

© В. В. Порсева, В. В. Шилкин, А. А. Стрелков, П. М. Маслюков, 2014  
УДК 611.822.0186599.323.4

*В. В. Порсева, В. В. Шилкин, А. А. Стрелков и П. М. Маслюков*

## КАЛЬБИНДИН-СОДЕРЖАЩИЕ НЕЙРОНЫ ВЕНТРАЛЬНОГО РОГА СЕРОГО ВЕЩЕСТВА СПИННОГО МОЗГА МЫШЕЙ

Кафедра нормальной физиологии с биофизикой (зав. — проф. П. М. Маслюков), Ярославская государственная медицинская академия

Исследование проведено на 4 мышах C57black/6 с целью изучения нейронов, содержащих белки кальбиндин (КБ) с молекулярной массой 28 килодальтон, и нейрофиламентов (НФ) с молекулярной массой 200 килодальтон в вентральном роге серого вещества сегментов T<sub>II</sub>, L<sub>IV</sub>, L<sub>V</sub> и L<sub>VI</sub> спинного мозга (СМ). Для выявления иммунопозитивных нейронов применяли мечение антителами к КБ и двойное мечение антителами к КБ и к НФ. Всю клеточную популяцию выявляли красителем NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stain. Результаты работы показали, что КБ-иммунопозитивные (КБ<sup>+</sup>) нейроны, выявляемые в вентро-медиальной области вентрального рога на всех уровнях СМ, представлены клетками Реншоу. КБ<sup>+</sup>-интернейроны, расположенные в медиальной области вентрального рога, присутствовали только в поясничных сегментах СМ. КБ<sup>+</sup>-мотонейроны, выявляемые в медиальной области вентрального рога, имелись в одном сегменте СМ — L<sub>IV</sub> — и одновременно содержали белок НФ.

**Ключевые слова:** спинной мозг, нейроны, кальбиндин 28 килодальтон, нейрофиламенты 200 килодальтон, мышь

Среди факторов, регулирующих функцию клетки и ее пластичность, важное значение имеет поддержание определенной концентрации Ca<sup>2+</sup>, и значимая роль в этом отводится внутриклеточным Са-связывающим белкам [21, 22, 24]. Вместе с тем, аксональный транспорт является Са-зависимым процессом, причем избыток ионов кальция внутри клетки ухудшает перемещение белков нейрофиламентов (НФ), которые переносятся от тела клетки к аксонному окончанию медленным транспортом [9, 14, 15].

Показано, что мото- и интернейроны вентрального рога спинного мозга (СМ), включая и клетки Реншоу, проявляют иммунореактивность по отношению к большому количеству Са-связывающих белков: кальбиндину (КБ), кальмодулину, парвальбумину, кальретинину [6, 11, 16]. Нейромодуляторную функцию Са-связывающих белков связывают с их распределением в холинергических и NO-ергических нейронах вентрального рога и нейропротекторными свойствами данных белков [17, 18].

Для понимания сути функциональных отношений между мотонейронами и интернейронами вентрального рога СМ необходимо решить: совпадает ли локализация Са-связывающих белков с белками НФ.

Цель данного исследования — изучение нейронов вентрального рога серого вещества СМ, иммунопозитивных по отношению к белкам КБ с молекулярной массой 28 килодальтон (28 kD calbindin) и нейрофиламентов с молекулярной массой 200 килодальтон (200 kD neurofilament).

Материал и методы. Исследование проведено на 4 линейных мышах C57black/6 массой 20±5 г в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». СМ фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатно-солевом буфере (PBS; 0,01 M, pH 7,4) (БиолоТ, Россия) в течение 2 ч при 4 °С, после чего промывали 3-кратно в PBS в течение 30 мин и оставляли в 30% растворе сахарозы на 24 ч при 4 °С. Из фиксированного СМ выделяли II грудной (T<sub>II</sub>), IV поясничный (L<sub>IV</sub>), V поясничный (L<sub>V</sub>) и VI поясничный (L<sub>VI</sub>) сегменты, 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 вентральном роге серого вещества СМ, устанавливая их соответствие пластинам Рекседа [20, 23]. Выявление КБ-иммунопозитивных (КБ<sup>+</sup>) и содержащих белки НФ (НФ<sup>+</sup>) нейронов проводили по ранее описанной методике с использованием меченых антител [1, 2]. Срезы преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% сыворотки, 1% тритона X-100, 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% тимерозола. Затем срезы инкубировали с первичными антителами в течение 24 ч при комнатной температуре.

