

© А. Ф. Будник, П. М. Маслюков, А. Д. Ноздрачев, 2019  
УДК 611.018.8:612.368:612.65:599.323.4

А. Ф. Будник<sup>1</sup>, П. М. Маслюков<sup>2</sup>, А. Д. Ноздрачев<sup>3</sup>

## ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ ИНТРАМУРАЛЬНЫХ УЗЛОВ ТОЛСТОЙ КИШКИ, СОДЕРЖАЩИХ КАЛЬБИДИН И КАЛЬРЕТИНИН

<sup>1</sup> Кафедра нормальной и патологической анатомии (зав. — проф. И. А. Мизиев), Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова; <sup>2</sup> кафедра нормальной физиологии (зав. — проф. П. М. Маслюков), ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России; <sup>3</sup> кафедра общей физиологии (зав. — проф. А. Г. Марков), ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

**Цель** — выявление локализации, процентного содержания и морфометрических характеристик кальбиндин (КБ)- и кальретинин (КР)-иммунореактивных (ИР) нейронов в интрамуральных метасимпатических узлах межмышечного и подслизистого автономных нервных сплетений толстой кишки у крыс различных возрастных групп.

**Материал и методы.** С помощью иммуногистохимических и морфометрических методов изучены толстые срезы поперечной ободочной кишки у крыс линии Вистар (n=30) в возрасте 1, 10, 20, 30, 60 сут и 2 года.

**Результаты.** КБ-ИР- и КР-ИР-нейроны выявлены у крыс всех исследованных возрастных групп. В межмышечном нервном сплетении процентное содержание КБ-ИР- и КР-ИР-нейронов на 10-е сутки жизни значительно больше, чем после рождения, и не изменяется в старших группах. В подслизистом нервном сплетении у новорожденных крысят КБ не выявляется (регистрируется с 10-х суток), а КР обнаруживается в 72,0±2,52% нейронов. Значимо больший процент КБ-ИР- и КР-ИР-нейронов выявляется у 2-месячных крыс и старше. Средняя площадь сечения КБ-ИР- и КР-ИР-клеток значительно превосходит таковую иммуноотрицательных нейронов во всех возрастных группах.

**Выводы.** В раннем постнатальном онтогенезе происходит увеличение доли КБ-ИР- и КР-ИР-нейронов в интрамуральных узлах кишки.

**Ключевые слова:** ободочная кишка, интрамуральные узлы кишки, кальбиндин, кальретинин

Введение. Выделяют большое количество Са-связывающих белков, содержащих в своей структуре от 2 до 6 Са-связывающих центров [8]. К наиболее распространенным в нервной системе, селективно экспрессирующимся в определенных популяциях нейронов, относятся кальбиндин (КБ) массой 28 килодальтон, кальретинин (КР) и парвальбумин (ПБ) [3, 7, 13].

В автономной нервной системе сравнительно большое количество КБ-содержащих нейронов описано в симпатических узлах [3] и метасимпатических интрамуральных узлах кишки [2, 9]. При этом в тонкой и толстой кишке грызунов число КР-иммунореактивных (ИР) нейронов значительно превосходит количество КБ-ИР-нервных клеток [10, 11].

В онтогенезе процентное содержание различных типов кальций-связывающих белков в автономной нервной системе меняется. Показано, что у крыс и кошек в ходе возрастного развития процент КБ-ИР-симпатических нейронов увели-

чивается с момента рождения до 10-х суток, затем снижается до конца первого месяца жизни [3]. В тонкой кишке процентное содержание КБ-ИР-нейронов возрастает за первые 20 сут жизни, КР-ИР-нейронов — увеличивается в течение 2 мес [3, 9]. Тем не менее, в литературе отсутствуют данные о возрастных изменениях экспрессии КБ и КР в нейронах интрамуральных узлов толстой кишки.

Целью настоящего исследования явилось выявление локализации, процентного содержания и морфометрических характеристик КБ- и КР-иммунопозитивных нейронов в интрамуральных метасимпатических узлах межмышечного (МС) и подслизистого автономных нервных сплетений (ПС) толстой кишки у крыс различных возрастных групп.

