

Правительство Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

Индекс УДК 612.084
Рег. № НИОКТР АААА-А20-120012390063-1
Рег. № ИКРБС

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Управления
научных исследований СПбГУ

_____ Е.В. Лебедева
« » _____ 2022 г.

ОТЧЁТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОНАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ
СОМАТОСЕНСОРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА РАБОТУ МОЧЕВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ
СИСТЕМЫ
(промежуточный, этап 2)

Руководитель лаборатории нейропротезов
ИТБМ СПбГУ, д.м.н.



подпись, дата

18.04.2022 П.Е.Мусиенко

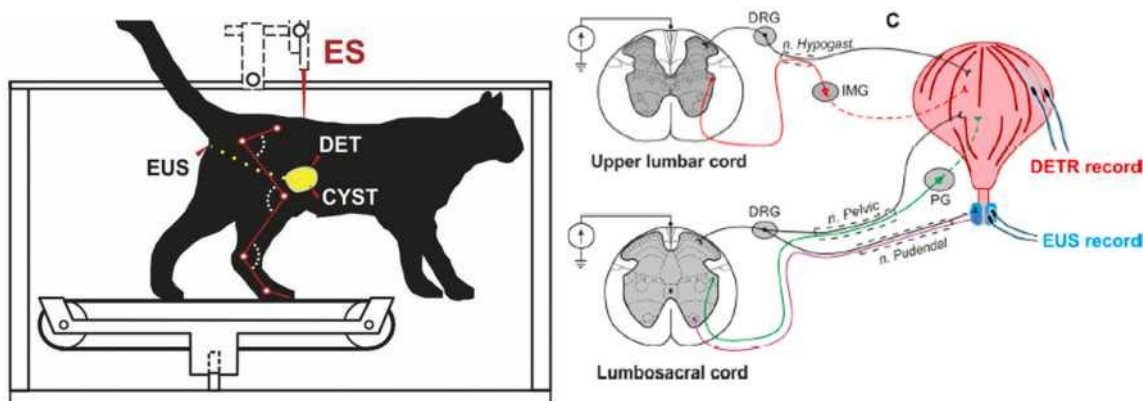
Санкт-Петербург 2022

РЕФЕРАТ

В ходе работы 2 года проекта изучались механизмы интегративного соматовисцерального контроля на острой экспериментальной модели кошки с вживлением имплантов для регистрации активности детрузора, наружного сфинктера уретры, мышц конечностей и силовых опорных реакций, внутривезикального давления при уродинамических циклах наполнения-опорожнения мочевого пузыря, в покое, при сенсорном раздражении лап и электрической стимуляции. Исследованы эффекты влияния стимуляции спинного мозга на рефлекторную активность наружного сфинктера уретры, детрузора и координацию их работы, а также тоническую активность этих мышц и уродинамические параметры. Выявлены триггерные зоны спинного мозга для усиления детрузорной или сфинктерной активности. Обнаружены специфические эффекты соматовисцерального и висцеросоматического взаимовлияния. Получены косвенные доказательства о возможном едином стволовом интегративном центре управления локомоторной и мочевыделительной функций.

Введение

Расстройства мочеиспускания, в частности, гиперактивность мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, являются распространенной патологией. Хотя в клинической практике лечения данной группы заболеваний успешно применяются подходы, основанные на стимуляции сенсомоторных систем (стимуляция сакральных нервных корешков и тибиального нерва), механизмы действия этих методов остаются неясными, а поэтому практика их применения не имеет общепризнанных стандартов.



Основная часть отчета о НИР

Целью проекта является исследование механизмов влияния соматосенсорной стимуляции на работу мочевыделительной системы. Цель подразумевает решение следующих задач:

1. Изучение эффектов влияния стимуляции сенсомоторных систем на нормальные уродинамические показатели.

2. Комплексное исследование рефлекторной активности наружного сфинктера уретры, детрузора и соматовисцеральных взаимодействий при стимуляции сенсомоторных систем.
3. Анализ оптимальных алгоритмов применения соматосенсорной стимуляции для восстановления мочеиспускания на экспериментальных моделях уродинамических нарушений.

