

На правах рукописи

ВЕЩИЦКИЙ

АЛЕКСАНДР АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ MORFOFUNKЦИОНАЛЬНОЙ АРХИТЕКТУРЫ
СЕНСОМОТОРНЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ СПИННОГО МОЗГА КОШКИ,
ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ХОДЬБУ В РАЗНЫХ НАПРАВЛЕНИЯХ**

03.03.01 – физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург-2019

Работа выполнена в лаборатории нейроморфологии и лаборатории физиологии движения
Федерального государственного учреждения науки «Института физиологии
им. И.П. Павлова Российской академии наук»

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:

кандидат биологических наук

Меркульева Наталья Сергеевна

доктор медицинских наук

Мусиенко Павел Евгеньевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Обухов Дмитрий Константинович

доктор биологических наук, профессор кафедры
цитологии и гистологии,

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
Государственный Университет»

Мейгал Александр Юрьевич

доктор медицинских наук, профессор,
заведующий лабораторией новых методов
физиологических исследований,

Институт высоких биомедицинских технологий
ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный
университет»

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Федеральное государственное учреждение науки
«Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова Российской академии наук»

Защита диссертации состоится « » _____ 2019 г. в _____ часов на заседании
Диссертационного Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций
(Д 002.020.01) при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, г. Санкт-
Петербург, наб. Макарова, 6).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им.
И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6) и на сайте <http://www.infran.ru/>

Автореферат разослан « » _____ 2019 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета

доктор биологических наук

Ордян Наталья Эдуардовна

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Передвижение в пространстве является неотъемлемой частью успешного существования животного в окружающей его среде. Активное перемещение сопровождается выполнением сложнейших двигательных задач, таких как координированная ходьба, контроль скорости и направления передвижения (Gerasimenko et al., 2005, 2006; Edgerton et al., 2008; Musienko et al., 2009, 2010). Большинство позвоночных способны к локомоции в разных направлениях. Однако, исторически так сложилось, что основной акцент при изучении в сфере локомоции был направлен на всестороннее исследование ходьбы вперед (ХВ), как наиболее типичного, выученного и эволюционно закрепленного типа перемещения. Локомоция в других направлениях, в частности ходьба назад (ХН), используемая для уникальных эволюционно значимых двигательных актов (избегание опасности, необходимость развернуться или пятиться и др.), практически не изучена. При этом существует ряд работ, в которых доказывается, что ходьба назад увеличивает способность животных и пациентов с различного рода моторными нарушениями к восстановлению локомоторных функций (Neptune, Kautz, 2000; Yang et al., 2005; Takami, Wakayama, 2010; Kim et al., 2013; Moriello et al., 2013; Foster et al., 2016). Таким образом, изучение механизмов локомоции в направлении назад имеют не только фундаментальное, но и прикладное значение.

Известно, что инициация ходьбы в направлении вперед может быть вызвана не только активацией супраспинальных локомоторных структур, но и эпидуральной стимуляцией (ЭС) спинного мозга (Iwahara et al., 1991; Gerasimenko et al., 2003). Недавно выявлено, что у децеребрированных животных ходьба назад также может быть вызвана ЭС области поясничных сегментов спинного мозга, но не при воздействии электрическим током на супраспинальные локомоторные области (Musienko et al., 2007; Musienko et al., 2012).

Запуск ходьбы при стимуляции спинного мозга возможен за счет активации специфических спинальных локомоторных сетей, называемых центральным генератором паттернов (ЦГП) (Cazalets et al., 1995; Dimitrijevic et al., 1998; Duysens, Crommert, 1998; Bogacheva et al., 2009; Musienko et al., 2012; Frigon, 2011; Kiehn et al., 2017). В основе формирования данного понятия лежат работы С.С. Шеррингтона о цепном рефлексе (Sherrington, 1910) и Т.Г. Брауна, предложившего основную концепцию ЦГП – так называемую «модель полуцентров» (Brown, 1914), позже получившую свое развитие в трудах советских ученых М.Л. Шика и Г.Н. Орловского (Shik, Orlovsky, 1976; Orlovsky et al., 1999) и ряда выдающихся зарубежных исследователей – G. Székely, S. Grillner,

V.R. Edgerton, K.G. Pearson и др. (Székely, 1965; Kling, Székely, 1968; Grillner, 1975, 1981; Pearson, Duysens, 1976; Edgerton et al., 1976; Pearson, 1995).

Согласно современным представлениям, ЦГП имеет двухуровневую структуру: первый уровень отвечает за формирование ритма чередований движений конечностями при ходьбе, второй – за образование конкретного моторного паттерна, т.е. последовательности активации мышц, обеспечивающих направление движения конечности в зависимости от сенсорного входа (Lafreniere-Roula, McCrea, 2005; Rybak et al., 2006 а, б; Brownstone, Wilson, 2008; McCrea, Rybak, 2008; Guertin, 2009; Rybak et al., 2015). Однако, морфофункциональная организация сенсомоторных нейронных сетей, формирующих компоненты ЦГП, во многом неясна. Существует целый ряд вопросов относительно клеточного состава и функционального значения отдельных элементов спинальных сетей, их распределения в спинном мозге, связей между нейронами, возможного влияния на нейронные сети при заболеваниях и травмах нервной системы.

Цели и задачи исследования. Целью настоящего исследования является изучение морфофункциональной организации сенсомоторных нейронных сетей спинного мозга кошки, контролирующей ходьбу в направлении вперед и назад.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

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

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

ламинарное и региональное распределение нейронов, иммунопозитивных к кальций-связывающим белкам (кальбиндину и парвальбумину) в сегментах L1-S1 спинного мозга кошки.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Триггерные зоны, стимуляция которых вызывает активность нейронных сетей, обеспечивающих ходьбу задних конечностей в направлении вперед и назад, по-разному распределены вдоль rostroкаудальной оси пояснично-крестцового утолщения спинного мозга.

2. Паттерн распределения интернейронов, экспрессирующих ген раннего ответа *c-fos* после эпидуральной стимуляции, определяется направлением вызванной локомоции.

3. Области серого вещества спинного мозга, характеризующиеся наибольшим числом нейронов, активируемых при локомоции, содержат кластеры интернейронов, иммунопозитивных к кальций-связывающим белкам (кальбиндину и парвальбумину).

Теоретическая и практическая значимость работы. Картирование пояснично-крестцового утолщения спинного мозга (сегменты L3-S1) посредством эпидуральной электрической стимуляции, позволило определить зоны, электрическое воздействие на которые вызывает ходьбу в разных направлениях (вперед и назад), а также опосредует качество вызываемой ходьбы. Полученные данные могут быть использованы для создания наиболее оптимальной пространственной конфигурации расположения электродов в спинальных имплантах. Данная задача является актуальной, так как небольшие по размеру импланты обладают ограниченным пространством для размещения проводящих дорожек и точек стимуляции.

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

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

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертации были представлены на 12 российских и международных конференциях: I научной конференции с международным участием, посвященной 70-летию Ярославской государственной медицинской академии (Ярославль, 2014); Neuronus 2015 IBRO & IRUN Neuroscience Forum (Poland, Kragow, 2015); всероссийской конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, (Санкт-Петербург – Колтуши, 2015); международной научной конференции Научного Парка СПбГУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину», (Санкт-Петербург, 2015); XII международной междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2016); VI всероссийской с международным участием конференции по управлению движениями «Motor Control-2016» (Казань, 2016); II научной конференции с международным участием, посвященной 70-летию Ярославской государственной медицинской академии (Ярославль, 2016); FENS Regional Meeting (Hungary, Pécs, 2017); the XIX international conference on neuroinformatics «Advances in neural computation, machine learning, and cognitive research, studies in computational intelligence» (Russia, Moscow, 2017); XIII международной междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2017); XXIII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017), всероссийской молодежной конференции с международным участием «Современные аспекты интегративной физиологии» (Санкт-Петербург, 2018).

