

© Коллектив авторов, 2017  
УДК 591.544:611.82.018:599.323.4

*В.В.Порсева<sup>1</sup>, В.В.Шилкин<sup>1</sup>, А.А.Стрелков<sup>1</sup>, К.Ю.Моисеев<sup>1</sup>, И.Б.Краснов<sup>2</sup>,  
П.М.Маслюков<sup>1</sup>*

## ИЗМЕНЕНИЯ КАЛЬБИДИН-СОДЕРЖАЩИХ НЕЙРОНОВ ДОРСАЛЬНОГО РОГА СПИННОГО МОЗГА МЫШЕЙ ПОСЛЕ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА БИОСПУТНИКЕ БИОН-М1

<sup>1</sup> Кафедра нормальной физиологии с биофизикой (зав. — проф. П.М.Маслюков), Ярославский государственный медицинский университет; <sup>2</sup> лаборатория гравитационной биологии (зав. — канд. мед. наук Д.В.Раков), Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Кальбиндин (КАБ)-содержащие интернейроны дорсального рога спинного мозга (СМ) верхних грудных сегментов у самцов мышей С57/BL6, находившихся в условиях космического полета (полетная группа) в течение 30 сут (n = 3) на биоспутнике Бион-М1 (полетная группа), исследовали с использованием иммуногистохимических методов и вестерн-блоттинга. Контрольную группу составили мыши (n = 3), находившиеся в то же время в условиях вивария. У мышей полетной группы численность КАБ-содержащих интернейронов в пластинках I и II увеличивалась. Также по данным вестерн-блоттинга, экспрессия КАБ в спинном мозгу после полета возрастала. Эти данные, как и преимущественно ядерная локализация КАБ в нейронах пластинок I–V, отсутствие иммунореактивности к КАБ в интернейронах области медиального края дорсального рога, уменьшение средней площади сечения КАБ-ИР-интернейронов пластинки II, увеличение средней площади сечения КАБ-ИР-интернейронов пластинок III, IV и V, обнаруженные у мышей полетной группы, свидетельствуют о дисбалансе в кальциевой буферной системе нервных клеток СМ. Очевидно, кальциевая система нейрональных функциональных модулей СМ, прежде всего моторного, подвергается в условиях космического полета существенным изменениям.

**Ключевые слова:** спинной мозг, дорсальный рог, интернейрон, кальбиндин, микрогравитация

Известно, что во всех пластинках дорсального рога спинного мозга (СМ) у млекопитающих, включая человека, расположены интернейроны, содержащие кальбиндин (КАБ) [5, 6, 8, 9, 15, 20], который модулирует эффекты, возникающие в ответ на изменения внутриклеточной концентрации кальция, функционируя в качестве своеобразного буфера, обеспечивающего кальциевый гомеостаз [19]. В нервных клетках роль кальций-связывающих белков заключается в нейропротекции и связана с избирательной устойчивостью их к глутамат-индуцированной нейротоксичности [15, 18]. Показано, что дисфункция кальциевой буферной системы в сенсорных нейронах может приводить к их дегенерации [11]. Однако изменения КАБ-содержащих интернейронов спинного мозга под влиянием различных факторов мало изучены.

Установлено, что после космического полета отмечаются морфофункциональные изменения в мотонейронах в поясничном отделе СМ [4, 12, 13]. Это объясняется изменением аффе-

рентных потоков от рецепторов мышц, участвующих в придании телу определенной позы. Межреберные мышцы, морфологические характеристики которых аналогичны указанной выше мускулатуре, также являются гравитационно-зависимыми: изменения частоты дыхания, дыхательного объема и легочной вентиляции в условиях микрогравитации рассматриваются как признаки функциональной «ваготомии» или частичной «деафферентации» [1]. Несмотря на это, влияние микрогравитации на нейроны грудного отдела СМ изучено явно недостаточно, хотя в единичных публикациях отмечают разнонаправленные изменения их количественных и качественных характеристик, зависящие от расположения в сером веществе СМ и их функциональной организации [17].

Цель настоящей работы — исследование КАБ-содержащих интернейронов дорсального рога грудного отдела СМ мышей, находившихся в 30-суточном космическом полете на биоспутнике Бион-М1.

