

СУБПОПУЛЯЦИИ КАЛЬБИНДИН-ИММУНОРЕАКТИВНЫХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ ДОРСАЛЬНОГО РОГА СПИННОГО МОЗГА МЫШЕЙ

© В. В. Порсева,¹ В. В. Шилкин, А. А. Стрелков, П. М. Маслюков

Ярославская государственная медицинская академия Минздрава РФ;

* электронный адрес: vvporseva@mail.ru

В дорсальном роге спинного мозга в пластинах I—IV на грудном и поясничном уровнях выявляются специфичные для каждой пластины субпопуляции интернейронов, иммунореактивных к кальбиндину 28 кДа (КАБ ИР). В области медиального края дорсального рога определяется особая субпопуляция КАБ ИР интернейронов, клетки которой отличаются по морфометрическим характеристикам от субпопуляций КАБ ИР-интернейронов указанных пластин. На всех изученных уровнях спинного мозга максимальное количество КАБ ИР-интернейронов локализовано в пластине II. Уровневые различия заключаются в большем количестве КАБ ИР-интернейронов и большей площади их сечения на поясничном уровне.

Ключевые слова: кальбиндин, интернейрон, дорсальный рог, спинной мозг, мышь.

Принятые сокращения: КАБ — белок кальбиндин с мол. массой 28 кДа, КАБ ИР-интернейроны — интернейроны, иммунореактивные к кальбиндину, МК — область медиального края дорсального рога спинного мозга, НФ — белок нейрофиламентов с мол. массой 200 кДа, СМ — спинной мозг, L4-L5-L6 — четвертый, пятый и шестой поясничные сегменты спинного мозга, Т2 — второй грудной сегмент спинного мозга, PBS — фосфатно-солевый буфер.

Биологическая роль кальция состоит в регуляции разнообразных процессов в нейроне — синаптической пластичности, активации цитоплазматических ферментов и ионных каналов, секреции нейромедиаторов в синаптическую щель (Neher, 2008; Schmidt, 2012). Все эти эффекты связаны с кратковременным повышением концентрации ионов кальция в цитоплазме клетки (Schwaller, 2009). Таким образом, значимым для функционирования нейрона является поддержание постоянного уровня кальция, так как его долговременное повышение в цитоплазме приводит к гибели клетки (Caillard et al., 2000). Одним из механизмов, обеспечивающих низкую концентрацию ионов кальция в цитоплазме клетки, является кальцийсвязывающий белок кальбиндин, который удерживает кальций, функционируя в качестве своеобразного буфера (Schmidt, 2012; Schwaller, 2012). Известно также, что в ноцицептивных интернейронах спинного мозга, содержащих кальбиндин, имеется и другой механизм поддержания низкой концентрации кальция в цитозоле — через α_2 - и δ -субъединицы потенциалактивируемых кальциевых каналов (CaCh) L-типа (Li et al., 2007).

Наибольшим разнообразием структурных и нейрохимических характеристик межнейронных связей отличаются спинальные интернейроны, обеспечивающие модуляцию соматосенсорных и висцеросенсорных влияний. В пластинах I—IV дорсальных рогов спинного мозга содержатся интернейроны, обеспечивающие точную локализацию болевого ощущения и способные изменяться под влиянием передаваемой сенсорной информации с первичных афферентных А- и С-волнок, обеспечивая тем самым торможение активности интернейронов иной

функциональной принадлежности (Craig et al., 2002; Grudt, Perl, 2002; Li et al., 2005; Sojka et al., 2010). По содержанию нейромедиаторов и пептидов интернейроны этих пластин разнообразны (Antal et al., 1991; Nazli, Morris, 2000; Lu, Perl, 2005; Порсева и др., 2013) и, составляя основу функциональных модулей различных видов чувствительности, представляют особый интерес с морфологической точки зрения для изучения распределения в них белков, связывающих кальций.

Целью данного исследования явилось изучение морфологических, топографических и морфометрических характеристик интернейронов дорсального рога спинного мозга, иммунореактивных к белку кальбиндину 28 кДа (calbindin 28 kDa).

Материал и методика

Исследование проведено на спинном мозге мышей C57BL/6 массой 20 ± 5 г (питомник ФИБХ, Пущино). Образцы были получены в ГНЦ РФИМБП РАН в рамках договора по программе фундаментальных и прикладных исследований по проекту «БИОН-М» № 1. Спинной мозг фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (Sigma, США) на фосфатно-солевом буфере (PBS; 0.01 M, pH 7.4) (Биолот, Россия) в течение 2 ч при 4 °C, после чего промывали трехкратно в растворе PBS в течение 30 мин и оставляли в 30%-ном растворе сахарозы (Panreac, Испания) на 24 ч при 4 °C (Brouns et al., 2003). Из фиксированного спинного мозга (СМ) выделяли сегменты: на грудном уровне — второй (T2), на пояснич-

