

18. Stepien A. E., Tripodi M. and Arber S. Monosynaptic rabies virus reveals premotor network organization and synaptic specificity of cholinergic partition cells. *Neuron*, 2010, v. 68, p. 456–472.

Поступила в редакцию 21.05.2014
Получена после доработки 22.07.2014

CALBINDIN-IMMUNOREACTIVE INTERNEURONS OF THE SPINAL CORD GRAY MATTER INTERMEDIATE ZONE AND VENTRAL HORNS IN ALBINO RAT

V.V.Porseva

The aim of the study was to examine the topography and structural characteristics of the interneurons containing 28 kDa calbindin (CAB) in the ventral horn and the intermediate zone of the spinal cord (SC) gray matter in T_{II} and L_{IV} segments. The study was performed on 4 adult female Wistar rats using immunohistochemical and morphometric methods. 14 micrometers-thick

cryostat cross-sections of SC were analyzed. Two subpopulations of CAB-immunoreactive (CAB-IR) interneurons were present in the intermediate SM zone in lamina VII in both segments: preganglionic sympathetic neurons and the partition cells. In the ventral horn, also two subpopulations of CAB-IR interneurons were identified: Renshaw cells in the lamina IX in T_{II} and in the lamina VII in L_{IV}; large interneurons in the lamina VIII in T_{II} and lamina VII in L_{IV}. Segmental differences were observed only in larger numbers of Renshaw cells and partition cells in L_{IV}. The average cross-sectional area of CAB-IR Renshaw cells and autonomic preganglionic neurons was greater in T_{II}, while this parameter of large ventral horn interneurons and partition cells was greater in L_{IV}.

Key words: *spinal cord, ventral horn, intermediate zone interneurons, 28 kDa calbindin*

Department of Normal Physiology with Biophysics, Yaroslavl State Medical Academy

© В. В. Шилкин, В. В. Порсева, П. М. Маслюков, А. А. Стрелков, 2014
УДК 612.014.46:611.822.018:599.323.4

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

ИЗМЕНЕНИЯ КАЛЬБИНДИН-СОДЕРЖАЩИХ НЕЙРОНОВ ЗАДНЕГО РОГА СЕРОГО ВЕЩЕСТВА СПИННОГО МОЗГА И ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО УЗЛА СПИННОМОЗГОВОГО НЕРВА БЕЛОЙ КРЫСЫ ПОСЛЕ СЕНСОРНОЙ ДЕПРИВАЦИИ

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

У крыс линии Вистар (n=4) иммуногистохимическим методом исследовали влияние капсаицина на морфометрические и структурные характеристики нейронов заднего рога серого вещества T_{II}-сегмента спинного мозга (СМ) и второго грудного чувствительного узла спинномозгового нерва (ЧУСН), содержащих кальбиндин (КБ) с молекулярной массой 28 килодальтон. Капсаицин вводили взрослым животным 3-кратно с интервалом 24 ч в суммарной дозе 125 мг/кг, материал брали на 14-е сутки. Введение капсаицина вызвало уменьшение доли КБ-иммунопозитивных (КБ-ИП) нейронов в ЧУСН (на 60%) и в пластинках заднего рога I–II–III (на 8, 18 и 15% соответственно), средние размеры КБ-ИП-нейронов увеличились за счет внутриклеточного отека. В результате деафферентации развивались однотипные морфометрические и структурные изменения КБ-ИП-нейронов как в ЧУСН, так и в заднем роге серого вещества СМ, которые проявлялись центральным хроматолизом, вакуолизацией ядра и цитоплазмы, свидетельствуя о гидропической дистрофии. О необратимости выявленных изменений в нейронах ЧУСН и пластинках I, II и V заднего рога СМ свидетельствовали деформация ядра, лизис ядрышка, уменьшение числа КБ-содержащих нейронов, признаки нейронофагии с образованием остаточных узелков на месте погибших клеток.

Ключевые слова: *спинной мозг, задний рог, чувствительный узел спинномозгового нерва, нейроны, кальбиндин*

В первичных чувствительных нейронах локализованы TRPV1-рецепторы (Transient Receptor Potential Vanilloid 1), которые взаимодействуют с капсаицином — производным ваниллоидов [7, 12, 17, 19]. Капсаицин — нейротоксин, в небольших дозах оказывает избирательное влияние на боль-

шинство афферентных тонких безмиелиновых С-волокон и частично на тонкие миелиновые А-δ-волокна. Все эффекты капсаицина зависят от вводимой дозы и длительности его применения, поэтому в зависимости от целей исследования, вида и возраста животного применяются раз-

Сведения об авторах:

Шилкин Валентин Викторович (e-mail: shilkin39@mail.ru), Порсева Валентина Вячеславовна (e-mail: vporseva@mail.ru), Маслюков Петр Михайлович (e-mail: mpm@yuma.ac.ru), Стрелков Андрей Анатольевич (e-mail: strelkov-yar@mail.ru), кафедра нормальной физиологии с биофизикой, Ярославская государственная медицинская академия, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

личные дозы капсаицина (от 50 до 150 мг/кг) и способы его введения (1-кратное, многократное). Низкие дозы активируют афферентные терминалы, в результате чего проявляется его анальгезирующий эффект [11, 24]. При 1-кратном введении капсаицина новорожденным животным обнаруживается его нейротоксическое действие [2, 3, 11]. При многократном применении постепенно увеличивающихся доз капсаицинов вызывает десенситизацию, блокаду аксоплазматического тока, истощение запаса нейропептидов, дегенерацию чувствительных нейронов [24].