**Материал и методы.** Работа выполнена на 30 крысах линии Вистар в возрасте 1, 10, 20, 30, 60 сут и 2 года после рождения (по 5 животных в каждой возрастной группе). Исследование проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных»

### Сведения об авторах:

Будник Антонина Францевна, кафедра анатомии человека, Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова, 360004, г. Нальчик, ул. Чернышевского, 173

Маслюков Петр Михайлович (e-mail: [mppm@ysmu.ru](mailto:mppm@ysmu.ru)), кафедра нормальной физиологии с биофизикой, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

Ноздрачев Александр Данилович, кафедра общей физиологии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

(приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). На проведение исследования получено разрешение этического комитета Ярославского государственного медицинского университета (протокол № 29 от 21.02.2019 г.). После введения легальной дозы уретана (3 г/кг внутривенно) животных перфузировали транскардиально раствором стандартного фосфатно-солевого буфера (PBS, 0,01M, pH 7,4) (БиолоТ, Россия), затем 4% раствором параформальдегида (Sigma, США) на PBS. Из поперечной ободочной кишки выделяли фрагменты, которые фиксировали в течение 2 ч в указанной смеси, после чего промывали трехкратно в PBS в течение 30 мин и оставляли в 30% растворе сахарозы на 24 ч. Из фиксированного материала на криостате готовили серии срезов толщиной 14 мкм.

Выявление нейронов, содержащих КБ и КР, проводили при помощи меченых антител по методике, описанной нами ранее [9]. Для этого использовали первичные антитела кролика (Abcam, США, разведение 1:500 и 1:100 соответственно), вторичные антитела были конъюгированы с флюорохромом — индокарбоданином (Cy3, Jackson ImmunoResearch, США, разведение 1:100), дающим красную флюоресценцию. Для расчета процента иммуноположительных нейронов, кроме меток к КБ и КР, производили иммуномечение всей нейронной популяции при помощи антител к протеиновому генному продукту 9,5 (ППП 9,5) [4]. Использовали первичные антитела к ППП 9,5 от морской свинки (Abcam, США, разведение 1:200), вторичные антитела были конъюгированы с флюорохромом флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC, разведение 1:100, Jackson ImmunoResearch, США), дающим зеленую флюоресценцию.

Срезы преинкубировали 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% сыворотки, 1% тритон X-100, 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% тимерозола. Затем срезы инкубировали 24 ч с первичными антителами при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировали 2 ч с вторичными антителами. После чего срезы отмывали в PBS и заключали в среду для иммуофлюоресценции (VectaShield, Vector Laboratories, США).

Гистологические препараты исследовали на флюоресцентном микроскопе Olympus BX43 (Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD-камерой Tucsen TCC 6.1ICE с программным обеспечением ISCapture 3.6 (Китай). Для анализа размеров и процентного соотношения иммунопозитивных нейронов на цифровых изображениях гистологических препаратов использовали программу Image J (НИН, США, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Долю КБ-ИР- и КР-ИР-нейронов определяли как их отношение к общему числу ППП 9,5 ИР-нейронов, которое принимали за 100%. Морфометрическому исследованию подлежали нервные клетки, срез которых прошел через ядро. Для определения площади сечения нейронов у животных в каждой возрастной группе в случайном порядке брали 100 нейронов, иммуноположительных к каждому из исследованных маркеров.

Математическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Sigma Plot (StatSoft, США). Все величины представлены как средняя арифметическая величина ± ошибка средней. Значимость различий средних величин определяли по методикам ANOVA, критериям Вилкоксона и Манна—Уитни. Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

Результаты исследования. Результаты иммуофлюоресцентного анализа показали, что КБ-ИР- и КР-ИР-нейроны выявляются в межмышечном и подслизистом нервных сплетениях поперечной ободочной кишки у крыс всех возрастных групп от новорожденных до старых. При этом флюоресценция различной степени интенсивности отмечается как в ядре, так и в цитоплазме нейронов (рис. 1, 2).