Для изучения спинальных механизмов регуляции работы нижних мочевыводящих путей была использована модель острой децеребрированной кошки (Shik et al. 1966; Musienko et al. 2005, 2012, 2014; Merkulyeva et al. 2018). Децеребрация позволяет устранить влияние от вышележащих отделов, для того, чтобы исследовать свойства и возможности спинальных и стволовых структур, находящихся каудальнее места перерезки. Кроме того, после проведения децеребрации нет необходимости в наркотизации животного (Silverman, J., 2005), что является несомненным достоинством модели при регистрации вызванных потенциалов и проведения других нейрофизиологических тестов, т.к. исключается возможность влияния анестетика.

Исследование было выполнено на 10 взрослых животных-самцах массой 3-5 кг.

Операции проводились под ингаляционной анестезией (изофлуран 1,5-2,5% с кислородом). Уровень анестезии контролировали тестами на чувствительность лап при механическом давлении на кожу, а также путем проверки реакции зрачков на свет. Перед проведением децеребрации одновременно с трахеостомией осуществляли перевязку общих сонных артерий. Голова и позвоночный столб жестко фиксировали в металлической раме. Далее проводили трепанацию черепа, открывали доступ к четверохолмиям среднего мозга, осуществляли преколликулярную-постмаммилярную децеребрацию. Уровень перерезки проверяли после опыта при диссекции ствола головного мозга. После децеребрации проводили срединный дорсальный разрез кожи спины и выполняли частичную ламинэктомию между позвонками различными грудными, поясничными, крестцовыми и копчиковыми позвонками. Действие анестезии прекращалось после хирургических вмешательств, а эксперименты начинались через 4-6 ч после децеребрации. В ходе эксперимента непрерывно отслеживали показатели частоты дыхательных движений, частоты сердечных сокращений, среднего артериального давления, электрокардиограммы, ректальной температуры, которая поддерживалась на уровне 37-38°C. Снятие показаний состояния децеребрированных животных начинали при хирургических манипуляциях и продолжали в течение всего опыта.

Биполярные электромиографические (ЭМГ) электроды были имплантированы в детрузор (вентрально и дорсально, DetrV и DetrD, соответственно), наружный уретральный сфинктер (EUS), абдоминальные мышцы (Abdomen) и мышцы конечностей. Также для регистрации внутривезикального (P_bladder) и абдоминального давления (P_abdomen) использовались катетеры, располагаемые внутри мочевого пузыря и брюшной полости.

Для вызова рефлекторных ответов на регистрируемых каналах, оценки влияния на тоническую мышечную активность и уродинамические параметры осуществляли эпидуральную электрическую стимуляцию шариковым электродом (диаметр 0.5 мм), закрепленным на микроманипуляторе, который подводился к нужному сегменту дорсальной поверхности спинного мозга. Индифферентный электрод имплантировали в паравертебральные мышцы. Для стимуляции использовали стимулятор фирмы A-M Systems, частота стимуляции - 1-5 Гц, длительность стимула 0,3 мс, шаг приращения силы тока - 10 мкА (до достижения максимального ответа мышц нижних конечностей). Рассчитывали амплитуды полученных ответов (пик-пик), для Detr, EUS, Abdomen, P_bladder и P_abdomen строили кривые рекрутирования в каждой точке стимуляции. Полученные данные по рекрутированию рефлекторных ответов аппроксимировали методом линейной регрессии, рассчитывали угол наклона для каждой кривой (Sysoev et al. 2020; Shkorbatova et al. 2020). Для каждого из животных все углы были нормализованы относительно максимального угла наклона в одной из точек стимуляции. Также осуществляли анализ средней амплитуды внутривезикального давления, силовых опорных реакций, активности регистрируемых мышц в проводимых тестах.

Проведенный анализ рефлекторных ответов при картировании спинного мозга (n=5 кошек) показал, что рекрутирование DetrV и DetrD происходило, в большей степени, при стимуляции нижних грудных и верхних поясничных отделов спинного мозга (T13-L1). Схожим образом рекрутировались P_abdomen, P_bladder, а также Abdomen, однако их активацию вызывали также более каудальные отделы (L3-L4). Ответы в EUS возникали как правило, при стимуляции всех изучаемых отделов спинного мозга, однако, выраженная специфичность была отмечена для нижних поясничных, верхних сакральных отделов (L6-S1), о чем свидетельствует сравнение нормализованные значений углов наклона прямых, используемых для аппроксимации данных кривых рекрутирования методом линейной регрессии (**Рис. 3**).