Реакция на введение нейротоксической дозы капсаицина отражается на функционально различных нейронах. Ряд авторов предполагают, что реакция, вызываемая введением капсаицина, может быть изучена не ранее, чем через 2 нед с момента его введения [6]. Другие исследователи утверждают, что процесс деафферентации проявляется уже спустя 3 сут после введения капсаицина [7]. Нейротоксическое действие капсаицина объясняется также избыточным внутриклеточным накоплением ионов Ca^{2+} и Na^+ , что ведет к активации протеаз и гибели клеток [8, 13].

Кальбиндин (КБ) является внутриклеточным кальций-связывающим белком, который участвует в транс-клеточном транспорте ионов кальция и модулирует эффекты, возникающие в ответ на изменения внутриклеточной концентрации кальция, функционируя в качестве своеобразного буфера и обеспечивая кальциевый гомеостаз [18, 22]. КБ присутствует в различных типах клеток как в центральной [14, 16, 26], так и в периферической нервной системе [1, 4, 8, 15]. Показано, что дисфункция кальциевой буферной системы в чувствительных нейронах может приводить к их дегенерации [9]. В нервных клетках выделяют особую роль кальций-связывающих белков, которая заключается в нейропротекции и связана с их избирательной устойчивостью к глутамат-индуцированной нейротоксичности [20, 24].

Причины стойких изменений нейрональной системы заднего рога спинного мозга (СМ) в результате повреждающей деафферентации изучены далеко не полностью, однако, некоторые механизмы развития сенситизации уже определены. Нейронные сети заднего рога, образуя функционально различные модули, содержат интернейроны, которые способны изменяться под влиянием передаваемой сенсорной информации с первичных афферентных А- и С-волокон [27].

Цель настоящей работы — выявить морфометрические и структурные изменения нейронов, содержащих КБ с молекулярной массой 28 кило-

далтон (calbindin 28 kDa) в заднем роге СМ и чувствительном узле спинномозгового нерва (ЧУСН) на фоне дефицита афферентации, вызванной капсаицином.

Материал и методы. Исследование проведено на самках крыс линии Вистар массой 200 ± 10 г, которые были разделены на 2 группы: контрольную ($n=4$) и подопытную ($n=4$). В подопытной группе моделировали деафферентацию путем подкожного введения капсаицина (N-vanillylonamide, Sigma), который растворяли в фосфатно-солевом буфере (PBS), 0,01 М, pH 7,4 (БиолоТ, Россия), содержащем 10% этилового спирта и 10% Твин-80. Суммарную дозу капсаицина (125 мг/кг) крысам вводили в течение 3 сут: в 1-е сутки — 25 мг/кг; во 2-е и 3-и сутки — по 50 мг/кг [5]. У животных подопытной группы материал брали на 14-е сутки после последнего введения раствора капсаицина, одновременно с взятием материала у крыс контрольной группы. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Эвтаназию осуществляли под уретановым наркозом (3 г/кг внутривенно) путем транкардиальной перфузии PBS, 0,01 М, pH 7,4, содержащего гепарин (5 ЕД/л), затем 4% раствора параформальдегида (Sigma, США) на PBS. Объектом исследования служили нейроны заднего рога II грудного сегмента СМ (T_{II}) и чувствительного узла второго грудного спинномозгового нерва. Выделенный СМ с корешками и чувствительными узлами фиксировали в 4% растворе параформальдегида на PBS в течение 2 ч при 4 °С, после чего промывали 3-кратно в PBS в течение 30 мин и оставляли в 30% растворе сахарозы (Panreac, Испания) на 24 ч при 4 °С. Из фиксированного СМ, ориентируясь по корешкам, выделяли T_{II} и ЧУСН, которые замораживали в криогеле Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Нидерланды). Из выделенных объектов с помощью криостата Shandon E (Thermo Scientific, Великобритания) готовили поперечные серийные срезы толщиной 14 мкм. Для выявления нейронов использовали каждый 5-й срез — всего 10 срезов с каждого объекта. Выявление КБ-иммунопозитивных (КБ-ИП) нейронов проводили по ранее описанной методике с использованием меченых антител [1]: первичные антитела (Abcam, Великобритания) — поликлональные кроличьи к КБ, разведение 1:500; вторичные — ослиные (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США) к кроличьему иммуноглобулину G, конъюгированные с флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC), разведение 1:200, флюоресцирующим в зеленой области спектра. Мечение всей популяции нейронов по Ниссли проводили красителем, флюоресцирующим в красной области спектра, NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains (Molecular Probes, США), разведение 1:200. Далее срезы отмывали в растворе PBS и заключали в среду для иммунофлюоресценции VectaShield (Vector Laboratories, США). С целью контроля, для исключения неспецифической реакции, часть срезов инкубировали без первичных антител.

