

На правах рукописи



Насретдинов Азат Рафаилович

**ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОТОРНОЙ И
СЕНСОРНОЙ ОБЛАСТЕЙ СПИННОГО МОЗГА ВО ВРЕМЯ
СПОНТАННЫХ ДВИЖЕНИЙ У НОВОРОЖДЕННЫХ
КРЫС**

Специальность 03.03.01 —
«Физиология»

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Казань — 2019

Работа выполнена в НИЛ Нейробиологии кафедры физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: **Хазипов Рустем Нариманович**
доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник НИЛ Нейробиологии ИФМиБ ФГАОУ ВО КФУ

Официальные оппоненты: **Мошонкина Татьяна Ромульевна**,
доктор биологических наук, заместитель директора по науке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологии им И.П. Павлова Российской академии наук»

Гайдуков Александр Евгеньевич,
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук»

Защита диссертации состоится 29 января 2020 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета КФУ 03.06 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420015, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 76 в зале заседания ученого совета (ауд. 208).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан « ____ » _____ 20 ____ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
КФУ 03.06,
д.б.н., профессор



Т.А. Аникина

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Ранние этапы развития животных характеризуются особыми формами двигательной активности, которые включают в себя спонтанные движения в виде кратковременных миоклонических подергиваний (так называемых «твитчей») и более комплексных примитивных двигательных паттернов (Blumberg et al., 2010; Hafez, 1975; De Vries et al., 1982). Считается, что эти ранние формы двигательной активности участвуют в формировании нейрональных сетей, обеспечивающих координированное функционирование сенсорной и двигательной систем (Sanes et al., 1999; Petersson et al., 2003; Mendelsohn et al., 2016). Важным свойством примитивных двигательных паттернов является то, что моторные команды, лежащие в их основе, автономно генерируются на уровне спинного мозга (Robinson et al., 1999). Также было показано, что спонтанные примитивные движения запускают ранние осцилляторные паттерны активности на более высоких уровнях сенсорно-моторной системы, в том числе в таламусе, а также в соматосенсорной и моторной коре головного мозга (Khazipov et al., 2004; Tiriac et al., 2014; Akhmetshina et al., 2016). На основании этих данных, а также в результате поведенческих исследований и компьютерном моделировании развития ноцицептивных рефлексов (Petersson et al., 2003), было предположено, что активация соматосенсорных путей вследствие примитивных движений обеспечивается активацией обратных сенсорных связей (включая тактильную и проприоцептивную сенсорную обратную связь). Данная гипотеза предполагает координированную активность моторных нейронов и нейронов сенсорной области спинного мозга, которая обеспечивается сенсорной обратной связью во время примитивных движений. Однако физиологические паттерны нейрональной активности в моторной и сенсорной областях спинного мозга, а также механизмы, лежащие в основе координированной активности нейронов в спинном мозге во время генерации примитивных движений, до сих пор остаются малоизученными. Это обусловлено, в первую очередь, тем, что в основе современных знаний об активности нейрональных сетей спинного мозга на ранних этапах онтогенеза лежат результаты исследований с использованием препаратов изолированного спинного мозга, либо срезов спинного мозга новорожденных крыс и мышей *in vitro*. Эти исследования позволили выявить спонтанные вспышки нейрональной активности в моторных областях изолированного спинного мозга у новорожденных животных. Такие вспышки распространяются в вентральные корешки, а также сопровождаются деполяризацией афферентных волокон и активацией дорсальных корешков спинного мозга. Поскольку активация афферентов предполагает передачу возбуждения на нейроны сенсорной области спинного мозга, было предположено, что данный механизм «эфферентной копии» может обеспечивать координированную активацию моторной и сенсорной областей спинного мозга даже в отсутствие связей спинного мозга с мышцами

и сенсорной обратной связи (Bos et al., 2011). Однако следует отметить, что одновременная регистрация активности нейронов в сенсорной и моторной областях изолированного спинного мозга новорожденных животных до сих пор не производилась, и механизм «эфферентной копии» также остается лишь гипотетическим. Более того, остается неизвестным, какие физиологические паттерны характеризуют активность сенсорной и моторной областей спинного мозга у интактных новорожденных животных в условиях *in vivo*, каким образом эти паттерны нейрональной активности в спинном мозге соотносятся с ранними формами двигательной активности, а также какие механизмы лежат в основе координации сенсорно-моторной активности в развивающемся спинном мозге. Информация об организации активности спинного мозга во время спонтанных движений является ключевой для понимания раннего функционирования и развития как нейрональных сетей спинного мозга, так и сенсорно-моторной системы в целом.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлось изучение паттернов электрической активности и исследование механизмов синхронизации активности нейронов сенсорной и моторной областей спинного мозга новорожденных крыс во время спонтанных движений.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Провести функциональное картирование сенсорной и моторной областей поясничного сегмента спинного мозга новорожденных крыс.
2. Классифицировать паттерны спонтанной двигательной активности задних конечностей у новорожденных крыс.
3. Исследовать паттерны электрической активности нейронов в дорсальных и вентральных рогах поясничных сегментов спинного мозга новорожденных крыс во время различных типов спонтанных движений задних конечностей.
4. Оценить влияние деафферентации на электрическую активность нейронов в дорсальных и вентральных рогах спинного мозга новорожденных крыс во время спонтанных движений.
5. Провести сравнительный анализ паттернов спонтанной электрической активности в дорсальных и вентральных рогах спинного мозга новорожденных крыс в условиях *in vivo* и в изолированном спинном мозге *in vitro*.
6. Выявить механизмы генерации спонтанной электрической активности нейронов в изолированном спинном мозге *in vitro* с помощью фармакологических методов.