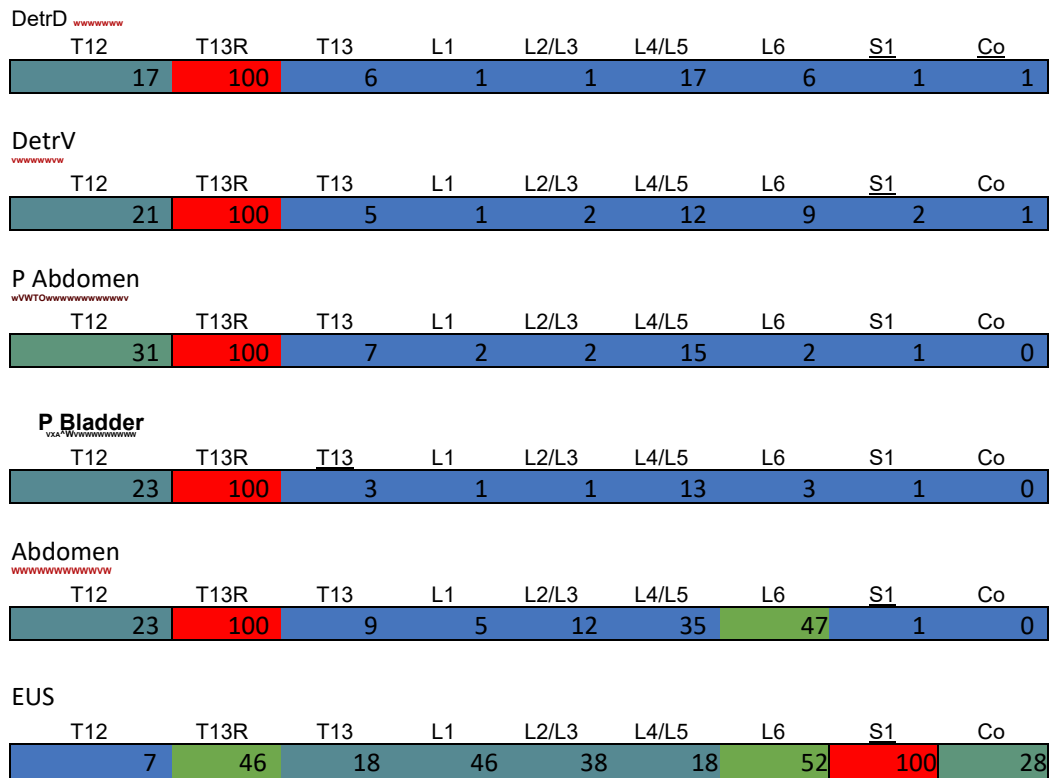


Рис. 3. Нормализованные значения углов наклона кривых рекрутирования *Detr*, *EUS*, *Abdomen*, *P_bladder* и *P_abdomen* для различных отделов спинного мозга у одного животного.

Получены результаты (n=4 кошек) по влиянию стимуляции висцеральных и сенсомоторных нейрональных путей, распределенных rostrocaudally в спинном мозге, на тоническую активность детрузора, наружного сфинктера уретры, а также мышцы конечностей (**Рис. 4**). Как и с одиночными рефлекторными ответами, была обнаружена специфичность ростральных сегментов спинного мозга в активации детрузорной активности, тогда как каудальные сегменты в большей степени влияли на активность наружного сфинктера (**Рис. 4А-Б**). Следует отметить и специфичность активации ростральными электродами проксимальных мышц (*m. iliopsoas*) с более рострально распределенными мотонейрональными пулами (**Рис. 4В**). Тогда как дистальные мышцы (*m. gastrocnemius medialis*, *m. tibialis ant*, *m. soleus*) в большей степени активировались при стимуляции L6 и S-Co отделов спинного мозга (**Рис. 4Г-Е**). Медленная мышца *m. soleus* отличалась по динамике рекрутирования, со временем после включения стимуляции наблюдался кумулятивный активирующий эффект при стимуляции ростральных сегментов (**Рис. 4А-Е**).