Препараты анализировали под микроскопом Olympus BX43 (Olympus Corporation, Япония), оснащенным соответствующим набором флюоресцентных фильтров-блоков. Изображения получали при помощи охлаждаемой цифровой видеокамеры TCC-5.0ICE (Tucsen, Китай). На срезах с использованием объектива $10 \times / 0,30$ изучали топографические характеристики интернейронов в заднем роге СМ, устанавливая их соответствие пластинам Рекседа [21], конфигурация которых соответствовала верхним грудным сегментам

[23]. Измерение площади сечения всех ИП-нейронов проводили, используя программу Image J (НИН, США) на изображениях срезов, полученных при объективе 20×/0,50. На этих же срезах подсчитывали число ИП-нейронов: в ЧУСН — на площади 0,01 мм²; в дорсальном роге — в каждой пластине серого вещества СМ. Долю ИП-нейронов в ЧУСН определяли как их отношение к общему числу нейронов, которое принимали за 100%. Для характеристики нейронов ЧУСН по площади сечения использовали 5 размерных классов: до 200 мкм² (очень малые), 201–400 мкм² (малые), 401–600 мкм² (средние), 601–800 мкм² (крупные), более 801 мкм² (очень крупные). Анализу подлежали нейроны, срез которых прошел через ядро с видимым ядрышком. Для определения средних арифметических и их стандартных ошибок использовали программу Statistica, версия 10 (StatSoft, Inc., 2011). Для поиска различий средних значений применяли анализ вариаций ANOVA и считали их значимыми при P<0,05.

Результаты исследования. В ЧУСН крыс в обеих группах наблюдения выявлялись КБ-ИП-нейроны и нервные волокна, глиоциты были иммунонегативными. В контроле на всем срезе узла КБ-ИП-нейроны располагались как одиночно, так и образовывали кластеры от 2 до 8 клеток различных размеров (рис. 1, а). Вся популяция КБ-ИП-нейронов имела зеленую флюоресценцию, КБ распределялся в цитоплазме диффузно, в части клеток определялся в ядрах. По распределению продукта реакции всю популяцию КБ-ИП-нейронов можно разделить на 3 субпопуляции: первую — представленную нейронами малых размеров с более интенсивной флюоресценцией в ядре, чем в цитоплазме; вто-

