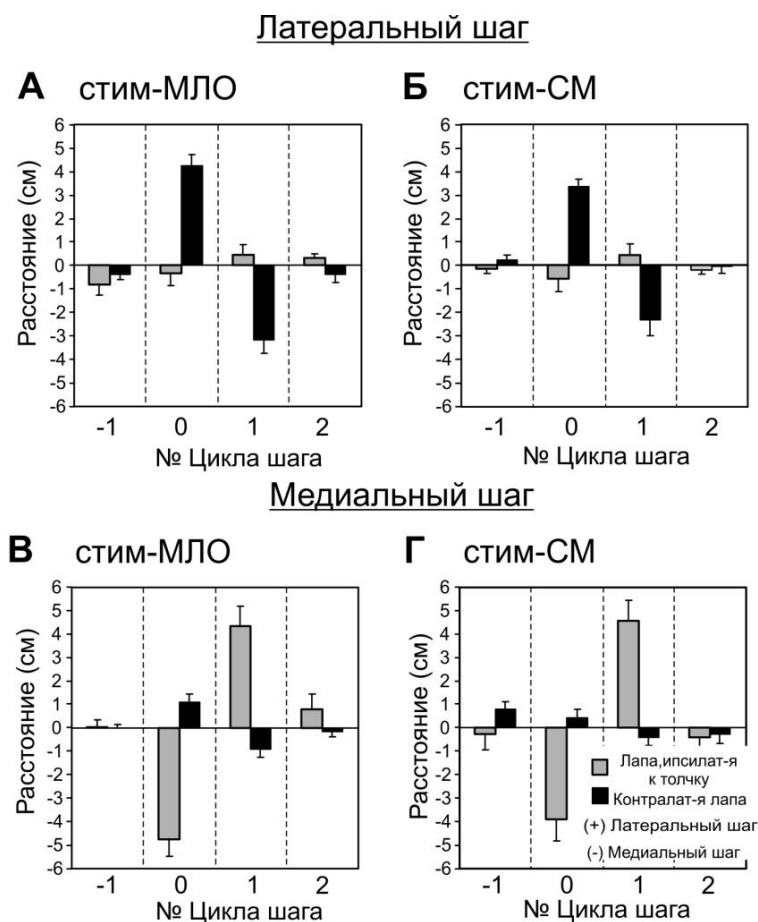


Рис. 65. Общие изменения в локомоторном паттерне, вызываемые толчками.

Латеральный шаг наблюдался у всех кошек, если толчок (влево) делался в момент переносной фазы контралатеральной (правой) конечности, как при стимуляции МЛО, так и СМ. Рисунок 65А,Б показывает средние значения ($\pm$ станд.ошибка), характеризующие латеральный компонент шага в последующих шагательных циклах для обеих конечностей при локомоции, вызванной стимуляцией МЛО и СМ (А и Б соответственно). В обоих условиях в цикле шага во время толчка (цикл 0), контралатеральная конечность выполняла большой латеральный шаг, а в следующем цикле (цикл 1) конечность выполняла большой медиальный шаг для возвращения нормальной медиолатеральной позиции. Латеральный компонент шагов конечности ипсилатеральной по отношению к стороне толчка (левой) практически не изменялся.

Медиальный шаг. Пример реакции этого типа показан на Рис. 64Г и Д. Толчок таза влево производился во время фазы переноса правой лапы. Толчок вызывал большое латеральное отклонение таза и его ротацию. На пике отклонения проекция ЦМ оказывалась снаружи области опоры (отмечено звездочкой), так же как и при латеральном шаге. Толчок также вызывал большой медиальный шаг правой лапы (Tr-П1), за которым следовала опорная фаза в более медиальном положении (красная полоска). Конечность возвращалась в нормальное латеральное положение в следующем шаге (Tr-П2). Латеральный компонент шагов в левой лапе практически не изменялся. Риунок 64Д показывает конфигурацию задних конечностей (в момент приземления) в обычном шаге (панель 1) и в шаге при толчке (панель 2). Видно, что угол между тазом и конечностью (γ) в обоих случаях существенно не отличался (около 90°), так же как описано выше при латеральном шаге. Медиальный шаг наблюдался у всех кошек, когда толчок осуществлялся в фазу переноса конечности ипсилатеральной толчку (Рис. 65В и Г), как для МЛО (В), так и стимуляции СП (Г).

Эксперименты продемонстрировали, что все тестированные животные ($n=6$) хорошо компенсировали латеральные толчки; обычно только несколько шагов было нужно для восстановления нормальной ходьбы. Даже сильные толчки, которые отклоняли проекцию ЦМ за пределы области опоры не приводили к падению. Такие случаи были обнаружены у всех кошек, в случае латерального и медиального шага, при локомоции, вызванной стимуляцией МЛО и СМ (Рис. 64Е). По-видимому, для предотвращения падения в сторону задней части тела в данных случаях и для возвращения ЦМ в область опоры, внешняя сила должна быть приложена к каудальной части туловища и тазу в направлении, противоположном направлению толчка. Предполагается, что такая сила генерируется при рефлекторной активации мышц спины (см. далее Механизмы конфигурации туловища).

Эксперименты также показали, что, несмотря на значительные латеральные отклонения (до 10 см) и ротацию (до 20°) таза при толчках, конечности, выполняющие латеральный или медиальный шаги, в конце переноса оказывались под постоянным углом (около 90°) относительно таза, как при стимуляции МЛО, так и СМ (Рис. 64Ж). Предполагается, что этот угол стабилизировался во время переноса каждой конечности, которая участвует в сохранении нормальной конфигурации задней части тела в поперечной плоскости (см. раздел Механизмы при переносе конечности).

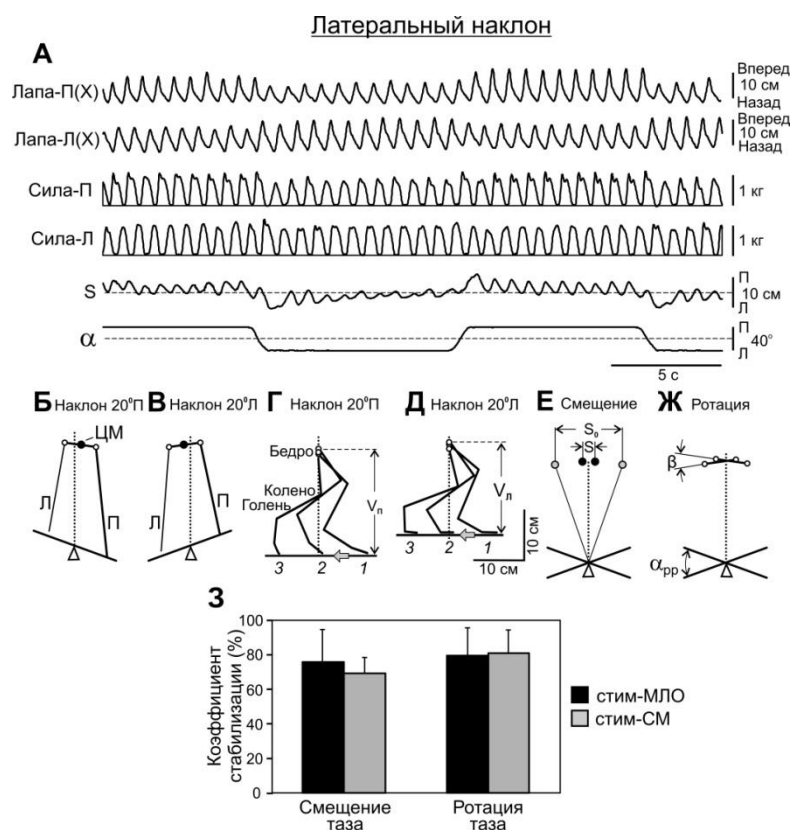


Рис. 66. Эффекты латеральных наклонов тредбана.

Реакции на латеральные наклоны

Мы обнаружили, что все децеребрированные кошки со свободным тазом ($n=6$) были способны ходить и поддерживать баланс на тредбана, который наклонялся латерально (Тест 2, Рис. 62В и Г), как иллюстрировано на Рис. 66А. Кошки демонстрировали быстрые реакции на трапецевидные наклоны опорной поверхности направо или налево, а также хорошо

адаптировали свой локомоторный паттерн при длительном наклоне беговой дорожки.

Рисунок 66Б и В показывает конфигурацию задних конечностей (вид сзади) в середину опоры правой конечности (и перенос левой конечности), когда кошка ходила по наклоненному тредбану. При наклоне тредбана вправо (Б), таз отклонялся горизонтально вправо (по отношению к сагиттальной плоскости закрепленной передней части тела) и поворачивался по часовой стрелке. При левом наклоне тредбана (В) таз отклонялся влево и поворачивался против часовой стрелки. Рисунок 66Г и Д показывает конфигурацию правой лапы (вид сбоку) во время правого (Г) и левого (Д) наклона тредбана в начале (1), середине (2) и конце (3) фазы опоры. Эти изменения в конфигурации конечности вызывали изменения «вертикальной длины» конечностей ($V_{П}$ и $V_{Л}$), которые уменьшали горизонтальное смещение таза и его ротацию.

Для оценки эффективности постуральных коррекций, когда кошка ходила на наклоненной опоре, мы использовали два подхода. *Во-первых*, мы определяли среднее положение ЦМ в каждом шагательном цикле. Это было сделано для 10 последовательных циклов с тредбаном, наклоненным вправо, и 10 циклов с тредбаном, наклоненным влево. Затем средние положения ЦМ были усреднены по каждой последовательности. Различия между двумя значениями (S на Рис. 66 Е) сравнивались с соответствующим изменением, ожидаемым при отсутствии постуральных коррекций (S_0). Для оценки S_0 эталонный маркер был жестко закреплен на тредбане над осью наклонов на высоте центра масс животного и перемещения этого маркера измерялись (Рис. 66 Е; метод детально описан в Beloozerova et al., 2003). *Во-вторых*, мы усредняли средний угол ориентации таза в 10 шагах, когда тредбан наклонялся направо, и в 10 шагах, когда он наклонялся налево. Различия между двумя значениями (β) сравнивались с различиями, ожидаемыми в отсутствии постуральных коррекций, т.е. при изменении

угла тредбана ($\alpha_{pp}=40^\circ$, Рис. 66 Ж). Коэффициент стабилизации вычислялся затем для отклонения таза в сторону и его ротаций.

$$K_{\text{TRAN}}=1-S/S_0; K_{\text{ROT}}=1-\beta/\alpha_{pp}$$

Как показано на Рис. 66 З, коэффициент стабилизации был около 80% для обоих типов смещений таза и при локомоции, вызванной стимуляцией МЛО и СМ. Эти результаты демонстрируют высокую эффективность системы, поддерживающей базовую ориентацию тела (положение спиной вверх). Поддержание этой ориентации (то есть латеральной устойчивости) у децеребрированной кошки, шагающей по наклоненной поверхности.

Механизмы поструральных коррекций при ходьбе

Механизм при переносе конечности (МПК). Для тестирования гипотезы, что существуют механизмы, переносящие конечность в стандартное (по отношению к туловищу) начальное положение (см. выше), кошкам ($n=5$) были проведены тесты 3 and 4 (Рис. 62Е).

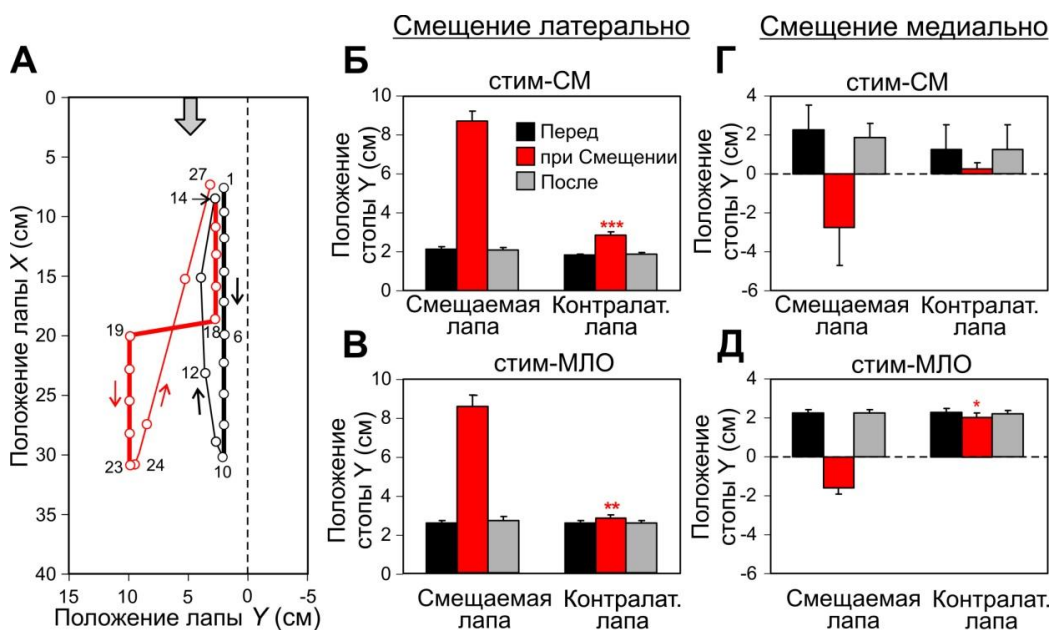


Рис. 67. Эффект смещения опорной поверхности во время опорной фазы локомоторного цикла

Рисунок 67А иллюстрирует эффект смещения влево опорной поверхности под левой лапой (Тест 3) при локомоции, вызванной стимуляцией СМ. Показана траектория левой стопы в X/Y координатах (см. Методы) в

течение двух шагов. В фазу опоры шагательного цикла, предшествующего возмущающему воздействию (толстая черная линия, точки 1-10), левая конечность двигалась назад (вдоль траектории $Y=2$ см) со скоростью движения ленты тредбана. Во время последующей фазы переноса (тонкая черная линия) конечность двигалась вперед и приземлялась в положении, (точка 14) очень близком к начальному положению в опоре (точка 1). Затем фаза опоры нового цикла начиналась (толстая красная линия) с траекторией стопы, очень близкой, как в предыдущем цикле. Однако, в точке 18 осуществлялось быстрое латеральное смещение опорной поверхности, которое приводило к перемещению стопы в новое, более латеральное положение (точка 19; $Y=11$ см). Из точки 19 опора продолжалась в этом новом латеральном положении до точки 23, где новая фаза переноса начиналась (тонкая красная линия). Во время этой фазы (точки 24-27) стопа передвигалась в положение (точка 27; $Y=3$ см), которое было очень близко к начальному положению в двух предшествующих шагах (точка 1 и 14, соответственно). Время, необходимое для коррекции пертурбации (различие между точкой 18 и 27), соответствовало ~ 0.4 с.

Этот тип коррекций, т.е. смещение лапы из неправильного латерального положения в правильное («стандартное»), осуществлялся во время фазы переноса шагательного цикла и наблюдался у всех тестируемых кошек как при смещении опорной поверхности наружу (Рис. 67Б и В), так и смещении внутрь (Рис. 67Г и Д). Полученные результаты были схожи при стимуляции СМ и МЛО (Рис. 67В и Д).

В этих экспериментах мы также регистрировали латеральное (Y) положение контралатеральной лапы в цикле перед, во время и после пертурбации (Рис. 67Б-Д). Хотя изменения в положении контралатеральной лапы в опорную фазу были намного меньше, чем изменения в ипсилатеральной конечности, различия были статистически значимы (Рис. 67 Б, В и Д). Эти данные демонстрируют, что при зафиксированном тазе

реакции на смещение опоры распространяются не только на ипсилатеральную лапу, но и задействуют и контралатеральную сторону, по-видимому, за счет кросс-рефлекторных связей.

Для анализа механизма переноса конечности в стандартное положение при опоре мы прикладывали латеральную силу к конечности (эластичной резинкой), которая не вызывала отклонение во время опорной фазы, но влияла на конечность во время всей фазы переноса (Тест 4, Рис. 62 Е). Рис. 68А иллюстрирует изменения траектории шага, причиняемые воздействием латеральной силы. Показана траектория левой стопы до возмущающего воздействия с ее фазой переноса (точки 1-5) и фазой опоры (точки 5-12), отмеченные толстой и тонкой линиями соответственно. Траектория опоры имеет латеральную координату $Y=2$ см.

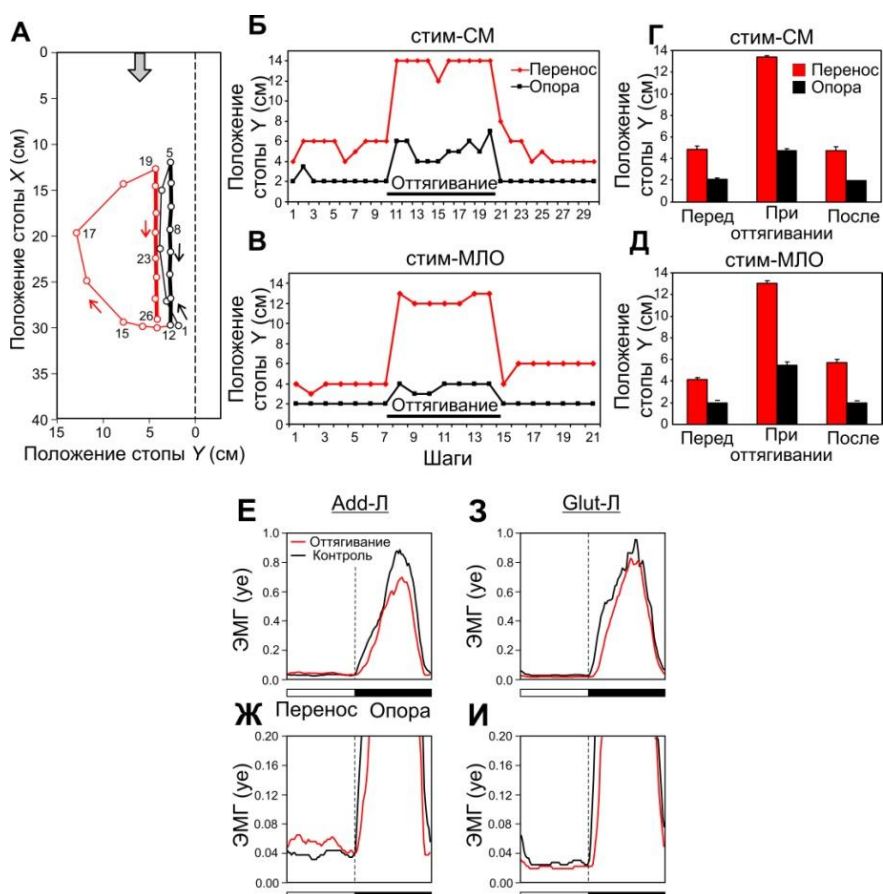


Рис. 68. Эффект латерального оттягивания конечности. Условные единицы(ue).

Затем латеральная сила (0.15-0.2 кг) прикладывалась в область голени (точка 13), что приводило к увеличению латерального отклонения конечности в фазу переноса (тонкая красная линия), которое максимально ($Y=13$ см) в точке 17. После этой точки отклонение лапы градуально уменьшалось, и конечность в конечном итоге приземлялась в положение $Y=4$ см (точка 19). Новая траектория опоры (толстая красная линия) была немного отклонена влево в сравнении с предыдущим циклом (с $Y=2.5$ см до $Y=4$ см). Можно сделать вывод, что во время фазы переноса конечность развивает дополнительную латеральную силу для преодоления приложенной извне силы, что приводило к возвращению конечности в положение, близкое к стандартному.

Рисунок 68 Б и В показывает отведение лапы латерально, осуществляемое при нескольких последовательных шагах во время локомоции кошек при стимуляции СМ и МЛО. Приложенная сила (0.15-0.2 кг) не влияла на положение конечности при опоре. При переносе такая сила вызывала сильное латеральное смещение конечности в каждом шаге (сходно с тем, как показано на Рис. 68 А), с пиком на $Y=12-14$ см. Однако, благодаря противодействующей силе, конечность приземлялась в намного более медиальном положении ($Y=4-6$ см), что приводило к траектории опоры с этим значением Y . Такие результаты, демонстрирующие стабилизацию положения приземляющейся конечности, были получены у всех тестированных кошек во время локомоции, вызванной стимуляцией СМ (Рис. 68 Г) и МЛО (Рис. 68 Д). Сходные результаты были получены при приложении внешней силы в противоположном (медиальном) направлении (не показано).

Можно предположить, что преодоления абдукции и аддукции, причиняемой при тестах с эластичной резинкой, мышцы с противоположной функцией (приведение и отведение конечности) активируются, и их антагонисты (абдукторы и аддукторы) инактивируются. Мы не обнаружили, однако, какие-либо значимые изменения в активности

(при шагах с с латеральным и медиальным оттягиванием конечности) в 10 регистрируемых мышцах (см. Методы). Небольшие изменения были видны в ЭМГ активности *adductor femoris* (экстензор и аддуктор бедра) и *gluteus* (экстензор и абдуктор бедра) при шагании с и без латерального отведения. Рисунок 68 Е-И показывает усредненные электромиограммы в Add-Л и Glut-L в различные фазы локомоторного цикла. Видно, что обе мышцы проявляют высокую активность в опорную фазу (что соответствует их экстензорной функции), тогда как их активность в фазу переноса была относительно небольшая (Е и З). Но при болшем усилении ЭМГ сигналов (Ж и И) можно видеть некоторое увеличение активности Add-Л в фазу переноса во время отведения лапы, также как небольшое уменьшение активности Glut-Л в эту фазу.

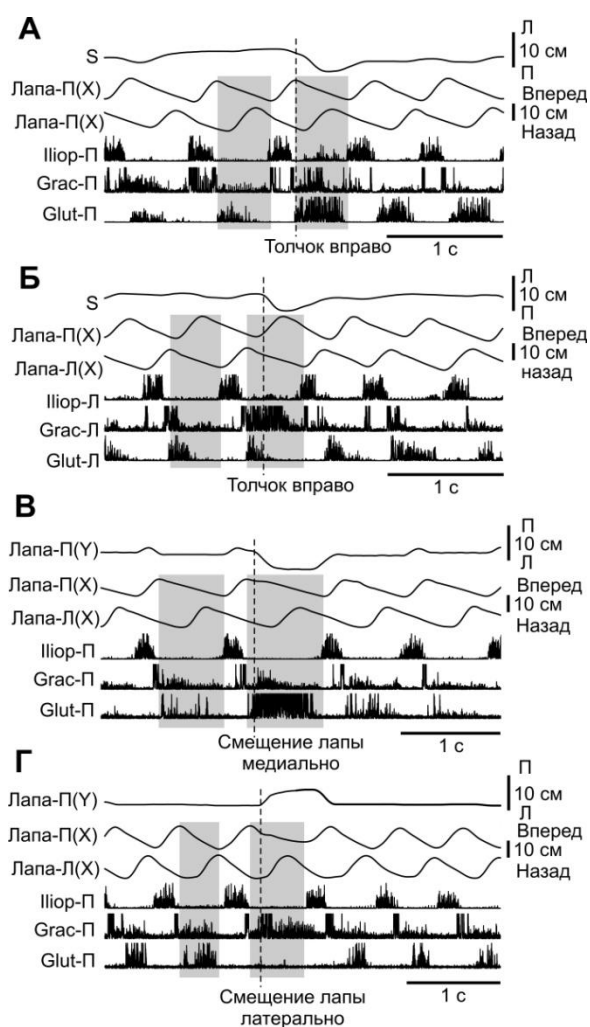


Рис. 69. Эффекты толчков туловища и смещения лапы на ЭМГ.

Одно возможное объяснение небольшой активности абдукторных и аддукторных мышц в фазу переноса является то, что поддержка веса тела в опору требует намного большей активности в бифункциональных мышцах, чем необходимо для коррекции траектории конечности при переносе. Нельзя исключить, однако, что некоторые мышцы из тех, которые не регистрировались (около 20 мышц, действующих, например, на тазобедренный сустав у кошки, см. Reighard, Jennings, 1902), могут быть специфически вовлечены в контроль латерального положения конечности во время переноса.

Механизм при опоре конечности (МОК). В условиях свободного таза (*Тип экспериментов 1*, Рис. 62 Б) латеральный толчок, приложенный в опорную фазу конечности, вызывал активацию абдукторных и аддукторных мышц этой конечности, в зависимости от направления толчка (Рис. 69 А,Б. Толчок в опорную фазу контралатеральной конечности (Рис. 69 А) вызывал увеличение активности абдукторов (Glut-II). Толчок в опорную фазу ипсилатеральной конечности (Рис. 69Б) вызывал увеличение активности аддукторов (Grac-III). Сходные реакции были обнаружены у всех тестируемых кошек при локомоции, вызванной стимуляцией МЛО (n=2) и СМ (n=4). Эти реакции были схожи с реакциями, обнаруженными у интактных кошек (Karayannidou et al. 2009a), подтверждая, что основные нейрональные сети, лежащие в основе этих рефлекторных реакций, находятся на уровне спинного мозга, ствола и мозжечка. Разные афферентные входы могут вносить свой вклад в эти реакции. В частности, латеральное отклонение таза (S на Рис. 69А,Б) в опорную фазу может вызывать абдукцию или аддукцию конечности по отношению к туловищу, что может отслеживаться рецепторами растяжения соответствующих мышц. Для выяснения роли этих сигналов таз жестко фиксировался и шагающая лапа смещалась (в опорную фазу) внутрь или наружу сдвиганием опорной поверхности (Тест 4, Рис. 62Е). Результаты этих экспериментов иллюстрированы на Рис. 69В,Г. Смещение медиально (В) вызывало

аддукцию конечности и активацию Glut (абдуктор бедра). Смещение латерально (Г) вызывало абдукцию конечности и активацию Grac (аддуктор бедра), так же как инактивацию Glut. Схожие реакции наблюдались у всех тестируемых кошек с локомоцией, вызванной стимуляцией МЛО (n=2) и СМ (n=4). Таким образом, сигналы об абдукции и аддукции конечности во время опорной фазы вносят вклад в активацию постуральных механизмов при опоре конечности. Предполагается, что этот механизм противодействует смещениям в сторону и наклонам задней части тела, вызываемым латеральными толчками.