ном — четвертый (L4), пятый (L5) и шестой (L6), которые замораживали в криогеле (Tissue-Tek O. C. T. Compound, Sakura Finetek, Нидерланды). Из выделенных сегментов изготавливали поперечные серийные срезы толщиной 16 мкм на криостате (Shandon E, Thermo Scientific, Великобритания). Иммуногистохимические, морфометрические и топографические характеристики интернейронов изучали в дорсальном роге СМ, устанавливая их соответствие пластинам Рекседа (Rexed, 1952; Steiner, Turner, 1972). Выявление нервных клеток, иммунореактивных (ИР) к белку кальбиндину (КАБ), проводили по ранее описанной методике с использованием меченых антител (Маслюков и др., 2012). Для выявления КАБ использовали первичные антитела (Abcam, Великобритания, разведение 1 : 500), вторичные антитела были коньюгированы с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC, Jackson, США), флуоресцирующим в зеленой области спектра. Мечение всей популяции нейронов по Нисслю производили с помощью красителя, флуоресцирующего в красной области спектра (NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains, Molecular Probes, США). Для определения положения и принадлежности интернейронов к пластинам проводили одновременное выявление в нейронах кальбиндина и белка нейрофиламентов с мол. массой 200 кДа (НФ) на одном срезе (Порсева и др., 2012). С этой целью проводили мечение антителами против белка КАБ (Abcam, Великобритания, разведение 1 : 500) и белка НФ200 (Abcam, Великобритания, разведение 1 : 300) в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в растворе PBS срезы последовательно инкубировали со вторичными антителами, коньюгированными с флуорохромами: флуоресцеинизотиоцианатом (FITC, Jackson, США, разведение 1 : 100) в течение 2 ч, флуоресцирующим в зеленой области спектра; индокарбоцианином (Cy3, Jackson, США, разведение 1 : 100) в течение 2 ч, флуоресцирующим в красной области спектра. После этого срезы отмывали в растворе PBS и заключали в среду для иммунофлуоресценции (VectaShield, Vector Laboratories, США).

Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе ЛОМО Микмед 2, вариант 12 (Санкт-Петербург,

Россия), оснащенном соответствующим набором светофильтров, объективом Микрофлюар 20 \times /0.70 и цифровой видеокамерой MDC320 (ScopeTec, Китай). Для выявления ИР-интернейронов использовали каждый пятый из серийных срезов — всего 10 срезов с каждого сегмента, которые подвергались качественному (положение, форма, отростки) и количественному анализу. Суммарное количество срезов составляло 40 срезов на 1 животное, общее количество животных равнялось 4. На срезах проводили подсчет всех ИР-интернейронов, срез которых прошел через ядро, и с помощью программы Image J (NIH, США) измеряли площадь их сечения. Для определения средних арифметических и их стандартных ошибок использовали программу Statistica, версия 10 (StatSoft, Inc., 2011). Учитывая, что полученные выборки были различного объема, для детального поиска различий в исследовании применяли анализ вариаций ANOVA и критерий Тьюки Post-hoc-анализа.

Использованные реагенты. В работе использовали следующие реагенты: параформальдегид (Sigma, США), фосфатно-солевой буфер (Биолот, Россия), саха-роза (Panreac, Испания), криогель (Tissue-Tek O. C. T. Compound, Sakura Finetek, Нидерланды), среда для иммунофлуоресценции (VectaShield, Vector Laboratories, США) и первичные антитела — поликлональные кроличьи против белка кальбиндина, моноклональные мышиные против белка нейрофиламентов (Abcam, Великобритания); вторичные ослиные антитела, коньюгированные с флуоресцеинизотиоцианатом против иммуноглобулинов кролика и с индокарбоцианином против иммуноглобулинов мыши (Jackson, США), красный флуоресцентный краситель Нисселя (Molecular Probes, США).

Результаты

В дорсальном роге СМ КАБ ИР-интернейроны выявлены как на грудном, так и на поясничном уровнях в идентичных областях, которые соответствовали пластинам I—IV серого вещества (рис. 1). Интенсивность свечения ИР-интернейронов была одинаковой для всех уров-