Научная новизна работы

- Впервые были охарактеризованы пространственно-временные свойства электрической активности в сенсорной и моторной областях пояс-

- ничных сегментов спинного мозга новорожденных крыс во время спонтанных движений задних конечностей.
- Впервые показана последовательная активация нейронов в моторной и сенсорной областях, при которой активация мотонейронов предшествует, а активация нейронов сенсорной области следует за началом движений.
 - Впервые показано, что деафферентация спинного мозга путем перерезки дорсальных корешков не приводит к достоверным изменениям в электрической активности в моторной области и в двигательной активности задней конечности, но устраняет активацию нейронов в сенсорной области спинного мозга во время спонтанных движений.
 - Впервые охарактеризованы пространственно-временные свойства спонтанной вспышечной активности, и показан низкий уровень корреляции между нейрональной активностью в сенсорной и моторной областях изолированного спинного мозга новорожденных крыс *in vitro*.
 - В совокупности, впервые представлены прямые доказательства того, что сенсорная обратная связь лежит в основе координированной активации нейронов моторной и сенсорной областей во время спонтанных движений.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы

Результаты, полученные в данной работе, имеют, преимущественно, фундаментальное значение, которое заключается в получении новых данных о принципах организации нейрональной активности в спинном мозге млекопитающих на ранних этапах развития. Полученные результаты позволяют сформировать полноценную картину процессов, происходящих в спинном мозге новорожденных крыс, и соотнести ранние паттерны нейрональной активности в моторной и сенсорной областях спинного мозга со спонтанными движениями. Полученные данные о коррелированной активности в топографически связанных сенсорной и моторной областях спинного мозга, которая обеспечивается обратной сенсорной активацией во время спонтанных движений, имеют принципиальное значение как для понимания пластичности и развития локальных сенсорно-моторных нейрональных сетей в спинном мозге, так и для установления топографических связей между спинным мозгом и мышцами, а также между спинным мозгом и более высокими структурами центральной нервной системы. Исследования в рамках данной работы проводились на крысах возраста P5–P7 (P0 соответствует дню рождения), в период, который по уровню развития центральной нервной системы соответствует концу второго – началу третьего триместра внутриутробного развития у человека. Таким образом, полученные результаты могут быть транслированы на плод человека, у которого наблюдаются схожие с новорожденными крысами примитивные паттерны двигательной активности. В перспективе разработанная в ходе данного исследования экспериментальная модель для регистрации

движений конечностей и нейрональной активности в спинном мозге может быть также использована для исследования ранних проявлений и для изучения патофизиологических механизмов как ряда врожденных, так и приобретенных заболеваний спинного мозга.

Методология и методы исследования

Эксперименты *in vivo* проводились на крысах линии Вистар возраста P5–P7 в условиях фиксации позвоночного столба. Подготовка животных к эксперименту осуществлялась с использованием изофлурановой анестезии. Для регистрации электрофизиологической активности (локальных полевых потенциалов и множественных потенциалов действия) в поясничных сегментах спинного мозга использовались линейные многоканальные внеклеточные электроды. Одновременно с этим проводилась регистрация двигательной активности конечностей животного с использованием пьезоэлектрических датчиков. Эксперименты *in vitro* проводились на препарате изолированного спинного мозга крыс линии Вистар возраста P5–P7 с использованием таких же линейных многоканальных внеклеточных электродов, как и в экспериментах *in vivo*.

Положения, выносимые на защиту

1. Электрическая активность нейронов в поясничных сегментах спинного мозга новорожденных крыс характеризуется коррелированными вспышками активности в сенсорной и моторной областях, которые возникают во время движений задних конечностей.
2. Активация нейронов в сенсорной области спинного мозга во время спонтанных движений новорожденных крыс обеспечивается обратной сенсорной связью, которая активизируется во время этих движений.

Достоверность полученных данных

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментальных данных и статистическими методами анализа.

Апробация работы

Материалы работы представлены на Международной научной конференции «Наука будущего» (Санкт-Петербург, 2014); IX Международном нейробиологическом форуме FENS (Милан, Италия, 2014); VI Российской с международным участием научной конференции по управлению движением «Motor control 2016» (Казань, 2016); Международной научной конференции «Трансляционная медицина, настоящее и будущее» (Казань, 2016), II Международной научной конференции «Наука будущего» (Казань, 2016).

Личный вклад диссертанта в исследование

Данная научная работа была выполнена при личном участии диссертанта в анализе литературы, формулировке цели и задач исследования, проведении экспериментов, анализе и обсуждении результатов и подготовке публикаций.

Основное содержание работы

Материалы и методы исследования

Экспериментальные процедуры в рамках данного исследования проводились в соответствии с протоколами, одобренными этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета по защите прав и использованию животных в экспериментальных целях (№9-2013), а также в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС по работе с лабораторными животными. Все протоколы использования животных были также одобрены Национальным институтом здравоохранения и медицинских исследований Франции INSERM (протокол №007.08.01). Для экспериментов использовались крысы линии Вистар возраста P5–P7 дней после рождения (P0 соответствует дню рождения).

Эксперименты in vivo

Для решения поставленных задач использовался метод одновременной регистрации электрической активности в спинном мозге и регистрации движений задних конечностей у новорожденных крыс. Во время оперативного вмешательства и в течение ряда экспериментов использовалась изофлурановая анестезия (1.5 %). Местное обезболивание в области оперативного вмешательства осуществлялось подкожной инъекцией лидокаина. На протяжении всего эксперимента температура тела поддерживалась на уровне 37°C с помощью термостатируемой пластинки, на которой располагалось экспериментальное животное. Спинной мозг покрывался силиконовым маслом и был защищен металлическим кольцом, прикрепленным к позвоночнику с помощью цианоакрилатного клея, а само кольцо прикреплялось к стереотаксической раме, что обеспечивало механическую стабильность препарата (рис. 1А).

Электрическая активность регистрировалась в поясничных сегментах спинного мозга, которые функционально связаны с задними конечностями. Для регистрации электрической активности спинного мозга использовалась линейная 16-канальная матрица электродов с расстоянием 100 мкм между электродами (A1x16-5mm-100-703-A16, Neuronexus Technologies, США). Матрица электродов размещалась на 0.3–0.5 мм латеральнее спинномозговой вены и погружалась в медиально-латеральном направлении под углом 17° (рис. 1Б). Регистрация электрической активности начиналась через 30 минут после введения матрицы электродов. Электрофизиологические сигналы

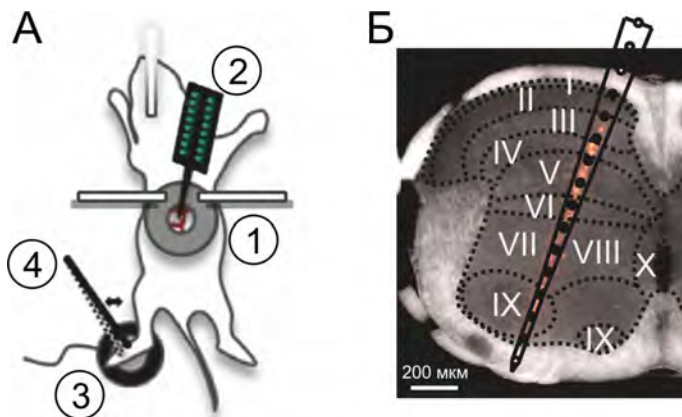


Рисунок 1 — А. Схема экспериментальной установки *in vivo*.