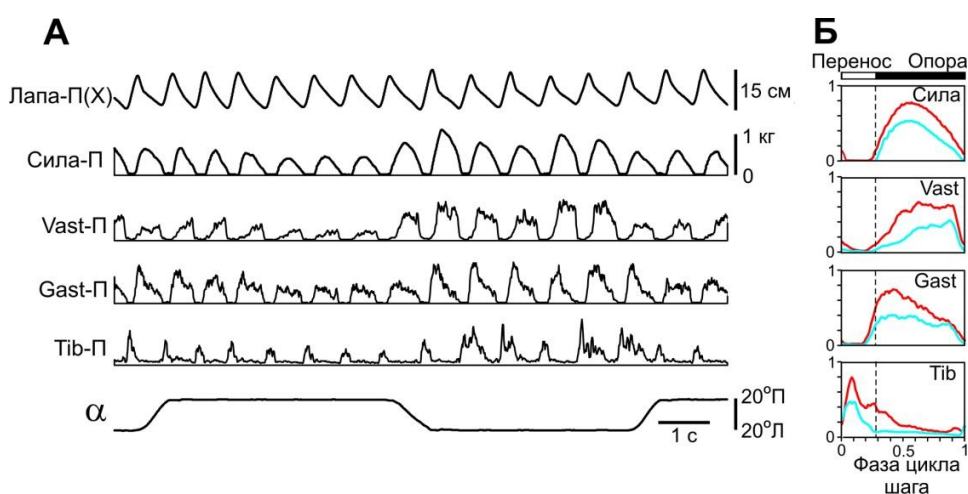


Рис. 70. Эффекты нагрузки конечности.

Механизм компенсации нагрузки конечности (МКНК). Для исследования эффектов нагрузки/разгрузки шагающей конечности, таз жестко закреплялся и тредбан наклонялся направо и налево (Тест 5, Рис. 62 Ж и З). Такие наклоны вызывали смещение опорной поверхности вверх и вниз (небольшие изменения в наклоне поверхности под каждой конечностью не учитывались), что приводило к одновременной нагрузке одной конечности и разгрузке другой конечности. Пример эффектов нагрузки/разгрузки конечности на ЭМГ и силовые ответы показаны на рисунке 70 А. Для оценки таких реакций силовые и ЭМГ ответы усреднялись для ипсилатерального (синий, n=12) and контралатерального (красный, n=12) наклонов (Рис. 70 Б). Амплитуды сил и ЭМГ ответов в данной лапе были больше, когда опора поднималась (контралатеральный наклон, нагрузка

конечности) по сравнению с ее смещением вниз (ипсилатеральный наклон, разгрузка конечности). Увеличение ЭМГ ответов в нагруженной конечности наблюдалось не только в экстензорах (Vast, Gast), но и во флексоре (Tib), таким образом внося вклад в увеличение жесткости конечности. Сходные реакции обнаружены у всех тестируемых кошек (n=3). У кошки со свободным тазом эти МКНК могут противодействовать отклонению задней части тела в направлении наклона опорной поверхности (см. обсуждение).

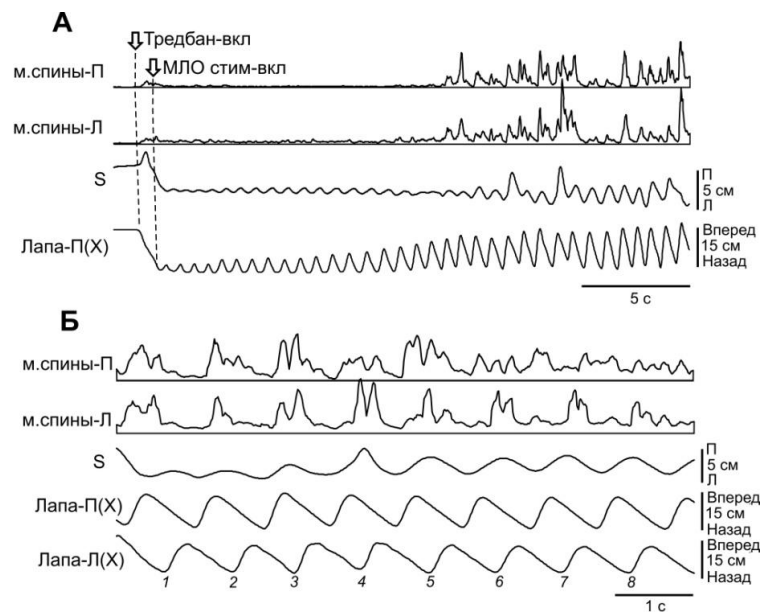


Рис. 71. Активность мышц спины при локомоции.

Механизм конфигурации туловища (МКТ). Для выяснения роли механизмов, связанных с конфигурацией туловища, в контроле баланса, мы регистрировали билатерально ЭМГ активность мышц спины (*erector spinae* and *multifidus*). Активность этих двух мышц при локомоции, так же как их реакции на постуральные отклонения были похожи. Эти мышцы у децеребрированных кошек были практически неактивны в покое. Активность появлялась при стимуляции МЛО и СМ вместе с инициацией шагательных движений, как показано на рис. 71 А. Можно увидеть, что стимуляция МЛО вызывала градуальную билатеральную активацию мышц спины при усилении шагательных движений (увеличении амплитуды шага, появлении латеральных осцилляций туловища). Активация этих двух систем приводила к подъему задней части тела и поддержанию его

основной поструральной конфигурации (ориентацию тела спиной вверх) при ходьбе. Модуляции при ходьбе часто наблюдались в активности мышц спины, как показано на Рис. 71 Б. Правая и левая мышцы спины могли быть активны в одну фазу (циклы 1-5), модулироваться только с одной стороны (циклы 6-8), или модулироваться в антифазу (не показано). Модуляция мышц спины при ходьбе интактных и децеребрированных была ранее описана Carlson et al., (1979) и Zomlefer et al., (1984). Эти модуляции возникают отчасти из-за влияний спинального локомоторного генератора (Koehler et al., 1984) и играют первостепенную роль в регуляции жесткости спины (Carlson et al., 1979).

Мы исследовали ответы мышц спины на различные поструральные тесты. В *Тесте 1* (Рис. 62 Б) короткий импульс латеральной силы (точок) прикладывался к тазу. Точок причинял быстрое смещение таза, изгиб туловища (Рис. 64 В), аддукцию и абдукцию поддерживающей конечности. Показательный пример ответа мышцы спины на толчок показан на рис. 72 А. Видно, что толчок в любом направлении вызывает коактивацию левой и правой мышц спины. Сходные реакции наблюдались у всех тестируемых кошек при стимуляции МЛО и СМ ($n=2$ и $n=3$, соответственно).

Для определения афферентных источников таких ответов (афференты конечности или туловища) проводились два теста. В *Тесте 3* (таз зафиксирован, Рис. 62 Е) мы двигали конечность относительно туловища посредством латерального смещения опорной поверхности под ней. Такое смещение (~ 7 см) вызывало небольшие билатеральные ответы в мышцах спины (Рис. 72 Б), подтверждая, что афферентация от конечности вносит вклад в их активацию. Затем той же кошке был проведен *Тест 6* (Рис. 62К). Тредбан удалялся и ходьба в воздухе вызывалась в подвешенных конечностях. Как показано на Рис. 72 В, отклонение таза вместе с конечностями (при этом крепление таза двигалось на 6 см) вызывало большую билатеральную активацию мышц спины, тогда как это почти не влияло на локомоторные движения конечностей (оценивалось по ЭМГ

ответам в Tib-R). Сходные результаты были получены у всех тестируемых кошек (n=3).

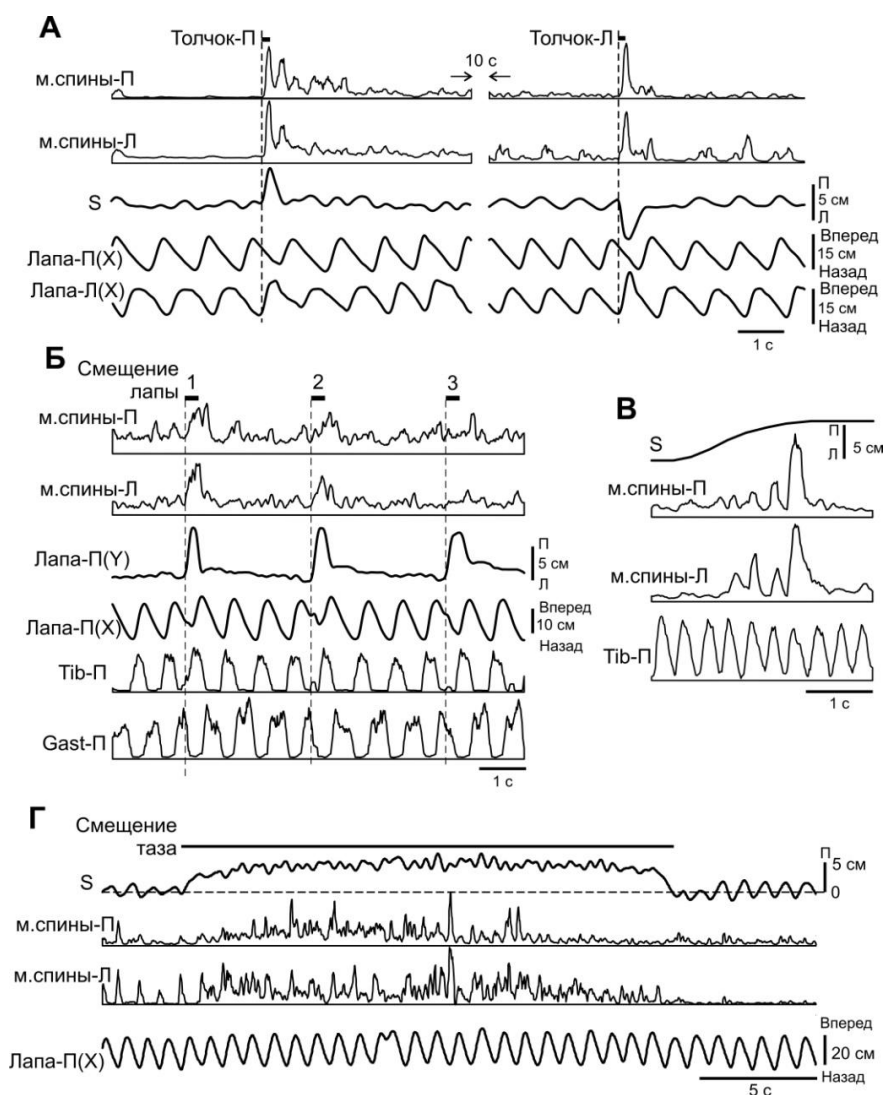


Рис. 72. Ответы мышц спины на различные возмущающие воздействия при локомоции. (А) Толчки туловища при ходьбе со свободным тазом, вызванной стимуляцией МЛО. (Б) Смещение лапы при ходьбе с закрепленным тазом, вызванной стимуляцией МЛО. (В-Г) Латеральное смещение таза в подвешенной кошке при ходьбе в воздухе, вызываемой стимуляцией МЛО (В) и стимуляцией СМ (Г).

Результаты, полученные при выполнении Теста 6 и Теста 3 подтверждают, что сгибание туловища при толчках (Рис. 72 А) было основным фактором, вызывающим ответы в мышцах спины, тогда как

искажение локомоторного паттерна вносило меньший вклад (видно при сравнении ответов мышц спины в Рис. 72 Б и В).

Мышцы спины отвечали на сенсорный вход не только динамически (как на Рис. 72 А,В), но и статически. Рисунок 72 D показывает, что длительные латеральные отклонения таза (вызываемые его смещением, *Тест 7* в Рис. 62 Л) приводили к длительному изгибанию туловища и коактивации мышц спины справа и слева. Вероятными сенсорными входами при этих реакциях были афферентные сигналы об амплитуде изгиба.

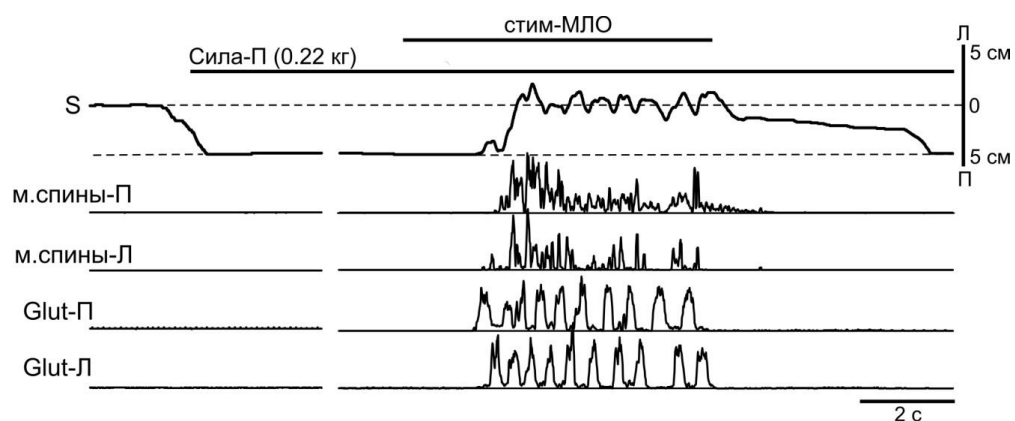


Рис. 73. Рефлекторные ответы на оттягивание туловища в покое и при локомоции.

Предполагается, что коактивация мышц спины, вызванная изгибами туловища, ведет к увеличению жесткости спины (как описано в *Hu et al.*, 2009) и поэтому к уменьшению изгиба туловища, вызванного внешним воздействием. Эта гипотеза была протестирована в экспериментах с подвешенной задней частью тела (*Тест 7*, Рис. 62Л и М). Как показано на рис. 73, латеральная сила (0.22 kg) вызывала изгиб туловища вправо и отклонение таза на расстояние около 5 см. Стимуляция МЛО активировала локомоторные механизмы и вызывала ходьбу в воздухе (оценивалась регистрацией ЭМГ активности в Glut-П and Glut-Л). Это также вызывало билатеральную активацию мышц спины, которая приводила к выпрямлению туловища (несмотря на продолжающееся воздействие латеральной силы). Этот результат поддерживает нашу гипотезу о том, что механизм

стабилизации туловища основан на контроле его жесткости по принципу обратной связи. Все эффекты изгибов туловища, перечисленные выше (*Тесты 1, 6 and 7*), были сходны, когда локомоция вызывалась стимуляцией МЛО ($n=3$) и СМ ($n=1$).

Обсуждение

В первой части данного исследования изучалась способность децеребрированной кошки сохранять латеральную стабильность при локомоции. Использовались два дестабилизирующих фактора – короткий боковой толчок и длительный боковой наклон тредбана.

Было обнаружено, что кошка способна быстро восстанавливать равновесие после толчков, используя два типа постуральных реакций – шаги в сторону и внутрь (Рис. 64). Вид реакции зависел от направления толчка и фазы его приложения в цикле шага. Шаг в сторону (когда стопа опускалась более латерально, чем при обычных шагах) выполнялся, когда толчок осуществлялся во время переноса конечности, расположенной на противоположной стороне. Шаг внутрь (при котором конечность опускалась более медиально, чем при нормальных шагах) выполнялся, когда толчок осуществлялся при переносе конечности, расположенной на ипсилатеральной стороне. Эти два типа реакций на боковые толчки наблюдались также у идущих интактных кошек (Karayannidou et al., 2009a), на основе чего можно предположить, что в обоих случаях реакции вызывались одними и теми же нейронными сетями, находящимися на уровне спинного мозга, ствола и мозжечка. По-видимому, переднемозговые механизмы (в частности, двигательная зона коры головного мозга) играют вторичную роль, определяя интенсивность этих реакций (см., например, Hof, 1996). У идущих людей латеральная стабильность также может корректироваться положением стоп (Townsend, 1985; Kuo, 1999), а латеральный толчок вызывает шаг в сторону или внутрь в зависимости от фазы отклонения (Hof et al., 2010).

Также установлено, что децеребрированная кошка могла идти по латерально наклоненному тредбану. Эта постуральная адаптация в значительной мере основывалась на трансформации нормального (симметричного) локомоторного паттерна в асимметричный, с разными функциональными длинами правой и левой конечности (Рис. 66D,E). Подобная адаптация к наклонной дорожке наблюдалась и у идущих интактных кошек (Karayannidou et al., 2009b), на основе чего можно также предположить, что в обоих случаях базовый паттерн реакций был вызван деятельностью одних и тех же стволово-церебеллярно-спинальных механизмов. Несмотря на то, что у интактных кошек активность моторной коры головного мозга коррелирует с наклоном тредбана (Karayannidou et al., 2009b), можно сделать вывод, что эти кортикальные команды (и сигналы из других центров переднего мозга) могут играть лишь вторичную роль в этой постуральной адаптации.

В недавнем исследовании было показано, что идущая децеребрированная кошка может сохранять равновесие, когда к ее хвосту прикладывалась латеральная тянущая сила (Musienko et al., 2012a). Вместе с результатами данного исследования эти выводы демонстрируют, что нейронные механизмы ствола головного мозга, мозжечка и спинного мозга способны поддерживать латеральную стабильность при локомоции и компенсировать широкий диапазон дестабилизирующих факторов. Децеребрированные животные также могут генерировать соответствующие постуральные реакции на различные отклонения при стоянии (Musienko et al., 2008; Honeycutt et al., 2009; Honeycutt, Nichols, 2010). Таким образом, можно сделать вывод, что контроль позы и равновесия при различных условиях является, по сути, функцией заднего и спинного мозга.

Во второй части настоящего исследования мы проанализировали нейронные механизмы, которые участвуют в постуральных реакциях на толчки и наклоны у идущих животных. Эти механизмы схематически показаны на Рис. 74 А-Б. Крестики и кружки обозначают точки

механической фиксации и подвешивания туловища соответственно, которые позволили отдельно изучать эти механизмы.

Механизм при переносе конечности (МПК) схематически изображен на Рис. 74 А. В ходе экспериментов, показанных на Рис. 67 и 68, был выявлен механизм переноса конечностей. Независимо от латерального положения стоп (по отношению к туловищу) в начале фазы переноса (D_0 , D_1 , D_2 , и т.д., Рис. 74 А1), окончательное положение стоп в момент постановки стопы всегда одно и то же, D_0 . Таким образом, траектории переноса, которые начинаются в разных точках, заканчиваются в стандартной точке и приводят к стандартной траектории опоры. Траектория переноса может быть скорректирована благодаря сенсорной обратной связи от самой конечности, сигнализирующей о текущем значении отведения или приведения (Рис. 74 А2), как было показано с помощью приложения латеральной силы к переносимой конечности (рис. 68).

Предполагается, что контролируемой переменной в МПК является угол во фронтальной плоскости между конечностью и туловищем (γ на Рис. 74 А3). Стабилизируя этот угол в конце фазы переноса (обычно γ составляет около 90° , Рис. 64 Ж, МПК обеспечивает постоянную латеральность траектории опоры (D_0). Это относится к хождению не только по горизонтальной поверхности, но и по поверхности с различными углами наклона (α) (Рис. 74 А3).

После того как конечность была перенесена вперед, начинает действовать *механизм при опоре конечности (МОК)* (Рис. 74 Б). Он основывается на рефлекторных реакциях на изменения угла тазобедренного сустава в поперечной плоскости (Рис. 69). Благодаря МОК, увеличение или уменьшение угла γ ($\Delta\gamma$ на Рис. 74 В) вызывает, соответственно, активизацию приводящих или отводящих мышц; это обычно восстанавливает начальный угол бедра (стрелка). МОК обусловлен сенсорной обратной связью от самой конечности, сигнализирующей об угле γ . Наиболее вероятными

афферентами, обеспечивающими эту информацию, являются рецепторы растяжения приводящих и отводящих мышц.

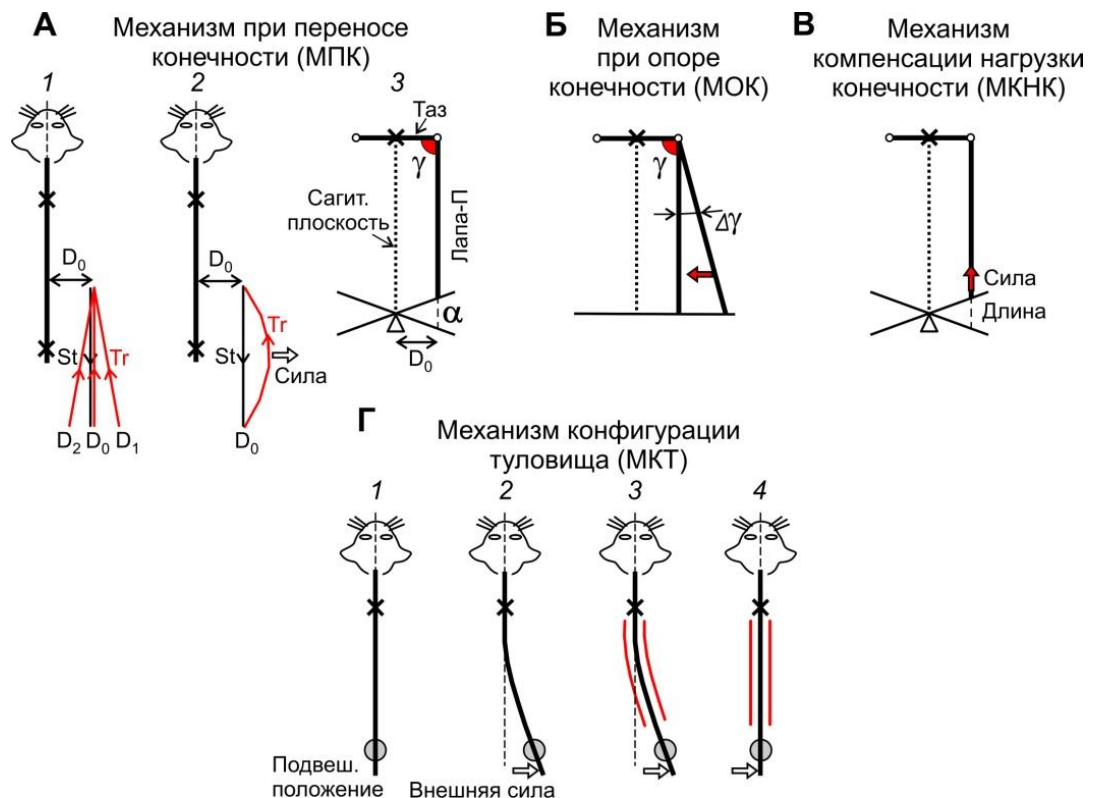


Рис. 74. Четыре базовых механизма постурального контроля при локомоции.

Обнаружено также, что приведение или отведение конечности во время фазы опоры вызывает приземление конечности с противоположной стороны в более латеральном или медиальном положении соответственно по сравнению с обычными шагами. Хотя эти взаимные межконечностные реакции были небольшими (Рис. 67 Б-Д), нельзя исключить то, что они вносят свой вклад в контроль баланса при локомоции (например, на шаги внутрь или в сторону, вызванные толчком).

Механизм компенсации нагрузки конечности (МКНК) также действует во время фазы опоры (Рис. 74 В). Он активизирует мышцы-разгибатели путем нагрузки и сгибания конечности (Рис. 71) (Orlovsky, 1972; Pratt, 1995; Duysens *et al.*, 2000). Наиболее вероятными афферентами, дающими информацию для МКНК, являются рецепторы растяжения и сухожильные органы Гольджи мышц-разгибателей.

Механизм конфигурации туловища (МКТ) схематически изображен на Рис. 74 Г. Эта схема основывается на двух обнаруженных фактах – симметричной активации мышц спины при любом изгибе туловища (Рис. 72) и выпрямлении туловища при активации этих мышц (Рис. 73 Б). Симметричная тоническая деятельность мышц спины обеспечивает прямую ось туловища при спокойной локомоции (Рис. 74 Г1). Приложение внешней силы (Рис. 74 Г2) вызывает изгиб тела в направлении силы. МКТ получает сенсорную информацию, говорящую об этом изгибе. Эта информация может исходить от рецепторов растяжения мышц спины. Она вызывает значительную двустороннюю активацию мышц спины (красные линии на Рис. 74 Г3), что приводит к возрастанию жесткости туловища (см., например, Hu et al., 2009). Последнее приводит к выпрямлению туловища (Рис. 74 Г4). Поскольку выпрямление происходит при любом (правом или левом) начальном изгибе туловища, можно сделать вывод, что направление моторной реакции определяется не моторной командой, а формой туловища. Механизм конфигурации туловища может действовать также у интактных животных, когда передняя часть туловища не фиксируется, а поддерживается передними конечностями.

Предполагается, что эти четыре основных механизма позволяют децеребрированным кошкам сохранять равновесие при локомоции и компенсировать нарушения, рассмотренные в предыдущем исследовании (боковые толчки и длительные боковые наклоны тредбана). Наши аргументы состоят в следующем:

В тестах с толчками установлено, что сильный боковой толчок может вызвать значительное смещение таза и изгиб туловища, которые приводят к смещению проекции центра масс за пределы площади опоры (Рис. 64 А,Г). При таком положении тела активность мышц конечностей не способна вернуть заднюю часть тела в устойчивое положение и равновесие может быть утрачено. Но этого не происходит, вероятнее всего, благодаря МКТ, который может устранить изгиб туловища в горизонтальной плоскости

(Рис. 73 и 74Г). Возможно, МКТ также компенсирует изгиб туловища в других плоскостях, а также скручивание туловища.

Одновременно с восстановлением нормальной (прямолинейной) формы тела и ориентации таза (осуществляемым в значительной мере МКТ), происходит восстановление нормального положения конечностей относительно туловища. Это достигается в основном благодаря МПК, который в фазе переноса переносит конечность в стандартное положение по отношению к туловищу, независимо от исходного положения конечности. Предполагаемая роль МКНК и МОК в тестах с толчком состоит в уменьшении нарушений локомоторного паттерна, вызванных толчком, путем повышения жесткости опорной конечности при движениях вдоль ее оси (МКНК) и движений вокруг тазобедренного сустава в поперечной плоскости (МОК).

В тестах с наклонами адаптация к постоянному боковому наклону опорной поверхности, возможно, также зависит от МКТ и МПК. Этот наклон потенциально может вызвать значительное смещение и ротацию таза. Однако этого не происходит и эти переменные хорошо стабилизированы (Рис. 66 З). Вместе с восстановлением нормальной (прямолинейной) формы туловища и ориентации таза (которое происходит в значительной степени за счет МКТ), благодаря МПК, который обеспечивает стандартное латеральное положение конечности относительно туловища в момент постановки конечности, происходит восстановление нормального положения конечностей. Этот механизм может также определить функциональную длину конечностей при ходьбе по наклонной поверхности (Рис. 66 Г,Д) с учетом того, что фаза опоры включается в момент приземления стопы (Рис. 74В). Предполагаемая роль МКНК в тестах с наклонами состоит в сохранении симметричной нагрузки двух конечностей, расположенных на разных высотах опоры, в то время как МОК может повысить жесткость в тазобедренном суставе, чтобы

уменьшить отклонения в локомоторной модели, вызванные наклонами. Эти механизмы могут иметь также и другие функции.