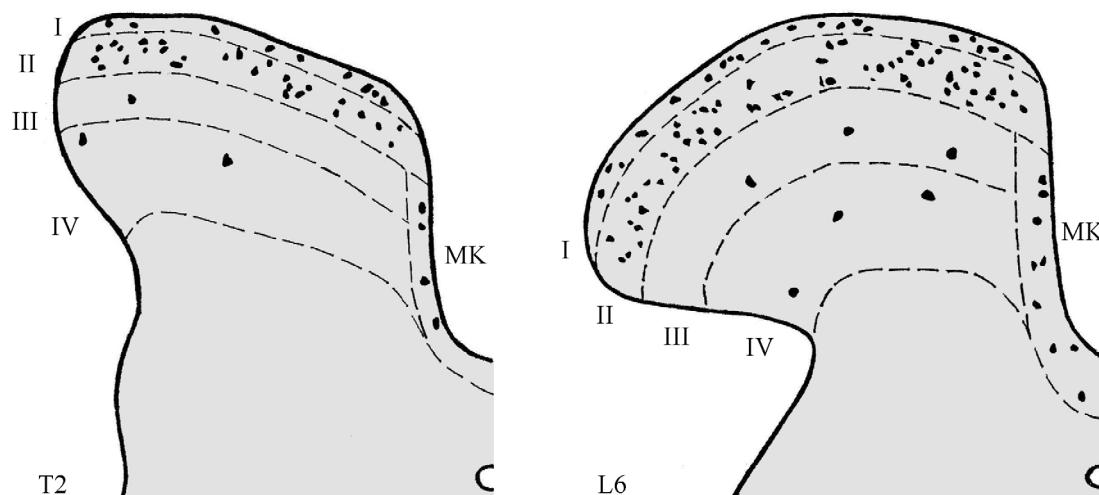


Рис. 1. Распределение КАБ ИР-интернейронов в дорсальном роге серого вещества спинного мозга.

Штриховые линии — границы пластин (I—IV) и области медиального края (МК); точки — КАБ ИР-интернейроны, количество, размеры и локализация которых изображены с соблюдением масштаба по отношению к областям и друг к другу; T2, L6 — дорсальный рог второго грудного и шестого поясничного сегментов спинного мозга соответственно (по: Steiner, Turner, 1972).

