

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ярославский государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Порсева Валентина Вячеславовна

**НЕЙРОННЫЙ СОСТАВ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА СПИННОГО МОЗГА И
СПИННОМОЗГОВОГО УЗЛА: СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ
ОСОБЕННОСТИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология
03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научные консультанты:
доктор медицинских наук, профессор
П.М. Маслюков
академик РАН, профессор
А.Д. Ноздрачев

Ярославль

2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	7
Глава 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	21
1.1. Выбор возрастных групп исследования	21
1.2. Объекты исследования и выбор сегментарного уровня.....	22
1.3. Номенклатура структур серого вещества спинного мозга.....	24
1.5. Методы исследования.....	25
1.5.1. Выделение сегмента спинного мозга и спинномозгового узла	25
1.5.2. Приготовление гистологических срезов.....	26
1.5.3. Метод гистологического исследования.....	27
1.5.4. Методы гистохимического исследования.....	27
1.5.5. Методы иммуногистохимического исследования.....	28
1.5.6. Визуализационные методы исследования.....	30
1.5.7. Анализ гистологических срезов под объективом микроскопа.....	32
1.5.8. Нейрохимическая идентификация нейрональных структур.....	34
1.5.9. Нейроморфологический анализ.....	36
1.5.10. Статистическая обработка результатов	37
Глава 2. СЕРОЕ ВЕЩЕСТВО СПИННОГО МОЗГА	39
2.1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	39
2.1.1. Сегментарная организация спинного мозга.....	39
2.1.2. Ядерная организация грудной части спинного мозга.....	42
2.1.3. Пластинчатая организация грудной части спинного мозга.....	47
2.1.4. Цито- и дендроархитектоника пластинок спинного мозга.....	51
2.1.5. Развитие серого вещества спинного мозга в пренатальном онтогенезе	59
2.1.6. Развитие серого вещества спинного мозга в постнатальном онтогенезе.....	62

2.2.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	66
2.2.1.	СЕРОЕ ВЕЩЕСТВО ГРУДНОГО СПИННОГО МОЗГА У ВЗРОСЛОЙ КРЫСЫ.....	66
2.2.1.1.	Анализ пластинок дорсального рога спинного мозга.....	69
2.2.1.2.	Анализ пластинки VII промежуточной зоны спинного мозга.....	74
2.2.1.3.	Анализ пластинок вентрального рога спинного мозга.....	75
2.2.1.4.	Анализ поля X спинного мозга.....	76
2.2.1.5.	Гистопография ядер спинного мозга.....	79
2.2.1.6.	Заключительные замечания.....	82
2.2.2.	ОСОБЕННОСТИ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА ГРУДНОГО СПИННОГО МОЗГА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫСЫ.....	86
2.2.2.1.	Возрастные особенности пластинок дорсального рога спинного мозга.....	94
2.2.2.2.	Возрастные особенности пластинки VII спинного мозга.....	101
2.2.2.3.	Возрастные особенности пластинок вентрального рога спинного мозга.....	102
2.2.2.4.	Формирование поля X спинного мозга.....	104
2.2.2.5.	Постнатальная перестройка ядер спинного мозга.....	106
2.2.2.6.	Заключительные замечания.....	110
Глава 3. НЕЙРОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА СПИННОГО МОЗГА.....		113
3.1.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	113
3.1.1.	Вставочные и проекционные нейроны.....	113
3.1.2.	Морфометрия спинальных нейронов.....	115
3.1.3.	Аксональные проекции спинальных нейронов.....	119
3.1.4.	Спинальные входы и проекции афферентных нейронов.....	124
3.1.5.	Структурно-функциональные изменения спинальных нейронов в постнатальном онтогенезе.....	130

3.2.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	136
3.2.1.	НЕЙРОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА ГРУДНОГО СПИННОГО МОЗГА У ВЗРОСЛОЙ КРЫСЫ...136	
3.2.1.1.	Нейрональный состав пластинок дорсального рога спинного мозга.....	136
3.2.1.2.	Нейрональный состав пластинки VII промежуточной зоны спинного мозга.....	146
3.2.1.3.	Нейрональный состав пластинок вентрального рога спинного мозга.....	148
3.2.1.4.	Нейрональный состав поля X спинного мозга.....	153
3.2.1.5.	Нейрональный состав ядер спинного мозга.....	156
3.2.1.6.	Заключительные замечания.....	159
3.2.2.	ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА ГРУДНОГО СПИННОГО МОЗГА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫСЫ.....	165
3.2.2.1.	Возрастные особенности нейронального состава пластинок дорсального рога спинного мозга.....	165
3.2.2.2.	Возрастные особенности нейронального состава пластинки VII спинного мозга.....	172
3.2.2.3.	Возрастные особенности нейронального состава пластинок вентрального рога спинного мозга.....	174
3.2.2.4.	Возрастные особенности нейронального состава структур поля X спинного мозга.....	176
3.2.2.5.	Возрастные особенности нейронального состава ядер спинного мозга.....	180
3.2.2.6.	Заключительные замечания.....	183
Глава 4. НЕЙРОХИМИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА СПИННОГО МОЗГА.....		189
4.1.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	189
4.1.1.	Дифференциация спинальных нейронов в пренатальном онтогенезе.....	189
4.1.2.	Изменения нейрохимических характеристик нейронов спинного мозга в онтогенезе.....	192
4.1.3.	Физиологическая роль отдельных трансммиттеров в спинном мозге.....	197

4.1.3.1. Ацетилхолин: ацетилхолинэстераза (АХЭ), холинацетилтрансфераза (ХАТ), везикулярный переносчик ацетилхолина (ВПА).....	198
4.1.3.2. TRPV1, transient receptor potential vanilloid 1.....	204
4.1.3.3. Вещество Р и кальцитонин ген-родственный пептид.....	205
4.1.3.4. Белки нейрофиламентов.....	207
4.1.3.5. Кальций-связывающие белки: кальбиндин 28 кДа, кальретинин, парвальбумин.....	209
4.1.3.6. Оксид азота – газ, низкомолекулярный липидо- и водорастворимый нейромедиатор, NO-синтаза, НАДФН-диафораза.....	214
4.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	218
4.2.1. НЕЙРОХИМИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА ГРУДНОГО СПИННОГО МОЗГА У ВЗРОСЛОЙ КРЫСЫ	218
4.2.1.1. ХАТ-иммунопозитивные структуры серого вещества спинного мозга.....	218
4.2.1.2. Структуры серого вещества спинного мозга, содержащие TRPV1, вещество Р и кальцитонин-ген-родственный пептид.....	225
4.2.1.3. Иммунореактивность структур серого вещества спинного мозга к высокомолекулярному белку нейрофиламентов.....	227
4.2.1.4. Распределение кальбиндина 28 кДа в сером веществе спинного мозга.....	239
4.2.1.5. Распределение нейрональной NO-синтазы в сером веществе спинного мозга.....	251
4.2.1.6. Распределение НАДФН-диафоразы в сером веществе спинного мозга.....	256
4.2.1.7. Заключительные замечания.....	265
4.2.2. ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОХИМИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА ГРУДНОГО СПИННОГО МОЗГА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫСЫ.....	269
4.2.2.1. Возрастные особенности распределения холинацетилтрансферазы в сером веществе спинного мозга.....	269

4.2.2.2. Возрастные особенности распределения TRPV1, вещества Р и кальцитонин-ген-родственного пептида в сером веществе спинного мозга.....	274
4.2.2.3. Возрастные особенности распределения высокомолекулярного белка нейрофиламентов в сером веществе спинного мозга.....	275
4.2.2.4. Возрастные особенности распределения кальбиндина 28 кДа в сером веществе спинного мозга.....	281
4.2.2.5. Возрастные особенности распределения нейрональной NO-синтазы в сером веществе спинного мозга.....	285
4.2.2.6. Возрастные особенности распределения НАДФН-диафоразы в сером веществе спинного мозга.....	287
4.2.2.7. Заключительные замечания.....	290
Глава 5. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СПИНОМОЗГОВОГО УЗЛА.....	294
5.1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	294
5.1.1. Нейрохимическое разнообразие сенсорных нейронов.....	294
5.1.2. Развитие сенсорных нейронов в пре- и постнатальном онтогенезе.....	304
5.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	310
5.2.1. Нейрональный состав спинномозгового узла у взрослой крысы.....	310
5.2.2. Особенности нейронального состава спинномозгового узла в постнатальном онтогенезе крысы.....	333
5.2.3. Сегментарные особенности нейронального состава спинномозговых узлов в постнатальном онтогенезе.....	352
5.2.4. Заключительные замечания.....	356
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	363
ВЫВОДЫ.....	379
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	384
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	438

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Интегративная деятельность центральной нервной системы представляет собой многоуровневый контроль, направленный на достижение результата, адекватного действующему раздражителю и потребностям самого организма. На спинальном уровне попытки интеграции морфологических и функциональных данных ограничены либо представлениями о связи моторных структур спинного мозга с реализацией движений (Исламов и др., 2013; Григорьев, Зефирова, 2016; Тяпкина и др., 2016; Miles et al., 2007; Stepien et al., 2010; Levine et al., 2014), то есть локомоторной функции, либо представлениями о связи сенсорных структур с обработкой входящей информации (Сотников, 2008; Гилерович и др., 2009; Петрова и др. 2012; Аданина, Веселкин, 2017; Ghamdi et al., 2009; Ruscheweyh et al., 2011). В тоже время, функциональная значимость представительства различных нейронов в спинном мозге имеет дорсовентральную, медиолатеральную и ростокаудальную пространственную организацию, состоящую из пластинок и сегментов (Яценко, Лютикова, 2012; Сокульский, 2014; Klop et al., 2005; Calka et al., 2008; Bruska et al., 2010; Pytel et al., 2011; Beliez et al., 2015). Результаты работ по исследованию спинного мозга показывают противоречивость и неопределенность протяженности ядер в столбах, топографии нейронов в пластинках серого вещества (Маслюков, 2004; Меркульева и др., 2016; Grant, Koerber, 2004; Freire et al., 2008; Sengul et al., 2012; Beliez et al., 2015). Однако, на протяжении спинного мозга четко прослеживается специфика строения серого вещества, зависящая от отдела и сегмента спинного мозга. Без термина сегмент невозможно говорить ни о конкретном строении серого вещества спинного мозга, ни об особенностях его строения на различных уровнях, ни о сегментарных закономерностях иннервации органов и областей тела человека, ни об уровне и характере патологических процессов в спинном мозге.

Нейрональный состав серого вещества спинного мозга, очевидно, отражает функционально согласованные объединения клеток, которые могут быть

идентифицированы морфологически как конкретные клеточные популяции, наиболее многочисленными из которых являются интернейроны, играющие ведущую роль в реализации функций нейронных сетей спинного мозга. В связи с этим представляется важным изучение клеточного состава серого вещества спинного мозга в постнатальном периоде онтогенеза.

В настоящее время первостепенное значение придается изучению особенностей нейротрансмиттеров в различном возрасте постнатального онтогенеза, что может способствовать выявлению характера обменных процессов в нейроне и возможностей адекватной его реакции на меняющиеся условия существования (Петрова, Отеллин, 2004; Обухов и др., 2011; Шабанов и др., 2012; Писалева, 2013; Маслюков и др., 2014; Григорьев, Зефилов, 2015; Колос, Коржевский, 2015; Дробленков и др., 2016; Volekova et al., 2011; Hori et al., 2012; Momose-Sato, Sato, 2013; Moiseev et al., 2019). Накопленные к настоящему времени данные, позволяют весьма условно представить топографию в сером веществе спинного мозга нейронов и их окончаний, содержащих медиаторы и их предшественники, ферменты, белки. При этом, чаще всего констатируется какая-либо область или ядро, где локализуются клетки, содержащие тот или иной маркер, без учета анализа всех структурно-функциональных зон его серого вещества.

В последние годы большое внимание уделяется выявлению структурно-функциональных характеристик нейронов спинного мозга, гетерогенность которых выходит далеко за рамки сложившихся представлений об их делении на пучковые (проекционные) и собственные. Интернейроны промежуточной зоны серого вещества преимущественно выполняют связующую функцию, как внутрисегментарную, так и межсегментарную, благодаря ипси- и контрлатеральным соединениям, а также соединениям между интернейронами дорсальных рогов и мотонейронами вентральных рогов спинного мозга (Гилерович и др., 2007; Jankowska et al., 2009; Miles et al., 2007; Stepien et al., 2010; Skup et al., 2012). Представления о том, как эти нейрональные соединения организованы и по какому принципу происходят взаимодействия между

нейронами, до сих пор ограничены. Так, если есть прямые контакты между волокнами первичных афферентов и интернейронами (Ghamdi et al., 2009; Fenselau et al., 2011; Ruscheweyh et al., 2011), то есть такие же контакты между волокнами первичных афферентов и проекционными нейронами (Grudt, Perl, 2002; Polgár et al., 2008; Todd, 2010).

Общая характеристика всех интернейронов спинного мозга, изученных на сегодняшний день, заключается в том, что они получают комплексный мультисенсорный вход от афферентов различных типов и различного происхождения (Гилерович и др. 2009; Almarestani et al., 2007; Miles et al., 2007; Liu et al., 2010; Ruscheweyh et al., 2011; Levine et al., 2014). Функциональная организация спинного мозга активно обсуждается, а структурная организация серого вещества спинного мозга с точки зрения функциональных связей не имеет морфологического подкрепления. Связь структурных и функциональных особенностей нейронов позволит осмыслить имеющееся разнообразие спинальных нейронов и учитывать изменения нейронального состава серого вещества при различных патологических процессах. Исследование структурно-функциональной организации спинного мозга диктуется требованиями нейрофизиологии, неврологии, нейрохирургии, с позиций изменения различных структур – исполнителей функций (клеток, органов, систем) (Веселкин, Наточин, 2010), что составляет обширный класс патологии, определяемый как болезни нервной регуляции (Крыжановский, 1997; Одинак и др., 2009; Цыган, 2013; Корнева, 2016; Чумасов и др. 2018; Белокоскова, Цикунов, 2018).

Данные литературы свидетельствуют о сложной организации спинномозгового узла как афферентного центра, его разнообразных связях, наличии специфических возрастных и сегментарных особенностей нейрохимической организации (Мотавкин, Охотин, 1983; Ковригина, Филимонов, 1998; Золотарев, Ноздрачев, 2001; Рагинов, Челышев, 2003; Коржевский и др., 2010; Петрова и др., 2012; Маслюков и др., 2014; Колос, Коржевский, 2016; Liu, Ma, 2011; Ladd et al., 2012; Lloyd, 2013; Medici, Shortlan, 2015; De Moraes et al., 2017).

Сопоставление функциональных с морфологическими и изначальными нейрохимическими характеристиками может оказаться перспективным для идентификации топографии и структурно-морфофункциональных свойств нейронов спинного мозга и чувствительных узлов в их постнатальном развитии. Этапы развития определенных функций определяются пластичностью развивающейся нервной системы (Одинцова, Слуцкая, 2009; Раевский, 2011; Сотников, 2013; Бажанова и др. 2016; Мухин и др., 2017; Fitzgerald, Jennings, 1999; Fiumelli, Woodin, 2007; Wilhelm et al., 2009; Pytel et al., 2011; Punnakkal et al., 2014). Знание о точных временных периодах онтогенеза во время развития спинного мозга прольет свет на механизмы, играющие роль в определении последствий при поражениях структур, происходящих в определенный временной промежуток онтогенеза.

Степень разработанности темы исследования

Современные представления о строении серого вещества спинного мозга у млекопитающих основываются на изучении различных животных (Яценко, Лютикова, 2012; Сокульский и др., 2014; Фасахутдинова и др., 2015; Molander et al., 1984, 1989; Schoenen, Faull, 2004; Calka et al., 2008; Heise, Kayalioglu, 2009; Torres-da-Silva et al., 2016). Критерии определения границ пластинок и ядер серого вещества усложняются выявленной уровневой (сегменты), возрастной, половой и видовой специфичностью (Пивченко, 1993; Меркульева и др., 2016; Nogradi, Vrbova, 2006; Freire et al., 2008; Sengul et al., 2013; Beliez et al., 2015). Учение о строении серого вещества спинного мозга имеет свои неопределенности, противоречия и условности, число которых увеличивается при изучении формы и размера тел нервных клеток. В литературе чаще встречается их качественная характеристика: мелкие - крупные, крупнее – мельче (Ahn et al., 2006; Freire et al., 2008; Pawlowski et al., 2013). Иногда приводятся размеры конкретных нейронов (Гилерович и др., 2007; Polgár et al., 2008; Todd, 2010). В части исследований пластинки и ядра спинного мозга, помимо топографических границ, разграничивают по направленности максимальных диаметров тел

нервных клеток, ориентации и нейрохимической характеристике их отростков (Yasaka et al., 2007; Freire et al., 2009; Stepien et al., 2010). Функциональную принадлежность нейронов рассматривают в совокупности размерных и топографических характеристик нейронов серого вещества, соотнося с формой клеточных тел и аксональными проекциями (Miles et al., 2007; Stepien et al., 2010; Skup et al., 2012; Alvarez et al., 2013; Beliez et al., 2015). Таким образом, систематизация нейронов серого вещества спинного мозга базируется на исходных вариабельных особенностях, обусловленных неоднородностью внутри-, межсегментарных и проекционных связей, структурных (форма, размер) и топографических характеристик, что всесторонне исследуется, дискутируется, но безусловно требует комплексного изучения.

Постнатальное развитие спинного мозга изучают в основном по метрическим параметрам его серого вещества, белого вещества и их количественным соотношениям (Писалева, 2013; Сокульский, 2014; Фасахутдиновой и др., 2016; Sengul et al., 2012; Rasouli, Gholami, 2018). Данные о развитии серого вещества в постнатальном периоде далеко неполные и противоречивые, определяются лишь в конкретной структуре (рога/пластинка/ядро) серого вещества путем сравнительного анализа выборочных возрастных периодов и только по отдельным характеристикам: или по топографии, или по клеточной плотности, или по количеству нейронов, или по форме нейронов, или по их размерам (Бурдей, 1984; Писалева, 2012; Яценко, Лютикова, 2012; Molander et al., 1989; Lorenzo et al., 2008; Maya et al., 2014).

Исследования эмбриогенеза внесли существенный вклад в понимание с одной стороны – многообразия нейронов спинного мозга, с другой – сходства многих из них по нейрохимическим признакам. Нейрональные эмбриональные классы формируют функциональные группы клеток, которые могут быть определены генетически, физиологически, морфологически, нейрохимически (Pillai et al., 2007; Alaynick et al., 2011; Dyck et al., 2012; Hori, Hoshino, 2012; Lu et al., 2015; Floyd et al., 2018).

Большинство структурных типов нейронов спинного мозга характеризуется определенными нейрохимическими особенностями (Alvarez, Fyffe, 2007; Todd, 2010; Ueno et al., 2011; Polgár et al., 2013; Merkulyeva et al., 2016). Накопленные к настоящему времени данные о нейрохимической характеристике нейронов спинного мозга (Черток, Коцюба, 2013; Колос, Коржевский, 2016; Kato et al., 2009; Park et al., 2011; Kim et al., 2012; Sławińska et al., 2014; Moiseev et al., 2019) только закладывают основы их идентификации, без чего невозможно установление основы межнейрональных связей. Интеграция морфологических и функциональных данных в виде общей концепции структурно-функциональной организации серого вещества спинного мозга отсутствует, установить четкое представление о их становлении в процессе нейроонтогенеза до сих пор не представлялось возможным.

Морфологическое разнообразие нейронов в узлах периферической нервной системы обычно устанавливается по неравнозначности нервных клеток по размерам, их диаметру, числу отростков, характеру базофильной субстанции, по содержанию различных белков, липидов, ферментов, медиаторов (Рагинов, Чельшев, 2003; Коржевский и др., 2010; Васильева и др., 2011; Russo et al., 2010; Ghorbani et al., 2013; Russel et al., 2014; Sankaran et al., 2016; de Moraes et al., 2017; Schwarz et al., 2019). Однако анализ представляемых исследователями результатов работ затрудняется различиями в использованных методах исследования и животных, а также несопоставимостью по виду, полу и возрасту.

Цель исследования: изучить структурно-функциональную организацию серого вещества грудного отдела спинного мозга и спинномозгового узла у взрослой крысы и закономерности их развития в течение первого года жизни.

Задачи исследования:

1. Определить топографию и размеры рогов, центральных структур, пластинок и ядер в сером веществе второго грудного сегмента спинного мозга у взрослой крысы и в постнатальном онтогенезе.

2. Изучить количественный состав, плотность расположения нейронов с выделением конкретных структурных типов в пластинках и ядрах серого вещества спинного мозга у взрослой крысы и в постнатальном онтогенезе.

3. Исследовать распределение нейронов с различными морфофункциональными особенностями по их нейрохимическому составу (холинацетилтрансфераза, TRPV1, вещество P, кальцитонин-ген-родственный пептид, белок нейрофиламентов 200 кДа, кальбиндин 28 кДа, нейрональная NO-синтаза и НАДФН-диафораза) в пластинках и ядрах серого вещества спинного мозга у крысы в постнатальном онтогенезе.

4. Изучить морфометрические и нейрохимические (выявление TRPV1, вещества P, кальцитонин-ген-родственного пептида, белка нейрофиламентов 200 кДа, кальбиндина 28 кДа, нейрональной NO-синтазы и НАДФН-диафоразы) характеристики нейронов чувствительного узла спинномозгового нерва у взрослой крысы, в постнатальном онтогенезе и на различных сегментарных уровнях.

5. Определить структурно-функциональную организацию нейрональных «нейрохимических кластеров» спинного мозга и спинномозгового узла.

Научная новизна

Впервые определены топография и морфометрические параметры (площадь) всех областей (рогов, промежуточной зоны, центральных структур, пластинок, ядер) серого вещества второго грудного сегмента спинного мозга в постнатальном онтогенезе крысы. Впервые установлена гетерохронность периодов роста рогов и промежуточной зоны спинного мозга, обусловленная неравномерностью увеличения площадей пластинок их образующих. Впервые показана разнонаправленность постнатального развития частей спинномозгового поля X и участие пластинки IV дорсального рога спинного мозга в формировании дорсальной серой спайки. Впервые установлена гетерохронность окончательного расположения функционально различных ядер в сером веществе грудного отдела спинного мозга, обусловленная их смещением в сером веществе в вентральном

направлении. Проведен полный количественный анализ нейронов пластинок и ядер с выделением структурных типов нейронов по форме их клеточных тел, что позволило персонифицировать нейроны, и может использоваться для идентификации спинальных интернейронов. Впервые показано, что уменьшение клеточной плотности сопровождается увеличением абсолютного количества нейронов в пластинках поверхностной области дорсального рога до 10-дневного возраста крысы. Выявлена более ранняя (30-дневный возраст) по сравнению с пластинками (90-дневный возраст) постнатальная стабилизация размеров нейронов, определяемая по их площади сечения, в функционально различных ядрах спинного мозга. Впервые детально рассмотрено распределение TRPV1, вещества P, кальцитонин-ген-родственного пептида, белка нейрофиламентов 200 кДа, кальбиндина 28 кДа, нейрональной NO-синтазы и НАДФН-диафоразы в сером веществе спинного мозга и в спинномозговом узле одного сегментарного уровня, холинацетилтрансферазы в структурах серого вещества спинного мозга в постнатальном онтогенезе. Принципиально новыми являются данные о топографической обособленности и приуроченности популяций позитивных нейронов к конкретным пластинкам и ядрам, что является определяемым в трехдневном возрасте крысы. Впервые продемонстрирована структурная чувствительность и специфика различных гистохимических методов выявления НАДФН-диафоразы в нейронах спинного мозга и спинномозгового узла различных сегментарных уровней.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическое значение исследования заключается в том, что впервые комплексно установлена структурно-функциональная обусловленность серого вещества спинного мозга и чувствительного узла спинномозгового нерва одного сегментарного уровня. На основе выявленных закономерностей обосновывается и формулируется необходимость в интеграции структурных и функциональных данных с целью выяснения всей совокупности местных пространственных межнейрональных взаимодействий на спинальном уровне. Полученные данные

детализируют топографические особенности пластинчатой и ядерной организации второго грудного сегмента спинного мозга. Представленные структурные и нейрохимические особенности расширяют представления о развитии, строении и нейронном составе пластинок, ядер серого вещества спинного мозга и чувствительного узла спинномозгового нерва и могут быть использованы как нормативные: при изучении функциональных особенностей на этапах постнатального онтогенеза; при изучении становления центральной и периферической нервной системы в пренатальном онтогенезе; при изучении адаптивных реакций при воздействии различных средовых факторов, в том числе при изучении гипогравитации и космических полетов. На основе полученных представлений возможен анализ последствий в экспериментальных моделях сенсорной депривации с ослаблением или перерывом межнейронных связей, генетически обусловленных или образовавшихся в индивидуальном развитии. Для экспериментальных и электрофизиологических исследований представляют интерес данные по пластинчатой цитоархитектонике, функциональной гистотопографии серого вещества спинного мозга. Практическую значимость представляют данные гистохимического выявления НАДФН-диафоразы различными методами, которые позволяют модифицировать полученные результаты. Кроме этого, полученные результаты определяют направления дальнейших исследований и могут быть применимы в сравнительных исследованиях в ряду позвоночных, при изучении процессов старения и дегенеративных болезней, которые сопровождаются дезинтеграцией центральной нервной системы. Результаты работы свидетельствуют о необходимости учета архитектоники сегментарного уровня спинного мозга и могут быть использованы для комплексной оценки в исследованиях уровневой организации спинного мозга и соответствующих спинномозговых узлов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Пластинчатая и ядерная организация серого вещества грудного отдела спинного мозга определяется в первую неделю жизни крысенка. Установление

окончательного расположения ядер в сером веществе сопровождается их вентральным смещением. Постнатальное формирование центральных структур серого вещества спинного мозга – поля X происходит вне связи с рогами и промежуточной зоной спинного мозга.

2. Становление количественных характеристик и структурных особенностей нейронов пластинок и ядер серого вещества является гетерохронным. Общие закономерности заключаются в уменьшении клеточной плотности и увеличении площади сечения нейронов, как в пластинках, так и в ядрах серого вещества с возрастом крысы.

3. В сером веществе спинного мозга функционирует нейрохимический кластер нейронов, различающихся по своим структурно-функциональным характеристикам. Клеточные группировки являются топографически обособленными уже в трехдневном возрасте крысенка, в большинстве своём количественно стабильны, сопровождаются гетерохронным ростом нейронов.

4. В спинномозговом узле определяется кластерная локализация нейронов, обусловленная структурной и химической гетерогенностью нейронов. При различных наборах размерных классов в популяциях нейронов узла стабилизация их количественного представительства отмечается до 90-дневного возраста.

Методология и методы исследования.

Исследование выполнено в Центре нейробиологических исследований кафедры нормальной физиологии с биофизикой ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Выбор постнатальной периодизации обусловлен тем, что она включает в себя комплекс динамических показателей функционального роста белых крыс линии Вистар, которые применялись в исследовании. Комплексное исследование всех звеньев и клеточных элементов спинальной рефлекторной дуги явилось определяющим в выборе объектов одного сегментарного уровня.

Выбор второго грудного сегмента спинного мозга обусловлен как отсутствием центров иннервации конечностей на этом сегментарном уровне, так и

присутствием в сером веществе функционально различных групп нейронов, которые включают не только сенсорные интернейроны и мотонейроны, но и нейроны автономной нервной системы, локализованные в промежуточной зоне спинного мозга в виде симпатических ядер (Ноздрачев, Поляков, 2001). Выбор животного в 90 дневном возрасте для первоначального анализа обусловлен имеющимися данными по видовой, уровневой архитектонике серого вещества спинного мозга у взрослых животных, что позволило в последующем детально анализировать аналогичные структуры в процессе развития крысы.

Терминология структур серого вещества приведена в соответствии с Международными: ветеринарной анатомической – МВАН (Зеленевский, 2013) и *Nomina Anatomica Veterinaria* (NAV, 2017), анатомической – МАТ (Колесников, 2003), гистологической (Банин, Быков, 2009) и нейроанатомической (ТНА, 2017, <http://FIPAT.library.dal.ca>) номенклатурами. Вертикальная ориентация человека и горизонтальная – животных обязала использовать универсальную биологическую терминологию – вентральный, дорсальный, роstralный, каудальный, поперечный, когда речь идет об ориентации структур спинного мозга, направленности тел нейронов, их отростков у исследуемой крысы.

Для достижения поставленной цели и решения задач использованы высокоинформативные медико-биологические методы, включая статистические. Серийные срезы спинного мозга и узла были смонтированы последовательно на пяти предметных стеклах таким образом, чтобы на каждом стекле был соответственно только каждый первый, второй, третий, четвертый или пятый из серии срезов. Приготовленные таким образом свежемороженые срезы использованы одновременно для гистологического, гистохимического и иммуногистохимического методов. Данный принцип подготовки гистологических срезов позволил минимизировать количество крыс, используемых в исследовании, так как объекты, полученные от одного животного, окрашивались различными методами.