### Сведения об авторах:

Порсева Валентина Вячеславовна (e-mail: vvporseva@mail.ru), Шилкин Валентин Викторович (e-mail: shilkin39@mail.ru), Стрелков Андрей Анатольевич (e-mail: strelkov-yar@mail.ru), Маслюков Петр Михайлович (e-mail: mpm@yuma.ac.ru), кафедра анатомии человека, Ярославская государственная медицинская академия Минздрава России, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

Для выявления КБ использовали поликлональные антитела кролика (Abscam, Великобритания, разведение 1:500). Вторичные антитела были конъюгированы с флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC, Jackson, США), флюоресцирующим в зеленой области спектра. Мечение всей популяции нейронов по Нисслю производили красителем, флюоресцирующим в красной области спектра (NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stain, Molecular Probes, США). Для одновременного выявления в нейронах белков КБ и НФ на одном срезе использовали двойную метку. С этой целью проводили мечение кроличьими антителами к белку КБ (Abscam, Великобритания, разведение 1:500) и моноклональными мышьиными антителами АВ82259 к белку НФ (Abscam, Великобритания, разведение 1:300) в течение 24 ч при комнатной температуре. Для предотвращения неспецифического окрашивания, перед применением первичных антител, использовали преинкубацию в течение 1 ч с Fab-фрагментом неконъюгированных ослиных антител к иммуноглобулинам мыши (Jackson Immunoresearch, США, разведение 10 мг/мл). Инкубацию с вторичными антителами проводили последовательно: FITC (Jackson, США, разведение 1:100), флюоресцирующим в зеленой области спектра, в течение 2 ч; индокарбозинином — Су3-конъюгированным с Fab-фрагментом ослиных антител к иммуноглобулинам мыши (Jackson Immunoresearch, США, разведение 1:500), флюоресцирующим в красной области спектра, в течение 2 ч. После этого срезы отмывали в растворе PBS и заключали в среду для иммуофлюоресценции (VectaShield, Vector Laboratories, США). Для исключения неспецифической реакции часть срезов инкубировали без первичных антител.

Анализ препаратов проводили с помощью флюоресцентного микроскопа ЛОМО Микмед 2, вариант 12 (Россия) с соответствующим набором светофильтров и CCD камеры MDC320 (ScoreTec, Китай). На каждом 5-м срезе подсчитывали иммунопозитивные клетки, срез которых прошел через ядро. На цифровых изображениях гистологических препаратов при увеличении 200 по программе ImageJ (NIH, США) измеряли площадь сечения нейронов. Статистическую обработку полученных морфометрических параметров проводили, используя программы Statistica 10 (StatSoft, Inc., 2011). Различия считали значимыми при  $P < 0,05$ . Цифровые данные в работе представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки.

**Результаты исследования.** В вентральном роге серого вещества СМ КБ<sup>+</sup>-нейроны выявлены во всех исследованных сегментах. Тело и отростки КБ<sup>+</sup>-нейронов имели яркое зеленое свечение, интенсивность которого была одинаковой у клеток грудного и поясничных сегментов СМ, но топография их зависела от уровня. Так, в L<sub>IV</sub>, L<sub>V</sub>, L<sub>VI</sub> сегментах КБ<sup>+</sup>-нейроны обнаруживались в вентромедиальной и медиальной областях вентрального рога, которые соответствовали вентральным частям пластин VII и VIII серого вещества СМ. В сегменте T<sub>II</sub> КБ<sup>+</sup>-нейроны выявлялись только в вентромедиальной части рога. Область расположения этих нейронов соответствовала вентральной части пластины VIII серого вещества СМ.

КБ<sup>+</sup>-нейроны, выявляемые в вентромедиальной части вентрального рога СМ, имели овальную

форму и 2–3 тонких дендрита, ветви которых протяженностью до 35 мкм прослеживались в медиальной и латеральной областях вентрального рога.