В межмышечном автономном нервном сплетении у новорожденных крысят процент выявленных КБ-ИР- и КР-ИР-нейронов невелик (табл. 1). У крысят в возрасте 10 сут и старше доля тех и других нейронов значимо больше. У крыс в возрасте 30 сут, 2 мес и 2 года доля КР-ИР-нейронов превосходит таковую КБ-ИР.

В подслизистом автономном нервном сплетении у новорожденных крысят КБ не выявляется, но определяется во всех остальных возрастных группах (табл. 2). При этом к моменту рождения подавляющее большинство нейронов сплетения уже содержат КР. Значимо больший процент КБ-ИР- и КР-ИР-нейронов обнаружен лишь у животных в возрасте 2 мес и старше.

Анализ данных морфометрического исследования показал, что средняя площадь сечения КБ-ИР- и КР-ИР-нейронов у новорожденных крысят значимо меньше, чем у крыс остальных возрастных групп (табл. 3). При этом средний размер таких нейронов у крыс в 2-летнем возрасте по сравнению с новорожденными больше, в межмышечном нервном сплетении — более чем вдвое, а в подслизистом — в 1,5 раза. Средняя площадь сечения КБ-ИР- и КР-ИР-клеток значимо превосходит таковую иммуоотрицательных нейронов во всех возрастных группах ( $p < 0,05$ ). При этом значимых различий между средней площадью сечения КБ-ИР- и КР-ИР-нейронов в каждой возрастной группе не выявлено ( $p > 0,05$ ).

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что за первые 10 сут доля КБ-ИР- и КР-ИР-нейронов в межмышечном автономном нервном сплетении толстой кишки увеличивается. Это согласуется с аналогичными данными, полученными нами ранее, для межмышечного нервного сплетения тонкой кишки. Как и в тонкой, в толстой кишке процент КБ-ИР- и КР-ИР-нейронов, выявляемых в подслизистом нервном сплетении, выше, чем в межмышечном нервном сплетении [3, 9].

В отличие от существующего представления о формировании подслизистого нервного сплетения у грызунов после 1-й недели жизни [2] в настоящем исследовании мы установили нали-