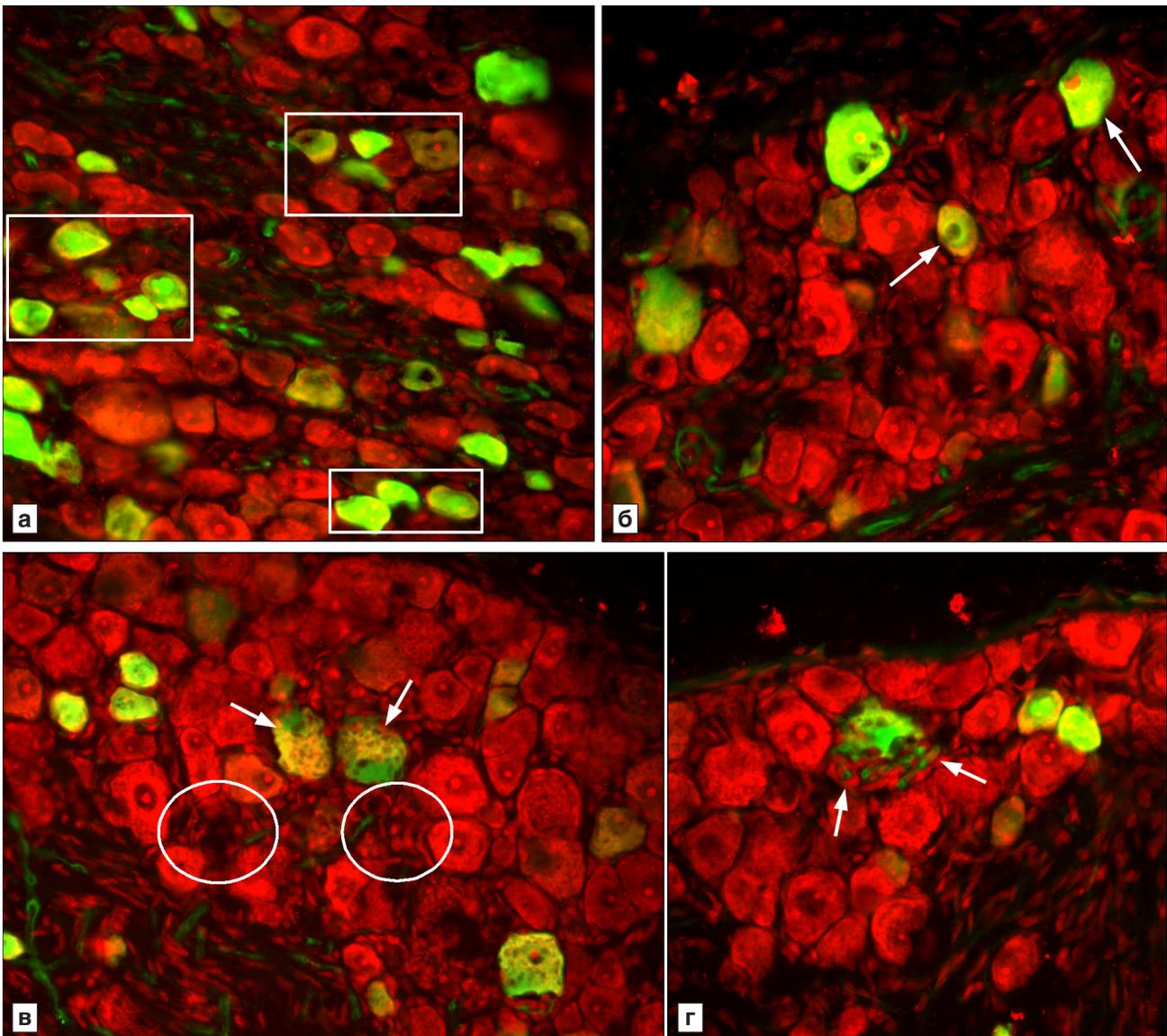


Рис. 1. Кальбиндин-иммунопозитивные (КБ-ИП) нейроны второго грудного чувствительного узла спинномозгового нерва крысы в контроле (а) и после введения капсаицина (б–г).

а — кластеры КБ-ИП-нейронов (заклучены в рамки); б — клетки с измененным ядром (стрелки); в — клетки с измененной нейроплазмой (стрелки) и остаточные узелки от погибших нейронов (обведены кругами); г — клетки с отчетливо выраженной глиальной реакцией, нейрофагией (стрелки). Иммуногистохимическая реакция. а, б — об. 10, ок. 10; в, г — об. 20, ок. 10

Таблица 1

Относительное содержание (ОС) кальбиндин-иммунопозитивных нейронов и площадь их сечения (S) у крыс в контроле и при химической деафферентации капсаицином ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

| Группа животных | ОС, % | S, мкм ² | Доля нейронов различных размерных классов, % | | | | |
|-----------------|-----------|---------------------|----------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | | | 200 мкм ² и менее | 201–400 мкм ² | 401–600 мкм ² | 601–800 мкм ² | Более 801 мкм ² |
| Контрольная | 26±3 | 439±27 | 9,7±0,8 | 45,5±0,6 | 28,3±0,8 | 8,5±0,6 | 8,0±0,4 |
| Подопытная | 10,3±0,6* | 552±33* | 6,0±0,7* | 27,5±0,5* | 35,5±1,0* | 15,3±0,5* | 15,7±0,8* |

* Различия значимы по сравнению с контролем при P<0,05.

рую — нейронами крупных размеров с более интенсивной флюоресценцией в цитоплазме, чем в ядре; третью — нейронами различных размеров с одинаково слабой флюоресценцией в ядре и в цитоплазме. Было обнаружено, что до 30% нейронов ЧУСН содержали КБ. Они были представлены клетками всех размерных классов: от очень малых до очень крупных. Около 50% составляли нейроны малых, около 30% — средних размеров. Остальные нейроны в равных количествах относились к ИП-клеткам очень малых, крупных и очень крупных размеров (табл. 1).

После введения капсаицина в ЧУСН на срезе узла обнаружены как одиночные КБ-ИП-нейроны, так и их кластеры, которые насчитывали по 2 клетки, на 1 срез приходилось 2–3 таких кластера. Практически все КБ-ИП-нейроны узла имели неправильную форму и «ячеистый» вид. В одних клетках изменения касались только ядра (см. рис. 1, б), которое имело полости различных размеров и неровные контуры. В других клетках полости заполняли не только ядро, но и нейроплазму (см. рис. 1, в), перинуклеарная зона отсутствовала. Возле некоторых таких клеток наблюдалась отчетливо выраженная глиальная реакция (см. рис. 1, г), встречались остаточные узелки (см. рис. 1, в). В опыте содержание КБ-ИП-нейронов в ЧУСН уменьшилось на 60%, но средние размеры этой популяции клеток увеличились на 25% по сравнению с контролем (см. табл. 1). Анализ клеточного состава КБ-ИП-нейронов в подопытной группе обнаружил, что популяция состояла из клеток всех размерных классов. Существенная часть нейронов имели малые и средние размеры — по 30%, крупные и очень крупные размеры — по 15%, незначительная оставшаяся часть нейронов узла были очень малых размеров (см. табл. 1). Как видно, проведенная химическая деафферентация изменила распределение размерных групп: в 1,6 раза уменьшилась доля нейронов малых размеров, в 2 раза увеличилась доля нейронов крупных и очень крупных размеров.