Личный вклад автора. Материалы, вошедшие в данную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями. Автор лично принимал участие в разработке и постановке экспериментов по выявлению локомоторных спинальных нейронных сетей, анализе электромиограмм и кинематических характеристик конечностей, анатомическом анализе посмертного материала, иммуногистохимическом выявлении антигенов на срезах спинного мозга, морфологическом анализе срезов посредством световой микроскопии, разработке цифровых методов обработки и анализа морфологических данных.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение), выводов и списка литературы. Работа изложена на 214 страницах печатного текста, содержит 6 таблиц и иллюстрирована 52 рисунками. В списке литературы приведено 532 источника.

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 24 публикациях, из них 6 – научные статьи в рецензируемых журналах.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы. Исследование проведено на 20 нормально пигментированных беспородных взрослых кошках. Постановка опытов осуществлялась на острой модели взрослого децеребрированного животного. Все хирургические процедуры проводили под общим наркозом (смесь изофлюрана (2-4%) и кислорода). Голову, позвоночник и таз фиксировали на жесткой раме стереотаксической установки. Посредством трепанации черепа и последующего удаления коры открывали доступ к четверохолмиям среднего мозга, после чего производили перерезку ствола на преколликулярно-постмамиллярном уровне. Остановку кровотечения в черепной коробке обеспечивали установкой плотной тампонады. Для последующей эпидуральной стимуляции спинного мозга производили ламинэктомию на уровне 4-5 поясничных позвонков. Последующие эксперименты начинали через 2-3 часа (период покоя). Для предотвращения развития отека и воспалительных процессов, в течение всего эксперимента каждые 60 минут внутримышечно вводили по 0,5 мл преднизолона.

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

Исследование спинальных нейронных сетей, задействованных в контроле локомоции в разных направлениях, проводили с помощью иммуногистохимического метода визуализации продукта экспрессии раннего гена *c-fos*. Экспериментальный протокол состоял из 18-22 стимуляционных сессий по 1-2 минуты, во время которых животное осуществляло шагательные движения по ленте тредбана. Период отдыха между сессиями составлял 2-4 минуты. Общее время всех стимуляционных сессий и периодов между ними составляло 1,5-2 часа – оптимальное для достижения максимальной концентрации белка *c-Fos* в ядрах активных нейронов (Morgan, Curran, 1991).

Регистрацию электрической активности мышц задних конечностей проводили после имплантации биполярных электромиографических (ЭМГ) электродов билатерально в икроножную мышцу (*m. gastrocnemius lateralis*, разгибательная мышца голеностопного сустава) и большеберцовую мышцу (*m. tibialis*, сгибательная мышца голеностопного сустава). Сигналы от ЭМГ электродов были дифференциально усилены (A-M Systems,

model 1700, с частотой пропускания 30 Гц–5 кГц), их дальнейший анализ проводили в программном комплексе MATLAB R2017b. Регистрацию силовых опорных реакций осуществляли с помощью сенсоров силовых нагрузок (1002K, VISHAY), располагаемых под лентой тредбана. Регистрацию кинематики движений проводили: 1) с помощью потенциометров, прикрепленных к лодыжке экспериментального животного, 2) посредством видеорегистрации (25 кадр/сек, видеокамеры располагались сзади и сбоку). Анализ полученных видеозаписей осуществляли покадрово в программном комплексе VirtualDubMod 1.5.10.1, позволяющему выявлять угловые изменения в суставах задней конечности, возникающие при сгибании и разгибании бедра, колена и лодыжки в различные моменты локомоторного цикла – периоды переноса и опоры.

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

По окончании перфузии проводили анатомическое препарирование, в ходе которого обеспечивали доступ к дорзальным корешкам и спинномозговым ганглиям, по которым определяли границы сегментов, включающим корешковую часть и прилежащую к ней рострально бескорешковую. На основе данных о границах сегментов определяли точное положение ламинэктомии и точки приложения эпидурального электрода.

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

Выявление продукта экспрессии гена *c-fos* и кальций-связывающих белков (кальбиндина и парвальбумина) осуществляли с помощью стандартного непрямого иммуногистохимического метода на поперечных и горизонтальных свободноплавающих срезах сегментов L1-S1.

Цифровую обработку срезов антигенами проводили на компьютерной установке, оснащенной световым микроскопом Olympus CX31 (Olympus Corporation, Japan), программным комплексом digiCamControl и камерой Nikon (D3200, Nikon Corporation, Japan). Морфологический анализ оцифрованных изображений срезов производили в программной среде ImageJ Fiji (Schindelin et al., 2012).

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

Для выявления в сером веществе областей колокализации нейронов, иммунопозитивных к разным маркерам, Total-изображения с черно-белым градиентом инвертировали по цветам и придавали бело-черному градиенту разные значения: красный – для c-Fos-иммунопозитивных клеток, зеленый – для нейронов, иммунопозитивных к кальций-связывающим белкам. Далее, на основе реперных точек два Total-изображения (черно-красное и черно-зеленое) объединяли в одно, используя режим «перекрывтия» слоев, получая таким образом черно-желтые градиентные изображения, отражающие зоны серого вещества, в которых наблюдается пересечение двух градиентов (красного и зеленого). Для получения зелено-красного градиента, отражающего степень перекрывтия двух меток, черно-желтое изображение обесцвечивали, инвертировали цвета и придавали полученному черно-белому градиенту соответствующие значения.

Обработку данных проводили с использованием пакета статистических программ Prism7 (GraphPad Software, Inc.). Статистический анализ данных проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни и критерия иерархической линейной модели (Aarts et al., 2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вызов локомоции в направлении вперед и назад при эпидуральной стимуляции различных пояснично-крестцовых сегментов спинного мозга. Картирование спинного мозга посредством ЭС сегментов L2-S1 выявило, что триггерные зоны, запускающие активность нейронных сетей, обеспечивающих ходьбу задних конечностей в направлении вперед и назад, распределены в спинном мозге по-разному (рис. 1). При ЭС сегмента L2 у всех исследуемых животных (n=3) не наблюдалось инициации ходьбы ни в одном из направлений. ЭС сегмента L3 у 67% животных (у 2 из 3) вызывала ХВ, но ни у одного – ХН. ЭС сегментов L4 (n=8), L5 (n=15), L6 (n=15), L7 (n=12) и S1 (n=5) вызывала локомоцию

вперед у всех тестируемых объектов. Однако, стимуляция сегментов L4 и S1 не приводила к инициации ХН ни у одного из животных (соответственно, $n=8$ и $n=6$). ХН была выявлена только при ЭС сегментов L5-L7. В сегменте L5 стимуляция только каудальной части вызывала ХН: у 38% животных (у 3 из 8). Стимуляция роstralной части сегмента L6 вызывала ходьбу назад у 50% животных (4 из 8), средней – у 50% (5 из 10) и каудальной – у 80% (8 из 10). Стимуляция роstralной части сегмента L7 вызывала ходьбу назад у 44% кошек (4 из 9), средней – у 33% (2 из 6) и каудальной – у 33% (2 из 6). Таким образом, область спинного мозга, ЭС которой вызывает оба вида ходьбы, занимает достаточно узкую часть пояснично-крестцового отдела: сегменты L5-L7.

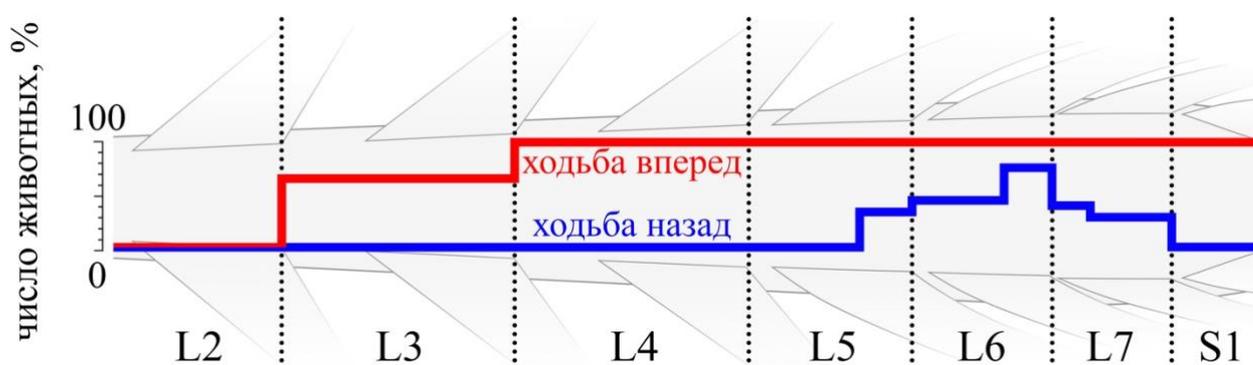


Рис. 1. Картирование спинного мозга. По оси ординат – процентное выражение числа животных, ЭС спинного мозга которых в обозначенном сегменте вызывала ХВ (красная линия) и ХН (синяя линия), по оси абсцисс – номера сегментов спинного мозга.