На срезе каждого сегмента в этой области выявлялось незначительное количество КБ<sup>+</sup>-нейронов: на уровне T<sub>II</sub> — 1–2 клетки; на уровнях L<sub>IV</sub>, L<sub>V</sub>, L<sub>VI</sub> — 3–4 клетки (рис. 1, а). В сегменте T<sub>II</sub> средняя площадь сечения иммунопозитивных нейронов была минимальной и составила  $73 \pm 14$  мкм<sup>2</sup>; в поясничных сегментах СМ этот показатель был больше: в L<sub>IV</sub> —  $97 \pm 9$  мкм<sup>2</sup>; L<sub>V</sub> —  $101 \pm 7$  мкм<sup>2</sup>; L<sub>VI</sub> —  $87 \pm 16$  мкм<sup>2</sup>.

КБ<sup>+</sup>-нейроны, выявляемые в медиальной части вентрального рога СМ, являлись типичными мультиполярными клетками и имели значимо большие размеры ( $P < 0,05$ ): средняя площадь их сечения составила в L<sub>VI</sub>  $222 \pm 27$  мкм<sup>2</sup>, в L<sub>V</sub> —  $202 \pm 28$  мкм<sup>2</sup> и в L<sub>IV</sub> —  $214 \pm 28$  мкм<sup>2</sup>. При этом на срезах каждого поясничного сегмента в данной части вентрального рога СМ выявлялись только одиночные КБ<sup>+</sup>-нейроны (см. рис. 1, б).

Анализ результатов при маркировке нейронов двойной меткой показал, что субпопуляция КБ<sup>+</sup>-нейронов разнородна по содержанию в них белка НФ. Так, КБ<sup>+</sup>-нейроны, выявляемые в вентромедиальной области вентрального рога в грудном и поясничных сегментах СМ, не содержали НФ200. Только КБ<sup>+</sup>-нейроны, расположенные в медиальной области вентрального рога на уровне L<sub>VI</sub>, являлись НФ<sup>+</sup>-нейронами (рис. 2).

Субпопуляция НФ<sup>+</sup>-нейронов имела красную флюоресценцию, свечением обладали волокна и цитоплазма иммунопозитивных нейронов, ядро оставалось интактным. При сопоставлении с результатами иммуногистохимической окраски всей нейронной популяции вентрального рога оказалось, что белок НФ определялся исключительно в мотонейронах, но не все мотонейроны содержали этот белок, а только сравнительно небольшая их часть (см. рис. 2, б, в). Так, на уровне T<sub>II</sub> белок НФ обнаружен в 5–6 клетках, а на уровнях L<sub>IV</sub>, L<sub>V</sub> и L<sub>VI</sub> — 7–8 клеток являются НФ<sup>+</sup>-мотонейронами. При этом количество всей клеточной субпопуляции мотонейронов на поперечном срезе СМ составило в T<sub>II</sub>  $24,0 \pm 0,9$ , в L<sub>IV</sub> —  $26,3 \pm 2,2$ , в L<sub>V</sub> —  $31 \pm 3$ , в L<sub>VI</sub> —  $31,0 \pm 1,3$ . Расположение мотонейронов соответствовало пластине IX серого вещества СМ и включало на уровнях T<sub>II</sub> и L<sub>IV</sub> вентромедиальную область, на уровнях L<sub>V</sub> и L<sub>VI</sub> — латеральную область вентрального рога. Анализ площади сечения мотонейронов показал, что наименьшие размеры имели клетки в сегментах T<sub>II</sub> и L<sub>VI</sub>, где этот показатель составил  $224 \pm 13$  и  $236 \pm 13$  мкм<sup>2</sup> соответственно. Наибольшие размеры мотонейро-