В контроле в заднем роге СМ КБ-ИП-интернейроны были выявлены во всех пластинках — с I по V. Интенсивность свечения ИП-интернейронов не менялась в пределах ука-

занных пластинок серого вещества. В пластинках I–II на каждом срезе располагались КБ-ИП-интернейроны, которые имели округлую форму, для них характерным было свечение только клеточных тел (рис. 2, а).

В пластинках III–IV на каждом срезе выявлялись КБ-ИП-вытянутые интернейроны, флюоресценция обнаруживалась и в отростках этих клеток. Тела клеток располагались вдоль дорсовентральной оси, их отростки протяженностью до 20 мкм распространялись в дорсальном и вентральном направлениях. В пластинке V на каждом 4-м срезе выявлялось от 1 до 4 КБ-ИП-интернейронов треугольной и вытянутой формы, расположенных параллельно дорсовентральной оси, флюоресцирующие отростки которых длиной до 10 мкм распространялись в дорсальном направлении, а длиной до 20 мкм — в вентромедиальном направлении. В области всего медиального края (МК) заднего рога СМ на каждом 3-м срезе выявляли 3–4 КБ-ИП-интернейрона круглой и вытянутой формы с более длинными (до 35 мкм) флюоресцирующими отростками, ориентированными в дорсовентральном направлении.

В T_{II} СМ максимальное количество КБ-ИП-интернейронов выявлялось в пластинке II (табл. 2), меньше их было в пластинках I и III–IV — в 3,2 и 2,9 раза соответственно, а минимальное число отмечалось в пластинке V и в области МК, где определялись единичные КБ-ИП-интернейроны. Площадь КБ-содержащих клеток в заднем роге сегмента T_{II} колебалась от 46,2 до 147 мкм² (см. табл. 2). При этом самыми крупными были интернейроны пластинки V, а самыми мелкими — интернейроны пластинки II. Промежуточные размеры имели клетки пластинки III–IV и МК, КБ-ИП-интернейроны пластинки I были больше таковых пластинки II на 18%, но меньше на 26% ИП-клеток пластинок III–IV заднего рога.

После введения капсаицина КБ-ИП-интернейроны выявлялись в аналогичных пластинках заднего рога СМ, флюоресценция в их отростках наблюдалась в пластинках III–IV, V и МК. Характерной структурной особенностью КБ-ИП-интернейронов пластинок I–II было крупное КБ-негативное ядро и наличие узкого ободка цито-