Четыре рассмотренных выше механизма (МПК, МОК, МКНК и МКТ), по-видимому, участвуют не только в постуральных реакциях на толчки и наклоны, но и в реакциях на другие нарушения устойчивости. В предыдущих исследованиях было показано, что, благодаря увеличению активности разгибателей и абдукторных мышц, а также уменьшению активности аддукторных мышц на стороне возмущающего воздействия, у идущей децеребрированной кошки хорошо компенсируется постоянная отклоняющая сила, приложенная к хвосту (Musienko et al., 2012a). Это может быть вызвано МКТ, который противодействует латеральному изгибу туловища, МПК, который поддерживает нормальное положение конечности и туловища, а также МОК и МКНК, которые повышают жесткость конечности со стороны приложения тянущей силы.

В данном исследовании мы выявили и сравнили деятельность разных рефлекторных механизмов баланса при локомоции, вызванной стимуляцией МЛО или СМ. Между этими двумя способами активации механизмов, контролирующих направление шагания при локомоции, ранее обнаружена значительная разница (Musienko et al., 2012b). Было высказано предположение, что участие нейронных сетей ствола мозга больше в случае стимуляции МЛО, чем СМ (Musienko et al., 2012b). Однако в настоящем исследовании не было обнаружено значительных различий в работе механизмов баланса при локомоции вперед во время активации стимуляцией МЛО и СМ (Рис. 66 З, 67 Б-Д и 68Б-Д), что говорит о доминирующей роли спинальных нейронных сетей в этих моторных задачах.

Глава 7.

ОБЩЕЕ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Локомоторные и постуральные нейронные сети спинного мозга и ствола

Исследования настоящей диссертационной работы доказывают, что спинальные нейронные сети играют ключевое значение в генерации постуральных реакций при стоянии (Musienko et al., 2008; 2010), контроле направления локомоторной активности (Мусиенко с соавт., 2005; Musienko et al., 2012a, Musienko et al., 2012b), мышечного тонуса и динамического баланса при ходьбе (Мусиенко с соавт., 2013a; Musienko et al., 2011, 2012c). При сохранных спинальных проводящих системах у децеребрированных и интактных животных эти сети активируются тоническими сигналами из ствола мозга, в том числе происходящими из мезенцефалической локомоторной области и вентральной области покрывки продолговатого мозга (Mori et al., 1986; 1987; Musienko et al., 2008, 2012b).

Хотя локомоторная и постуральная активность могут управляться спинальными сетями, двигательный паттерн становится нестабильным после повреждения спинного мозга и плохо интегрирован в реальную окружающую среду вследствие нарушения спинально-стволовых, внутриспинальных и сенсомоторных механизмов. Если посмотреть на единую систему управления позой и локомоцией с этого угла зрения, принципиально можно выделить два уровня их интеграции (Рис. 75): 1 – спинальный и 2 – супраспинальный. Первый уровень интеграции включает как взаимодействие отдельных спинальных нейронных сетей и их составных компонентов – межсетевую и внутрисетевую интеграцию, так и сенсомоторную интеграцию – адаптацию активности сетей и их моторного выхода к тоническим и фазическим сенсорным сигналам от окружающей

среды. Интегративные контролирующие механизмы, которые осуществляются через восходящие и нисходящие пути с участием нейронных сетей головного мозга и супраспинальных сенсорных систем, относятся ко второму уровню интеграции.

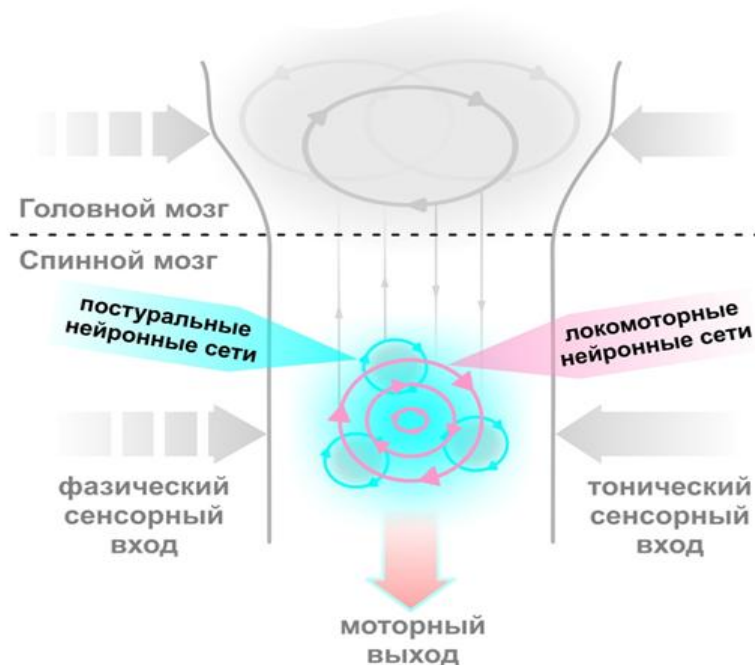


Рис. 75. Уровни интеграции локомоции и позы

В результате исследований диссертационной работы на спинальных и децеребрированных моделях можно сделать вывод, что супраспинальный уровень управления локомоцией и позой играет важнейшую роль, хотя не является необходимым и может быть заменен искусственной электрохимической стимуляцией (Courtine et al., 2009; Musienko et al., 2010, 2011). О важности моторных отделов переднего мозга в контроле позы свидетельствуют эксперименты на децеребрированных кроликах, в которых было обнаружено, что после преаммиллярной децеребрации реакции на латеральные наклоны и толчки аналогичны наблюдаемым у интактных животных, но интенсивность их проявления снижена (Musienko et al., 2008). При выпрямлении преаммиллярные кролики принимали нормальное положение медленнее, чем интактные. Об особенной важности зоны среднего мозга, в которой располагается черная субстанция (SN на Рис. 11),

для активации установочных рефлексов, свидетельствуют опыты на постмамиллярных кроликах, в которых дополнительно повреждалась эта область. Такие животные теряли способность к самостоятельным установочным рефлексам (Magnus, 1924) и постуральным коррекциям. Однако электрическая стимуляция мезэнцефалической локомоторной области, соответствующей клиновидному ядру среднего мозга (Musienko et al., 2008, 2012b), или стимуляция вентральной области покрышки продолговатого мозга (Musienko et al., 2008) вызывала увеличение тонуса разгибательных мышц задних конечностей и усиление реакций на латеральные наклоны и толчки.

После спинализации животные не могли поддерживать латеральную стабильность, причиной чего было нарушение тонической активности постуральных рефлексов конечностей, приводимых в действие сигналами от рецепторов растяжения и нагрузки ипсилатеральной и, в меньшей степени, контралатеральной конечности (Musienko et al., 2010). Исследования показали, что эти постуральные реакции, характерные для интактных животных, осуществляются на уровне спинного мозга. Спинальные рефлексы, лежащие в их основе, подавлены, а их паттерн искажен после спинализации (Рис. 23 и 24). Однако активность спинальных постуральных рефлексов может быть быстро перенастроена и восстановлена одной тонической электрической эпидуральной стимуляцией (ЭС). Постстимуляционный эффект ЭС на постуральные рефлексы еще более усиливался путем интратекального введения 5-НТ агониста квипазина в область пояснично-крестцового утолщения (Musienko et al., 2010). Исследование на хронически парализованных спинальных крысах показало, что тонической электрической стимуляцией спинного мозга и химической активацией специфических нейрофармакологических систем можно также одновременно активировать локомоторные и постуральные спинальные сети, вызывая локомоторную активность с полной поддержкой веса тела и частичным поддержанием равновесия (Musienko et al., 2011). Таким

образом, результаты исследований настоящей диссертационной работы позволяют сделать вывод, что спинной мозг содержит собственные механизмы, лежащие в основе постурального контроля при стоянии и ходьбе (Рис. 75), участвующие в поддержании латеральной стабильности и у интактных субъектов, активируемые и модулируемые в норме супраспинальными сигналами.

Шаги в различных направлениях часто используются человеком и животными для поддержания равновесия при стоянии и локомоции (Chvatal et al., 2011; Karayannidou et al., 2009a). Децеребрированные и спинальные кошки (Мусиенко с соавт., 2005; Rossignol, 1996) и крысы (Courtine et al., 2009) ходят назад, вперед и в сторону в зависимости от направления движения тредбана. Сильные постуральные отклонения при стоянии, вызванные латеральными наклонами опоры или латеральными толчками, могут вызвать латеральные шаги у кроликов и кошек (Beloozerova et al., 2003a,b; Karayannidou et al., 2009a). Также у кошек, идущих вперед, шаг, отклоняющийся от направления движения (например, влево или вправо), вызывается для коррекции отклонений из состояния равновесия (Karayannidou et al., 2009a). В связи с этим можно предположить, что общие спинальные механизмы используются в генерации одиночных шагов при постуральных коррекциях и повторяющихся шагах во время локомоции.

Функциональная организация системы управления направлением локомоторной активности исследовалась нами на модели децеребрированной кошки (Musienko et al., 2012b). Использовались различные направления движения ленты тредбана относительно оси тела (0 , ± 45 , ± 90 , и 180°). Для каждого направления, сравнивалась локомоторная активность, вызванная из ствола мозга (стимуляцией мезэнцефалической локомоторной области, МЛО), и локомоция, вызванная эпидуральной стимуляцией спинного мозга (СМ). Было обнаружено, что стимуляция СМ вызывала хорошо скоординированные шагательные движения в различных направлениях движения ленты тредбана. Направление шагов было

противоположным движению ленты тредбана. Это позволяет полагать, что направление движения лапы определялось фазными сенсорными сигналами по афферентам конечностей, сигнализирующими о направлении и амплитуде отклонения конечности в фазе опоры. Например, во время ходьбы вбок афферент сигнализирует об абдукции, и аддукция может быть использована для запуска переноса в противоположном направлении. Таким образом, стимуляция непосредственно спинного мозга активировала компоненты спинальных нейронных сетей – контроллеры конечности (Orlovsky et al., 1999), которые способны генерировать шагательные движения в различных направлениях (Рис. 10). Напротив, стимуляция ствола вызывала хорошо скоординированные шагательные движения только при движении ленты тредбана в переднезаднем направлении. Поэтому предполагается, что супраспинальные команды (вызванные стимуляцией МЛО) активируют только одну из множества форм работы спинальных контроллеров конечностей, а именно ходьбу вперед. МЛО, таким образом, можно рассматривать как командный центр для локомоции вперед, что является основной формой передвижения у двуногих и четвероногих. Не исключено, что ствол головного мозга содержит и командные центры шагания в других направлениях (Sirota et al., 2000; Islam et al., 2006; Dubuc et al., 2007). Другая гипотеза, также требующая экспериментальной проверки, состоит в том, что сигналы из МЛО управляют разными направлениями, но для этого командные нейроны должны быть специфически модулированы, например, субталамической локомоторной областью или другими вышестоящими центрами головного мозга (Shik, Orlovsky, 1976), которые удалены после преколликкулярной постмамиллярной децеребрации.

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. В отдельной экспериментальной серии было

показано, что децеребрированные кошки эффективно контролируют латеральную устойчивость при ходьбе (Musienko et al., 2012c). Это означает, что нейронные сети ствола, мозжечка и спинного мозга могут эффективно управлять динамическим балансом при активном передвижении. Поскольку вестибулярные, зрительные, шейно-тонические сенсорные входы отсутствовали в исследуемой экспериментальной модели, коррекции баланса полностью базировались на интеграции соматосенсорной информации, происходящей от двигающихся задних конечностей.

Детальный анализ корреляций между мышечной активностью, силовыми опорными реакциями, кинематикой движений туловища и задних конечностей показал, что моторная система децеребрированного животного использует комбинацию обратной связи (feedback control) и стратегию упреждения (feedforward control) для активного поддержания динамического равновесия во время локомоции сходно с интактными кошками. Результаты исследования позволяют предположить, что нейронные сети ствола мозга, мозжечка и спинного мозга поддерживают механизмы краткосрочной памяти непосредственно предшествующих сенсорных и моторных событий и используют эти инграммы в планировании и выполнении последующих движений, связанных с поддержанием равновесия при ходьбе (Hodgson et al., 1994; Мусиенко с соавт. 2013a).

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 (Musienko et al., 2012c; Мусиенко с соавт., 2013a). 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. Настоящие данные, однако, также свидетельствуют, что нейронные сети ствола, мозжечка и переднего мозга активно участвуют в обработке проприоцептивной и экстероцептивной информации и обеспечивают необходимый уровень тонического и модуляторного супраспинального контроля спинальных сетей. Например, уменьшение скорости и качества постуральных адаптаций при ходьбе (Рис. 59) у децеребрированных по сравнению с интактными животными, а также спинальными по сравнению с децеребрированными и интактными (Мусиенко с соавт., 2013а) доказывает важную роль супраспинальных интегративных механизмов контроля позы и локомоции. Относительное вовлечение спинальных и супраспинальных нейронных сетей, также как специфическая роль отдельных афферентных систем в регуляции баланса при ходьбе требует дальнейшего изучения.

Нейрональные механизмы динамического контроля баланса при ходьбе

В следующей экспериментальной серии на модели децеребрированной кошки (Zelenin et al., 2013; Musienko et al., 2014) были использованы два новых дестабилизирующих фактора – короткий боковой толчок и постоянный боковой наклон тредбана. Установлено, что толчок вызывал значительное изгибание и скручивание туловища, а также изменения модели шагания, но не приводил к падению. Благодаря постуральным реакциям, локомоция с нормальной конфигурацией восстанавливалась в несколько этапов. Также обнаружено, что децеребрированные кошки могут сохранять равновесие на тредбане с боковым наклоном. 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, нам удалось выделить по отдельности некоторые из этих механизмов, которые контролируют постуральные реакции конечностей и туловища. Был проведен анализ деятельности нейронных механизмов конечностей и туловища, влияющих на постуральный контроль при локомоции. Обнаружено, что один из механизмов конечностей работает в фазе переноса локомоторного цикла и обеспечивает стандартное положение (относительно туловища) для постановки конечности. Два другие механизма конечностей работают в фазе опоры; они уравнивают искажения локомоторной модели, регулируя жесткость конечности. Механизм конфигурации туловища управляет формой тела на основе сенсорной информации от афферентов туловища. Предполагается, что четыре основных постуральных механизма, описанных в данном исследовании, работают также у интактных животных и помогают сохранить устойчивость при локомоции, а также скомпенсировать различные отклонения. Постуральные реакции, вызванные этими четырьмя механизмами, являются интегрированными и таким образом формируют отклик всей системы на нарушение равновесия при локомоции (Рис. 76).

Последовательная интеграция механизмов конечностей и туловища при латеральном возмущающем воздействии показана на Рис. 76. 1- Нормальная конфигурация задних конечностей при локомоции. 2 – Толчок вправо вызывает отклонение таза вправо, 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

механизмов конечностей в перенос (МПК), переносится вперед и приземляется со стандартным углом (γ) по отношению к тазу. Однако, из-за изгиба туловища, правая конечность приземляется в значительно более латеральном положении по сравнению с опорным положением при нормальном шаге (показано маленькими черными квадратами под прямой).

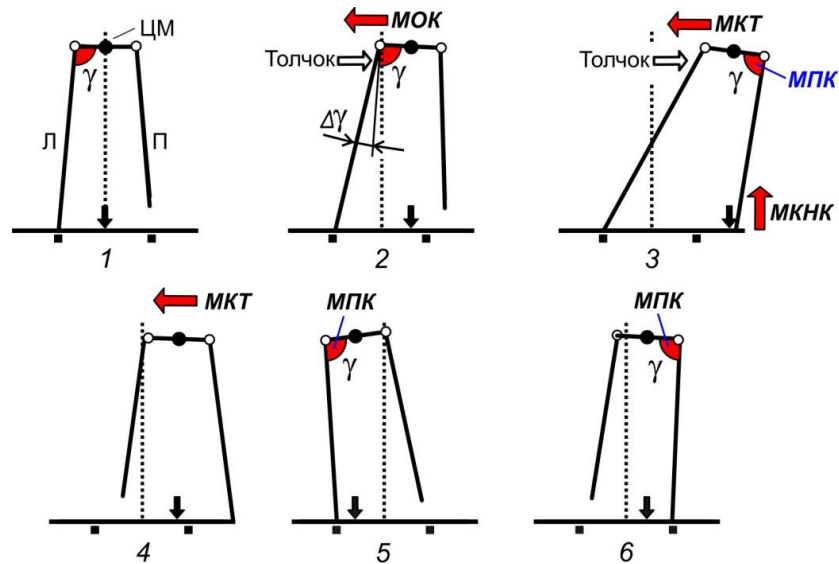


Рис. 76. Интеграция механизмов конечностей и туловища при ходьбе в ответ на латеральное возмущающее воздействие

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 МКТ левая и правая конечности приземлялись в последующих шагах в нормальное медиолатеральное положение (5 и 6). Таким образом, благодаря согласованной работе механизмов конечностей и туловища, восстанавливалась нормальная поструральная конфигурация тела при ходьбе.

Интеграцией четырех описанных механизмов (МПК, МОК, МКНК, МКТ) можно объяснить поструральные коррекции при ходьбе во время исследованных тестов с латеральными толчками и наклонами опоры –

аналогами естественных ситуаций с ходьбой по неровной поверхности или столкновений животных между собой или с объектами неодушевленной природы. Очевидно, однако, что система контроля баланса значительно сложнее и существуют другие механизмы, которые необходимо изучать в дальнейшем. Так, например, наши исследования показали значимость перекрестных рефлекторных механизмов (adduction – cross-abduction, adduction – cross-abduction) в позиционировании конечностей во фронтальной плоскости. Предполагается, что этот новый вид рефлекторных взаимодействий, который удалось выявить, также играет важную роль для сохранения баланса при бипедальной ходьбе. Для изучения этого вопроса планируется поставить отдельное исследование с использованием специальных экспериментальных тестов и точной системы оценки углов между конечностями и тазом (Антипенко с соавт., 2013).

Как отмечалось ранее, сравнение интегративных механизмов контроля позы и локомоции при стимуляции нейронных центров ствола (МЛО) и спинного мозга (СМ) не показало принципиальных различий (Musienko et al., 2013). Хотя между этими двумя способами активации механизмов, контролирующих направление шагания при локомоции, ранее обнаружена значительная разница (Musienko et al., 2012b), в результате чего был сделан вывод о большем участии нейронных сетей ствола мозга в случае стимуляции МЛО, по сравнению со стимуляцией СМ (Musienko et al., 2012b). Сходство механизмов баланса при стимуляции МЛО и СМ, напротив, косвенно говорит о доминирующей роли спинальных нейронных сетей в этих моторных задачах. Это подтверждается экспериментами на спинальных животных, в которых нейронные сети спинного мозга могли самостоятельно управлять латеральной стабильностью при ходьбе при полном отсутствии супраспинальных влияний (Musienko et al., 2011, 2013). Остается неисследованным вопрос: одна ли нейронная сеть спинного мозга контролирует и равновесие, и пропульсию при локомоторном поведении (Magnus, 1924; Шик, 1976), либо существуют разные нейронные системы,

которые тесно структурно и функционально интегрированы между собой (Рис. 75). Ответ на этот сложный вопрос может быть получен в дальнейших экспериментах с регистрацией нейрональной активности при in-vivo локомоции децеребрированной кошки (Горский с соавт., 2012).

Нейрофармакологические механизмы интеграции спинальных сетей

Активность отдельных нейронов постуральных и локомоторных спинальных сетей и координированное взаимодействие между сетями при выполнении сложных моторных задач в норме находятся под контролем нисходящих нейрофармакологических сигналов (Jordan et al., 2008; Jacobs et al., 1993). Одной из важнейших систем, модулирующих работу спинальных нейронов, является моноаминергическая система. После повреждения спинного мозга серотонинергические (5HT), норадренергические (NA) и допаминергические (DA) нисходящие пути прерываются и моторный контроль становится серьезно нарушенным. Однако постсинаптические рецепторы к моноаминам остаются на спинальных интернейронах и мотонейронах (рис. 77). Поэтому введением моноаминергических химических препаратов можно воздействовать на клеточные и синаптические процессы и, как следствие, модулировать функциональность спинальных нейронных сетей.

С использованием передовых нейробиомеханических систем записи и многомерных статистических подходов было обнаружено, что каждый из множества рецепторов к моноаминам модулирует широкий, но индивидуальный спектр кинематических, кинетических и миографических характеристик, которые были отражены на функциональных картах конкретных рецепторов (Musienko et al., 2011). Данный каталог функций далее был использован для выявления оптимальных фармакологических комбинаций, стимулирующих двигательную активность у парализованных крыс. В экспериментах на спинальных животных нам удалось селективно заменять супраспинальные сигналы, нацеленные на преимущественную

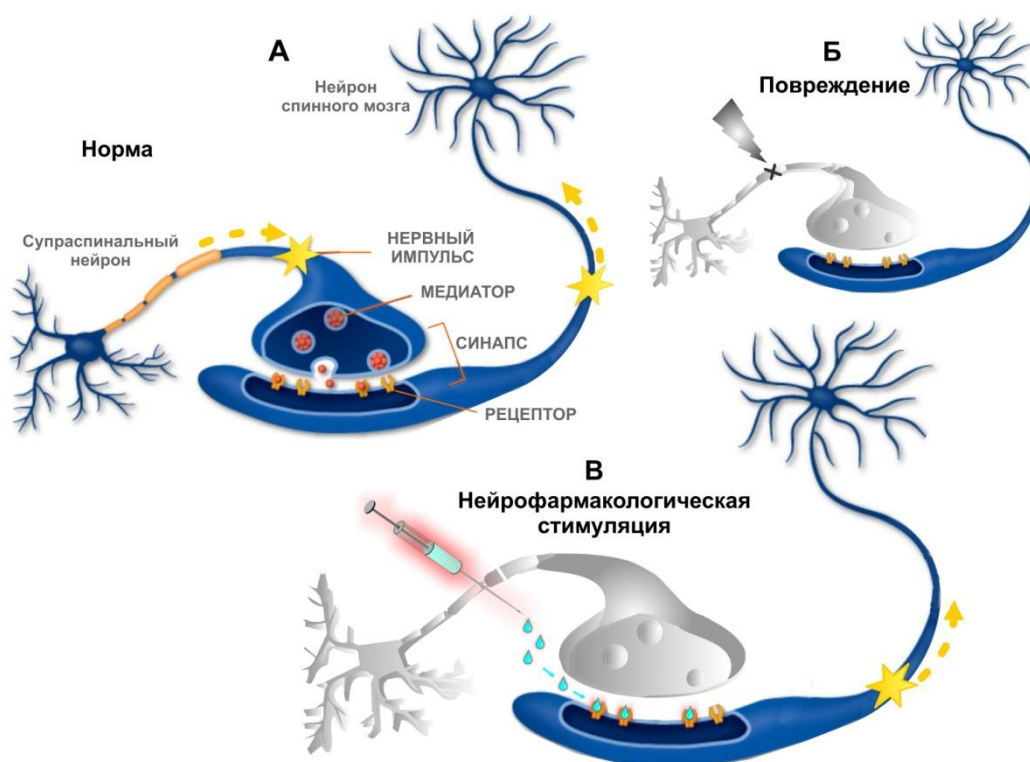


Рис. 77. Фармакологическая стимуляция рецепторов нейронов спинного мозга. (А) Схема выделения медиатора и синаптической передачи. (Б) Повреждение аксона супраспинального нейрона, имеющего синаптический контакт с нейроном спинного мозга, приводит к блокаде синаптической передачи, хотя рецепторы на постсинаптической мембране остаются. (В) Введение специфических химических препаратов – лигандов нейрорецепторов с последующей генерацией нервного импульса в нейроне спинного мозга.

модуляцию постуральных или локомоторных характеристик, искусственным введением лекарств – специфических агонистов или антагонистов моноаминовых рецепторов (Рис. 34, 37). Так, например, качество локомоторной активности было достаточно высоким при модуляции 5-НТ_{1А} и 5-НТ₇ рецепторов (Герасименко с соавт., 2012), а модуляция NA2 улучшала координацию и стабильность локомоторного паттерна. Однако для улучшения постуральных свойств необходима была дополнительная активация допаминовых DA1 и серотониновых 5-НТ_{2А} рецепторов. 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) (Рис.75).

Полученные результаты, с другой стороны, ставят новые вопросы и открывают дальнейшие направления исследований. В продолжение настоящей диссертационной работы, например, выполняются нейрофизиологические эксперименты в комбинации с гистологическими подходами, которые показали, что подтипы тормозных норадреналиновых рецепторов альфа 2А и 2С распределены на противодействующих нейрональных путях спинного мозга и играют противоположную роль в двигательном контроле. Стимуляция тормозных 2А рецепторов существенно подавляла активность спинальных локомоторных сетей через уменьшение сенсорной импульсации по миелинизированным проприоцептивным, кожным волокнам за счет их пресинаптического торможения. С другой стороны, активация тормозных 2С рецепторов улучшала локомоторную активность через пресинаптическое торможение сенсорного входа по ноцицептивным немиелинизированным афферентным волокнам, а также торможение возбуждающих, преимущественно глутаматергических, кожных интернейронов в пластине III-IV по Рекседу.

Дальнейшее изучение этих и других аспектов нейрофармакологического контроля позы и локомоции моноаминергической, глутаматергической, холинергической и другими нейромедиаторными системами не только расширит наши фундаментальные знания, но и поможет продвинуться вперед в оптимизации фармакотерапевтических подходов искусственного воздействия на нейронные сети спинного мозга при патологии.

РЕОБУЧЕНИЕ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ СПИННОГО МОЗГА ИНТЕГРАТИВНОМУ КОНТРОЛЮ ПОСТУРАЛЬНОЙ И ЛОКОМОТОРНОЙ ФУНКЦИИ ПРИ ПАТОЛОГИИ

Замена тонических супраспинальных сигналов электрической 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 постуральные спинальные нейронные сети (Musienko et al., 2010, 2012с; Мусиенко с соавт., 2013а). Эффект улучшения постуральных и локомоторных способностей парализованных животных, по-видимому, основан на схожих механизмах (Lavrov et al., 2008, Musienko et al., 2012с). В отдельной экспериментальной серии (Capogrosso et al., 2013) мы провели компьютерное моделирование электрической стимуляции сенсомоторных сетей спинного мозга крыс (Рис. 78А) и проанализировали структуру рефлекторного ответа на ЭС при электрофизиологических и фармакологических *in-vivo* тестах, которые подавляли отдельные группы сенсорных волокон и/или синаптическую передачу. В результате работы была экспериментально подтверждена гипотеза (Герасименко с соавт., 2002; Мусиенко с соавт., 2005; Lavrov et al., 2008) 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 (Рис. 78Б).