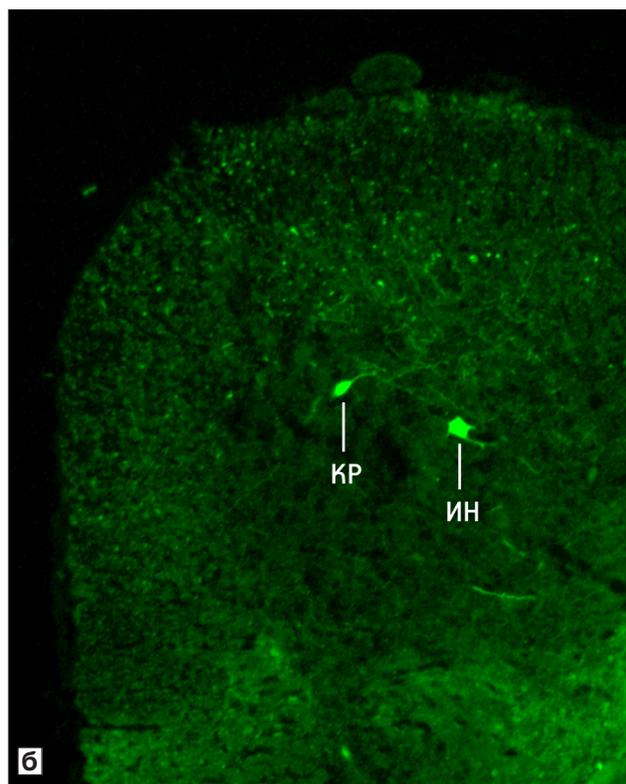
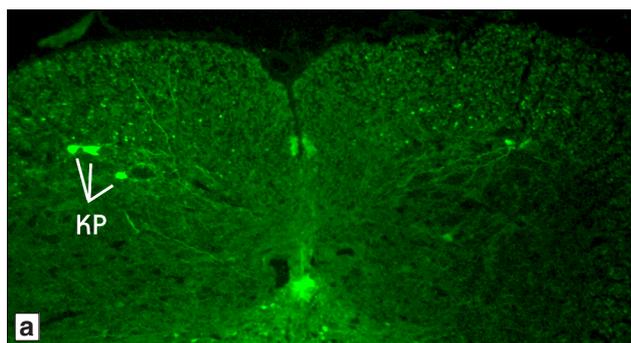


Рис. 1. Кальбиндин-иммунопозитивные нейроны сегментов  $L_V$  (а) и  $L_{VI}$  (б) спинного мозга мыши.

КР — клетка Реншоу; ИН — интернейрон. Иммуногистохимическая реакция. Об. 10, ок. 7

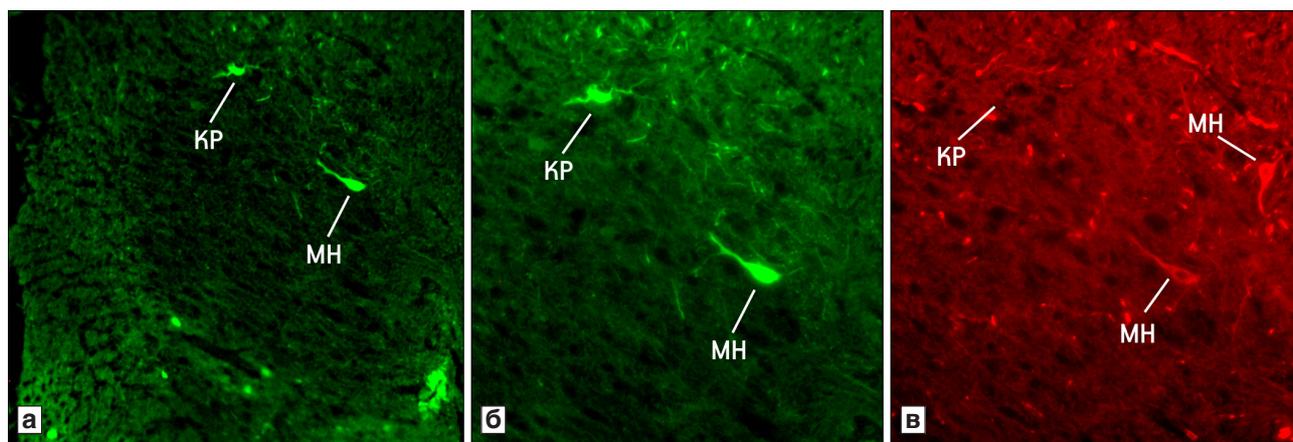


Рис. 2. Кальбиндин-иммунопозитивные (а, б) и содержащие белок нейрофиламенты (в) нейроны сегмента  $L_{IV}$  спинного мозга мыши.