Ранее в работах на животных (Barthélemy et al., 2007; Courtine et al., 2009) и людях (Dimitrijevic et al., 1998; Sharikov, Sharikova, 1998) было показано, что ЭС спинного мозга приводит к активации спинальных локомоторных сетей. Согласно современным представлениям, эффект, вызываемый ЭС, основан на стимуляции миелинизированных сенсорных волокон дорзальных корешков, в итоге приводящей к активации спинальных локомоторных сетей (Capogrosso et al., 2013). У кошки ходьба, вызванная посредством ЭС спинного мозга, впервые была продемонстрирована Т. Iwahara с коллегами в работе 1992 года, где авторы описывают возможность запуска ходьбы при стимуляции любого сегмента от L1 до S1. В настоящей работе активация ХВ у децеребрированной кошки возникает при стимуляции более узкого участка спинного мозга (сегментов L3-S1), что, вероятно, может быть объяснено параметрами стимуляции и способами определения анатомических границ сегментов спинного мозга.

Особенности кинематики локомоторных движений при ходьбе в разных направлениях. Сравнение кинематических особенностей движений конечностей при ХВ и ХН проводили при ЭС сегмента L6 – оптимального для вызова ходьбы в обоих направлениях. Данное сравнение проводили посредством анализа видеозаписей, на которых фиксировали значения углов в основных суставах конечности: тазобедренном,

коленном и голеностопном (рис. 2 Г). В ходе локомоторного цикла при ХН задние конечности выполняют движения, направленные в противоположную сторону по сравнению ХВ: во время фазы опоры конечность двигается из крайней задней позиции (Е1) в крайнюю переднюю (Е3), во время фазы переноса конечность возвращается в крайнюю заднюю позицию (Е1) (Buford et al., 1990). Оценку углов проводили в момент максимального сгибания и разгибания конечности (рис. 2 Г). При максимальном сгибании в ходе локомоторного цикла для обоих видов ходьбы значения углов во всех суставах схожи, достоверные различия наблюдаются только при максимальном разгибании. Полученные данные свидетельствуют о том, что кинематика конечностей при ХВ и ХН существенно отличаются: при ХН перемещение конечности реализуется за счет работы коленного и голеностопного суставов (рис. 2 Б, В), в то время как работа тазобедренного сустава значительно снижена (рис. 2 А). В результате этого, длина шага при ХН значительно меньше, чем при ХВ (рис. 2 Д), хотя его длительность выше (рис. 2 Е).

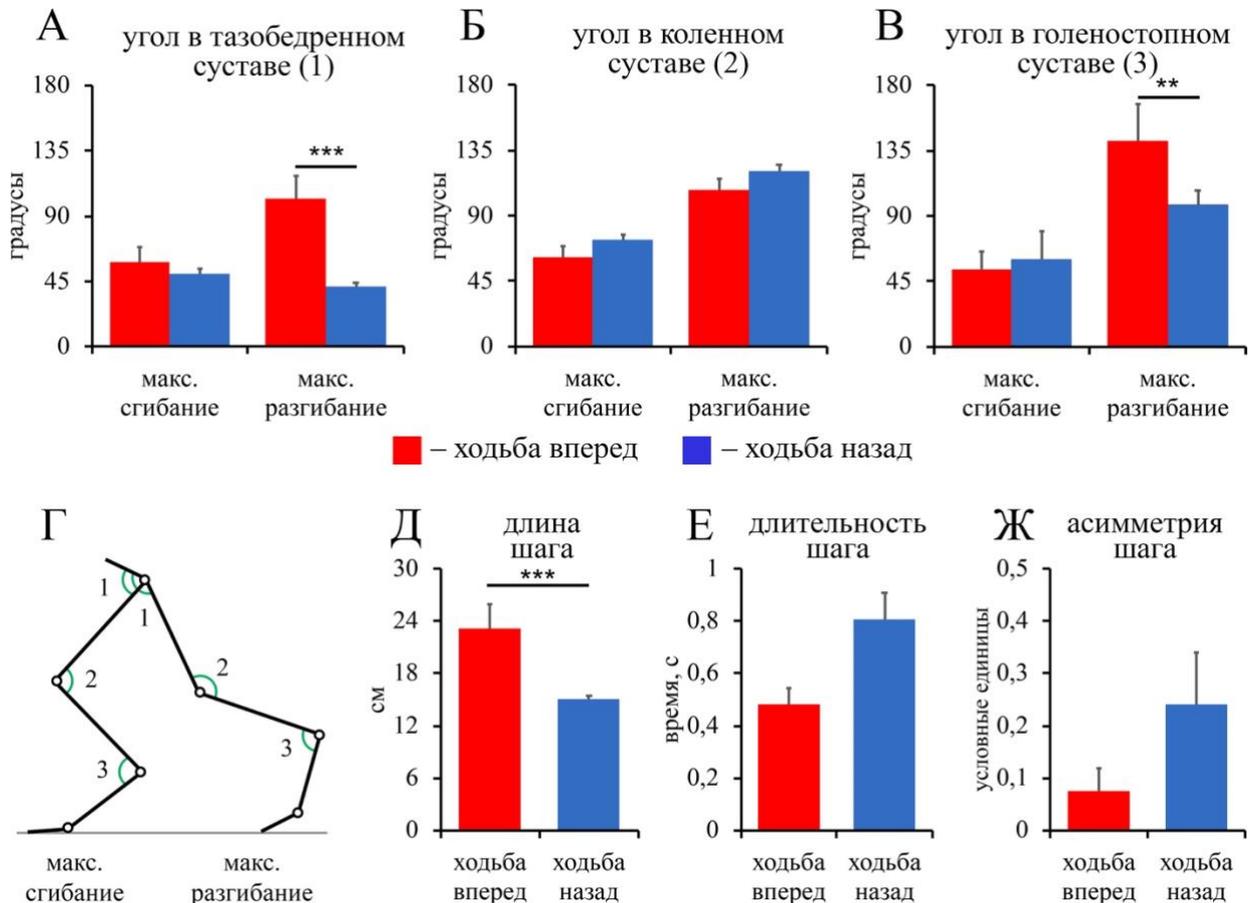


Рисунок 2. Сравнение кинематических характеристик задних конечностей при ходьбе вперед и назад. А – усредненные значения углов в тазобедренном суставе; Б – усредненные значения углов в коленном суставе; В – усредненные значения углов в голеностопном суставе; Г – измеряемые углы конечности в момент ее максимального сгибания и разгибания (1 – тазобедренный сустав, 2 – коленный сустав, 3 – голеностопный сустав); Д – усредненная длина шага; Е – усредненная длительность шага; Ж – коэффициент асимметрии. Представлены средние значения + стандартная ошибка. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Одним из важнейших афферентных сигналов, участвующих в запуске фазы переноса при ХВ является активация мышечных веретен мышц сгибателей бедра во время фазы опоры (Rossignol et al., 2006). Полагаем, что при ХН афферентные сигналы о сгибании бедра (от мышечных веретен мышц разгибателей бедра) в конце фазы опоры могут участвовать в инициации фазы переноса. Таким образом, мотонейронные пулы, иннервирующие мышцы разгибатели, и афференты от них могут представлять собой элементы сетей, определяющие движение шага в горизонтальной плоскости при ХН (Musienko et al., 2012). Данные элементы содержатся в сегментах L6-L7, стимуляция которых вызывает ХН (Hamm et al., 1985; Vanderhorst, Holstege, 1997). При этом, ХН характеризуется значительно меньшей симметричностью (длина шага одной конечности отличается от таковой для другой, рис. 2 Ж), что может быть объяснено слабым развитием синхронизирующих элементов локомоторных сетей, контролирующих ХН, как эволюционно менее развитого типа передвижения.