Нейрохимический анализ проведен методом флуоресцентной микроскопии с помощью программного обеспечения путем позиционирования (объединения)

гистологических изображений одного и того же поля зрения, полученных мультиканальной флюоресценцией с различными спектрами флюорохромов.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Степень достоверности полученных научных результатов основана на использовании современных методов исследования, адекватных поставленным задачам, и математической обработке данных, полученных при анализе материала. В диссертации использованы современные иммуногистохимические методы, методы статистического анализа. Предлагаемый материал достаточен для получения аргументированных положений, выявления и установления закономерностей. Сформулированные в диссертации научные положения, выводы и рекомендации обоснованы теоретически и логично вытекают из основных положений диссертации. Выводы полностью соответствуют поставленным цели и задачам, опираются на полученные данные и результаты нейрохимического и нейроморфологического анализов.

Материалы исследований были представлены на V Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения академика В.Н. Черниговского (Санкт-Петербург, 2007); Международной конференции, посвященной 75-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, члена-корреспондента РАН, профессора Б.А. Никитюка «Проблемы современной морфологии человека» (Москва, 2008); Научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика АМН СССР Д.А. Жданова (Москва, 2008); VII Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 160-летию со дня рождения И.П. Павлова «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2009); VI Всероссийском съезде анатомов, гистологов и эмбриологов (Саратов, 2009); III Всероссийской конференции с международным участием «Медико-физиологические проблемы экологии человека» (Ульяновск, 2009); Научно-практической конференции с международным участием, посвященная 85-летию со дня рождения д.м.н. профессора П.Ф. Степанова (Смоленск, 2009);

Международной научной конференции «Современные проблемы боли: механизмы возникновения и инновационные способы коррекции» (Минск, Беларусь, 2010); X Конгрессе международной ассоциации морфологов (Ярославль, 2010); Научно-практической конференции, посвященной 110-летию со дня рождения академика НАН Беларуси Д.М. Голуба «Современные аспекты фундаментальной и прикладной морфологии» (Минск, Беларусь, 2011); XIV Международном совещании и VII школе по эволюционной физиологии, посвященным памяти академика Л.А. Орбели (Санкт-Петербург, 2011); 9-ом, 10-ом, 11-ом, 12-ом, XIII, XIV, XV Международных междисциплинарных конгрессах «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019); III Эмбриологическом симпозиуме Всероссийского научного медицинского общества анатомов, гистологов, эмбриологов "ЮГРА-ЭМБРИО-2011. Закономерности эмбрио-фетальных морфогенезов у человека и позвоночных животных» (Ханты-Мансийск, 2011); Международной научной конференции посв. 100-летию со дня рождения проф. Б.З. Перлина «Актуальные вопросы морфологии» (Кишинэу, Молдавия, 2012); VIII Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 220-летию со дня рождения академика К.М. Бэра «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2012); XI Конгрессе международной ассоциации морфологов (Самара, 2012); Научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Е.Ф. Ларина «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных функций в норме и при патологии» (Томск, 2013); XXII Съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова (Волгоград, 2013); Научно-практической конференции с международным участием, посвящ. 85-летию со дня рождения заслуж. деятеля науки РБ, лауреата Гос. премии РБ, проф., д.м.н. П.И. Лобко «Морфология – медицинской науке и практике» (Минск, Беларусь, 2014); Научной конференции с международным участием, посвященной 70-летию Ярославской государственной медицинской академии «Современные проблемы нейробиологии» (Ярославль, 2014); Объединенном XII Конгрессе международной ассоциации морфологов и VII Съезде Всероссийского научного

медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Тюмень, 2014); Всероссийской научной конференции с международным участием «Экологические аспекты морфогенеза» (Воронеж, 2015); Научно-практической конференции с международным участием, посвящ. 115-летию со дня рожд. акад. Д.М. Голуба (Минск, Беларусь, 2016); V Съезде физиологов СНГ (Сочи, 2016); XIII Конгрессе Международной ассоциации морфологов (Петрозаводск, 2016); II Всероссийской научной конференции с международным участием (Ярославль, 2016); XXIII Съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова (Воронеж, 2017); XIV Конгрессе Международной ассоциации морфологов (Астрахань, 2018); III международной научной конференции, посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ, профессора В.В. Шилкина (Ярославль, 2018); Международной конференции «Инновационные исследования в области биомедицины» памяти академика В.Н. Ярыгина (Москва, 2019); VIII Съезде Научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Воронеж, 2019); 11 Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience (California, Los Angeles, 2019), Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», посвященной 170-летию со дня рождения И.П. Павлова, (Санкт-Петербург, 2019), VI Съезде физиологов СНГ (Сочи, 2019).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 75 научных работ, среди которых 29 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК, 1 глава в монографии на английском языке.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, методической главы и четырех глав собственных исследований с описанием результатов, их обсуждения и заключениями, а также общего заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 438 страницах, содержит 24 таблицы и иллюстрирована 66 рисунками. Список литературы включает 537 источников, из которых 125 отечественных и 412 иностранных.

Глава 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены в Центре нейробиологических исследований кафедры нормальной физиологии с биофизикой ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России (руководитель Центра – проф. П.М. Маслюков).

В Главе изложены основные методологические подходы к интерпретации полученных результатов.

1.1. Выбор возрастных групп исследования

Исследование выполнено на 174 самках крыс линии Вистар. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Эксперименты на животных проводились в соответствии с решением Этического комитета ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава Российской Федерации и с соблюдением Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

Сроки взятия материала конкретизировались в соответствии с периодизацией постнатального развития белой крысы и осуществлялись в двух фазах жизненного цикла животного: 1 фаза – прогрессивного роста, от рождения до 7 месяцев; 2 фаза – стабильного роста, от 7,5 мес. до 20 мес. жизни (Махинько, Никитин, 1975).

Возрастные группы были сформированы в соответствии с принятой схемой периодизации постнатального онтогенеза и представлены в *Таблице 1.1*.

Выбор данной периодизации обусловлен тем, что она включает в себя комплекс динамических показателей функционального роста именно белых крыс линии Вистар, которых применяли в настоящем исследовании. День рождения животного считали нулевым днем.

Периоды постнатального развития белой крысы с указанием сроков взятия исследуемого материала

Фаза жизненного цикла	Функциональные периоды развития			Возраст крысы в момент забора материала (день жизни)
	Константы роста	Название периода	Возраст по периодам (сутки)	
Фаза прогрессивного роста	Первое удвоение веса	Ранний молочный	0-7	3 5 7
	Второе удвоение веса	Средний молочный	8-15	10 15
	Третье удвоение веса	Поздний молочный	16-30	20 30
	Четвертое удвоение веса	Предпубертатный	31-60	60
	Пятое удвоение веса	Пубертатный	61-120	90 120
	Шестое удвоение веса	Репродуктивный	121-210	150 180
Фаза стабильного роста	Полное развитие, рост максимальной величины	Возмужание	211-270	240
		Зрелость 1-я	271-450	360

1.2. Объекты исследования и выбор сегментарного уровня

Объектами исследования служили нейроны чувствительного узла второго грудного спинномозгового нерва и серого вещества второго грудного сегмента спинного мозга у взрослой крысы в 90-дневном возрасте, а также в различных возрастах постнатального онтогенеза. Исследовались правые спинномозговые узлы и серое вещество соответственно только правой половины спинного мозга.

Серое вещество спинного мозга состоит из нервных клеток, расположение которых соответствует первичной трехчленности рефлекторной дуги. Первый нейрон располагается в чувствительном узле, периферический отросток идет в составе нерва к органам и тканям, а центральный в составе дорсального корешка – в спинной мозг, где формирует связи со вторым нейроном дуги – спинальным

интернейроном. Третий нейрон в простейшей дуге является конечным двигательным нейроном, отростки которого выходят из спинного мозга к скелетной мускулатуре. Таким образом, нейроны серого вещества спинного мозга и чувствительного узла образуют одноуровневый межнейрональный комплекс в пределах одного невротомы. Комплексное исследование всех звеньев и клеточных элементов спинальной рефлекторной дуги явилось определяющим в выборе объектов одного сегментарного уровня.

Большинство исследований на спинном мозге выполнено с целью изучения его структур в области шейного и пояснично-крестцового утолщений (Рагинов, Чельшев, 2003; Гилерович и др., 2007; Колос, Коржевский 2016; Bhardwaj et al., 2001; Weber et al., 2007; Freire et al., 2008; Liu et al., 2010), что, по-видимому, обусловлено их соответствием корешкам нервов передней (грудной) и задней (тазовой) конечностей у крысы (верхней и нижней у человека). Выбор второго грудного сегмента спинного мозга обусловлен как отсутствием центров иннервации конечностей на этом сегментарном уровне, так и присутствием в сером веществе функционально различных групп нейронов, которые включают не только сенсорные интернейроны и мотонейроны, но и нейроны автономной нервной системы, локализованные в промежуточной зоне спинного мозга в виде симпатических ядер (Ноздрачев, Поляков, 2001). Выбор животного в 90 дневном возрасте для первоначального анализа обусловлен имеющимися данными по видовой, уровневой (части, сегменты спинного мозга) архитектонике серого вещества спинного мозга у взрослых животных (Сокульский и др., 2014; Меркульева и др., 2016; Grant, Koerber, 2004; Sengul et al., 2012, Torres-da-Silva et al., 2016), что позволило в последующем детально анализировать аналогичные структуры в процессе развития крысы.

1.3. Номенклатура структур серого вещества спинного мозга

В соответствии с Международной анатомической терминологией (МАТ, Колесников, 2003) вся структура спинного мозга разбивается на:

- отдельные части (шейная, грудная, поясничная, крестцовая, копчиковая), включая сегменты;
- серые столбы, рога, ядра и пластинки;
- белое вещество;
- центральные структуры, включая поле X, белые спайки и серые спайки, непосредственно окружающие центральный канал.

В соответствии с Международной ветеринарной анатомической номенклатурой (МВАН, Зеленецкий, 2013) структура спинного мозга включает:

- отдельные части (шейная, грудная, поясничная, крестцовая, хвостовая);
- серое вещество, представленное рогами, ядрами, промежуточными центральным и латеральным веществами;
- центральный канал;
- белую спайку;
- серую спайку;
- белое вещество.

В пересмотренном варианте шестой редакции МВАН, утвержденной Генеральной Ассамблеей Всемирной Ассоциации Ветеринарных Анатомов (World Association of Veterinary Anatomists, W.A.F.A.) в 2004 году – *Nomina Anatomica Veterinaria* (NAV, 2017) содержатся пояснения к выделению структур промежуточного вещества спинного мозга, где к центральному промежуточному веществу относят серое вещество, окружающее центральный канал спинного мозга, в том числе серые спайки, а латеральное промежуточное вещество объединяет дорсальный и вентральный рога и примыкает к латеральному рогу.

Вместе с тем, в МАТ (Колесников, 2003) сохранились понятия промежуточное центральное вещество и промежуточное латеральное вещество,

которые располагаются в промежуточной зоне спинного мозга, без уточнения их топографии, и отдельно выделяются центральные структуры спинного мозга. К последним относятся структуры вокруг центрального канала – непосредственно спинномозговое поле X, центральный канал, серые спайки и белые спайки.

Имеющиеся разноречивые сведения относительно структур спинного мозга требуют всестороннего изучения, что находит отражение в формировании отдельной клинической Нейроанатомической Терминологии (Terminologia Neuroanatomica, TNA, 2017), доступной на <http://FIPAT.library.dal.ca> в качестве официальной номенклатуры Федеративной международной программы по анатомической терминологии (Federative International Programme for Anatomical Terminology, FIPAT) (ten Donkelaar et al., 2017), утвержденной на Конгрессе IFAA (International Federation of Association of Anatomists) в 2019 году.

Вертикальная ориентация человека и горизонтальная – животных заставляет в дальнейшем использовать универсальную биологическую терминологию – вентральный, дорсальный, ростральный, каудальный, поперечный, когда речь идет об ориентации структур спинного мозга, направленности тел нейронов, их отростков у исследуемой крысы.

1.5. Методы исследования

1.5.1. Выделение сегмента спинного мозга и спинномозгового узла

Эвтаназию животных осуществляли под уретановым наркозом (3 г/кг, внутривенно) путем транскардиальной перфузии физиологического раствора с гепарином (5 Ед/л), затем 4% раствора параформальдегда на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4) (БиолоТ, Россия).

Для выделения второго грудного сегмента и второго грудного чувствительного узла проводили вскрытие позвоночного канала путем ламинэктомии с визуализацией корешков спинномозгового нерва и установлением сегментарного соответствия, после чего иссекали сегмент и соответствующий чувствительный узел. У крысят 3 дневного возраста грудной

сегмент спинного мозга вместе с чувствительным узлом выделяли комплексно с ThII-III позвонками.

Выделенные узел и сегмент спинного мозга дополнительно фиксировали в течение 2 часов в 4% растворе параформальдегда на 0,1М фосфатном буфере (БиолоГ, Россия), после чего промывали трехкратно по 10 мин в физиологическом растворе на 0,01 М фосфатно-солевом буфере (рН 7,4). Последующую крипротекцию проводили в 30% растворе сахарозы в течение 24 час (t 4⁰С).

1.5.2. Приготовление гистологических срезов

Из выделенных узла и сегмента на криостате Shandon E (Thermo Scientific, Великобритания) готовили серийные срезы спинного мозга толщиной 14 мкм, узла – 20 мкм. Для этого сегмент спинного мозга был помещен на предметный столик криостата перпендикулярно к его продольному размеру и фиксирован криогелем Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, США). Из сегмента спинного мозга нарезали поперечные срезы. Срезы узла готовили продольно ходу корешков, также предварительно зафиксировав его на столике криогелем. Первые срезы выделенных объектов ткани не анализировались.

При интерпретации результатов подсчета клеток на серийных срезах возникает ошибка, связанная с тем, что одна клетка может попадать на последующие срезы, поэтому рекомендуется подбирать расстояние между обрабатываемыми срезами таким образом, чтобы оно превышало эквивалентный диаметр исследуемых объектов (Худоевков, 2014).

Серийные срезы спинного мозга и узла монтировали последовательно на пяти предметных стеклах таким образом, чтобы на каждом стекле был соответственно только каждый первый, второй, третий, четвертый или пятый из серии срезов. На каждое стекло осуществляли нарезку до 10 срезов, как сегмента спинного мозга, так и чувствительного узла. Приготовленные таким образом свежзамороженные срезы использовали для гистологического, гистохимического и иммуногистохимического методов. Данный принцип подготовки

гистологических срезов позволил минимизировать количество крыс, используемых в исследованиях, так как объекты, полученные от одного животного, окрашивались различными методами.

1.5.3. Метод гистологического исследования

Окраску гистологических срезов осуществляли методом Ниссля. В качестве красителя использовали тионин для более контрастной окраски (Ромейс, 1954) в водном растворе в разведении 1:1000 (Меркулов, 1961). Окраску срезов проводили холодным способом (при комнатной температуре) под контролем микроскопа. Для достижения закрашенности требовалось от 30 мин до 1 час. Окрашенные срезы промывали в дистиллированной воде 1 мин. Дифференцировку окрашенных структур проводили 96⁰ спиртом под контролем микроскопа до отчетливого различения ядра, ядрышка и зернистости. Затем срезы помещали в ксилол и зкалючали в бальзам.

1.5.4. Методы гистохимического исследования

Для выявления НАДФН-диафоразы применяли два метода окраски гистологических срезов:

1. Метод, описанный Р. Лилли (1969). Предметные стекла с приготовленными гистологическими срезами спинного мозга и узла инкубировали в течение 60 мин при 37⁰С в среде следующего состава: 50мМ фосфатный буфер (рН 7,4) (БиолоТ, Россия), 0,2% Тритон X-100 (Merck, Германия), 0,8 мг/мл β-NADPH (Sigma, США), 0,4 мг/мл нитросиний тетразолий (Sigma, США).

2. Метод, описанный V.T. Норе, S.R. Vincent (1989). Предметные стекла с приготовленными гистологическими срезами спинного мозга и узла инкубировали в течение 60 мин при 37⁰С в среде следующего состава: 50мМ 50мМ Трис-буфер (рН 8,0) (БиолоТ, Россия), 0,2%

Тритон X-100 (Merck, Германия), 0,8 мг/мл β -NADPH (Sigma), 0,4 мг/мл нитро-синий тетразолий (Sigma, США).

Окрашенные данными методами срезы промывали двукратно в дистиллированной воде, обезвоживали в спиртах возрастающей крепости, просветляли в ксилоле и заключали в бальзам.

1.5.5. Методы иммуногистохимического исследования

Иммуногистохимия изучает клеточные маркеры, определяющие специфический фенотип, и является методом, дополняющим морфологическую окраску нервной ткани. Выявление экспрессии - TRPV1, вещества P, кальцитонин-ген-родственного пептида, холинацетилтрансферазы, белка нейрофиламентов 200 кДа, кальбиндина 28 кДа, нейрональной синтазы оксида азота, осуществляли непрямым методом на гистологических срезах.

Срезы преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в 0,01 М фосфатно-солевом буфере с добавлением 10% сыворотки, 1% тритон X-100, 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% тимерозола. Затем срезы инкубировали с первичными антителами в течение 24 час при комнатной температуре.

При выявлении белка нейрофиламентов 200 кДа для предотвращения неспецифического окрашивания, перед применением первичных антител, использовали преинкубацию в течение 1 часа с Fab-фрагментом неконъюгированных ослиных антител против мыши (Jackson Immunoresearch, США, разведение 10 мг/мл).

После инкубации срезов с первичными антителами, осуществляли промывку в 0,01 М фосфатно-солевом буфере трехкратно по 10 мин при комнатной температуре. Затем срезы инкубировали с вторичными антителами – ослиные против иммуноглобулинов первичных антител (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США), разведение 1:100, в течение 2 час при комнатной температуре.

Вторичные антитела конъюгировали с флюорохромами:

- флюоресцеин-изотиоцианатом - FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США), дающим зеленую флюоресценцию нейронов;
- индокарбоцианином - Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США), дающим красную флюоресценцию нейронов.

Первичные антитела (Abcam, Великобритания) представлены в *Таблице 1.2*.

Таблица 1.2.

Антигены, выявляемые иммуногистохимическим методом, и первичные антитела

Антиген	Антитела	Разведение	№ (номер)
TRPV1	Кроличьи поликлональные	1:1000	ab10296
Вещество Р	Кроличьи поликлональные	1:1000	ab67006
Кальцитонин-ген-родственный пептид	Козьи поликлональные	1:1000	ab36001
Холинацетилтрансфераза (ХАТ)	Кроличьи поликлональные	1:300	ab6168
Белок нейрофиламентов 200 кДа (НФ)	Мышиные моноклональные	1:300	ab82259
Кальбиндин 28 кДа (КАБ)	Кроличьи поликлональные	1:500	ab11426
Нейрональная NO-синтаза (nNOS)	Козьи поликлональные	1:300	ab1376

Окраску клеток всей популяции нейронов проводили красителем, флюоресцирующим в красной области спектра, NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains (Molecular Probes, США), разведение 1:200. После этого срезы отмывали в 0,01 М фосфатно-солевом буфере трехкратно по 10 мин при комнатной температуре и заключали в среду для иммунофлюоресценции VectaShield (Vector Laboratories, США). Для исключения неспецифической реакции, часть срезов инкубировали без первичных и/или вторичных антител.

Определение иммунореактивных популяций в пластинке IX вентрального рога спинного мозга потребовало проведения множественного окрашивания. С

целью уточнения топографической и функциональной принадлежности нейронов использовали селективное выявление двух белков в одном препарате, что позволило оценить как взаимное расположение исследуемых белков в нейронных структурах, так и определить, находятся ли эти белки в одной или различных нервных клетках. Колокализацию белков в нервных клетках выявляли методом двойной метки, при котором вторичные антитела конъюгировали последовательно – первично с FITC, вторично с Cy3 в разведениях 1:100 в следующих комбинациях антигенов:

- холинацетилтрансфераз+белок нейрофиламентов 200 кДа;
- кальбиндин 28 кДа+холинацетилтрансфераза.

1.5.6. Визуализационные методы исследования

Иммунофлюоресценция обеспечивает визуализацию антигенов как внутри, так и вне структур клеток с использованием антител. При иммунофлюоресценции антитела конъюгируют с флюоресцентными красителями (флюорохромами), таким образом, связываясь и с выявляемым антигеном, что позволяет обнаружить данный изучаемый антиген с помощью флюоресцентной микроскопии.

Флюорохромы способны излучать свет, при флюоресценции излучение света происходит сразу же после возбуждения поглощенным светом. Энергия флюоресценции меньше, чем энергия поглощенного света, поэтому длина волны излученного света больше, чем света возбуждающего. Флюорохромы возбуждаются определенным спектром длин волн падающего света. Неправильный подбор фильтра может также снижать интенсивность флюоресценции.

В *Таблице 1.3.* представлены характеристики фильтров для используемых флюорохромов.

Соответствующие наборы фильтров для флюорохромов

Флюорохром	Фильтр	Длина волны
FITC (зеленый)	Возбуждающий	460-495
	Дихроичный	505
	Запирающий	510-550
Cu3, Red Nissl Stains (красный)	Возбуждающий	530-550
	Дихроичный	570
	Запирающий	575-625

Окрашенные гистологические срезы исследовали с помощью флюоресцентного микроскопа Олимпус VX43 (Olympus Corporation, Япония), оснащенного набором фильтров-блоков. При использовании одномоментного выявления на срезе двух маркеров устраняли возможность перекрытий излучаемых флюоресцентных сигналов, что могло дать ложное представление об анализируемых структурах. Показано, что FITC частично визуализируется через Cu3-фильтр (Франк, Малькова, 2011). С целью устранения перекрытий между спектрами флюорохромов использовали рекомендованные производителем настройки фильтров, а также индивидуальные фильтры для каждого флюорохрома в виде моховика (колесо) для возбуждения различных флюорохромов. Таким образом, мультиканальная флюоресценция позволила определять колокализацию различных маркеров на одном срезе, при этом флюорохромы между собой не взаимодействовали.

Гистологические срезы, окрашенные тионином по методу Ниссля, а также гистохимическим методом выявления НАДФ-диафоразы, исследовали световой микроскопией с помощью микроскопа, указанного выше, работая в светлом поле.

Изображения всех окрашенных гистологических срезов получали посредством цифровой видеокамеры ТСС-5.0ICE (Tucsen, Китай).

1.5.7. Анализ гистологических срезов под объективом микроскопа

Флюоресцентная микроскопия.

Распределение TRPV1, вещества P, кальцитонин-ген-родственного пептида, холинацетилтрансферазы, белка нейрофиламентов 200 кДа, кальбиндина 28 кДа, нейрональной NO-синтазы на срезах в структурах, как серого вещества спинного мозга, так и спинномозгового узла определяли под объективом микроскопа на малом увеличении ($\times 40$, $\times 100$). Топографическую принадлежность флюоресцирующих нейрональных структур (клеток, отростков, волокон) в сером веществе спинного мозга устанавливали в соответствии с его строением пластинок у крысы (Molander et al. 1989; Grant, Koerber, 2004; Sengul et al., 2013). Для выделения пластинок серого вещества спинного мозга проводили оценку всей клеточной популяции, используя окраску ткани флюоресцентным Нисслем. Затем, уже прицельно выбирали соответствующие поля зрения с флюоресцирующими нейрональными структурами на увеличениях $\times 200$, $\times 400$, $\times 1000$. Исследуемые поля зрения гистологических препаратов сохраняли в виде цифровых изображений.

В работе все изображения серого вещества спинного мозга на Рисунках ориентированы одинаково: в верхних областях рисунков расположены структуры серого вещества, локализованные дорсальнее (дорс.); в нижних частях рисунка – вентральнее (вентр.); соответственно в правых частях рисунка – латеральнее (лат.), в левых частях рисунка – медиальнее (мед.) (Рис. 1.1.).

Основной недостаток флюоресценции заключается в её фототоксичности. Фотохимические разрушения флюорохрома вследствие флюоресцентного возбуждения приводит к фотообесцвечиванию. Точный механизм фотообесцвечивания неизвестен, но полагают, что причиной является фотосенсибилизация синглетного кислорода и переход его в тройное возбужденное состояние (Франк, Малькова, 2011).

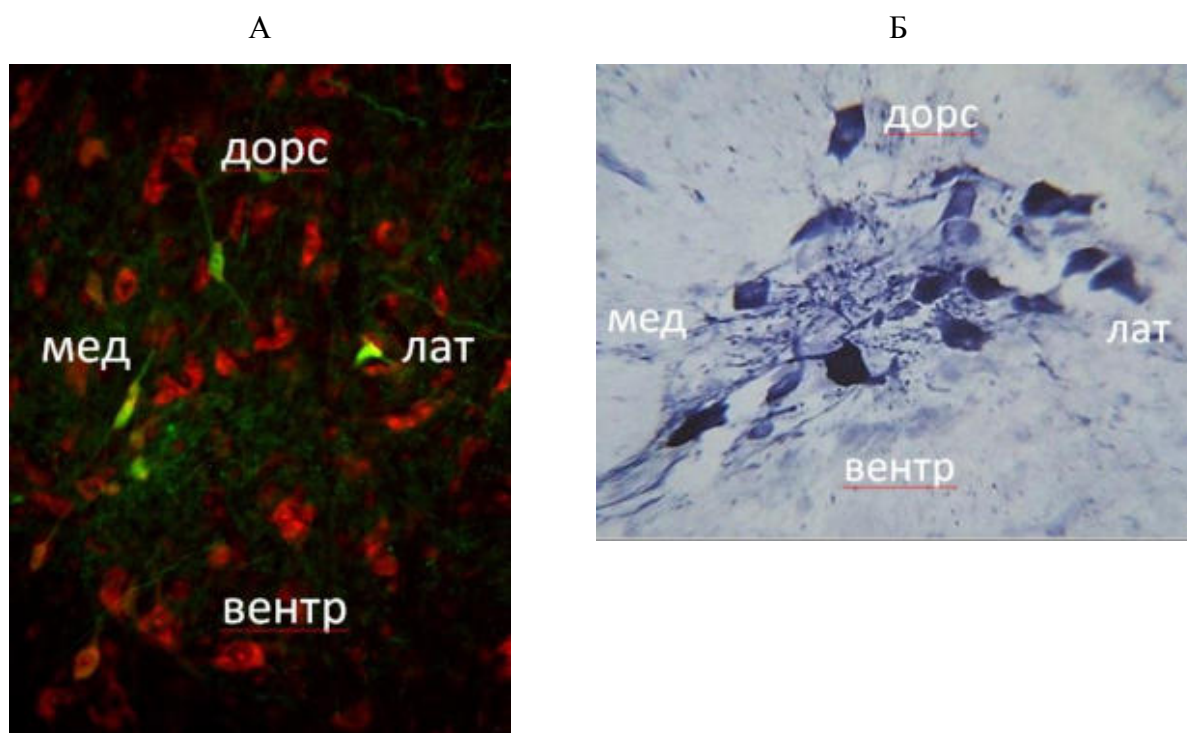


Рисунок 1.1. Расположение структур серого вещества на цифровых изображениях.

А. Взято из главы 4 (рис. 4.10. Б): кальбиндин-иммунореактивные интернейроны пластинки IV дорсального рога спинного мозга.

Б. Взято из главы 4 (рис. 4.17. Е): НАДФ-диафороза-позитивные нейроны промежуточно-латерального ядра спинного мозга.

Фотообесцвечивание может быть снижено с помощью уменьшения длительности действия возбуждающего света. В связи с этим, мы осуществляли оцифровку большого массива гистологических срезов, а последующий анализ структурных, нейрохимических и количественных характеристик проводили уже непосредственно на полученных цифровых изображениях препаратов.

Световая микроскопия.

Анализ гистологических срезов в светлом поле осуществляли аналогично этапам флюоресцентной микроскопии.

1.5.8. Нейрохимическая идентификация нейрональных структур

Изображения гистологических препаратов, полученных методом флюоресцентной микроскопии, позиционировали с помощью программного обеспечения Paint Shop Pro 7.02. Для этого объединяли изображения одного и того же поля зрения, полученные мультисканальной флюоресценцией с различными спектрами флюорохромов в следующих комбинациях:

- для выявления одного маркера: FITC (зеленый) + Red Nissl Stains (красный);
- для выявления колокализации двух маркеров: FITC (зеленый) + СуЗ (красный).

Позиционирование изображений представлено на *Рисунке 1.2*.

Получаемые объединенные изображения отображали зоны перекрытия зеленого и красного градиентов в виде гаммы цвета – от желто-зеленого до зеленого. Последующий анализ нейрональных структур серого вещества спинного мозга и чувствительного узла осуществляли с помощью программы Image J (НИН, США).