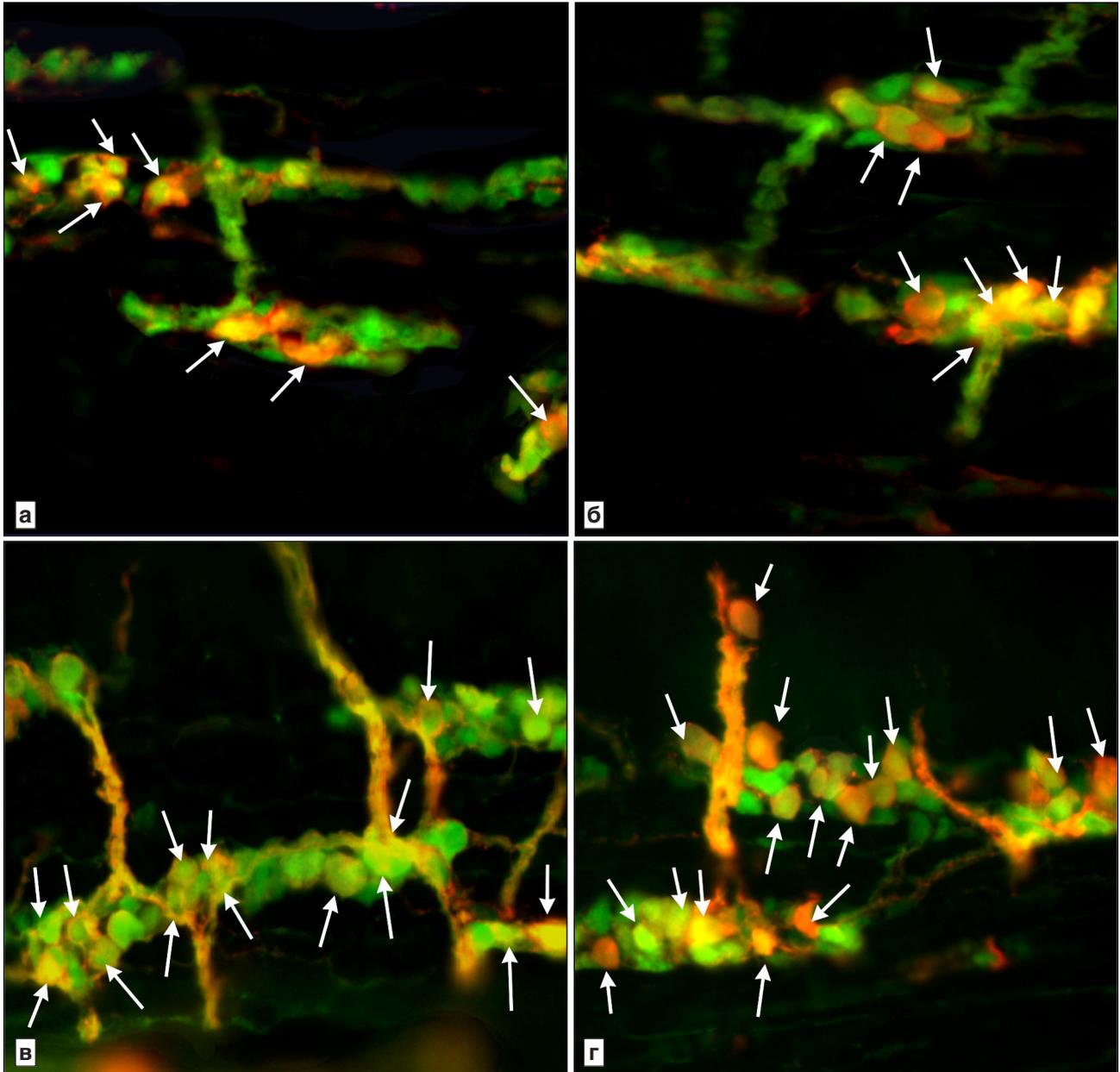


Рис. 1. Микрофотографии нейронов, содержащих кальбиндин (а, в) и кальретинин (б, г) в межмышечном автономном нервном сплетении поперечной ободочной кишки у крыс: новорожденных (а), 10-суточных (б), 20-суточных (в) и 30-суточных (г).

Здесь и на рис. 2: стрелки — кальбиндин-положительные и кальретинин-положительные нейроны. Иммуногистохимическая реакция: на кальбиндин и кальретинин (флюоресценция Су3, красный); на протеиновый генный продукт 9,5 (FITC, зеленый). Ув. 200

чие выраженного подслизистого нервного сплетения в толстой кишке уже у новорожденных. Причём в нём выявляется только кальретинин, а кальбиндин определяется лишь с 10-х суток жизни. Полученные в настоящей работе данные подтвердили результаты наших предыдущих исследований о том, что в интрамуральных ганглиях кишки у взрослой крысы почти половина нейронов содержат КБ и КР [2, 3, 9]. Это отличается от динамики содержания указанных кальций-связывающих белков в симпатических узлах

у крыс, где отмечено максимальное их содержание у новорожденных и 10-суточных животных и снижение в раннем постнатальном онтогенезе [3]. Значение такой гетерохронии остается пока неясным. Вероятно, это связано с важной ролью кальция в возрастных и стресс-индуцированных изменениях нервной системы [6, 12, 15].