1) новорожденная крыса, закрепленная на стереотаксической раме с помощью металлического кольца; 2) многоканальная матрица электродов для регистрации локальных полевых потенциалов и множественных потенциалов действия; 3) пьезоэлектрический датчик для регистрации движений; 4) металлическая трубка на пьезоэлектрической пластине для механической стимуляции конечностей; Б. Эпифлуоресцентное изображение среза спинного мозга и наложенная реконструкция положения регистрирующих электродов. Пунктирной линией обозначены предполагаемые границы пластин Рекседа.

усиливались в 1000 раз и записывались с частотой дискретизации 10 кГц (Digidata, Axon Instruments, США). Тактильная стимуляция осуществлялась тонкой трубкой, закрепленной на пьезоэлектрическом устройстве (РАВ-4010, Nihon Cerates, Япония), которое приводилось в движение кратковременными прямоугольными импульсами с частотой 0.2 Гц (Master 8, АМРІ, Израиль). Для каждой точки стимуляции применялось 100 стимулов. Спонтанная активность регистрировалась в течение 30–60 минут. Регистрация движений конечностей осуществлялась с помощью пьезоэлектрического датчика (КРЕG165, Kingstate, Великобритания). С целью электрической стимуляции в спинной мозг в условиях изофлурановой анестезии погружался биполярный электрод из нихромовой проволоки толщиной 50 мкм. Электрод опускался с шагом 100–200 мкм до значения глубины, соответствовавшего расположению нижнего регистрирующего электрода. На заданной глубине значение стимулирующего тока подбиралось таким образом, чтобы вызывать регистрируемое движение конечности. Стимуляция осуществлялась электрическими импульсами длительностью 50 мкс с частотой 0.2 Гц. На каждом выбранном значении глубины применялось 50 стимулов. Перед процедурой деафферентации, которая проводилась под изофлурановой анестезией, матрица электродов выводилась из спинного мозга, и затем проводилось вскрытие твердой мозговой оболочки для доступа к дорсальным корешкам в области сегмента, в котором

проводилась регистрация электрической активности. Корешки отделялись тонким пинцетом и перерезались с помощью микроножниц. После этого матрица электродов вновь вводилась по исходной траектории на ту же глубину, что и до деафферентации. Эффективность перерезки дорсальных корешков контролировалась по устранению сенсорно-вызванного ответа при механической стимуляции соответствующей конечности.

Эксперименты *in vitro*

Для выделения спинного мозга животное обезглавливалось под изофлурановой анестезией, и после эвисцерации туловище животного помещалось в охлажденную карбогенизированную (95% кислород, 5% углекислый газ) искусственную цереброспинальную жидкость (ИЦСЖ). Затем проводилась спинальная ламинэктомия от крестцового до шейного сегмента. Твердая оболочка удалялась, и спинной мозг вместе с дорсальными и вентральными корешками помещался в камеру, заполненную карбогенизированной ИЦСЖ, где выдерживался не менее одного часа. Затем спинной мозг закреплялся дорсальной стороной вверх в модифицированной перфузионной камере интерфейсного типа и перфузировался карбогенизированной ИЦСЖ со скоростью 3-4 мл/мин при комнатной температуре. Введение матрицы электродов проводилось аналогично экспериментам *in vivo*. Анализ экспериментальных данных проводился с использованием программного обеспечения MiniAnalysis (Synaptosoft, США) и пакета программ Matlab (MathWorks, США). Для сравнения выборок использовались непараметрические тесты из пакета Statistics Toolbox для Matlab: парный и непарный тесты Вилкоксона. Выборки считались достоверно различающимися при $p < 0.05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Функциональное картирование спинного мозга новорожденных крыс *in vivo*

Для решения поставленных задач на начальном этапе проводилось функциональное картирование сенсорной и моторной областей спинного мозга новорожденных крыс ($n=15$). При сенсорном картировании с помощью тактильной стимуляции различных участков соответствующей задней конечности определялись: 1) участок на задней конечности, который топографически связан с сенсорной областью регистрируемого сегмента спинного мозга; 2) каналы матрицы электродов, располагающиеся в сенсорной области исследуемого сегмента спинного мозга. При этом топографическая стимуляция задней конечности вызывала максимальные значения негативного отклонения локальных полевых потенциалов (ЛПП) и частоты множественных

потенциалов действия (МПД) в поверхностных пластинах дорсального рога соответствующего сегмента спинного мозга (рис. 2А).

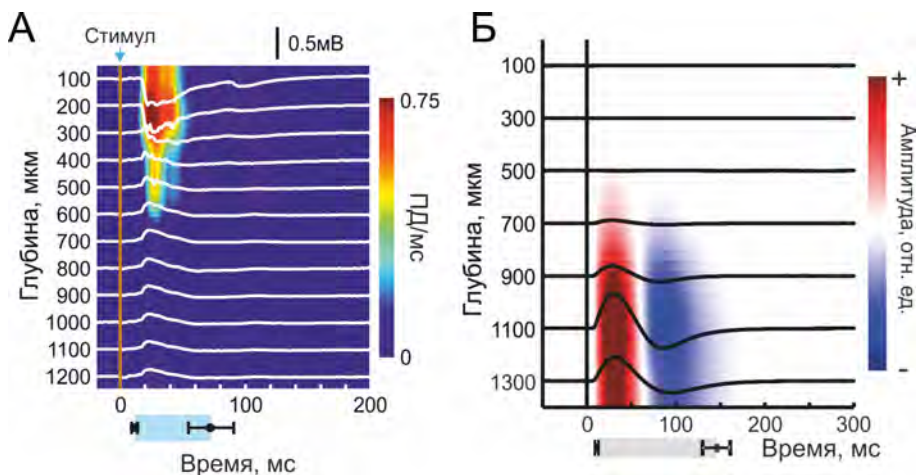


Рисунок 2 — Функциональное картирование сенсорной и моторной областей спинного мозга.