### Сведения об авторах:

Порсева Валентина Вячеславовна (e-mail: [vvporseva@mail.ru](mailto:vvporseva@mail.ru)), Шилкин Валентин Викторович (e-mail: [shilkin39@mail.ru](mailto:shilkin39@mail.ru)), Стрелков Андрей Анатольевич (e-mail: [strelkov-yar@mail.ru](mailto:strelkov-yar@mail.ru)), Моисеев Константин Юрьевич (e-mail: [mky\\_yma@mail.ru](mailto:mky_yma@mail.ru)), Маслюков Петр Михайлович (e-mail: [mpm@yma.ac.ru](mailto:mpm@yma.ac.ru)), кафедра нормальной физиологии с биофизикой, Ярославский государственный медицинский университет, 150000, Ярославль, ул. Революционная, 5

Краснов Игорь Борисович (e-mail: [krasib@yandex.ru](mailto:krasib@yandex.ru)), лаборатория гравитационной биологии, Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76а

**Материал и методы.** Для изучения локализации, морфометрической и иммуногистохимической характеристик интернейронов в СМ, а также экспрессии КАБ в СМ методом вестерн-блоттинга использованы самцы мышей C57/BL6. Животные экспериментальной — полетной группы ( $n = 3$ ) находились в условиях микрогравитации в 30-суточном космическом полете биоспутника Бион-М1. Контрольную группу составили мыши ( $n = 3$ ), находившиеся в то же время в наземных условиях вивария. По завершении эксперимента [2], животные были подвергнуты эвтаназии методом цервикальной дислокации. Материал брали через 12 ч с момента посадки спутника, в течение которых животные находились в условиях силы тяжести Земли. Эксперименты выполнены в соответствии с решением Комиссии по биомедицинской этике ГНЦ РФ-ИМБП РАН (протокол № 319 от 04.04.2013 г.), одобряющее проведение исследования по проекту «БИОН-М» № 1.

Для исследования использованы  $T_{III}$ – $T_V$  сегменты СМ, которые фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатно-солевом буфере PBS, 0,01 M, pH 7,4, криопротекцию проводили в 30% растворе сахарозы. Из образцов СМ на криостате Shandon E (Thermo Scientific, Великобритания) готовили поперечные серийные срезы толщиной 14 мкм. Выявление интернейронов, содержащих КАБ, проводили с использованием меченых антител [3]: первичные антитела (Abcam, Великобритания) — поликлональные кроличьи к КАБ, разведение 1:500; вторичные — ослиные антитела (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США) к кроличьему иммуноглобулину G, конъюгированные с флюоресцеин-изотиоцианатом — FITC, разведение 1:100, флюоресцирующим в зеленой области спектра. Клетки всей популяции интернейронов окрашивали красителем, флюоресцирующим в красной области спектра, NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains (Molecular Probes, США) разведение 1:200. После этого срезы отмывали в PBS и заключали в среду для иммунофлюоресценции VectaShield (Vector Laboratories, США). Для исключения неспецифической реакции часть срезов инкубировали без первичных и/или вторичных антител.

При проведении вестерн-блоттинга образцы сегментов СМ гомогенизировали с буфером для лизиса. Каждый лизат разводили в буфере (Bio-Rad Laboratories Inc., США) и денатурировали при 95 °C в течение 5 мин. Эквивалентное количество образцов было загружено и разделено электрофорезом в 10% полиакриламидном геле с последующим переносом на мембраны ПВДФ (PVDF-Star Transmembran, AppliChem, Германия). Мембраны блокировали раствором, содержащим 3% обезжиренное сухое молоко (AppliChem, Германия) в ТБСТ (трис-буфер на Твине 20): 0,1% Tween 20, 0,2 mM Трис, 137 mM NaCl; в течение 30 мин при комнатной температуре. После промывки в ТБСТ мембраны инкубировали с первичными антителами (Abcam, Великобритания): поликлональные кроличьи к КАБ, разведение 1:5000 и к GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа), разведение 1:2500 (Abcam, ab9485, Великобритания), в одном блокирующем растворе при 4 °C в течение ночи. После промывки в ТБСТ мембраны инкубировали с вторичными антителами (козьи HRP-конъюгированные с анти-кроличьим IgG, Abcam, ab6721) в соотношении 1: 3000. Визуализацию белков проводили хемилюминесцентной детекцией (ECL Prime детектирующий реагент вестерн-блоттинга, BioRad) с гель-документирующей системой Syngene G:BOX Chemi XR5E (Syngene, Великобритания). Хемилюминесцентные сигналы были определены количественно при помощи программного обеспечения Gene Tools Gel Analysis (Syngene,