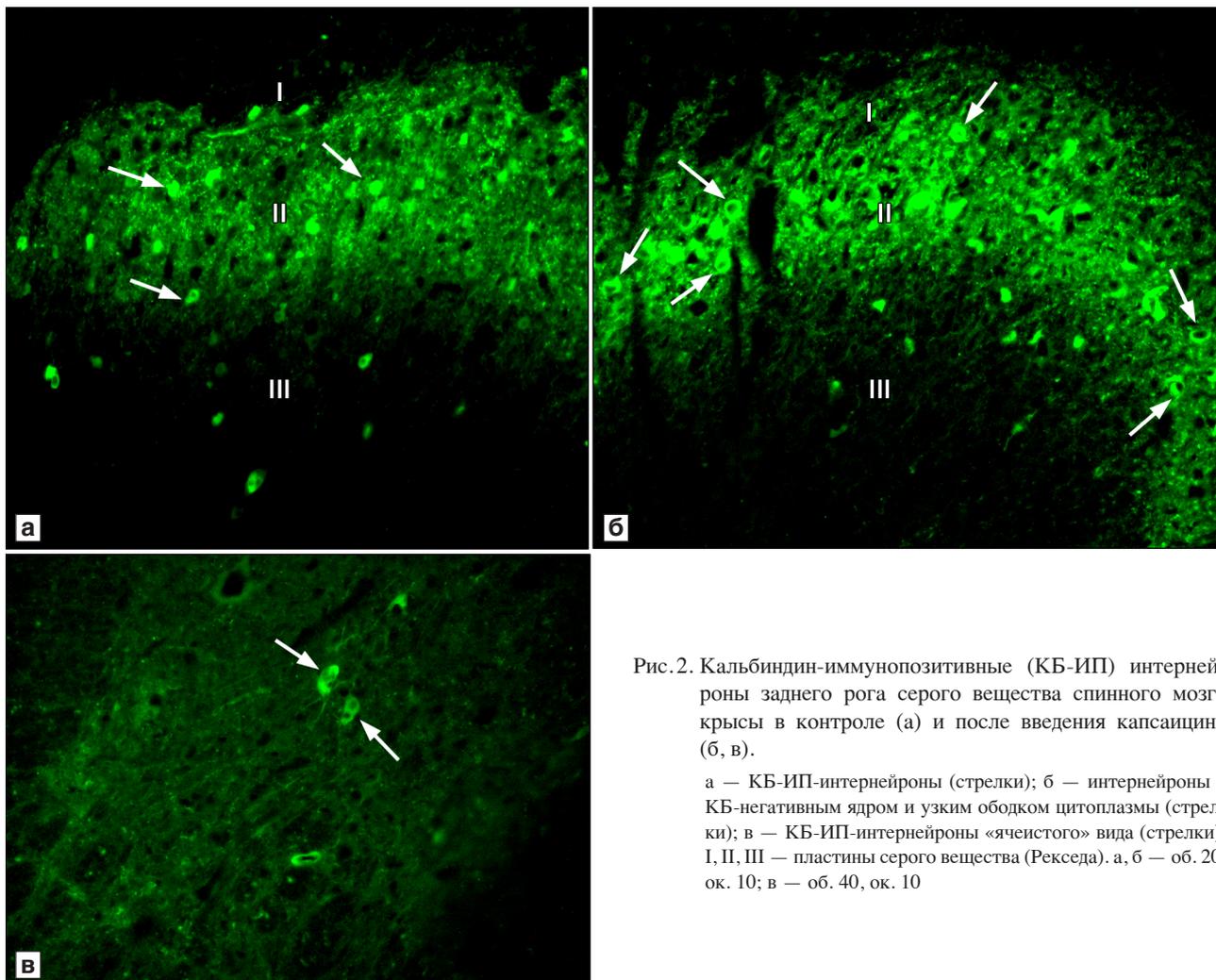


Рис. 2. Кальбиндин-иммунопозитивные (КБ-ИП) интернейроны заднего рога серого вещества спинного мозга крысы в контроле (а) и после введения капсаицина (б, в).

а — КБ-ИП-интернейроны (стрелки); б — интернейроны с КБ-негативным ядром и узким ободком цитоплазмы (стрелки); в — КБ-ИП-интернейроны «ячеистого» вида (стрелки). I, II, III — пластины серого вещества (Рекседа). а, б — об. 20, ок. 10; в — об. 40, ок. 10

плазмы (см. рис. 2, б). В пластине V тела КБ-ИП-интернейронов, имея «ячеистый» вид, содержали различного размера полости, которые были локализованы преимущественно в ядре, в небольшой части клеток — в ядре и в цитоплазме (см. рис. 2, в). В пластинах III–IV и в области МК морфологически измененных КБ-ИП-интернейронов не обнаружено. В опыте в T_{II} СМ максимальное количество КБ-ИП-интернейронов было выяв-

лено также, как и в контроле, в пластине II (см. табл. 2), меньше их было в пластинах I и III–IV (в 2,9 и 2,7 раза соответственно), а минимальное число — в пластине V и области МК, где выявлялись единичные клетки. Площадь КБ-содержащих клеток колебалась в пределах 61,4–187 μm^2 (см. табл. 2). При этом наиболее крупными были интернейроны пластины V, а мелкими — интернейроны пластины II. Промежуточные размеры

Таблица 2

Абсолютное содержание (АС) и площадь (S) кальбиндин-иммунопозитивных интернейронов в заднем роге на срезах спинного мозга ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

| Области серого вещества спинного мозга | Группа животных | | | |
|----------------------------------------|-----------------|--------------------|------------|--------------------|
| | Контрольная | | Подопытная | |
| | АС | S, μm^2 | АС | S, μm^2 |
| Пластины серого вещества: | | | | |
| I | 7,20±0,18 | 54,8±2,5 | 6,60±0,22* | 68±5* |
| II | 23,3±1,1 | 46,2±1,0 | 19,1±1,2* | 61,4±1,7* |
| III–IV | 8,1±0,4 | 74±8 | 6,90±0,17* | 80±6 |
| V | 0,70±0,23 | 147±10 | 0,70±0,24 | 187±11* |
| Медиальный край заднего рога | 1,0±0,27 | 71,4±2,5 | 0,80±0,19 | 78,7±1,8* |

* Различия значимы по сравнению с контролем при $P < 0,05$.

имели клетки пластины III–IV и МК, КБ-ИП-интернейроны пластины I были больше таковых пластины II на 10%, но меньше на 16%, чем пластин III–IV. После введения капсаицина число ИП-клеток уменьшилось в пластинках: I — на 8%, II — на 18%, III–IV — на 15% ($P < 0,05$). Средние размеры ИП-интернейронов, напротив, увеличились практически во всех пластинках СМ, где превышение составило: в I — 23%, во II — 33%, в V — 27%, в области МК — 10%.