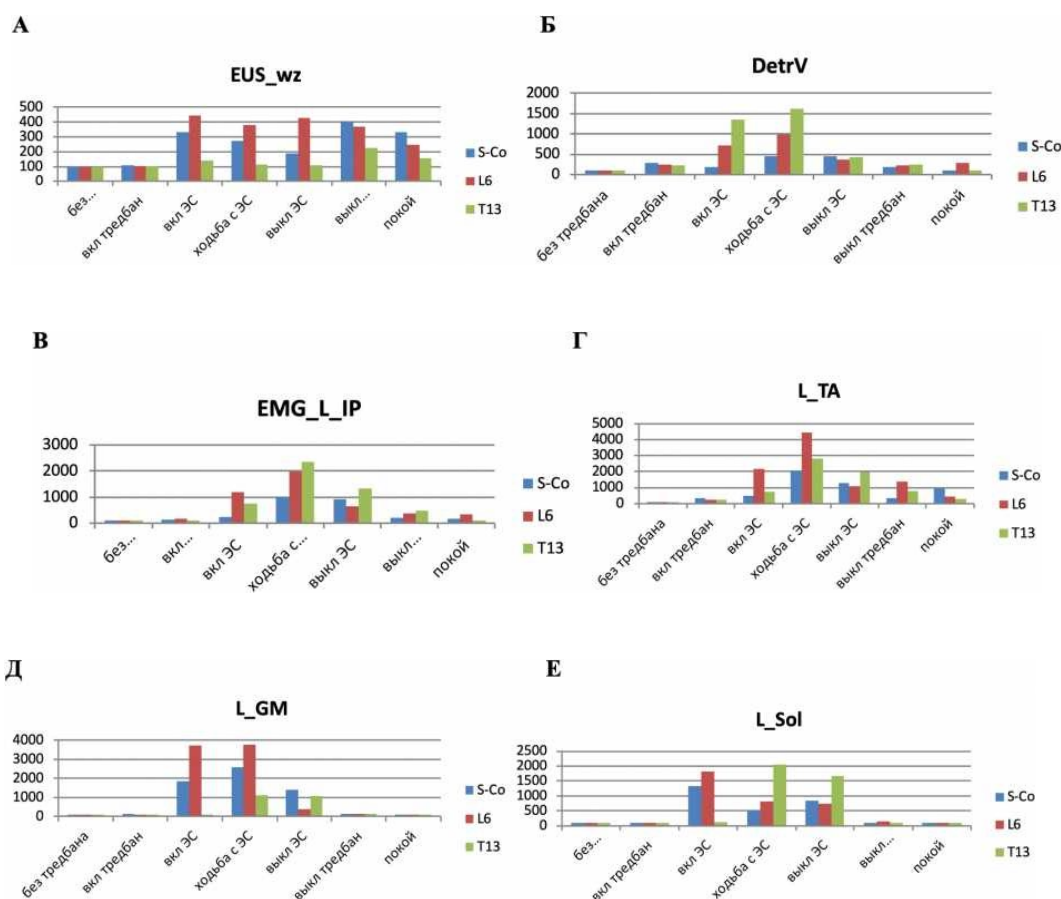


Рис. 4. Средняя амплитуда (в % по отношению к покою) активности (А-Б) мышц LUT (DetrV-вентральный детрузор, EUS-наружный сфинктер уретры) и (В-Е) конечностей (IP, TA - флексоны, GM, Sol - экстензоры) при стимуляции спинного мозга в области сакральных-копчиковых сегментов (S-Co), сегментов L6 и T13.