Распределение c-Fos-иммунопозитивных нейронов по функциональным областям серого вещества при вызванной ходьбе в разных направлениях. С помощью модифицированного нами метода регионального деления серого вещества спинного мозга кошки (рис. 3 А), предложенного М. Matsushita в 1979 году для изучения распределения интернейронных популяций, были проанализированы поперечные срезы сегментов L4-S1 (ЭС которых приводит к активации локомоторных сетей в 100% случаев – см. выше) спинного мозга животных с вызванной ХВ (n=3) и ХН (n=3) после иммуногистохимического выявления белка экспрессии раннего гена *c-fos* – маркера нейрональной активности. Подсчет c-Fos-иммунопозитивных (FOS+) нейронов осуществляли с левой и правой половины серого вещества в каждой из 6 зон интереса: дорзолатеральной (ДЛ), дорзомедиальной (ДМ), центрлатеральной (ЦЛ), центромедиальной (ЦМ), вентролатеральной (ВЛ) и вентромедиальной (ВМ). Таким образом, были выявлены достоверные отличия между ХВ и ХН, а именно большее число FOS+ нейронов при ХН в сегментах L6 и L7, в частности, во всех зонах, за исключением ДМ, в сегменте L6 и в промежуточной (ЦМ и ЦЛ) и вентролатеральной (ВЛ) зонах сегмента L7 (рис. 3 Б). Полагаем, выявленные таким образом нейроны являются элементами локомоторного ЦГП, участвующими в формировании соответствующего порядка активации мышц при ХН.

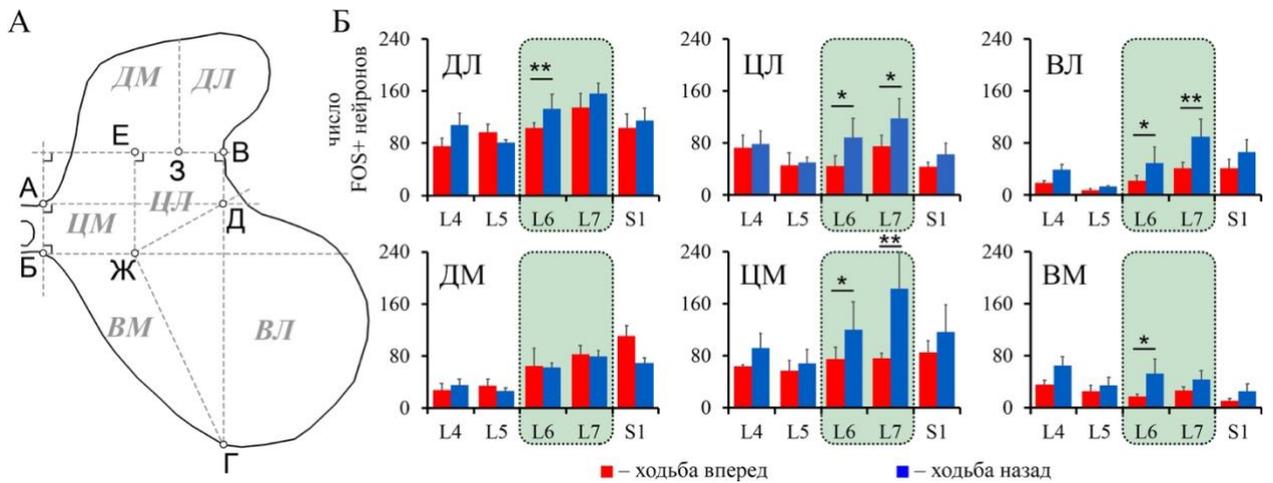


Рисунок 3. Распределение FOS+ нейронов в сером веществе сегментов L4-S1. А – модифицированный алгоритм деления серого вещества на зоны интереса; Б – среднее число FOS+ нейронов в каждой зоне интереса серого вещества. Для всех графиков представлены среднее значение + стандартное отклонение, по оси ординат – абсолютное число FOS+ нейронов, по оси абсцисс – номера сегментов. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Распределение нейронов, иммунопозитивных к кальций-связывающим белкам. Спинальный контроль локомоции обеспечивается разнородной популяцией интернейронов серого вещества (Kiehn, 2006). В настоящем исследовании по выявлению FOS+ нейронов было установлено, что при локомоции, вызванной ЭС, специфические сети интернейронов активируются во всех областях серого вещества (см. выше). Однако, вопрос о том, какие именно типы интернейронов формируют сети, способные обеспечивать локомоторную активность и ее модуляцию, остается открытым. Хорошо известными маркерами разных популяций интернейронов являются кальций-связывающие белки (Fournet et al., 1986; Antal et al., 1990, 1991; Celio, 1990; Ince et al., 1993; Ren et al., 1993; Megías et al., 2003; Anelli, Heckman, 2005; Morona et al., 2006 а, б). Мы решили посмотреть, как распределены в сером веществе интернейроны разных типов и не будет ли выявлено какого-либо пространственного пересечения с интернейронами, иммунопозитивными к белку c-Fos. Одними из наиболее изученных кальций-связывающих белков являются кальбиндин и парвальбумин (Vaimbridge et al., 1992). Мы провели подробный анализ распределения данных кальций-связывающих белков и выявили основные зоны их локализации.

Кальбиндин. Кальбиндин-иммунопозитивные (КЛБ+) нейроны представлены преимущественно в дорзальных рогах (пластины I-III) (рис. 4 А) в виде мелких веретеновидных клеток; в остальных пластинах выявлено еще 10 морфотипов одиночных или сгруппированных в кластеры КЛБ+ нейронов (табл. 1), но в значительно меньшем объеме (рис. 4 А).