Великобритания), и их оптическая плотность выражалась относительно GAPDH. Маркеры молекулярной массы белков были включены в каждый вестерн-блот-анализ.

Препараты анализировали, используя микроскоп Olympus BX43 (Olympus Corporation, Япония), оснащенный набором флюоресцентных фильтров-блоков. Изображения получали посредством охлаждаемой цифровой видеокамеры TCC-5.0ICE (Tucsen, Китай). Для выявления интернейронов использовали каждый 5-й из серийных срезов — всего 15 срезов каждого образца. На срезах изучали топографию КАБ-содержащих интернейронов дорсального рога СМ, устанавливая их положение в пластинках СМ, конфигурация которых соответствовала верхним грудным сегментам [16]. Число иммунореактивных (ИР) интернейронов и площадь сечения (ПС) КАБ-содержащих интернейронов проводили, используя программу Image J (НИН, США) на изображениях срезов, полученных под объективом 20×/0.50. Долю ИР-интернейронов определяли как их отношение к общему количеству интернейронов, выявленных в пластинках с использованием NeuroTrace Red, которое принимали за 100%. Анализу подлежали интернейроны, срез которых прошел через ядро с видимым ядрышком и с флюоресценцией, превышающей фоновое свечение. Для определения средних значений и их стандартных ошибок использовали программу Statistica, версия 10 (StatSoft, Inc., 2011). Для поиска различий средних величин применяли анализ вариаций ANOVA и считали их значимыми при  $P < 0,05$ .

**Результаты исследования.** Наибольшее количество выявленных флюоресцентным методом интернейронов в дорсальном роге СМ контрольной и подопытной групп животных с сопоставимой массой тела ( $26,9 \pm 1,2$  г и  $28,9 \pm 1,7$  г соответственно) располагались в пластинке II, наименьшее — в пластинке V и в области медиального края (ОМК) дорсального рога СМ — области расположения медиальных частей пластинок III, IV и V (табл. 1). В полетной и контрольной группах различия количества интернейронов в пластинках II, III и IV не превышали 10%.