А. Частота МПД и ЛПП сенсорно-вызванных ответов в спинном мозге новорожденной крысы в присутствии изофлурана 0.5% (усреднение проводилось по 100 стимулам). ЛПП представлены в виде горизонтальных белых линий, вертикальная оранжевая линия соответствует времени стимула. Темно-красный цветовой код соответствует максимальному значению частоты МПД, темно-синий – минимальному. Диаграмма внизу показывает средние времена начала и окончания сенсорно-вызванного ответа \pm стандартные отклонения по всем экспериментальным животным ($n=15$);

Б. Механограммы движений задней конечности, возникающих в ответ на электрическую микроstimуляцию спинного мозга на различных глубинах.

Темно-красный и темно-синий цвета соответствуют максимальным амплитудам движений, белый цвет – отсутствию двигательной активности. Диаграмма внизу показывает средние значения начала и окончания движения \pm стандартные отклонения для всех экспериментальных животных ($n=15$).

С целью функционального картирования моторной области использовалась методика электрической микроstimуляции спинного мозга (ЭМСМ) на разных глубинах относительно поверхности спинного мозга с помощью биполярного электрода с одновременной регистрацией вызываемых ЭМСМ движений задней конечности. На основании анализа амплитуды моторных ответов в зависимости от глубины ЭМСМ для каждого животного определялась моторная область, стимуляция которой вызывала максимальный двигательный

ответ, и определялись каналы регистрирующей матрицы электродов, находившиеся в моторной области (рис. 2Б).

Общая характеристика двигательной активности задних конечностей в препарате новорожденных крыс со спинальной фиксацией

Двигательная активность задних конечностей у животных со спинальной фиксацией характеризовалась разнообразными типами движений, включавшими кратковременные подергивания и сложные нестереотипные двигательные события. На основе анализа механограмм задних конечностей в рамках данной работы была проведена классификация движений по длительности на кратковременные миоклонические подергивания и более продолжительные комплексные движения. Для кратковременных миоклонических подергиваний была характерна двухфазность, с первой быстрой доминирующей клонической фазой и последующей фазой релаксации.

Около половины всех проанализированных движений были классифицированы как миоклонические подергивания ($53 \pm 15 \%$) с длительностью 252 ± 122 мс, происходившие на фоне атонии в отсутствие предшествующей и последующей двигательной активности. Из остальных движений были выделены эпизоды активности длительностью более 900 мс, которые были классифицированы как комплексные движения (1.7 ± 1.4 с). Таким образом, для характеристики двигательной активности у новорожденных крыс со спинальной фиксацией использовалось два основных класса движений – кратковременные миоклонические подергивания и комплексные движения, которые характеризуют двигательную активность у животных во время активного сна и бодрствования, соответственно.

Паттерны электрической активности нейронов спинного мозга новорожденных крыс во время миоклонических подергиваний и комплексных движений

На следующем этапе исследовалась пространственно-временная организация активности в поясничных сегментах спинного мозга, полученная на основании регистрации ЛПП и МПД с помощью многоканальной матрицы электродов во время миоклонических подергиваний и комплексных движений. Было обнаружено, что электрическая активность в сенсорной и моторной областях спинного мозга имеет прерывистую временную организацию, и вспышки активности в обеих областях коррелируют с движениями задней конечности. Спонтанная электрическая активность характеризовалась вспышками МПД в моторной и сенсорной областях с частотами 4.3 ± 1.0 / мин и 3.6 ± 0.9 / мин, соответственно ($n=15$ крыс). Анализ сетевой динамики в спинном мозге во время миоклонических подергиваний по профилю плотности источников тока (ПИТ) и частоты МПД выявил, что движениям предшествуют кратковременные вспышки в моторной области, а вспышки активности в сенсорной области

возникают после начала движений (рис. 3 и 4). Следует также отметить, что повышение частоты МПД наблюдалось во время всего временного хода миоклонических подергиваний.

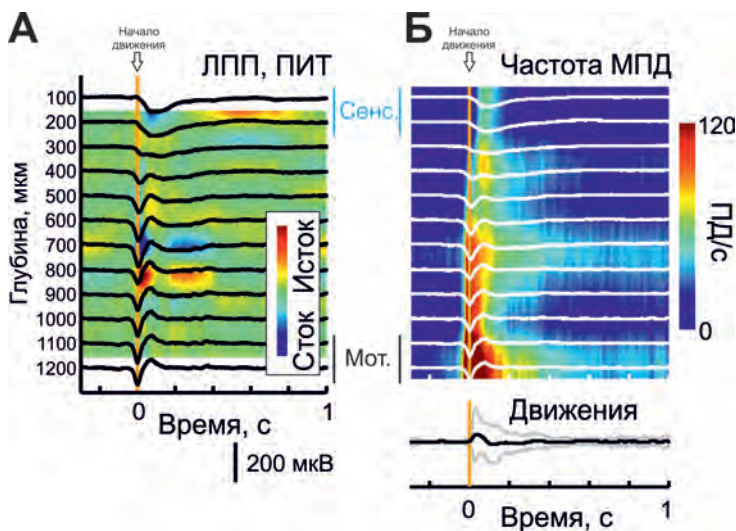


Рисунок 3 — Электрическая активность в поясничном сегменте спинного мозга новорожденных крыс во время миоклонических подергиваний задней конечности.

А. Динамика локальных полевых потенциалов и профиль плотности источников тока во время миоклонических подергиваний.

Б. Динамика частоты множественных потенциалов действия в спинном мозге во время миоклонических подергиваний.

Механограмма движений представлена в виде среднего значения и стандартного отклонения. Усреднение проводилось по началам миоклонических подергиваний (вертикальная оранжевая линия, $n=330$ движений).

Кросс-корреляционный анализ МПД в поясничных сегментах спинного мозга новорожденных крыс также выявил высокую степень корреляции между активностью во всех пластинках спинного мозга с миоклоническими подергиваниями, активацию моторной области спинного мозга до начала движений и то, что активация нейронов в сенсорной области происходит со значительной временной задержкой после активации нейронов в моторной области.