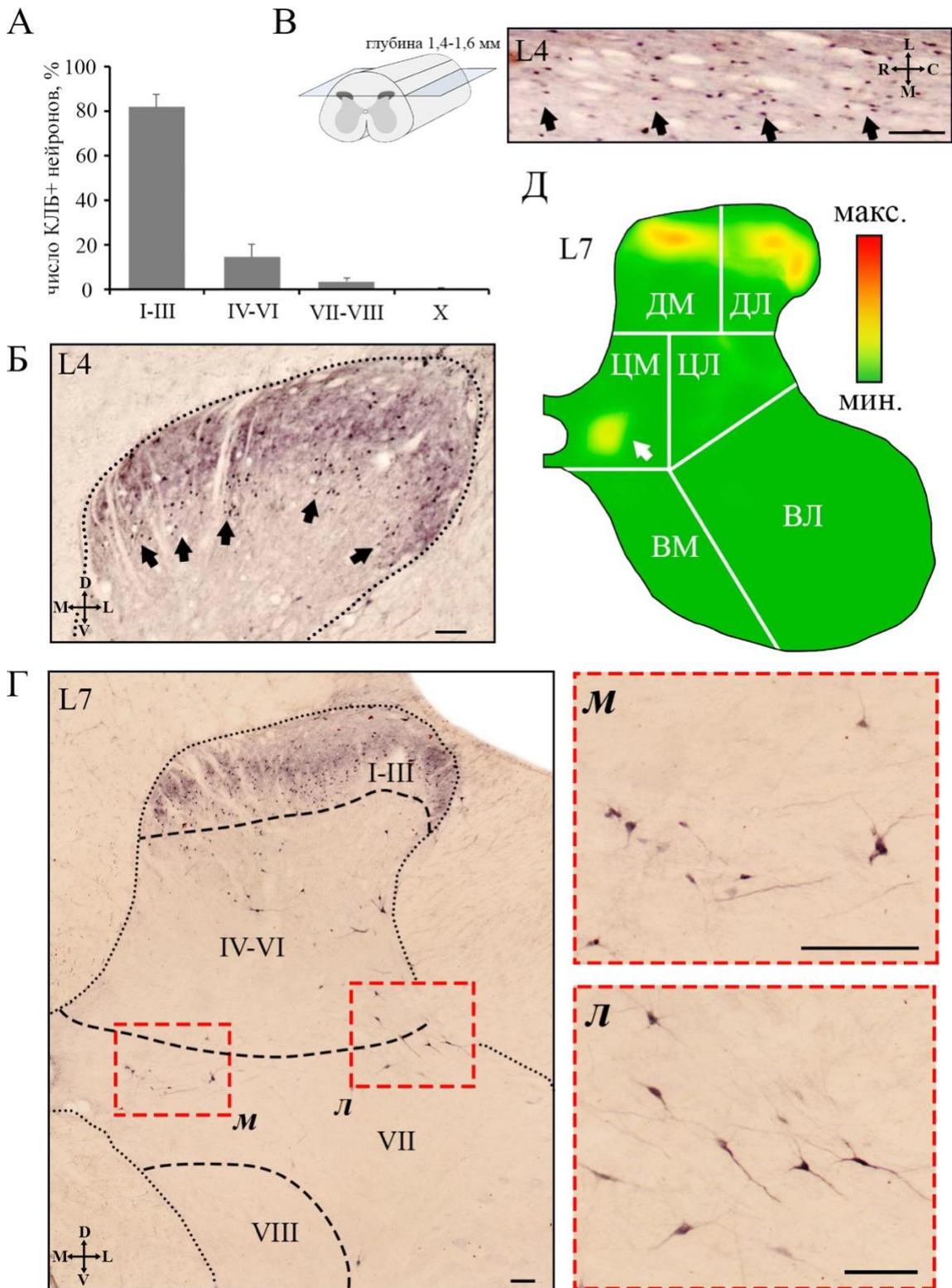


Рисунок 4. Распределение КЛБ+ нейронов. А – усредненное по всем животным и сегментам процентное распределение КЛБ+ нейронов по группам пластин серого вещества спинного мозга (среднее значение + стандартное отклонение); Б – колонки КЛБ+ нейронов пластин II-III на поперечном срезе (черные стрелки); В – колонки КЛБ+ нейронов пластин II-III на горизонтальном срезе (черные стрелки); Г – кластеры КЛБ+ нейронов промежуточного серого вещества (м – медиальная кластер, л – латеральный кластер); Д – сопоставление карт плотности КЛБ+ и FOS+ нейронов на примере сегмента L7 (зелено-красный градиент отражает степень колокализации разных маркеров от минимального к максимальному, соответственно). Буквами D (dorsal), L (lateral), V (ventral), M (medial), R (rostral) и C (caudal) обозначены направления. Калибровочный маркер равен 100 мкм.

В настоящей работе впервые выявлено группирование КЛБ+ нейронов в дорзальных рогах. Так, на некоторых поперечных срезах спинного мозга сегментов L3-L6 в пластинах II-III обнаружено от 3 до 6 колонко-подобных структур, образованных мелкими веретеновидными КЛБ+ нейронами (рис. 4 Б). Периодичность проявления данных колонок вдоль длинной оси спинного мозга наиболее очевидна на горизонтальных срезах (рис. 4 В). Ранее (Scheibel, Scheibel, 1968), с помощью окрашивания нервных клеток по методу Гольджи, было показано, что для нейронов пластин II-III характерна тенденция к колончатому расположению. В других работах продемонстрировано, что центральные проекции от нейронов дорзальных ганглиев формируют в дорзальных рогах патчи, ориентированные в медиолатеральном и rostroкаудальном направлениях (Rivero-Melián, Grant, 1990; Takahashi et al., 2007). Локализация, размер и число данных патчей позволяют предположить, что колонки КЛБ+ нейронов пластин II-III могут иметь связи с дерматомами задних конечностей и являться элементами кожной соматотопической организации в дорзальных рогах.

Среди остальных типов КЛБ+ нейронов наибольший интерес представляют два специфических кластера клеток, локализованных на границе пластин VI и VII (в зонах ЦМ и ЦЛ) (рис. 4 Г). Медиально расположенный кластер состоит из средних по размеру КЛБ+ нейронов (рис. 4 Г, м), латеральный кластер сформирован более крупными (рис. 4 Г, л). Однако, при сопоставлении карт плотности КЛБ+ и FOS+ нейронов, было выявлено, что высокая степень колокализации между ними во всех анализируемых сегментах (L4-S1) (помимо дорзальных рогов) наблюдается только в области медиального кластера (в зоне ЦМ) (рис. 4 Д, белая стрелка). В работах E. Jankowska с коллегами (1967 а, б), выполненных на спинальных кошках, в данной зоне выявлены скопления интернейронов по-разному активируемые в ответ на стимуляцию афферентов сгибательного рефлекса. Данные типы интернейронов могут быть элементами локомоторного ЦГП, обеспечивающими реципрокные взаимодействия между мотонейронами-антагонистами (Jankowska et al., 1967 б). У мышей схожими функциями обладает часть нейронов эмбрионального класса V0, локализованная в медиальной части промежуточного серого вещества (Griener et al., 2015). Данные клетки имеют моносинаптические контакты с мотонейронами контралатеральной половины спинного мозга, благодаря чему участвуют в координации движений между левой и правой конечностью (Lanuza et al., 2004). Также у мышей на границе пластин VI, VII и X выявлена часть клеток V3 класса, связанные с формированием устойчивого и сбалансированного моторного ритма, обеспечивающего симметричность движения левой и правой конечностей (Zhang et al., 2008). Помимо этого, в работе J.S. Riddell и M. Hadian (2000), в обозначенной области серого вещества сегментов L6-L7 спинного мозга кошки

были выявлены скопления интернейронов, на которых сходится афферентная информация от мышечных афферентов группы II.

Таблица 1. Типы КЛБ+ нейронов и их характеристики. Мелкие нейроны – площадь сомы <200 мкм², средние нейроны – площадь сомы 200-450 мкм², крупные нейроны – площадь сомы >450 мкм².

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

Парвальбумин. В настоящей работе выявлено 6 морфотипов парвальбумин-иммунопозитивных (ПРВ+) нейронов (табл. 2), локализованных во всех пластинах серого вещества кроме IX и X. Наибольший интерес представили скопления нервных клеток вентромедиальной части пластин V-VI в сегментах L5-S1 (рис. 5 Б) (в значительной степени колокализующихся с FOS+ нейронами, белая стрелка на рис. 5 В), положение которых сходно с локализацией ядер Кларка, находящихся в более ростральных сегментах (L1-L4) и характеризующихся ярко-окрашенным ПРВ+ нейропилем (рис. 5 А). Ядра Кларка исторически полагаются основным источником дорзального спинномозжечкового тракта, передающего сенсорную информацию от проприорецепторов задней части туловища и задних конечностей в мозжечок. Мы предположили, что кластеры ПРВ+ нейронов пластин V-VI в сегментах L5-S1, будучи гомологичными ядрам Кларка, также могут являться элементами общей спинальной проприоцептивной системы. По-видимому, проприоцептивные нейроны изначально закладываются в спинном мозге в виде единой

системы, охватывающей весь поясничный отдел. Дальнейшее ее разбиение на подсистемы, по-видимому, связано с усложнением в ходе онтогенеза двигательных паттернов животного, для чего необходим более тонкий контроль со стороны нервной системы, и как следствие развитие мото- и интернейронного аппарата. В результате этого в пределах поясничного отдела происходит разделение общей проприоцептивной системы на морфологически различные составляющие: 1) ядра Кларка, локализующиеся в сегментах L1-L4 и 2) группы проприоцептивных нейронов сегментов L5-S1.