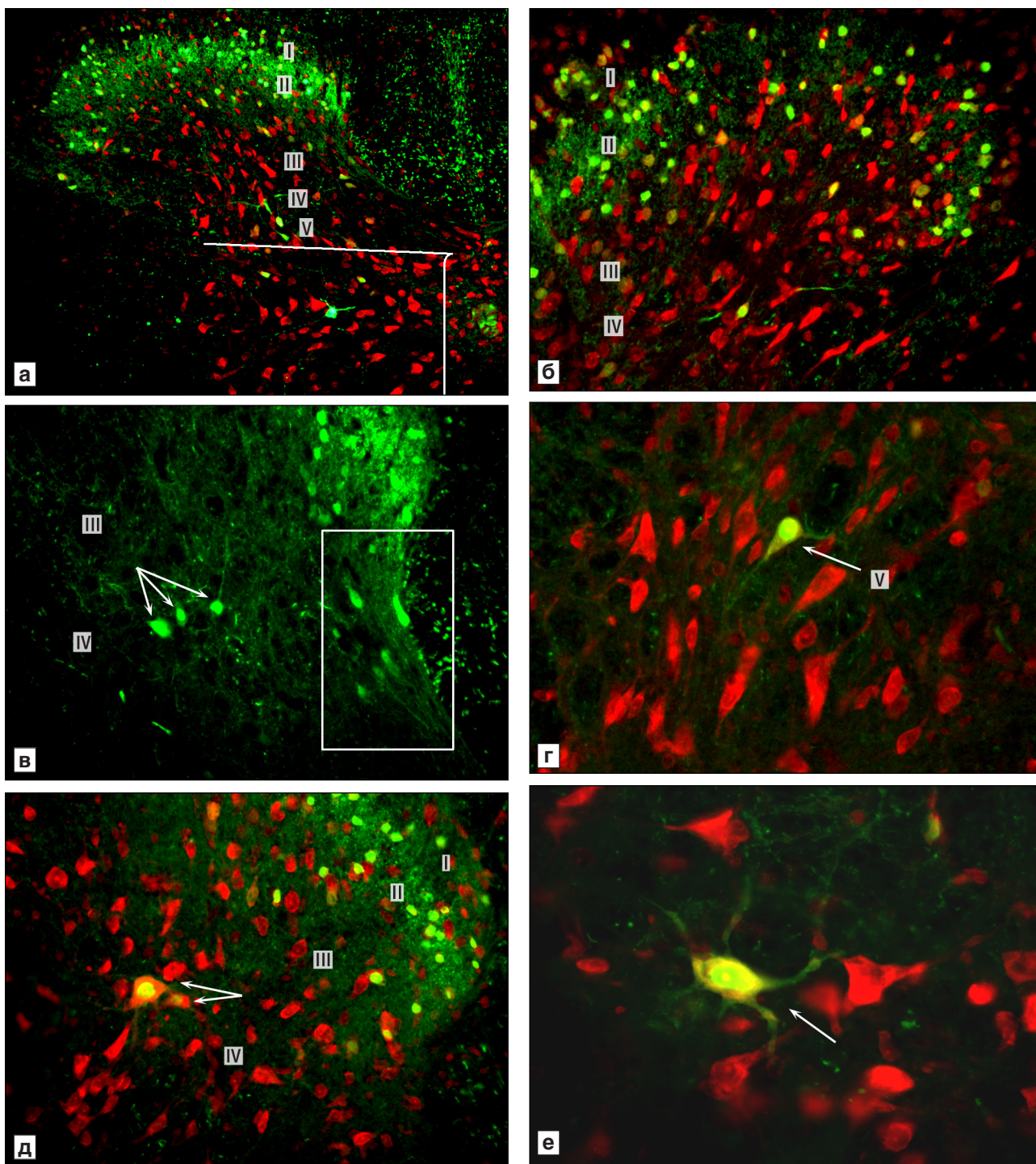
У мышей, находящихся в стандартных условиях вивария (группа контроля) в дорсальном роге выявлены ИР-интернейроны на всех срезах СМ в пластинках I–V (рисунок, а–г). КАБ-ИР-интернейроны характеризовались яркой флюо-

Таблица 1

Общее количество интернейронов в дорсальном роге спинного мозга мышей ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )

| Область дорсального рога спинного мозга | Группы животных |                              |
|-----------------------------------------|-----------------|------------------------------|
|                                         | Контрольная     | Экспериментальная — полетная |
| Пластины:                               |                 |                              |
| I                                       | 52,2±0,7        | 52,4±0,7                     |
| II                                      | 112,9±0,8       | 105,2±0,7*                   |
| III–IV                                  | 60,8±0,4        | 55,0±0,4*                    |
| V                                       | 29,2±0,3        | 28,2±0,4                     |
| Медиальный край                         | 12,40±0,24      | 13,1±0,27                    |

Здесь и в табл. 2: \* различия значимы по сравнению с показателями в контрольной группе при  $P < 0,05$ .



Кальбиндин содержащие интернейроны дорсального рога грудного отдела спинного мозга мышей в контроле (а-г) и после космического полета (д, е).

Римские цифры — пластинки; стрелки — иммунореактивные клетки, область прямоугольника соответствует области медиального края. Иммуногистохимический метод выявления кальбиндина. а — об. 10; б, в, д — об. 20; г, е — об. 40

ресценций нейроплазмы, проксимальных отделов волокон и отсутствием флюоресценции в ядре. Интенсивность свечения была одинаковой во всех ИР-интернейронах. В каждой из пластинок количество КАБ-ИР-интернейронов было всегда меньше, чем общее число интернейронов, выявленных красителем NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains, и составляло в зависимости от пластинок:

I — 19,4, II — 36,9, III–IV — 6, V — 10, ОМК — 28,2%.