Стандартный набор инструментов программы позволяет анализировать цифровые изображения как с окрашенными, так и с неокрашенными структурами. Для проведения анализа окрашенных структур устанавливали пределы распознавания. Анализировали структуры, уровень флюоресценции или активности НАДФН-диафоразы в которых, превышали фоновую окраску среза.

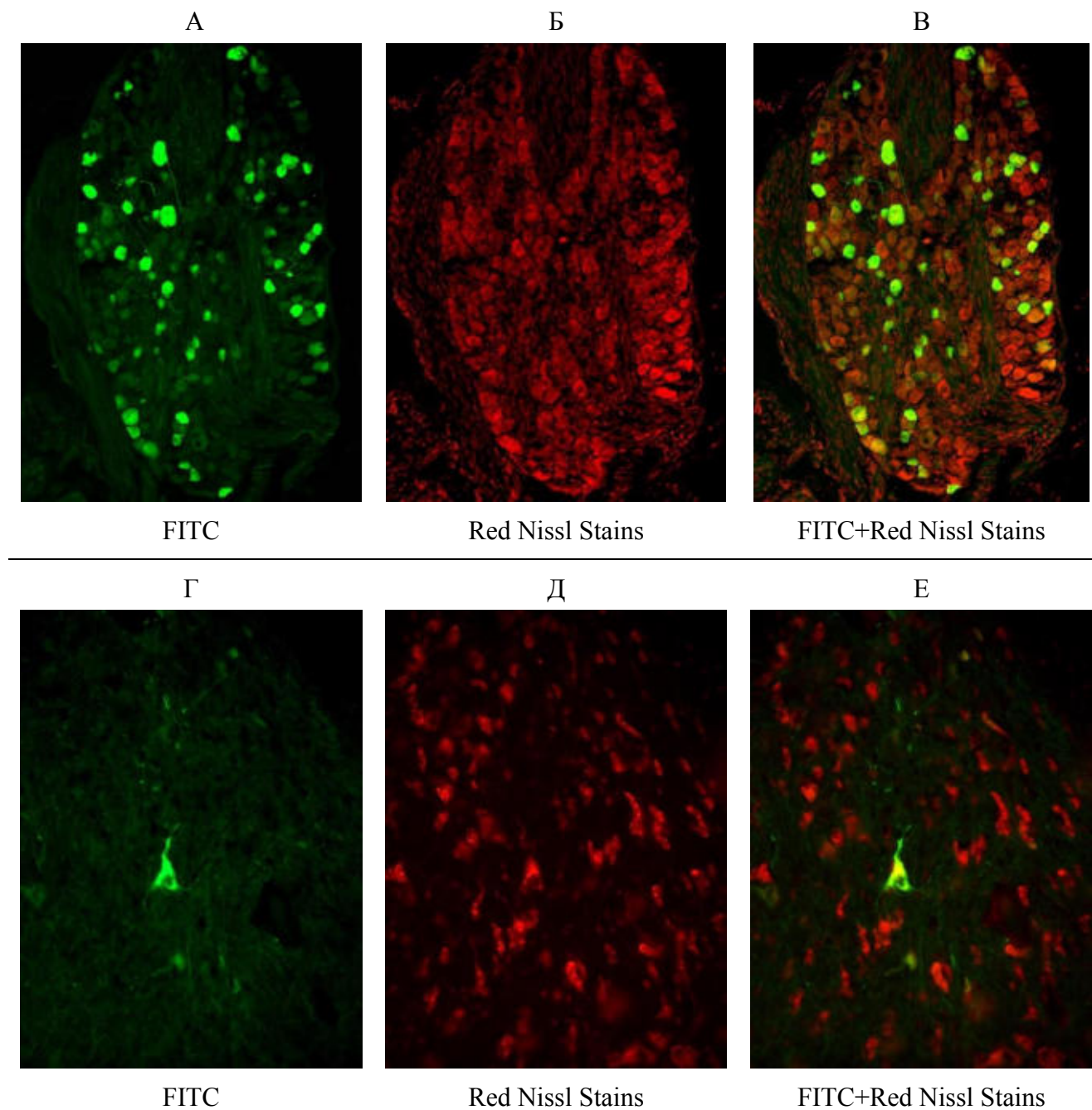


Рисунок 1.2. Позиционирование цифровых изображений чувствительного узла (А-В) и серого вещества спинного мозга (Г-Е). Иммуногистохимическое выявление кальбиндина 28 кДа. А-В. Об. 10, ок.10. Г-Е. Об. 20, ок. 10.

FITC – зеленая флюоресценция структур, содержащих кальбиндин.

Red Nissl Stains – красная флюоресценция структур, окрашенных по Нисслю.

FITC+Red Nissl Stains – объединенные изображения.

1.5.9. Нейроморфологический анализ

Сегментацию цифровых изображений гистологических препаратов проводили в ручном режиме. С помощью коэффициента, полученного при калибровке измерительной системы число пикселей переводили в метрические единицы (мкм). Определяли величину нейронов (площадь сечения) на поперечных срезах спинного мозга и срезах чувствительных узлов, прошедших через дорсальный корешок соответствующего спинномозгового нерва. По значениям площади нейронов клеточный состав узлов был разбит и сгруппирован в 5 размерных классов: до 300 мкм² (очень малые), 301-600 мкм² (малые), 601-900 мкм² (средние), 901-1200 мкм² (крупные), более 1201 мкм² (очень крупные). Клеточный состав пластинок серого вещества спинного мозга был разбит на 3 размерных класса: до 200 мкм² (малые), 201-400 мкм² (средние), более 401 мкм² (крупные). Анализировали клетки, срез которых прошел через ядро с видимым ядрышком.

На изображениях срезов спинного мозга проводили измерение площади пластинок и ядер серого вещества, подсчет количества нейронов в пластинках и ядрах с определением клеточной плотности на стандартной площади (S_{std}) 0,001 мм² (формула 1):

$$N_p = \frac{S_{std} \times N}{S}, \quad (1)$$

где S – площадь пластинки или ядра серого вещества, мм²;

N – количество нейронов на площади пластинки или ядра;

N_p – количество нейронов на стандартной площади пластинки или ядра.

Анализировали возрастную динамику площади областей (рогов/пластинок/ядер) серого вещества спинного мозга, применяя показатель темпа прироста (Сепетлиев, 1968). Темп прироста позволяет вычислить процентное отражение за анализируемый временной отрезок постанатального

развития и показывает, на сколько процентов увеличилась или уменьшилась площадь анализируемой структуры исходного возраста по сравнению с предыдущим возрастом, принятым за 100%. Отрицательный результат темпа прироста отражал уменьшение показателя (площади) за рассматриваемый возрастной период постнатального развития.

Темп прироста рассчитывали по формуле 2:

$$T = \frac{S_i - S_{i-1}}{S_{i-1}} \times 100\%, \quad (2)$$

где S_i – показатель площади структуры серого вещества анализируемого возраста, мкм^2 ;

S_{i-1} – показатель площади структуры серого вещества предыдущего возраста, мкм^2 ;

T – темп прироста показателя площади, %.

Долю позитивных нейронов в спинномозговом узле, в пластинках и ядрах серого вещества спинного мозга определяли как их отношение к общему числу нейронов, которое принимали за 100%. Общее количество нейронов (абсолютное количество, АК) и количество позитивных нейронов подсчитывали на изображениях срезов спинномозговых узлов, срезов спинного мозга в границах пластинок и ядер серого вещества.

1.5.10. Статистическая обработка результатов

Обработку данных проводили с использованием программы Statistica, версия 10 (StatSoft, Inc., 2011). Полученные данные представлены в виде $X \pm Sx$, где X – среднее значение, Sx – стандартная ошибка среднего.

Сравнения двух групп наблюдения (разных возрастов животного) проводили с

использованием t-критерия Стьюдента при условии нормального распределения в выборках. Учитывая количество групп сравнения (более двух) и то, что полученные выборки были разного объема, для детального поиска различий в исследовании применяли однофакторный дисперсионный анализ вариаций ANOVA и критерий Тьюки Post-hoc анализа.

Различия принимали статистически значимыми при $P \leq 0,05$.

Глава 2. СЕРОЕ ВЕЩЕСТВО СПИННОГО МОЗГА

2.1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Учение о строении спинного мозга постоянно пополняется новыми данными о структурно-функциональной организации, способствующими пониманию нейронного его строения и функции как органа центральной нервной системы. Вместе с тем, осмысление новых данных создает неопределенность таких понятий как сегмент спинного мозга, ядро серого вещества спинного мозга, пластинка серого вещества спинного мозга, весьма распространенных в научной и учебной литературе.

2.1.1. Сегментарная организация спинного мозга

В физиологии сегмент спинного мозга определяют как его участок, соответствующий двум парам, отходящих от него корешков спинномозговых нервов (Ноздрачев, Маслюков, 2019). Основой представлений о сегментарном строении спинного мозга являются данные о метамерном строении его серого вещества, имеющего связь с определенными участками кожи (дерматомы), с внутренними органами (спланхнотомы), мышцами (миотомы) (Кнорре, 1959). Каждый метамер связан нервными волокнами, предшественниками спинномозговых нервов, с определенным участком нервной трубки (невромер) (Сепп, 1959).

Вся сложная структура спинного мозга разбивается на отдельные части, сегменты, ядра, состоящие из нервных клеток, воспринимающих чувствительные импульсы, управляющих движениями, оказывающих адаптационно-трофические влияния на органы и ткани.

С этой точки зрения, наряду с частями спинного мозга, оправданным является выделение следующих сегментарных уровней локализации центров управления органами шеи (и органов, связанных с ней по развитию) – С1-С4, верхней (у животных – грудной) конечностью – С5-Т2; органами грудной

полости, органами полости живота – T3-L1, симпатической иннервации тела – C8-L2-4; нижней (у животных – тазовой) конечностью, иннервации промежности – L2-S5, Co1, парасимпатической иннервации органов таза и промежности (S2-S4).

Считается, что доказательством сегментарного строения спинного мозга, помимо данных фило- и онтогенеза, является:

- наличие периодичности в выходе вентральных (передних) и дорсальных (задних) корешков спинномозговых нервов;
- симметричность парных корешков спинномозговых нервов;
- наличие межсегментарных промежутков, расположенных между корешками;
- периодичность и симметричность положения стволов и самих спинномозговых нервов, их чувствительных узлов.

Однако, изучение наружного строения спинного мозга как раз и не выявляет указанных особенностей:

- количество корешковых нитей непостоянно в rostroкаудальном направлении (Берсенев, 1980; Оленев, 1987);
- корешковые нити не имеют билатеральной симметричности (Пивченко, 1993);
- протяженность входа/выхода корешковых нитей в спинном мозге часто ассиметрична и, определяя протяженность сегмента, различна в rostroкаудальном направлении (Бурдей, 1984);
- часто корешковые нити соседних корешков перекрывают зоны входа/выхода, что исключает возможность сопоставимого подразделения спинного мозга на сегменты снаружи (Pinto et al., 2008);
- внутри спинного мозга распространение волокон корешковых нитей более широко, нежели зона их нахождения в передней и задней латеральных бороздах наружной поверхности спинного мозга (Kato et al., 2004).

Таким образом, создается впечатление об однородности внешнего (наружного) строения спинного мозга, что и является основой критики термина

сегмент, которую можно найти в исследованиях Д.М. Голуба (1982), П.И. Лобко (2011).

Если рассматривать фронтальные сечения спинного мозга человека, разделяющие его на столбы, то гетерогенность их по ширине и толщине очевидна. Это связано с размерами спинного мозга в его шейной части, на уровне шейного утолщения, в грудной части, на уровне пояснично-крестцового утолщения, в крестцовой части.

Термин сегмент отражает не столько дискретность строения спинного мозга, сколько потребность в детализации его уровня сечения относительно позвонков для физиологов, нейробиологов, нейрохирургов, для определения локализации и характера патологического процесса – для неврологов, травматологов, хирургов. Поэтому, как и другие условные термины (рефлекторная дуга, нейронные сети и т.д.), имеет право на существование.

Совершенно очевидно, что, несмотря на условность термина сегмент, без его употребления невозможно говорить ни о конкретном строении серого вещества спинного мозга, ни об особенностях его строения на различных уровнях, ни о закономерностях иннервации органов и областей тела человека, ни об уровне и характере патологических процессов в спинном мозге.

Топография нейронов в сером веществе на горизонтальных (поперечных, аксиальных) сечениях спинного мозга изменчива и связана с его сегментом. Гетерогенность проявляется и при исследовании нейронов спинного мозга, образующих скопления в виде ядер серого вещества. Аналогичная картина отмечается и в спинном мозге животных.

На представлениях о сегментарном строении серого вещества спинного мозга базируются и современные данные о его ядерной и пластинчатой организации и о функциональной характеристике клеточного состава.

Учитывая специфику строения серого вещества в зависимости от уровня спинного мозга, под его сегментарным строением следует подразумевать сложную rostrocaudальную, dorsoventральную, mediolateralную организацию нейронов его составляющих.

2.1.2. Ядерная организация грудной части спинного мозга

Серое вещество спинного мозга состоит из нервных клеток, группирующихся в ядра, расположение которых в основном соответствует сегментарному строению спинного мозга (Зернов, Дешина, 1926; Иванов, 1949; Жукова, Брагина, 1981; Оленев, 1987; Barber et al., 1984; Clarke et al., 1998; Deuchars et al., 2005). По мнению П.Г. Пивченко (1993), в спинном мозге отсутствуют сегментарно расположенные центры (ядра): все комплексы морфологически и функционально однотипных клеток выявляются на протяжении всего спинного мозга или на протяжении его отрезка, соответственно протяженности иннервируемого субстрата.

В дорсальном (заднем) роге располагаются ядра, которые присутствуют на всех уровнях спинного мозга: *краевое ядро, студенистое вещество, собственное ядро* (Шпальтегольц, 1909; Оленев, 1987; Molander et al., 1984, 1989; Bhardwaj et al., 2001; Grant, Koerber, 2004). Другие ассоциативные ядра имеют ограниченное распространение (Рис. 2.1.).

Так, в основании дорсального рога располагается *заднее грудное или дорсальное ядро*, именуемое ядром Штиллинга-Кларка (Voehme, 1968). До настоящего времени отсутствует единое мнение о его топографии. Так, у человека, часть авторов дорсальное ядро определяет латерально от центрального канала на уровне сегментов с T1 по L2 (Nogradi, Vrbova, 2006), другие находят его позади центрального канала соответственно сегментам T2–T12 (Schoenen, Faull, 2004). У грызунов дорсальное ядро располагают в основании дорсального рога медиально на уровне сегментов T1–L3 у мыши (Sengul et al., 2013) и T2–L2 у крысы (Molander et al., 1984, 1989), у кошек каудально до L4 (Меркульева и др., 2016). У крупных млекопитающих семейства лошадиных дорсальное ядро располагается дорсолатерально от центрального канала на уровне сегментов C8–L3 (Eustachiewicz et al., 1980).

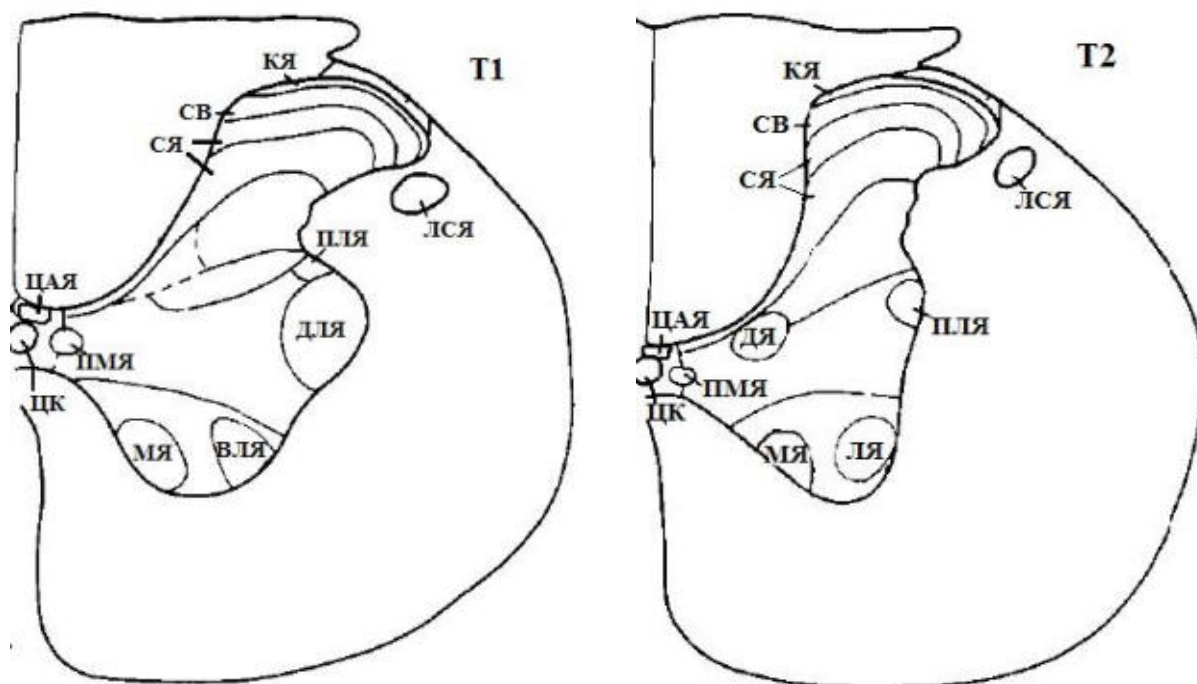


Рисунок 2.1. Схематичное расположение ядер на уровне первого (Т1) и второго (Т2) грудных сегментов спинного мозга у крысы. За основу взяты схемы С. Molander et al. (1989) и G. Grant, H.R. Koerber (2004).

Обозначения: КЯ-краевое ядро, СВ-студенистое вещество, СЯ-собственное ядро, ДЯ-дорсальное ядро, ЛСЯ-латеральные спинальные ядра, ЦАЯ-центральное автономное ядро, ПЛЯ-промежуточно-латеральное ядро, ПМЯ – промежуточно-медиальное ядро, МЯ-медиальные ядра, ЛЯ-латеральные ядра, ВЛЯ-вентролатеральные ядра, ДЛ-дорсолатеральные ядра, ЦК-центральный канал.

Разнообразие локализации дорсального ядра у млекопитающих объясняется полифункциональностью нейронов его составляющих, которые обеспечивают конвергенцию корковых и сенсорных путей (Hantman, Jessell, 2010).

Между дорсальным и вентральным рогами расположена промежуточная зона серого вещества, в которой поблизости от центральных структур спинного мозга находится *промежуточно-медиальное ядро*. В ранних работах Н. К. Anderson (1902) по удалению симпатических паравертебральных узлов показано, что симпатические волокна в спинном мозге "берут начало от клеток парацентральной группы, которая расположена на обеих сторонах центрального канала, непосредственно вентрально от столбов Кларка". После односторонней грудной или брюшной симпатэктомии установлено, что клетки промежуточно-

медиального ядра являются вставочными между афферентными и эфферентными висцеральными нейронами (Petras, Cummings, 1972).

Очевидно, нейроны промежуточно-медиального ядра спинного мозга выполняют роль как афферентного центра вегетативной рефлекторной дуги (Оленев, 1987), так и проекционных интернейронов, формирующих спиноталамические пути (de Lanerolle, Lamotte, 1982). Висцеросенсорная функция нейронов промежуточно-медиального ядра подкрепляется также его распространенностью с С8 по L4 сегмент спинного мозга, на уровне которых выходят белые соединительные ветви спинномозговых нервов, содержащие преганглионарные симпатические волокна (Жукова, Брагина, 1981).

В большей части работ промежуточно-медиальное ядро, в отличие от промежуточно-латерального, располагают вдоль всей длины серого вещества спинного мозга у мыши (Sengul et al., 2012), у крысы (Molander et al., 1984, 1989;

Grant, Koerber, 2004), собаки (Сокульский и др., 2014) и человека (de Lanerolle, Lamotte, 1982), что подтверждает проекционную функцию его нейронов. Последние исследования подтверждают висцеро- и соматосенсорную функцию промежуточно-медиального ядра, отростки клеток которого, содержащие холинацетилтрансферазу, распространяются как в поле Х и в область основания дорсального рога спинного мозга, так и образуют связи с симпатическими преганглионарными нейронами (Calka et al., 2008), участвуя тем самым в формировании симпатического модуля промежуточной области серого вещества спинного мозга (Пивченко, 1993).

В промежуточной зоне торако-люмбального отдела спинного мозга располагаются преганглионарные нейроны симпатической нервной системы, которые включают группы клеток, объединяемые в ядра (Жукова, Брагина, 1981; Barber et al., 1984; Clarke et al., 1998; Deuchars et al., 2005):

- **промежуточно-латеральное ядро** соответствует латеральному рогу;
- **центральное автономное поле** – ядро локализовано в дорсальной серой спайке поля Х дорсально (Barber et al., 1984) или дорсолатерально от центрального канала (Sengul et al., 2012), именуемое также

параэпендимальной частью вставочного спинномозгового ядра (Petras, Cummings, 1972) соответствует центральному промежуточному веществу по NAV (2017) или центральным структурам спинного мозга по МАТ (Колесников, 2003);

- *вставочное спинномозговое ядро* – сформировано цепочкой клеток, простирающихся от центрального ядра к главному промежуточно-латеральному ядру, соответствует латеральному промежуточному веществу по NAV (2012) или промежуточной зоне МАТ (Колесников, 2003).

Промежуточно-латеральное ядро у человека и других млекопитающих имеет различную протяженность, располагаясь в следующих сегментах спинного мозга: T1-L3 – у мыши (Sengul et al., 2012), крысы (Molander et al., 1984, 1989; Grant, Koerber, 2004), С6-L6 – у кролика (Пивченко, 1993); С8-L3 – у кошки (Оленев, 1987), С8-L4 – у собаки (Kojima et al., 1982); T1-L1 – у человека (Schoenen, Faull, 2004). Ряд авторов уровень каудального распространения нейронов данного ядра у крысы определяет сегментом L4 (Пивченко, 1993; Barber et al., 1984). При введении метки в краниальный шейный симпатический узел крысы (Cabot et al., 1994) и в шейно-грудной (звездчатый) узел кошке (Маслюков, 2004) ретроградно меченые нейроны обнаруживались и в С8 сегменте спинного мозга.

В белом веществе латеральных (боковых) канатиков спинного мозга расположена канатиковая часть промежуточно-латерального ядра (Жукова, Брагина, 1981; Barber et al., 1984; Clarke et al., 1998), которая локализована вентральнее латеральных спинальных ядер. Латеральные спинальные ядра присутствуют на всех уровнях спинного мозга (Molander et al., 1984, 1989; Grant, Koerber, 2004; Schoenen, Faull, 2004; Heise, Kayalioglu, 2009) в белом веществе СМ вблизи латерального края дорсального рога.

Нервные клетки вентральных рогов на основании интеграции их строения и функции еще в конце XIX столетия объединяли в две группы: вентромедиальную и вентролатеральную, как у человека (Тилло, 1883), так и у животных (Франк, 1890). Медиальная группа иннервирует мышцы, развивающиеся из дорсальной

части миотомов, а латеральная – мышцы, происходящие из вентральной части миотомов. При этом, чем каудальнее находятся иннервируемые мышцы, тем латеральнее лежат иннервирующие их клетки. Эти данные, вошедшие в руководства конца XIX - начала XX века (Зернов, 1926; Иванов, 1949), нашли подтверждение в более поздних исследованиях, показавших, что мотонейроны мышц разгибателей, а также иннервирующие туловище, располагаются кпереди мотонейронов, иннервирующих сгибатели. Латеральные мотонейроны, дорсолатеральная группа которых располагается в основном в шейном и поясничном утолщениях спинного мозга, иннервируют мышцы грудных и тазовых конечностей, соответственно (Джон и др., 2008).

Но, с 80-ых годов (Оленев, 1987) и по настоящее время практически во всех руководствах по неврологии, а также в учебной литературе описаны иные границы и местоположение ядер вентрального рога спинного мозга. В литературе можно найти данные от двух до пяти двигательных ядер на протяжении спинного мозга.

Наибольшее число двигательных ядер отмечают в вентральных столбах на уровне шейного и пояснично-крестцового утолщений. На уровне грудной части спинного мозга более двух ядер не находят даже у высших приматов, объясняя малое число двигательных ядер особенностями иннервации гипаксиальной мускулатуры туловища, тогда как в области шейного и пояснично-крестцового утолщений развиваются центры иннервации мышц верхней конечности (C5-T1-2), осуществляющей тонкие движения (трудовую деятельность), и нижней конечности (L2-S4), осуществляющих локомоцию, позу стояния. Многочисленность нейрональных популяций в области утолщений спинного мозга объясняется функциональной общностью зон иннервации передних и задних конечностей у млекопитающих (Freire et al., 2008). Так, в области утолщений спинного мозга крысы, кошки и собаки, располагаются дополнительные группы мотонейронов (Molander et al., 1984, 1989; Пивченко, 1993; Grant, Koerber, 2004; Sengul et al., 2013).

Считается, что медиальные ядра развиты на протяжении сегментов C1-L4. Их мотонейроны иннервируют мышцы туловища, а мышцы конечностей иннервируются нейронами из групп латеральных ядер (Molander et al., 1984, 1989; Grant, Koerber, 2004; Schoenen, Faull, 2004; Яценко, Лютикова, 2012).

У крысы на всех уровнях спинного мозга мотонейроны формируют медиальные и латеральные клеточные группы, которые располагаются в вентральном роге спинного мозга (Оленев, 1987; Пивченко, 1993), центральная клеточная группа присутствует ниже L2 спинного мозга и в шейных сегментах: верхних – ядро добавочного нерва; средних – ядро диафрагмального нерва (Barber et al., 1984).

2.1.3. Пластинчатая организация грудной части спинного мозга

Гетерогенность столбов серого вещества проявляется не только в rostrocaudальном, но и в ventrodorsальном направлении, о чем свидетельствует топография и нейрональный состав пластинок серого вещества спинного мозга, называемых обычно пластинками Рекседа.

В. Rexed (1952) описал топографию серого вещества на поперечных сечениях спинного мозга кошки, используя цитологический подход, исключив из анализа дендроархитектонику. Предложенная им схема пластинчатого строения спинного мозга включает десять пластинок (I-X), из которых первые девять располагаются от вершины дорсального рога серого вещества спинного мозга до вершины вентрального рога, а десятая пластинка занимает область вокруг центрального канала спинного мозга и относится к центральным структурам последнего MAT (2003) или формирует центральное промежуточное вещество NAV (2012).

Современные представления о пластинчатом строении серого вещества спинного мозга у млекопитающих основаны на изучении различных животных: мыши (Порсева и др., 2014; Sidman et al., 1971; Sengul et al., 2012), крысы (Steiner, Turner, 1972; Molander et al., 1984, 1989; Grant, Koerber, 2004), кошки

(M.E. Scheibel, A.B. Scheibel, 1968, 1969), собаки (Buxton, Goodman, 1967) и обезьяны (Dum, Strick, 1996; Torres-da-Silva et al., 2016).

Считается, что пластинчатое строение серого вещества спинного мозга имеют не только представители класса млекопитающих, включая человека (Schoenen, Faull, 2004), но и класса птиц (Wild et al., 2010). При этом за основу берутся классические представления о цито- и дендроархитектонике пластинок спинного мозга у кошки (M.E. Scheibel, A.B. Scheibel, 1968, 1969), которые практически аналогичны пластинкам спинного мозга крысы (Steiner, Turner, 1972; Molander et al., 1984, 1989; Grant, Koerber, 2004; Ribeiro-da-Silva, 2004; Sengul et al., 2013).

Трудность выделения границ между различными пластинками в сером веществе спинного мозга была отмечена ещё Рекседом (Rexed, 1952), который рассматривал их не как "строгие" границы, а как нечёткие "переходные" зоны. В течение последующих лет критерии определения границ между пластинками усложнились, выявленной уровневой (части и сегменты спинного мозга), возрастной (Molander et al., 1984, 1989, Sengul et al., 2012), половой (Breedlove, Arnold 1980; Papka et al., 2002) и видовой (Пивченко, 1993) спецификой.

С.Н. Оленев (1987) на основании морфологических особенностей серого вещества различных уровней спинного мозга у млекопитающих выделяет: пластинки I-III, которые соответствуют дорсальным рогам; пластинки VIII-IX, которые соответствуют вентральным рогам; пластинки IV, V, VI, VII соответствуют промежуточной зоне; пластинку X, располагающуюся вокруг центрального канала.