Обсуждение полученных данных. В результате проведенного исследования установлено, что у взрослых белых крыс во втором грудном ЧУСН присутствуют нейроны, проявляющие КБ-иммунореактивность и составляющие до 30% нейронов узла, что совпадает с данными других исследований [2, 4, 15]. Указанная популяция представлена нейронами всех размерных классов, от очень мелких до очень крупных, более 50% этих ИП-нейронов имеют малые (201–400 мкм²) и средние (401–600 мкм²) размеры. Размеры КБ-ИП-нейронов ЧУСН связывают с выполняемой ими ноцицептивной функцией [10, 24], о чем свидетельствует присутствие КБ в мелких пептидергических нейронах [26]. В мелких нейронах, содержащих TRPV1, КБ участвует в хемосенсорных функциях [12]. В сером веществе заднего рога СМ КБ-ИП-интернейроны располагаются во всех его пластинках, более плотно в пластинке II, что согласуется с данными других исследователей [4, 14]. Самыми мелкими КБ-ИП-интернейронами являются клетки пластины II — их средние размеры не превышают 50 мкм², самыми крупными — площадью более 100 мкм² — интернейроны пластины V.

Введение капсаицина, агониста TRPV1-рецепторов, вызывает уменьшение доли КБ-ИП-нейронов как в ЧУСН — на 60%, так и в пластинках заднего рога I–II–III — на 8, 18, 15% соответственно. При этом, средняя площадь сечения КБ-содержащих нейронов, напротив, увеличивается за счет внутриклеточного отека: окраска по Нисслю позволила обнаружить после введения капсаицина центральный хроматолиз, вакуолизацию ядра и цитоплазмы, свидетельствующие о гидропической дистрофии нейронов ЧУСН и заднего рога. О необратимости выявленных изменений свидетельствуют деформация ядра, лизис ядрышка, уменьшение числа КБ-содержащих нейронов, признаки нейронофагии с образованием остаточных узелков на месте погибших клеток.

Как и другие исследования [3, 25], результаты проведенной работы свидетельствуют о том, что после введения капсаицина в ЧУСН происходит гибель нейронов независимо от их разме-

ров, механизм его повреждающего действия связан с внутриклеточным накоплением ионов кальция, следствием чего являются развитие отека и последующая деструкция клеток. Вовлечение интернейронов I, II и V пластинок заднего рога в деструктивный процесс, возможно, объясняется прекращением передачи информации с первичных чувствительных нейронов [27]. В результате отсутствия ноцицептивной афферентации развивается состояние, при котором интернейроны заднего рога СМ воспринимают неболевые стимулы как ноцицептивные. Это ведет к формированию центральной гиперчувствительности (гиперальгезия) интернейронов заднего рога СМ [6, 24], которая поддерживается длительной активацией интернейронов заднего рога, особенно пластинок I, II и V, с выделением глутамата, что вызывает чрезмерное накопление в постсинаптическом нейроне ионов кальция, оказывая нейротоксическое действие [20].

Итак, в результате деафферентации развиваются однотипные морфометрические и структурные изменения КБ-ИП-нейронов как в ЧУСН, так и в заднем роге серого вещества СМ.

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. Маслюков П. М., Порсева В. В., Корзина М. Б. и Ноздрачев А. Д. Нейрохимические особенности сенсорных нейронов в онтогенезе. *Росс. физиол. журн.*, 2013, т. 99, № 7, с. 777–792.
3. Порсева В. В., Шилкин В. В., Корзина М. Б. и др. Особенности возрастных изменений НФ200⁺-нейронов чувствительных узлов различных сегментарных уровней при химической деафферентации. *Морфология*, 2012, т. 142, вып. 4, с. 37–42.
4. Antal M., Freund T. F. and Polgár E. Calcium-binding proteins, parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and dorsal root ganglia: a light and electron microscopic study. *Comp. Neurol.*, 1990, v. 295, № 3, p. 467–484.
5. Brouns I., Van Genechten J., Hayashi H. et al. Dual sensory innervation of pulmonary neuroepithelial bodies. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2003, v. 28, № 3, p. 275–285.
6. Chen J. H., Weng H. R. and Dougherty P. M. Sensitization of dorsal root reflexes in vitro and hyperalgesia in neonatal rats produced by capsaicin. *Neuroscience*, 2004, v. 126, № 3, p. 743–751.
7. Donnerer J., Liebmann I. and Schicho R. Differential regulation of 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase and vanilloid receptor TRPV1 mRNA in sensory neurons by capsaicin and NGF. *Pharmacology*, 2005, v. 73, № 2, p. 97–101.
8. Fuchs A., Lirk P., Stucky C. et al. Painful nerve injury decreased resting cytosolic calcium concentrations in sensory neurons of rats. *Anesthesiology*, 2005, v. 102, № 6, p. 1217–1225.