Комплексные движения также сопровождалось повышением уровня электрической активности в сенсорной и моторной областях спинного мозга, причем активация моторных нейронов предшествовала началу движений, а

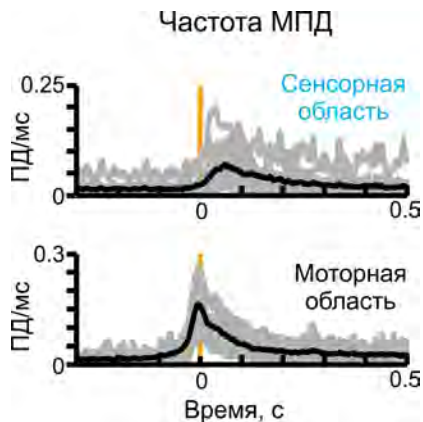


Рисунок 4 — Групповые данные по динамике частоты МПД в сенсорной и моторной областях спинного мозга новорожденных крыс во время миоклонических подергиваний задней конечности.

Данные представлены в виде среднего значения (обозначены черным цветом) и индивидуальных значений для каждого животного (обозначены серым цветом). Вертикальная оранжевая линия соответствует началу движения (n=15 крыс).

сенсорная область активировалась с задержкой от начала движений. Повышение частоты МПД во всех слоях также наблюдалось в течение всей длительности комплексных движений, хотя и наблюдалось уменьшение этой активности к концу движений. Сравнение активации спинного мозга во время миоклонических подергиваний и комплексных движений не выявило каких-либо принципиальных отличий в пространственно-временной организации активности в различных областях спинного мозга за исключением того факта, что комплексные движения сопровождалась более длительными эпизодами как двигательной, так и нейрональной активности в спинном мозге. Учитывая, что два исследованных типа движений характеризуют функциональные состояния сна и бодрствования, полученные данные свидетельствуют о том, что организация сетевой активности спинного мозга принципиально не отличается в этих двух состояниях.

Влияние деафферентации на электрическую активность в спинном мозге новорожденных крыс

На следующем этапе было исследовано, каким образом деафферентация поясничных сегментов влияет на активность в сенсорных и моторных областях исследуемых сегментов во время спонтанных движений. Предполагалось, что в случае активации нейронов сенсорной области путем эфферентной копии активация сенсорной области во время движений должна будет сохраняться

после деафферентации. Если же активация сенсорной области во время движений связана с сенсорной обратной связью, то деафферентация должна была бы приводить к устранению активации нейронов в сенсорной области во время движений и к разобщению активности в сенсорной и моторной областях. Последовательность экспериментальных процедур включала функциональное картирование и регистрацию спонтанной активности в контрольных условиях с последующим выводом регистрирующей пробы из спинного мозга. Затем с использованием изофлурановой анестезии (1.5 %) проводилась перерезка ипсилатеральных дорсальных корешков на уровне поясничного утолщения и близлежащих сегментов. Вслед за этим регистрирующая проба вводилась обратно в спинной мозг в то же положение, что и до деафферентации, и вновь проводилась регистрация спонтанной электрической активности и движений задней конечности.

После перерезки дорсальных корешков наблюдалось многообразие паттернов двигательной активности конечностей, включая миоклонические подергивания и комплексные движения, параметры которых существенно не отличались до и после деафферентации. После деафферентации также сохранялись ЛПП-сигналы и вспышки частоты МПД в моторной области, ассоциированные с движениями, а также не было обнаружено какого-либо достоверного изменения частоты вспышек активности и частоты МПД в моторной области (рис. 5 и 6). Однако в сенсорной области активность подвергалась значительным изменениям вследствие деафферентации. Так, после перерезки дорсальных корешков в сенсорной области наблюдалось существенное снижение частоты вспышек (на 66 ± 30 %) и уровня частоты МПД на 61 ± 28 % (рис. 5), а также полное подавление активации нейронов в сенсорной области во время миоклонических движений (рис. 6). Аналогичная картина с подавлением активности в сенсорной области и ее сохранением в моторной областях наблюдалась и во время комплексных движений. Кросс-корреляционный анализ ПД также показал, что после деафферентации значительно снижалась корреляция между ПД в моторной и сенсорной областях как во время миоклонических подергиваний, так и во время комплексных движений.

Полученные данные показывают, что преобладающая парадигма о функционировании спинного мозга новорожденных крыс заключается в генерации спонтанных вспышек активности в моторной области, которые вызывают миоклонические подергивания и комплексные движения, а затем – посредством механизма сенсорной обратной связи – происходит активация нейронов в сенсорной области. Полное подавление активации нейронов в сенсорной области во время движений вследствие деафферентации является прямым доказательством гипотезы о доминирующей роли сенсорной обратной связи в процессах координации сенсорно-моторных сетей развивающегося спинного мозга.

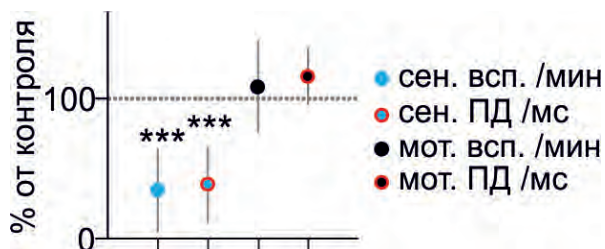


Рисунок 5 – Изменение частоты МПД и частоты вспышек в сенсорной и моторной областях спинного мозга в результате деафферентации. Контрольные значения для каждого из параметров приняты за 100%. Голубым и черным цветом обозначены, соответственно, параметры для сенсорной и моторной области (n=3 крысы) .