Таким образом, ЭС активирует спинальные нейронные сети через сенсорные пути, которые имеют характерную анатомию и проецируются к соответствующим мотонейронным пулам, распределенным в ростокаудальном направлении (Vrieseling, Arber, 2006). Из-за этого ЭС

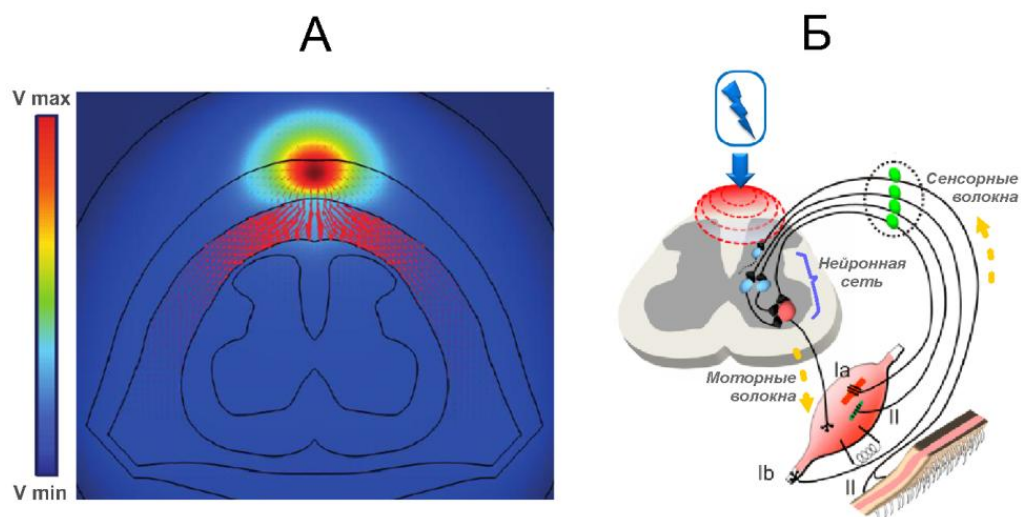


Рис. 78. Распространение электрического поля при эпидуральной стимуляции спинного мозга крысы и вовлекаемые в активность нейрональные структуры. (А) Электрические потенциалы и генерируемые токи, возникающие вслед за импульсом ЭС дорсальной поверхности спинного мозга, кодированы цветом от красного (V_{max}) до синего (V_{min}). Длина и ориентация стрелок отражает интенсивность и направление плотности тока. (Б) Нейрональные структуры, активирующиеся при ЭС (Capogrosso et al., 2013).

определенных мест вызывает разные двигательные паттерны конечностей. Так, применение ЭС на поясничном (L2) или крестцовом (S1) сегментах спинальных крыс (Мусиенко, 2005; Courtine, et al., 2009, Musienko et al., 2012), в соответствии с rostrocaudalным анатомическим градиентом пулов сгибательных и разгибательных мотонейронов, приводило к усилению сгибания или разгибания, соответственно, как при стоянии, так и при ходьбе. Более того, сочетание ЭС двух (L2+S1) (Courtine et al., 2009), а еще эффективнее, трех (L2+L4+S1) (Musienko et al., 2009) сегментов вызывало четкое синергетическое улучшение ходьбы, которая характеризовалась большей координацией задних конечностей и усилением способностей поддержки веса тела. Дальнейшее детальное картирование различных зон спинного мозга в rostro-caudальном и медиолатеральном направлениях, сочетание стимуляции нескольких зон в тоническом режиме

или в определенную фазу локомоторного цикла (Moraud et al., 2013), внимательное изучение эффективных параметров стимуляции (частота, форма стимула) и конфигураций постановки электродов (монополярно, биполярно и триполярно), поиск неинвазивных подходов (Богачева с соавт., 2012; Мусиенко с соавт., 2013б) позволит оптимизировать использование метода электрической стимуляции спинного мозга (Мошонкина с соавт., 2012) для искусственного управления локомоторными и постуральными нейронными сетями.

*Синергичный эффект активации моторных функций
при электрической и химической стимуляции*

При нормальных условиях глутаматергические ретикулоспинальные нейроны обеспечивают тоническим возбуждающим сигналом спинальные нейронные сети (Hagglund et al., 2010). Настоящее исследование демонстрирует мощные возможности электрической стимуляции спинного мозга в замещении тонических нисходящих источников возбуждения для активации постуральной и локомоторной функции у парализованных животных. Но одна тоническая ЭС не могла обеспечить достаточного уровня поддержки веса тела и необходимой координации с плантарной постановкой стопы при ходьбе (Courtine et al., 2009). Сходно с этим, нисходящие глутаматергические входы сами по себе, без присутствия моноаминергического контроля, были не достаточны для того, чтобы поддерживать продолжительные локомоторные паттерны у мышей (Hagglund et al., 2010).

Спонтанная локомоторная активность связана со значительным высвобождением моноаминов в большинстве пластинок пояснично-крестцовых сегментов (Hentall et al., 2006). Эти моноаминергические входы не ограничены только классической синаптической передачей, но в большой степени работают через внесинаптическую диффузию медиатора и

объемную передачу (Agnati et al., 2010). Моноамины легко покидают синаптическую щель и проникают во внесинаптические рецепторы,

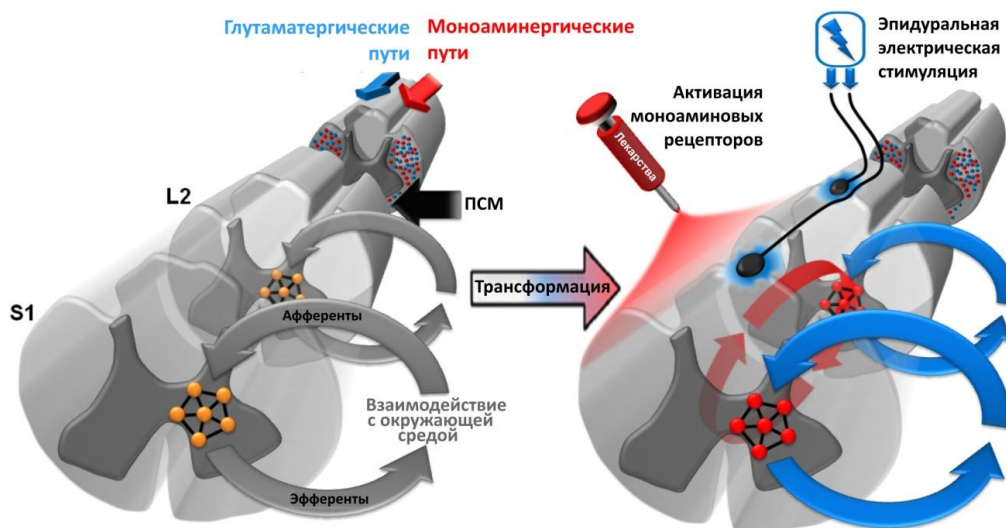


Рис. 79. Синергичный эффект комбинации мультисегментной электрической и мультирецепторной химической стимуляции для трансформации спинальных нейронных сетей из неактивного в высоко функциональное состояние после повреждения спинного мозга (ПСМ).

связанные с G-белком и расположенные на соседних клетках. Такая передача сигнала изменяет свойства нейронов и может действовать в течение минут-часов (Agnati et al., 2010). Поэтому фармакологические препараты, которые имитируют действие моноаминов, можно эффективно использовать совместно с ЭС, чтобы осуществлять функциональную регулировку спинальных цепей (Рис. 79). Мы первоначально проверили эту идею на взрослых крысах с полным повреждением спинного мозга (Courtine et al., 2009). Были выбраны агонисты серотониновых рецепторов 5HT1A, 5HT7 (8-OHDPAT), и 5HT2A/C (квипазин), так как эти фармакологические препараты ранее демонстрировали способность улучшать локомоцию у грызунов (Landry et al., 2006; Gerasimenko et al., 2007). Как правило, в подострой фазе после травмы функциональное состояние спинальных сетей значительно угнетено. В соответствии с этим, по отдельности ЭС или серотониновые агонисты не были способны активировать локомоторную активность через неделю после получения травмы. Однако детальный

анализ показал, что фармакологическое вмешательство разными препаратами модулировало уникальные постуральные и локомоторные свойства двигательного паттерна, свидетельствуя о тонкой регулировке специфических аспектов работы нейронных сетей. 5HT_{2A/C} рецепторы в первую очередь содействовали способностям разгибания и поддержки веса тела, тогда как 5HT_{1A} и 5HT₇ рецепторы усиливали ритмический компонент и вызывали локомоторные паттерны с преобладанием флексорного компонента. Функциональная специфичность электрической и фармакологической стимуляции легла в основу парадигмы синергетического эффекта при комбинации нескольких подходов стимуляции спинальных сетей. Сочетание ЭС двух сегментов (S1 и L2) с применением серотонинергических агонистов (5HT_{1A,7} и 5HT_{2A/C}) действительно способствовало вызову координированной локомоции по движущейся ленте тредбана с плантарным размещением стопы и частичной поддержкой веса тела уже через 1 неделю после спинального повреждения (Рис. 81А) (Cuertine et al., 2009, Musienko et al., 2012). Следующим шагом было установлено, что такая функциональная регулировка у спинальных крыс приводит к еще большему синергетическому усиливающему эффекту при комбинации электрической стимуляции нескольких сегментов спинного мозга и одновременного воздействия (Рис. 38) на серотонинергическую, норадренергическую, допаминергическую системы (Musienko et al., 2011).

В совокупности эти данные поддерживают точку зрения, по которой спинальная двигательная инфраструктура состоит из широко распространенных гетерогенных, но высоко интегрированных систем нейронных сетей и рецепторов, которые могут генерировать спектр двигательных поведений при активации в различных сочетаниях (Giszter et al., 2007). При нормальных условиях глутаматергические и моноаминергические проводящие пути, берущие свое начало из ствола мозга, активируют и модулируют эти спинальные локомоторные сети (Hagglund et al., 2010; Jordan et al., 2008). Мультисегментная электрическая

и мультирецепторная фармакологическая стимуляция, воздействуя на специфические аспекты движения, при совместном применении оказывают

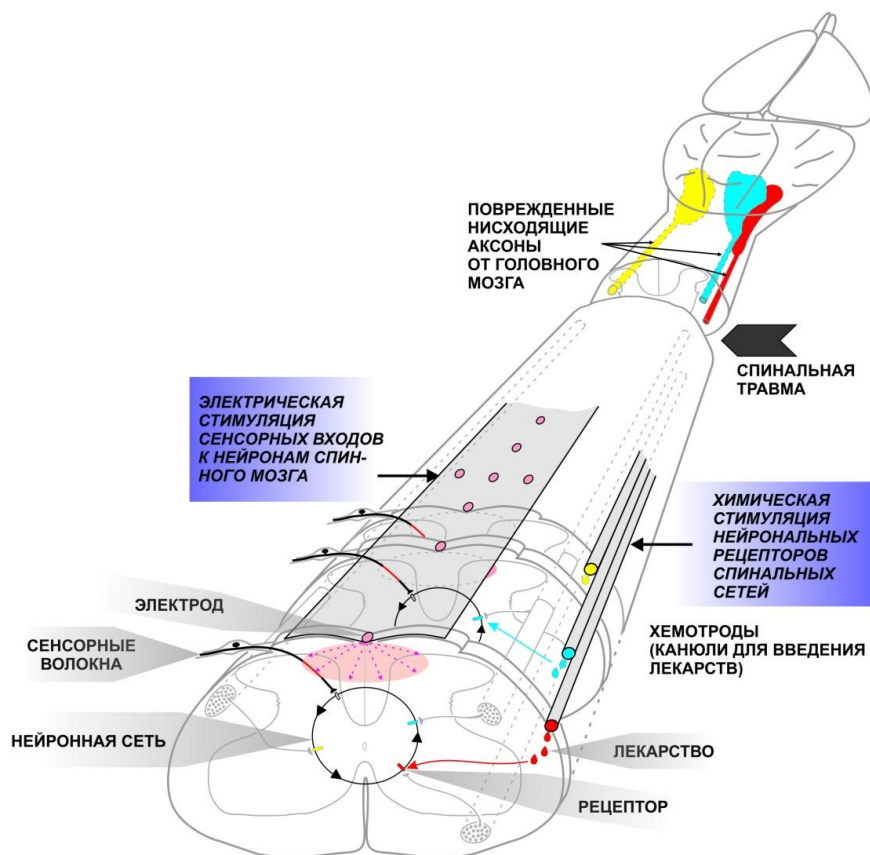


Рис. 80. Электрохимические нейропротезы.

синергичное действие и могут эффективно компенсировать утраченные активирующие и модулирующие супраспинальные команды после тяжелого повреждения спинного мозга (Courtine et al., 2009). Для применения данного подхода адресного воздействия на спинальные нейронные сети нами были созданы электрохимические спинальные нейропротезы (Larmagnac et al., 2011; Voeroes et al., 2011), представляющие из себя вживляемые биосовместимые мультиэлектродные и хемотродные интерфейсы (Рис. 80) (Fong et al., 2009; Musienko et al., 2009; Borton et al., 2014).

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 отдельного обследования и нейрореабилитации этих подфункций. Нами разработано и протестировано универсальное роботизированное устройство, 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). Благодаря этому роботизированное устройство обеспечивает контроль перемещения во фронтальной, сагиттальной, горизонтальной плоскостях и вокруг вертикальной оси, причем сила воздействия на животное по различным осям может меняться в зависимости от его собственных двигательных способностей и экспериментальной задачи.

В режиме исследования роботизированная система позволяет получить подробную характеристику локомоторных паттернов и динамического равновесия в норме, после повреждения спинного мозга (ПСМ), инсульта и других заболеваний ЦНС. В режиме активации устройство использовалось в качестве постурального нейропротеза, который активирует локомоторные способности, включая ходьбу по ровной поверхности после полного ПСМ, ходьбу по лестнице после частичного ПСМ и точное расположение лапы вскоре после инсульта. В режиме тренировки такой робототехнический нейропротез в сочетании с электрохимической стимуляцией спинного мозга способствовал восстановлению локомоции с поддержанием веса тела, контроля направления ходьбы и способностей поддержания равновесия у парализованных крыс. Тренировка в таких условиях позволяла давать дозированную нагрузку, стимулируя нейропластические процессы и

постепенно обучая нейронные сети новым задачам (Van den Brand et al., 2012).

Была обнаружена систематическая корреляция между восстановлением с помощью робота постуральной стабильности и улучшенным двигательным контролем задних конечностей. Это подчеркивает существенную роль потока постурально обусловленных афферентных входных сигналов от рецепторов растяжения и нагрузки туловища, бедра и голеностопного сустава, которые играют существенную роль в координации локомоции (Pearson, 2004). Восстановление с помощью робота сенсорной обратной связи и ее модуляции при конкретной двигательной задаче вносило существенный вклад в восстановление управления ходьбой.

Существуют данные, указывающие на то, что реабилитация должна проводиться с использованием различных наземных (Wessels et al., 2010) моделей (Musselman et al., 2011) ходьбы с надлежащими условиями поддержки (Wessels et al., 2010; Reinkensmeyer et al., 2006; Ada et al., 2010), активирующими системами (Courtine et al., 2009; Harkema et al., 2011; Kwakkel et al., 2008; Reinkensmeyer et al., 2006), соответствующими задачами сенсорных ориентиров (Courtine et al., 2009; Harkema et al., 2011) и активным участием пациента, но эти концепции оставались разрозненными. Разработанный универсальный локомоторный и постуральный нейропротез обобщает эти взгляды в единый терапевтический инструмент для исследования, оценки и восстановления двигательных функций. Данная технология и устройство имеет большой потенциал для дальнейшего исследования механизмов постуральных адаптаций при выполнении локомоторных задач разной степени сложности, поиска оптимальных реабилитационных подходов восстановления двигательных способностей животных и людей с такими нейромоторными заболеваниями как ПСМ разной степени тяжести, инсульты, паркинсонизм, дегенеративные заболевания ЦНС.

Управляемая нейропластичность

Хронический паралич и обездвиженность со временем после спинальной травмы 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 недавние исследования (Beauparlant et al., 2013), при параличе в отсутствии помощи развивается многосторонняя структурная и функциональная перестройка спинальных сетей, сопровождающаяся развитием абберантных межнейронных связей, нарушением их сенсорной иннервации, проприоспинальных проекций и рефлекторной активности. Такая ненаправленная 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).

Большое количество анатомических и функциональных изменений после повреждения спинного мозга обусловлено общим биологическим принципом – гомеостатической пластичностью, которая является сильнейшим механизмом поддержания стабильности нейронов и реконфигурации сетей и нейрональных путей после повреждения (Turrigiano et al., 1998). Но до тех пор, пока этот процесс не направлен, гомеостатическая пластичность может вести к патологической реорганизации спинальных сетей и усугублять нейрональную дисфункцию в хронической стадии после повреждения спинного мозга (van den Brand et al., 2012; Dietz, 2010).

Из сказанного выше следует, что восстановление после тяжелой вертеброспинальной травмы требует искусственного влияния, направляющего нейропластические процессы (Edgerton et al., 2001; Dietz, 2010). Наши исследования доказывают, что мультисистемная нейрореабилитация, включающая электрическую стимуляцию двух

сегментов спинного мозга (L2+S1), химическую стимуляцию нескольких моноаминовых рецепторов (5HT1A+5HT2C+5HT7) и тренировку специфических моторных задач (Courtine et al., 2009, Musienko et al., 2012) содействует полезному ремоделированию спинальных сетей парализованных крыс после повреждения спинного мозга (Рис. 81). После 9 недель таких тренировок спинальные крысы с полной комбинацией

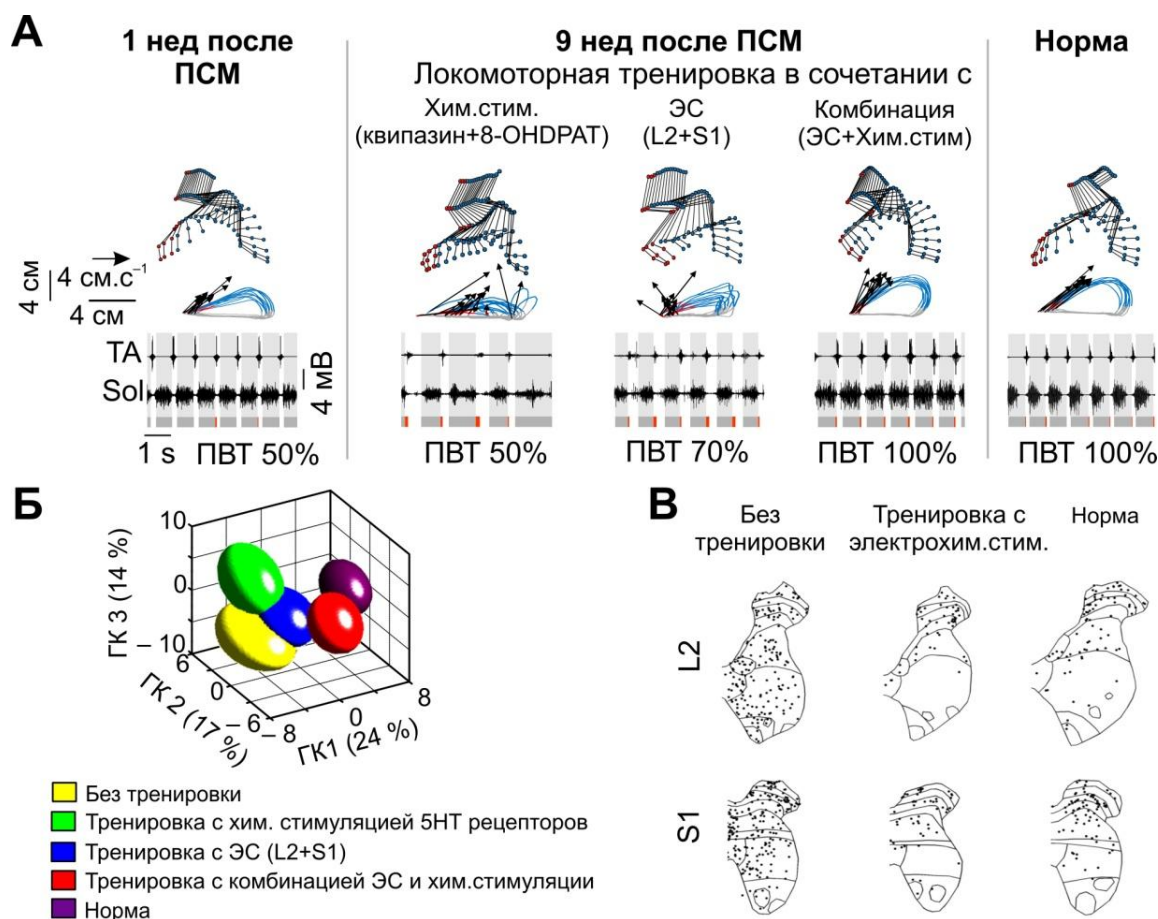


Рис. 81. Эффект мультисистемной нейрореабилитации на функциональное и структурное восстановление спинальных нейронных сетей.

стимулирующих воздействий восстанавливали значительные способности выполнять локомоцию с полной поддержкой веса тела, которая по многим характеристикам была практически неотличима от паттернов шагания тех же крыс до нанесения травмы (Рис. 81А). Крысы, тренируемые только с помощью ЭС или только с введением агонистов серотониновых рецепторов, развивали специфичные паттерны локомоции, но такое вмешательство не

смогло предотвратить деградацию функциональных способностей со временем после травмы (Рис. 81А-В). В совокупности эти результаты подтверждают, что повторяемая активация отдельных сенсомоторных сетей под влиянием тренировок и электрохимической стимуляции, позитивно воздействует и укрепляет уникальные комбинации нейронных сетей, которые оказываются активными в ходе выполнения моторных задач (Edgerton et al., 2008).

Таким образом, так же как было показано ранее на кошках (Tillakaratne et al., 2002), спинальные двигательные сети у грызунов, лишенные всякого супраспинального воздействия, способны обучаться моторным задачам, которые практикуются регулярно при тренировках. Это согласуется с концепцией “пластичности нейронных сетей при активности” (Cai et al., 2006, Edgerton et al., 2008), а также с изменениями, которые наблюдались в паттернах C-fos экспрессии после тренировок. По сравнению с нетренируемыми животными – у крыс, которым проводилась комплексная мультисистемная нейрореабилитация, было обнаружено значительное уменьшение количества C-fos положительных нейронов и более сходное с интактными крысами распределение по пластинам Рекседа в разных сегментах спинного мозга (Courtine et al., 2009; Ichiyama et al., 2008, Musienko et al., 2012) (Рис. 81В). Результаты доказывают, что комбинация локомоторных тренировок с мультикомпонентной фармакологической и электрической стимуляцией приводит к формированию у крыс новых, зависимых от активности, морфофункциональных состояний нейронных сетей. Эти факты отражают способность спинальных сетей к реобучению, и возможность активизации высокого уровня их функционального восстановления даже в отсутствии супраспинального входа.

Следующей нашей задачей было исследование возможности восстановления произвольного двигательного контроля за счет образования новых нейронных связей в обход повреждения спинного мозга (Мусиенко, 2012; Van den Brand et al., 2012). В дополнение к электрохимической

стимуляции, для тренировки нейрональных сетей был использован роботизированный постуральный нейропротез, который работал в режиме активации супраспинально опосредованных движений у крыс с тяжелым параличом. В ходе тренировок при желании и готовности выполнять данную задачу, животные могли произвольно двигаться вперед. Благодаря такой тренировке и несмотря на прерывание прямых супраспинальных проводящих путей, кора головного мозга крыс восстанавливала способность управлять локомоторной активностью задних конечностей. Как показали

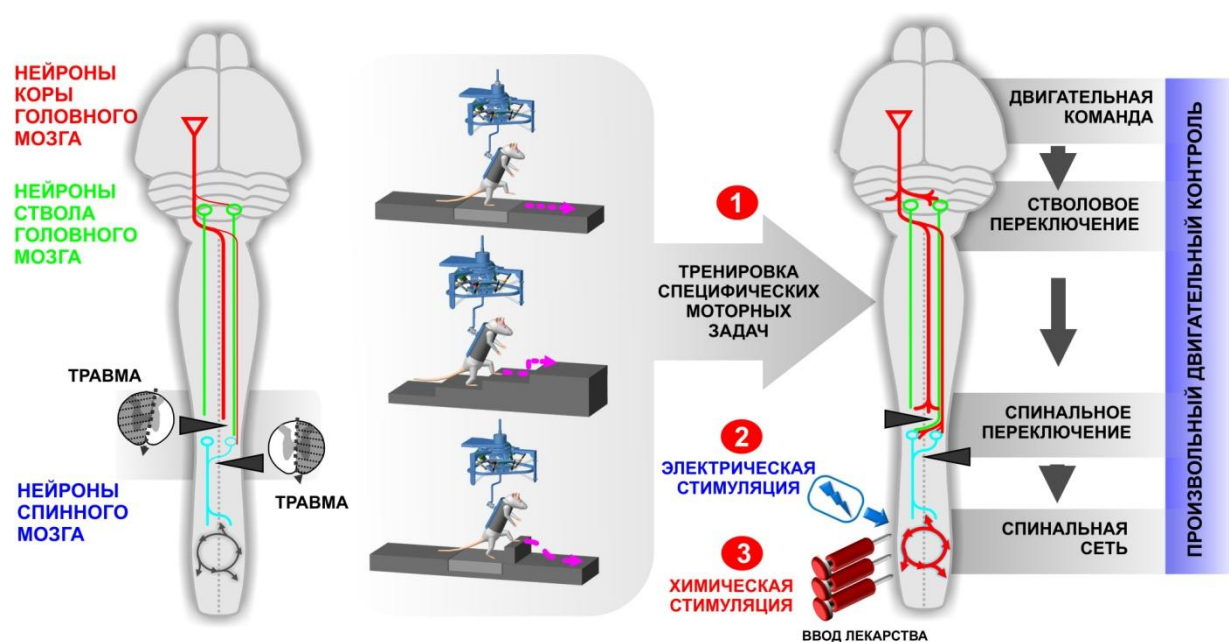


Рис. 82. Мультисистемная нейрореабилитация инициирует многоуровневые нейропластические изменения и восстанавливает произвольный двигательный контроль за счет образования новых обходных нейронных связей в спинном мозге и стволе головного мозга.

нейроморфологические исследования, восстановление произвольного контроля основывалось на глубоком ремоделировании корковых нисходящих путей, включая формирование новых спинальных и стволовых межнейронных связей для проведения супраспинальных сигналов в обход повреждения спинного мозга (Рис. 82).

То есть направленная нейропластичность, инициируемая мультисистемной нейрореабилитацией, коснулась не только спинальных

сетей, но и других отделов нервной системы, иными словами, приобрела системный многоуровневый характер. Была обнаружена многогранная анатомическая перестройка во многих двигательных областях ствола мозга: увеличение плотности кортикальных проекций в левом и правом вестибулярных ядрах, во всей ретикулярной формации и парапирамидальных областях (рис. 82, Рис. 52Н), зонах, содержащих ретикулоспинальные нейроны и серотонинергические нейроны, имеющие прямые проекции к спинальным двигательным сетям (Hägglund et al., 2010; Liu, Jordan, 2005). Разные отделы ЦНС от спинного мозга до сенсомоторной коры адаптировались к работе в условиях повреждения спинного мозга, приведшего к параплегии. Системная структурная и функциональная перестройка 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 (Рис. 82).