R.P. Dum, P.L. Strick (1996) на уровнях C2-C5 и C6-T2 в промежуточной зоне серого вещества спинного мозга обезьяны выделяют пластинки V-VIII. У грызунов агути в шейном утолщении (C4-T1), в грудной части СМ (Т7-Т10) и в поясничном утолщении (L4-S1) в дорсальном роге описаны пластинки I-IV, в вентральном роге – пластинки VII-IX (Freire et al., 2008).

Эти данные являются неоднозначными, требуют пересмотра содержания основных частей серого вещества и не являются доказательством необходимости пересмотра представлений Рекседа и его последователей.

Топографически пластинки Рекседа соответствуют, в основном, анатомическим частям серого вещества спинного мозга: в дорсальном роге нейроны располагаются по верхушке головки в виде тонкого ободка, плавно сужающегося к латеральной стороне рога и часто описываемого как маргинальный слой, то есть краевой слой дорсального рога - *пластинка I*, головке соответствуют *пластинка II*, шейке – *пластинки III, IV и V*, основанию рога – *пластинка VI*, наличие которой является спорным.

T.J. Steiner, L.M. Turner (1972), исследуя размеры нейронов и плотность их распределения в сером веществе спинного мозга на всех его уровнях, пришли к выводу, что у взрослых крыс пластинка VI отсутствует и дорсальной рог включает только пластинки I-V. С. Molander et al. (1984, 1989), G. Grant, H.R. Koerber (2004) считают, что пластинка VI выявляется только в области утолщений спинного мозга крысы, а именно с сегмента С4 по Т1 и с сегмента L3 по S1 (Рис. 2.2.).

Границы пластинки VI топографически трудно определяемы в связи с отсутствием четких отличий нейронов пластинок V и VI. В связи с этим, пластинки V и VI в спинном мозге человека (Schoenen, Faull, 2004) и в спинного мозга птиц (Wild et al., 2010) объединяют в одну, а межламинарную границу проводят не поперечно, а дорсовентрально.

У других представителей позвоночных пластинки V и VI рассматривают отдельно только в области шейного и поясничного утолщений, в которых пластинка VI относится к дорсальному рогу и граничит с промежуточной зоной спинного мозга (Rexed, 1952; Molander et al. 1984, 1989; Sengul et al., 2012; Ten Donkelaar et al., 2017).

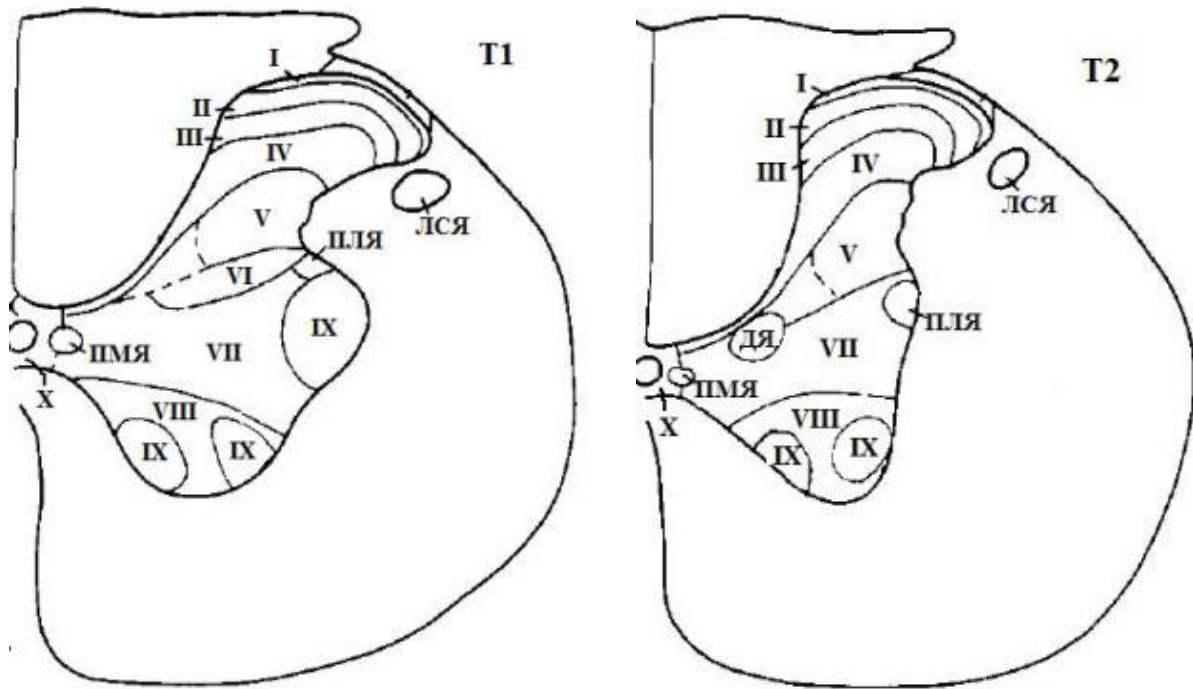


Рисунок 2.2. Схематичное расположение пластинок на уровне первого (Т1) и второго (Т2) грудных сегментов спинного мозга у крысы. За основу взяты схемы С. Molander et al. (1989) и G. Grant, H.R. Koerber (2004).

Обозначения: римские цифры (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X) - пластинки Рекседа, ЛСЯ-латеральные спинальные ядра, ДЯ-дорсальное ядро, ПЛЯ-промежуточно-латеральное ядро, ПМЯ-промежуточно-медиальное ядро.

Пластинка VII соответствует промежуточной зоне, занимая, как и пластинка VIII, часть вентрального рога только в области шейного и поясничного или пояснично-крестцового утолщений спинного мозга, углубляясь в вентральный рог вплоть до его верхушки (Steiner, Turner, 1972; Molander et al., 1984, 1989; Grant, Koerber, 2004; Schoenen, Faull, 2004).

Пластинка VIII принадлежит вентральному рогу и примыкает к пластинке VII, X и двигательным ядрам пластинки IX. Пластинки VII, VIII и X четких границ не имеют.

Пластинка IX располагается вентральнее предыдущих пластинок непосредственно в вентральном роге спинного мозга: она представлена двигательными ядрами, количество и локализация которых, вблизи латеральной и вентромедиальной поверхности вентрального рога зависят от уровня спинного мозга (Пивченко, 1993; Гилерович и др., 2007; Яценко, Лютикова, 2012; Molander

et al., 1984, 1989). На грудном уровне у мыши и крысы выделяют медиальную и латеральную группы мотонейронов (Peterson., 1989; Sengul et al., 2012, Beliez et al., 2015).

Топографически спинномозговое *поле X* не отражает классического представления о пластинчатом строении серого вещества спинного мозга, относится к центральным структурам спинного мозга и включает вентральную и дорсальную серые спайки (MAT, 2003; NAV, 2012), фактически не образуя типичного для серого вещества спинного мозга слоя (Ten Donkelaar et al., 2017).

Очевидно, для установления границ пластинок серого вещества спинного мозга следует учитывать комплекс (Яценко, Лютикова, 2012; Woolf, Fitzgerald, 1986; Brown et al., 1995; Todd, 2002, 2010; Schoenen, Faull, 2004; Grant, Koerber, 2004; Li et al., 2005; Lu, Perl, 2005) характеристик нейронов их составляющих, который включает в себя не только уровневую принадлежность спинного мозга, но и пространственное расположение и форму тел и отростков нейронов.

2.1.4. Цито- и дендроархитектоника пластинок спинного мозга

Нейропилль *пластинки I* является свободно-организованным из-за наличия ветвящихся дендритов как в поперечном, так и в rostroкаудальном направлении у всех без исключения нейронов, тела которых вытянуты в плоскости поперечного среза (Гилерович и др., 2007; Lima, Coimbra, 1983; Molander et al., 1984, 1989; Zhang, Craig, 1997; Schoenen, Faull, 2004).

В латеральной области пластинки I располагаются веретеновидные и призматические клетки, сплюснутые (плоские) клетки расположены в средней трети пластинки, а мультиполярные (многогранные) – в медиальной части пластинки (Lima, Coimbra, 1983). Многие авторы, однако, отмечают равномерность распределения разных форм клеточных типов в пределах пластинки I (Molander et al., 1984, 1989; Zhang, Craig, 1997; Schoenen, Faull, 2004), к которым у крысы относят веретеновидные, мультиполярные и пирамидальные нейроны (Spike et al., 2003; Almarestani et al., 2007), последние имеют, как правило, треугольную форму тела и располагаются на границе с белым веществом

(Ribeiro-da-Silva, 2004). К типичным нейронам пластинки I относят клетки Вальдейера по Terminologia Neuroanatomica (TNA, 2017), имеющие веретеновидную форму тела и самые крупные размеры, "гигантские клетки" по A.J. Todd (2002), на долю которых приходится 2-3% от всех нейронов пластинки I у крысы (Todd, 2002; Nogradi, Vrbova, 2006; Polgár et al., 2008) и незначительный процент у человека (Schoenen, Faull, 2004).

В пластинке II, в более ранних исследованиях с использованием окраски по методу Гольджи, у крысы (Todd, Lewis, 1986), кошки (Gobel, 1978) и обезьяны (Beal, Cooper, 1978) выделяют два характерных типа нейронов - островковый (islet cell) и стебельчатый (stalked cell), и группы нейронов, имеющих различную форму тела с обязательным наличием шипиков на дендритах, распространяющихся, как правило, в пластинку III в различных осевых проекциях, и аксональными бутонами, не выходящими за пределы пластинки II.

Островковые клетки имеют веретеновидную или округлую форму тела (Gobel, 1978), присутствуют как во внешней, так и во внутренней части пластинки в равных количественных соотношениях (Todd, Lewis, 1986), характерной особенностью которых является направление очень длинных дендритных отростков вдоль ростокаудальной оси спинного мозга с образованием как дендро-дендритических, так и дендро-аксональных соединений, как правило, в пределах самой пластинки с наличием многочисленных шипиков и редко встречающимися концевыми бутонами, аналогичными аксональным. Только у 30% нейронов данного типа дендриты достигают пластинки III (Todd, Lewis, 1986), а аксоны не покидают границ самой пластинки (Gobel, 1978). Данный клеточный тип, первоначально описанный Рамон-и-Кахалем (1909) как центральные клетки (central cell), является более многочисленным и широко распространённым по всей пластинке II (Todd, Lewis, 1986).

В пластинке II у крысы и кошки в настоящее время выделяют до 5 типов клеток: островковые, центральные, радиальные, вертикальные и звездчатые нейроны (Ribeiro-da-Silva, 2004; Yasaka et al., 2007; Todd, 2010; Grudt, E.R. Perl, 2002; Lu, Perl, 2005). Вертикальные клетки располагаются, преимущественно, в

латеральной части пластинки II, радиальные клетки – в медиальной её части (Grudt, Perl, 2002), островковые и центральные клетки – по всей ширине пластинки (Todd, 2010) (Рис. 2.3.), звёздчатые – на границе пластинок II и III (Ribeiro-da-Silva, 2004).

Описанное многообразие нейронов пластинки II этим не исчерпывается, так как около 25-30% нейронов пластинки II отличаются от всех описанных типов клеток (Lu, Perl, 2005; Yasaka et al., 2007; Todd, 2010).

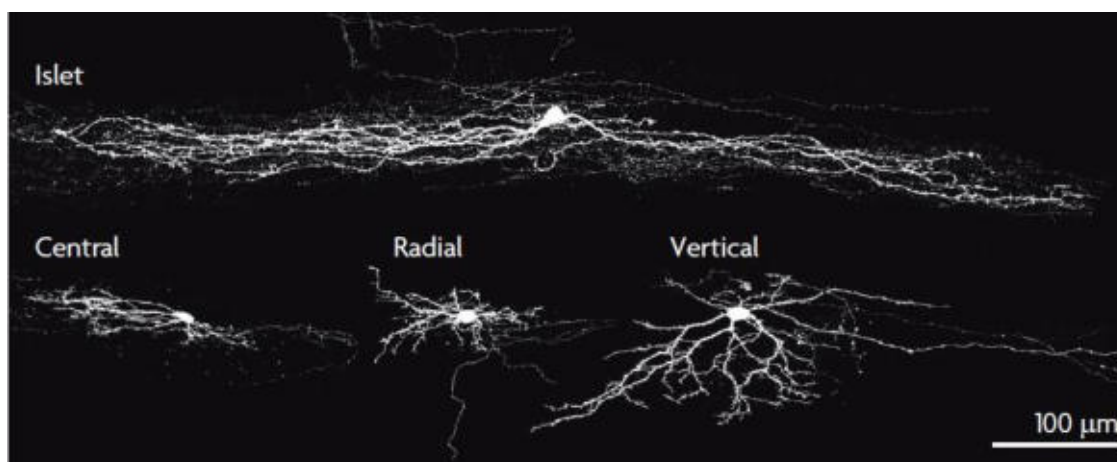


Рисунок 2.3. Классификация интернейронов пластинки II по А.Ж. Todd (2010). Islet - островковый, Central - центральный, Radial - радиальный, Vertical - вертикальный.

У человека в пластинке II подробно описаны четыре типа нейронов, отличия которых базируются на геометрии ветвлений отростков (Schoenen, Faull, 2004). В центральной части пластинки локализуются островковые клетки (30%) с ветвлением отростков в диаметрально противоположных направлениях – ростральном и каудальном. Нитевидные клетки (20%) имеют асимметричное дендритное ветвление и дорсальное направление аксона в пластинку I. Вьющиеся клетки (10%) локализуются в наружной части пластинки и характеризуются сложным строением дендритного дерева и дорсальным направлением аксона. Звёздчатые клетки (40%) занимают всю медиальную часть пластинки, характеризуются самым простым ветвлением дендритов и вентральным направлением аксона в пластинки III-IV.

У большинства нейронов пластинки II дендритные арборизации располагаются преимущественно вдоль rostroкаудальной оси спинного мозга (Grudt, Perl, 2002; Yasaka et al., 2007), дорсовентральная направленность клеточных тел определяется только в медиальной части пластинки (Schoenen, Faull, 2004).

Нейроны *пластинки III* по ветвлению дендритных отростков делятся на два типа: rostroкаудальной ориентации, не выходящие за пределы собственно пластинки (Maxwell, 1983), и дорсовентральной ориентации, пересекающие несколько пластинок (Pawlowski et al., 2013). В части работ указывается только rostroкаудальная ориентация дендритных полей нейронов пластинки III СМ у крысы и у кошки (Grant, Koerber, 2004; Freire et al., 2009).

У мыши, крысы, кошки и обезьяны интернейроны пластинок III-IV являются гетерогенными по форме клеточных тел. Среди них описаны веретеновидные, округлые, треугольные, пирамидальные (Гилерович и др., 2007; М.Е. Scheibel, А.В. Scheibel, 1968; Molander et al., 1984, 1989). По ветвлению отростков интернейроны делят на антенно-подобные, радиальные, поперечные (Brown, Fyffe, 1981; Nazli, Morris, 2000; Nogradi, Vrbova, 2006).

В пластинке III у крыс присутствуют только округлые и веретеновидные нейроны, причем последние преобладают (Molander et al., 1984, 1989), нейропилль содержит многочисленные мелкие миелинизированные волокна (Grant, Koerber, 2004; Порсева, 2013).

В *пластинке IV* у крыс форма клеточных тел не отличается от таковых в пластинке III, но соотношение округлых и веретеновидных клеток выравнивается (Bhardwaj et al., 2001). Отличительной особенностью нейронов пластинки IV является ветвление отростков во всех плоскостях с преимущественным распространением в поперечном направлении (Todd, 2002).

Нейропилль медиальной части *пластинки V* отличается от пластинки IV преимущественным ветвлением дендритов в дорсовентральном направлении (М.Е. Scheibel, А.В. Scheibel, 1968). Нейроны пластинки V имеют до 11 первичных дендритов, сложный рисунок которых прослеживается в пластинке VII

и в области собственного ядра дорсального рога спинного мозга, а ветви доходят до пластинок I и II (Ritz, Greenspan, 1985). Пластинка V является самой широкой пластинкой, её можно легко идентифицировать по сетчатому виду серого вещества в латеральной части – области, известной у человека как "ретикулярная формация" (Schoenen, Faull, 2004), у крысы – связями ее нейронов с ретикулярной формацией (Molander et al., 1984, 1989).

В пластинке V спинного мозга крысы и кошки присутствуют звёздчатые, круглые, веретеновидные, треугольные нейроны (M.E. Scheibel, A.B. Scheibel, 1968; Barber et al., 1982), причем в медиальной части пластинки определяются веретеновидные и треугольные клетки, в латеральной части – мультиполярные (Nogradi, Vrbova, 2006). В ряду позвоночных клетки дорсального ядра имеют самую разнообразную форму: овальную, грушевидную, звездчатую, вытянутую (Mann, 1973).

Наличие *пластинки VI* на уровне утолщений спинного мозга определяется по более темному виду ее нейронов при окраске толуидиновым синим (Rexed, 1952; Molander et al., 1984, 1989; Todd, 2002). Пластинка VI имеет сходный с пластинкой V клеточный состав, отростки нейронов достигают белого вещества латеральных канатиков (Schoenen, Faull, 2004). Однотипность ветвления дендритов пластинок V-VI объясняется их вертикальной ориентацией, которые достигают пластинок II, III, VII (Todd, 2002; Schoenen, Faull, 2004).

Наряду с пластинками Рекседа дорсальный рог имеет особую зону, которая занимает его медиальную треть. Именно здесь, в пластинках III, IV и V спинного мозга крысы, обезьяны, человека обнаружена преимущественно дорсовентральная ориентация отростков интернейронов (Ralston, 1982; Antal et al., 1990; Bhardwaj et al., 2001; Schoenen, Faull, 2004) и многочисленность интернейронов по сравнению с латеральной частью дорсального рога спинного мозга (Bhardwaj et al., 2001), что является сопоставимым с особенностями клеточного строения пластинки IV в работах В. Rexed (1952).

Пластинка VII идентифицируется по поперечной ориентации тел нейронов и их отростков, формирующих многочисленные ветвления в поперечной плоскости среза спинного мозга (Гилерович и др., 2007; Nogradi, Vrbova, 2006). Имеется зависимость распределения отростков от топографии нейронов в пластинке VII: в латеральной части расположены биполярные нейроны с дорсовентральной ориентацией, в центральной - мультиполярные нейроны. Отличием нейронов данной пластинки спинного мозга человека (Schoenen, Faull, 2004) от нейронов пластинок V-VI и VIII является их меньшая плотность и более многочисленная дендритная арборизация, что также является характерным и для крысы (Barber et al., 1984). Клетки именно этой пластинки образуют цепочку разделительных нейронов на границе пластинок V и VII, симпатические ядра торако-люмбального отдела спинного мозга, парасимпатические ядра крестцового отдела спинного мозга, промежуточно-медиальное ядро (Жукова, Брагина, 1981; Barber et al., 1984; Clarke et al., 1998; Deuchars et al., 2005; Stepien et al., 2010).

У крысы форма симпатических преганглионарных нейронов, расположенных в пластинке VII неодинакова. Так, нейроны главного ядра являются мультиполярными клетками, дендриты которых ветвятся в дорсолатеральном направлении. Нейроны вставочного ядра имеют, как правило, веретеновидную или треугольную форму с ветвлением дендритов в медиально-латеральном направлении (Порсева, 2014). Нейроны центрального ядра имеют веретеновидную форму, но их дендриты имеют дорсовентральную и поперечную ориентацию (Barber et al., 1984). По TNA (2017) симпатические преганглионарные нейроны являются мотонейронами промежуточной зоны спинного мозга. Симпатические преганглионарные нейроны следует дифференцировать от разделительных клеток пластинки VII, которые являясь биполярными нейронами вытянуты в поперечном направлении (Barber et al., 1984).

Нейроны пластинки VII имеют самую разнообразную форму с преимущественной локализацией в латеральных частях – веретеновидных клеток, в центральных частях – мультиполярных (Nogradi, Vrbova, 2006) и звездчатых

(Molander et al., 1984, 1989), в вентральных частях – округлых и треугольных клеток (Гилерович и др., 2007; Molander et al., 1984, 1989).

В *пластинке VIII* спинного мозга большинства млекопитающих, включая человека, присутствуют крупные мультиполярные нейроны, в нейроплазме которых отсутствует вещество Ниссля, что является критерием их отличия от мотонейронов (Schoenen, Faull, 2004; Nogradi, Vrbova, 2006). У крысы нейроны пластинки VIII имеют дорсовентральную поляризацию дендритных ветвлений (Schoenen, Faull, 2004), их аксоны переходят на противоположную сторону (Гилерович и соавт., 2007).

Было показано у кошки (M.E. Scheibel, A.B. Scheibel, 1970), а в последствии у крысы (Barber et al., 1982) и человека (Schoenen, Faull, 2004), отличие групповой дендроархитектоники *пластинки IX*: у вентромедиальных мотонейронов ростокаудальная ориентация отростков формирует пирамидальную форму дендритного дерева; у центральных мотонейронов преобладает ветвление боковых отростков в поперечной плоскости с формированием крупных древовидных пучков, напоминающих по форме букву "Т"; у вентролатеральных мотонейронов наблюдается ветвление отростков как в поперечном, так и в ростокаудальном направлениях с формированием дендритного дерева сравнимого с "крестом"; у дорсолатеральных мотонейронов преобладает ветвление в поперечном и ростокаудальном направлениях с преимущественным радиальным расположением дендритного дерева. При этом данные дендритные арборизации характерны как для α -, так и для γ -мотонейронов. Функциональная роль дендритных арборизаций мотонейронов до сих пор неизвестна. Есть мнение, что эти структуры образуют дендродендритические взаимодействия и участвуют в местных нейрональных схемах, синхронизирующих деятельность внутри столбов мотонейронов спинного мозга (Schoenen, Faull, 2004).

В пластинке IX у крысы мотонейроны сформированы в виде продольных столбов - медиального и латерального (Оленев, 1987; Пивченко, 1993), центральный столб обнаруживается лишь в верхних шейных сегментах и ниже второго поясничного сегмента СМ (Barber et al., 1982), а в области поясничного

утолщения спинного мозга определяется добавочная дорсолатеральная группа мотонейронов (Molander et al., 1984).

Пластинка IX, представленная мотонейронами, располагается в вентральном роге и легко идентифицируется по четко очерченным группам, в основном, очень крупных нейронов, расположенных вблизи латеральной и вентромедиальной поверхности рога. Мотонейроны отличаются от других нейронов обилием в них крупных гранул Нисселевского вещества (Пивченко, 1993; Яценко, Лютикова, 2012; Molander et al., 1984, 1989). У крысы встречается самая разнообразная форма клеточных тел мотонейронов: округлая, веретеновидная, треугольная с наличием 3-8 дендритов, ветвящихся в поперечной плоскости спинного мозга (Гилерович и др., 2007). В пластинке IX спинного мозга человека локализованы мотонейроны мультиполярной (многогранной) формы клеточных тел (Schoenen, Faull, 2004).

В пластинках VII, VIII и вблизи от мотонейронов пластинки IX расположены нейроны, имеющие округлую, веретеновидную и треугольную форму с 2-3 дендритами, ветвящимися в поперечной плоскости спинного мозга, именуемые клетками Реншоу (Экклс, 1959), у грызунов описываемые как мелкие звездчатые нейроны (Гилерович и др., 2007; Porseva et al., 2015).

Границы *поля X* определяются с трудом из-за рядом расположенных пластинок: вентролатерально – VIII, латерально – VII, дорсолатерально – V. У человека в поле X присутствуют только веретеновидные нейроны с дорсовентральной ориентацией дендритных отростков в центральной и дорсальной частях пластинки, с ростокаудальной – в вентральной части пластинки (Schoenen, Faull, 2004). В поле X у крысы выделяют различные по форме интернейроны – овальные и веретеновидные (Barber et al., 1982), пирамидальные, звездчатые и веретеновидные (Grant, Koerber, 2004), мультиполярные (Freire et al., 2009).

У человека и животных в сером веществе спинного мозга около центрального канала с большим постоянством обнаруживаются типичные для спинномозговых узлов псевдоуниполярные нейроны, гетеротопия которых

сохраняется в течение всей жизни организма (Мотавкин, Черток, 2008), а также нейроны автономной нервной системы, известные по литературе как «нейроны Мотавкина» (Motavkin, Dovbysh, 1970), относящиеся к периферическому отделу нервной системы. Очевидно, последние участвуют в формировании центрального симпатического ядра.

2.1.5. Развитие серого вещества спинного мозга в пренатальном онтогенезе

В эмбриональном периоде нейральный зачаток, представленный нервной трубкой, даёт начало мозгу. При этом из нервной трубки в области шеи и туловища развивается непосредственно спинной мозг (Кнорре, 1971). В эмбриогенезе в состоянии развития находятся как нервные клетки, так и их растущие отростки, а развитие ткани-мишени, по направлению к которой растёт развивающийся аксон, зависит от правильного его врастания, а также от взаимодействия между элементами системы нейрогенеза (Гейз, 1972). Ещё П. Вейс (1922) показал, что при трансплантации конечности в эмбриогенезе её реиннервация должна исходить от сегментов спинного мозга, которые приводят в движение конечности. Выдвинутая им теория модуляции или респециализации нервов под влиянием тех органов, в которые они врастают, сохраняется в литературе как модуляционная гипотеза (Гейз, 1972).

Е.К. Сепп (1959) показал, что наличие моторики является первостепенным фактором, влияющим на строение нервной системы в сравнительной эмбриологии. При этом порядок формирования вентральных корешков, основанный на принципе нисходящего осевого градиента, сменяется порядком двигательных единиц, иннервирующих определенную группу мышечных волокон, так называемый "мотонейронный пул" мышцы.

Обстоятельные исследования морфогенеза грудного отдела спинного мозга человека и животных, проведенные А.С. Леонтьевым (1971, 1972) показали, что в развитии спинного мозга и составляющих его серого и белого вещества, обнаруживается вентродорсальная последовательность роста и дифференциация,

которую следует считать филогенетически обусловленной и отражающей прогрессирующую цефализацию спинного мозга, где дорсальные рога и дорсальные канатики развиваются позже вентральных и боковых.

Развитие грудного отдела спинного мозга по его длинной оси происходит неравномерно: верхние сегменты представляются более дифференцированными, чем нижние, и раньше других формируются моторные клетки вентральных рогов (Pytel et al., 2011), вентральные рога серого вещества спинного мозга относительно больше, чем дорсальные рога спинного мозга в эмбриональном периоде (Школьников, Гуминский, 2014). Начало появления нервных клеток в вентральных рогах спинного мозга совпадает с образованием суставов между закладками хрящевых «костей», а мышцы анатомически уже определяются как органы (Попова-Лопаткина, 1966).

Относительно быстрый рост и развитие вентральных рогов по сравнению с дорсальными рогами спинного мозга объясняется появлением спонтанной активности мотонейронов первоначально до образования сенсорных входов (Momose-Sato, Sato, 2013). Возможно, что целевое получение ответных сигналов с мышц, является фактором, регулирующим формирование нейронных сетей в развивающемся спинном мозге (Одинцова, Слуцкая, 2009; Fiumelli, Woodin, 2007; Wilhelm et al., 2009).

Раннее образование ядерных групп происходит в начале в базальной пластинке (Woźniak, Węclewicz, 1987), затем – в крыльной пластинке (Pytel et al., 2011). Начиная с 5 недели эмбрионального периода человека в шейной и грудной частях спинного мозга формируется вентральный рог, с 7 недели - дорсальный рог, в котором определяется краевое ядро (Pytel et al., 2011), студенистое вещество и собственное ядро дорсального рога (Martí et al., 1987), к концу 8 недели ядра присутствуют на всех уровнях спинного мозга (Pytel et al., 2011). Однако, в плодном периоде разделение между дорсальной и вентральной частями собственного ядра отсутствует (Bhimaidevi et al., 2012).

Спинной мозг плодов человека в 18 недель развития уже имеет чётко выраженную дифференцировку на серое и белое вещество (Школьников,

Гуминский, 2014), но, по данным Г.Д. Бурдей (1984), чёткое разделение на белое и серое вещество на горизонтальных срезах спинного мозга у плодов человека до 32–36 недели отсутствует.

Боковые рога определяются к середине пренатального периода как у человека (Бурдей, 1984), так и у крысы (Phleps et al., 1993), в области которых отдельные клетки формируют промежуточно-латеральное ядро, не отличающееся от такового у взрослых.

Дифференциация морфологически и биохимически отличных групп нейронов в дорсальном роге развивающегося спинного мозга грызунов появляется до проникновения в серое вещество сенсорных аксонов (Ding et al., 2004). Немиелинизированные и малого диаметра миелинизированные волокна от первичных афферентов проникают в дорсальный рог у крысы сравнительно поздно в эмбриональном периоде – на 19-21 день (Fitzgerald et al., 1994). Афферентные волокна достигают дорсального рога до того, как их периферические волокна начинают вырабатывать сенсорные пептиды, что предполагает формирование центральных связей при отсутствии контакта с периферическими тканями (Konstantinidou et al., 1995). При этом, различные типы сенсорных аксонов врастают в развивающийся спинной мозг целенаправленно, непосредственно к их мишеням – соответствующим пластинкам серого вещества спинного мозга (Pytel et al., 2011). Таким образом, афферентные волокна достигают дорсального рога спинного мозга задолго до установления связей с периферическими рецепторами (Konstantinidou et al., 1995) и проецируются в уже сформированные и дифференцированные пластинки серого вещества спинного мозга (Ozaki, Snider, 1997; Ding et al., 2004; Pytel et al., 2011).