КР — клетка Реншоу; МН — мотонейрон. Иммуногистохимическая реакция. а — об. 10, ок. 7; б, в — об. 20, ок. 7

ны имели в сегментах  $L_{IV}$  и  $L_V$ , площадь их сечения составила  $282 \pm 14$   $\mu\text{m}^2$  и  $262 \pm 9$   $\mu\text{m}^2$ .

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного исследования показали, что в вентральном роге серого вещества СМ присутствуют клетки, которые содержат белок КБ. Топографически можно выделить 2 области расположения КБ<sup>+</sup>-нейронов в вентральном роге СМ, в пределах которых они различаются как формой, так и размерами. Одна область расположения КБ<sup>+</sup>-нейронов находится в вентромедиальной части вентрального рога СМ. С учетом строения

серого вещества на поперечных срезах различных отделов СМ выявляемые нейроны располагаются в вентральных частях пластины VIII сегмента  $T_{II}$ , пластины VII — в  $L_{IV}$ ,  $L_V$ ,  $L_{VI}$ . Субпопуляция КБ<sup>+</sup>-нейронов этой области представлена исключительно клетками малых размеров, средняя площадь сечения которых не превышает 100  $\mu\text{m}^2$  с характерной вытянутой формой и арборизацией коротких ветвей дендритов в пределах рога. Уровневые различия заключаются только в количестве этих КБ<sup>+</sup>-нейронов с минимумом в сегменте  $T_{II}$  СМ, где определяются единич-

ные иммунопозитивные клетки. Учитывая данные морфологических, топографических и иммуногистохимических характеристик этой субпопуляции клеток, можно с уверенностью говорить об их принадлежности к интернейронам, именуемым клетками Реншоу. По данным физиологических исследований [3, 13, 19], клетки Реншоу представляют особую группу интернейронов, расположенных в вентромедиальной области вентрального рога серого вещества СМ.  $\alpha$ -мотонейроны СМ образуют аксонные коллатерали, проецирующиеся на клетки Реншоу, которые, в свою очередь, образуют глицинергические синаптические контакты на телах мотонейронов, осуществляя таким образом возвратное торможение клеток с использованием глицина в качестве медиатора [4, 12]. Клетки Реншоу содержат  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий белок КБ [7, 8], являющийся их «потенциальным маркером» [5, 10] и играющий роль буфера для связывания избытка  $\text{Ca}^{2+}$  [13, 22], образующегося при усилении тормозного влияния клеток на мотонейроны [12]. Содержание КБ в клетке Реншоу изменяется в постнатальном онтогенезе — с возрастом количество  $\text{KB}^+$ -нейронов уменьшается, а у взрослых животных [8, 24] выявляются лишь единичные клетки, что соответствует результатам настоящего исследования. Данные литературы свидетельствуют, что у мышей в сегментах  $\text{L}_{\text{IV}}$  и  $\text{L}_{\text{V}}$  СМ клетки Реншоу составляют всего 2–3% от всех вентральных интернейронов, а соотношение их с мотонейронами составляет 1:5 [5]. Проведенное исследование обнаружило, что в вентральном роге серого вещества СМ мыши отношение клеток Реншоу к мотонейронам в сегменте  $\text{T}_{\text{II}}$  составляет 1:16, в  $\text{L}_{\text{IV}}$  — 1:7,5, в сегментах  $\text{L}_{\text{V}}$  и  $\text{L}_{\text{VI}}$  — 1:9, т.е. зависит от исследуемого уровня.

Другая область расположения  $\text{KB}^+$ -нейронов находится в медиальной части вентрального рога СМ. Уровневые различия заключаются в отсутствии нейронов, содержащих КБ в этой области в сегменте  $\text{T}_{\text{II}}$  СМ. С учетом строения серого вещества на поперечных срезах различных отделов СМ выявляемые нейроны располагаются в пластине VIII в сегментах  $\text{L}_{\text{IV}}$ ,  $\text{L}_{\text{V}}$ ,  $\text{L}_{\text{VI}}$ . Субпопуляция  $\text{KB}^+$ -нейронов этой области характеризуется иным строением и представлена мультиполярными клетками крупных размеров, средняя площадь сечения которых находится в пределах 200–220  $\text{мкм}^2$ . Анализ литературы показал, что в пластине VIII выявляются  $\text{KB}^+$ -интернейроны средних и крупных размеров на всех уровнях СМ в ряду позвоночных животных — от амфибий до млекопитающих [6, 11, 16–18]. Часть авторов описывают  $\text{KB}^+$ -нейроны пластины VIII, как типичные вставочные нейроны, ссылаясь на их