Заключение

Диссертационная работа показывает тесную взаимосвязь сетей спинного и головного мозга при управлении такими двигательными задачами, как выбор направления локомоторной активности, сохранение 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 сенсомоторными функциями нервной системой. Благодаря глубокой интеграции и согласованной работе различных нейронных сетей, нервная система обладает высокой пластичностью, которая играет 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 подходом управления такой нейрональной пластичностью и искусственного воздействия на нейронные сети при патологии в ходе комплексных лечебных мероприятий. Таким образом, проведенные исследования с одной стороны открывают новые пути исследования моторного поведения и лечения двигательных расстройств, а с другой - подчеркивают значимость дальнейшего изучения интегративных механизмов нейронального контроля.

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 позные 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

требуется 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анохин П.К. Очерки по физиологии функциональных систем. М.: Медицина, 1975.
2. Антипенко В.В., Горский О.В., Мусиенко П.Е. Кинематическая система отслеживания и анализа перемещения суставов для биомедицинских экспериментов // Материалы Всероссийской конференции «Нейробиология интегративных функций мозга». Санкт-Петербург. 2013. С. 13.
3. Аршавский Ю.И., Гельфанд И.М., Орловский Г.Н. Мозжечок и управление ритмическими движениями. – М.: Наука, 1984 – 137с.
4. Бабский Е.Б. Новый способ исследования устойчивости стояния человека / Е.Б. Бабский, В.С. Гурфинкель, Э.Л. Ромель // Физиологический журнал СССР. 1955. - Т. 12, № 3. - С.423-426.
5. Баев К.В., Дегтяренко А.М., Завадская Т.В. и Костюк П.Г. Активность поясничных интернейронов во время фиктивной локомоции у таламической кошки // Нейрофизиология. – 1979. – 11. – С.329-338.
6. Баев К.В. Механизмы локомоции // В кн.: Частная физиология нервной системы. – Л.: Наука, 1983. – С.171-217.
7. Баев К.В. Нейробиология локомоции. – М.: Наука, 1991.-199 с.
8. Березовский В.К. Морфологический анализ происхождения волокон локомоторной полосы спинного мозга кошки // Нейрофизиология. – 1989. – Т.21. – С.327-335.
9. Бернштейн Н.А. О построении движений. – М.: Наука, 1947. – 281с.
10. Бернштейн Н. А. Очерки о физиологии движений и физиологии активности. — М., 1966.
11. 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.
12. Будакова Н.Н. Шагательные движения, вызываемые у мезенцефалической кошки ритмическим раздражением дорсального корешка // Физиол. журн. СССР. – 1971. – Т.57. – №11. – С.1632-1640.
13. Будакова Н.Н. Шагательные движения спинальной кошки после инъекции ДОФА // Физиол. журн. СССР. – 1973. – Т.59. – №8. – С.1190-1198.
14. Герасименко Ю. П., Макаровский А.Н., Никитин О.А. Управление локомоторной активностью человека и животных в условиях отсутствия супраспинальных влияний // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2000. – 86. – С.1502-1511.
15. Герасименко Ю.П., Авелев В.Д., Никитин О.А., Лавров И.А. Инициация локомоторной активности спинализированных кошек при эпидуральной стимуляции спинного мозга // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2001. – 87. – С.1164-1170.
16. Герасименко Ю.П.. Генераторы шагательных движений человека: спинальные механизмы их активации // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2002. – Т.36. – №3. – С.14-24.
17. Герасименко Ю.П., Лавров И.А., Богачева И.Н., Щербакова Н.А., Кучер В.И., Мусиенко П.Е. Особенности формирования локомоторных паттернов у децеребрированной кошки при эпидуральной стимуляции спинного мозга // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2003. – 89. – С.1046-1057.
18. Герасименко Ю.П., Мусиенко П.Е., Мошонкина Т.Р., Эджерстон Р.В. Роль серотонинэргической системы в регуляции спинальной локомоции // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. – 2012. – № 25. – С.7-18.
19. Горский О.В., Антипенко В.В., Килимник В.А., Герасименко Ю.П., Куртин Г., Мусиенко П.Е. Исследование биоинженерных подходов

- восстановления функций спинного мозга. Материалы Всероссийской конференции «Актуальные вопросы биомедицинской инженерии». Ростов-на-Дону. 2012. с. 34.
20. Гурфинкель В.С., Коц Я.М., Шик М.Л. Регуляция позы человека. – М.: Наука, 1965.– 256 с.
21. Гурфинкель Е.В. Механический анализ методики стабилографии // Бюлл. экол.биол. – 1974. – Т.1,N5. – С.122-124.
22. Гурфинкель В.С., Левик Ю.С., Лебедев М.А. Концепция схемы тела и моторный контроль. Схема тела в управлении позными автоматизмами // Сб. «Интеллектуальные процессы и их моделирование. Пространственно-временная организация» Ред. А.В. Чернавский, М. Наука, 1991, С. 24 – 53.
23. Гурфинкель В.С., Левик Ю.С. Система внутреннего представления и управление движениями // Вестн. РАН.– 1995.– Т. 65, № 1.– С. 29–32.
24. Гурфинкель В.С., Бабакова И.А. Точность поддержания положения проекции общего центра массы человека при стоянии // Физиология человека. – 1995. – Т.21 – №1. - С.65-74.
25. Гурфинкель В.С., Левик Ю.С., Казенников О.В., Селионов В.А.. Существует ли генератор шагательных движений у человека? // Физиология человека. – 1998. – Т.24. - №3. – С.42-50.
26. Гурфинкель В. С., Левик Ю. С. Мышечная рецепция и обобщенное описание положения тела //Физиология человека. – 1999. – Т. 25. – №. 1. – С. 87-97.
27. Козловская И.Б. Афферентный контроль произвольных движений. – М.: Наука, 1976. – 293с.
28. Козловская И. Б. Гравитационные механизмы в двигательной системе // Современный курс классической физиологии/под ред. Ю.В. Наточина и В.А. Ткачука.-СПб: Изд-во ГЭОТАР-Медиа. – 2007. – С. 115-135.
29. Костюк П.Г., Скибо Г.Г. Структурная характеристика связей медиальных нисходящих систем с нейронами спинного мозга. // Нейрофизиология. – 1972. – Т.4. – №6. – С.579-586.

30. Костюк П. Г. Интегративные процессы в спинном мозге. // В кн.: Частная физиология нервной системы. – Л.: Наука, 1983. – С.5-60.
31. Коц Я.М. Организация произвольного движения. Нейрофизиологические механизмы. – М. Наука, 1975. – 248с.
32. 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.
33. Мусиенко П.Е., Богачева И.Н., Герасименко Ю.П. Значение периферической обратной связи в генерации шагательных движений при эпидуральной стимуляции спинного мозга // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. –2005 - Т.95 - №12 – С.1407-1420.
34. 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.
35. Мусиенко П.Е. Шаг в обход: электрохимические протезы - против паралича. // Наука и жизнь – 2012 - №12 – С. 42-47.
36. Мусиенко П.Е., Горский О.В., Килимник В.А., Козловская И.Б., Courtine G., Edgerton V.R., Герасименко Ю.П. Регуляция позы и локомоции у децеребрированных и спинализированных животных // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. – 2013а – Т.99 – №3 – С. 392-405.
37. 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. – 2013б. – Т. 99, № 8. – С.917-927.

38. Несмеянова Т.Н. Стимуляция восстановительных процессов при травме спинного мозга. – М.: Наука, 1971.
39. Иоффе М. Е. Механизмы двигательного обучения. – Наука, 1991.
40. Орловский Г.Н. Спонтанная и вызванная локомоция таламической кошки // Биофизика. – 1969. – Т.14. – С.1095-1102.
41. Орловский Г.Н. Связи ретикулоспинальных нейронов с “локомоторной полоской ” ствола мозга // Биофизика. – 1970. –Т.15. – С.171-177.
42. Орловский Г.Н., Фельдман А.Г. Классификация нейронов пояснично-крестцового отдела в соответствии с их разрядом при вызванной локомоции // Нейрофизиология. – 1972а. – Т.4. – №4. – С.410-417.
43. Орловский Г.Н., Фельдман А.Г. О роли афферентации в генерации шагательных движений // Нейрофизиология. – 1972б. – Т.4. – №4. – С.401-409.
44. Персон Р.С. Спинальные механизмы управления мышечным сокращением. М.: Наука, 1985. – 184с.
45. Сафьянц В.И. Билатеральная интегративная деятельность спинного мозга. – Л.: Наука, 1976.
46. Сеченов И.М. Физиология нервных центров. – М.: Изд-во АМН СССР, 1952. – С.236. (Из лекций, чит. в Собрании врачей в Москве в 1889-1890 гг.)
47. Цетлин М.Л. Исследования по теории автоматов и моделированию биологических систем. – М.: Наука, 1969.
48. Шаповалов А.И., Курчавый Г.Г., Строганова М.П. Синаптические механизмы вестибуло-спинальных влияний на мотонейроны. // Физиол. журн. – 1966. – 52. – С.1401-1409.
49. Шаповалов А.И., Грантынь А.А., Курчавый Г.Г. Коротколатентные ретикулоспинальные синаптические проекции на альфа мотонейроны. // Бюлл. exper. биол и мед. – 1967. – 7. – С.3-9.

50. Шаповалова К.Б., Якунин И. В., Бойко М. И. Участие головки хвостатого ядра в механизмах условно-рефлекторной перестройки позы // Журн. высш. нервн. деят. – 1984. – Т. 34. – №. 4. – С. 669-677.
51. Шик М.Л., Северин Ф.В., Орловский Г.Н. Управление ходьбой и бегом посредством электрической стимуляции среднего мозга // Биофизика. – 1966а. – 11. – С.659-666.
52. Шик М.Л., Орловский Г.Н., Северин Ф.В. Организация локомоторной синергии // Биофизика. – 1966б. – 11. – С.879-886.
53. Шик М.Л., Орловский Г.Н., Северин Ф.В. Локомоция мезенцефалической кошки вызываемая стимуляцией пирамид. // Биофизика. – 1968. – 13. – С.127-135.
54. Шик М.Л. Управление наземной локомоцией млекопитающих животных // В кн.: Физиология движения. – Л. Наука, 1976. – С.234-275.
55. Шик М.Л., Ягодницын А.С. Понтобульбарная “локомоторная полоска” // Нейрофизиология. – 1977. – Т.9. - №1. – С.95-97.
56. Шик М.Л. Локомоторная область мозгового ствола и гипотеза о «локомоторной колонне» // Успехи физиол. наук. – 1985. – 16. – С.76-95.
57. Ada, L., Dean, C.M., Vargas, J. & Ennis, S. Mechanically assisted walking with body weight support results in more independent walking than assisted overground walking in non-ambulatory patients early after stroke: a systematic review // J. Physiother. – 2010 – Vol.56 – P.153–161.
58. Agnati LF, Fuxe K. Volume transmission as a key feature of information handling in the central nervous system possible new interpretative value of the Turing’s B-type machine // Prog Brain Res – 2000 – Vol. 125 – P.3–19.
59. Agnati LF, Guidolin D, Guescini M, Genedani S, Fuxe K. Understanding wiring and volume transmission. // Brain Res Rev – 2010. – Vol. 64 – P.137-159.
60. Alto, L. T., Havton, L. A., Conner, J. M., Hollis II, E. R., Blesch, A., & Tuszynski, M. H. Chemotropic guidance facilitates axonal regeneration and

- synapse formation after spinal cord injury // *Nature neuroscience* – 2009. - Vol.12 - №9 – P. 1106-1113.
61. Afelt Z. Reflex activity in chronic spinal cats // *Acta Neurobiol. Exp.* - 1970. – Vol.30. – P.129-144.
 62. Anden N.E., Jukes M.G., Lundberg A. The effect of dopa on the spinal cord. 2. A pharmacological analysis // *Acta Physiol. Scand.* – 1966. – Vol.67. – P.387-397.
 63. Anderson O., Grillner S. Periferal control of the cat's step cycle. I. Phase dependent effects of ramp-movements of the hip during “fictive locomotion” // *Acta Physiol. Scand.* – 1981. – 113. – P.89-101.
 64. Antri M, Mouffle C, Orsal D, Barthe JY. 5-HT_{1A} receptors are involved in short- and long-term processes responsible for 5-HT-induced locomotor function recovery in chronic spinal rat // *Eur J Neurosci* – 2003. – Vol.18 – P.1963–1972.
 65. Armstrong D.M. Supraspinal contributions to initiation and control of locomotion in the cat // *Progr. Neurobiol.* – 1986. – Vol.26. – P.273-361.
 66. Arshavsky Y.I., Gelfand I.M. and Orlovsky G.N. The cerebellum and control of rhythmical movements // *Trends Neurosci.* – 1983 – Vol. 6. – P. 417-422.
 67. Arshavsky Y.I., Beloozerova I.N., Orlovsky G.N., Panchin Y.V., Pavlova G.A. Control of locomotion in marine mollusk *Clione limacina*. II. Rhythmic neurons of pedal ganglia // *Exper.Brain Res.* – 1985. – Vol.58. – P.263-272.
 68. Asanome M., Matsuyama K., Mori S. Augmentation of postural muscle tone induced by the stimulation of the descending fibers in the midline area of the cerebellar white matter in the acute decerebrate cat // *Neuroscience research.* – 1998. – Vol. 30. – №. 3. – P. 257-269.
 69. Anderson O., Grillner S. Periferal control of the cat's step cycle. I. Phase dependent effects of ramp-movements of the hip during “fictive locomotion” // *Acta Physiol. Scand.* – 1981. – Vol.113. – P.89-101.

70. Ayers JL, Clarac F. Neuromuscular strategies underlying different behavioral acts in a multi-functional crustacean leg joint // J Comp Physiol – 1978. – Vol. 128 – P.81–94.
71. Baev K.V. Central locomotor program for the cat's hindlimb // Neuroscience. – 1978. – Vol. 3. – P.1081-1092.
72. Baev K.V. Polarization of primary afferent terminals in the lumbar spinal cord during fictitious locomotion // Neurophysiol. – 1980. – Vol.12. – P.305-311.
73. Baev K.V., Beresovskii V.K., Kebkalo T.G. and Savoskina L.A. Afferent and efferent connections of brainstem locomotor regions study by means of horseradish peroxidase transport technique // Neuroscience. – 1988. – Vol.26. – P. 871-892.
74. Baev K.V., Shimansky. Principles of organization of neural systems controlling automatic movements in animals // Progress in Neurobiology. 1992. – Vol.39. – P.45-112.
75. Barbeau H, Rossignol S. Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. // Brain Res – 1987. – Vol.412 – P.84–95.
76. Barbeau H & Rossignol S. The effects of serotonergic drugs on the locomotor pattern and on cutaneous reflexes of the adult chronic spinal cat // Brain Res – 1990. – Vol. 514 – P. 55-67.
77. Barbeau H, Rossignol S. Initiation and modulation of the locomotor pattern in the adult chronic spinal cat by noradrenergic, serotonergic and dopaminergic drugs // Brain Res – 1991. – Vol. 546 – P.250-260.
78. Barbeau, H., Ladouceur, M., Norman, K.E., Pepin, A., Leroux, A.. Walking after spinal cord injury: evaluation, treatment, and functional recovery // Arch. Phys. Med. Rehabil. – 1999. – Vol.80 – P. 225–235
79. Barberini CL, Macpherson JM. Effect of head position on postural orientation and equilibrium // Exp Brain Res – 1998. – Vol. 122 –P. 175–184.

80. Bard P, Macht MB. The behavior of chronically decerebrate cats. In: Wolstenholme GEW, O'Connor CM, editors. Neurological basis of behavior. London: Churchill; 1958. p. 55–71.
81. Bareyre, F. M., Kerschensteiner, M., Raineteau, O., Mettenleiter, T. C., Weinmann, O., & Schwab, M. E. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats // Nature neuroscience – 2004. – Vol.7 – №3 – P.269-277.
82. Bässler U. Neuronal basis of elementary behavior in stick insects. – Springer.: Berlin, 1983.
83. Bässler U. Afferent control of walking movements in stick insect *Cuniculina impigra*. II. Reflex reversal and the release of the swing phase in the restrained foreleg // J. Comp. Physiol. – 1986. – Vol.158. – P.351-362.
84. Basso, D.M. et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Stud // J. Neurotrauma – 1996. – Vol.13 – P. 343–359.
85. Batueva, I., Tsvetkov, E., Sagatelyan, A., Buchanan, J. T., Vesselkin, N., Adanina, E. Suderevskaya, J.-P Rio, J Repérant. Physiological and morphological correlates of presynaptic inhibition in primary afferents of the lamprey spinal cord //Neuroscience. – 1999. – Vol. 88. – №. 3. – P. 975-987.
86. Beloozerova IN, Zelenin PV, Popova LB, Orlovsky GN, Grillner S, Deliagina TG. Postural control in the rabbit maintaining balance on the tilting platform // J Neurophysiol. – 2003a. – Vol.90. – P.3783–3793.
87. 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.
88. Beloozerova IN, Sirota MG, Swadlow H, Orlovsky GN, Popova LB, Deliagina TG. Activity of different classes of neurons in the motor cortex during postural corrections // J Neurosci. – 2003b. - Vol.23. – P.7844–7853.

89. Beloozerova IN, Sirota MG, Swadlow HA. Activity of different classes of neurons of the motor cortex during locomotion //J Neurosci. – 2003c. – Vol. 23. – P.1087–97.
90. Beloozerova IN, Sirota MG, Orlovsky GN, Deliagina TG. Activity of pyramidal tract neurons in the cat during postural corrections //J Neurophysiol. – 2005. – Vol. 93. – P.1831–1844.
91. Bernstein N. The Co-ordination and Regulation of Movements. Oxford, UK: Pergamon, 1967.
92. Barthe'lemy D, Leblond H, Rossignol S. Characteristics of mechanisms of locomotion induced by intraspinal microstimulation and dorsal root stimulation in spinal cats //J Neurophysiol. – 2007. – Vol. 97. – P.1986 –2000.
93. Berthoz A, Pozzo T. Intermittent head stabilization during postural and locomotory tasks in humans. In: Posture and Gait: Development, Adaptation and Modulation, edited by Amblard B, Berthoz A, Clarac F. Amsterdam: Excerpta Medica, 1988, p. 189–198.
94. Bizzi, E., Cheung, V. C. K., d'Avella, A., Saltiel, P., & Tresch, M. Combining modules for movement //Brain Research Reviews – 2008. – Vol. 57. – №1 – P.125-133.
95. Bolton DA, Misiaszek JE. Contribution of hindpaw cutaneous inputs to the control of lateral stability during walking in the cat //J Neurophysiol. – 2009. – Vol.102. – P. 1711–1724.
96. 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.
97. Bouyer L. and Rossignol S. The contribution of cutaneous inputs to locomotion in the intact and the spinal cat // In: O. Kiehn, R.M. Harris-Warrick, L.M. Jordan, H. Hultborn and N. Kudo (Eds.), Neuronal Mechanisms for Generating Locomotor Activity. – Annals of the New York Academy of Sciences, New York, 1998. – P.508-512.

98. Bouyer, L. and Rossignol, S. Spinal cord plasticity associated with locomotor compensation to peripheral nerve lesions in the cat // In: M.M. Patterson, J.W. Grau, J.R. Wolpaw, W.D.J. Willis and V.R. Edgerton (Eds.), Spinal Cord Plasticity: Alterations in Reflex Function. – Academic Publishers, New York, 2001. – P.207-224.
99. Boyle R. Vestibular control of reflex and voluntary head movement // Ann NY Acad Sci 942: 364–380, 2001.
100. Bracci, E., Ballerini, L., & Nistri, A. Localization of rhythmogenic networks responsible for spontaneous bursts induced by strychnine and bicuculline in the rat isolated spinal cord // The Journal of neuroscience – 1996. – Vol.16. - Vol.21. – P.7063-7076.
101. Brösamle C., Schwab M. E., Cells of origin, course, and termination patterns of the ventral, uncrossed component of the mature rat corticospinal tract //J. Comp. Neurol. – 1997. – Vol.386. – P.293.
102. Brown T.G. Intrinsic factors in the act of progression in the mammal // Proc. R. Soc Lond. B. – 1911. – Vol.84. – P.308-319.
103. Brown T.G. The phenomenon of “narcosis progression” in mammals. // Proc. R. Soc. Ser. B. – 1913. – 86. – P.140-164.
104. Brown T.G. On the nature of the fundamental activity of the nervous centres; together with an analysis of the conditioning of rhythmic activity in progression, and a theory of the evolution of function nervous system. // J. Physiol. Lond. – 1914. – Vol.48. – P.18-46.
105. Buford JA, Smith JL. Adaptive control for backward quadrupedal walking. II. Hindlimb muscle synergies // J Neurophysiol. – 1990. – Vol. 64. – P.756 – 766.
106. Buford JA, Zernicke RF, Smith JL. Adaptive control for backward quadrupedal walking. I. Posture and hindlimb kinematics // J Neurophysiol. – 1990. – Vol.64. – P.745–755.

107. Butt S. J. B., Kiehn O. Functional identification of interneurons responsible for left-right coordination of hindlimbs in mammals // *Neuron*. – 2003. – Vol.38. – №. 6. – P. 953-963.
108. Cai, L.L., Courtine, G., Fong, A.J., Burdick, J.W., Roy, R.R., Edgerton, V.R. Plasticity of functional connectivity in the adult spinal cord // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol.Sci.* – 2006. – Vol.361. – P.1635–1646.
109. Calancie, B., Alexeeva, N., Broton, J.G., Molano, M.R. Interlimb reflex activity after spinal cord injury in man: strengthening response patterns are consistent with ongoing synaptic plasticity // *Clin. Neurophysiol.* – 2005. – Vol.116. – P.75–86.
110. 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.
111. Carhart MR, He J, Herman R, D'Luzansky S, Willis WT. Epidural spinal-cord stimulation facilitates recovery of functional walking following incomplete spinal-cord injury // *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng.* – 2004. – Vol.12. – P.32– 42.
112. Carlson H, Halbertsma J & Zomlefer M. Control of the trunk during walking in the cat // *Acta Physiol Scan.* – 1979. – Vol.105. – P.251-253.
113. Carmel J. B., Berrol L. J., Brus-Ramer M., Martin J. H., Chronic electrical stimulation of the intact corticospinal system after unilateral injury restores skilled locomotor control and promotes spinal axon outgrowth // *J. Neurosci.* – 2010. - Vol.30. - P. 109.
114. Cazalets J.R., Grillner P., Menard I., Cremieux J. and Clarac F. Two types of motor rhythm induced by NMDA and amines in an in vitro spinal cord preparation. // *Neurosci. Lett.* – 1990. – Vol.108. – P.81-87.
115. Cazalets J.R., Sqalli-Houssaini Y. and Clarac F. Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1992. – Vol.455. – P.187-204.

116. Cazalets J.R., Sqalli-Houssaini Y. and Clarac F. GABA-ergic inactivation of the central pattern generators for locomotion in isolated neonatal rat spinal cord. // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1994. – 447. – P.173-181.
117. Cazalets J.R. Organization of the spinal locomotor network in neonatal rat. // In.: Kalb RG, Strittmater SM, editors. *Neurobiology of spinal cord injury*. – Totowa (NJ): Humana Press, 2000. – P.89–111.
118. Chau C, Barbeau H, Rossignol S. Early locomotor training with clonidine in spinal cats // *J Neurophysiol*. – 1998a. – Vol.79 – P.392– 409.
119. Chau C, Barbeau H, Rossignol S. Effects of intrathecal alpha1- and alpha2-noradrenergic agonists and norepinephrine on locomotion in chronic spinal cats // *J Neurophysiol*. – 1998b. – Vol.79. – P.2941–2963.
120. Chvatal SA, Torres-Oviedo G, Safavynia SA, Ting LH. Common muscle synergies for control of center of mass and force in nonstepping and stepping postural behaviors // *J Neurophysiol*. – 2011. – Vol.79. – Vol.106. – P.999 – 1015.
121. Colgate, E. & Hogan, N. An analysis of contact instability in terms of passive physical equivalents // In *Proceedings of the IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA)* – 1989. – P.404-409.
122. Courtine G, Roy RR, Raven J, Hodgson J, McKay H, Yang H, Zhong H, Tuszynski MH, Edgerton VR. Performance of locomotion and foot grasping following a unilateral thoracic corticospinal tract lesion in monkeys (*Macaca mulatta*) // *Brain*. – 2005. – Vol.128. – P.2338-2358.
123. Cowley K. C., Zaporozhets E., Schmidt B. J. Propriospinal neurons are sufficient for bulbospinal transmission of the locomotor command signal in the neonatal rat spinal cord // *The Journal of physiology*. – 2008. – Vol. 586. – №. 6. – P. 1623-1635.
124. Courtine G., Bunge M. B., Fawcett J. W., Grossman R. G., Kaas J. H., Lemon R., Maier I., Martin J., Nudo R. J., Ramon-Cueto A., Rouiller E.M., Schnell L., Wannier T., Schwab M. E., and Edgerton V. R. Can experiments in

- nonhuman primates expedite the translation of treatments for spinal cord injury in humans? // *Nature Med.* – 2007. - Vol.13. - №5. – P.561–566.
125. Courtine G, Song B, Roy RR, Zhong H, Herrmann JE, Ao Y, Qi J, Edgerton VR, Sofroniew MV. Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury // *Nat Med.* – 2008. - Vol.14. – P.69 –74.
126. Courtine G, Gerasimenko Y, van den Brand R, Yew A, Musienko P, Zhong H, Song B, Ao Y, Ichiyama RM, Lavrov I, Roy RR, Sofroniew MV, Edgerton VR. Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input // *Nat Neurosci.* – 2009. – Vol.12. – P.1333–1342.
- 127.
128. Courtine G, van den Brand R, Musienko P. Spinal cord injury: time to move // *Lancet.* – 2011 – Vol.377. - №9781. – P.1896-8.
129. Creed R., Denny-Brown D., Eccles J., Liddell E., Sherrington C. Reflex activity of the spinal cord. – Oxford, 1932.
130. DeForge D, Nymark, J., Lemaire, E., Gardner, S., Hunt, M., Martel, L., Curran, D., and Barbeau, H. Effect of 4-aminopyridine on gait in ambulatory spinal cord injuries: a double-blind, placebo-controlled, crossover trial // *Spinal Cord.* – 2004. – Vol. 42. – №. 12. – P. 674-685.
131. De Leon, R.D., Hodgson, J.A., Roy, R.R., Edgerton, V.R. Full weight-bearing hindlimb standing following stand training in the adult spinal cat // *J. Neurophysiol.* – 1998a. – Vol.80. – P. 83–91.
132. De Leon R.D., Hodgson J.A., Roy R.R. and Edgerton V.R. Locomotor capacity attributable to step training versus spontaneous recovery after spinalisation in adult cats // *J. Neurophysiol.* – 1998b. – Vol.79. – P.1329–1340.
133. De Leon R.D., London N.J., Roy R.R. and Edgerton V.R., Failure analysis of stepping in adult spinal cats. // *Prog. Brain. Res.* – 1999a. – Vol.123. – P.341–348.