На основе экспрессии эмбриональных факторов транскрипции в спинном мозге выделяют более 20 различных эмбриональных классов нейронов, которые определяют основные популяции нейронов. Нейрональные классы отражают функционально когерентные группы клеток, которые могут быть идентифицированы генетически, физиологически, морфологически как конкретные клеточные субпопуляции. Среди них установлено 13 классов клеток-

предшественников: 8 – дорсальные интернейроны; 4 – вентральные интернейроны; 1 – мотонейроны (Alaynick et al., 2011). Одиннадцать классов ранних постмитотических нейронов (dI1–6, V0–3 и мотонейроны – MN) и два более поздних интернейрона (dIL_A и dIL_B) присутствуют в эмбриональном спинном мозге.

Класс мотонейронов дифференцируется в нейроны, локализованные: в вентральном роге – α - и γ -мотонейроны; в промежуточной зоне тораколюмбального (T1-T12 и L1-L2) и крестцового (S2-4) отделов – преганглионарные нейроны автономной нервной системы; олигодендроциты серого вещества спинного мозга (Alaynick et al., 2011). Группы вентральных интернейронов (классы V0, V1, V2, V3) демонстрируют различную организацию структурно-функциональных моделей на различных уровнях спинного мозга с различной комбинацией факторов транскрипции (C. Francius et al., 2013).

Группы дорсальных прогениторных клеток представлены шестью различными классами – dI1–6, которые дают постмитотические миграционные клетки, непосредственно формирующие серое вещество дорсального рога спинного мозга (Mieseгаes et al., 2009; Avraham et al., 2009). Как и в случае вентральных классов интернейронов, каждый из этих классов имеет свои характерные особенности. Понимание развития дорсальных спинальных интернейронов осложняется значительными возможностями миграции клеток (Dyck et al., 2012), а точная корреляция между происхождением и конечной позицией нейронов до конца не изучена.

2.1.6. Развитие серого вещества спинного мозга в постнатальном онтогенезе

Количество/длина/площадь/объем белого вещества и серого вещества спинного мозга и форма последнего на поперечных срезах различных уровней спинного мозга неодинакова. В процессе развития животных изменение процентного соотношения площади белого и серого вещества спинного мозга направлено в сторону увеличения белого вещества (Писалева, 2013).

Так, распределение серого и белого вещества в различных частях спинного мозга эмбриона не соответствует дефинитивному состоянию: серого вещества значительно больше, чем белого, которое имеет вид лишь узкой полоски по периферии мощно развитого серого вещества (Попова-Лопаткина, 1966).

Объем белого вещества спинного мозга после рождения у человека увеличивается больше, чем объем серого вещества спинного мозга, увеличение последнего составляет: в шейной части – в 4,5 раза, в грудной – в 6,5 раза, в поясничной – в 4,5 раза, в крестцовой – в 3,5 раза (Бурдей, 1984). У взрослых людей самый большой объем имеет С5 сегмент, в грудной части – разница в площади серого и белого вещества незначительная, в поясничном спинном мозге – наибольшая площадь поперечного сечения у L4-5 (Malinska, 1972). У кроликов в постнатальном онтогенезе происходит увеличение абсолютного количества серого и белого вещества спинного мозга, при этом относительное количество белого вещества увеличивается мало (Фасахутдинова и др., 2015). У человека, напротив, в грудной части спинного мозга объем серого вещества к зрелому возрасту увеличивается в 6,5 раз, а объем белого вещества в 19,7 раза, что является максимальным среди других уровней спинного мозга (Бурдей, 1984)

Более заметное увеличение шейного и пояснично-крестцового утолщений наблюдается в первые годы жизни и происходит за счет энергичной миелинизации отростков нервных клеток, увеличения размеров нервных клеток, нарастания количества их дендритов, развития нейроглии (Бурдей, 1984). В тоже время, объем серого вещества спинного мозга увеличивается более интенсивно в первый месяц после рождения и менее интенсивно – у собак старшего возраста, у которых преобладает прирост белого вещества спинного мозга (Писалева, 2013), особенно значительное изменение соотношения между количеством серого и белого вещества претерпевает грудная часть спинного мозга, что также является зависимым от возраста животного. У мыши увеличение числа миелинизированных аксонов и соответственно белого вещества отмечается с 14 дня жизни, у крысы на один день позже, чем у мыши, но в первые две недели постнатального периода у грызунов преобладает серое вещество (Sengul et al., 2012).

В грудных сегментах спинного мозга увеличение площади белого вещества в постнатальном периоде онтогенеза приводит к уменьшению отношения серого вещества к белому веществу СМ у карпа, лягушки, собаки, свиньи и быка, что сопровождается изменением формы нервных клеток: средние по размеру нервные клетки, в основном, приобретают овальную и округлую форму, а в крупных нервных клетках доминирует многогранная форма (Сокульский, 2014). У мыши цитоархитектоника серого вещества спинного мозга в 4 дневном возрасте подобна взрослой мыши (Sengul et al., 2012).

Рост различных частей спинного мозга совершается неодинаково в различные возрастные периоды, после рождения отмечается более активный рост грудной части спинного мозга по сравнению с другими частями спинного мозга, на ранних стадиях развития спинного мозга наиболее короткими являются грудные сегменты, у взрослых отношения противоположны, что является характерным для грызунов (Козельская, 1974). Развитие спинного мозга кролика и морской свинки идет в направлении относительного укорочения поясничной и крестцово-каудальной частей, у белой крысы оно начинается с дорсальных грудных сегментов (Козельская, 1974). По данным А.Н. Фасахутдиновой и др. (2016) в течение шести месяцев жизни у кролика отмечаются большие темпы роста поясничного отдела спинного мозга, а относительная длина грудного отдела спинного мозга увеличивается в меньшей степени, чем других отделов спинного мозга.

У плодов человека наиболее длинными сегментами спинного мозга являются те, которые связаны с конечностями, а наиболее короткими – грудные сегменты спинного мозга. У взрослых организмов – наоборот: наиболее короткие сегменты становятся длинными, а наиболее длинные – самыми короткими (Попова-Лопаткина, 1966). Показано, что у взрослых животных поперечный диаметр поясничных сегментов спинного мозга превышает его вертикальный размер (Rasouli, Gholami, 2018). По Г.Д. Бурдей (1984) от периода новорожденности до зрелого возраста у человека в грудной части спинного мозга

длина сегментов увеличивается в 3 раза, что является максимальным по отношению к другим частям спинного мозга.

В. Rexed (1952), С. Molander et al. (1984, 1989) пришли к выводу, что строение серого вещества у новорожденных крысят и котят является уже сформированным в виде ядер и пластинок и сохраняется без существенных изменений цитоархитектоники в течение 10 недель постнатальной жизни. S.K. Maya et al. (2014) также считают, что к рождению у парнокопытных все ядра и пластинки серого вещества спинного мозга сформированы.

С. Finazzo (1994) отмечает уменьшение плотности клеток и размеров области расположения промежуточно-латерального ядра в грудных сегментах спинного мозга к годовалому возрасту крысы. Превышение площади латеральных ядер мотонейронов над медиальными в эмбриональном периоде человека сохраняется в течение всей его жизни (Бурдей, 1984). По данным L.E. Lorenzo et al. (2008) толщина пластинок I и II дорсальных рогов в поясничных сегментах спинного мозга не меняется от рождения до двух месячного возраста крысы. Но, как в пренатальном, так и в постнатальном онтогенезе клетки дорсальных рогов спинного мозга отличаются большим разнообразием форм, чем клетки вентральных рогов (Бурдей, 1984). Различия касаются только площади рогов: в раннем постнатальном периоде у мыши относительно большой дорсальный рог, что сохраняется и у взрослого животного; вентральный рог, наоборот, меньше как в 4 дневном возрасте, так и в сравнении с 56 дневным возрастом мыши (Sengul et al., 2012). Как в пренатальном, так и постнатальном онтогенезе площадь медиальных ядер мотонейронов вентрального рога меньше в два раза площади латеральных (Бурдей, 1984).

Несмотря на далеко неполные и противоречивые данные о развитии серого вещества спинного мозга в постнатальном периоде, исследования эмбриогенеза внесли существенный вклад в понимание формирования и развития частей (столбов/рогов) серого вещества спинного мозга.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.2.1. СЕРОЕ ВЕЩЕСТВО ГРУДНОГО СПИННОГО МОЗГА У ВЗРОСЛОЙ КРЫСЫ

На поперечном срезе серого вещества спинного мозга у крысы в 90-дневном возрасте отчетливо визуализируются следующие части: дорсальный рог, вентральный рог, промежуточная зона и центральные структуры, то есть структуры вокруг центрального канала – вентральная и дорсальная серые спайки, которые входят в состав поля X (Рис. 2.4. А).

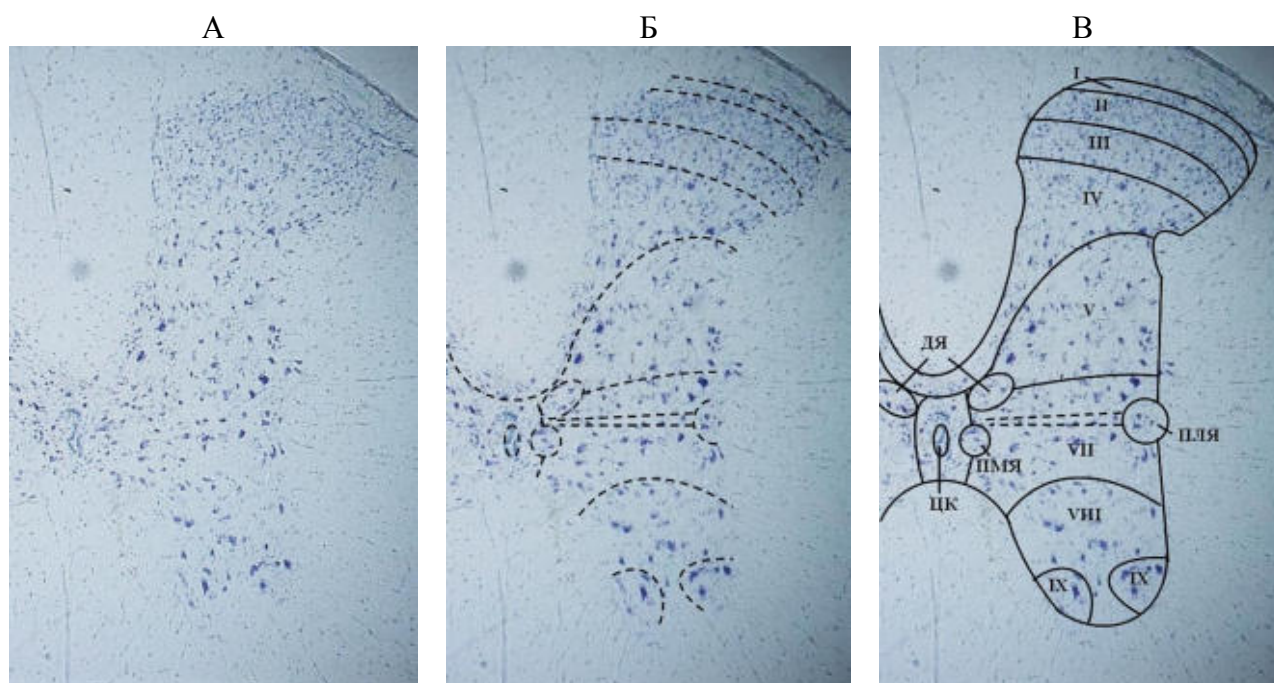


Рисунок 2.4. Серое вещество второго грудного сегмента спинного мозга взрослой крысы (90-й день жизни). Окраска по Ниссляу. Об. 4, ок. 10.

Пунктирными и сплошными линиями обозначены пластинки - римскими цифрами (I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X) и ядра: ДЯ - дорсальное, ПМЯ - промежуточно-медиальное, ПЛЯ - промежуточно-латеральное.

В спинномозговом поле X выделен центральный канал (ЦК). В пластинке VII между пунктирными линиями располагаются интернейроны вставочного ядра.

Из всех выделяемых макроструктур на срезе относительно больше – превалирует по размерам, и более наглядно выражен – дорсальный рог, в котором ясно видимы головка и его суженая часть – шейка, последняя без четко идентифицируемых границ основания переходит медиально в заднюю серую

спайку и вентрально в промежуточную зону спинного мозга. Относительно меньшая область серого вещества выступает вперед, формируя вентральный рог. Менее отчетливо выделяется по латеральному краю промежуточной зоны латеральный рог.

По NAV (2017) между дорсальным и вентральным рогами расположено латеральное промежуточное вещество, а к центральному промежуточному веществу относится серое вещество, окружающее центральный канал и включающее серые спайки, и непосредственно расширяющееся в латеральное промежуточное вещество.

В МВАН (Зеленевский, 2013) отсутствует описание структур, относящихся к латеральному и центральному промежуточным веществам. Но, с официальным признанием деления серого вещества на пластинки, по МАТ (Колесников, 2003) предусматривается наличие промежуточной зоны (синоним промежуточного столба, а на поперечном срезе грудного уровня спинного мозга пластинки VII), к которой относят:

- латеральный рог с промежуточно-латеральным ядром;
- центральное промежуточное вещество;
- заднее грудное ядро или дорсальное ядро;
- латеральное промежуточное вещество;
- промежуточно-медиальное ядро;
- крестцовые парасимпатические ядра.

Центральный канал и серые спайки входят в состав поля X и являются центральными структурами спинного мозга, то есть структурами вокруг центрального канала.

Тем не менее, по TNA (2017) также сохраняется понятие центрального промежуточного вещества, как части промежуточной зоны, к которому относятся дорсальное, вставочное и промежуточно-медиальное ядра. К латеральному промежуточному веществу относятся крестцовые парасимпатические ядра. А к латеральному рогу, как и по МАТ (Колесников, 2003), промежуточно-латеральное ядро.

Первая цитоархитектоническая пластинчатая схема, представленная для картирования спинного мозга кошки, была выполнена В. Rexed (1952) и основана на определении морфологии и расположении окрашенных методом Ниссля клеток на поперечных сечениях спинного мозга. Эта схема стала стандартной системой отсчета для анатомов, физиологов, и приобрела широкое принятие в нейробиологической литературе при исследованиях спинного мозга млекопитающих.

В научной литературе промежуточный столб спинного мозга у грызунов, в частности у крыс, не разграничивается и однозначно трактуется как промежуточная зона спинного мозга, а имеющаяся пластинчатая организация серого вещества у млекопитающих предусматривает выделение поля X, к которому относится серое вещество окружающее центральный канал, включая серые спайки (Steiner, Turner, 1972; Barber et al., 1982, 1984; Molander et al., 1984, 1989; Grant, Koerber, 2004; Sengul et al., 2013).

В связи с этим, с учетом разноречивости имеющихся номенклатур, нами были выделены следующие части серого вещества спинного мозга в T2 сегменте крысы: дорсальный рог, промежуточная зона, вентральный рог, поле X. Анализ поля X включал соответствующую область не только правой, но и левой половины спинного мозга в виду центральности (срединности) этой структуры спинного мозга.

Планиметрический анализ поперечного среза спинного мозга показал, что площадь правой половины серого вещества T2 сегмента составила $0,952 \text{ мм}^2$. Более половины серого вещества приходится на дорсальный рог – $0,534 \text{ мм}^2$ (56,1%), минимальную площадь занимает поле X – $0,039 \text{ мм}^2$ (4,1%). Соотношение относительных величин по средним значениям площадей промежуточной зоны и вентрального рога составило $0,204 \text{ мм}^2$ (21,4%) и $0,175 \text{ мм}^2$ (18,4%) соответственно.

2.2.1.1. Анализ пластинок дорсального рога спинного мозга

Границы каждой из пластинок показаны на *Рисунке 2.4. Б, В*.

В области головки дорсального рога спинного мозга располагаются пластинки I, II, III, IV. Место перехода головки в шейку является наиболее суженной частью дорсального рога и одновременно границей, отделяющей пластинку IV от пластинки V. Большую, узкую часть дорсального рога – его шейку, занимает пластинка V – центральную и латеральную области рога, меньшую часть – область медиального края – пластинка IV.

Расположение пластинки IV соответствует нескольким частям дорсального рога: дорсальной части головки – поперечное расположение, медиальным частям шейки и основания дорсального рога – продольное расположение в области медиального края рога; и дорсальной части поля X – дорсальной спайке – поперечное расположение.

Промежуточная зона спинного мозга образовано пластинкой VII, которая отделена от пластинки V дорсального рога "разделительными" интернейронами (Barber et al., 1984), формирующими клеточную цепочку от дорсальной серой спайки поля X до латерального края серого вещества спинного мозга вблизи и чуть дорсальнее области латерального рога.

Границы между пластинками выделить возможно с учетом их цитологических характеристик.

Пластинка I соответствует верхушке головки дорсального рога и в виде узкого ободка, занимает всю выпуклую часть головки, образована нейронами различной формы и направленности клеточных тел – дорсо-вентральной и медиально-латеральной: мелкие клетки имеют овальную, веретеновидную формы тел; крупные клетки – треугольную и веретеновидную, локализованы в латеральной области пластинки. Единичные нейроны имеют различную форму клеточных тел.

Пластинка II образована клетками исключительно мелких размеров преимущественно овальной и веретеновидной формы с дорсовентральной

ориентацией клеточных тел. В пластинке можно выделить две части: дорсальную – наружную с более плотным и вентральную – внутреннюю с менее плотным расположением клеток. В вентральной части пластинки преимущественно в центральной её области располагаются веретеновидные клетки, отростки которых прослеживаются в пластинке III. В медиальной и латеральной частях пластинки клетки располагаются более плотно и имеют более крупные размеры, чем в её центральной части. В пластинке выявляются не многочисленные нейроны треугольной и различной формы тела. Толщина пластинки II значительно превышает толщину пластинки I и располагается параллельно и вентральнее последней.

Пластинка III образована также мелкими клетками преимущественно овальной и веретеновидной формы, ориентированными дорсо-вентрально, визуалью не отличимыми от клеток предыдущей пластинки, но превышающими размер клеток пластинки II. Клетки располагаются менее плотно, чем в пластинке II, и занимают поперечно центральную часть головки. В латеральной трети пластинки располагаются немногочисленные крупные клетки веретеновидной и треугольной формы тела, отростки которых распространяются вентрально в пластинку IV. Единичные крупные клетки локализованы в области медиального трети пластинки ближе к медиальному краю головки, форма клеточных тел их различная.

Пластинка IV образована мелкими, средними и крупными клетками веретеновидной, треугольной, овальной формы. Последние, локализуются преимущественно в её центральной части. Плотность их расположения меньше, чем в пластинке III, а ориентация клеточных тел соответствует дорсовентральной. В пластинке также выявляются не многочисленные нейроны различной формы тела.

Пластинка IV, располагаясь вентральнее пластинки III и поперек шейки дорсального рога, является более длинной, чем предыдущие пластинки, так как продолжается вдоль всей шейки дорсального рога, занимая область медиального края, включая заднюю часть дорсальной серой спайки спинного мозга, где

ориентация клеточных тел меняется на медиально-латеральную (поперечную) (Рис. 2.5. А).

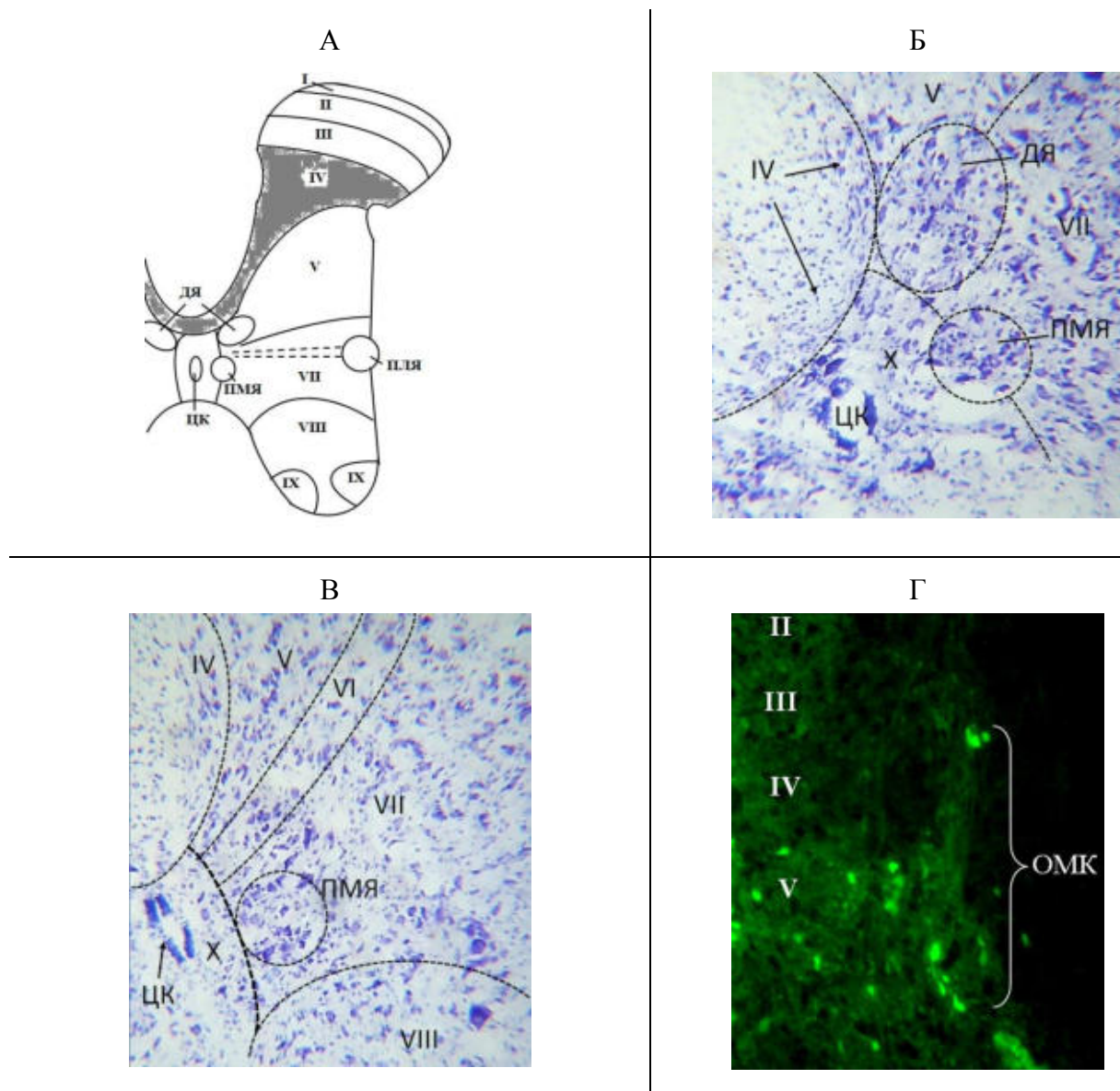


Рисунок 2.5. Расположение пластинки IV в грудном T2 (А, Б), поясничном L4 (В) и интернейронов, содержащих кальбиндин в поясничном L6 (Г) сегментах спинного мозга крысы Wistar (А, Б, В) и мыши C57BL/6 (Г).

Б, В – окраска по Нислю, об. 20, ок. 10; Г – иммуногистохимическое выявление кальбиндина 28 кДА, об. 4, ок. 20.

Обозначения:

- пластинки – римскими цифрами (I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X);
- ядра: ДЯ – дорсальное, ПМЯ – промежуточно-медиальное, ПЛЯ – промежуточно-латеральное;
- в спинномозговом поле X: ЦК – центральный канал, ВС – вентральная серая сайка, ДС – дорсальная серая спайка;
- ОМК – область медиального края дорсального рога спинного мозга.

В области медиального края дорсального рога часть интернейронов имеет длинные отростки, распространяющиеся в дорсомедиальном направлении, и по структуре отличается от интернейронов пластинки V, которая располагается непосредственно в шейке рога.

Таким образом, в T2 сегменте спинного мозга у крысы пластинка IV пересекает срединную линию и не прекращаясь переходит на другую половину серого вещества в его дорсальный рог.

Эта область включает не только морфологически, но и функционально доказанное продолжение пластинки IV между полем X и белым веществом дорсального канатика, что предусматривает участие пластинки IV в формировании дорсальной серой спайки (Порсева, Шилкин, 2016; Porseva et al., 2015) и документируется при окраске методом Ниссля (Рис. 2.5. Б, В) и результатами иммуногистохимических исследований (Рис. 2.5. Г) не только на поясничном уровне спинного мозга у грызунов, но и на грудном уровне спинного мозга у крысы.

Показано, что пластинка IV пересекает срединную линию у крысы только в сегментах L3-S4 (Molander et al., 1984, 1989; Grant, Koerber, 2004), у мыши в сегментах C1-L6 (Sengul et al., 2013), на других уровнях спинного мозга у крысы она прерывается или областью поля X, или областью дорсального ядра (Grant, Koerber, 2004), у мыши крестцовыми дорсальными комиссуральными ядрами (Sengul et al., 2012). В тоже время, показано, что интернейроны области медиального края дорсального рога участвуют в формировании дорсальной комиссуральной области всего спинного мозга, соединяя правый и левый дорсальные рога спинного мозга мыши (Zhang et al., 2014).

Пластинка V образована клетками разных размеров и формы. Расположение клеток менее плотное, чем в пластинке IV. Среди клеток преобладают крупные, которые в отличие от предыдущей пластинки, занимают практически всю шейку дорсального рога спинного мозга. В пластинке V наблюдается четкое разграничение её на медиальную и латеральную части в области дорсального рога. Критерием деления является ориентация клеточных

тел: в медиальной части пластинки V, что соответствует центральной части рога, расположены клетки с преимущественной дорсовентральной ориентацией тел; в латеральной части пластинки V, что соответствует одноименной части рога - клетки с различной ориентацией тел.

Пластинка VI на изучаемом сегментарном уровне отсутствует, и основание дорсального рога относится к дорсальной части пластинки V, где клетки не отличаются от клеток вентральной части пластинки V.

Таким образом, в T2 сегменте спинного мозга взрослой крысы верхушка дорсального рога образована только пластинкой I, что показано у всех млекопитающих (Steiner, Turner, 1982; Molander et al., 1984, 1989; Grant, Koerber, 2004; Ribeiro-da-Silva, 2004; Schoenen, Faull, 2004; Sengul et al., 2013). В головке дорсального рога T2 сегмента спинного мозга у крысы располагаются пластинки II, III и IV, что характерно и для мыши (Steiner, Turner, 1982; Sengul et al., 2013), но отличается как от данных Терминологии (МАТ, Колесников, 2003), так и от данных, полученных на различных млекопитающих, включая человека (Rexed, 1952; Пивченко, 1993; Schoenen, Faull, 2004), в которых головка рога образована только пластинкой II.

Распределение относительных величин по средним значениям площадей пластинок дорсального рога к общей площади серого вещества показало, что большая часть рога представлена пластинками IV ($0,155 \text{ мм}^2$) и V ($0,166 \text{ мм}^2$), на долю которых приходится 16,3% и 17,5% соответственно, меньшую часть рога занимает пластинка I – $0,027 \text{ мм}^2$ (2,8%). Пластинки II ($0,087 \text{ мм}^2$) и III ($0,089 \text{ мм}^2$) по показателям значимо не отличаются – 9,1% и 9,4% соответственно. Планиметрический анализ поперечного среза спинного мозга по параметру площади показал, что доля дорсального рога составила 56,1%: из этого 55,1% приходится на пластинки I-V, а 1,0% – на дорсальное ядро, топография которого будет обсуждена ниже.

2.2.1.2. Анализ пластинки VII промежуточной зоны спинного мозга

Пластинка VII дорсально имеет ясно видимую границу, отделяющую её от пластинки V. Граница образована интернейронами, располагающимися между дорсальным рогом и промежуточной зоной. Эти разделительные интернейроны имеют веретеновидную форму с поперечной медиально-латеральной ориентацией клеточных тел и расположены в виде узкой полосы от поля X к латеральному краю дорсального рога с переходом интернейронов в белое вещество латерального канатика – в область латеральных спинальных ядер, которые обнаруживаются в белом веществе латерально от серого вещества в области перехода головки дорсального рога в его шейку.