Размеры нейронов интрамуральных узлов тонкой и толстой кишки возрастают в постнатальном онтогенезе. Однако средняя площадь сечения нейронов интрамуральных узлов толстой

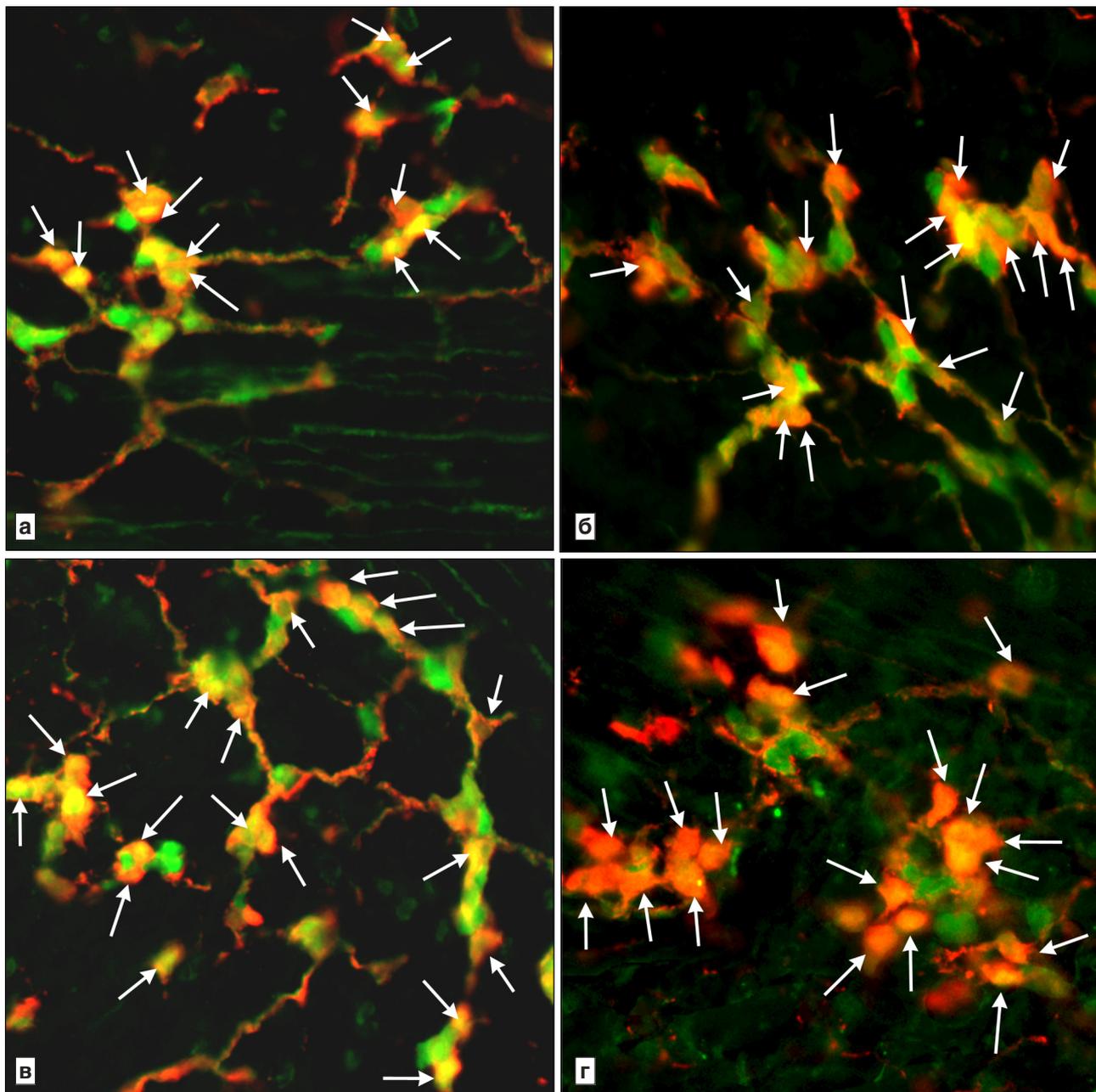


Рис. 2. Микрофотографии нейронов, содержащих кальбиндин (а, в) и кальретинин (б, г) в подслизистом автономном нервном сплетении поперечной ободочной кишки у крыс: новорожденных (а), 20-суточных (б), 30-суточных (в) и 2-летних (г)

кишки меньше таковой нейронов тонкой кишки [3, 9]. Как и в тонкой, в толстой кишке КБ-ИР- и КР-ИР-нейроны крупнее иммунонегативных клеток [3].