134. De Leon R.D., Hodgson J.A., Roy R.R. and Edgerton V.R. Retention of hindlimb stepping ability in adult spinal cats after the cessation of step training. // J. Neurophysiol. – 1999b. – Vol.81. – P.85–94.
135. De Leon R.D., Tamaki H., Hodgson J.A., Roy R.R. and Edgerton V.R., Hindlimb locomotor and postural training modulates glycinergic inhibition in the spinal cord of the adult spinal cat // J. Neurophysiol. – 1999c. – Vol.82. – P.359–369.
136. Deliagina T.G., Feldman A.G., Gelfand I.M. and Orlovsky G.N. On the role of central program and afferent inflow in the control of scratching movements in the cat // Brain Res. – 1975. – Vol.100. – P.297-313.
137. Deliagina T.G., Orlovsky G.N., Pavlova G.A. The capacity for generation of rhythmic oscillations is distributed in the lumbosacral spinal cord of the cat. // Exp. Brain Res. – 1983. – Vol.53. – P.81–90.
138. Deliagina TG, Popova LB, Grant G. The role of tonic vestibular input for postural control in rats // Arch Ital Biol. – 1997. – Vol.135. – P.239 –261.
139. Deliagina TG, Arshavsky YI, Orlovsky GN. Control of spatial orientation in a mollusc // Nature. – 1998. – Vol.393. - №6681. – P.172-175.
140. Deliagina TG, Fagerstedt P. Responses of reticulospinal neurons in intact lamprey to vestibular and visual inputs. // J Neurophysiol. – 2000. – Vol.83. - №2. – P.864-78.
141. Deliagina TG, Beloozerova IN, Popova LB, Sirota MG, Swadlow H, Grant G, Orlovsky GN. Role of different sensory inputs for maintenance of body posture in sitting rat and rabbit // Motor Control. – 2000. – Vol.4. – P.439–452.
142. Deliagina T. G., Orlovsky G. N. Comparative neurobiology of postural control //Current opinion in neurobiology. – 2002. – Vol.12. – №. 6. – P.6.
143. Deliagina TG, Orlovsky GN, Zelenin PV, Beloozerova IN. Neural bases of postural control // Physiology. – 2006a. – Vol.21. – P.216–225.

144. Deliagina TG, Sirota MG, Zelenin PV, Orlovsky GN, Beloozerova IN. Interlimb postural coordination in the standing cat // J Physiol. – 2006b. – Vol.573. – P.211–224.
145. Deliagina TG, Beloozerova IN, Zelenin PV, Orlovsky GN. Spinal and supraspinal postural networks // Brain Res Rev. – 2008. – Vol. 57. – P.212–221.
146. Deliagina TG, Zelenin PV & Orlovsky GN. Physiological and circuit mechanisms of postural control // Current Opin Neurobiol. – 2012. – Vol.22. – P.646-652.
147. Deliagina TG, Musienko PE, Zelenin PV, Lyalka VF, Orlovsky GN, Gerasimenko YP. Spinal and supraspinal control of the direction of stepping during locomotion // Soc Neurosci Abstr. – 2012. – 38:577.27.
148. Delivet-Mongrain H, Leblond H, Rossignol S. Effects of localized intraspinal injections of a noradrenergic blocker on locomotion of high decerebrate cats // J Neurophysiol. – 2008. – Vol.100. – P.907–921.
149. DiiCaprio R., Clarak F. Reversal of a walking reflex elicited by a muscle receptor. // J. Exp. Biol. – 1981 – 90. – P.197-203.
150. Diener, H. C., & Dichgans, J. On the role of vestibular, visual and somatosensory information for dynamic postural control in humans // Prog Brain Res. – 1988. – Vol.76. – P.253-262.
151. Diener H. C., Dichgans J. Pathophysiology of cerebellar ataxia //Movement disorders. – 1992. – Vol. 7. – №. 2. – P. 95-109.
152. Dietz V, Berger W, Horstmann GA. Posture in Parkinson's disease: impairment of reflexes and programming. // Ann Neurol. – 1988. – Vol.24. - №5. – P.660-9.
153. Dietz V, Colombo G, Jensen L, Baumgartner L. Locomotor capacity of spinal cord in paraplegic patients // Ann Neurol. – 1995. – Vol.37. – P.574 – 582.
154. Dietz V. and Harkema S. J. Locomotor activity in spinal cord-injured persons // J. Appl. Physiol. – 2004. – Vol.96. – №5. – P.1954–1960.

155. Dietz V, Grillner S, Trepp A, Hubli M, Bolliger M. Changes in spinal reflex and locomotor activity after a complete spinal cord injury: a common mechanism? // *Brain*. – 2009. – Vol.132. – P.2196–2205.
156. Di Fabio RP, Gerleman D, Soderberg GL, Melnick ME. An adaptable, multiple plate dynamometer and electromyograph for the study of quadruped postural responses // *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. – 1982. – Vol.54. – P.235–236.
157. Dimitrijevic M, Gerasimenko Y, Pinter M. Evidence for a spinal central pattern generator in humans // *Ann NY Acad Sci*. – 1998. – Vol.860 – P.360–376.
158. Domingo A, Al-Yahya AA, Asiri Y, Eng JJ, & Lam. A systematic review of the effects of pharmacological agents on walking function in people with spinal cord injury // *Journal of neurotrauma*. – 2012. – Vol.29. – №.5. – P.865–879.
159. Ditunno JF, Little JW, Tessler A, Burns AS. Spinal shock revisited: a four-phase model // *Spinal Cord*. – 2004. – Vol.42. – P.383–395.
160. Dobkin BH, Harkema S, Raquejo P, Edgerton VR. Modulation of locomotor-like EMG activity in subjects with complete and incomplete spinal cord injury // *Journal of neurologic rehabilitation*. – 1994. – Vol.9. – №.4. – P.183–190.
161. 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.
162. Drew, T., Andujar, J.E., Lajoie, K. & Yakovenko, S. Cortical mechanisms involved in visuomotor coordination during precision walking // *Brain Res. Rev.* – 2008. – Vol.57. – P.199–211.
163. Dubuc R, Brocard F, Antri M, Fénelon K, Gariépy JF, Smetana R, Ménard A, Le Ray D, Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Sirota MG, Derjean D, St-Pierre

- M, Zielinski B, Auclair F, Veilleux D. Initiation of locomotion in lampreys. // Brain Res Rev. – 2008. – Vol.57. – №1. – P.172-82. Review.
164. Duenas S.H., Rudomin P. Excitability changes of ankle extensor group Ia and Ib fibers during fictive locomotion in the cat. // Exp. Brain Res. – 1988. – 70. – P.15-25.
165. Duenas S.H., Loeb G.E. and Marks W.B. Monosynaptics and dorsal root reflexes during locomotion in normal and thalamic cats // J. Neurophysiol. – 1990. – Vol.63. – P.1467-1476.
166. Duysens J. and Pearson K.G. The role of cutaneous afferents from the distal hindlimb in the regulation of the step cycle of thalamic cats // Exp. Brain Res. – 1976. – Vol.24. – P.245-255.
167. Duysens J. Reflex control of locomotion as revealed by stimulation of cutaneous afferents in spontaneously walking premammillary cats // J. Neurophysiol. – 1977. – Vol.40. – №4. – P.737-751.
168. Duysens J., Pearson K. G. Role of skin and muscle afferents in the control of locomotion // Proc. Intern. Union Physiol. sci 27th Intern. Congr., symp. “Neurophysiological mechanisms of locomotion”, Paris, 1977.
169. Duysens J., Stein R.B. Reflexes induced by nerve stimulation in walking cats with implanted nerve cuff electrodes // Exp. Brain. Res. – 1978. – Vol.32. – P.213-224.
170. Duysens J.D., Pearson K.G. Inhibition of flexor burst generation by loading ankle extensor muscles in walking cats. // Brain Res. – 1980. – Vol.187. – N.2. – P.321-332.
171. Duysens J, Clarac F, Cruse H. Load-regulating mechanisms in gait and posture: comparative aspects // Physiol Rev. – 2000. – Vol.80. – P.83–133.
172. Duschau-Wicke, A., Caprez, A. & Riener, R. Patient-cooperative control increases active participation of individuals with SCI during robot-aided gait training // J. Neuroeng. Rehabil. – 2010. – Vol.7. – P.43.
173. Eccles J.C. The neurophysiological basis of mind. – Oxford.: Clarendon Press, 1953.

174. Edgerton V.R., Grillner S., Sjostrom A. On the spinal stepping generator // Soc. Neurosci. Abstr. – 1975. – Vol.1. – P.615.
175. Edgerton V.R., Grillner S., Sjostrom A., Zangger P. Central generation of locomotion in Vertebrates. // Neural control of locomotion. New York. (Adv.in behav.biol. Vol.18) – 1976. – 439-464.
176. Edgerton V.R., Johnson D.J., Smith L.A., Murphy K., Eldred A., Smith J.L. Effects of treadmill exercises on hindlimb muscles of the spinal cat // In: Kao C.C., Bunge R.P., Reier P.J., editors. Spinal cord reconstruction. – New York: Raven., 1983. – P.435–44.
177. Edgerton V.R., de Guzman C.P., Gregor R.J., Roy R.R., Hodgson J.A., Lovely R.G. Trainability of the spinal cord to generate hindlimb stepping patterns in adult spinalized cats // In: Neurobiological basis of human locomotion. Eds. M. Shimamura, S. Grillner and V.R. Edgerton. – Japan Scientific Societies Press.Tokyo, 1991. – P.411-423.
178. Edgerton V.R. et al. Use-dependent plasticity in spinal stepping and standing // In: Advances in Neurology: Neuronal Regeneration. Reorganization and Repair. Seil E.J. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. PA. 1997. – Vol.72. – P.233-247.
179. Edgerton VR, de Leon RD, Harkema SJ, Hodgson JA, London N, Reinkensmeyer DJ, Roy RR, Talmadge RJ, Tillakaratne NJ, Timoszyk W, Tobin A. Retraining the injured spinal cord // J Physiol. – 2001. – Vol.533. – P.15–22.
180. Edgerton VR, Courtine G, Gerasimenko YP, Lavrov I, Ichiyama RM, Fong AJ, Cai LL, Otsoshi CK, Tillakaratne NJ, Burdick JW, Roy RR. Training locomotor networks // Brain Res Rev. – 2008. – Vol.57. – P.241–254.
181. Edgerton, V.R. & Roy, R.R. Robotic training and spinal cord plasticity // Brain Res. Bull. – 2009. – Vol.78. – P.4–12.
182. Ekeberg O & Pearson K. Computer simulation of stepping in the hind legs of the cat: an examination of mechanisms regulating the stance-to-swing transition. // J Neurophysiol. – 2005. – Vol.94. – P.4256-4268.

183. Engberg I. Reflex to foot muscles in the cat. // Acta Scand. Suppl. – 1964. – Vol.235. – P.1-64.
184. Engberg I., Lundberg A. An electromyographic analysis of muscular activity in the hindlimb of the cat during unrestrained locomotion. // Acta physiol.scand. – 1969 – Vol.75 – №.4. – P.614-630.
185. Erlanger J., Gasser H.S. Electrical signs of nervous activity. – Philadelphia: Univ. Pennsylvania Press, 1937.
186. Feldman A. G., Levin M. F. The origin and use of positional frames of reference in motor control //Behavioral and Brain Sciences. – 1995. – Vol.18. – №. 4. – P. 723-744.
187. Fifkova E, Marsala J. Stereotaxic atlases for the cat, rabbit and rat. In: Electrophysiological methods in biological research. Prague Acad Sci; 1967. P. 653–731.
188. Fishman, G. S. Monte Carlo: Concepts, Algorithms, and Applications. New York: Springer. 1995.
189. Flash T., Hochner B. Motor primitives in vertebrates and invertebrates //Current opinion in neurobiology. – 2005. – Vol. 15. – №. 6. – P. 660-666.
190. Fleshman J.W., Lev-Tov A., Burke R.E., Peripheral and central control of flexor digitorum longus and flexor hallucis longus motoneurons: the synaptic basis of functional diversity // Exp. Brain. Res. – 1984. – Vol.54. – P.133-149.
- 191.
192. Fong AJ, Roy RR, Ichiyama RM, Lavrov I, Courtine G, Gerasimenko Y, Tai YC, Burdick J, Edgerton VR. Recovery of control of posture and locomotion after a spinal cord injury: solutions staring us in the face // Prog Brain Res. – 2009. – 175. – P.393– 418.
193. Forssberg H., Grillner S. The locomotion of the acute spinal cat injected with clonidine i.v. // Brain Res. – 1973. – Vol.50. – P.184-186.
194. Forssberg H., Grillner S. and Rossignol S. Phasic gain control of reflexes from the dorsum of the paw during spinal locomotion // Brain Res. – 1977. – Vol.132. – P.121-139.

195. Forssberg H. Stumbling corrective reaction: A phase dependent compensatory reaction during locomotion // *J. Neurophysiol.* – 1979. – Vol.42. – P.936-953.
196. Forssberg H., Grillner S., Halbertsma J. The locomotion of the low spinal cat. I. Coordination within a hindlimb // *Acta Physiol. Scand.* – 1980a. – Vol.108. – P.269-281.
197. Forssberg H., Grillner S., Halbertsma J., Rossignol S. The locomotion of the low spinal cat. II. Interlimb coordination // *Acta Physiol. Scand.* – 1980b. – Vol.108. – P.283-295.
198. Freusberg A. Reflexbewegungen beim Hunde. // *Pfluegers Arch. Physiol.* – 1874. – Vol. 9. – P.358-391.
199. Frey, M. et al. A novel mechatronic body weight support system // *IEEE Trans. Neural. Syst. Rehabil. Eng.* – 2006. – Vol.14. – P.311–321.
200. Fung J, Macpherson JM. Attributes of quiet stance in the chronic spinal cat // *J Neurophysiol.* – 1999. – Vol.82. – P.3056–65.
201. Fuentes R, Petersson P, Siesser, WB., Caron MG, & Nicolelis, MA. Spinal cord stimulation restores locomotion in animal models of Parkinson's disease // *Science.* – 2009. – Vol.323. – №5921. – P.1578-1582.
202. Gahéry Y, Ioffe M, Massion J, Polit A. The postural support of movement in cat and dog // *Acta Neurobiol Exp (Wars).* – 1980. – Vol.40. – № 4. – P.741-55.
203. Gambaryan PP, Orlovskii GN, Protopopova TG, Severin FV, Shik ML. The activity of muscles during different forms of locomotion in the cat and adaptive changes of locomotor organs in family Felidae // *Trudy Zool Inst Acad Nauk (USSR).* – 1971. – Vol.48. – P. 220–239.
204. Garcia-Rill E, Skinner RD. The mesencephalic locomotor region. i. Activation of a medullary projection site // *Brain Res.* – 1987a. – Vol. 411. – P.1–12.

205. Garcia-Rill E, Skinner RD. The mesencephalic locomotor region. ii. Projections to reticulospinal neurons // Brain Res. – 1987b. – Vol.411. – P.13–20.
206. Gaunt RA, Prochazka A, Mushahwar VK, Guevremont L, Ellaway PH. Intraspinal microstimulation excites multisegmental sensory afferents at lower stimulus levels than local alpha-motoneuron responses // J Neurophysiol. – 2006. – Vol. 96. – P.2995–3005.
207. Gelfand IM, Orlovsky GN, Shik ML. Locomotion and scratching in tetrapods. In: Neural control of rhythmic movements in vertebrates (Cohen AH, Rossignol S, Grillner S eds), 1988. P.167–199. New York: Wiley.
208. Gelfand I.M., Tsetlin M.L. Mathematical modeling of mechanisms of central nervous system // In Models of structural-functional organization of central biological system. – 1971. – P.1-22.
209. Gerasimenko YP, Avelev VD, Nikitin OA, Lavrov IA. Initiation of locomotor activity in spinal cats by epidural stimulation of the spinal cord // Neurosci Behav Physiol. – 2003. – Vol.33. – P.247–254.
210. Gerasimenko YP, Lavrov IA, Bogacheva IN, Shcherbakova NA, Kucher VI, Musienko PE. Formation of locomotor patterns in decerebrate cats in conditions of epidural stimulation of the spinal cord // Neurosci Behav Physiol – 2005. – Vol.35. – P.291–298.
211. Gerasimenko YP, Lavrov IA, Courtine G, Ichiyama RM, Dy CJ, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR. Spinal cord reflexes induced by epidural spinal cord stimulation in normal awake rats // J Neurosci Methods. – 2006. – Vol.157. – P.253–263.
212. Gerasimenko YP, Ichiyama RM, Lavrov IA, Courtine G, Cai L, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR. Epidural spinal cord stimulation plus quipazine administration enable stepping in complete spinal adult rats // J Neurophysiol. – 2007. – Vol.98. – P.2525–2536.
213. Gerasimenko YP, Moshonkina TR, Musienko PE. Capacity of lumbar-sacral spinal cord to produce locomotor pattern in response to electrical epidural

- stimulation and step training in decerebrated and spinal animals // Soc Neurosci Abstr. 75.4, 2007.
214. Gerasimenko YP, Roy RR, Edgerton VR. Epidural stimulation: comparison of the spinal circuits that generate and control locomotion in rats, cats and humans // *Exp Neurol.* – 2008. – Vol.209. – P.417–425.
215. Gerasimenko Y, Musienko P, Bogacheva I, Moshonkina T, Savochin A, Lavrov I, Roy RR, Edgerton VR. Propriospinal bypass of the serotonergic system that can facilitate stepping // *J Neurosci.* – 2009. – Vol.29. – P.5681–5689.
216. Getting PA. Emerging principles governing the operation of neural networks // *Annual review of neuroscience.* – 1989. – Vol. 12. – №. 1. – P.185–204.
217. Giroux N., Reader T. A., Rossignol S. Comparison of the effect of intrathecal administration of clonidine and yohimbine on the locomotion of intact and spinal cats // *Journal of neurophysiology.* – 2001. – Vol.. 85. – №.6. – P. 2516-2536.
218. Giszter S. F., Mussa-Ivaldi F. A., Bizzi E. Convergent force fields organized in the frog's spinal cord // *J Neurosci.* – 1993. – Vol.13. – №. 2. – P. 467-491.
219. Gosgnach, S., Lanuza, G. M., Butt, S. J., Saueressig, H., Zhang, Y., Velasquez, T., & Goulding, M. V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs // *Nature.* – 2006. – Vol.440. - №7081. – P.215–219.
220. Gossard JP, Brownstone RM, Barajon I, Hultborn H. Transmission in a locomotor-related group 1b pathway from hindlimb extensor muscles in the cat // *Exp Brain Res.* – 1994. – Vol.98 – P.213–228.
221. Gorska T., Bem T. and Majczynski H. Locomotion in cats with ventral spinal lesions: support patterns and duration of support phases during unrestrained walking // *Acta Neurobiol. Exp.* – 1990. – Vol.50. – P.191–200.

222. Goslow G. E., Reinking R. M., Stuart D. G. The cat step cycle: hind limb joint angles and muscle lengths during unrestrained locomotion // J. Morphol. – 1973. – Vol.141. – P.1-42.
223. Gossard JP, Brownstone RM, Barajon I, Hultborn H. Transmission in locomotor-related group Ib pathway from hindlimb extensor muscles in the cat // Expl. Brain. Res. – 1994. – Vol.98 – P.213-228.
224. Guertin P, Angel MJ, Perreault MC, McCrea DA. Ankle extensor group I afferents excite extensors throughout the hindlimb during MLR evoked fictive locomotion in the cat // J. Physiol. – 1995. – Vol.487. – P.197-209.
225. Guertin PA, Steuer I. Ionotropic 5-HT₃ receptor agonist-induced motor responses in the hindlimbs of paraplegic mice // J Neurophysiol. – 2005. – Vol.94. – P.3397–3405.
226. Guertin P.A. Recovery of locomotor function with combinatory drug treatments designed to synergistically activate specific neuronal networks // Curr Med Chem. – 2009. – Vol.16. – P.1366 –1371.
227. Guertin PA, Ung RV, Rouleau P, Steuer I. Effects on locomotion, muscle, bone, and blood induced by a combination therapy eliciting weight-bearing stepping in nonassisted spinal cord-transected mice // Neurorehabil Neural Repair. – 2011. – Vol.25. – P.234 –242.
228. Guevremont L, Renzi CG, Norton JA, Kowalczewski J, Saigal R, & Mushahwar VK. Locomotor-related networks in the lumbosacral enlargement of the adult spinal cat: activation through intraspinal microstimulation // Neural Systems and Rehabilitation Engineering, IEEE Transactions on. – 2006. – Vol.14. – №3. – P.266-272.
229. Guyat GH., Sullivan MJ, Thompson PJ, Fallen EL, Pugsley SO, Taylor D. W, & Berman LB. The 6-minute walk: a new measure of exercise capacity in patients with chronic heart failure // Canadian Medical Association Journal. – 1985. – Vol.132. – №8. – P.919.

230. Grillner S. Supraspinal and segmental control of static and dynamic γ -motoneurons in cat // *Acta Physiol. Scand. Suppl.* – 1969. – Vol.327. – P.1-34.
231. Grillner S. Locomotion in spinal cat // In: *Control of posture and locomotion/* Eds. R.B.Stein et al. New York: Plenum. – 1973. – P.513-535.
232. Grillner S. Locomotion in vertebrates: Central mechanisms and reflex interaction. // *Physiol. Rev.* – 1975. – Vol.55. – P.247-304.
233. Grillner S., Zangger P. How detailed is the central pattern generation for locomotion? // *Brain Res.* – 1975. – Vol.88. – P.367-371.
234. Grillner S, Rossignol S. On the initiation of the swing phase of locomotion in chronic spinal cats // *Brain Res.* – 1978. – Vol.146. – P.269 –277.
235. Grillner S, Zangger P. On the central generation of locomotion in the low spinal cat // *Exp Brain Res.* – 1979. – Vol.34. – P.241–261.
236. Grillner S. Control of locomotion in bipeds, tetrapods and fish. // In: *Handbook of Physiology. Sect 1, Vol. 2. The Nervous System, Motor Control.* P.1179-1236. Ed. V.B. Brooks. American Physiological Society: Bethesda, MD, 1981.
237. Grillner S., Wallen P. Centar pattern generators for locomotion, with special reference to vertebrates // *Annu. Rev. Neurosci.* – 1985. – Vol.8. – P.233-261.
238. Grillner S. Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion // *Neuron.* – 2006. – Vol. 52. – №. 5. – P.751-766.
239. Grillner S., Jessell T. M. Measured motion: searching for simplicity in spinal locomotor networks // *Current opinion in neurobiology.* – 2009. – Vol.19. – №6. – P.572-586.
240. Gurfinkel VS, Shik ML. The control of posture and locomotion // In: *Motor Control*, ed. By Gydikov A.A., Tankov N.T., Kosarov D.S., Plenum Press, New York, P.217-234. 1973.

241. Gurfinkel VS, El'ner AM. Participation of the secondary motor area of the frontal lobe of the brain in organizing postural components of human voluntary movement // *Neirofiziologiya*. – 1988. – Vol.20. – №1. – P.7-15.
242. Gurfinkel VS, Lebedev M. A., Levik Yu. S. Effects of reversal in the human equilibrium regulation system // *Neurophysiology*. – 1992. – Vol.24. – №4. – P. 297-304.
243. Hägglund M, Borgius L, Dougherty KJ, Kiehn O. Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion // *Nat Neurosci*. – 2010. – Vol.13. – P.246 –252.
244. Han P, Nakanishi ST, Tran MA, Whelan PJ. Dopaminergic modulation of spinal neuronal excitability // *J Neurosci*. – 2007. – Vol. 27. – P.13192–13204.
245. Haour R, Massarino R, Massion J, Swett JE. A device used for study of postural reactions in the quadruped // *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. – 1976. – Vol.40. – P.427–431.
246. Harkema SJ. et al. Human lumbosacral spinal cord interprets loading during stepping // *J. Neurophysiol*. – 1997. – Vol.77. – P.797–811.
247. Harkema SJ. Plasticity of interneuronal networks of the functionally isolated human spinal cord // *Brain Res Rev*. – 2008. – Vol.57. – P.255–264.
248. Harkema SJ, Gerasimenko Y, Hodes J, Burdick J, Angeli C, Chen Y, Ferreira CK, Rejc E, Edgerton VR. Sensory control of standing and stepping enabled by epidural stimulation after a human motor complete spinal cord injury // *Soc Neurosci Abstr*. 2010. 36:259.251.
249. Harkema S, Gerasimenko Y, Hodes J, Burdick J, Angeli C, Chen Y, Ferreira C, Willhite A, Rejc E, Grossman RG, Edgerton VR. Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study // *Lancet*. – 2011. – Vol.377. – P.1938–1947.
250. Hebb DO. *The Organization of Behavior: A neuropsychological Theory*. 1949. Wiley, New York.

251. Hiebert G.W., Gorassini M.A., Jiang W., Prochazka A. And Pearson K.G. Corrective responses to loss of ground support during walking, II. Comparison of intact and chronic spinal cats // J. Neurophysiol. – 1994. – Vol.71. – P.611-622.
252. Hicks A.L., Adams, M. M., Ginis, K. M., Giangregorio, L., Latimer, A., Phillips, S. M., & McCartney, N. Long-term body-weight-supported treadmill training and subsequent follow-up in persons with chronic SCI: effects on functional walking ability and measures of subjective well-being // Spinal Cord. – 2005. – Vol. 43. – №. 5. – P. 291-298.
253. Hiebert G.W., Whelan P.J., Prochazka A. and Pearson K.G. Contribution of hind limb flexor muscle afferents to the timing of phase transitions in the cat step cycle // J. Neurophysiol. – 1996. – Vol.75. – P.1126-1137.
254. Hidler, J. et al. ZeroG: overground gait and balance training system // J. Rehabil. Res. Dev. – 2011. – Vol.48. – P.287–298.
255. Hilliard MJ, Martinez KM, Janssen I, Edwards B, Mille ML, Zhang Y & Roberts ML. Lateral balance factors predict future falls in community-living older adults // Archs Phys Med Rehabil. – 2008. – Vol.89. – P.1708-1713.
256. Hochman S, Garraway S, Machacek D, Shay B. 5-HT receptors and the neuromodulatory control of spinal cord function // In: Motor neurobiology of the spinal cord (Raton B, ed), 2011, P.47–87. Boca Raton, FL: CRC.
257. Hodgson J.A., Roy R.R., de Leon R., Dobkin B, Edgerton VR. Can the mammalian lumbar spinal cord learn a motor task? // Med Sci Sports Exerc. – 1994. - Vol.26. – P.1491–1497.
258. Ho S., O'Donovan M.J. Regionalization and intersegmental coordination of rhythm-generating networks in the spinal cord of the chick embryo // J. Neurosci. – 1993. – Vol.13. – P.1354-1371.
259. Hochman S., Jordan L.M. and Macdonald J.F. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated voltage oscillations in neurons surrounding the central canal in slices of rat spinal cord // J. Neurophysiol. – 1994. – Vol.72. – P.565 – 577.