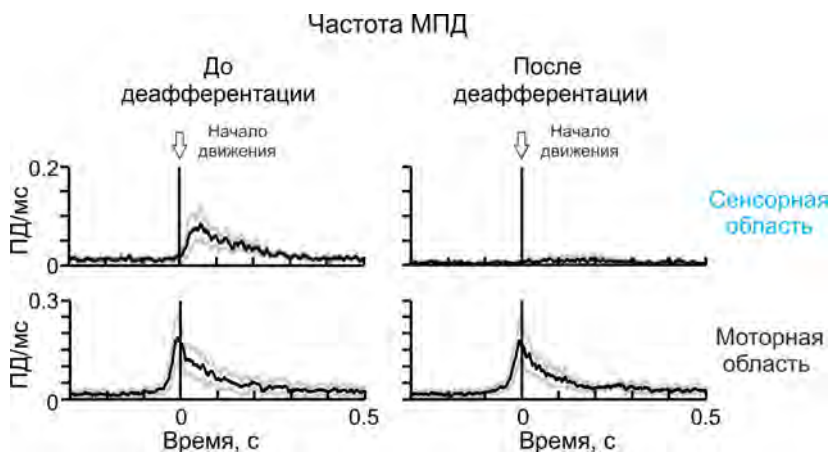


Рисунок 6 – Групповые данные по динамике частоты МПД в сенсорной и моторной областях спинного мозга новорожденных крыс во время миоклонических подергиваний до и после деафферентации. Данные представлены в виде среднего значения (обозначены черным цветом) и индивидуальных значений для каждого животного (обозначены серым цветом). Вертикальная черная линия соответствует началу движения (n=3 крысы).

Электрическая активность в изолированном спинном мозге новорожденных крыс *in vitro*

На следующем этапе исследовалась активность в поясничных сегментах изолированного спинного мозга *in vitro* – в препарате, в котором перерезаны как сенсорные входы, так и моторные эфференты, но сохранены связи внутри спинного мозга, которые могли бы обеспечивать координированную активность

нейронов сенсорной и моторной областей посредством эфферентной копии. Схема расположения регистрирующих электродов в поясничном сегменте спинного мозга на крысах возраста P5-P7 была аналогична расположению электродов при регистрации *in vivo*. Пример регистрации электрической активности в поясничном сегменте изолированного спинного мозга *in vitro* представлен на рисунке 7.

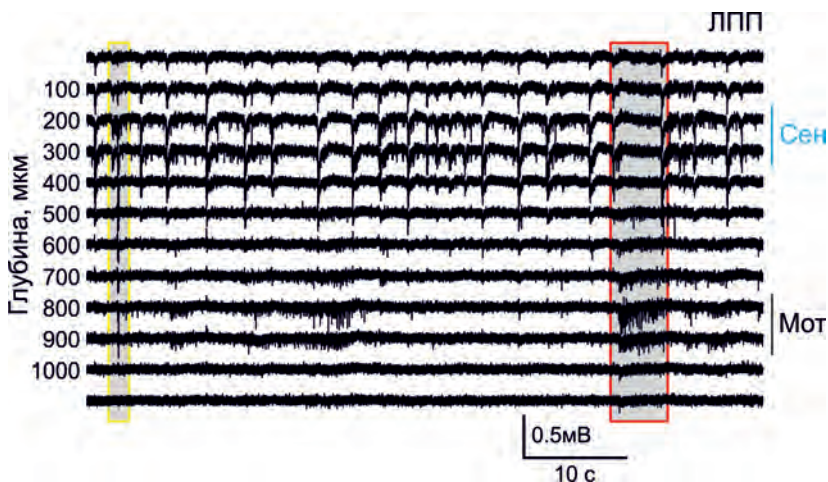


Рисунок 7 — Пример регистрации электрической активности в поясничном сегменте изолированного спинного мозга новорожденной крысы.

Представленные ЛПП демонстрируют различные виды спонтанной активности. Желтой и красной рамкой выделены примеры, соответственно, кратковременной и длительной вспышек в моторной области.

Активность в дорсальных рогах в изолированном спинном мозге была организована в виде частых кратковременных вспышек, возникающих с частотой 15 ± 4.9 / мин и длительностью 119 ± 28 мс ($n=5$ крыс, 6860 вспышек). Вспышки активности в сенсорной области характеризовались локальными негативными отклонениями ЛПП и повышением частоты МПД в дорсальных рогах и, как правило, отсутствием связанной активности в вентральных рогах (рис. 8). Анализ ПИТ выявил во время этих вспышек наличие мощного одиночного стока в дорсальных рогах. Кратковременные вспышки в сенсорной области по своим характеристикам были схожи со вспышками, которые наблюдались во время миоклонических подергиваний *in vivo*, однако частота вспышек *in vivo* была значительно ниже. Кроме того, в отличие от данных, полученных *in vivo*, эти вспышки в дорсальных рогах имели принципиально иную временную организацию относительно активности в вентральных рогах. В частности, вспышкам в сенсорной области достоверно не предшествовала активность в моторной области (в пределах

100 мс интервала), и только 3.7 ± 1.9 % сенсорных вспышек были связаны с последующей активностью в вентральных рогах. Другим отличием активности в дорсальных рогах в условиях изолированного спинного мозга *in vitro* являлось отсутствие длительных эпизодов активности, которые наблюдались во время комплексных движений *in vivo*.

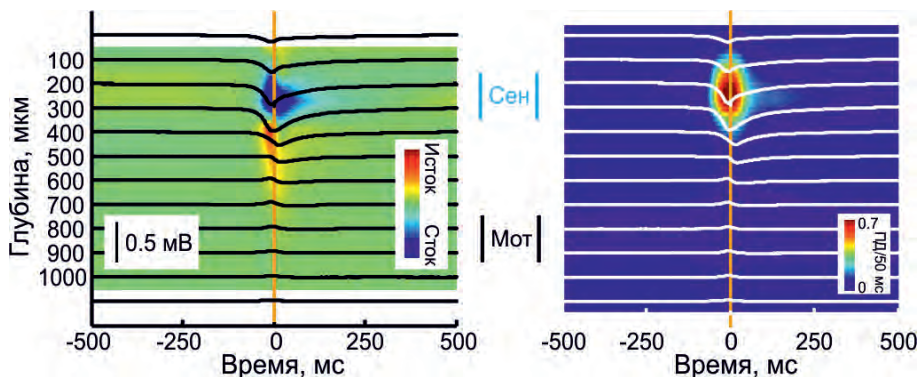


Рисунок 8 – Глубинный профиль электрической активности в изолированном спинном мозге новорожденных крыс во время вспышек активности в сенсорной области.

Представлены усредненный профиль ПИТ (слева) и динамика частоты МПД (справа). Усреднение проводилось по пику ЛППП в сенсорной области (вертикальная оранжевая линия).

