

Порсева В. В.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СУБПОПУЛЯЦИЙ СПИНАЛЬНЫХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ КАЛЬБИДИН, У РАЗНЫХ ВИДОВ ГРЫЗУНОВ

Ярославская государственная медицинская академия, Россия

Среди факторов, регулирующих функционирование клетки и ее пластичность, важное значение играет поддержание определенной концентрации Ca^{2+} , и значимая роль в этом отводится внутриклеточным Са-связывающим белкам (Schwaller, 2012). Показано, что спинальные интернейроны проявляют иммунореактивность к большому количеству этих белков: кальбиндину, кальмодулину, парвальбумину, кальретинину (Antal et al., 1991; Li et al., 2005). В настоящее время, с учетом выявления химической гетерогенности интернейронов, широко дискутируется как общая морфология клеточного состава пластин спинного мозга, так и их видовые особенности.

В связи с этим, **целью** данного исследования явилось изучение морфологических, топографических, морфометрических характеристик интернейронов дорзального рога спинного мозга, иммунореактивных к белку кальбиндину 28 кДа (calbindin 28 kDa) у разных видов грызунов.

Материалы и методы

Исследование проведено на спинном мозге от 4 линейных мышей C57black/6 массой 20 ± 5 г (питомник ФИБХ, г. Пущино) и 4 белых крыс-самок линии Вистар массой 190–210 г. Спинной мозг фиксировали в 4 % растворе параформальдегида на 0,1 М фосфатном буфере в течение 2 часов при 4 °С, после чего промывали трехкратно в растворе фосфатно-солевого буфера (PBS; 0,01 М, рН 7,4) (БиолоТ, Россия) в течение 30 минут и оставляли в 30 % растворе сахарозы на 24 часа при 4 °С. Из фиксированного спинного мозга (СМ) выделяли четвертый поясничный сегмент (L4) сегмент, который замораживали в криогеле (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura Finetek, Нидерланды). Из выделенного сегмента изготавливали поперечные серийные срезы толщиной 16 мкм на криостате (Shandon E, Thermo Scientific, Великобритания). Выявление интернейронов, иммунореактивных (ИР) к белку кальбиндину (КАБ) проводили по ранее описанной методике с использованием меченых антител (Маслюков и др., 2012). Для выявления КАБ использовались первичные антитела (Abcam, США, разведение 1:500), вторичные антитела были конъюгированы с флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC, Jackson, США), флюоресцирующем в зеленой области спектра. Мечение всей популяции нейронов по Ниссля производили с помощью красителя, флюоресцирующего в красной области спектра (NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains, Molecular Probes, США). После чего срезы отмывали в фосфатно-солевом

растворе (PBS) и заключали в среду для иммунофлюоресценции (VectaShield, Vector Laboratories, США).

Препараты анализировали на флюоресцентном микроскопе ЛОМО Микмед 2, вариант 12 (С-Петербург, Россия), оснащенном соответствующим набором светофильтров, объективом с увеличением 20× и цифровой видео-камерой MDC320 (ScoreTec, Китай). Для выявления ИР интернейронов использовали 10 срезов сегмента СМ одного животного, которые подвергались качественному анализу. На трех-четырех срезах проводили подсчет всех ИР интернейронов, срез которых прошел через ядро и с помощью программы Image J (НИН, США) измеряли площадь их сечения. Устанавливали соответствие ИР интернейронов пластинам Рекседа (Steiner, Turner, 1972). Для определения средних арифметических и их стандартных ошибок использовали программу Statistica, версия 10 (StatSoft, Inc., 2011). Учитывая, что полученные выборки были разного объема, для детального поиска различий между переменными в исследовании применяли анализ вариаций ANOVA и критерий Тьюки Post-hoc анализа.

Результаты и обсуждение

Как у мыши, так и у крысы в дорзальном роге L4 СМ интернейроны с КАБ выявлялись в пластинах I–IV серого вещества. В пластинах I–II ИР интернейроны имели округлую и веретеновидную форму, КАБ содержался исключительно в клеточных телах, отростки были иммунонегативными. В данных пластинах большая часть ИР интернейронов у мыши была представлена клетками веретеновидной формы, в отличие от крысы, где преобладали клетки округлой формы. В пластинах III–IV КАБ ИР интернейроны имели только веретеновидную форму у обоих видов животных, а флюоресценцией обладали как тела, так и отростки клеток, которые имели дорзо-вентромедиальное направление с максимальной длиной отростков, ориентированных к пластине II, то есть дорзально. Учитывая структурное сходство интернейронов пластины III с пластиной IV, данные субпопуляции были объединены в одну, что совпало с данными других исследований (Antal et al., 1991; Bhimaidevi et al., 2012). По краевой области медиального отдела дорзального рога (МК) выявлялись КАБ ИР интернейроны преимущественно веретеновидной формы у мыши и соответственно округлой формы у крысы с очень длинными флюоресцирующими отростками, которые были направлены дорзально с ориентацией к маргинальной области (пластина I) и вентромедиально — ориентированы к области центрального канала (пластина X). При этом, в области МК дорзального рога, где фактически расположены все четыре пластины, выявляется особая субпопуляция КАБ ИР интернейронов, отличающаяся по структурным параметрам от субпопуляций КАБ ИР интернейронов всех этих пластин. Максимальные диаметры тел ИР интернейронов были ориентированы по дорзовентральной оси в пластинах I–II и дорзо-вентромедиальной оси в пластинах III–IV и по МК у обоих видов животных.