В конце XX века нейрофизиологи заявили о присутствии в сером веществе СМ не только симпатических преганглионарных нейронов, но и симпатических интернейронов, которые не образуют ядер. Н.А. Clarke et al. (1998) определяют их в базальной части дорсального рога, признавая за пластинкой V висцеросенсорную функцию.

Х. Tang et al. (2003) определяют симпатические интернейроны в промежуточной зоне дорсальнее преганглионарных нейронов и в медиальных частях пластинок I-IV дорсального рога спинного мозга.

Интересно, что на границе V и VII пластинок расположены разделительные клетки, выделенные топографически именно как «cell partitions» (Barber et al., 1984), которые, возможно, и являются симпатическими интернейронами (Stepien et al., 2010). Это не исключает их иную локализацию: медиальные части пластинок I-V содержат мультиполярные интернейроны, относящиеся к премоторным (Miles et al., 2007; Liu et al., 2010; Porseva et al., 2015), то есть связанными как с симпатическими преганглионарами (Tang et al., 2003), так и с мотонейронами (Stepien et al., 2010).

Вентральнее этих разделительных интернейронов, в пластинке VII присутствуют интернейроны овальной, треугольной, звездчатой и

веретеновидной формы, различных размеров и ориентации клеточных тел, равномерно распределенные в пределах самой пластинки.

Пластинка VII составляет 12,5% (0,119 мм²) от общей площади серого вещества спинного мозга на его поперечном срезе. В этот показатель не учитывалась площадь ядер, локализованных в промежуточной зоне спинного мозга: дорсального, промежуточно-латерального, вставочного, промежуточно-медиального.

2.2.1.3. Анализ пластинок вентрального рога спинного мозга

Пластинку VIII образуют нейроны разных размеров от мелких до крупных и разных форм клеточного тела с различной ориентацией отростков. Плотность нейронов в пластинке VIII еще меньше, чем в пластинке VII. Пластинка VIII внедряется в вентральный рог и соседствует с пластинкой IX.

Граница, отделяющая пластинку VIII от пластинки VII, проходит вентральнее, как от вентральной серой спайки, так и от латерального рога, но дорсальнее вентролатеральной группы мотонейронов пластинки IX.

Пластинку IX образуют крупные и мелкие многоугольные и треугольные нейроны, которые формируют две выраженные группы в апикальной (верхушечной) области рога. Одна группа локализуется в медиальной области рога – вентромедиальная группа мотонейронов, другая – в латеральной области рога – вентролатеральная группа мотонейронов.

Мотонейроны пластинки IX отличаются от интернейронов пластинки VIII преимущественно многоугольной формой клеточных тел и обилием в них крупных гранул нисслевского вещества. Самыми крупными в вентральном роге обычно считают мотонейроны, но их детальные исследования показывают, что они имеют различные размеры. С учетом размеров и функциональных характеристик, мотонейроны в спинном мозге разделяют на крупные – α и мелкие – β и γ (Гилерович и др., 2007; Яценко, Лютикова, 2012; Порсева, 2014; Barber et al., 1982; Molander et al., 1984; Calka et al., 2008).

Большая часть вентрального рога образована пластинкой VIII, на долю которой приходится 12,1% (0,115 мм²) от всей площади серого вещества, в два раза меньший процент приходится на пластинку IX, в которой вентромедиальная и вентролатеральная группы мотонейронов занимают 3,0% (0,029 мм²) и 3,3% (0,031 мм²) соответственно.

2.2.1.4. Анализ поля X спинного мозга

Поле X соответствует серому веществу, непосредственно окружающему центральный канал, состоит из мелких овальных, треугольных, веретеновидных и многоугольных нейронов. Интернейроны поля X отличаются от рядом расположенных клеток пластинок IV и VII, дорсального и промежуточно-медиального ядер, более мелкими размерами и кучностью расположения вокруг центрального канала. Граница поля X проходит дорсовентрально латеральнее центрального канала, смежно с пластинкой VII промежуточной зоны спинного мозга.

На срезах, окрашенных по Нисслю для световой микроскопии (рис. 2.6. А, Б) или с использованием красителя, флюоресцирующего в красной области спектра NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains (рис. 2.6. В) на поперечном срезе спинного мозга в дорсальной серой спайке поля X, вентральнее одиночных клеток пластинки IV, отчетливо видно скопление интернейронов преимущественно овальной и треугольной формы с поперечной ориентацией отростков (рис. 2.6. А, В). В окружности центрального канала – в центральной части поля X и вентральной серой спайке интернейронов меньше, форма и ориентация отростков их различная (Рис. 2.6. Б).

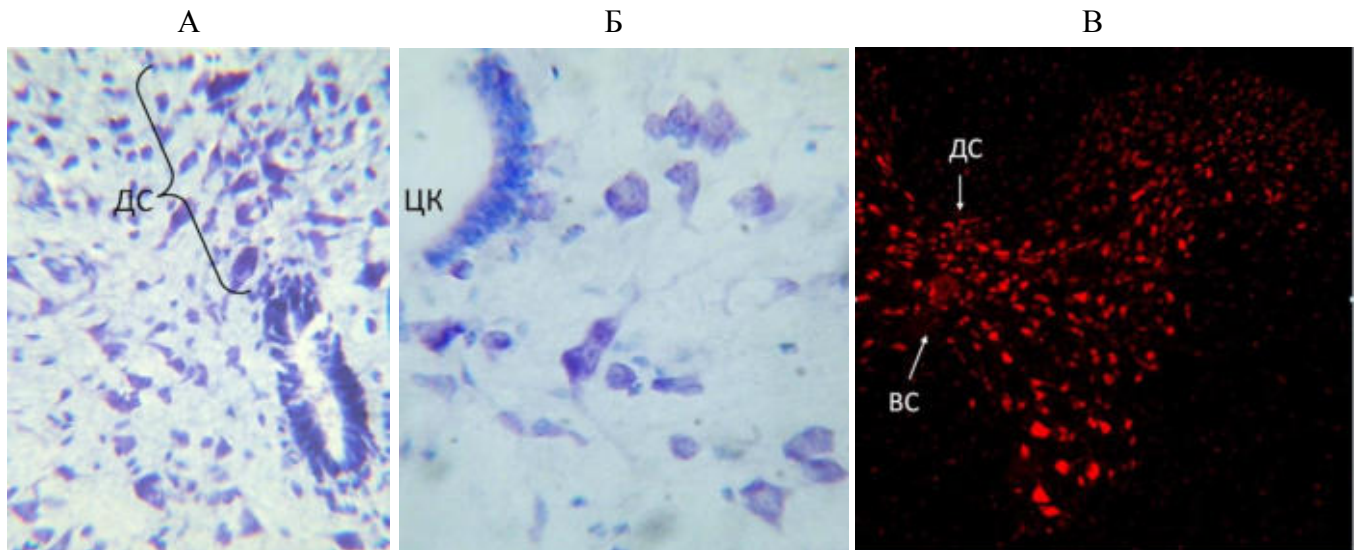


Рисунок 2.6. Интернейроны поля X второго грудного сегмента спинного мозга крысы.

А: окраска по Нисслю, об. 20, ок. 7. Б: окраска по Нисслю, об. 40, ок. 7.

В: окраска NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains, об. 4, ок. 10.

Обозначения: ДС – дорсальная серая спайка; ЦК – центральный канал, ВС – вентральная серая спайка.

Данные литературы (Nahin et al., 1983; Grant, Koerber, 2004; Freire et al., 2009) и результаты собственных исследований свидетельствуют о гетерогенности интернейронов поля X по форме клеточных тел и направленности отростков, что очевидно связано с их функциональными характеристиками. В поле X выделяют центральное автономное ядро, локализованное в дорсальной серой спайке (Barber et al., 1984; Deuchars et al., 2005), форма и направленность клеточных тел и отростков нейронов которого соответствует описанным выше.

Р.А. Motavkin и Т.В. Dovbysh (1970) выделили в окружности центрального канала нейроны периферического отдела вегетативной (автономной) нервной системы, иннервирующие интрамедуллярные кровеносные сосуды, паравазальную соединительную ткань, астроглиальные мембраны и эпендимную оболочку центрального канала. Помимо этого, в окружности центрального канала, эпендимной оболочке и в зонах облитерации центрального канала у человека и животных (кролик, кошка, собака) были обнаружены псевдоуниполярные нейроны (Мотавкин, Черток, 2008), которые, будучи по

форме и, видимо, по функции первичными чувствительными, могут взаимодействовать с нервными центрами мозга.

Как видно, вокруг центрального канала функционирует сложный кластер интернейронов: преганглионарные нейроны автономной нервной системы; симпатocyты, осуществляющие иннервацию сосудов спинного мозга. Что касается чувствительных нейронов, то нахождение в спинном мозге их групп не должно вызывать сомнения в достоверности: морфологам физиологам хорошо известен факт эктопии первичных чувствительных нейронов, образующих среднемозговое ядро тройничного нерва.

Функциональная роль нейронов поля X в спинном мозге до сих пор не совсем ясна, а с учетом «комиссуральности» поля X – многочисленности немиелизированных волокон, проходящих из одной половины серого вещества спинного мозга в другую, особенно дорсально от центрального канала, позволяет предполагать интегративно-координационную функцию поля X, характерную в целом для промежуточного вещества спинного мозга млекопитающих (Пивченко, 1993).

В связи с этим, на данном этапе исследования поле X было топографически разделено на области:

- непосредственно дорсальную и вентральную серые спайки – области, расположенные кпереди и кзади от центрального канала (MAT, 2003; NAV, 2012) и входящие в состав поля X (TNA, 2017);
- правую и левую центральные части – области серого вещества, расположенные около центрального канала и ограниченные вентрально и дорсально соответствующими серыми спайками, а латерально пластинкой VII, промежуточно-медиальным и дорсальным ядрами (Рис.2.5.А).

Распределение относительных величин по средним значениям площадей выделенных частей поля X к общей площади серого вещества показало, что большую часть занимают серые спайки, на долю которых приходится 2,9%, меньшую часть центральные части – 1,0%. Дорсальная серая спайка – 0,014 мм² (1,5%) чуть превышает площадь вентральной – 0,013 мм² (1,4%) серой спайки

поля X спинного мозга. Правая и левая центральные части значимо не различаются: на каждую приходится 0,6% (по 0,006 мм²). Доля поля X составила 4,1%: из этого 3,9% приходится непосредственно на её части, а 0,2% занимает часть промежуточно-медиального ядра, расположенная в центральной части поля X, топография которого будет обсуждена ниже.

2.2.1.5. Гистотопография ядер спинного мозга

В дорсальном роге располагаются ядра, которые соответствуют его пластинкам, топография их описана выше:

- *краевое ядро* – пластинка I;
- *студенистое вещество* – пластинка II;
- *собственное ядро* – пластинки III и IV.

В медиальной области основания дорсального рога на стыке двух пластинок различных частей серого вещества спинного мозга – пластинки V дорсального рога и пластинки VII промежуточной зоны можно выделить область расположения нейронов дорсального ядра или заднего грудного ядра (MAT, 2003; TNA, 2017), или грудного ядра (NAV, 2012; МВАН, 2013), у крысы описываемого как дорсальное ядро (Barber et al., 1982, 1984; Molander et al., 1984, 1989; Grant, Koerber, 2004; Sengul et al., 2013).

Дорсальное ядро имеет овальную форму (рис. 2.4. Б, В), сжатую дорсовентрально, включает мелкие, средние и крупные клетки различной формы с различной ориентацией клеточных тел и проксимальных частей отростков, что отличает область ядра от дорсомедиальной направленности клеточных тел рядом располагающейся области медиального края дорсального рога спинного мозга (пластинка IV) и поперечной направленности мелких клеток дорсальной серой спайки (поле X), и от дорсовентральной направленности клеток медиальной части пластинки V. Неупорядоченная ориентация клеточных тел в ядре позволяет отличить его от разделительных клеток пластинки VII и интернейронов дорсальной серой спайки поля X.

Дорсальное ядро имеет площадь $0,019 \text{ мм}^2$, располагается в медиальных частях пластинок V ($0,0095 \text{ мм}^2$) и VII ($0,0095 \text{ мм}^2$), медиально примыкает к дорсальной серой спайке поля X, дорсально к пластинке IV.

Топографически область дорсального ядра расширяется в каудальном направлении спинного мозга (Sengul et al., 2012), но не выходит за пределы дорсального рога в T2 сегменте спинного мозга, располагаясь на границе пластинок IV и V у мыши (Sengul et al., 2013). У крысы дорсальное ядро локализуется более вентрально и прослеживается в верхних грудных сегментах спинного мозга не только в дорсальном роге, но и в промежуточной зоне спинного мозга (Grant, Koerber, 2004), что также наблюдается и в нашей работе.

У грызунов форма ядра является округлой, овальной или овоидной (Molander et al., 1984, 1989; Sengul et al., 2012), в отличие от кошек, у которых наблюдается шаровидная форма ядра, а уплощение ядра и смещение его в сером веществе в дорсолатеральном направлении является характерным только для самого каудального уровня его локализации – L3-L4 у кошки (Меркульева и др., 2016) и L2 у крысы (Molander et al., 1984).

Расположение дорсального ядра исключительно в промежуточной зоне спинного мозга согласно современной терминологии, по-видимому, обусловлено первоначально описанной ламинарной организацией серого вещества спинного мозга с топографией столбов Кларка у кошки – более вентрально в медиальной части пластинки VII, распространяясь от T3-4 до L3-4 сегментов спинного мозга (Rexed, 1952).

Промежуточно-медиальное ядро имеет шаровидную форму и является смежным, располагаясь в медиальной части промежуточной зоны на стыке пластинки VII и поля X таким образом, что оказывается встроенным в эти обе пластинки. Ядро содержит мелкие и средние нейроны преимущественно овальной и треугольной формы с различной ориентацией тел и направленностью их отростков, кучность расположения которых позволяет отличить нейрональный состав ядра от клеток пластинки VII и поля X.

Промежуточно-медиальное ядро имеет площадь 0,011 мм², располагается на границе медиальной части пластинки VII (0,0095 мм²) и центральной части поля X (0,0019 мм²).

Вставочное спинномозговое ядро располагается вентральнее разделительных нейронов пластинки VII в промежуточной зоне спинного мозга в виде узкой полоски мелких и средних нейронов овальной и треугольной формы, с характерной медиально-латеральной (поперечной) направленностью продольных размеров клеточных тел. Клетки ядра по их отросткам прослеживаются от дорсальной серой спайки поля X, располагаясь дорсальнее промежуточно-медиального ядра и вентральнее дорсального ядра, до латерального рога спинного мозга. В области латерального рога нейроны группируются в главное симпатическое ядро.

Таким образом, у крысы вставочное ядро локализуется исключительно в промежуточной зоне спинного мозга – в центральной части пластинки VII, клетки которого формируют «мостик» или «дорожку», соединяющие промежуточно-латеральное ядро с центральным автономным полем, локализованным, вероятно, в дорсальной серой спайке поля X. Площадь вставочного ядра составляет 0,030 мм².

У мыши интернейроны вставочного ядра в T2 сегменте спинного мозга не продолжают в область дорсальной серой спайки поля X, располагаются так же, как и у крысы в области центральной части промежуточной зоны, но соединяют область промежуточно-латерального ядра с областью промежуточно-медиального ядра и центральной частью поля X (Sengul et al., 2013).

Промежуточно-латеральное ядро располагается в области латерального рога, имеет шаровидную форму. Клетки ядра четко идентифицируются в области латеральной трети пластинки VII и представлены нейронами, превышающими размеры таковых вставочного ядра, имеющие преимущественно овальную и треугольную форму клеточных тел различной ориентации и направленности отростков. Площадь промежуточно-латерального ядра составляет 0,035 мм².

Таким образом, у крысы форма ядер преганглионарных симпатических нейронов, расположенных в пластинке VII изменчива в связи с их медиально-латеральной протяженностью. Описанные клеточные формы преганглионарных нейронов следует дифференцировать от популяции разделительных клеток пластинки VII, которые имеют чаще вытянутую в дорсовентральном направлении форму и являются веретновидными (биполярными) нейронами (Barber et al., 1982; Порсева и др., 2014).

Планиметрический анализ показал, что доля серого вещества, которую занимают ядра от всей его площади, составила: для дорсального ядра – 2,0%, для промежуточно-медиального – 1,2%, для вставочного – 3,2%, для промежуточно-латерального – 3,7%.

2.2.1.6. Заключительные замечания

Результаты проведенного исследования показали, что первоначально представленная для кошки пластинчатая схема строения серого вещества спинного мозга (Rexed, 1954) может быть применима к спинному мозгу взрослой крысы, но имеются некоторые различия в детальности ориентации и топографии некоторых пластинок, а также расположения групп клеток, формирующих ядра во втором грудном сегменте спинного мозга у крысы. Более того, результаты демонстрируют и некоторое расхождение внутри одной таксономической группы «отряд грызуны → подотряд мышеобразные», а именно с ядерной организацией серого вещества спинного мозга мыши.

Действительно, выделение границ пластинок и ядер часто оказывалось неоднозначным, наводящим на размышления, но разграничение их стало возможным с учетом качественной (форма, ориентация клеточных тел и проксимальных частей отростков), количественной (плотность расположения) и функциональной характеристик клеток их составляющих.

Особенности топографии серого вещества в Т2 сегменте спинного мозга взрослой крысы заключаются в следующем:

- в головке дорсального рога располагаются не две, а четыре пластинки – от I до IV, параллельно друг другу;
- в шейке дорсального рога располагаются две пластинки – IV и V, граница между которыми проходит не поперечно, а продольно; меньшая часть шейки – только область медиального края принадлежит пластинке IV;
- пластинка IV участвует в формировании дорсальной серой спайки, но её можно отграничить от поля X;
- дорсальный рог действительно является отделенным от промежуточной зоны разделительными нейронами пластинки VII;
- ядра, первоначально описанные в промежуточной зоне спинного мозга, оказались принадлежащими различным частям и пластинкам серого вещества:
 - *дорсальное ядро* дорсальному рогу (пластинка V) и промежуточной зоне (пластинка VII);
 - *промежуточно-медиальное ядро* – промежуточной зоне (пластинка VII) и полю X;
 - *симпатические преганглионарные нейроны* – поперечная протяженность в промежуточной зоне (латеральный рог, пластинка VII) и поле X;
- в промежуточной зоне представляется возможным определить расположение интернейронов вставочного ядра, которое отсутствует в NAV (2012), МВАН (2013);
- в поле X выделяются не только области вентральной и дорсальной спаек, но и правая и левая центральные части, располагающиеся непосредственно около центрального канала.

Особенности цитоархитектоники серого вещества на поперечном срезе Т2 сегмента спинного мозга взрослой крысы заключаются в следующем:

- плотность расположения клеток в пластинках уменьшается дорсовентрально: от выраженной густоты клеток в пластинках I, II, III, IV; менее плотного расположения в пластинках V и VII; и более редкого в пластинке VIII;
- размер клеток в пластинках увеличивается дорсовентрально: самые мелкие клетки располагаются преимущественно в пластинках I, II, III; затем клетки начинают укрупняться от пластинки IV к пластинкам V и VII; до максимальных крупных размеров в пластинках VIII и IX;
- изменение плотности расположения и размеров нейронов является характерным не только для пластинчатой, но и для ядерной организации спинного мозга: уменьшение клеточной плотности и увеличение размеров прослеживается в дорсовентральном направлении от краевого ядра (пластинка I) до ядер мотонейронов (пластинка IX);
- форма клеточных тел и направленность проксимальных частей отростков в пластинках также изменяются в дорсовентральном направлении, проявляясь гетерогенностью: от преимущественно дорсовентральной ориентации овальных и веретеновидных клеток в пластинках I, II, III, IV до различных клеточных форм и ориентаций в пластинках, располагающихся всё более вентральнее в сером веществе спинного мозга;
- **исключение составляют:**
 - *пластинка I*: присутствует популяция крупных клеток;
 - *поле X*: интернейроны имеют преимущественно мелкие размеры и кучность расположения около центрального канала; но прослеживается всё та же дорсовентральность, характерная в целом для серого вещества – в дорсальной части (дорсальной серой спайке) плотность расположения интернейронов больше, чем в областях поля X, расположенных вентральнее;
 - *вставочное ядро и разделительные нейроны*: расположение интернейронов и их ориентация являются поперечными.

Особенности распределения пластинок и ядер по показателю площади в сером веществе T2 сегмента спинного мозга взрослой крысы заключаются в следующем:

- из частей – наибольшую площадь серого вещества занимает дорсальный рог, наименьшую – поле X;
- из пластинок – наибольшую площадь серого вещества занимает пластинка V, наименьшую – пластинка I;
- из ядер – наибольшую площадь серого вещества занимают ядра дорсального рога (собственное ядро, студенистое вещество), наименьшую – промежуточно-медиальное ядро;
- данные представляют интерес для изучения в сравнительном аспекте изменений постнатального онтогенеза и уровневой организации серого вещества спинного мозга.

Применение морфометрического анализа клеточных популяций позволит с большей достоверностью судить о нейрональном составе пластинок и ядер серого вещества спинного мозга, рассмотрению которого будет посвящена Глава 3.

2.2.2. ОСОБЕННОСТИ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА ГРУДНОГО СПИННОГО МОЗГА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫСЫ

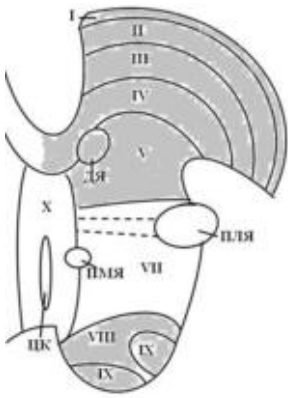
Изменения в строении серого вещества на поперечном срезе спинного мозга в постнатальном онтогенезе изображены в виде схем на *Рисунке 2.7*.

В возрасте 3 и 5 дней из всех выделяемых частей на срезе превалирует по размерам, и выражен - дорсальный рог, в котором отчетливо визуализируется большая головка и суженная короткая шейка, последняя переходит медиально в дорсальную серую спайку и вентрально в промежуточную зону. Меньшая область серого вещества выступает вперед, формируя вентральный рог, который является широким и только незначительно выступает. Отчетливо выделяется в латеральной части промежуточной зоны латеральный рог в виде выступа серого вещества, который соприкасается дорсально с шейкой дорсального рога спинного мозга. Область поля X занимает большое пространство в связи со значительной протяженностью в дорсовентральном направлении.

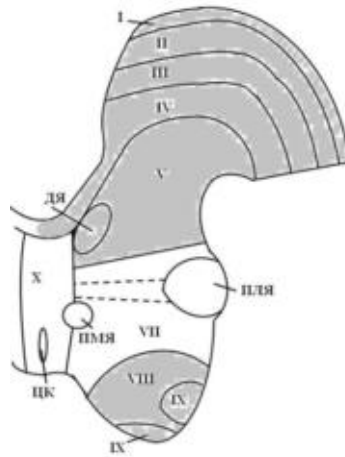
В 7-дневном возрасте при сохранении преобладающего размера дорсального рога, обнаружены изменения в конфигурации вентрального рога, который становится более вытянутым вентрально, что фактически выравнивает его продольный и поперечный размеры. Дорсальный рог также вытягивается дорсально, отчетливо прослеживается его суженная шейка, которая становится более длинной. Контур выступа латерального рога сглаживается. Ширина поля X незначительно уменьшается.

В 10-дневном возрасте изменяется форма дорсального рога: переход головки в шейку не выражен, последняя становится сглаженной и по поперечному размеру соответствует головке. Дорсальный рог становится широким, значительно выступает латеральный рог. Ширина поля X продолжает уменьшаться.

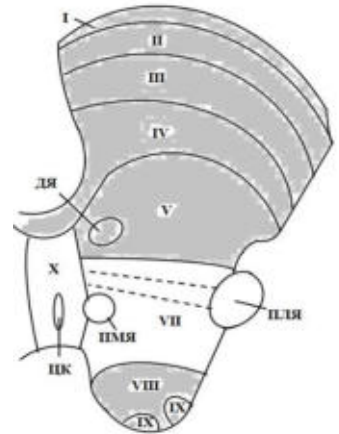
3-дневный



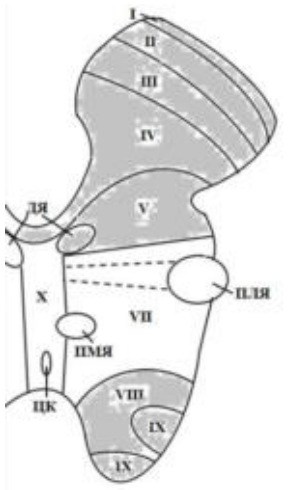
7-дневный



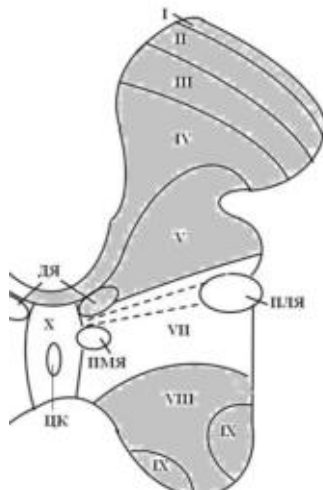
10-дневный



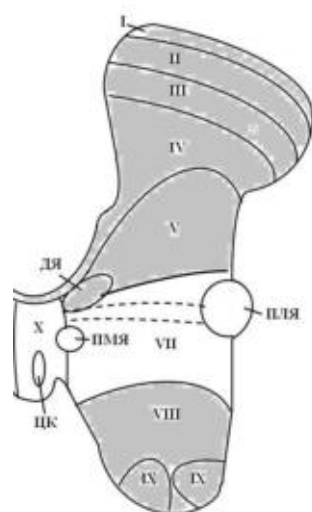
15-дневный



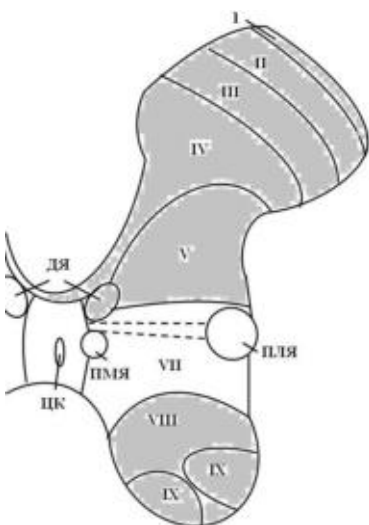
20-дневный



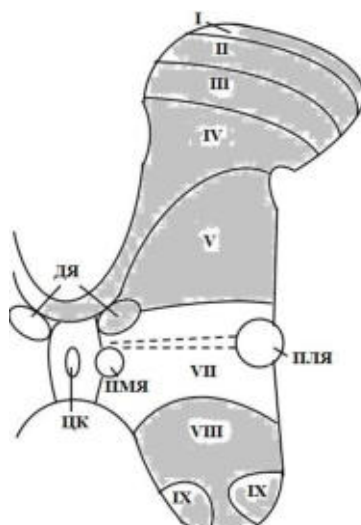
30-дневный



60-дневный



90-дневный



180-дневный

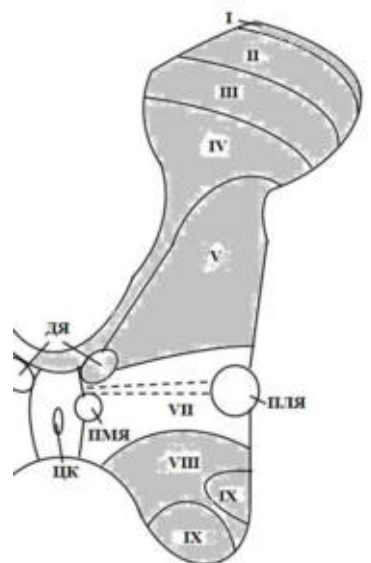


Рисунок 2.7. Серое вещество второго грудного сегмента спинного мозга в постнатальном онтогенезе крысы. На схемах цветом выделены пластинки и ядра дорсального рога (I, II, III, IV, V, ДЯ-дорсальное ядро) и вентрального рога (VIII, IX).

В 15-дневном возрасте конфигурация всех частей серого вещества спинного мозга изменяется. Промежуточная зона и вентральный рог удлиняются, апикальная часть вентрального рога становится более узкой и вытянутой. На поперечном срезе дорсальный рог имеет следующие структуры: головку, переходящую в узкую шейку и расширяющееся вентрально основание рога. Контур выступа латерального рога сглаживается, но остается хорошо видимым.

В 20-дневном возрасте изменяется форма и размеры вентрального рога, он становится более выпуклым: увеличивается как продольный, так и поперечный его размер. Увеличивается размер дорсального рога при сохранности формы предыдущего возраста. Латеральный рог, напротив, еще больше сглаживается, едва выступая над основанием дорсального рога. Ширина поля X значительно уменьшается, в основном за счет уменьшения ширины дорсальной серой спайки, которая лишь незначительно превышает ширину вентральной серой спайки.