В вентральных рогах выявлено два типа мультиполярных ПРВ+ нейронов: мелкие, лишенные дендритной метки, и крупные, обладающие длинными дендритами. В сегментах L1-L4 и S1 ПРВ+ клетки локализованы неупорядоченно (рис. 5 Г), в сегментах L5-L7 – занимают место вокруг мотонейронов пластин IX, формируя 2 кластера клеток: медиальный и латеральный (рис. 5 Д). Локализация медиального кластера схожа с положением интернейронов Реншоу, которые посредством возвратного торможения участвуют в механизме стабилизации частоты разрядки α -мотонейронов (Renshaw, 1946; Eccles et al., 1954; Windhorst, 2007; Alvarez et al., 2013). Клетки латерального кластера, вероятно, относятся к группе Ia интернейронов, передающих сенсорную информацию от рецепторов группы Ia к мотонейронам (Jankowska, Lindstrom, 1972), обеспечивая реципрокное торможение мышц антагонистов (Hultborn et al., 1971; Jankowska, 1992; Jankowska, 2013; Côté et al., 2018).

Таблица 2. Типы ПРВ+ нейронов и их характеристики. Мелкие нейроны – площадь сомы <200 мкм², средние нейроны – площадь сомы 200-450 мкм², крупные нейроны – площадь сомы >450 мкм².

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

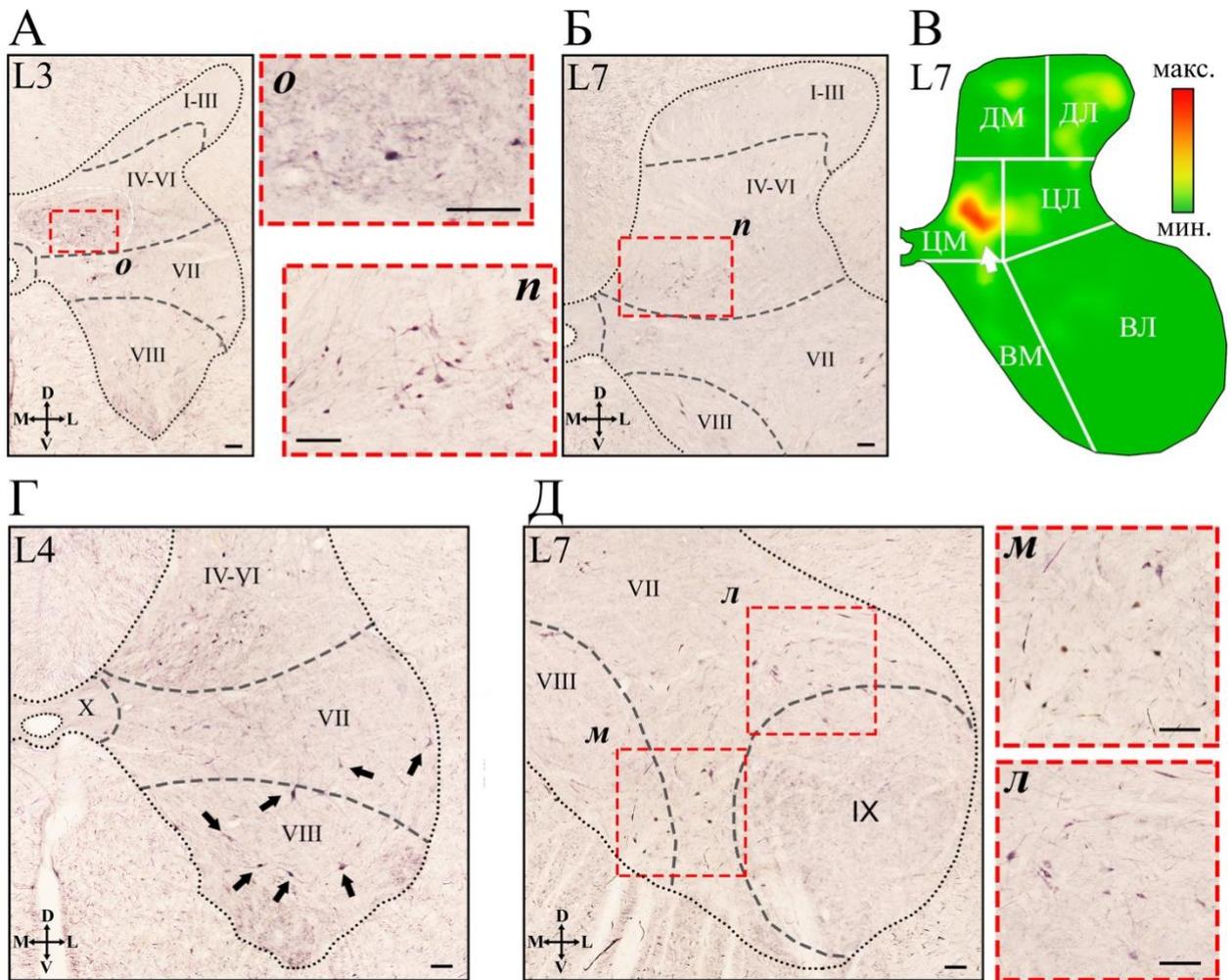


Рисунок 5. Распределение ПРВ+ нейронов. А – локализация ядер Кларка (белая штриховая линия; о – увеличенное изображение ПРВ+ нейронов ядер Кларка); Б – ПРВ+ нейроны вентромедиальной области пластин IV-VI сегментов L5-S1 (на примере сегмента L7; n – увеличенное изображение клеток); В – сопоставление карт плотности ПРВ+ и FOS+ нейронов (на примере сегмента L7, зелено-красный градиент отражает степень колокализации разных маркеров от минимального к максимальному, соответственно); Г – локализация ПРВ+ нейронов (обозначены черными стрелками) в пластинах VII-VIII в сегментах L1-L4 (на примере L4); Д – локализация медиального (м) и латерального (л) кластера ПРВ+ нейронов по границам мотонейронных пулов в пластинах VII-VIII сегментов L5-L7 (на примере L7). Латинскими буквами D (dorsal), L (lateral), V (ventral) и M (medial) обозначены направления. Калибровочный маркер равен 100 мкм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее, было выдвинуто предположение, что ходьба в разных направлениях реализуется за счет работы одного и того же ЦГП (Duysens, Crommert, 1998). В настоящем исследовании было выявлено, что ХВ активируется при стимуляции значительно более широкого участка спинного мозга (сегменты L3-S1), чем ХН (сегменты L5-L7). Данные результаты могут быть объяснены существованием различий в ростокаудальном распределении локомоторных сетей для каждого вида ходьбы. Для того, чтобы проверить данную гипотезу, мы сравнили распределение спинальных нейронов, активированных при ХВ и ХН, используя метод иммуногистохимического выявления белка c-Fos. Было

выявлено, что качественное распределение FOS+ нейронов при ХВ и ХН схоже. Наибольшая плотность FOS+ нейронов наблюдается в трех областях серого вещества: 1) в латеральной части пластин I-IV (зона ДЛ), 2) на границе пластин VI и VII (зона ЦЛ) и VII и X (зона ЦМ) и 3) в пластине VIII (зона ВМ) (рис. 6 А). Несмотря на то, что общий вид распределения FOS+ нейронов при ХВ и ХН схож, количественные показатели существенно разнятся. В определенных областях серого вещества сегментов L6-L7 у животных с ХН число FOS+ нейронов значительно выше, чем в группе кошек с ХВ (рис. 6 А). По-видимому, выраженное отличие в числе FOS+ нейронов для ХВ и ХН отражает активацию специфических сетей для данных видов ходьбы.