В пластинках I–II располагались ИР-интернейроны, которые имели округлую и веретеновидную форму, свечение было выявлено лишь в их телах (см. рисунок, а, б). В пластинках III–IV выявлены ИР-интернейроны, имевшие только веретеновидную форму с флюоресценцией, лока-

лизированной как в телах клеток, так и в их отростках (см. рисунок, в). ИР-отростки интернейронов пластинок III–IV распространялись в вентральном направлении к пластинке II и в вентромедиальном направлении к пластинке X. В пластинке V выявлены ИР-интернейроны треугольной и веретеновидной формы, расположенные параллельно дорсовентральной оси, флюоресцирующие отростки которых распространялись в дорсовентромедиальном направлении (см. рисунок, г). В ОМК дорсального рога СМ ИР-интернейроны характеризовались округлой и веретеновидной формой и флюоресцирующими отростками, ориентированными в дорсомедиальном направлении (см. рисунок, в).

Подсчет КАБ-содержащих интернейронов показал (табл. 2), что в контрольной группе максимальное количество интернейронов было выявлено в пластинке II, а наименьшее число — в пластинках III–IV, V и в ОМК. Самыми крупными являлись ИР-интернейроны пластинки V, самыми мелкими — пластинок I и II, промежуточные размеры имели интернейроны ОМК и пластинок III–IV.

У мышей полетной группы ИР-интернейроны выявлялись во всех пластинках дорсального рога, но не были обнаружены в ОМК дорсального рога СМ. В пластинках I и II на каждом срезе располагались КАБ-содержащие интернейроны веретеновидной (преимущественно в пластинке I) или округлой (преимущественно в пластинке II) формы (см. рисунок, д). Флюоресценция в них обнаружена в ядрах, которые, как правило, располагались центрально. В пластинках III–IV в интернейронах выявлялся КАБ во всех структурах клетки: более отчетливо — в ядре и менее — в нейроплазме и отростках (см. рисунок, д). Тела ИР-интернейронов пластинок III–IV были веретеновидной или треугольной формы. Однако на каждом срезе в области этих пластинок присутствовали огромные КАБ-содержащие клетки овальной или треугольной формы с цен-

трально расположенным, относительно крупным ядром и иммунонегативным ядрышком (см. рисунок, е). От тела клеток отходило 5–6 толстых радиально направленных отростков. Отростки других ИР-интернейронов пластинок III–IV были тонкими, ветвились преимущественно в дорсовентромедиальном направлении. В пластинке V выявлялись КАБ-содержащие интернейроны, которые имели веретеновидную и треугольную форму, КАБ в них был локализован только в ядре.

Подсчет ИР-интернейронов показал, что в полетной группе, как и в контрольной, максимальное количество клеток выявлялось в пластинке II, а наименьшее число — в пластинках III–IV, V (см. табл. 2). В пластинках I и II число ИР-интернейронов в полетной группе превышало таковое в контроле на 71 и 62% соответственно, а в пластинках III–IV и V было меньше, чем в контроле — на 43 и 17% соответственно. Существенным было уже отмеченное выше отсутствие ИР-интернейронов в ОМК дорсального рога СМ.

У мышей полетной группы ПС ИР-интернейронов в пластинках I–II была меньше чем в контроле. В пластинках III–IV и V ПС ИР-интернейронов значительно превышала контрольные значения в связи с обнаружением среди них незначительного количества КАБ-содержащих интернейронов, имевших огромные размеры.

Экспрессия КАБ в СМ у контрольных мышей и после космического полета определялась методом вестерн-блоттинга, при этом в обеих группах выявлялись полосы, соответствующие молекулярной массе белка 28 килодальтон. Экспрессия белка значительно возрастала у мышей полетной группы по сравнению с таковой в контрольной (в 1,3 раза).