В 30-дневном возрасте изменяется строение серого вещества, что связано с еще большим удлинением его в дорсовентральном направлении: сглаживается переход головки в шейку дорсального рога, латеральный рог образует выступ, определяемый по расположению нейронов промежуточно-латерального ядра, вентральный рог становится более узким.

В 60-дневном возрасте головка дорсального рога закругляется и отклоняется латерально, отчетливо видна узкая шейка, переходящая в широкое основание рога. Латеральный рог формирует едва уловимый выступ. Вентральный рог округляется и также отклоняется латерально.

В 90-дневном возрасте еще больше суживается шейка дорсального рога, переход головки в шейку становится четко обозначенным. Данное строение серого вещества сохраняется до 180-дневного возраста крысы.

В 180-дневном возрасте изменяется строение серого вещества, что связано с удлинением его в дорсовентральном направлении: головка дорсального рога округляется и значительно выступает дорсально, апикальная часть головки суживается, шейка становится более узкой с четко дифференцируемым переходом в расширяющееся основание дорсального рога. Вентральный рог также

удлинняется и становится более узким, выступая полого вентрально. Конфигурация серого вещества не меняется до 360-дневного возраста крысы.

В 360-дневном возрасте прослеживается удлинение и сужение продольного размера, отмечается еще большее сужение в месте перехода головки дорсального рога в шейку (Рис. 2.8.).

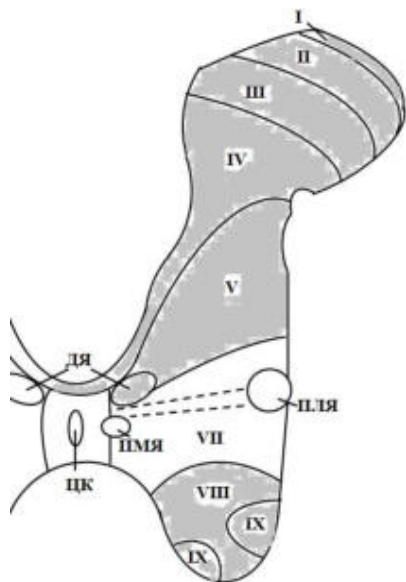


Рисунок 2.8. Серое вещество второго грудного сегмента спинного мозга в возрасте 360 дней жизни крысы.

На схеме цветом выделены пластинки и ядра дорсального рога (I, II, III, IV, V, ДЯ-дорсальное ядро) и вентрального рога (VIII, IX).

Средние значения площади серого вещества и его частей показаны в *Таблице 2.1.*

(Пояснения к таблице 2.1.: темп прироста показывает насколько процентов увеличилась (положительный прирост) или уменьшилась (отрицательный прирост) средняя площадь серого вещества спинного мозга данного возраста крысы по сравнению с предшествующим возрастом; ежедневный показатель прироста не вычислялся, так как не представляется возможным ответить на вопрос – в какой именно день жизни животного показатель изменялся более интенсивно и в какой менее интенсивно при анализе возрастных групп наблюдения).

Средние значения площади серого вещества ($S \times 10^4$, $\mu\text{км}^2$) на поперечном срезе второго грудного сегмента спинного мозга и темпы её прироста (Т, %) в различные возраста белой крысы

Возраст крысы (дни жизни)	Σ (общая)		Дорсальный рог		Промежуточная зона		Вентральный рог		Поле X	
	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T
3	32,39±0,63	-	18,16±0,58	-	6,62±0,15	-	3,01±0,06	-	4,60±0,08	-
5	36,03±0,40*	11,2	21,05±0,32*	15,9	7,15±0,16	8,0	3,29±0,06	9,3	4,54±0,05	-1,3
7	46,12±0,66*	28,0	28,55±0,69*	35,6	8,84±0,13*	23,6	4,07±0,05*	23,7	4,66±0,12	2,6
10	68,89±1,00*	49,4	38,38±1,04*	34,4	17,14±0,38*	93,9	8,75±0,17*	115,0	4,62±0,04	-0,9
15	81,48±0,81*	18,3	45,04±0,67*	17,4	17,18±0,29	0,2	14,64±0,27*	67,3	4,62±0,12	-
20	88,38±0,70*	8,5	50,18±0,58*	11,4	17,48±0,11*	1,7	16,44±0,33*	12,3	4,28±0,08*	-7,4
30	90,01±0,64	1,8	50,40±0,57*	0,4	18,87±0,13*	7,9	16,51±0,25	0,4	4,23±0,04	-1,2
60	94,88±0,44*	5,4	53,33±0,35	5,8	20,29±0,15*	7,5	17,27±0,30	4,6	3,99±0,03*	-5,7
90	95,22±0,42	0,4	53,40±0,22	0,1	20,40±0,27	0,5	17,49±0,34	1,3	3,93±0,04	-1,5
120	96,55±0,46	1,4	54,15±0,35*	1,4	20,80±0,23	1,9	17,67±0,34	1,0	3,93±0,06	-
150	99,52±0,57*	3,1	56,62±0,36*	4,6	21,19±0,21	1,9	17,80±0,17	0,7	3,91±0,03	-0,5
180	111,70±0,62*	12,2	66,93±0,34*	17,7	23,02±0,27*	7,2	17,85±0,29	0,3	3,90±0,03	-0,3
240	109,17±0,59	-2,3	65,85±0,47	-1,0	22,10±0,20	-2,7	17,71±0,31	-0,8	3,51±0,04*	-10,0
360	107,22±0,39	-1,8	64,46±0,31	-2,3	21,58±0,20	-2,4	17,68±0,12	-0,2	3,50±0,04*	-0,3

* - изменения достоверны в сравнении с данными предыдущего возраста крысы, $P < 0.05$

В постнатальном онтогенезе крысы средняя площадь серого вещества на поперечном срезе спинного мозга увеличивается до 180-дневного возраста, после чего незначительно уменьшается к 360-дневному возрасту.

Интенсивный рост площади серого вещества приходится на первые 20 дней жизни крысы, где увеличение показателя составляет 2,7 раза; в целом к 180-дневному возрасту площадь становится больше в 3,4 раза. В раннем постнатальном развитии максимальный прирост показателя отмечается в 10-дневном возрасте крысенка, что превышает размеры серого вещества 3-дневного возраста в 2,1 раза, но темп прироста по отношению к предыдущему возрасту (7-дневному) является самым наибольшим во всей исследуемой возрастной динамике – прирост площади составил 49,4%.

У взрослой крысы достоверное увеличение средней площади серого вещества спинного мозга наблюдается в возрасте 60, 150 и 180 дней, с наибольшим увеличением показателя на 180 день развития, где прирост составил более 10% (за 30 дней жизни крысы), в отличие от предыдущих указанных возрастов – где также 30-дневный прирост показателя не превышал 5%. Средняя площадь дорсального рога спинного мозга также увеличивается до 180-дневного возраста крысы – в 3,7 раза, без значимых изменений показателя до 360-дневного возраста крысы. Интенсивный рост площади дорсального рога наблюдается также в первые 20 дней жизни, показатель увеличивается в 2,8 раза. Прирост площади является относительно равномерным, то есть характерен для всех возрастных групп периода 20 дней жизни крысы. Высокие темпы прироста отмечаются только в возрасте 7 и 10 дней жизни крысенка, что соответствует 35,6% и 34,4%. У взрослой крысы отмечается значительный рост площади дорсального рога в 180-дневном возрасте с приростом показателя на 17,7%.

Средняя площадь промежуточной зоны спинного мозга увеличивается до 180-дневного возраста крысы в 3,5 раза. Интенсивный рост площади наблюдается в первые 10 дней жизни, показатель увеличивается в 2,6 раза. Максимальный рост показателя приходится на 10-дневный возраст крысенка, прирост составляет

93,9%. В возрасте 30, 60 и 180 дней жизни также отмечается рост показателя (прирост 7-8%).

Средняя площадь вентрального рога спинного мозга увеличивается до 20-дневного возраста крысы в 5,5 раза, затем рост площади является незначительным до 180-дневного возраста, увеличиваясь в 5,9 раза. Интенсивный рост показателя отмечается в 10 и 15 дневных возрастах, но темп прироста максимален в 10 дневном возрасте (115%).

Средняя площадь поля X не меняется до 15-дневного возраста, в 20-дневном возрасте наблюдается отрицательный прирост показателя. В последующие возраста площадь поля X продолжает уменьшаться, сопровождаясь отрицательными приростами, наиболее значимыми в возрасте 60 и 240 дней жизни крысы.

Таким образом, у крысы площадь серого вещества более интенсивно увеличивается в первые 20 дней жизни, что объясняет преобладание серого вещества над белым в раннем периоде постнатального онтогенеза млекопитающих (Писалева, 2012; Фасахутдинова и др., 2015).

Особый интерес представляют данные *Таблицы 2.2*.

Так, при сопоставлении показателей трехдневного крысенка и взрослой крысы в возрасте 90 дней жизни обнаруживается отсутствие изменений в процентном соотношении дорсального рога и промежуточной зоны ко всему серому веществу, при имеющемся возрастном увеличении показателя площади. Но, в тоже время, в 90-дневном возрасте по сравнению с трехдневным крысенком кардинально меняется соотношение вентрального рога, доля которого во всем сером веществе значительно увеличивается (почти в 2 раза) и поля X, доля которого уменьшается (в 3,5 раза).

Как видно, имеющая возрастная перестройка процентного участия частей серого вещества в его формировании обусловлена преимущественным увеличением доли вентрального рога в раннем постнатальном онтогенезе, а именно, в 10 и 15 дневных возрастах, и уменьшением доли поля X в 5, 7, 10, 15 и 20 дневных возрастах крысы.

Распределение частей серого вещества (%) по параметру площади на поперечном срезе второго грудного сегмента спинного мозга в различные возраста белой крысы

Возраст крысы	Дорсальный рог	Промежуточная зона	Вентральный рог	Поле X
3	56,07±0,79	20,44±0,47	9,29±0,18	14,20±0,26
5	58,42±0,90	19,85±0,43	9,13±0,16	12,60±0,13*
7	61,90±1,49	19,17±0,27	8,83±0,11	10,10±0,26*
10	55,71±1,51	24,88±0,55*	12,70±0,25*	6,71±0,06*
15	55,28±0,83	21,08±0,36	17,97±0,33*	5,67±0,15*
20	56,78±0,66	19,78±0,12	18,60±0,37	4,84±0,09*
30	56,00±0,63	20,96±0,14	18,34±0,28	4,70±0,05
60	56,21±0,37	21,38±0,16	18,20±0,31	4,21±0,04*
90	56,08±0,23	21,42±0,28	18,37±0,36	4,13±0,04
120	56,09±0,37	21,54±0,24	18,30±0,35	4,07±0,06
150	56,89±0,36	21,29±0,21	17,89±0,17	3,93±0,03
180	59,92±0,31*	20,61±0,24	15,98±0,26*	3,49±0,02*
240	60,32±0,43	20,24±0,18	16,22±0,29	3,22±0,04*
360	60,12±0,29	20,13±0,19	16,49±0,11	3,26±0,04

* - изменения достоверны в сравнении с данными предыдущего возраста, $P < 0.05$

В 10-дневном возрасте также увеличивается доля промежуточной зоны. С 30-дневного возраста и до 150-дневного возраста процентное соотношение частей серого вещества не меняется и соответствует 20-дневному возрасту крысы. Следующая перестройка частей серого вещества наблюдается в 180-дневном возрасте крысы вследствие увеличения доли дорсального рога и уменьшения долей других частей серого вещества, что сохраняется до 360-дневного возраста крысы. В целом, если анализировать средние значения площадей каждой части серого вещества по отдельности, то наблюдается тенденция к уменьшению их размеров с 240-дневного возраста крысы. Возможно, такая перестройка обусловлена возрастным удлинением именно грудных сегментов спинного мозга, что имеет место быть у грызунов (Козельская, 1974).

Возрастные изменения формы и соотношений частей серого вещества спинного мозга обусловлены периодами интенсивного увеличения площади – максимальными (наибольшими) приростами показателя и соответственно увеличением доли соответствующей части серого вещества: дорсального рога в возрасте 7 и 10 дней жизни, промежуточной зоны – в 10-дневном возрасте, вентрального рога – в возрасте 10 и 15 дней жизни крысы. Диаметралью от этих частей изменяются как показатели площади поля X, так и непосредственно доленое участие поля X в формировании серого вещества в T2 сегменте спинного мозга.

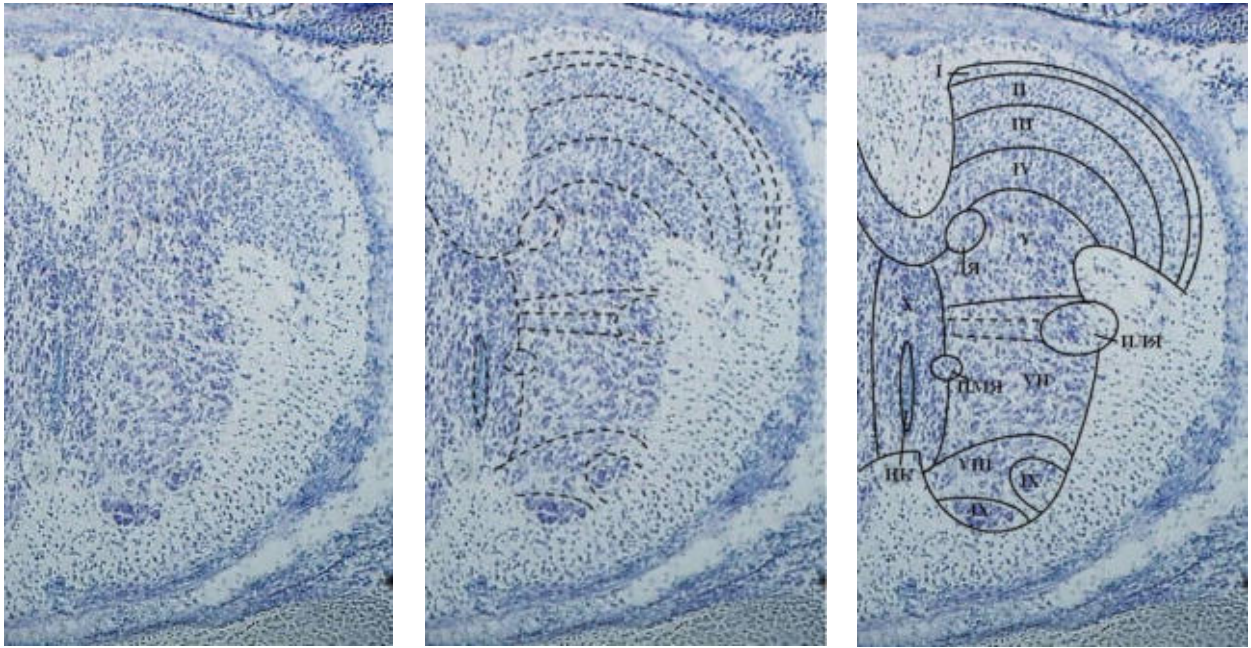
2.2.2.1. Возрастные особенности пластинок дорсального рога спинного мозга

Пластинчатая организация серого вещества в постнатальном онтогенезе крысы представлена на *Рисунке 2.9*.

В возрасте 3, 5 и 7 дней жизни крысенка в области головки дорсального рога спинного мозга располагаются пластинки I, II, III, IV. Место перехода головки в шейку является наиболее узкой частью дорсального рога CM и одновременно границей, отделяющей пластинку IV от пластинки V. Большую часть шейки дорсального рога занимает пластинка V. Пластинка IV располагается не только в головке, но и в области медиального края шейки дорсального рога вплоть до дорсальной серой спайки.

Пластинка I соответствует верхушке головки и в виде узкого ободка, занимает всю выпуклую часть головки, образована мелкими клетками различной формы и направленности клеточных тел, расположенных менее плотно, чем в пластинке II.

А: 3-дневный возраст



Б: 7-дневный возраст

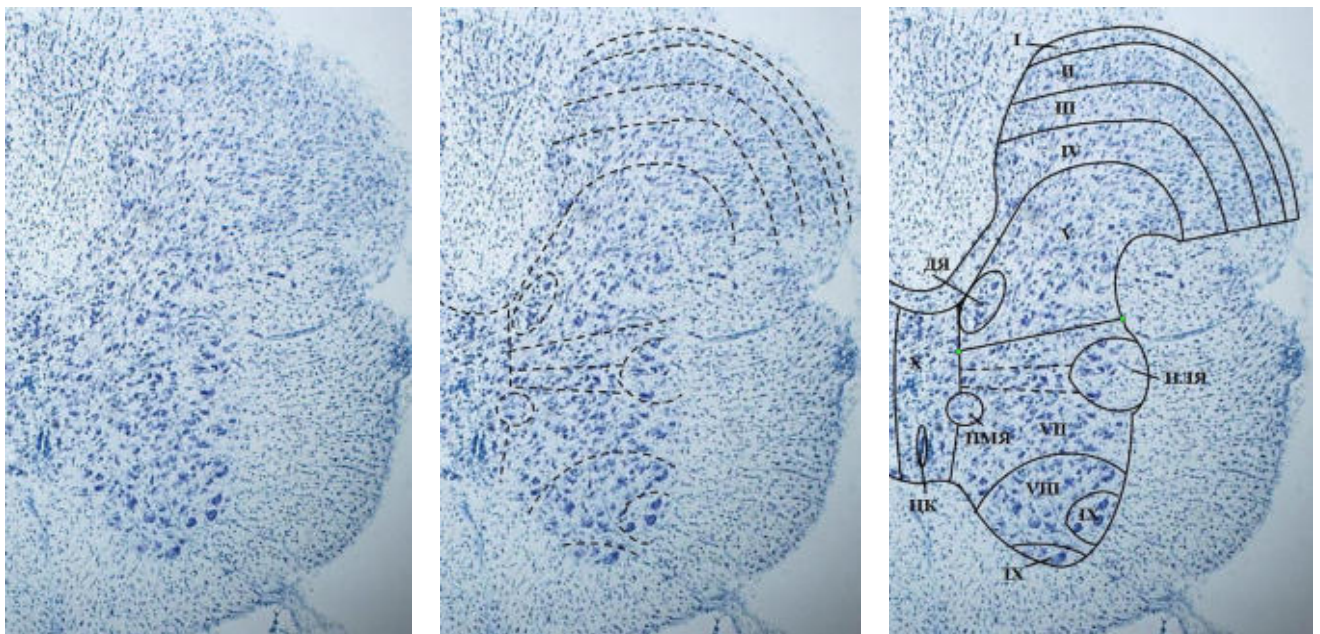
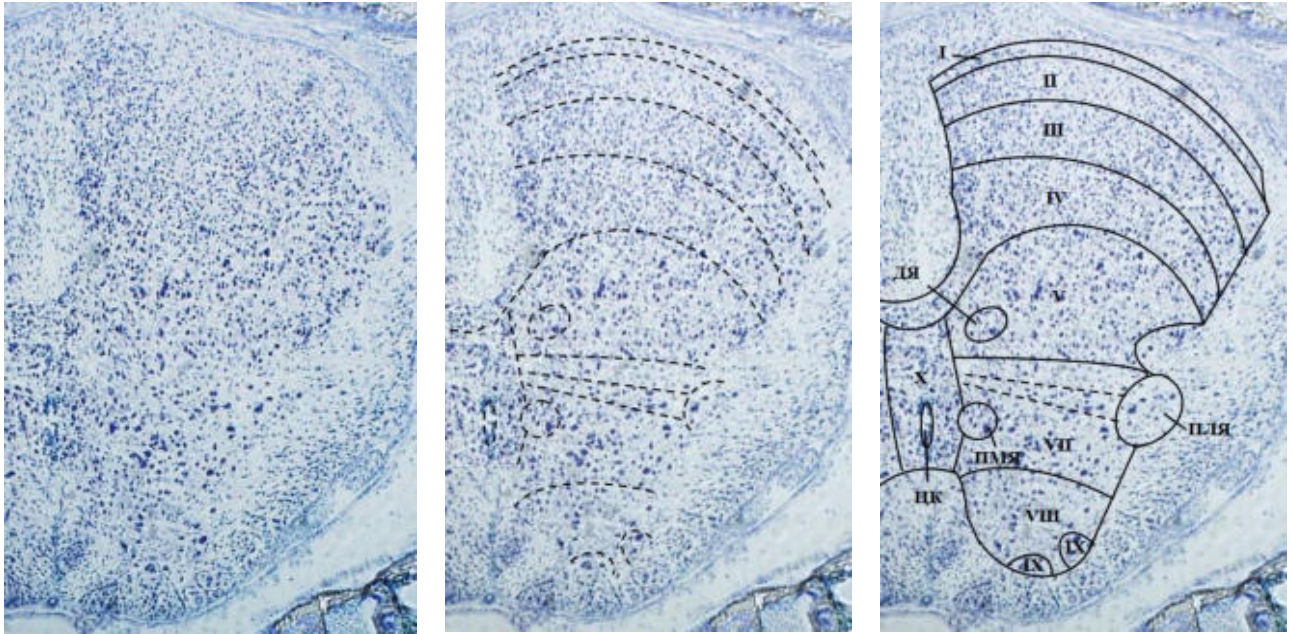


Рисунок 2.9. А, Б. Серое вещество второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Нислю. Об. 4, ок. 10.

Пунктирными и сплошными линиями обозначены пластинки - римскими цифрами (I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X) и ядра (ДЯ - дорсальное, ПМЯ - промежуточно-медиальное, ПЛЯ - промежуточно-латеральное).

В спинномозговом поле X выделен центральный канал (ЦК). В пластинке VII между пунктирными линиями располагаются интернейроны вставочного ядра.

В: 10-дневный возраст



Г: 15-дневный возраст

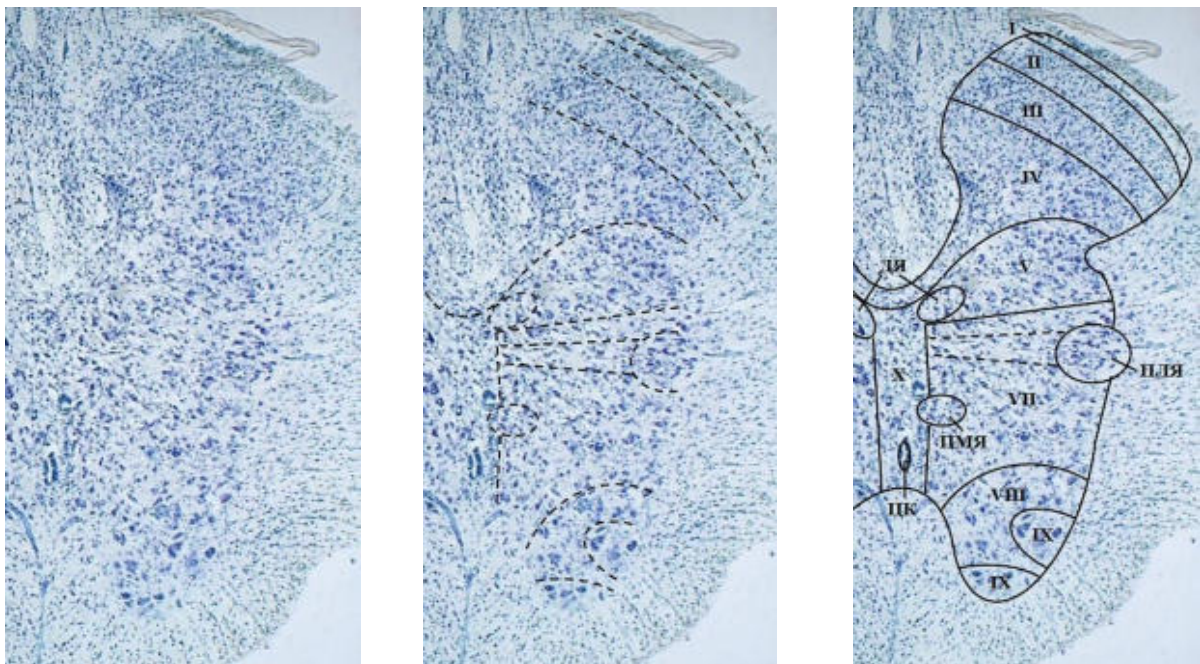
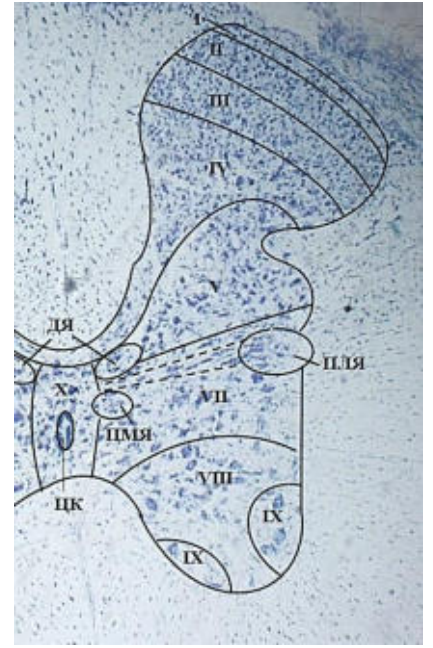
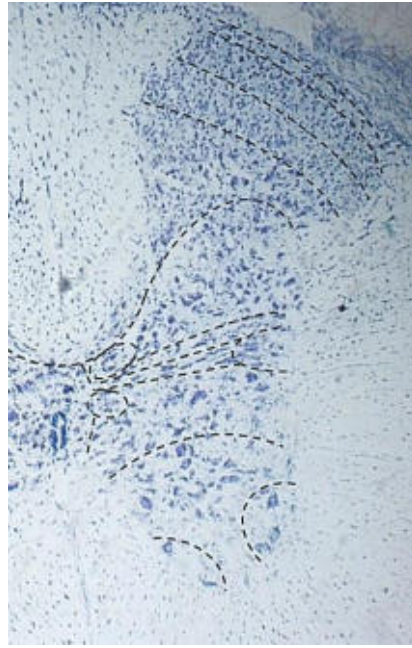
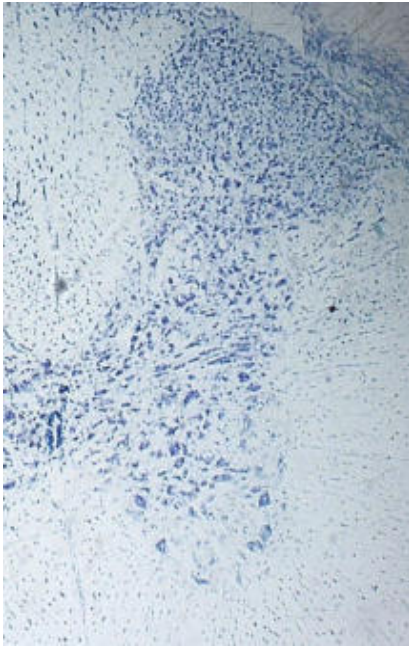


Рисунок 2.9. В, Г. Серое вещество второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Нисслю. Об. 4, ок. 10.

Пунктирными и сплошными линиями обозначены пластинки - римскими цифрами (I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X) и ядра (ДЯ - дорсальное, ПМЯ - промежуточно-медиальное, ПЛЯ - промежуточно-латеральное).

В спинномозговом поле X выделен центральный канал (ЦК). В пластинке VII между пунктирными линиями располагаются интернейроны вставочного ядра.