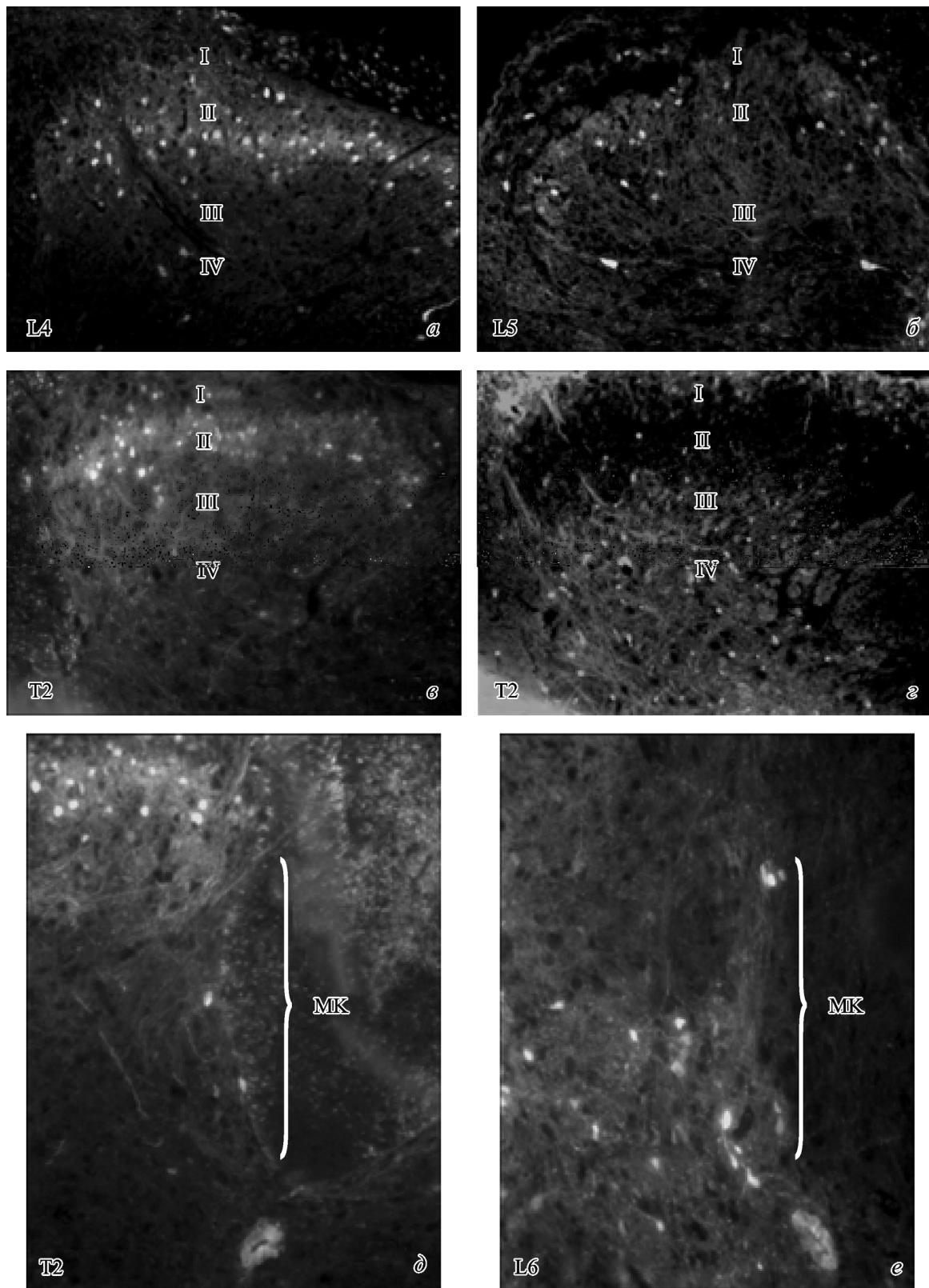


Рис. 2. Интернейроны, иммунореактивные к КАБ (*a—e, δ, ε*) и к НФ200 (*ε*) в пластинах I—IV и в области медиального края (МК) серого вещества дорсального рога во втором грудном (T2), четвертом (L4), пятом (L5) и шестом (L6) поясничных сегментах спинного мозга.

Об. 20×.

Таблица 1

Число КАБ ИР-интернейронов дорсального рога ($X \pm S_x$) на срезах СМ

Области серого вещества СМ	Сегменты спинного мозга			
	T2	L4	L5	L6
Lamina I	9.90 ± 0.55 ^a	15.70 ± 0.51 ^{a,b}	17.40 ± 0.49 ^{a,b}	19.70 ± 0.58 ^{a,b}
Lamina II	27.40 ± 0.65 ^a	40.40 ± 0.68 ^{a,b}	47.40 ± 0.59 ^{a,b}	59.60 ± 0.64 ^{a,b}
Lamina III—IV	2.90 ± 0.21 ^a	6.20 ± 0.28 ^{a,b}	5.20 ± 0.24 ^{a,b}	5.90 ± 0.33 ^{a,b}
МК	4.40 ± 0.35 ^a	9.50 ± 0.57 ^{a,b}	8.10 ± 0.32 ^{a,b}	9.20 ± 0.34 ^{a,b}

^a $P < 0.05$, различия достоверны внутри сегмента; ^b $P < 0.05$, различия достоверны по сравнению с T2-сегментом.

Таблица 2

Площадь сечения КАБ ИР-интернейронов дорсального рога СМ ($X \pm S_x$)

Области серого вещества СМ	Сегменты спинного мозга			
	T2	L4	L5	L6
Lamina I	54.70 ± 2.37	77.10 ± 4.39 ^{a,b}	72.20 ± 3.73 ^a	72.70 ± 2.54 ^b
Lamina II	46.20 ± 1.78	52.30 ± 0.89 ^b	55.60 ± 1.53 ^b	58.50 ± 1.44 ^b
Lamina III—IV	72.60 ± 3.97 ^a	91.70 ± 3.62 ^{a,b}	88.10 ± 5.94	105.40 ± 6.90 ^{a,b}
МК	60.30 ± 2.47	52.70 ± 2.09 ^b	54.40 ± 2.21	61.40 ± 4.18

^a $P < 0.05$, различия достоверны внутри сегмента; ^b $P < 0.05$, различия достоверны по сравнению с T2-сегментом.

ней СМ и не менялась в пределах указанных пластин серого вещества. В пластинах I и II каждого среза располагались КАБ ИР-интернейроны, которые имели округлую или веретеновидную форму, свечение было характерно только для их клеточных тел (рис. 2, *a, б*). При одновременном выявлении на срезах нейронов, иммунореактивных к КАБ и НФ, область серого вещества СМ, соответствующая пластинам I и II, содержала КАБ ИР-интернейроны, но являлась НФ-иммунонегативной по отношению к клеткам и отросткам данных пластин (рис. 2, *в, г*). В пластинах III и IV в 3—4 срезах из 10 выявлялись КАБ ИР-интернейроны, которые имели только веретеновидную форму, флуоресцентное мечение было характерно как для их тел, так и для отростков клеток. Максимальная длина этих отростков отмечена на поясничном уровне, где в дорсальном направлении (по направлению к пластине II) она достигала 70, в вентромедиальном (по направлению к пластине X) — 30 мкм. В T2 отростки КАБ ИР-интернейронов также распространялись в направлениях, указанных выше, длина их была одинаковой и составляла 10 мкм. В области всего медиального края (МК) дорсального рога СМ на каждом срезе выявлялись КАБ ИР-интернейроны округлой или веретеновидной формы с очень длинными флуоресцентно меченными отростками, ветвящимися преимущественно в дорсовентральном направлении. Длина этих отростков во всех сегментах достигала 300 мкм (рис. 2, *д, е*). При одновременном выявлении на срезах КАБ и НФ в пластинах III—IV и в области МК иммунореактивность к обоим белкам проявляли только отростки нейронов. При этом на всех изученных уровнях тела КАБ ИР-клеток были ориентированы параллельно дорсовентральной оси.