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного исследования показали, что количество КАБ-позитивных интернейронов в различных пластинках СМ изменяется раз-

Таблица 2

Общее количество (ОК) и площадь сечения (ПС) кальбиндин-содержащих интернейронов в дорсальном роге спинного мозга мыши ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )

| Область дорсального рога спинного мозга | Группы животных |                      |                              |                      |
|-----------------------------------------|-----------------|----------------------|------------------------------|----------------------|
|                                         | Контрольная     |                      | Экспериментальная — полетная |                      |
|                                         | ОК              | ПС, мкм <sup>2</sup> | ОК                           | ПС, мкм <sup>2</sup> |
| Пластины:                               |                 |                      |                              |                      |
| I                                       | 10,1±0,8        | 57,7±2,8             | 17,3±0,9*                    | 57,9±2,1             |
| II                                      | 42±4            | 57,3±1,7             | 67,4±1,1*                    | 43,5±1,1*            |
| III–IV                                  | 3,70±0,14       | 102±9                | 2,10±0,22                    | 343±57               |
| V                                       | 2,90±0,16       | 128±13               | 2,40±0,17                    | 174±33               |
| Медиальный край                         | 3,50±0,12       | 70±6                 | 0                            | 0                    |

нонаправленно. Однако в пластинках I и II число КАБ-ИР-интернейронов увеличивалось в большей степени, чем в других отделах. По данным вестерн-блоттинга, экспрессия КАБ увеличивается во время космического полета. Таким образом, общее количество КАБ-ИР-интернейронов после космического полета возрастает. Учитывая, что общее количество интернейронов, выявляемых в пластинках СМ флюоресцентным красителем в контрольной и полетных группах, существенно не различалось, выявленное изменение в количестве КАБ-содержащих интернейронов в полетной группе по сравнению с таковым в контрольной можно отнести к изменению функционального состояния этих клеток.

Эти данные, как и преимущественно ядерная локализация КАБ в нейронах пластинок I–V, отсутствие ИР к КАБ в интернейронах ОМК дорсального рога, уменьшение ПС ИР-интернейронов пластинки II, увеличение ПС ИР-интернейронов пластинок III, IV, V, обнаруженные у мышей полетной группы, свидетельствуют о дисбалансе в кальциевой буферной системе нервных клеток СМ.

Результаты проведенного исследования показали, что в дорсальном роге СМ мышей контрольной и полетной групп форма нейронов, содержащих КАБ, практически одинакова. Только в пластинках III–IV СМ у мышей полетной группы обнаружены единичные огромные ИР-интернейроны округлой и треугольной формы. Если отмечалось увеличение размеров единичных ИР-интернейронов III–IV пластинок дорсального рога СМ мышей, перенесших условия космического полета, то нейроны I и II пластинок имели значимо меньшую ПС по сравнению с контрольными значениями. При этом количество ИР-нейронов в пластинках I и II было значимо больше, чем в контроле.

Увеличение объема клетки может свидетельствовать либо о гипертрофии, либо об изменении осмотических свойств. Увеличение экспрессии КАБ может быть связано с изменением ионной проницаемости мембраны, в частности для ионов кальция. Более того, увеличение числа КАБ-содержащих клеток может свидетельствовать об увеличении его экспрессии в ранее иммунонегативных клетках. В настоящее время не представляется возможным объяснить, с чем связано отсутствие КАБ в интернейронах ОМК дорсального рога серого вещества СМ у мышей полетной группы: при окраске флюоресцентным красителем не обнаружено ни существенных различий суммарного количества выявляемых в контрольной и полетной группах интернейронов, ни

признаков их гибели. Возможно, это обусловлено неоднозначными изменениями афферентных потоков в условиях космического полета и проявлениями адаптационного синдрома. Вероятно, не случайно изменения выявлены в интернейронах поверхностной области дорсального рога, в которую включают пластинки I и II, связанные с центрами термо- и ноцицепции [10, 15], а также в интернейронах глубокой области дорсального рога — пластинки III, IV, V, ОМК, в которых располагается популяция премоторных нейронов, на которые проецируются сигналы первичных афферентных структур, связанных с механорецепторами [21].