Также проводился анализ влияния стимуляции разных сегментов спинного мозга у кошек с нормальным мочеиспусканием (n=3), и у кошек с признаками патологии (n=2) парадоксальной ишурии (характерно для спинальной и черпно-мозговой травмы), терминальной гиперактивности мочевого пузыря в сочетании со сфинктерно-детрузорной диссинергией (характерно для спинальной травмы, нейродегенеративных заболеваний и др.). В качестве критериев оценки стимуляции использовались: введенный объем, характеризующий комплаентность-способность мочевого пузыря растягиваться, выделенный объём, характеризующий контрактильность - способность мочевого пузыря сокращаться, пиковое и среднее внутрипузырное давление, а также активность детрузора и наружного сфинктера в фазу pre-voiding, voiding и post-voiding. Набрана обширная матрица экспериментальных данных, исследование которой и интерпретация результатов будут продолжены в следующем году с применением метода принципиальных компонент (PCA, Musienko et al. J Neurosci, 2011).

В отдельных экспериментальных протоколах (n=5 кошек) изучалось взаимовлияние сенсомоторной и висцеральной систем. В частности, исследовались висцеросоматические эффекты, а именно специфические влияния висцеральной активности при наполнении мочевого пузыря, акте мочеиспускания, активности LUT мышц (до и после мочеиспускания) на работу различных мышц конечностей (**Рис. 5А**). Проанализирована средняя амплитуда активности сенсомоторной и висцеральной мускулатуры при мочеиспускании (**Рис. 5Б**). Обнаружено, что мочеиспускание сопровождается не только повышением внутривезикального давления, увеличением активности детрузора, и уменьшением активности EUS, но и увеличением силовых опорных реакций, а также тонуса антигравитационной мускулатуры, в частности, m.Soleus and m.Gastrocnemius (**Рис. 5А,Б**). В отдельных случаях мочеиспускание приводило к увеличению тонической активности m. iliopsoas.