260. Hof A.L. The 'extrapolated center of mass' concept suggests a simple control of balance in walking // *Hum Mov Sci.* – 2008. – Vol.27. – P.112 – 125.
261. Hof AL, Vermerris SM & Gjaltema WA. Balance responses to lateral perturbations in human treadmill walking // *J Exp Biol.* – 2010. – Vol.213. – P.2655-2664.
262. Hof AL. Scaling gait data to body size // *Gait Posture.* – 1996. – Vol.4. – P.222-223.
263. Holsheimer J. Computer modelling of spinal cord stimulation and its contribution to therapeutic efficacy // *Spinal Cord.* – 1998. – Vol.36. – P.531-540.
264. Honeycutt CF, Gottschall JS, Nichols TR. Electromyographic responses from the hindlimb muscles of the decerebrate cat to horizontal support surface perturbations // *J Neurophysiol.* – 2009. – Vol.101. – P.2751–2761.
265. Honeycutt CT & Nichols TR. The decerebrate cat generates the essential features of the force constraint strategy // *J Neurophysiol.* – 2010. – Vol.103. – P.3266-3273.
266. Hoogkamer W, Meyns P, Duysens J. Steps Forward in Understanding Backward Gait: From Basic Circuits to Rehabilitation // *Exercise and sport sciences reviews.* – 2014. – Vol. 42. – №. 1. – P.23-29.
267. Horak F. B., Diener H. C. Cerebellar control of postural scaling and central set in stance // *J Neurophysiol.* – 1994. – Vol. 72. – №. 2. – P.479-493.
268. Horak F. B., Frank J., Nutt J. Effects of dopamine on postural control in parkinsonian subjects: scaling, set, and tone // *J Neurophysiol.* – 1996. – Vol. 75. – №. 6. – P. 2380-2396.
269. Horak F, Macpherson J. Postural orientation and equilibrium // In: *Handbook of Physiology. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems. Neural Control of Movement.* Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., 1996, sect. 12, P. 255–292.

270. Hou S., Duale H., Cameron A.A., Abshire S.M., Lyttle T.S., Rabchevsky A.G. Plasticity of lumbosacral propriospinal neurons is associated with the development of autonomic dysreflexia after thoracic spinal cord transaction // J. Comp. Neurol. – 2008. – Vol.509. – P.382–399.
271. Hore J, Vilis T. Loss of set in muscle responses to limb perturbations during cerebellar dysfunction. // J Neurophysiol. – 1984. - Vol.51. – №6. – P.1137-48.
272. Hyngstrom A, Johnson M, Schuster J, Heckman CJ. Movement-related receptive fields of spinal motoneurons with active dendrites // J Physiol. – 2008. – Vol.586. – P.1581–1593.
273. Hu Y, Wong YL, Lu WW & Kawchuk GN. Creation of an asymmetrical gradient of back muscle activity and spinal stiffness during asymmetrical hip extension // Clin Biomech. – 2009. – Vol.24. – P.799-806.
274. Ichiyama RM, Gerasimenko YP, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR. Hindlimb stepping movements in complete spinal rats induced by epidural spinal cord stimulation // Neurosci Lett. – 2005. – Vol.383. – P.339–344.
275. Ichiyama RM, Courtine G, Gerasimenko YP, Yang GJ, Van Den Brand R, Lavrov IA, Zhong H, Roy RR, and Edgerton VR. Step training reinforces specific spinal locomotor circuitry in adult spinal rats // J. Neurosci. – 2008. - Vol.28. - №29 – P.7370–7375.
276. Inglis JT, Macpherson JM. Bilateral labyrinthectomy in the cat: effects on the postural response to translation // J Neurophysiol. – 1995. – Vol.73. – P.1181–91.
277. Ingram JN, Körding KP, Howard IS, & Wolpert DM. The statistics of natural hand movements // Experimental brain research. – 2008. – Vol.188. – №2 – P.223-236.
278. Ioffe ME, Ivanova NG, Frolov AA, Birjukova EV, & Kiseljova NV. On the role of motor cortex in the learned rearrangement of postural coordinations. Stance and motion. Facts and concepts. Eds.: VS Gurfinkel, ME Ioffe, J. Massion, J.-P. Roll. NY, Plenum. 1988. P.213-226.

279. Islam SS, Zelenin PV, Orlovsky GN, Grillner S, Deliagina TG. Pattern of motor coordination underlying backward swimming in the lamprey // *J Neurophysiol.* – 2006. – Vol.96. – №1 – P.451-60.
280. Iwahara T, Atsuta Y, Garcia-Rill E, Skinner R. Spinal cord stimulation induced locomotion in adult cat // *Brain Res Bull.* – 1991. – Vol. 28. – P.99-105.
281. Jacobs BL, Fornal CA. 5-HT and motor control: a hypothesis // *Trends in neurosciences.* – 1993. – Vol.16. – №. 9. – P.346-352.
282. Jacobs JV, Horak FB. Cortical control of postural responses // *J Neural Transm.* – 2007. – Vol.114. – P.1339–1348.
283. Jankowska E., Jukes M.G.M., Lund S., Lundberg A. Reciprocal innervation through interneuronal inhibition // *Nature.* – 1965. – Vol.206. – №4980. – P.198-199.
284. Jankowska E., Lund S., Lundberg A. The effect of DOPA on the spinal cord. 4. Depolarization evoked in the central terminals of contralateral Ia afferent terminals by volleys in the flexor reflex afferents // *Acta Physiol. Scand.* – 1966. – Vol.68. – P.337-341.
285. Jankowska E, Jukes MGM, Lund S, Lundberg A. The effect of DOPA on the spinal cord. 5. Reciprocal organization of pathways transmitting excitatory action to alpha motoneurons of flexors and extensors // *Acta Physiol Scand.* – 1967a. – Vol.70. – P.369–388.
286. Jankowska E, Jukes MGM, Lund S, Lundberg A. The effect of DOPA on the spinal cord. 6. Half-centre organization of interneurons transmitting effects from the flexor reflex afferents // *Acta Physiol Scand.* – 1967b. – Vol.70. – P.389–402.
287. Jankowska E., Lundberg A., Roberts W. J., and Stuart D. A long propriospinal system with direct effect on motoneurons and on interneurons in the cat lumbosacral cord // *Exp. Brain Res.* – 1974. – Vol.21. – №2. – P.169–194.

288. Jordan L. M. Initiation of locomotion from the mammalian brainstem. // In: Neurobiology of Vertebrate Locomotion, edited by S. Grillner, P.S.G. Stein, D.G. Stuart and H. Forssberg. London. Macmillan, 1986. – P.21-37.
289. Jordan LM. Initiation of locomotion in mammals // Ann NY Acad Sci. – 1998. – Vol.860. – P.83–93.
290. Jordan LM, Liu J, Hedlund PB, Akay T, Pearson KG. Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals // Brain Res Rev. – 2008. – Vol.57. – P.183–191.
291. Kakulas B. A. A review of the neuropathology of human spinal cord injury with emphasis on special features // J. Spinal Cord Med. – 1999. – Vol.22. – P.119.
292. Karayannidou A, Orlovsky GN, Sirota MG, Beloozerova IN, Deliagina TG. Compensation for lateral perturbations of body orientation in the standing and walking cat // Soc Neurosci Abstr. 2007.
293. Karayannidou A, Zelenin PV, Orlovsky GN, Sirota MG, Beloozerova IN, Deliagina TG. Maintenance of lateral stability during standing and walking in the cat // J Neurophysiol. – 2009a. – Vol.101. – P.8–19.
294. Karayannidou A, Beloozerova IN, Zelenin PV, Stout EE, Sirota MG, Orlovsky GN, Deliagina TG. Activity of pyramidal tract neurons in the cat during standing and walking on an inclined plane // J Physiol. – 2009b. – Vol.587 – P.3795–3811.
295. Kato M, Murakami S, Hirayama H, Hikino K. Recovery of postural control following chronic bilateral hemisections at different spinal cord levels in adult cats // Exp Neurol. – 1985. – Vol.90. – P.350–64.
296. Kawahara K., Mori S., Tomiyama T. and Kanaya T. Discharges of neurons in the midpontine dorsal tegmentum of mesencephalic cat during locomotion // Brain Res. – 1985. – Vol.341. – P.377-380.
297. Kazennikov OV, Selionov VA, Shik ML. On the bulbospinal locomotion column in the cat // In: Stance and Motion: Facts and Concepts. New York: Plenum, 1988, P. 123–131.

298. Kiehn O., Kjaerulff O. Distribution of central pattern generators for rhythmic motor outputs in the spinal cord of limbed vertebrates // *Ann NY Acad Sci* – 1998. – Vol.860. – P.110–29.
299. Kiehn O. Locomotor circuits in the mammalian spinal cord // *Annu Rev Neurosci.* – 2006. – Vol.29. – P.279–306.
300. Kiehn O. Development and functional organization of spinal locomotor circuits // *Current opinion in neurobiology.* – 2011. – Vol. 21. – №. 1. – P. 100-109.
301. Kim SA, Heinze KG, Schulle P. Fluorescence correlation spectroscopy in living cells // *Nat Methods.* – 2007. – Vol.4. – P.963–973.
302. Kjaerulff O., Kiehn O. Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord in vitro: a lesion study // *The Journal of Neuroscience.* – 1996. – Vol. 16. – №. 18. – P. 5777-5794.
303. Kling U., Szekely G. Simulation of rhythmic nervous activities. I. Function of networks with cyclic inhibitions // *Kybernetik.* – 1968. – Vol.5. – P.89-103.
304. Kniffki K.D., Schomburg E.D., Steffens. Effects from fine muscle and cutaneous afferents on spinal locomotion in cats // *J. Physiol. (Lond.)* – 1981. – Vol.319. – P.543-554.
305. Koehler WJ, Schomburg ED, Steffens H. Phasic modulation of trunk muscle efferents during fictive locomotion in cat // *J Physiol.* – 1984. – Vol.353, 187-197.
306. Ko H-Y, Ditunno JF, Graziani V, Little JW. The pattern of reflex recovery during spinal shock // *Spinal Cord.* – 1999. – Vol.37. – P.402–409.
307. Kostyuk PG. Integrative processes in the spinal cord // In: *Specific Physiology of the Nervous System.* Leningrad: Nauka, 1983, P. 5–60.
308. Kozlovskaya I, Aslanova IF, Barmin VA, Grigoreva L, Gevlich GI, Kirenskaia A, & Sirota MG. The nature and characteristics of a gravitational ataxia // *Physiologist.* – 1983. – Vol. 26. – P.108-109.

309. Kozlovskaya, I., Dmitrieva, I., Grigorieva, L., Kirenskaya, A., & Kreidich, Y. Gravitational mechanisms in the motor system. Studies in real and simulated weightlessness // *Stance and Motion*. – Springer US, 1988. – P. 37-48.
310. Kozlovskaya, I. B., Sayenko, I. V., Sayenko, D. G., Miller, T. F., Khusnutdinova, D. R., & Melnik, K. A. Role of support afferentation in control of the tonic muscle activity // *Acta Astronautica*. – 2007. – Vol. 60. – №. 4. – P. 285-294.
311. Kuo A. Stabilization of lateral motion in passive dynamic walking // *Int J Robotics Res.* – 1999. – Vol.18. – P.917-930.
312. Kwakkel, G., Kollen, B.J. & Krebs, H.I. Effects of robot-assisted therapy on upper limb recovery after stroke: a systematic review // *Neurorehabil. Neural Repair*. – 2008. – Vol.22. – P.111–121.
313. Lacquaniti F., Borghese N.A., Carrozzo M. Transient reversal of stretch reflex in human arm muscles // *J. Neurophysiol.* – 1991. – Vol.66. – P.939-954.
314. Lamb T, Yang JF. Could different directions of infant stepping be controlled by the same locomotor central pattern generator? // *J Neurophysiol.* – 2000. – Vol.83. – P.2814 –2824.
315. Landry ES, Lapointe NP, Rouillard C, Levesque D, Hedlund PB, Guertin PA. Contribution of spinal 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors to locomotor-like movement induced by 8-OH-DPAT in spinal cordtransected mice // *Eur J Neurosci.* – 2006. – Vol.24. – P.535–546.
316. Langlet C, Leblond H, Rossignol S. Mid-lumbar segments are needed for the expression of locomotion in chronic spinal cats // *Neurophysiol.* – 2005. – Vol.93 – N.5. – P.2474-88.
317. Lapointe NP, Guertin PA. Synergistic effects of D₁/5 and 5-HT_{1A}/7 receptor agonists on locomotor movement induction in complete spinal cord-transected mice // *J Neurophysiol.* – 2008. – Vol.100. – P.160 –168.

318. Lapointe NP, Rouleau P, Ung RV, Guertin PA. Specific role of D1 receptors in spinal network activation and rhythmic movement induction in vertebrates // *J Physiol.* – 2009. – Vol.587. – P.1499–1511.
319. Larimer O. Command interneurons and locomotor behavior in crustaceans. // In *Neural control of locomotion* (Herman RM, Grillner S, Stein PSG, Stuart D, eds), 1976, P.293–326. New York: Plenum.
320. 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.
321. Latash M. L., Gurfinkel V. S. Tonic vibration reflex and position of the body // *Physiologiya Cheloveka* (Human Physiology). – 1976. – Vol. 2. – P.593-598.
322. Lavrov I, Gerasimenko Y, Ichiyama RM, Courtine G, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR. Plasticity of spinal cord reflexes after a complete transection in adult rats: relationship to stepping ability // *J Neurophysiol.* – 2006. – Vol.96. – P.1699–1710.
323. Lavrov I, Courtine G, Dy CJ, van den Brand R, Fong AJ, Gerasimenko Y, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR. Facilitation of stepping with epidural stimulation in spinal rats: role of sensory input // *J Neurosci.* – 2008a. – Vol.28. – P.7774-7780.
324. Lavrov I, Dy CJ, Fong AJ, Gerasimenko Y, Courtine G, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR. Epidural stimulation induced modulation of spinal locomotor networks in adult spinal rats // *J Neurosci.* – 2008b. – Vol.28. – P.6022– 6029.
325. Levin M. F. Interjoint coordination during pointing movements is disrupted in spastic hemiparesis // *Brain.* – 1996. – Vol.119. – №. 1. – P.281-293.

326. Lewicki M. S. A review of methods for spike sorting: The detection and classification of neural action potentials // *Network: : Computation in Neural Systems*. – 1998. – Vol.9. – №4 – R.53-R.78.
327. Liu J, Jordan LM. Stimulation of the parapyramidal region of the neonatal rat brain stem produces locomotor-like activity involving spinal 5-HT₇ and 5-HT_{2A} receptors // *J Neurophysiol*. – 2005. – Vol.94. – P.1392–1404.
328. Liu J, Akay T, Hedlund PB, Pearson KG, Jordan LM. Spinal 5-HT₇ receptors are critical for alternating activity during locomotion: in vitro neonatal and in vivo adult studies using 5-HT₇ receptor knockout mice // *J Neurophysiol*. – 2009. – Vol.102. – P.337-348.
329. Lloyd D.P.C. Mediation of descending long spinal reflex activity // *J. Neurophysiol*. – 1942. – Vol.5 – №6. – P.435-458.
330. Lloyd D.P.C. Conduction and synaptic transmission in the reflex response to stretch in spinal cats // *J.Neurophysiol*. – 1943. – Vol.6. – №4. – P.317-326.
331. Lloyd D.P.C. Functional organization of the spinal cord // *Physiol. Rev.* – 1944. – 24. – P.1-17.
332. Lloyd D.P.C., Chang H.T. Afferent fibres in muscle nerves // *J.Neurophysiol*. – 1948. – Vol.11. – №3. – P.199-227.
333. Lloyd D.P.C., McIntyre A.K. Dorsal column conduction of group I muscle afferent impulses and their relay through Clarke's column // *J. Neurophysiol*. – 1950. – Vol.13. – N.1. – P.39-54.
334. Lockhart DB, Ting LH. Optimal sensorimotor transformations for balance // *Nat Neurosci*. – 2007. – Vol.10. – P.1329–1336.
335. Lovely R.G., Gregor R.J., Roy R.R., Edgerton V.R. Effects of training on the recovery of full-weight-bearing stepping in the adult spinal cat // *Exp. Neurol*. – 1986. – Vol.92. – P.421–35.
336. Lovely RG, Gregor RJ, Roy RR, Edgerton VR. Weight-bearing hindlimb stepping in treadmill-exercised adult spinal cats // *Brain Res*. – 1990. – Vol.514. – P.206–218.

337. Lundberg A. Reflex control of stepping // Nansen memorial lecture V. Oslo Univ. Forlaget. 1969a.
338. Lundberg A. Convergence of excitatory and inhibitory action on interneurons in spinal cord // In: Interneuron. Eds. by M. Brazier. Los Angeles: Univ. Calif. Press. – 1969b. – P.231-265.
339. Lundberg A. Multisensory control of spinal reflex pathways // Prog. Brain. Res. – 1979. – Vol.50. – P.11-28.
340. Lundberg A. Half-centres revisited. // In: Regulatory Functions of the CNS. Principles of Motion and Organization. Adv. Physiol. Sci. edited by J. Szentagothai, M. Palkovits, and J.Hamori. Budapest: Pergamon Press, 1981. Vol.1. P.155-167.
341. Lyalka VF, Zelenin PV, Karayannidou A, Orlovsky GN, Grillner S, Deliagina TG. Impairment and recovery of postural control in rabbits with spinal cord lesions // J Neurophysiol. – 2005. – Vol.94. – P.3677–90.
342. Lyalka VF, Musienko PE, Orlovsky GN, Grillner S, Deliagina TG. Effect of intrathecal administration of serotonergic and noradrenergic drugs on postural performance in rabbits with spinal cord lesions // J Neurophysiol. – 2008. – Vol.100. – P.723–732.
343. Lyalka VF, Karayannidou A, Zelenin PV, Orlovsky GN, Deliagina TG. Facilitation of postural limb reflexes in spinal rabbits // Soc Neurosci Abstr. 2009. 35:766.13.
344. MacLean J. N., Hochman S., Magnuson D. S. Lamina VII neurons are rhythmically active during locomotor-like activity in the neonatal rat spinal cord // Neurosci. Lett. – 1995. – Vol.197. – P.9-12.
345. Macpherson JM. Strategies that simplify the control of quadrupedal stance. I. Forces at the ground // J Neurophysiol. – 1988a. – Vol.60. – P.204–217.
346. Macpherson JM. Strategies that simplify the control of quadrupedal stance. II Electromyographic activity // J Neurophysiol. – 1988b. – Vol.60. – P.218–231.

347. Macpherson JM, Fung J, Jacobs R. Postural orientation, equilibrium, and the spinal cord // In: *Advances in Neurology: Neuronal Regeneration, Reorganization, and Repair*, edited by Seil FJ. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1997, Vol. 72, P. 227–232.
348. Macpherson JM, Everaert DG, Stapley PJ, Ting LH. Bilateral vestibular loss in cats leads to active destabilization of balance during pitch and roll rotations of support surface // *J Neurophysiol.* – 2007. – Vol.97. – P.4357–4367.
349. Madriaga MA, McPhee LC, Chersa T, Christie KJ, Whelan PJ. Modulation of locomotor activity by multiple 5-HT and dopaminergic receptor subtypes in the neonatal mouse spinal cord // *J Neurophysiol.* – 2004. – Vol.92. – P.1566–1576.
350. Maegele M, Muller S, Wernig A, Edgerton VR, Harkema SJ. Recruitment of spinal motor pools during voluntary movements versus stepping after human spinal cord injury // *J. Neurotrauma.* – 2002. – Vol.19. – P.1217–1229.
351. Magnus R. *Korperstellun [Body posture]*. Berlin: Springer, 1924.
352. Magnus R. Some results of studies in the physiology of posture // *Lancet.* – 1926. – Vol.2. – P.531-536.
353. Marcoux J., Rossignol S. Initiating or blocking locomotion in spinal cats by applying noradrenergic drugs to restricted lumbar spinal segments // *J. Neurosci.* – 2000. – Vol.20. – P.8577–85.
354. Marple-Horvat DE, Amos AJ, Armstrong DM & Criado JM. Changes in the discharge patterns of cat motor cortex neurones during unexpected perturbations of on-going locomotion // *J Physiol.* – 1993. – Vol.462. – P.87-113.
355. Marder E, Calabrese RL. Principles of rhythmic motor pattern generation // *Physiol Rev.* -1996. – Vol.76. – P.687–717.
356. Massion J. Postural control system // *Curr Opin Neurobiol.* – 1994. – Vol.4. – P.877–888.

357. Massion J. Postural control systems in developmental perspective // *Neurosci Biobehav Rev.* – 1998. – Vol. 2. – P.465–472.
358. Massion J. The mammalian red nucleus // *Physiol Rev.* – 1967. – Vol.47. – P.383–436.
359. Massion J. Postural control system // *Curr Opin Neurobiol.* – 1994. – Vol.4. – P.877–88.
360. Massion J, Dufosse M. Coordination between posture and movement: why and how? // *News Physiol Sci.* – 1988. – Vol.3. – P.88–93.
361. Massion J, Popov K, Fabre JC, Rage P & Gurfinkel V. Is the erect posture in microgravity based on the control of trunk orientation or center of mass position? // *Experimental brain research.* – 1997. – Vol.114. – №2. – P.384-389.
362. Matsushima T, Grillner S. Neural mechanisms of intersegmental coordination in lamprey: local excitability changes modify the phase coupling along the spinal cord // *Journal of neurophysiology.* – 1992a. – Vol.67. – №. 2. – P.373-388.
363. Matsushima T, Grillner S. Local serotonergic modulation of calcium-dependent potassium channels controls intersegmental coordination in the lamprey spinal cord // *Journal of neurophysiology.* – 1992b. – Vol.67. – №. 6. – P.1683-1690.
364. Matsushita M. Some aspects of the international connections in cats spinal grey matter // *J. Comp. Neurol.* – 1969 – V.136. – №.1. – P.57-80.
365. Matthews PBC. *Mammalian Muscle Receptors and Their Central Actions.* London: Arnold, 1972.
366. Merton P.A. Speculation on serve control of movement // *The spinal cord.* Ed. by C.E.W.Wolstenholme. Churchill Ltd. London. – 1953. – P.247-255.
367. Miller JF, Paul KD, Lee RH, Rymer WZ, Heckman CJ. Restoration of extensor excitability in the acute spinal cat by the 5HT2 agonist DOI // *J Neurophysiol.* – 1996. – Vol.75 – P.620–628.

368. Minassian K, Persy I, Rattay F, Pinter MM, Kern H, Dimitrijevic MR. Human lumbar cord circuitries can be activated by extrinsic tonic input to generate locomotor-like activity // *Hum Mov Sci.* – 2007 – Vol.26. – P.275–295.
369. Misiaszek JE. Control of frontal plane motion of the hindlimbs in the unrestrained walking cat // *J Neurophysiol.* – 2006a. – Vol.96. – P.1816–1828.
370. Misiaszek JE. Neural control of walking balance: if falling then react else continue // *Exerc Sport Sci Rev.* – 2006b. – Vol.34. – P.128–134.
371. Matsuyama K., Mori F. and Mori S. Fine structure of a reticulospinal-interneuronal system for coordinating locomotor rhythm in cats // *From Basic Motor Control to Functional Recovery.* Eds: N. Gantchev & G.N. Gantchev. Conference on Motor Control. St. Constantine. Varna. Bulgaria. – 1999. – P.14-18.
372. Matsuyama K, Drew T. Vestibulospinal and reticulospinal neuronal activity during locomotion in the intact cat. II. Walking on an inclined plane // *J Neurophysiol.* – 2000. – Vol.84. – P.2257–2276.
373. McIlroy WE & Maki BE. The control of lateral stability during rapid stepping reactions evoked by anterior-posterior perturbation: does anticipatory control play a role? // *Gait Posture.* – 1999. – Vol.9. – P.190-198.
374. Merton P.A. Speculation on serve control of movement // *The spinal cord.* Ed. by C.E.W.Wolstenholme. Churchill Ltd. London. – 1953. – P.247-255.
375. Moor SP, Rushmer DS, Windus SL, Nashner LM. Human automatic postural responses: responses to horizontal perturbations of stance in multiple directions // *Exp Brain Res.* – 1988. – Vol.73. – P.648–658.
376. Morales M, Battenberg E, Bloom FE. Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5HT3 receptor subtype in the rat brain and spinal cord // *J Comp Neurol.* – 1998. – Vol.402. – P.385– 401.
377. 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
378. Mori S., Shik M.L. and Yagodnitsyn A.S. Role of pontine tegmentum for locomotor control in mesencephalic cat // J Neurophysiol. – 1977. – Vol.40. – P.284-295.
379. Mori S., Nishimura H., Kurakami, C., Yamamura, T. and Aoki, M. Controlled locomotion in the mesencephalic cat: distribution of facilitatory and inhibitory regions within pontine tegmentum // J. Neurophysiol. – 1978. – Vol.41. – P.1580-1591.
380. Mori S, Kawahara K, Sakamoto T, Aoki M, Tomiyama T. Setting and resetting of postural muscle tone in the decerebrate cat by stimulation of the brain stem // J Neurophysiol. – 1982. – Vol.48. – P.737–48.
381. Mori S, Kawahara K, Sakamoto T. Supraspinal aspects of locomotion in the mesencephalic cat // In: Neural Control, edited by Roberts A, Roberts BL. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 1983, P.445–468.
382. Mori S. Integration of posture and locomotion in acute decerebrate cats and awake, freely moving cats // Progress in Neurobiology. – 1987. – Vol.28. – P.161-195.
383. Mori S., and Takakusaki K. Integration of posture and locomotion. // In: Posture and Gait; Development and Modulation (Amblard, A., Berthoz, F., Clarac, F., eds) Excerpta Medica, 1989. Amsterdam, P.341-354.
384. Mori S., Matsuyama K., Kohhyama J., Kobayashi Y., Takakusaki K. Neuronal constituents of postural and locomotion control systems and their interactions in cat // Brain Dev. – 1992. – Vol.14. – S.109-S.120.
385. Moritz Heinrich Romberg “Lehrbuch der Nervenkrankheiten» (1840—46 г.; 3-е изд., 1857)
386. Musselman, K., Brunton, K., Lam, T. & Yang, J. Spinal cord injury functional ambulation profile: a new measure of walking ability // Neurorehabil. Neural Repair. – 2011. – Vol.25. – P.285–293.