Данные, что КАБ-интернейроны дорсального рога СМ являются возбуждающими, согласуются с исследованиями [9], выявившими меченые аспаратом ( $^3\text{H-D-aspartate}$ ) КАБ-содержащие интернейроны в пластинках I–IV и в области медиальной трети дорсального рога. Известно также, что производными V1-нейронов, которые образуются из прогениторных клеток, содержащих транскрипционные факторы Pax6/Dbx2/Nkx6.2, являются несколько субпопуляций проприоцептивных тормозных интернейронов, экспрессирующих КАБ и дающих аксональные проекции на мотонейроны: клетки Реншоу, интернейроны пластинки VII и глубокой области дорсального рога СМ [7]. При этом большинство V1 аксонных терминалей интернейронов СМ взрослых животных содержат глицин, треть клеток являются ГАМК-ергическими и в значительной части клеток выявляется солокализация этих нейротрансмиттеров.

Ранее [17] сообщалось об отсутствии выявления КАБ в субпопуляции премоторных интернейронов вентрального рога СМ — в клетках Реншоу у мышей, перенесших 30-суточный космический полет. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о проявлении этого феномена и в нейронах тех областей дорсального рога, где также локализуются премоторные интернейроны [14], т. е. отсутствие КАБ в нейронах ОМК дорсального рога СМ и уменьшение количества КАБ-содержащих интернейронов пластинок III, IV, V. Логично предположить, что выявленные в настоящем исследовании изменения в КАБ-содержащих нейронах затрагивают преимущественно субпопуляцию тормозных премоторных интернейронов.

Проведенное исследование не предполагало изучение отдельных факторов космического полета (перегрузка при взлете и приземлении, влияние 30-суточной микрогравитации, 12-часовая адаптация к земной гравитации и др.) на интернейроны дорсального рога СМ, а установило совокупное

их влияние на кальциевую систему нейрональных функциональных модулей СМ, прежде всего — моторного, который подвергается в условиях космического полета существенным изменениям.

*Работа выполнена по договору о НТ сотрудничестве с ГНЦ РФ — ИМБП РАН и поддержана РФФИ (проект 12-04-00621-а).*

#### ЛИТЕРАТУРА

- Александрова Н.П., Доница Ж.А., Данилова Г.А. и др. Роль афферентной системы легких в механизмах компенсаторных реакций дыхательной системы в антиортостатическом положении // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. 2007. Т. 93, № 6. С. 670–677.
- Андреев-Андреевский А.А., Шенкман Б.С., Попова А.С. и др. Экспериментальные исследования на мышах по программе полета биоспутника «Бийон-М1» // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2014. Т. 48, № 1. С. 14–27.
- Маслюков П.М., Коробкин А.А., Коновалов В.В. и др. Возрастное развитие кальбиндин-иммунопозитивных нейронов симпатических узлов крысы // Морфология. 2012. Т. 141, вып. 1. С. 77–80.
- Поляков И.В., Лоури О., Эджерстон В.Р., Краснов И.Б. Гистохимия и морфология передних рогов спинного мозга крыс после 9-суточного космического полета // Авиакосмическая и экологическая медицина. 1995. Т. 29, № 1. С. 30–32.
- Порсева В.В., Шилкин В.В., Стрелков А.А., Маслюков П.М. Субпопуляции кальбиндин-иммунореактивных интернейронов дорсального рога спинного мозга мышей // Цитология. 2014. Т. 56, № 8. С. 612–618.
- Шилкин В.В., Порсева В.В., Маслюков П.М., Стрелков А.А. Влияние сенсорной депривации на кальбиндин содержащие нейроны дорсального рога серого вещества спинного мозга и чувствительного узла спинномозгового нерва белой крысы // Морфология. 2014. Т. 146, вып. 6. С. 26–32.
- Alvarez F.J., Jonas P.C., Sapir T. et al. Postnatal phenotype and localization of spinal cord V1 derived interneurons // J. Comp. Neurol. 2005. Vol. 493, № 2. P. 177–192.
- Anelli R., Heckman C.J. The calcium binding proteins calbindin, parvalbumin, and calretinin have specific patterns of expression in the gray matter of cat spinal cord // Neurocytology. 2005. Vol. 34, № 6. P. 369–385.
- Antal M., Polgar E., Chalmers J. et al. 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 // J. Comp. Neurol. 1991. Vol. 314, № 1. P. 114–124.
- Craig A.D., Zhang E.T., Blomqvist A. Association of spinothalamic lamina I neurons and their ascending axons with calbindin-immunoreactivity in monkey and human // Pain. 2002. Vol. 97, № 1–2. P. 105–115.
- Gibbons S.J., Brorson J.R., Bleakman D. et al. Calcium influx and neurodegeneration // Ann. NY Acad. Sci. 1993. Vol. 679. P. 22–33.
- Krasnov I.B. Gravitational Neuromorphology // Advances in Space Biology and Medicine. 1994. Vol. 4. P. 85–110.
- Krasnov I.B., Polyakov I.V., Drobyshev V.I. Neuron-glia-capillary system in spinal cord of rats after 14-day space flight // The Physiologist. 1992. Vol. 35, № 1. Suppl., S.218–S.219.
- Levine A.J., Hinckley C.A., Hilde K.L. et al. Identification of a cellular node for motor control pathways // Nat. Neurosci. 2014. Vol. 17, № 4. P. 586–593.
- Lu Y., Perl E.R. Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II) // J. Neurosci. 2005. Vol. 25, № 15. P. 3900–3907.
- Molander C., Xu Q., Rivero-Melian C., Grant G. Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord // J. Comp. Neurol. 1989. Vol. 289, № 3. P. 375–385.
- Porseva V.V., Shilkin V.V., Krasnov I.B., Masliukov P.M. Calbindin-D28k immunoreactivity in the mice thoracic spinal cord after space flight // Int. J. Astrobiol. 2015. Vol. 14, № 4. P. 555–562.
- Punnakkal P., von Schoultz C., Haenraets K. et al. Morphological, biophysical and synaptic properties of glutamatergic neurons of the mouse spinal dorsal horn // J. Physiol. 2014. Vol. 592, № 4. P. 759–776.
- Schwaller B. The use of transgenic mouse models to reveal the functions of Ca<sup>2+</sup> buffer proteins in excitable cells // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1820, № 8. P. 1294–1303.
- Sojka D., Zacharova G., Spicarova D., Palecek J. Changes of calcium binding protein expression in spinothalamic tract neurons after peripheral inflammation // Physiol. Res. 2010. Vol. 59, № 6. P. 1011–1017.
- Todd A.J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn // Nat. Rev. Neurosci. 2010. Vol. 11, № 12. P. 823–836.