9. Gibbons S.J., Brorson J.R., Bleakman D. et al. Calcium influx and neurodegeneration. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1993, v. 679, p. 22–33.
10. Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachikinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience*, 1988, v. 24, № 3, p. 739–768.
11. Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.*, 1991, v. 43, p. 143–201.
12. Ichikawa H. and Sugimoto T. Co-expression of VRL-1 and calbindin D-28k in the rat sensory ganglia. *Brain Res.*, 2002, v. 924, № 1, p. 109–112.
13. Jin H.W., Ichikawa H., Fujita M. et al. Involvement of caspase cascade in capsaicin-induced apoptosis of dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.*, 2005, v. 1056, № 2, p. 139–146.
14. Kim J.J., Chang I.Y., Chung Y.Y. et al. Immunohistochemical studies on the calbindin D-28K and parvalbumin positive neurons in the brain stem and spinal cord after transection of spinal cord of rats. *Korean J. Phys. Anthropol.*, 2002, v. 15, № 4, p. 305–329.
15. Li Y.N., Li Y.C., Kuramoto H. et al. 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.*, 2007, v. 59, № 3, p. 304–308.
16. Lu E., Llano D.A. and Sherman S.M. Different distributions of calbindin and calcitonin immunostaining across the medial and dorsal divisions of the mouse medial geniculate body. *Hearing Res.*, 2009, v. 257, p. 16–23.
17. Ma Q.P. Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats. *Neurosci. Lett.*, 2002, v. 319, p. 87–90.
18. Neher E. Details of Ca²⁺ dynamics matter. *Physiology*, 2008, v. 586, p. 2031.
19. Piper A.S. and Docherty R.J. One-way cross-desensitization between P2X purinoceptors and vanilloid receptors in adult rat dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol.*, 2000, v. 15, № 523, p. 685–696.
20. 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, v. 592, № 4, p. 759–776.
21. Rexed B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord of the cat. *J. Comp. Neurol.*, 1952, v. 96, p. 415–495.
22. Schwaller B. The continuing disappearance of «pure» Ca²⁺ buffers. *Cell Mol. Life Sci.*, 2009, v. 66, p. 275–300.
23. Steiner T.J. and Turner L.M. Cytoarchitecture of the rat spinal cord. *J. Physiol.*, 1972, v. 222, p. 123–125.
24. Szallasi A. and Blumberg P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.*, 1999, v. 51, № 2, p. 159–211.
25. Torsney C., Meredith-Middleton J. and Fitzgerald M. Neonatal capsaicin treatment prevents the normal postnatal withdrawal of A fibres from lamina II without affecting fos responses to innocuous peripheral stimulation. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 2000, v. 11, v. 121, № 1, p. 55–65.
26. Yoshida S., Senba E., Kubota Y. et al. Calcium-binding proteins calbindin and parvalbumin in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience*, 1990, v. 37, № 3, p. 839–848.
27. Zheng J., Lu Y. and Perl E.R. Inhibitory neurones of the spinal substantia gelatinosa mediate interaction of signals from primary afferents. *J. Physiol.*, 2010, v. 588, p. 2065–2075.

Поступила в редакцию 21.05.2014
Получена после доработки 22.07.2014

CHANGES IN CALBINDIN-CONTAINING NEURONS IN THE POSTERIOR HORNS OF THE GRAY MATTER OF THE SPINAL CORD AND IN THE SENSORY GANGLION OF THE SPINAL NERVE IN ALBINO RAT AFTER SENSORY DEPRIVATION

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

An immunohistochemical method was used to study the effect of capsaicin treatment on morphometric and structural characteristics of neurons containing 28 kDa calbindin (CAB) in the posterior horns of the spinal cord (SC) gray matter T_{II} segment and in the sensory ganglion of the second thoracic spinal nerve (SGSN) in Wistar rats (n=4). Capsaicin was administered to adult animals 3 times with an interval of 24 hrs, in a total dose of 125 mg/kg, the material was taken on the 14th day. The administration of capsaicin caused a decrease in the proportion of CAB-immunopositive (CAB-IP) neurons in SGSN (by 60%) and in dorsal horn laminae I–II–III (by 8, 18 and 15%, respectively), while the average size of CAB-IP neurons increased due to intracellular edema. As a result of deafferentation, similar morphometric and structural changes of CAB-IP neurons developed in both SGSN and posterior horn of SC gray matter, which were manifested by the central chromatolysis, vacuolation of nucleus and cytoplasm indicative of hydropic dystrophy. The irreversibility of the changes observed in the neurons of SGSN and SC dorsal horn laminae I, II and V was supported by the observations of their nuclear deformation, lysis of nucleolus, reduction of the number of CAB-containing neurons, signs of neuronophagia with the formation of residual nodules in place of the dead cells.

Key words: *spinal cord, dorsal horn, spinal ganglion, neurons, calbindin*

Department of Normal Physiology with Biophysics, Yaroslavl State Medical Academy