Подсчет КАБ ИР-интернейронов показал, что в T2 максимальное количество клеток выявлялось в пластине

II (табл. 1), меньше их было в пластине I и в области МК КАБИР — в 2.8 и 6.2 раза соответственно, а минимальное число отмечалось в пластинах III и IV КАБИР и составляло 2—3 клетки на срез ($P < 0.05$). При анализе средней площади сечения ИР-интернейронов обнаружено, что в дорсальном роге T2 размеры клеток находились в пределах от 46.2 до 72.6 мкм² (табл. 2). При этом самыми крупными являлись интернейроны пластин III и IV, а самыми мелкими — интернейроны пластины II ($P < 0.05$). Промежуточные размеры имели клетки пластины I и медиального края дорсального рога.

В L4 количество КАБ ИР-интернейронов также было максимальным в пластине II и минимальным в пластинах III и IV, при этом превышая показатели грудного уровня в 1.5 и 2 раза соответственно. В пластине I и по МК ИР-клеток было меньше, чем в пластине II, но значительно больше, чем в T2, — в 1.6 и 2.2 раза соответственно. Анализ средней площади сечения ИР-интернейронов показал, что в дорсальном роге L4 размеры клеток находились в пределах от 52.3 до 91.7 мкм². На срезе СМ в L4 наиболее крупными были клетки пластин I, III и IV, а мелкими — пластин II и МК ($P < 0.05$). При этом клетки L4 СМ в области МК имели меньшие размеры, чем в T2 ($P < 0.05$), а в пластинах I, II и III и IV превышали последние ($P < 0.05$).

В L5 количественный состав интернейронов с КАБ ИР в пределах указанных областей серого вещества СМ не отличался от уровня L4, за исключением пластины II, в которой число клеток являлось максимальным, превышая в 1.7 раза показатели, характерные для уровня T2, и в 1.2 раза — для уровня L4. При анализе средней площади сечения ИР-интернейронов обнаружено, что в дорсальном роге L5 размеры клеток находились в пределах от 54.4 до 88.1 мкм². Площадь сечения интернейронов плас-

тин L5 и L4 сегментов спинного мозга практически не различалась.

На уровне L6 максимальное количество клеток выявлялось в пластине II, причем их количество здесь превышало как показатели других областей серого вещества СМ данного сегмента, так и показатели всех других изученных сегментарных уровней. При этом данный показатель был больше, чем в T2, в 2.2 раза, в L4 — в 1.5 раза, в L5 — в 1.3 раза. В пластине I число интернейронов с КАБ также было наибольшим в L6 и превышало данные T2 в 2 раза, L4 — в 1.3 раза. В пластинах III и IV и МК уровня L6 количество клеток не отличалось от уровней L4 и L5. Средняя площадь сечения ИР-интернейронов в дорсальном роге L6 находилась в пределах от 58.5 до 105.4 мкм². В пластинах III и IV располагались самые крупные интернейроны с КАБ в исследуемом уровневом ряду, средние размеры которых превышали таковые в T2 в 1.5 раза, в L4 и L5 — в 1.1 раза ($P < 0.05$). КАБ ИР-нейроны других пластин дорсального рога имели меньшую среднюю площадь сечения, но практически не отличались друг от друга по данному показателю. Площадь интернейронов в области МК L6 существенно не отличалась от других сегментов.

Обсуждение

Результаты проведенного исследования показали, что в дорсальном роге серого вещества СМ выявляются интернейроны, которые содержат кальбиндин. Топографически можно выделить четыре области их расположения, в пределах которых они различаются как формой, так и размерами: пластины I—IV и медиальный край. Так, в пластине I тела КАБ ИР-интернейронов имеют округлую и веретеновидную форму, как и в пластине II, но размеры их больше, а количество меньше, чем в пластине II. В пластине III ИР-интернейроны имеют только веретеновидную форму и значительно большие размеры. По данным литературы, интернейроны пластин I—II, выделяемые в «поверхностную область дорсального рога», на продольных срезах СМ ориентированы вдоль рострокaudальной оси и имеют веретеновидную форму (Lu, Perl, 2005; Morona et al., 2006). Данные клетки, содержащие кальбиндин, описываются как «атипичные» интернейроны поверхностной области дорсального рога (Todd, Lewis 1986). Несовпадение данных литературы о форме интернейронов пластин I и II с результатами проведенного исследования объясняется разницей в направлении срезов СМ. На продольных срезах выявляется веретеновидная форма интернейронов, на поперечных — округлая.