Поступила в редакцию 13.10.2016

Получена после доработки 30.11.2016

#### CHANGES IN CALBINDIN-CONTAINING NEURONS IN THE DORSAL HORN OF THE SPINAL CORD OF MICE AFTER SPACE FLIGHT IN BION-M1 BIOSATELLITE

V.V.Porseva<sup>1</sup>, V.V.Shilkin<sup>1</sup>, A.A.Strelkov<sup>1</sup>,  
K.Yu.Moiseyev<sup>1</sup>, I.B.Krasnov<sup>2</sup>, P.M.Maslyukov<sup>1</sup>

Calbindin (CAB)-containing interneurons of the dorsal horn of upper thoracic segments of the spinal cord (SC) were studied with the use of immunohistochemistry and Western-blotting in male C57/BL6 mice (n = 3) after 30 days-long space flight in Bion-M1 biosatellite (“flight” group). The control group consisted of mice kept in a vivarium (n = 3). In the “flight” group, the number of CAB-containing interneurons in laminae I and II was increased. Also, Western-blotting data showed that the expression of CAB in the SC increased after the flight. These results, as well as predominantly nuclear localization of CAB in neurons of laminae I–V, together with the lack of CAB immunoreactivity in interneurons of the medial edge of the dorsal horn, reduction of the average cross-sectional area of lamina II CAB-immunoreactive interneurons, an increase of the average cross-sectional area in CAB-immunoreactive interneurons of laminae III, IV and V in mice of the “flight” group indicate an imbalance in the calcium buffer system of SC neurons after the space flight. It may be concluded that the calcium system of SC neuronal functional modules (primarily, of the motor module) undergoes substantial changes under conditions of the space flight.

**Key words:** spinal cord, dorsal horn, interneuron, calbindin, microgravitation

<sup>1</sup> Department of Normal Physiology with the Course of Biophysics, Yaroslavl State Medical Academy; <sup>2</sup> RAS Institute of Biomedical Problems, Moscow