В вентральных рогах спинного мозга активность была представлена двумя основными паттернами, которые, в первую очередь, отличались по своей длительности и включали в себя кратковременные вспышки с длительностью 62 ± 14 мс и длительные разряды продолжительностью 3.0 ± 0.3 с. Кратковременные вспышки, возникавшие с частотой 1.9 ± 0.7 / мин, были схожи с кратковременными вспышками, наблюдавшимися во время твитчей в условиях *in vivo*. Однако в отличие от экспериментов *in vivo*, вспышки в вентральных рогах в изолированном спинном мозге *in vitro* принципиально отличались по своей временной корреляции с активностью в дорсальных рогах. В то время как *in vivo* активация нейронов в дорсальных рогах следовала за кратковременными вспышками в вентральных рогах, *in vitro* эта последовательность была инвертирована, и активность в дорсальных рогах предшествовала кратковременным вспышкам в вентральных рогах. При этом 16.4 ± 9.7 % кратковременных вспышек активности в моторной области предшествовали вспышкам в сенсорной области. Усреднение ЛППП и ПИТ, а также частоты МПД по пику ЛППП кратковременных вспышек в моторной области показало наличие стока и увеличение частоты МПД в вентральных рогах, а также предшествующего им стока и вспышек МПД в дорсальных рогах

(рис. 9). Помимо кратковременных паттернов, активность в вентральных рогах была также представлена редкими (1.7 ± 0.3 / мин) и длительными вспышками активности, организованными в осцилляции с частотой 6.0 ± 0.1 Гц, но не сопровождающимися активацией нейронов сенсорной области.

Таким образом, пространственно-временная организация активности в изолированном спинном мозге новорожденных крыс *in vitro* существенно отличалась от активности *in vivo* значительно более низкой и инвертированной во времени корреляцией вспыхивающей нейрональной активности в сенсорных и моторных областях.

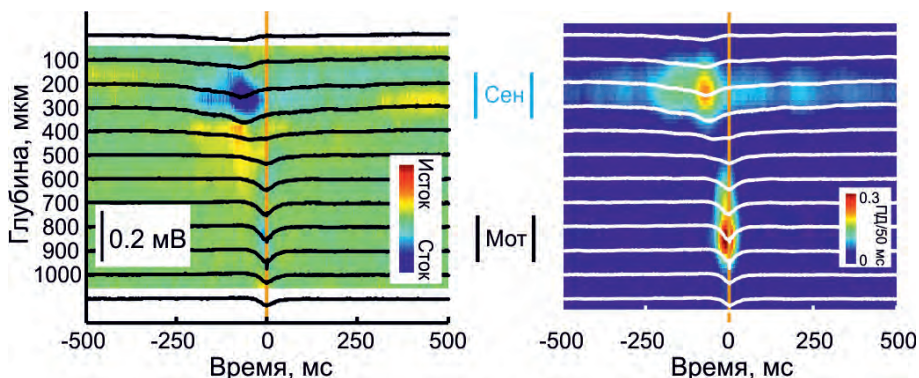


Рисунок 9 — Глубинный профиль электрической активности в изолированном спинном мозге новорожденных крыс во время кратковременных вспышек в моторной области.

Представлены усредненный профиль ПИТ (слева) и динамика частоты МПД (справа). Усреднение проводилось по пику ЛПП в моторной области (вертикальная оранжевая линия).

Фармакологический анализ механизмов спонтанной активности в изолированном спинном мозге новорожденных крыс

На следующем этапе был проведен анализ механизмов функционирования сетей изолированного спинного мозга *in vitro* с использованием фармакологических методов. Для этого проводилась аппликация антагонистов рецепторов глутамата и ГАМК_A-рецепторов. Фармакологический анализ показал, что комбинированное использование антагонистов ионотропных глутаматных рецепторов CNQX (20 мкМ) и APV (50 мкМ) (антагонистов ионотропных глутаматных рецепторов) полностью подавляет спонтанную активность как в сенсорной, так и в моторной областях (рис. 10А), что свидетельствует о ключевой роли глутаматергических механизмов в генерации спонтанных

вспышек в сенсорной и моторной областях в изолированном спинном мозге новорожденных крыс.

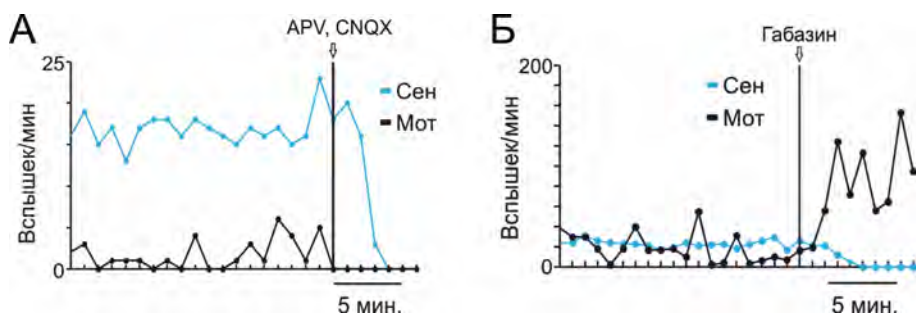


Рисунок 10 — Динамика изменения частоты вспышек в моторной и сенсорной областях изолированного спинного мозга *in vitro* в контрольных условиях и после аппликации APV и CNQX (А) и габазина (Б)

Интервал для расчета параметров – 1 минута. Вертикальная черная линия соответствует времени аппликации APV и CNQX / габазина.

Аппликация антагониста ГАМК_A-рецепторов габазина (5 мкМ) приводила к устранению регулярных вспышек в сенсорной области и значительно увеличивала мощность ЛПП и частоту МПД во время длительных вспышек в моторной области (рис. 10Б) с устранением 6-герцовых осцилляций, что свидетельствует о тормозном эффекте ГАМК_A-рецепторов и участии ГАМК-ергических интернейронов в генерации осцилляций в нейрональных сетях вентральных рогов изолированного спинного мозга.

Представленные данные показывают, что даже высокосинхронная активность в вентральном роге, вызываемая блокированием торможения, не приводит к активации нейронов в первичной сенсорной области дорсального рога, что в очередной раз указывает на отсутствие интраспинальных связей, способных обеспечить координированную активность в сенсорно-моторных сетях спинного мозга у новорожденных крыс посредством эфферентной копии. Вместе с тем, устранение вспышечной активности в дорсальных рогах спинного мозга при блокировании ГАМК_A-рецепторов свидетельствует об участии ГАМК-ергических механизмов в синхронном возбуждении нейронов сенсорной области во время вспышечной активности, что, вероятно, связано с возбуждающим действием ГАМК на нейроны в дорсальных рогах спинного мозга новорожденных крыс *in vitro*.