На основании геометрии дендритного дерева выделяют различные типы интернейронов, специфичных для каждой из указанных пластин дорсального рога СМ. Но так как в пластине II отростки КАБ ИР интернейронов не окрашиваются с помощью антител к кальбиндину, отнести их к какому-либо типу клеток затруднительно. КАБ ИР-интернейроны пластины III по характеру ветвления их отростков можно отнести к антенноподобным нейронам (antenna-like neurons) с их асимметричным ветвлением дендритного дерева, дорсальные ветви которого длинные, а вентральные короткие (Schoenen, Faull, 2004). Данный тип КАБ ИР-интернейронов выявляется и в пластине IV, указывая на сходство между интернейронами пластин III и IV, что совпадает с данными других исследователей (Antal et al., 1991; Bhimaidevi et al., 2012).

Но ряд авторов разделяют интернейроны в пластинах III и IV на основании меньшего размера клеток в пластине III (Ralston, 1982; Schoenen, Faull, 2004). Учитывая тот факт, что в пределах обеих пластин локализуются сходные интернейроны, объединенные в собственное ядро дорсального рога (Bhardwaj et al., 2001; Bhimaidevi et al., 2012), интернейроны пластин III и IV мы объединили в одну субпопуляцию КАБ ИР-клеток, которая независимо от размеров относится к антенноподобным интернейронам.

Как правило, антенноподобные интернейроны плохо отличимы от звездчатых нейронов (stellate neurons) пластины II. Критерием дифференцирования КАБ ИР-интернейронов пластин II и III послужило их мечение белком нейрофиламентов с мол. массой 200 кДа. Известно, что в поверхностной области дорсального рога СМ преобладают безмилиновые нервные волокна (Rexed, 1952; Light et al., 1979), интернейроны которой являются иммунонегативными к этому белку в отличие от таковых пластины III (Порсева, 2013).

Как видно, выделение границ пластин дорсального рога связано с определенными трудностями, так как в описательных целях применяется фундаментальная схема ламинации серого вещества СМ, предложенная еще Рекседом (Rexed, 1952). Все последующие годы в контексте новых данных о химической гетерогенности интернейронов обсуждаются как общая морфология клеточного состава пластин, так и их видовые особенности. Так, деление пластины II на сегменты связывают с функциональной специфичностью расположенных в них интернейронов (Grudt, Perl, 2002; Lu, Perl, 2005). В нашем случае большая часть клеточной субпопуляции КАБ ИР-интернейронов пластины II сосредоточена в ее средней трети, меньшая же часть — в наружной трети, что позволяет предположить участие данного белка в ноцицептивных механизмах (Sojka et al., 2010). А отсутствие интернейронов с КАБ ИР во внутренней трети пластины II у грызунов (Yoshida et al., 1990) согласуется с данными о том, что кальбиндин не задействован в механорецепции (Li et al., 2005). Интернейроны пластины I также являются морфологическим субстратом для проведения болевой чувствительности и также содержат кальбиндин, что подтверждается и в работах других авторов (Craig et al., 2002).

В пластинах III и IV обнаружено изменение распределения интернейронов у крыс, обезьяны и человека в медиолатеральном направлении (Ralston, 1982; Antal et al., 1991; Bhardwaj et al., 2001; Schoenen, Faull, 2004). Показано, что в медиальной части этих пластин на единицу площади приходится в 2 раза больше клеток по сравнению с латеральной частью дорсального рога СМ (Bhardwaj et al., 2001). Эти наблюдения сопоставимы с ранней работой (Rexed, 1952), где описаны аналогичные морфологические особенности интернейронов в пластине IV.

В области МК дорсального рога, где фактически расположены все четыре пластины, выявляется, как мы считаем, особая субпопуляция КАБ ИР-интернейронов, клетки которой отличаются по морфометрическим характеристикам от субпопуляций КАБ ИР-интернейронов всех этих пластин. Это мнение базируется на исследованиях Антал с соавторами (Antal et al., 1991), выявивших меченные аспартатом (³H-D-aspartate) КАБ ИР-интернейроны в пластинах I—IV и в области медиальной трети дорсального рога. Ретроградное мечение нейронов спиноталамических путей показало, что на уровне поясничных сег-

ментов СМ выявляются аналогичные области расположения субпопуляций интернейронов, содержащих КАБ, функцию которых связывают как с модуляцией ноцицептивных сигналов на уровне спинного мозга, так и с изменением синаптической активности нейронов спиноталамического пути (Craig et al., 2002; Sojka et al., 2010).

В предыдущем исследовании (Порсева, Шилкин, 2010) в пластинах I—IV и МК, т. е. в аналогичных областях дорсального рога, нами были обнаружены субпопуляции интернейронов, содержащих NO-синтазу. Нейропротективное действие как NO, так и кальбинина заключается в уменьшении внутриклеточной концентрации кальция (Schwaller, 2009), а одним из путей активации нейрональной NO-синтазы в спинном мозге является выброс терминалями первичных афферентов вещества Р в результате стимуляции ноцицепторов (Valtschanoff et al., 1992). Таким образом, в дорсальном роге СМ области расположения интернейронов с NO и КАБ совпадают, но присутствие этих веществ в одних и тех же нейронах не показано (Morona et al., 2007). Напротив, согласно имеющимся данным, КАБ-интернейроны являются возбуждающими (Antal et al., 1991), а NO-ergicеские — тормозными нейронами, содержащими ГАМК (Nazli, Morris, 2000).