Подробно проанализировав распределение нейронов, иммунопозитивных к кальций-связывающим белкам, мы полагаем, что те интернейроны спинного мозга, которые являются элементами ЦГП, вероятно, образуют сходный паттерн распределения и, по-видимому, данный паттерн сходен с распределением FOS+ нейронов. Так, было замечено, что только в промежуточном сером веществе спинного мозга выявлены близко расположенные скопления интернейронов нескольких типов, экспрессирующих кальбиндин и парвальбумин (рис. 6 А). Пространственная локализация этих скоплений сходна с локусом промежуточного серого вещества (ЦМ), содержащим наибольшее число нейронов, активируемых в ходе вызванной локомоции вне зависимости от направления ходьбы. На основе данных результатов, полагаем, нейроны промежуточного серого вещества, иммунопозитивные к кальций-связывающим белкам, могут являться разнородными элементами ЦГП (в частности, комиссуральными тормозными интернейронами и интернейронами группы II) и нейронами дорзального спинномозжечкового тракта.

Ранее П. Мусиенко с коллегами (2012) была предложена гипотеза о контроле направления шага: локомоторная система включает в себя два основных механизма, один генерирует вертикальный компонент шага (поднятие и опускание конечности), другой – горизонтальный компонент (перенос конечности от одной точки к другой) (рис. 6 Б). Последний включает в себя сети, управляющие направлением шага в разные стороны. Данные сети получают сенсорную информацию о движении конечности во время фазы опоры – при достижении конечностью крайней точки запускается фаза переноса (Pearson, Duysens, 1976). В рамках двухуровневой модели локомоторного ЦГП (Rybak et al., 2015), можно предположить, что вертикальный компонент включает в себя ритм-генерирующий уровень и часть паттерн-формирующего, в то время как сети горизонтального компонента принадлежат к паттерн-формирующему слою.

Мы полагаем, что сети, генерирующие горизонтальный компонент для ХВ распределены по всему пояснично-крестцовому утолщению спинного мозга, для ХН – только в сегментах L6-L7 (рис. 6 В). Таким образом, для активации ХН, ЭС должна быть приложена к сегментам L6-L7, в то время как широко распространенные сети, генерирующие вертикальный и горизонтальный компонент ХВ, могут быть активированы ЭС любого сегмента от L3 до S1. При этом, сети, генерирующие вертикальный компонент для обоих видов ходьбы распространены в пояснично-крестцовом утолщении достаточно широко. Данное предположение может объяснить схожий паттерн распределения FOS+ нейронов при ХВ и ХН. Так, FOS+ нейроны, генерирующие горизонтальный компонент для ХВ, распределены по всему пояснично-крестцовому отделу спинного мозга, а совокупность нейронов, генерирующих горизонтальный компонент для ХН, сконцентрирована только в L6-L7, в связи с чем число FOS+ нейронов в этих сегментах значительно выше, чем у животных с ХВ.

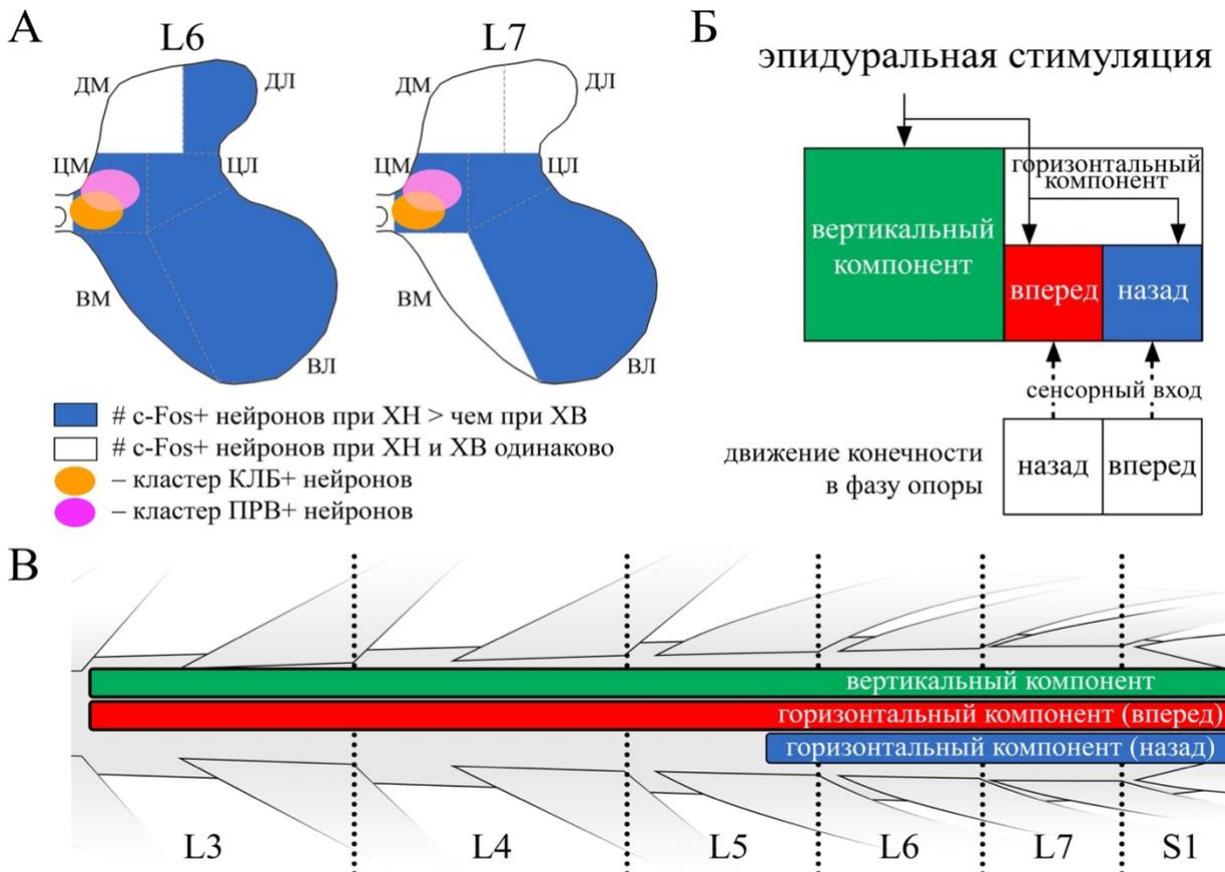


Рисунок 6. Распределение нейронных сетей, обеспечивающих ходьбу в разных направлениях. А – области серого вещества сегментов L6 и L7, нейроны которых генерируют горизонтальный компонент для ХВ (обозначены синим) и зоны кластеризации КЛБ+ и ПРВ+ нейронов (оранжевый и розовый овалы, соответственно). Б – схема контроля за направлением ходьбы (адаптировано из Musienko et al., 2012). В – схема rostrocaudального распределения в пояснично-крестцовом утолщении спинного мозга сетей, генерирующих вертикальный компонент для ХВ и ХН (обозначен зеленой полосой), горизонтальный компонент для ХВ (обозначен красной полосой) и горизонтальный компонент для ХН (обозначен синей полосой).

ВЫВОДЫ

1. Триггерная зона спинного мозга, стимуляция которой вызывает ходьбу задних конечностей вперёд, локализуется в сегментах L3-S1. При этом область вызова ходьбы назад более локальна и соответствует преимущественно сегментам L6-L7.

2. Исследование паттернов распределения активированных нейронов, экспрессирующих ген раннего ответа *c-fos*, выявило большее число клеток в промежуточном сером веществе сегментов L6 и L7 во время вызванной ходьбы назад, по сравнению с ходьбой вперед.

3. Нейроны, экспрессирующие кальбиндин, формируют в сером веществе спинного мозга несколько кластеров: мелкие колончатые структуры в дорзальных рогах сегментов L3-L6 и крупные кластеры в промежуточном сером веществе сегментов L5-S1. Оба типа кластеров, вероятно, участвуют в интеграции сенсомоторной информации.

4. В спинном мозге парвальбумин выступает маркером элементов проприоцептивной системы. Выявлены две основные области локализации парвальбумин-позитивных нейронов: ядра Кларка в сегментах L1-L4; кластер в промежуточной части серого вещества и цепочка крупных нейронов в вентральном роге по границе мотонейронных пулов в сегментах L5-L7.