Подсчет КАБ ИР интернейронов показал, что максимальное количество клеток выявлялось в пластине II (табл.) как у мыши, так и у крысы. В пластине I ИР интернейронов было значимо меньше у обоих видов животных — в 2,6 раза у мыши и в 4,4 раза у крысы, но большее количество ИР клеток в этой пластине также наблюдалось у мыши. В пластинах III–IV у мыши выявлялось минималь-

ное количество ИР интернейронов, сопоставимое с числом интернейронов в пластине I, III–IV и области МК дорзального рога СМ крысы. При этом у крысы в области МК число интернейронов было значимо меньше их количества в области МК у мыши. Средние площади сечения ИР интернейронов в дорзальном роге у мышей составили от 52,7 до 91,7 мкм², у крыс — от 53,9 до 119,8 мкм² (табл.). На срезе СМ в L4 самыми крупными у обоих видов животных являлись клетки пластин III–IV. При этом средняя площадь сечения крупных КАБ ИР интернейронов у крыс была больше, чем в аналогичных пластине мышей на 30 % ($p < 0,05$). У крысы выявлялись крупные клетки и в области МК — средний показатель превышал 100 мкм², в отличие от мышей, где это значение было минимальным в пределах сегмента. Самые малые средние размеры у крысы имели ИР интернейроны пластины II, которые не отличались от таковых у мыши. В пластине I КАБ интернейроны СМ имели промежуточные размеры в группах обоих видов животных.

Таблица

Области серого вещества СМ	Мышь		Крыса	
	количество	площадь	количество	площадь
Lamina I	15,7 ± 0,51°	77,1 ± 4,39°	7,3 ± 0,37*	70,5 ± 4,93°
Lamina II	40,4 ± 0,68°	54,0 ± 1,04	32,0 ± 1,35°*	53,9 ± 1,48°
Lamina III–IV	6,2 ± 0,28°	91,7 ± 3,62°	7,8 ± 0,55*	119,8 ± 6,45°*
МК	9,5 ± 0,57°	52,7 ± 2,09	7,1 ± 0,34*	100,9 ± 4,78°*

° $p < 0,05$, различия достоверны внутри сегмента; * $p < 0,05$, различия достоверны между животными.

Выводы:

1. На уровне L4 интернейроны с КАБ располагаются в аналогичных областях серого вещества дорзального рога СМ у обоих видов животных, которые включают пластины I, II, III–IV и медиальный край. Выявляемые различные типы КАБ ИР интернейронов, являются специфичными для каждой пластины, но однообразны у обоих видов грызунов.

2. Независимо от принадлежности к виду, максимальное количество КАБ-ИР интернейронов располагается в пластине II. Межвидовые различия заключаются в большем количественном представительстве КАБ-ИР интернейронов в пластине I и в области МК у мыши и большей площади интернейронов пластин III–IV и МК дорзального рога СМ крысы.

3. Самыми крупными у обоих видов грызунов являются КАБ ИР интернейроны пластины III–IV, мелкими — пластины II.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Возрастное развитие кальбиндин-иммунопозитивных нейронов симпатических узлов крысы* / П. М. Маслюков [и др.] // Морфология. 2012. № 141(1). С. 77–80.
2. *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* / M. Antal [et al.] // Comp. Neurol. 1991. № 314. P. 114–124.
3. *Histogenesis of nucleus proprius of lumbar spinal cord of fullterm human foetus* / N. Bhimaidevi [et al.] // Biol. Med. Res. 2012. № 3(2). P. 1506–1508.

4. *An immunocytochemical study of calbindin-D28K in laminae I and II of the dorsal horn and spinal ganglia in the chicken with special reference to the relation to substance P-containing primary afferent neurons / Y. N. Li [et al.] // Arch. Histol. Cytol. 2005. № 68(1). P. 57–70.*
5. *Schwaller, B. The use of transgenic mouse models to reveal the functions of Ca²⁺ buffer proteins in excitable cells / B. Schwaller // Biochim. Biophys. Acta. 2012. № 1820. P. 1294–1303.*
6. *Steiner, T. J. Cytoarchitecture of the rat spinal cord / T. J. Steiner, L. M. Turner // Physiology. 1972. № 222. P. 123–125.*