Среди факторов, регулирующих развитие синапсов и их пластичность, большое значение имеет поддержание определенной концентрации ионов кальция, которое может изменяться в пространстве и во времени, и важная роль в этом отводится КБ и КР [8, 14]. В развивающихся нейронах при участии ионов кальция происходит регуляция роста нейронов и морфологической пластичности, в частности конуса роста и раз-

витие дендритов, что совпадает по времени с увеличением содержания кальций-связывающих белков [15]. На более поздних этапах постнатального развития нейронов интрамуральных узлов кальций-связывающие белки играют роль кальциевых сенсоров и участвуют в поддержании уровня кальция в клетках. КБ и КР, связывая кальций, могут регулировать внутриклеточные ответы на физиологические стимулы и защищать клетки от кальций-опосредованной нейротоксичности, а также от процессов апоптоза [5].

В литературе имеются данные о возрастном снижении экспрессии КБ [1], что делает клетки

Таблица 1

**Процентное содержание кальбиндин- и кальретицин-иммунореактивных (+) нейронов в интрамуральных ганглиях межмышечного автономного нервного сплетения поперечной ободочной кишки у крыс разного возраста (n=5 в каждой возрастной группе)**

Возраст	Кальретицин+-нейроны, %	Кальбиндин+-нейроны, %
Новорожденные	28,6±2,17	33,5±2,47
10 сут	53,0±2,14*	46,3±4,09*
20 сут	49,3±2,45*	50,3±4,24*
30 сут	56,3±2,32*	47,7±0,85*
2 мес	58,2±2,97*	46,3±3,67*
2 года	55,3±3,26*	43,5±3,06*

Таблица 2

**Процентное содержание кальбиндин- и кальретицин-иммунореактивных (+) нейронов в интрамуральных ганглиях подслизистого автономного нервного сплетения поперечной ободочной кишки у крыс разного возраста (n=5 в каждой возрастной группе)**

Возраст	Кальретицин+-нейроны, %	Кальбиндин+-нейроны, %
Новорожденные	72,0±2,52	–
10 сут	76,0±2,52	68±4,09
20 сут	72,7±5,21	64,0±2,95
30 сут	75±2,32	70,3±3,93
2 мес	84,0±2,31*	81,5±3,93*
2 года	84,0±2,16*	83,2±8,18*

\* Здесь и в табл. 2 и 3: различия значимы по сравнению с новорожденными животными при  $p < 0,05$ .

Таблица 3

**Средняя площадь сечения кальбиндин- и кальретицин-иммунореактивных (+) нейронов (n=100 в каждой возрастной группе) в интрамуральных ганглиях межмышечного и подслизистого автономных нервных сплетений поперечной ободочной кишки у крыс разного возраста**

Возраст	МС		ПС	
	Кальбиндин+-нейроны	Кальретицин+-нейроны	Кальбиндин+-нейроны	Кальретицин+-нейроны
Новорожденные	65±3,6	73±3,7	75±5,4	84±4,5
10 сут	114±8,9*	121±4,8*	94±6,6*	103±3,9*
20 сут	98±7,9*	111±6,1*	105±9,3*	107±7,1*
30 сут	115±6,4*	118±5,3*	110±11,2*	119±8,2*
2 мес	143±9,2*	139±8,4*	117±13,5*	126±10,1*
2 года	152±13,7*	153±11,5*	122±12,3*	136±16,2*

более чувствительными к изменениям концентрации ионов кальция [6]. Однако результаты нашего исследования не подтверждают этого. Напротив, нами показано отсутствие достоверного снижения содержания кальций-связывающих белков в нейронах интрамуральных узлов метасимпатической нервной системы у старых животных.