Подсчет КАБ ИР-интернейронов показал, что независимо от уровня СМ наибольшее количество клеток располагалось в пластинах I и II, а максимальное — в пластине II. Уровневые различия выражались в большем представительстве ИР-интернейронов в поясничных сегментах по сравнению с Т2. При этом на поясничном уровне максимальное количество КАБ ИР-интернейронов наблюдалось в L6, минимальное — в L4. Наименьшее количество ИР-интернейронов располагалось в пластинах III и IV второго грудного сегмента, наибольшее — в поясничных сегментах. В области медиального края дорсального рога на срезах каждого сегмента количество КАБ ИР-интернейронов в 1.5 раза превышало их количество в пластинах III и IV. Что касается площади сечения интернейронов то, несмотря на значительную вариабельность показателя, более крупные КАБ-интернейроны обнаружены в поясничных сегментах.

Работа выполнена в рамках договора о научно-техническом сотрудничестве с ГНЦ РФ ИМБП РАН и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00621-а).

Список литературы

- Маслюков П. М., Коробкин А. А., Коновалов В. В., Порсева В. В., Емануилов А. И. 2012. Возрастное развитие кальбиндин-иммунопозитивных нейронов симпатических узлов крысы. Морфология. 141 (1) : 77—80. (Maslyukov P. M., Korobkin A. A., Konovalov V. V., Porseva V. V., Emanuilov A. I. 2013. Age-related development of calbindin-immunopositive neurons in rat sympathetic ganglia. Neurosci. Behav. Physiol. 43 (2) : 153—156.)
- Порсева В. В. 2013. Топография и морфометрическая характеристика НФ200⁺-нейронов серого вещества спинного мозга при деафферентации капсаицином. Морфология. 144 (6) : 20—25. (Porseva V. V. 2013. Topography and morphometric characteristics NF200⁺ neurons of the gray matter of the spinal cord in capsaicin deafferentation. Morphology. 144 (6) : 20—25.)
- Порсева В. В., Шилкин В. В. 2010. Топография интернейронов серого вещества спинного мозга. Морфологические ведомости. 1 : 82—85. (Porseva V. V., Shilkin V. V. 2010. Topography interneurons of the spinal cord gray matter. Morphol. Newsletter. 1 : 82—85.)
- Порсева В. В., Шилкин В. В., Корзина М. Б., Смирнова В. П., Маслюков П. М. 2012. Особенности возрастных изменений НФ200⁺-нейронов чувствительных узлов различных сегментарных уровней при химической деафферентации. Морфология. 142 (4) : 37—42. (Porseva V. V., Shilkin V. V., Korzina M. B., Smirnova V. P., Maslyukov P. M. 2013. Developmental changes in NF200⁺ neurons in sensory ganglia at different segmental levels on chemical deafferentation. Neurosci. Behav. Physiol. 43 (5) : 602—606.)
- Antal M., Polgar E., Chalmers J., Minson J. B., Llewellyn-Smith I., Heizmann C. W., Somogyi P. 1991. Different populations of parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons contain GABA and accumulate 3H-D-Aspartate in the dorsal horn of the rat spinal cord. Comp. Neurol. 314 : 114—124.
- Bhardwaj R., Nagar M., Prakash R. 2001. Histomorphometry of nucleus proprius in rat lumbar dorsal spinal horn. Anat. Soc. India. 50 : 140—144.
- Bhimaidevi N., Narasingarao B., Sunitha V., Padmini P. 2012. Histogenesis of nucleus proprius of lumbar spinal cord of fullterm human foetus. Biol. Med. Res. 3 : 1506—1508.
- Brouns I., Van Genechten J., Hayashi H., Gajda M., Gomi T., Burnstock G., Timmermans J.-P., Adriaensen D. 2003. Dual sensory innervation of pulmonary neuroepithelial bodies. Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol. 28 : 275—285.
- Caillard O., Moreno H., Schwaller B., Llano I., Celio M. R., Marty A. 2000. Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity. Neurobiology. 97 : 13 372—13 377.
- Craig A. D., Zhang E. T., Blomqvist A. 2002. Association of spinothalamic lamina I neurons and their ascending axons with calbindin-immunoreactivity in monkey and human. Pain. 97 : 105—115.
- Grudt T. J., Perl E. R. 2002. Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. Physiology. 540 : 189—207.
- Li Y. N., Li Y. C., Kuramoto H., Liu Z. R., Kawate T., Atsumi S., Deng Y. C., Huang Y. G. 2007. Immunohistochemical demonstration of the calcium channel alpha2 subunit in the chicken dorsal root ganglion and spinal cord: a special reference to colocalization with calbindin-D28k in dorsal root ganglion neurons. Neurosci. Res. 59 : 304—308.
- Li Y. N., Sakamoto H., Kawate T., Cheng C. X., Li Y. C., Shimada O., Atsumi S. 2005. An immunocytochemical study of calbindin-D28k in laminae I and II of the dorsal horn and spinal ganglia in the chicken with special reference to the relation to substance P-containing primary afferent neurons. Arch. Histol. Cytol. 68 : 57—70.
- Light A. R., Trevino D. L., Perl E. R. 1979. Morphological features of functionally defined neurons in the marginal zone and substantia gelatinosa of the spinal dorsal horn. Comp. Neurol. 186 : 151—171.
- Lu Y., Perl E. R. 2005. Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). Neurosci. 25 : 3900—3907.
- Morona R., Lopez J. M., Dominguez L., Gonzalez A. 2007. Immunohistochemical and hodological characterization of calbindin-D28k-containing neurons in the spinal cord of the turtle, *Pseudemys scripta elegans*. Microsc. Res. Tech. 70 : 101—118.
- Morona R., Lopez J. M., Gonzalez A. 2006. Calbindin-D28k and calretinin immunoreactivity in the spinal cord of the lizard *Gekko gecko*: Colocalization with choline acetyltransferase and nitric oxide synthase. Brain Res. Bull. 69 : 519—534.
- Nazli M., Morris R. 2000. Evidence that the neurokinin 1 receptor is expressed in spinal neurones which do not synthesize nitric oxide in the rat. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 24 : 453—458.
- Neher E. 2008. Details of Ca²⁺ dynamics matter. Physiology. 586 : 2031.
- Ralston H. J. III. 1982. The fine architecture of laminae IV, V and VI of the macaque spinal cord. Comp. Neurol. 212 : 125—134.
- Rexed B. 1952. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord of the cat. Comp. Neurol. 96 : 415—495.