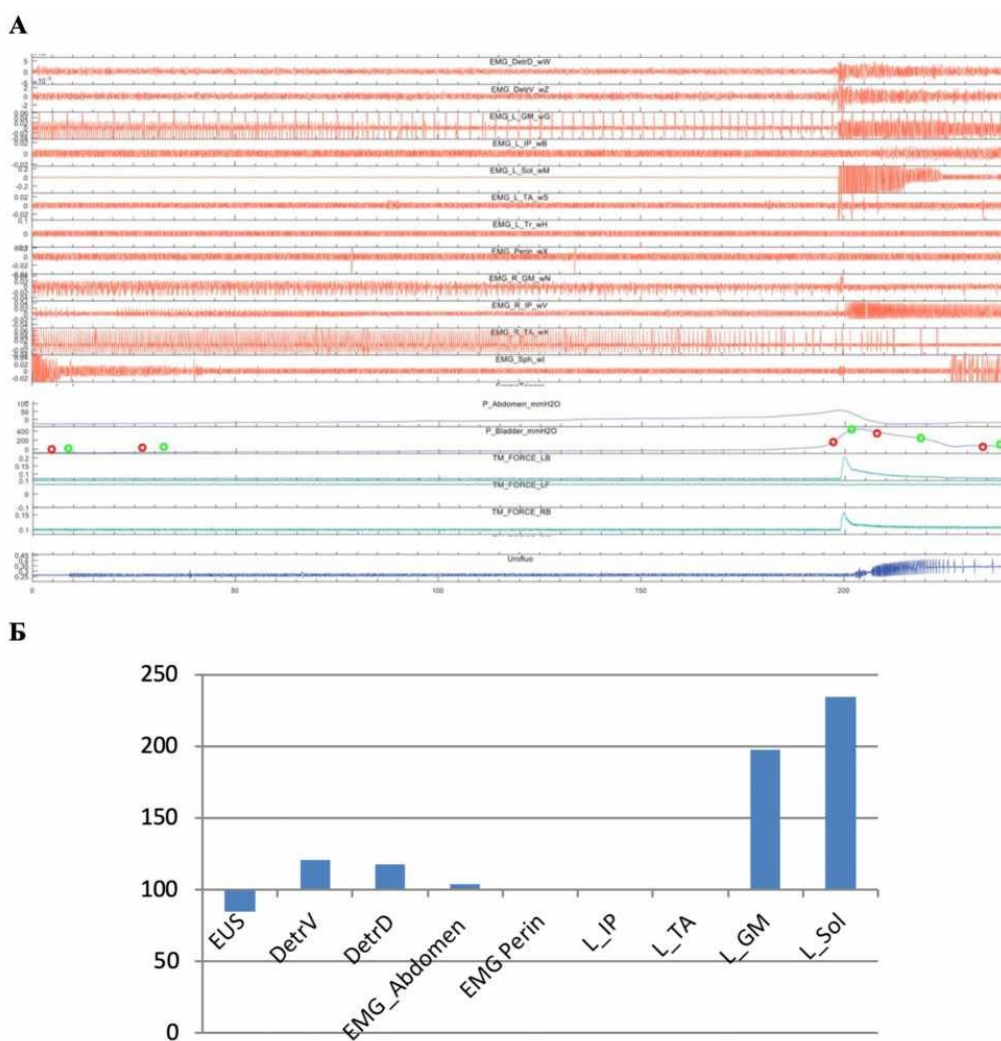


Рис. 5. А. Пример экспериментальной записи уродинамического цикла наполнения-опорожнения мочевого пузыря. Б. Средняя амплитуда (в % по отношению к покою) активности мышц LUT (DetrV-вентральный детрузор, DetrD-дорсальный детрузор, EUS-

наружный сфинктер уретры), мышц живота (Abdomen), промежности (Perin), и конечностей (IP, TA - флексоры, GM, Sol - экстензоры) при мочеиспускании.

В другом экспериментальном протоколе (n=5 кошек) изучались соматовисцеральные эффекты, а именно, влияние соматосенсорной стимуляции на детрузорную активность. Для этого осуществлялись различные пассивные и активные движения лап. Отведение лапы назад не вызывало приращение ДЕТР сигнала относительно базового уровня; отведение лапы вперёд не приводило к приращению ДЕТР сигнала относительно базового уровня; пассивная ходьба вперёд (ХВ) одной лапой у большинства животных (4 из 5) вызывала большее приращение ДЕТР сигнала относительно ходьбы назад (ХН) одной лапой. Пассивная ХВ одной лапой приводила к большему приращению ДЕТР сигнала относительно нажатия на живот у 2 из 3 животных. Пассивная ХН одной лапой приводила к большему приращению ДЕТР сигнала относительно нажатия на живот (n=3). Пассивная ХВ двумя лапами приводила к большему приращению ДЕТР сигнала относительно ХВ одной лапой у большинства (2 из 3) животных. Пассивная ХН двумя лапами приводила к большему приращению ДЕТР сигнала относительно ХН одной лапой у большинства (2 из 3) животных. Отведение лапы вбок приводило к приращению ДЕТР сигнала относительно базового уровня у большинства (2 из 3) животных. Пассивное сгибание лапы в тазобедренном суставе вызывало приращение ДЕТР сигнала относительно базового уровня. Поставлена модель крысы с хронической вывеской задних конечностей (Popov et al. J Exp Biol. 2021, Popov et al. Exp Brain Res. 2021) для изучения роли рецепторов опоры в сенсомоторном и висцеральном контроле, проведен первичный анализ висцеральных эффектов в условиях моделируемой микрогравитации, который будет продолжен в следующем году.

В последней серии экспериментов на децеребрированных кошках (n=3) изучалось влияние стимуляции спинного и головного мозга на активность мочевого пузыря. Применялись точки стимуляции среднего мозга (МЛО-мезенцефалическая локомоторная область) и поясничного утолщения спинного мозга (L5-L6), вызывающие ходьбу задних конечностей. У большинства котов сигнал ДЕТР был выше при МЛО, чем при ЭС. Дополнительно проводили картирование эффектов МЛО по глубине. Выявлено, что есть оптимальная точка, приближаясь к которой возникает максимальный прирост активности детрузора и инициация мочеиспускания (**Рис. 6**). Причем эта точка совпадает с точкой максимальной активности локомоторной мышцы IP. Это косвенно говорит о том, что мезенцефалический центр мочеиспускания и локомоции представляют собой единый

интегративный центр, или близко расположенные и функционально взаимосвязанные области.