Заключение

В данной работе исследовалась пространственно-временная динамика активности в сенсорных и моторных сетях спинного мозга новорожденных крыс *in vivo* во время спонтанных движений задних конечностей, а также спонтанная электрическая активность в изолированном спинном мозге новорожденных крыс *in vitro*. В экспериментах *in vivo*, во время миоклонических подергиваний и комплексных движений наблюдалась высокая степень корреляции активности в сенсорных и моторных областях спинного мозга по последовательной временной схеме: мотонейроны – движения – нейроны сенсорной области. Деафферентация методом локальной перерезки дорсальных корешков подавляла вспышечную активность в сенсорной области, и тем самым устраняла сенсорно-моторную координацию, не оказывая значительного влияния на характеристики движений и параметры активности в моторной области. В отличие от экспериментов *in vivo*, активность в изолированном спинном мозге *in vitro* характеризовалась гораздо более слабыми взаимодействиями между сенсорными и моторными областями. Кроме того, наблюдаемые в изолированном спинном мозге *in vitro* сенсорные вспышки предшествовали моторным, что принципиально отличается от полученных в экспериментах *in vivo* данных. Фармакологический анализ сетевой активности в изолированном спинном мозге *in vitro* выявил ключевую роль глутаматергических механизмов в генерации вспышечной активности как в моторной, так и сенсорной областях, а также разнонаправленные эффекты ГАМК – тормозные в моторной области и возбуждающие в сенсорной области. В совокупности, данные, полученные *in vivo* и на изолированном спинном мозге *in vitro*, являются прямым доказательством принципиальной роли сенсорной обратной связи в координации активности в сенсорных и моторных областях спинного мозга во время спонтанных движений.

Выводы

1. Разработанная методика функционального картирования с использованием комбинированной локальной тактильной стимуляции конечностей и электрической микроstimуляции спинного мозга позволила локализовать сенсорные и моторные области в поясничных сегментах спинного мозга новорожденных крыс.
2. Анализ двигательной активности задних конечностей выявил кратковременные миоклонические подергивания, характерные для состояния активного сна и длительные комплексные движения, характерные для состояния бодрствования новорожденных крыс.
3. Спонтанные движения конечностей новорожденных крыс во время сна и бодрствования сопровождаются координированными вспышками активности нейронов в моторных и сенсорных областях соответствующим

- ющего поясничного сегмента спинного мозга. При этом активация мотонейронов предшествует началу движений, а начало активации нейронов сенсорной области следует за началом движений.
4. Деафферентация устраняет активацию нейронов сенсорной области во время спонтанных движений, не изменяя активности моторных нейронов и характеристик движений, что является прямым доказательством обратной сенсорной связи как основного механизма активации нейронов сенсорной области во время спонтанных движений.
 5. Пространственно-временная организация активности в изолированном спинном мозге новорожденных крыс *in vitro* существенно отличается от активности *in vivo* значительно более низкой и инвертированной во времени корреляцией вспыхивающей нейрональной активности в сенсорных и моторных областях.
 6. В генерацию вспыхивающей активности в сенсорной и моторной областях изолированного спинного мозга новорожденных крыс *in vitro* вовлечены глутаматергическими и ГАМК-ергическими механизмы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

- 1) Паттерны двигательной активности вибрисс в состояниях сна и бодрствования у новорожденных крыс / **Насретдинов А.Р.**, Валеева Г.Р., Хазипов Р.Н. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2019. – Т. 105. – № 10. – С. 1215-1224. – DOI: 10.1134/S0869813919100066.
- 2) Sensory feedback synchronizes motor and sensory neuronal networks in the neonatal rat spinal cord / Inacio A.R., **Nasretdinov A.R.**, Lebedeva J.A., Khazipov R.N. // Nature Communications. – 2016. – V. 7: 13060. – P.1-14. – DOI: 10.1038/ncomms13060.
- 3) **Nasretdinov A.R.**, Akhmetshina D.R., Valeeva G.R., Khazipov R.N. Follicular nerve evoked responses in the neonatal rat barrel cortex // Bionanoscience. – 2016. – V. 29. – № 2. – С. 373-375. – DOI: 10.1007/s12668-016-0245-6.
- 4) Emergence of coordinated activity in the developing entorhinal-hippocampal network / Valeeva G.R., Janackova S., **Nasretdinov A.R.**, Rychkova V.S., Makarov R.A., Holmes G.L., Khazipov R.N., Lenck-Santini P.P. // Cerebral Cortex. – 2019. – V. 29. – № 2. – С. 906-920. – DOI: 10.1093/cercor/bhy309.

Тезисы докладов в сборниках материалов конференций:

- 1) Сенсорная обратная связь, синхронизирующая моторные и сенсорные зоны в спинном мозге новорожденных крыс / **Насретдинов А.Р.**, Инасио А.Р., Лебедева Ю.А., Мухтаров М.Р., Хазипов Р.Н. // Motor Control: Дополнительные материалы VI Российской с международным участием Конференции по управ-

лению движением. 14-16 апреля 2016 г. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2016. – 16 с. – С. 9.

2) Сенсорно-моторная интеграция в спинном мозге новорожденных крыс / **Насретдинов А.Р.**, Инасио А.Р., Лебедева Ю.А., Хазипов Р.Н. // Трансляционная медицина 2016: Сборник тезисов международной конференции. 13-14 октября 2016 г. – Казань: ИПК «Бриг», 2016. – 125 с. – С. 76.

E-mail автора: Azrnasretdinov@kpfu.ru

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский (Приволжский) федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических кадров, ученому секретарю Диссертационного совета КФУ 03.06 Аникиной Татьяне Андреевне, факс: (843)238-76-01, e-mail: tania57vgl@rambler.ru

Насретдинов Азат Рафаилович

ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОТОРНОЙ И СЕНСОРНОЙ ОБЛАСТЕЙ
СПИННОГО МОЗГА ВО ВРЕМЯ СПОНТАННЫХ ДВИЖЕНИЙ У
НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС

Автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук

Подписано в печать _____._____._____. Заказ № _____

Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.

Типография _____