- Schmidt H.* 2012. Three functional facets of calbindin D-28k. *Front. Mol. Neurosci.* 5 : 25.
- Schoenen J., Faull R. L. M.* 2004. Spinal cord: cyto- and chemoarchitecture. In: *The human Nervous System* 2nd edition. Amsterdam: Elsevier Acad. Press. 7 : 190—232.
- Schwaller B.* 2009. The continuing disappearance of «pure» Ca²⁺ buffers. *Cell Mol. Life Sci.* 66 : 275—300.
- Schwaller B.* 2012. The use of transgenic mouse models to reveal the functions of Ca²⁺ buffer proteins in excitable cells. *Biochim. biophys. acta.* 1820 : 1294—1303.
- Sojka D., Zacharova G., Spicarova D., Palecek J.* 2010. Changes of calcium binding protein expression in spinothalamic tract neurons after peripheral inflammation. *Physiol. Res.* 59 : 1011—1017.
- Steiner T. J., Turner L. M.* 1972. Cytoarchitecture of the rat spinal cord. *Physiology.* 222 : 123—125.
- Todd A. J., Lewis S. G.* 1986. The morphology of Golgi-stained neurons in Lamina II of the rat spinal cord. *Anat.* 149 : 113—119.
- Valtschanoff J. G., Weinberg R. J., Rustioni A.* 1992. NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *Comp. Neurol.* 321 : 209—222.
- Yoshida S., Senba E., Kubota Y., Hagihira S., Yoshiya I., Emson P. C., Tohyama M.* 1990. Calcium-binding proteins calbindin and parvalbumin in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience.* 37 : 839—848.

Поступила 13 XII 2013

SUBPOPULATION OF CALBINDIN-IMMUNOREACTIVE INTERNEURONS IN THE DORSAL HORN OF THE MICE SPINAL CORD

V. V. Porseva,¹ V. V. Shilkin, A. A. Strelkov, P. M. Masliukov

Yaroslavl State Medical Academy;
* e-mail: vvporseva@mail.ru

In the dorsal horn of the spinal cord in the plates I—IV on the thoracic and lumbar levels different subpopulations of interneurons immunoreactive for calbindin 28 kDa (CAB IR), which are specific to each plate. In the area of the medial edge of the dorsal horn, we have found a special subpopulation of CAB IR interneurons whose morphometric characteristics differ from CAB IR interneurons subpopulations of said plates. The number of CAB IR interneurons was maximal in the plate II at all levels of the spinal cord. Leveled differences are more CAB IR interneurons and larger area of the cross sections at the lumbar level.

Key words: calbindin, interneuron, dorsal horn, spinal cord, mouse.