5. Выявленные в промежуточном сером веществе спинного мозга кластеры интернейронов двух типов, экспрессирующие кальбиндин и парвальбумин, пространственно совпадают с локусом, содержащим наибольшее число *c-Fos*-иммунопозитивных нейронов, и могут представлять из себя функционально разные нейронные популяции, задействованные в контроле направления при ходьбе.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Меркульева Н.С., Михалкин А.А., **Вещицкий А.А.** Особенности распределения ацетилхолинэстеразы в заднелатеральном ядре таламуса кошки // Морфология. – 2015. – Т. 148. – №. 4. – С. 46-48.

2. Merkulyeva N., **Veshchitskii A.**, Makarov F., Gerasimenko Y., Musienko P. Distribution of 28 kDa calbindin-immunopositive neurons in the cat spinal cord // Frontiers in Neuroanatomy. – 2016. – Vol. 9. – №. 166. – P. 1-13.

3. Ляховецкий В.А. Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Герасименко Ю.П., Мусиенко П.Е. Математическая модель управления задними конечностями кошки при ходьбе назад // Биофизика. – 2016. – Т. 61. – №. 5. – С. 1001-1009.

4. Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Шкорбатова П.Ю., Шенкман Б.С., Мусиенко П.Е., Макаров Ф.Н. Морфометрические особенности ядра Кларка в ростральных сегментах

поясничного отдела спинного мозга кошки // Морфология. – 2016. – Т. 150. – №. 5. – С. 18-23.

5. Merkulyeva N., **Veshchitskii A.**, Gorsky O., Pavlova N., Zelenin P., Gerasimenko Y., Deliagina T., Musienko P. Distribution of spinal neuronal networks controlling forward and backward locomotion // Journal of Neuroscience. – 2018. – Vol. 38. – №. 20. – P. 4695-4707.

6. Shkorbatova P.Y, Lyakhovetskii V.A., Merkulyeva N.S., **Veshchitskii A.A.**, Bazhenova E.Y., Laurens J., Pavlova N.V., Musienko P.E. Prediction algorithm of the cat spinal segments lengths and positions in relation to the vertebrae // The Anatomical Record. - 2018. - P. 1-10.

Работы, опубликованные в материалах конференций

1. **Вещицкий А.А.**, Михалкин А.А. Экспрессия ацетилхолинэстеразы в LP ядрах таламуса мозга 2-недельных котят. Современные проблемы нейробиологии // Материалы I научной конференции с международным участием, посвященной 70-летию Ярославской государственной медицинской академии, Ярославль. – 2014. – С. 11.

2. Mikhalkin A., Nikitina N., **Veschitskiy A.**, Merkulyeva N. Expression of the heavy-chain neurofilament proteins in the lateral geniculate nucleus of the cat // Neuronus 2015 IBRO & IRUN neuroscience forum, Poland, Krarow. – 2015. – P. 116.

3. **Вещицкий А.А.**, Меркульева Н.С., Мусиенко П. Е. Популяция кальбиндиновых интернейронов серого вещества спинного мозга кошки // Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем. Материалы всероссийской конференции с международным участием, посвященная 90-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург – Колтуши. – 2015. – С. 42.

4. **Вещицкий А.А.**, Меркульева Н. С., Мусиенко П. Е. Распределение кальбиндин-иммунопозитивных нейронов в спинном мозге кошки // Материалы международной научной конференции Научного Парка СПбГУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину», Санкт-Петербург. – 2015. – С. 29.

5. **Вещицкий А.А.**, Меркульева Н. С., Мусиенко П. Е. Кластерная организация кальбиндин-иммунопозитивных нейронов спинного мозга кошки. Материалы XII международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии», Судак. – 2016. – С. 111.

6. Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Герасименко Ю. П., Мусиенко П.Е. Локализация нейронов спинного мозга кошки, активирующихся при вызванной локомоции // Материалы XII международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии», Судак. – 2016. – С. 276.

7. Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Герасименко Ю. П., Мусиенко П.Е. Распределение c-fos-иммунопозитивных нейронов в спинном мозге децеребрированных кошек при вызванной локомоции // Материалы VI всероссийской с международным участием конференции по управлению движениями «Motor Control-2016», Казань. – 2016. – С. 61.

8. Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Мусиенко П.Е. Иммуногистохимическое исследование локализации кальбиндиновых интернейронов в люмбосакральном отделе спинного мозга кошки // Материалы II научной конференции с международным участием, посвященной 70-летию Ярославской государственной медицинской академии, Ярославль. – 2016. – С. 31.

9. Павлова Н.В., Баженова Е.Ю., Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Шкорбатова П.Ю., Мусиенко П.Е. Цитохимические особенности нейронов ядра Кларка спинного мозга кошки // Материалы II научной конференции с международным участием, посвященной 70-летию Ярославской государственной медицинской академии, Ярославль. – 2016. – С. 38.

10. Merkulyeva N., **Veshchitskii A.**, Lyakhovetskii V., Musienko P. Relationships between the pattern of the c-fos-positive neurons and locomotion hindquarters properties in cats // FENS Regional Meeting, Hungary, Pécs. – 2017.

11. Fomin I., Mikhailov V., Bakhshiev A., Merkulyeva N., **Veshchitskii A.**, Musienko P. Detection of neurons on images of the histological slices using convolutional neural network // Selected papers from the XIX international conference on neuroinformatics «Advances in neural computation, machine learning, and cognitive research, studies in computational intelligence», Russia, Moscow. – 2017. – P. 85.

12. **Veshchitskii A.**, Merkulyeva N., Gorsky O., Musienko P. Analysis of spinal neuronal networks controlling forward and backward locomotion // FENS Regional Meeting, Hungary, Pécs. – 2017.

13. Баженова Е.Ю., Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Горский О.В., Павлова Н.С., Мусиенко П.Е. Исследование спинальных механизмов соматовисцеральной интеграции локомоторной и мочевыделительной систем // Материалы XIII международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии», Судак. – 2017. – С. 78.

14. Баженова Е.У., Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Горский О.В., Павлова Н.В., Мусиенко П.Е. Distribution of c-fos positive neurons in the sacral spinal segments of the cat stepping in different directions // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова, Воронеж. – 2017. – С. 1628.

15. Попов А.А., Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Горский О.В., Туртикова О.В., Тыганов С.А., Шенкман Б.С., Мусиенко П.Е. Влияние опорного стимула на кинематику локомоторных движений в условиях моделируемой микрогравитации // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова, Воронеж. – 2017. – С. 286.

16. Баженова Е.Ю., Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Горский О.В., Павлова Н.С., Мусиенко П.Е. Исследование влияния локомоторной активности на работу мочевыделительной системы // Материалы всероссийской молодежной конференции с международным участием «Современные аспекты интегративной физиологии», Санкт-Петербург. – 2018. – С. 13-14.

17. **Вещицкий А.А.**, Меркульева Н.С., Мусиенко П.Е. Спинальные нейроны, экспрессирующие парвальбумин: паттерн распределения и онтогенез // Материалы всероссийской молодежной конференции с международным участием «Современные аспекты интегративной физиологии», Санкт-Петербург. – 2018. – С. 31-32.

18. Шкорбатова П.Ю., Ляховецкий В.А., Меркульева Н.С., **Вещицкий А.А.**, Баженова Е.Ю., Павлова Н.В., Мусиенко П.Е. Скелетотопия и прогнозирование положения поясничных и крестцовых сегментов спинного мозга кошки относительно позвонков // Материалы всероссийской молодежной конференции с международным участием «Современные аспекты интегративной физиологии», Санкт-Петербург. – 2018. – С. 119-120.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

FOS+	– с-Fos-иммунопозитивный
ВЛ	– вентролатеральный
ВМ	– вентромедиальный
ДЛ	– дорзолатеральный
ДМ	– дорзомедиальный
КЛБ+	– кальбиндин-иммунопозитивный
ПРВ+	– парвальбумин-иммунопозитивный
ХВ	– ходьба вперед
ХН	– ходьба назад
ЦЛ	– центролатеральный
ЦМ	– центромедиальный
ЦГП	– центральный генератор паттернов
ЭМГ	– электромиография
ЭС	– эпидуральная стимуляция