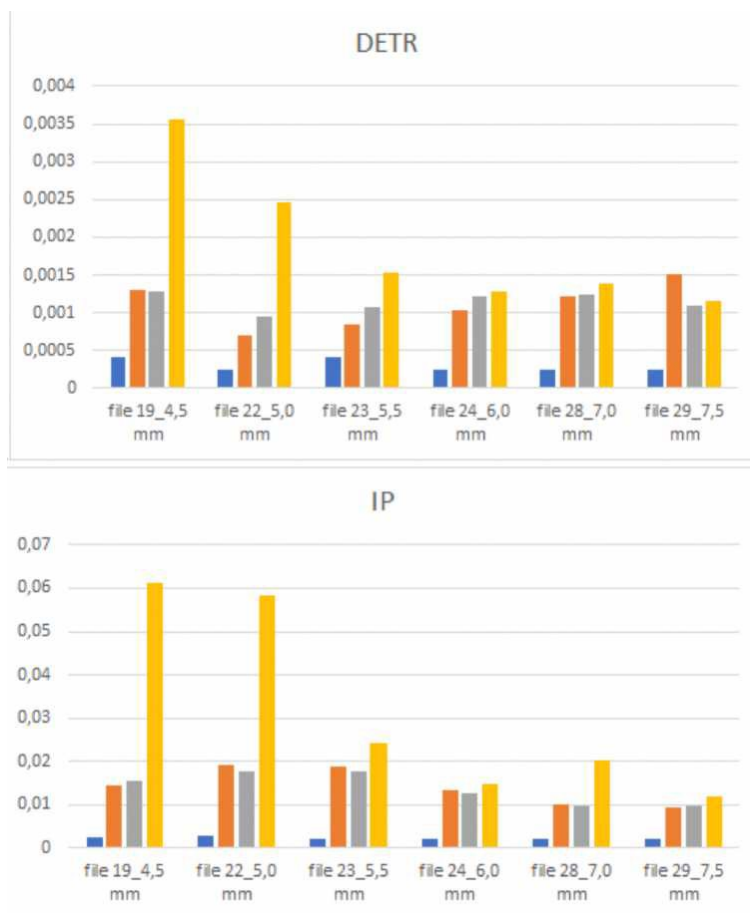


Рис. 6. Активность детрузора и *m.iliopsoas* при стимуляции мезенцефалической локомоторной области на разных глубинах.

Заключение

Теоретическое значение проведенной работы состоит в расширении представлений о спинальных механизмах соматовисцеральной интеграции. Полученная информация об интегративной активности сенсомоторных и висцеральных нейронных сетей, а также возможностях управления этими двумя системами при нарушении супраспинального контроля, позволит оптимизировать подходы к нейрореабилитации спинальных больных.

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Popov Alexander, Lyakhovetskii Vsevolod, Bazhenova Elena, Gorskii Oleg, Kalinina Daria, Merkulyeva Natalia, Musienko Pavel. The role of load-dependent sensory input in the control of balance during gait in rats. Journal of Experimental Biology, 2021, 224 - 15

2. Alexander Popov, Vsevolod Lyakhovetskii, Natalia Merkulyeva, Pavel Musienko. Effect of hindlimb unloading on recruitment of gastrocnemius medialis muscle during treadmill locomotion in rats. *Experimental Brain Research*, 2021, 239 - 9, 2793-2801

Тезисы в материалах отечественных и международных конференций:

1. Sysoev Y. , Bazhenova E, Lyakhovetskii V., Kovalev G., Shkorbatova P., Pavlova N., Gorskii O., Merkulyeva N., Shkarupa D., Musienko P. Modulation of detrusor muscle and external urethral sphincter activity by site-specific electrical stimulation of rat spinal cord // 27th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference “Stress and Behavior”. St. Petersburg. Russia. 16-18 Sept. 2020. P. 30-31. Устный доклад.

2. Мусиенко П.Е, Сысоев Ю.И., Ляховецкий В.А., Баженова Е.Ю., Меркульева Н.С. Спинальные механизмы интегративного контроля сенсомоторной и мочевыделительной систем // Инновационные исследования в биологии и медицине. Международная научная конференция. 25-27 ноября 2020 г. Сочи, Россия. С. 85-86. Устный доклад.