серотонинергическую иммунореактивность [16]. Доказано также, что данная субпопуляция  $\text{KB}^+$ -интернейронов не содержит гефрина (gephyrin), являющийся адаптерным белком комплекса рецепторов глицина и специфическим маркером клеток Реншоу [5, 12]. Следовательно, это другая, отличная от клеток Реншоу, субпопуляция  $\text{KB}^+$ -интернейронов. Также обнаружено, что в данной области в сегменте  $\text{L}_{\text{IV}}$  СМ присутствуют  $\text{KB}^+$ -нейроны, которые содержат белок НФ. Они превосходят по размерам клетки Реншоу и имеют сравнительно толстый ярко флюоресцирующий отросток, который по морфологической и иммуногистохимической характеристике может быть идентифицирован как аксон, содержащий белок НФ. Показана также солокализация КБ и холинацетилтрансферазы (ХАТ) в нейронах вентрального рога СМ. Разброс показателей холинергических нейронов, содержащих КБ, велик: от 2% — у черепахи, 18–24% — у геккона, до 56% — у человека [11, 17, 18]. При этом, авторы относят эту субпопуляцию  $\text{KB}^+$ -нейронов исключительно к мотонейронам [11, 17]. В пользу этого свидетельствуют данные, что именно крупные  $\alpha$ -мотонейроны пластины IX СМ проявляют иммунореактивность не только к КБ, но и к другим  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим белкам — парвальбумину, кальретину [7, 11]. По всей видимости, эти клетки и относятся к особым мотонейронам с солокализацией КБ и НФ.

Различия положения  $\text{KB}^+$ -нейронов в пластине Рекседа на грудном и поясничных уровнях СМ связаны с особенностями строения его серого вещества. Так, на уровне  $\text{T}_{\text{II}}$  пластине VIII распространяется практически на весь вентральный рог: от медиальной до латеральной его границы; «грудной тип» строения серого вещества СМ. А на уровне  $\text{L}_{\text{IV}}$  в пластине VIII располагается медиальная группа мотонейронов — «транзиторный тип» строения серого вещества СМ.

Таким образом, установлено, что в вентральном роге серого вещества СМ у мыши содержатся 3 субпопуляции  $\text{KB}^+$ -нейронов, одна из которых представлена мотонейронами, 2 другие — интернейронами и клетками Реншоу. При этом единичные  $\text{KB}^+$ -мотонейроны содержат белок НФ.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. 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.