**Заключение.** Таким образом, в раннем постнатальном онтогенезе происходит увеличение доли КБ- и КР-иммунопозитивных нейронов в интрамуральных узлах кишки, что противоположно возрастным изменениям содержания кальций-связывающих белков в чувствительных спинномозговых и симпатических узлах. Окончательное созревание нейронов интрамуральных узлов, содержащих различные типы кальций-связывающих белков, завершается к концу 1-го месяца жизни. Возрастной инволюции КБ- и КР-иммунопозитивных нейронов кишки у старых крыс не отмечается.

#### Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: А. Д. Н., П. М. М.

Сбор и обработка материала: А. Ф. Б.

Статистическая обработка данных: А. Ф. Б.

Анализ и интерпретация данных: А. Д. Н., П. М. М.

Написание текста: А. Ф. Б.

**Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.**

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гилерович Е.Г., Федорова Е.А., Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. Морфологические основы реорганизации коры мозжечка крыс при старении // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 2015. Т. 51, № 5. С. 370–376 [Gilerovich E.G., Fedorova E.A., Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. Morphological bases of reorganization of the rat cerebellar cortex in senescence // Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii. 2015. Vol. 51, № 5. P. 370–376. In Russ.].
2. Маслюков П.М., Будник А.Ф., Ноздрачев А.Д. Нейрохимические особенности узлов метасимпатической системы в онтогенезе // Успехи геронтол. 2017. Т. 30, № 3. С. 347–355 [Masliukov P.M., Budnik A.F., Nozdrachev A.D. Developmental changes of neurotransmitter properties in sympathetic neurons // Uspekhi gerontologii. 2017. Vol. 30, № 3. P. 347–355. In Russ.].
3. Маслюков П.М., Ноздрачев А.Д., Емануйлов А.И. Возрастные особенности экспрессии кальций-связывающих