387. Musienko PE, Orlovsky GN, Zelenin PV, Lyalka VF, Deliagina TG. Postural performance in decerebrate rabbit // Soc Neurosci Abstr. 2006.
388. Musienko PE, Bogacheva IN, Gerasimenko YP. Significance of peripheral feedback in the generation of stepping movements during epidural stimulation of the spinal cord // Neurosci Behav Physiol. – 2007a. – Vol.37. – P.181–190.
389. Musienko PE, Zelenin PV, Orlovsky GN, Deliagina TG. Enhancement of limb reflexes in the spinal rabbit by stimulation of the spinal cord // Soc Neurosci Abstr 33: 75.17, 2007b.
390. Musienko PE, Zelenin PV, Lyalka VF, Orlovsky GN, Deliagina TG. Postural performance in decerebrated rabbit // Behav Brain Res. – 2008. – Vol.190. – P.124–134.
391. 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 // IEEE Trans Biomed Eng. – Vol.56. – 2009a. – P.2707–2711.
392. Musienko PE, Pavlova NV, Selionov VA, Gerasimenko IuP. [Locomotion induced by epidural stimulation in decerebrate cat after spinal cord injury.] // Biofizika. – 2009b. – Vol.54. – P.293–300.
393. Musienko P, Edgerton VR, Zelenkova N, Courtine G, Gerasimenko Y. Decerebrated cats show somatosensory-driven postural reactions during locomotion facilitated by epidural stimulation // Soc Neurosci Abstr. 80.6. 2009c.
394. Musienko PE, Zelenin PV, Orlovsky GN, Deliagina TG. Facilitation of postural limb reflexes with epidural stimulation in spinal rabbits // J Neurophysiol. – 2010. – Vol.103. – P.1080–1092.
395. Musienko P, van den Brand R, Maerzendorfer O, Roy RR, Gerasimenko Y, Edgerton VR, Courtine G. Controlling specific locomotor behaviors through multidimensional monoaminergic modulation of spinal circuitries // J Neurosci. – 2011. – Vol.31. – P.9262–9278.

396. Musienko P, Heutschi J, Friedli L, van den Brand R, Courtine G. Multi-system neurorehabilitative strategies to restore motor functions following severe spinal cord injury // *Exp. Neurol.* – 2012a. – Vol.235. – P.100.
397. Musienko PE, Zelenin PV, Lyalka VF, Gerasimenko YP, Orlovsky GN & Deliagina TG. Spinal and supraspinal control of the direction of stepping during locomotion // *J Neurosci.* – 2012b. – Vol.32. – P.17442-17453.
398. Musienko P, Courtine G, Tibbs JE, Kilimnik V, Savochin A, Garfinkel A, Roy RR, Edgerton VR, Gerasimenko Y. Somatosensory control of balance during locomotion in decerebrated cat // *J Neurophysiol.* – 2012c. – Vol.107. – P.2072–2082.
399. Musienko PE, Deliagina TG, Gerasimenko YP, Orlovsky GN, Zelenin PV. Limb and trunk mechanisms for balance control during locomotion // *J Neurosci.* – 2014. In press.
400. Mushahwar, V. K., Aoyagi, Y., Stein, R. B., & Prochazka, A. Movements generated by intraspinal microstimulation in the intermediate gray matter of the anesthetized, decerebrate, and spinal cat // *Canadian journal of physiology and pharmacology.* – 2004. – Vol.82. – P.702-714.
401. Mussa-Ivaldi F. A., Solla S. A. Neural primitives for motion control // *Oceanic Engineering, IEEE Journal of.* – 2004. – Vol.29. – №. 3. – P. 640-650.
402. Muybridge, E. *Animal in Motion.* – New York: Dover, 1957. (From *Animal Locomotion*, 1887.)
403. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane odenervated frog muscle fibres // *Nature.* – 1976. – Vol.260. - №5554. – P.799-802.
404. Nessler, J.A. et al. A robotic device for studying rodent locomotion after spinal cord injury // *IEEE Trans. Neural. Syst. Rehabil. Eng.* – 2005. – Vol.13. – P.497–506.
405. Noga BR, Johnson DM, Riesgo MI, Pinzon A. Locomotor-activated neurons of the cat. I. Serotonergic innervation and co-localization of 5-HT7, 5-

- HT2A, and 5-HT1A receptors in the thoraco-lumbar spinal cord // J Neurophysiol. – 2009. – Vol.102. – P.1560–1576.
406. O'Donovan M.J., Ho S., Yee W. Calcium imaging of rhythmic network activity in the developing spinal cord of the chick embryo // J. Neurosci. – 1995. – Vol.14. – P.6354-6369.
407. Okado N, Homma S, Ishihara R, Sako H, Kohno K. Differential innervations of specific motor neuron pools by serotonergic fibers in the chick spinal cord // Neurosci Lett. – 1988. – Vol. 94. – P.29–32.
408. Orlovsky GN. Spontaneous and induced locomotion of the thalamic cat // Biophysics. – 1969. – Vol.14. – P.1154–62.
409. Orlovsky GN, Deliagina TG, Grillner S. Neuronal control of locomotion. From mollusc to man. Oxford University Press, Oxford; 1999.
410. Orlovsky GN. The effect of different descending systems on flexor and extensor activity during locomotion // Brain Res. – 1972. – Vol.40. – P.359-371.
411. Pang MY, Yang JF. Sensory gating for the initiation of the swing phase in different directions of human infant stepping // J Neurosci. – 2002. – Vol.22. – P.5734–5740.
412. Pavlova EL, Deliagina TG. Responses of reticulospinal neurons in intact lamprey to pitch tilt. // J Neurophysiol. – 2002. – Vol.88. – №3. – P.1136-46.
413. Pearson K.G., Duysens J. Function of segmental reflex in the control of stepping in cockroaches and cats // In: Neural control locomotion. New York-London, 1976. – P.519-537.
414. Pearson K.G., Rossignol S. Fictive motor patterns in chronic spinal cats // J. Neurophysiol. – 1991. – Vol.66. – P.1874-1887.
415. Pearson K.G., Collins D.F. Reversal of the influence of group Ib afferents from plantaris on activity in medial gastrocnemius muscle during locomotion activity // J. Neurophysiol. – 1993. – Vol.70. – P.1009-1017.
416. Pearson K.G. Proprioceptive regulation of locomotion // Ctw. Opin Neurobiol. – 1995. – Vol.5. – P.786-791.

417. Pearson, K.G. Generating the walking gait: role of sensory feedback // Prog. Brain Res. – 2004. – Vol.143. – P.123–129.
418. Pearson K, Ekeberg O & Büschges A. Assessing sensory function in locomotor systems using neuro-mechanical simulations // Trends Neurosci. – 2006. – Vol.29. – P.625-631.
419. Pierotti D.J., Roy R.R., Gregor R.G., Edgerton V.R. Electromyographic activity of cat hindlimb flexors and extensors during locomotion at varying speeds and inclines // Brain Res. – 1989. – Vol.481. – P.57-66.
420. Philipppson M. L'autonomie et la centralisation dans le systeme nerveux des animaux // Trav. Lab. Physiol. Inst. Solvay, Bruxelles. – 1905. – Vol.7. – P.1-208.
421. Portal JJ, Corio M, Viala D. Localization of the lumbar pools of motoneurons which provide hindlimb muscles in the rabbit // Neurosci Lett. – 1991. – Vol.124. – P.105–107.
422. Pratt CA, Fung J, Macpherson JM. Stance control in the chronic spinal cat // J Neurophysiol. – 1994. – Vol.71. – P.1981–1985.
423. Pratt CA. Evidence of positive force feedback among hindlimb extensors in the intact standing cat // J Neurophysiol. – 1995. – Vol.73. – P.2578–2583.
424. Prochazka A., Mushahwar V. K., McCreery D. B. Neural prostheses //The Journal of physiology. – 2001. – Vol. 533. – №. 1. – P. 99-109.
425. Prochazka A., Sontag K.H. and Wand P. Motor reactions to perturbations of gait: proprioceptive and somesthetic involvement // Neurosci. Lett. – 1978. – Vol.7. – P.35-39.
426. Quiroga RQ, Nadasdy Z, Ben-Shaul Y. Unsupervised spike detection and sorting with wavelets and superparamagnetic clustering // Neural Comput. – 2004. – Vol.16. – P.1661.
427. Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction // Pharmacol Ther. – 2001. – Vol.92. – P.179 –212.

428. Rasmussen S, Chan AK, Goslow GE Jr. The cat step cycle: electromyographic patterns for hindlimb muscles during posture and unrestrained locomotion // *J Morphol.* – 1978. – Vol.155. – P.253–269.
429. Rattay F, Minassian K, Dimitrijevic MR. Epidural electrical stimulation of posterior structures of the human lumbosacral cord. 2. Quantitative analysis by computer modeling // *Spinal Cord.* – 2000. – Vol.38. – P.473–489.
430. Reighard J & Jennings HS. *Anatomy of the cat.* Henry Holf and Company, New York. 1902.
431. Reinkensmeyer, D. J., Aoyagi, D., Emken, J. L., Galvez, J. A., Ichinose, W., Kerdanyan, G., & Edgerton, V. R. Tools for understanding and optimizing robotic gait training // *Journal of rehabilitation research and development.* – 2006. – Vol.43. - №5. – P.657.
432. Remy-Neris O., Barbcau, H., Daniel, O., Boiteau, F., and Busse B. Effects of intrathecal clonidine injection on spinal reflexes and human locomotion in incomplete paraplegic subjects // *Experimental brain research.* – 1999. – Vol. 129. – №. 3. – P. 433-440.
433. Renshaw B. Central effects of centripetal impulses in axons of spinal roots // *J. Neurophysiol.* – 1945. – Vol.9 – №3 – P.191-204.
434. Rexed B.A. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. // *J.Comp.Neurol.* – 1954. – Vol.100. – №3. – P.297-397.
435. Riddell JS, Jankowska E, Eide E. Depolarization of group II muscle afferents by stimuli applied in the locus coeruleus and raphe nuclei of the cat // *J Physiol.* – 1993. – Vol.461. – P.723–741.
436. Roberts TDM. *Neurophysiology of Postural Mechanisms.* London: Butterworths, 1978.
437. Robinson G.A. and Goldberger M.E. The development and recovery of motor function in spinal cats. II. Pharmacological enhancement of recovery // *Exp. Brain Res.* – 1986. – Vol. 62. – P.387–400.

438. Rossignol S. and Julien C. Crossed hindlimb reflexes during fictive locomotion in acute spinal cats // Soc. Neurosci. Abstr. – 1980. – Vol.6. – P.392.
439. Rossignol S. Neuronal control of stereotypic limb movements // In Handbook of physiology (eds. L.B.Rowell and J.T.Sheperd). 1996. P.173-216. Oxford University Press, New York.
440. Rossignol S, Chau C, Brustein E, Giroux N, Bouyer L, Barbeau H, Reader TA. Pharmacological activation and modulation of the central pattern generator for locomotion in the cat // Ann NY Acad Sci. – 1998. – Vol.860. – P.346–359.
441. Rossignol S, Drew T, Brustein E, Jiang W. Locomotor performance and adaptation after partial or complete spinal cord lesions in the cat // In: Peripheral and Spinal Mechanisms in the Neural Control of Movement, edited by Binder MD. Amsterdam: Elsevier. 1999. P. 349–365.
442. Rossignol S, Giroux N, Chau C, Marcoux J, Brustein E, Reader TA. Pharmacological aids to locomotor training after spinal injury in the cat // J Physiol. – 2001. – Vol.533. – P.65–74.
443. Rossignol S. Locomotion and its recovery after spinal injury in animal models // Neurorehabil. Neural. Repair. – 2002a. – Vol.16. – N.2. – P.201-6.
444. Rossignol S., Bouyer L., Bartelem D., Langlet C., Leblond H. Recovery of locomotion in the cat following spinal cord lesions // Brain Res. Rev. – 2002b. – 40. – P.257-266.
445. Rossignol S., Chau C., Giroux N., Brustein E., Bouyer L., Marcoux J., Langlet C., Barthelemy D., Provencher J., Leblond H., Barbeau H., Reader T.A. The cat model of spinal injury // Prog Brain Res. – 2002c. – Vol.137. – P.151-68.
446. Rossignol S, Dubuc R., Gossard J.P, 2006. Dynamic sensorimotor interactions in locomotion // Physiol. Rev. – 2006. – Vol.86. – P.89–154.
447. Rosenzweig, E. S., Courtine, G., Jindrich, D. L., Brock, J. H., Ferguson, A. R., Strand, S. C., & Tuszynski, M. H. Extensive spontaneous plasticity of

- corticospinal projections after primate spinal cord injury // *Nat Neurosci.* – 2010. – Vol.13. - №12. – P.1505-1510.
448. Satterlie R.A., Spencer A.N. Swimming in the pteropod mollusk *Clione limacine*. II. Physiology // *J. of Exper. Biol.* – 1985. – Vol.116. – P.205-222.
449. Sawyer CH, Everett JW, Green JD. The rabbit diencephalon in stereotaxic coordinates // *J Comp Neurol.* – 1954. – Vol.101. – P.801–24.
450. Schomburg ED, Steffens, H., Kniffki, K.D. Contribution of group III and IV muscle afferents to multisensorial spinal motor control in cats // *Neurosci. Res.* – 1999. – Vol.33. – P.195–206.
451. Silverman J, Garnett NL, Giszter SF, Heckman CJ 2nd, Kulpa-Eddy JA, Lemay MA, Perry CK, Pinter M. Decerebrate mammalian preparations: unalleviated or fully alleviated pain? A review and opinion // *Contemp Top Lab Anim Sci.* – 2005. – Vol.44. – P.34–36.
452. Sirota MG, Di Prisco GV, Dubuc R. Stimulation of the mesencephalic locomotor region elicits controlled swimming in semi-intact lampreys // *Eur J Neurosci.* – 2000. – Vol.12. – №11. – P.4081-92.
453. Shah PK, Gerasimenko Y, Shyu A, Lavrov I, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR. Variability in step training enhances locomotor recovery after a spinal cord injury // *Eur J Neurosci.* – 2012. – Vol.36. – P.2054 –2062.
454. Shapovalov AI. Neuronal organization and synaptic mechanisms of supraspinal motor control in vertebrates // *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Volume 72. – Springer Berlin Heidelberg, 1975. – P.1-54.
455. Shapkov IuT, Shapkova EIu, Mushkin AIu. Electrostimulation of the spinal cord as a method of inducing locomotor activity in children (clinical aspects and technical problems) // *Med Tekh.* – 1996. – Vol.4. – P.3-5.
456. Shapkov IuT, Shapkova EIu. Spinal locomotor generators in humans: problems in assessing effectiveness of stimulations. // *Med Tekh.* – 1998. – Vol.4. – P.24-7.

457. Shefchyk S.J., Stein R.B. and Jordan L.M. Synaptic transmission from muscle afferents during fictive locomotion in the mesencephalis cat // J. Neurophysiol. – 1984. – Vol.51. – P.986-997.
458. Shefchyk S., McCrea D., Kriellaars D., Fortier P. and Jordan L. Activity of interneurons within the L4 spinal segment of the cat during brainstem-evoked fictive locomotion // Exp. Brain Res. – 1990. – Vol.80. – P.290-295.
459. Sherrington C.S. The integrative action of the nervous system. 1906. New Haven Yale Univ. Press, London. 433 pp.
460. Sherrington C.S. Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing // J.Physiol. – 1910. – Vol.40. – P.28-121.
461. Shik ML, Severin FV, Orlovsky GN Control of walking and running by means of electrical stimulation of mid-brain // Biophysics – 1966. – Vol. 11. – №. 4. – P. 756–65.
462. Shik ML, Orlovsky GN. Neurophysiology of locomotor automatism // Physiological reviews. – 1976. –Vol. 56. – №. 3. – P.465-501.
463. Smith, J. L., Smith, L. A., Zernicke, R. F., & Hoy, M. Locomotion in exercised and nonexercised cats cordotomized at two or twelve weeks of age //Experimental neurology. – 1982. – Vol. 76. – №. 2. – P. 393-413.
464. Stapley PJ, Ting LH, Hulliger M, Macpherson JM. Automatic postural responses are delayed by pyridoxine-induced somatosensory loss // The Journal of neuroscience. – 2002. – Vol. 22. – №. 14. – P.5803-5807.
465. Stapley PJ, Ting LH, Kuifu C, Everaert DG, Macpherson JM. Bilateral vestibular loss leads to active destabilization of balance during voluntary head turns in the standing cat //Journal of neurophysiology. – 2006. – Vol. 95. – №. 6. – P.3783-3797.
466. Steeves J.D. and Jordan L.M. Localization of a descending pathway in the spinal cord which is necessary for controlled treadmill locomotion // Neuroscience Letters. – 1980. – Vol. 20. – P.283-288.

467. Steeves J.D., Sholomenko G.N., Webster D.M.S. Reticular formation stimulation evokes walking and flying in birds // *Neurobiology of vertebrate locomotion*. Eds. S. Grillner et al. L. MacMillan. – 1986. – P.1-54.
468. Stein P. S. G. Motor systems, with specific reference to the control of locomotion // *Annu. Rev. Neurosci.* – 1978. – Vol.1. – P.61-81.
469. Stewart J. E., Barbeau H., Gauthier S. Modulation of locomotor patterns and spasticity with clonidine in spinal cord injured patients // *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques.* – 1991. – Vol. 18. – №. 3. – P. 321-332.
470. Steward O., Zheng B., Tessier-Lavigne M. False resurrections: distinguishing regenerated from spared axons in the injured central nervous system // *Journal of Comparative Neurology.* – 2003. – Vol. 459. – №. 1. – P.1-8.
471. Sun, F., Park, K. K., Belin, S., Wang, D., Lu, T., Chen, G., & He, Z. Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3 // *Nature.* – 2011. – Vol. 480. – №. 7377. – P.372-375.
472. Szekely G., Czeh G. Localization of motoneurons in the limb-moving spinal cord segments of *Ambystoma* // *Acta Physiol Acad Sci Hung.* – 1967 – Vol.32 - №1. – P.3-17.
473. Takakusaki K, Habaguchi T, Ohtsuka-Sugimoto J, Saitoh K, Sakamoto T. Basal ganglia efferents to the brainstem centers controlling postural muscle tone and locomotion: a new concept for understanding motor disorders in basal ganglia dysfunction // *Neuroscience.* – 2003. – Vol. 119. – №.1. – P. 293-308.
474. Takakusaki K, Saitoh K, Harada H, Kashiwayanagi M. Role of basal ganglia-brainstem pathways in the control of motor behaviors // *Neuroscience research.* – 2004. – Vol. 50. – №. 2. – P.137-151.
475. Tatton WG, Bruce IC. Comment: a schema for the interaction between motor programs and sensory input // *Can. J.Physiol.Pharmacol.* – 1981. – Vol.59. – №7. – P.691-699.

476. Tegner J, Matsushima T, Manira A, Grillner S. The spinal GABA system modulates burst frequency and intersegmental coordination in the lamprey: differential effects of GABAA and GABAB receptors // Journal of neurophysiology. – 1993. – Vol.69. – №.3. – P.647-657.
477. Thuret S., Moon L. D. F., Gage F. H. Therapeutic interventions after spinal cord injury // Nature Reviews Neuroscience. – 2006. – Vol. 7. – №. 8. – P.628-643.
478. Tillakaratne NJ, Mouria M, Ziv NB, Roy RR, Edgerton VR. And Tobin AJ. Increased expression of glutamate decarboxylase (GAD(67)) in feline lumbar spinal cord after complete thoracic spinal cord transection // J. Neurosci. Res. – 2000. – Vol.60. – P.219–230
479. Timoszyk WK, Nessler JA, Acosta C, Roy RR, Edgerton VR. Reinkensmeyer DJ, & de Leon R. Hindlimb loading determines stepping quantity and quality following spinal cord transection // Brain research. – 2005. – Vol.1050. – №. 1. – P.180-189.
480. Townsend MA. Biped gait stabilization via foot placement //Journal of biomechanics. – 1985. – Vol. 18. – №. 1. – P.21-38.
481. Tresch M. C., Kiehn O. Coding of locomotor phase in populations of neurons in rostral and caudal segments of the neonatal rat lumbar spinal cord //Journal of Neurophysiology. – 1999. – Vol. 82. – №. 6. – P.3563-3574.
482. Tresch M. C., Saltiel P., Bizzi E. The construction of movement by the spinal cord //Nature neuroscience. – 1999. – Vol. 2. – №. 2. – P.162-167.
483. Valero-Cabré A., Forés J., Navarro X. Reorganization of reflex responses mediated by different afferent sensory fibers after spinal cord transection //Journal of neurophysiology. – 2004. – Vol. 91. – №. 6. – P.2838-2848.
484. Vallery, H., Veneman, J., Van Asseldonk, E., Ekkelenkamp, R., Buss, M., & Van Der Kooij, H. Compliant actuation of rehabilitation robots // Robotics & Automation Magazine, IEEE. – 2008. – Vol.15. – №. 3. – P.60-69.
485. 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.
486. Vesselkin, N. P., Rio, J. P., Adanina, V. O., & Repérant, J. GABA-and glycine-immunoreactive terminals contacting motoneurons in lamprey spinal cord // *Journal of chemical neuroanatomy*. – 2000. – Vol. 19. – №. 2. – P.69-80.
487. Viala D., Buisseret-Delmas C., Portal J.J. An attempt to localize the lumbar locomotor generator in the rabbit using 2-deoxy-[C14] glucose autoradiography // *Neurosci. Lett.* – 1988. – Vol.86. – P.139-143.
488. Pat. US20130303873-A1; WO2011157714-A1; EP2582289-A1, IPC A 61 B 5/04, A 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.
489. Wachtel S. R., White F. J. The dopamine D₁ receptor antagonist SCH 23390 can exert D₁ agonist-like effects on rat nucleus accumbens neurons // *Neuroscience letters*. – 1995. – Vol.199. – №.1. – P.13-16.
490. Wainberg M., Barbeau H., Gauthier S. The effects of cyproheptadine on locomotion and on spasticity in patients with spinal cord injuries // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. – 1990. – Vol. 53. – №. 9. – P.754-763.
491. Waller W.H. Progression movements elicited by subthalamic stimulation // *J.Neurophysiol.* – 1940. – Vol.3. – P.300-307.
492. Wall P.D. Some unanswered questions about the mechanism and function of presynaptic inhibition // In: Rudomin P., Romo R., Mendell L. (eds)

- Presynaptic inhibition and neural control. Oxford University Press, New York, 1998. – P.303-314.
493. Warren WHJr., Kay BA, Zosh WD, Duchon AP. & Sahuc S, Warren W.H. et al. Optic flow is used to control human walking // *Nature neuroscience*. – 2001. – Vol.4. – №. 2. – P.213-216.
494. Wernig A, Müller S. Laufband locomotion with body weight support improved walking in persons with severe spinal cord injuries // *Spinal Cord*. – 1992. – Vol.30. – №.4. – P.229-238.
495. Wernig, A., Müller, S., Nanassy, A., & Cagol, E. Laufband therapy based on ‘rules of spinal locomotion’ is effective in spinal cord injured persons // *European Journal of Neuroscience*. – 1995. – Vol.7. – №.4. – P. 823-829.
496. Wernig A. “Ineffectiveness” of Automated Locomotor Training // *Archives of physical medicine and rehabilitation*. – 2005. – Vol.86. – №.12. – P.2385-2386.
497. Wessels, M., Lucas, C., Eriks, I. & de Groot, S. Body weight-supported gait training for restoration of walking in people with an incomplete spinal cord injury: a systematic review // *Journal of Rehabilitation Medicine*. – 2010. – Vol.42. – №.6. – P.513-519.
498. Wetzel M.C. and Stuart D.G. Ensemble characteristics of cat locomotion and its neuronal control // *Prog. Neurobiol.* – 1976. – Vol.7. – P.1-98.
499. Whelan P.J. Control of locomotion in the decerebrate cat // *Progr. Neurobiol.* – 1996. – Vol.49. – P.481-515.
500. Whelan P., Bonnot A., O'Donovan M. J. Properties of rhythmic activity generated by the isolated spinal cord of the neonatal mouse // *Journal of neurophysiology*. – 2000. – Vol.84. – №.6. – P.2821-2833.
501. Winter, D.A., MacKinnon, C.D., Ruder, G.K. & Wieman, C. An integrated EMG/biomechanical model of upper body balance and posture during human gait // *Progress in brain research*. – 1992. – Vol.97. – P.359-367.
502. Wirz M., Zemon D. H., Rupp R., Scheel A., Colombo G., Dietz V., & Hornby T.G. Effectiveness of automated locomotor training in patients with

- chronic incomplete spinal cord injury: a multicenter trial // Archives of physical medicine and rehabilitation. – 2005. – Vol.86. – №4. – P.672-680.
503. Zelenin PV, Deliagina TG, Grillner S, Orlovsky GN. Postural control in the lamprey: a study with a neuro-mechanical model // Journal of neurophysiology. – 2000. – T.84. – №.6. – P.2880-2887.
504. Zelenin PV, Beloozerova IN, Sirota MG, Orlovsky GN, Deliagina TG. Activity of red nucleus neurons in the cat during postural corrections // The Journal of Neuroscience. – 2010. – Vol.30. – №.43. – P. 14533-14542.
505. Zelenin PV, Deliagina TG, Orlovsky GN, Karayannidou A, Stout EE, Sirota MG, Beloozerova IN. Activity of motor cortex neurons during backward locomotion // Journal of neurophysiology. – 2011. – Vol.105. – №. 6. – P.2698.
506. Zelenin PV, Musienko PE, Gerasimenko YP, Orlovsky GN, Deliagina TG. Mechanisms of balance control during locomotion // Soc Neurosci Abstr 39. 2013. 832.06.
507. Zoli M, Jansson A, Sykova E, Agnati LF, Fuxe K. Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology // Trends in pharmacological sciences. – 1999. – Vol.20. – №.4. – P.142-150.
508. Zomlefer MR, Provencher J, Blanchette G & Rossignol S. Electromyographic study of lumbar back muscles during locomotion in acute high decerebrate and in low spinal cats // Brain research. – 1984. – Vol.290. – №.2. – P.249-260.
509. Zörner, B., Filli, L., Starkey, M. L., Gonzenbach, R., Kasper, H., Röthlisberger, M., & Schwab, M. E. Profiling locomotor recovery: comprehensive quantification of impairments after CNS damage in rodents // Nature methods. – 2010. – Vol.7. – №9. – P.701-708.