2. Порсева В.В., Шилкин В.В., Корзина М.Б. и др. Особенности возрастных изменений НФ200<sup>+</sup>-нейронов чувствительных узлов различных сегментарных уровней при химической деафферентации. *Морфология*. 2012, т. 142, вып. 4, с. 37–42.
3. Экклс Д. Антидромный тормозной путь. В кн.: Физиология нервных клеток. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1959, с. 182–191.
4. Alvarez F.J., Dewey D.E., McMillin P. and Fyffe R. E. W. Distribution of cholinergic contacts on Renshaw cells in the rat spinal cord: a light microscopic study. *J. Physiol.* 1999, v. 515, Pt. 3, p. 787–797.
5. Alvarez F.J. and Fyffe R.E.W. The continuing case for the Renshaw cell. *J. Physiol.*, 2007, v. 584, p. 31–45.
6. 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. *J. Neurocytol.*, 2005, v. 34, № 6, p. 369–385.
7. Arvidsson U., Ulfhake B., Cullheim S. et al. Distribution of calbindin D28k-like immunoreactivity (LI) in the monkey ventral horn: do Renshaw cells contain calbindin D28k-LI? *J. Neurosci.*, 1992, v. 12, № 3, p. 718–728.
8. Blanchard S.R., Al-Marsoum S. and Carr P.A. Renshaw cell loss in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J.*, 2009, v. 23, p. 831.
9. Capano C.P., Pernas-Alonso R. and Porzio U. Neurofilament homeostasis and motoneurone degeneration. *BioEssays.*, 2001, v. 23, p. 24–33.
10. Carr P.A., Alvarez F.J., Leman E.A. and Fyffe R.E. Calbindin D28k expression in immunohistochemically identified Renshaw cells. *NeuroReport.*, 1998, v. 9, № 11, p. 2657–2661.
11. Fahandejsaadi A., Leung E., Rahaii R. et al. Calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in primate lower motor neurons. *NeuroReport.*, 2004, v. 15, № 3, p. 443–448.
12. Geiman E.J., Knox M.C., Alvarez F.J. Postnatal maturation of gephyrin/glycine receptor clusters on developing Renshaw cells. *J. Comp. Neurol.*, 2000, v. 426, p. 130–142.
13. Kim J. S., Kim J. M., Son J.A. et al. Decreased calbindin-immunoreactive Renshaw cells (RCs) in the lumbar spinal cord of the ataxic pogo mice. *Korean J. Anat.*, 2008, v. 41, № 4, p. 255–263.
14. Liu Q., Xie F., Siedlak S.L. et al. Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. *Cell Mol. Life Sci.*, 2004, v. 61, p. 3057–3075.
15. Meier J., Couillard-Despres S., Jacomy H. et al. Extra neurofilament NF-L subunits rescue motor neuron disease caused by overexpression of the human NF-H gene in mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1999, v. 58, p. 1099–1110.
16. Megias M., Alvarez-Otero R. and Pombal M. Calbindin and calretinin immunoreactivities identify different types of neurons in the adult lamprey spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 2003, v. 455, № 1, p. 72–85.
17. Morona R., Lopez J.M. and Gonzalez A. Calbindin-D28k and calretinin immunoreactivity in the spinal cord of the lizard *Gekko gekko*: Colocalization with choline acetyltransferase and nitric oxide synthase. *Brain Res. Bull.*, 2006, v. 69, № 5, p. 519–534.
18. Morona R., Lopez J. M., Dominguez L. and Gonzalez A. Immunohistochemical and hodological characterization of calbindin-D28k-containing neurons in the spinal cord of the turtle, *Pseudemys scripta elegans*. *Microsc. Res. Tech.*, 2007, v. 70, № 2, p. 101–118.
19. Renshaw B. Central effects of centripetal impulses in axons of spinal ventral roots. *J. Neurophysiol.*, 1946, v. 9, p. 191–204.
20. Rexed B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord of the cat. *J. Comp. Neurol.*, 1952, v. 96, p. 415–495.
21. Schmidt H. Three functional facets of calbindin D-28k. *Front. Mol. Neurosci.*, 2012, v. 5, p. 25.
22. 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, v. 1820, p. 1294–1303.
23. Steiner T.J. and Turner L.M. Cytoarchitecture of the rat spinal cord. *J. Physiol.*, 1972, v. 222, p. 123–125.
24. Zhang J.H., Morita Y., Hironaka T. et al. Ontological study of calbindin-D28k-like and parvalbumin-like immunoreactivities in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.*, 1990, v. 302, p. 715–728.

Поступила в редакцию 20.11.2013  
Получена после доработки 14.04.2014

#### CALBINDIN-CONTAINING NEURONS OF THE VENTRAL HORN OF MURINE SPINAL CORD GRAY MATTER

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

The study was performed in 4 C57black/6 mice to examine the neurons located in T<sub>II</sub>, L<sub>IV</sub>, L<sub>V</sub> and L<sub>VI</sub> segments of the spinal cord (SC) ventral horn, containing 28 kD calbindin (CAB) and 200 kD neurofilament (NF) proteins. To demonstrate immunoreactive neurons, the cells were labeled with antibodies against CAB and double labeled with antibodies against CAB and NF. The total cell population was demonstrated using NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stain. Results have shown that CAB-immunopositive neurons were identified in ventromedial area of the ventral horn at all SC levels and were represented by Renshaw cells. CAB-positive interneurons located in the medial area of the ventral horn were present only in SC lumbar segments. CAB-positive motoneurons that were identified in the medial area of the ventral horn, were present in one SC segment (L<sub>IV</sub>) and were also found to contain a NF protein.

**Key words:** spinal cord, neurons, 28 kD calbindin, 200 kD neurofilaments, mouse

Department of Physiology, Yaroslavl' State Medical Academy