- белков в нейронах ганглиев автономной нервной системы // Успехи геронтол. 2016. Т. 29, № 2. С. 247–253 [Masliukov P.M., Nozdrachev A.D., Emanuilov A.I. Age-related expression of calcium-binding proteins in autonomic ganglionic neurons // Uspekhi gerontol. 2016. Vol. 29, № 2. P. 247–253 In Russ.].
4. Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. Структурная организация и взаимосвязь интрапанкреатических ганглиев с межмышечным нервным сплетением двенадцатиперстной кишки на ранней стадии постнатального онтогенеза крысы // Морфология. 2016. Т. 150, вып. 5. С. 24–30 [Chumasov E.I., Petrova E.S., Korzhevskii D.E. Structural organization and interrelation of the intra-pancreatic ganglia with the myenteric nervous plexus of the duodenum in the early stage of postnatal ontogenesis of rat // Morfologiya. 2016. Vol. 150, № 5. P. 24–30. In Russ.].
  5. Ahn J.H., Hong S., Park J.H., Kim I.H., Cho J.H., Lee T.K., Lee J.C., Chen B.H., Shin B.N., Bae E.J., Jeon Y.H., Kim Y.M., Won M.H., Choi S.Y. Immunoreactivities of calbindin-D28k, calretinin and parvalbumin in the somatosensory cortex of rodents during normal aging // Mol. Med. Rep. 2017. Vol. 16, № 5. P. 7191–7198.
  6. Franconville R., Revet G., Astorga G., Schwaller B., Llano I. Somatic calcium level reports integrated spiking activity of cerebellar interneurons in vitro and in vivo // J. Neurophysiol. 2011. Vol. 106, № 4. P. 1793–1805.
  7. Girard F., Venail J., Schwaller B., Celio M.R. The EF-hand Ca(2+)-binding protein super-family: a genome-wide analysis of gene expression patterns in the adult mouse brain // Neuroscience. 2015. Vol. 294. P. 116–155.
  8. Heizmann C.W. Ca<sup>2+</sup>-Binding Proteins of the EF-Hand Superfamily: Diagnostic and Prognostic Biomarkers and Novel Therapeutic Targets // Methods Mol. Biol. 2019. Vol. 1929. P. 157–186.
  9. Masliukov P.M., Moiseev K., Budnik A.F., Nozdrachev A.D., Timmermans J.-P. Development of calbindin- and calretinin-immunopositive neurons in the enteric ganglia of rats // Cell Mol. Neurobiol. 2017. Vol. 37, № 7. P. 1257–1267.
  10. Misawa R., Girotti P.A., Mizuno M.S., Liberti E.A., Furness J.B., Castellucci P. Effects of protein deprivation and re-feeding on P2X2 receptors in enteric neurons // World J. Gastroenterol. 2010. Vol. 16, № 29. P. 3651–3663.
  11. Sang Q., Young H.M. The identification and chemical coding of cholinergic neurons in the small and large intestine of the mouse // Anat. Rec. 1998. Vol. 251, № 2. P. 185–199.
  12. Segal M., Korkotian E. Roles of Calcium Stores and Store-Operated Channels in Plasticity of Dendritic Spines // Neuroscientist. 2016. Vol. 22, № 5. P. 477–485.
  13. Schwaller B. The regulation of a cell's Ca(2+) signaling toolkit: the Ca (2+) homeostasome // Adv. Exp. Med. Biol. 2012. Vol. 740. P. 1–25.
  14. Sun S., Li F., Gao X., Zhu Y., Chen J., Zhu X., Yuan H., Gao D. Calbindin-D28K inhibits apoptosis in dopaminergic neurons by activation of the PI3-kinase-Akt signaling pathway // Neuroscience. 2011. Vol. 199. P. 359–367.
  15. Verdaguer E., Brox S., Petrov D., Olloquequi J., Romero R., de Lemos M.L., Camins A., Auladell C. Vulnerability of calbindin, calretinin and parvalbumin in a transgenic/knock-in APP<sup>swE</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer disease together with disruption of hippocampal neurogenesis // Exp. Gerontol. 2015. Vol. 69. P. 176–188.
- Поступила в редакцию 11.04.2019  
Получена после доработки 20.05.2019
- ### AGE-RELATED CHANGES IN INTRAMURAL GANGLIONIC NEURONS OF THE LARGE INTESTINE EXPRESSING CALBINDIN AND CALRETININ
- A. F. Budnik<sup>1</sup>, P. M. Maslyukov<sup>2</sup>, A. D. Nozdrachev<sup>3</sup>
- Objective** — to identify the localization, percentage and morphometric characteristics of calbindin (CB) and calretinin (CR)-immunoreactive (IR) neurons in the methasymphathetic intramural ganglia of the myenteric (MP) and submucous plexus (SP) of the large intestine of rats of different age groups.
- Material and methods.** Thick sections of the transverse colon of Wistar rats aged 1, 10, 20, 30, 60 days and 2 years were studied by immunohistochemical and morphometric methods.
- Results.** CB-IR and CR-IR neurons were demonstrated in rats of all studied age groups. In the MP, the percentage of CB-IR and CR-IR neurons on the 10th day of life was significantly greater than after birth, and did not change in the older groups. In the SP of newborn rats, CB was not detected (it was demonstrated only from the 10th day), and CR was detected in 72,0±2,52% of neurons. A significantly higher percentage of CB-IR and CR-IR neurons was detected in 2-month-old and older rats. The average cross-sectional area of CB-IR and CR-IR cells was significantly larger than the average cross-sectional area of the immunonegative neurons in all age groups.
- Conclusions.** In early postnatal ontogenesis, there was an increase in the proportion of CB-IR and CR-IR neurons in the intramural ganglia of the intestine.
- Key words:** colon, enteric intramural ganglia, calbindin, calretinin
- <sup>1</sup> Department of Normal and Pathological Anatomy, H. M. Berbekov Kabardino-Balkarian State University, 173 Chernyshevskogo St., Nalchik 360004; <sup>2</sup> Department of Normal Physiology, Yaroslavl' State Medical University, 5 Revolutsionnaya St., Yaroslavl' 150000; <sup>3</sup> Department of General Physiology, St. Petersburg State University, 7–9 University Emb., St. Petersburg 199034