Д: 20-дневный возраст



Е: 30-дневный возраст

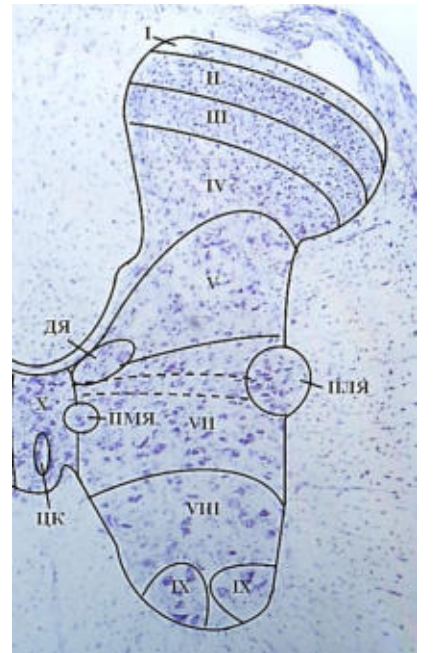
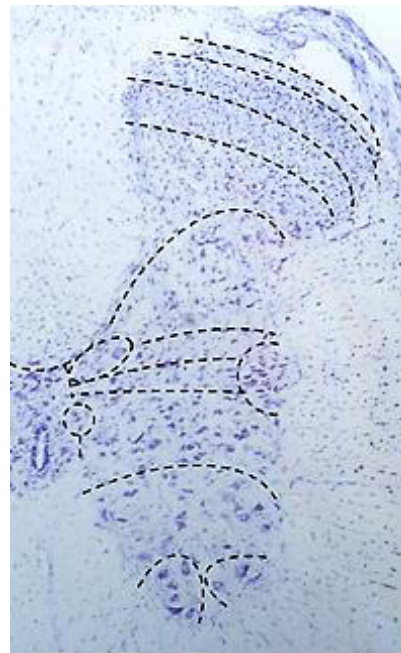
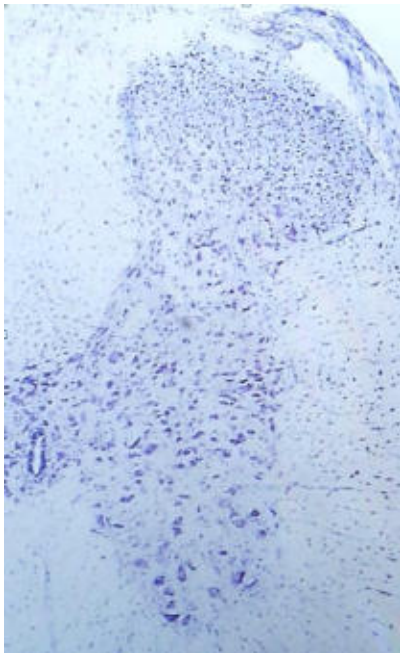
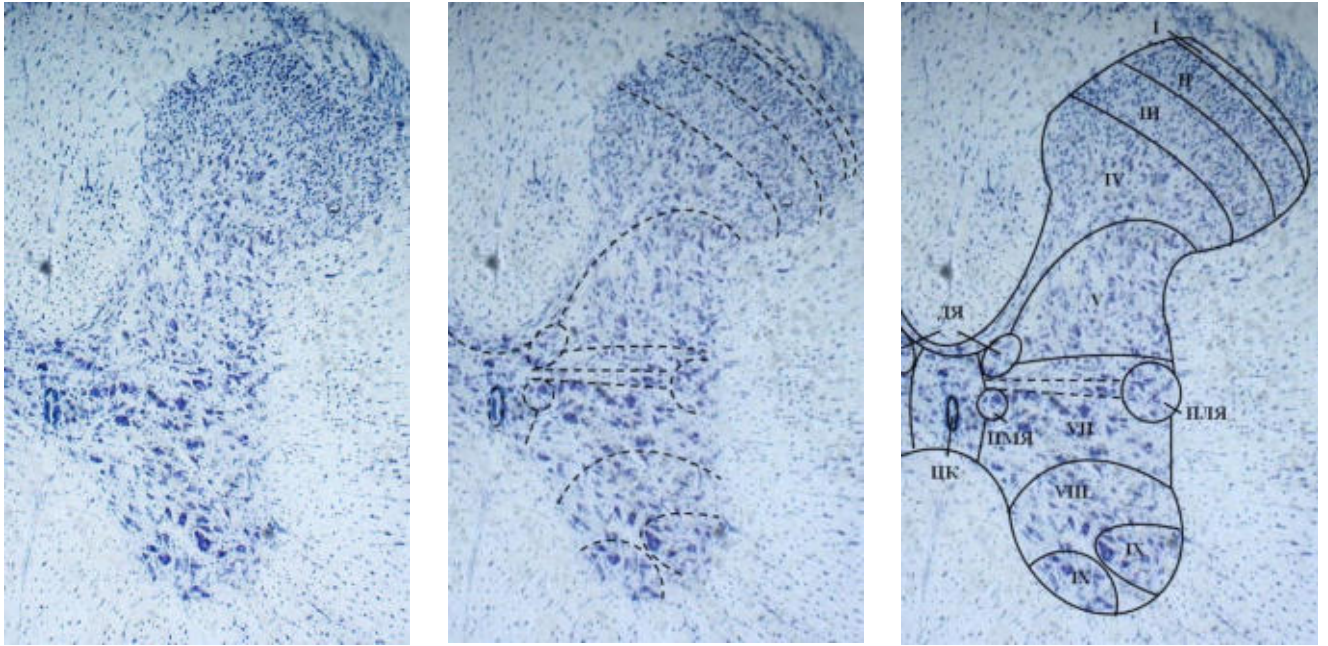


Рисунок 2.9. Д, Е. Серое вещество второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Нисслию. Об. 4, ок. 10.

Пунктирными и сплошными линиями обозначены пластинки - римскими цифрами (I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X) и ядра (ДЯ - дорсальное, ПМЯ - промежуточно-медиальное, ПЛЯ - промежуточно-латеральное).

В спинномозговом поле X выделен центральный канал (ЦК). В пластинке VII между пунктирными линиями располагаются интернейроны вставочного ядра.

Ж: 60-дневный возраст



З: 180-дневный возраст



Рисунок 2.9. Ж, З. Серое вещество второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Ниссля. Об. 4, ок. 10.

Пунктирными и сплошными линиями обозначены пластинки - римскими цифрами (I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X) и ядра (ДЯ - дорсальное, ПМЯ - промежуточно-медиальное, ПЛЯ - промежуточно-латеральное).

В спинномозговом поле X выделен центральный канал (ЦК). В пластинке VII между пунктирными линиями располагаются интернейроны вставочного ядра.

И: 360-дневный возраст

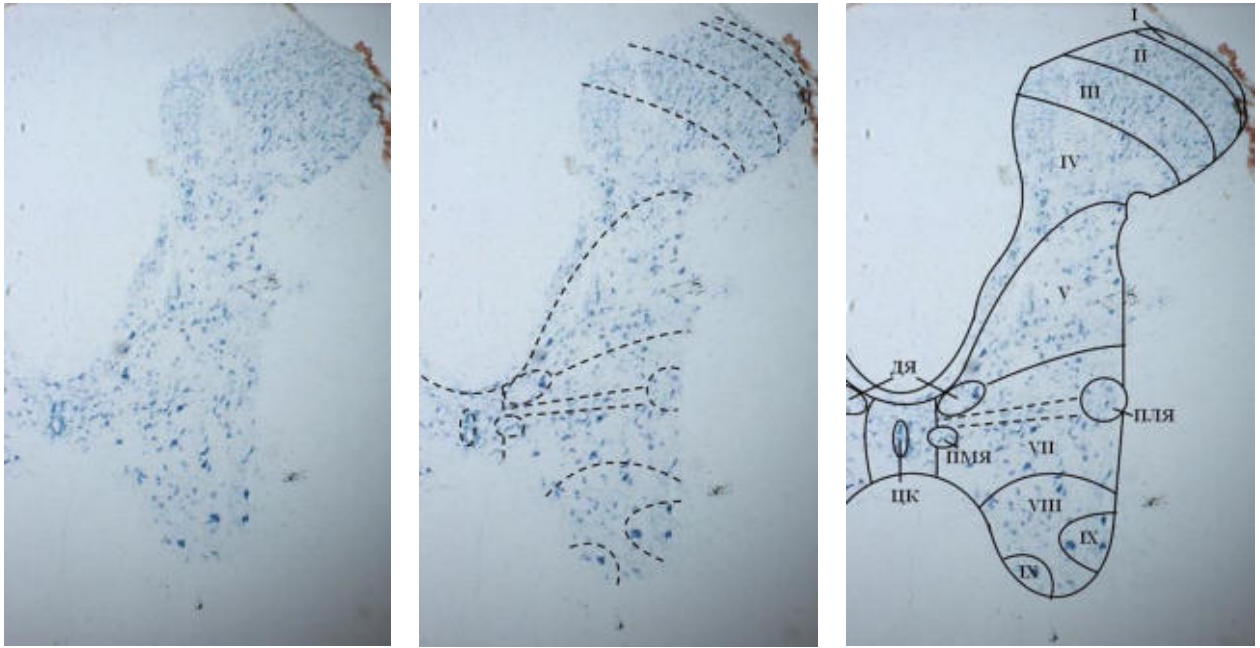


Рисунок 2.9. И. Серое вещество второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Нисслю. Об. 4, ок. 10.

Пунктирными и сплошными линиями обозначены пластинки - римскими цифрами (I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X) и ядра (ДЯ - дорсальное, ПМЯ - промежуточно-медиальное, ПЛЯ - промежуточно-латеральное).

В спинномозговом поле X выделен центральный канал (ЦК). В пластинке VII между пунктирными линиями располагаются интернейроны вставочного ядра.

Пластинки II и III образованы клетками исключительно мелких размеров, повторяющих форму клеток пластинки I, но имеющих преимущественно дорсовентральную направленность клеточных тел в центральной и медиальной частях обеих пластинок. В латеральных частях пластинок клетки имеют различную ориентацию клеточных тел. Густота клеток увеличивается от пластинки I к пластинке III. Уже в трехдневном возрасте хорошо определяется зональность пластинки II – её разграниченность на дорсальную и вентральную части. В вентральной части пластинки II располагаются веретеновидные клетки, отростки которых уходят в пластинку III.

Пластинки IV и V образованы клетками, которые относительно больше по размерам по сравнению с нейронами пластинки III, и также имеют различную форму. Дорсовентральная ориентация клеточных тел в пластинке IV сменяется

различной их направленностью в пластинке V, расположение клеток в которой менее плотное, чем в пластинках I-IV. Хорошо определяется выраженная граница из разделительных клеток, отделяющая дорсальный рог от промежуточной зоны спинного мозга.

В трехдневном возрасте крысы пластинки дорсального рога распределяются следующим образом: пластинка I занимает 4,2% всей площади серого вещества, пластинка II – 11%, пластинка III – 12,1%, пластинка IV – 12,9%, пластинка V – 14,9%. Такое распределение сохраняется и в 5-дневном возрасте крысенка. В 7-дневном возрасте увеличивается только доля пластинки V (16,9%), что связано с удлинением шейки дорсального рога (рис. 2.9. А, Б). В 7-дневном возрасте в пластинке I выявляются крупные нейроны.

В 10-дневном возрасте гистотопография пластинок IV и V дорсального рога спинного мозга явно отличается от предыдущего возраста крысы, что связано с изменением формы рога и сглаженностью его шейки, пластинки вытягиваются не как обычно – в дорсовентральном направлении, а в поперечном. Пластинки I, II, III и IV также локализованы в головке рога и располагаются параллельно друг к другу. В пластинке V плотность расположения инернейронов в латеральной части уменьшается, а клетки укрупняются. В медиальной части пластинки V сохраняется компактность расположения нейронов мелких размеров. В этом возрасте уменьшается только доля пластинок I, II и III – до 4,1%, 9,4% и 10,6% соответственно.

В 15-дневном возрасте в связи с обозначившимся сужением шейки изменяется форма пластинок IV и V, что приводит к увеличению их продольного размера к **30-дневному возрасту**. Цитоархитектоника всех пластинок сохраняется. Процентное соотношение пластинок не меняется и соответствует 10-дневному возрасту.

В 60-дневном возрасте в связи с изменением формы головки и сужением шейки незначительно изменяется процентное распределение пластинок: уменьшается доля пластинок I, II и III – до 2,9%, 9,1% и 9,5% соответственно, но увеличивается доля пластинок IV (до 15,9%) и V (до 17,7%).

В 90-дневном возрасте во всех пластинках дорсального рога наблюдается уменьшение плотности расположения клеток, что сохраняется и в последующих возрастах крысы.

В 180-дневном возрасте вследствие удлинения продольного размера рога и большего округления головки визуально отмечается увеличение ширины пластинок. При этом доля пластинок I и II уменьшается до 2,2% и 8,6% соответственно, а доля пластинок IV и V увеличивается до 17,5% и 21,1% соответственно, что не меняется до 360-дневного возраста крысы.

Анализ параметра площади пластинок на поперечном срезе спинного мозга показал, что увеличение площади каждой пластинки отмечается до 180-дневного возраста, как в целом и всего серого вещества, после чего размер их не меняется до 360-дневного возраста крысы.

В постнатальном онтогенезе показана равномерность роста пластинок по всему дорсальному рогу у крысы (Lorenzo et al., 2008). Однако, площадь пластинки I увеличивалась в 1,8 раза, пластинок II и III – в 2,7 раза, пластинки IV – в 4,6 раза, пластинки V – в 4,8 раза.

2.2.2.2. Возрастные особенности пластинки VII спинного мозга

В трехдневном возрасте пластинка VII дорсально имеет ясно видимую границу, отделяющую её от пластинки V, которая образована пограничными "разделительными" нейронами преимущественно веретеновидной формы, мелких размеров и только с медиолатеральной ориентацией клеточных тел в виде небольшой узкой полоски клеток, располагающихся от дорсальной серой спайки до латерального края серого вещества спинного мозга вблизи и дорсальнее области латерального рога. Вентральнее присутствуют интернейроны мелких и средних размеров, различных форм с различной ориентацией клеточных тел. **До 15-дневного возраста** цитоархитектоника этой пластинки не меняется.

В 20-дневном возрасте наблюдается уменьшение плотности расположения клеток в пределах пластинки с выявлением интернейронов не только мелких и

средних, но и относительно крупных размеров. Уменьшение плотности расположения клеток определяется их малочисленностью на срезе спинного мозга по сравнению с предыдущим возрастом. Следующее возрастное уменьшение клеточной плотности отмечается *в 90-дневном возрасте*.

Средняя площадь пластинки VII увеличивается до 180-дневного возраста крысы – в 2,7 раза, без значимых изменений показателя до 360-дневного возраста крысы. Интенсивный рост площади пластинки наблюдается в первые 20 дней жизни, показатель увеличивается в 2,5 раза. Максимальный прирост площади отмечается в 10-дневном возрасте (79,7%). Отношение пластинки VII ко всему серому веществу с возрастом крысы не меняется и как в трехдневном возрасте, так и в 360-дневном возрасте соответствует показателю 90-дневного возраста крысы.

2.2.2.3. Возрастные особенности пластинок вентрального рога спинного мозга

В возрасте 3, 5, 7, 10 и 15 дней жизни основная часть вентрального рога представлена пластинкой VIII, которая вклиниваясь между нейронами пластинки IX, содержит наиболее крупные мультиполярные интернейроны, которые располагаются в её пределах менее компактно по сравнению с пластинкой VII. Размеры интернейронов пластинки VIII больше интернейронов пластинки VII и меньше мотонейронов пластинки IX, локализованных в вентральном роге.

Пластинка IX образована двумя группами крупных и мелких мультиполярных клеток, являющихся мотонейронами, одна из которых локализуется в апикальной части вентрального рога – вентральная (апикальная) группа, другая в области латерального края рога – латеральная группа. Граница, отделяющая промежуточную зону спинного мозга от пластинки VIII, является условной и проходит от вентральной серой спайки до латерального края переднего рога вблизи и дорсальнее латеральной группы мотонейронов пластинки IX спинного мозга.

В 20-дневном возрасте изменяется топография вентрального ядра, которое смещается на вентромедиальный край рога, формируя теперь вентромедиальное ядро. Наблюдается резкое уменьшение плотности расположения клеток в пластинке VIII, по-видимому, вследствие увеличения поперечного размера рога. Размеры единичных интернейронов пластинки VIII являются сопоставимыми с размерами мотонейронов, последних отличает локализация в пластинке IX. В данном возрасте можно четко отграничить область вентрального рога. В последующие возраста цитоархитектоника вентрального рога не меняется, только отмечается еще большее снижение клеточной плотности в пластинке VIII в 90-дневном возрасте крысы.

Изменения размеров площади пластинки VIII полностью повторяют возрастную динамику, характерную для всего вентрального рога. В отличие от этого, площадь пластинки IX увеличивается к 30-дневному возрасту крысы в 5,5 раза, одинаково для обоих ядер. После чего размеры обоих ядер стабилизируются, их площадь не меняется до 360-дневного возраста крысы. При этом, интенсивный прирост показателя отмечается в возрасте 10 и 15 дней – соответственно 113% и 172,5% для вентромедиального ядра, 178% и 115% для вентролатерального ядра. Прирост площади пластинки VIII также наблюдается в аналогичных возрастах и является менее интенсивным (106% и 43,8%), но в отличие от пластинки IX продолжается до 20-дневного возраста, где он составляет 14%. Изменение конфигурации вентрального рога в 7-дневном возрасте крысы приводит к тому, что средняя площадь обоих ядер на поперечном срезе спинного мозга значительно уменьшается, что не свойственно пластинке VIII.

В трехдневном возрасте крысенка ядра мотонейронов занимают по 1,6% от всей площади серого вещества, на долю пластинки VIII приходится 6,1%. Усиленный прирост площади отражается на изменении соотношений, так, уже к 20-дневному возрасту ядра мотонейронов занимают 3,1-3,2% от всей площади серого вещества спинного мозга, а пластинка VIII – 12,3%. При этом, если в возрасте 3 и 5 дней жизни площадь обоих ядер не различается, то в возрасте 7, 10, 15 и 20 дней жизни размер области вентролатерального ядра превышает таковой

медиального ядра – на 8%, 40,1%, 11,6% и 36% соответственно возрастам крысы. В последующие возраста размеры площадей ядер снова не различаются, а с 150-дневного возраста крысы начинает незначительно преобладать площадь вентромедиального ядра, что сохраняется до 360-дневного возраста крысы.

2.2.2.4. Формирование поля X спинного мозга

В возрасте 3, 5, 7, 10 и 15 дней жизни поле X образовано очень мелкими клетками. Интернейроны поля X отличаются от рядом расположенных клеток пластинок IV, V, VII и VIII, не только мелкими размерами, но и кучностью расположения вокруг центрального канала, преимущественно медиолатеральной ориентацией клеточных тел. Граница, отделяющая интернейроны поля X от рядом расположенных пластинок, проходит дорсовентрально латеральнее центрального канала.

На гистологических срезах спинного мозга видна значительная протяженность поля X в дорсовентральном направлении с трехдневного и до 15-дневного возрастов крысы (Рис. 2.9. А, Б, В, Г). При этом также видно, что в этих возрастах большую часть поля X занимает область дорсальной серой спайки. Гистологический анализ подтверждается числовыми данными, приведенными для каждой из частей, формирующих поле X (Табл. 2.3.)

Возрастная динамика изменения всей площади поля X описана выше (Табл. 2.2.).

В 20-дневном возрасте крысы густота расположения клеток снижается, ориентация их меняется от медиолатеральной (поперечной) в дорсальной серой спайке до различной в центральных и вентральной областях поля X. В дорсальной серой спайке интернейроны формируют скопления в виде клеточных групп, в центральных частях и в вентральной серой спайке располагаются одиночно. Цитологическая и топографическая картина поля X является аналогичной взрослому – 90 дневному возрасту крысы.

Средние значения площади частей поля X ($S \times 10^4$, $\mu\text{км}^2$) на поперечном срезе второго грудного сегмента спинного мозга в различные возраста белой крысы

Возраст крысы	Вентральная спайка	Дорсальная спайка	Центральная часть	
			правая	левая
3	0,72±0,01	2,41±0,04	0,77 ±0,01	0,70±0,01
5	0,69±0,01	2,41±0,02	0,76±0,01	0,68±0,01
7	0,66±0,02	2,71±0,07*	0,67±0,02*	0,62±0,02
10	0,53±0,01*	3,02±0,02*	0,56±0,01*	0,51±0,01*
15	0,51±0,01	3,22±0,08	0,45±0,01*	0,44±0,01*
20	0,98±0,02*	1,99±0,03*	0,68±0,01*	0,63±0,01*
30	1,03±0,01	1,91±0,02	0,67±0,02	0,62±0,01
60	1,11±0,01*	1,69±0,01*	0,61±0,01*	0,58±0,01*
90	1,30±0,01*	1,45±0,01*	0,61±0,01	0,57±0,01
120	1,30±0,02	1,45±0,02	0,61±0,01	0,57±0,01
150	1,29±0,01	1,43±0,01	0,60±0,01	0,59±0,01
180	1,28±0,01	1,42±0,01	0,60±0,01	0,60±0,01
240	1,15±0,01*	1,27±0,01*	0,55±0,01*	0,54±0,01*
360	1,15±0,01	1,25±0,01	0,55±0,01	0,55±0,01

* - изменения достоверны в сравнении с данными предыдущего возраста, $P < 0.05$

В *Таблице 2.3.*, в трехдневном возрасте наибольшую площадь имеет дорсальная серая спайка, другие части поля X являются равнозначными. В раннем постнатальном периоде происходит постепенное увеличение площади дорсальной серой спайки до 15-дневного возраста крысы, после чего площадь её уменьшается в возрасте 20, 60, 90 и 240 дней жизни. Кардинально противоположно этому изменяется площадь вентральной серой спайки: в раннем постнатальном периоде её площадь уменьшается, а в 20-дневном возрасте отмечается увеличение показателя с последующим его повышением в возрасте 60 и 90 дней жизни икрысы. Показатели центральных частей значимо не различаются, их возрастная динамика заключается в первоначальном уменьшении площади к 15-дневному

возрасту, затем её увеличению в 20-дневном возрасте, и вновь уменьшению в возрасте 60 и 180 дней жизни крысы.

2.2.2.5. Постнатальная перестройка ядер спинного мозга

Ядерная организация серого вещества в постнатальном онтогенезе крысы представлена на *Рисунке 2.9*.

Дорсальное ядро

В возрасте 3 и 5 дней жизни локализуется фактически в медиальной части шейки дорсального рога, по-видимому, из-за её сжатости. Имеет форму близкую к шару, содержит мелкие клетки различных форм медиолатеральной ориентации, принадлежит двум пластинкам дорсального рога – IV и V.

В 7-дневном возрасте в связи с удлинением шейки дорсального рога, ядро смещается вентральнее, вытягивается и принимает форму овала, локализуется только в медиальной части пластинки V. В ядре выявляются клетки различных размеров и форм, направленность отростков которых различная.

В 10-дневном возрасте в связи с изменением формы дорсального рога и сглаженностью шейки, форма ядра вновь приближается к шаровидной. Топография не меняется.

В 15-дневном возрасте ядро смещается еще более вентрально, располагается непосредственно в пластинке V и прилежит к границам трех пластинок: вентрально – пластинки VII, дорсально – пластинки IV, медиально – поля X. Форма ядра становится овальной.

В 20-дневном возрасте ядро смещается еще более вентральнее, и таким образом становится принадлежащим двум пластинкам – пластинке V дорсального рога и пластинке VII промежуточной зоны спинного мозга. В этом возрасте ядро достигает своих максимальных размеров, увеличивая свою площадь в 3,3 раза. В последующие возраста крысы цитоархитектоника и топография ядра не меняется. Средняя площадь ядра до 360-дневного возраста крысы увеличивается в 3,4 раза. Наибольший прирост площади отмечается в возрасте 7 и 10 дней жизни, что

составляет 59,0% и 81,3% соответственно. Что интересно, отношение площади ядра ко всей площади серого вещества не меняется в течение всего изучаемого отрезка постнатального онтогенеза: в трехдневном возрасте ядро занимает 2% площади всего серого вещества спинного мозга.

Промежуточно-медиальное ядро

В возрасте 3 и 5 дней жизни имеет овальную форму и располагается латеральнее центрального канала в центральной части поля X и медиальной части пластинки VII. Ядро образовано мелкими клетками различных форм с медиолатеральной ориентацией отростков.

В 7-дневном возрасте форма ядра меняется на шаровидную, а *в 10-дневном возрасте* в связи с увеличением поперечного размера серого вещества большей частью располагается в медиальной части пластинки VII. Клетки ядра имеют мелкие и средние размеры, форма их преимущественно треугольная или мультиполярная, ориентация отростков различная.

В 15-дневном возрасте ядро вновь принимает форму овала, продольной осью располагаясь поперек серого вещества, располагаясь на стыке двух пластинок, но смещаясь дорсальнее в область дорсальной серой спайки поля X.

В 20-дневном возрасте форма ядра начинает округляться, в 30-дневном возрасте приближается к шаровидной. В поле X до 30-дневного возраста ядро занимает часть дорсальной спайки, а с 60-дневного возраста крысы смещается вентральнее и располагается латеральнее центрального канала в центральной части поля X. В последующие возраста крысы цитоархитектоника, форма и топография ядра не меняются.

Средняя площадь ядра до 360-дневного возраста крысы увеличивается в 6,5 раза. Интенсивный рост площади ядра наблюдается в первые 10 дней жизни, показатель увеличивается в 4,9 раза. Наибольший прирост площади отмечается в возрасте 7 и 10 дней – 152,3% и 71,5% соответственно. При этом, в трехдневном возрасте площадь ядра составляет 0,6% от всей площади серого вещества спинного мозга, а к 10-дневному возрасту доля ядра увеличивается в 2,3 раза (до

1,4%), в последующие возраста и до 360-дневного возраста крысы остается без изменений.

Вставочное спинномозговое ядро

В возрасте 3 и 5 дней жизни вентральное разделительных интернейронов пластинки VII располагается ядро в виде узкой полоски популяции нейронов с медиолатеральной ориентацией отростков и направленностью продольных размеров клеточных тел. Клетки имеют преимущественно овальную форму и мелкие размеры. Отростки клеток формируют клеточную цепочку, которая прослеживается от группового скопления клеток в области латерального рога до дорсальной серой спайки поля X, располагаясь дорсальнее промежуточно-медиального ядра.

В 7-дневном возрасте клетки укрупняются и вытягиваются, выявляются различные клеточные формы.

В 10-дневном возрасте уменьшается густота расположения клеток в ядре. В последующие возраста крысы топография и цитоархитектоника ядра не меняется.

В 30-дневном возрасте ядро смещается более вентрально в центральную часть пластинки VII, топография его не меняется до конца наблюдения.

Средняя площадь ядра до 360-дневного возраста крысы увеличивается в 6,1 раза. Интенсивный рост площади ядра наблюдается в первые 10 дней жизни, показатель увеличивается в 5 раз. Размер ядра значительно увеличивается уже в 5-дневном возрасте, прирост площади составляет 47,2%, в 7-дневном возрасте – 63,5%, и является максимальным в 10-дневном возрасте – 109,1%. В 10-дневном возрасте ядро занимает 3,4% площади всего серого вещества.

Промежуточно-латеральное ядро

В возрасте 3 и 5 дней жизни крысенок располагается в области латеральной части пластинки VII, имеет овальную форму, повторяет очертания выступающего латерального рога. Ядро образовано группой клеток мелких

размеров, большей частью овальных с медиолатеральной ориентацией и направленностью отростков.

В 7-дневном возрасте в ядре выявляются клетки различных форм, ориентация их становится различной, длинная ось овальной формы ядра всё также вытянута в поперечном направлении.

В 10-дневном возрасте в связи с изменением конфигурации серого вещества, происходит смещение длинной оси овала из поперечного положения в продольное, вследствие чего латеральный рог становится максимально определяющимся. Цитоархитектоника ядра не меняется.

В возрасте 15 и 20 дней жизни в связи с удлинением продольного размера серого вещества, овальная форма ядра занимает положение, характерное для 7-дневного возраста.

В 30-дневном возрасте большое количество нейронов, локализованных в области ядра формирует по латеральному краю промежуточной зоны серого вещества округлый выступ (латеральный рог) и форма ядра округляется, приближается к шаровидной., что сохраняется в последующие возраста крысы. На гистологических срезах спинного мозга (Рис. 2.9.) видно, что в трехдневном возрасте крысы ядро располагается в дорсальной части латеральной области промежуточной зоны. В последующие возраста происходит его постепенное смещение вентрально, и в 90-дневном возрасте крысы оно располагается в центральной части латеральной области промежуточной зоны спинного мозга, что сохраняется до 360-дневного возраста крысы.

Средняя площадь ядра до 360-дневного возраста крысы увеличивается в 3,6 раза. Интенсивный рост площади ядра наблюдается в первые 10 дней жизни, показатель увеличивается в 3,4 раза. Наибольший прирост площади отмечается в возрасте 7 и 10 дней жизни – 29% и 138,9% соответственно. В 10-дневном возрасте ядро занимает 3,7% площади всего серого вещества, что не отличается от процентного показателя взрослой 90-дневного возраста крысы.

2.2.2.6. Заключительные замечания

В постнатальном онтогенезе белой крысы площадь серого вещества второго грудного сегмента спинного мозга более интенсивно увеличивается в первые 20 дней жизни и менее интенсивно в последующие возраста – до 180-дневного возраста крысы. Действительно, относительно стабильное превалирование размеров дорсального рога над вентральным рогом и промежуточной зоной спинного мозга прослеживается в течение всего изученного периода постнатального онтогенеза крысы. Тем не менее, постнатальный период роста серого вещества сопровождается выраженной гетерохронностью развития его частей, что заключается в увеличении площади вначале дорсального рога (5-дневный возраст), затем промежуточной зоны и вентрального рога (7-дневный возраст). Гетерохронность объясняется и последовательным вкладом в рост всего серого вещества высоких приростов площадей: вначале дорсального рога (7-, 10-дневный возраст), затем промежуточной зоны (10-дневный возраст) и вентрального рога (10-, 15-дневный возраст). В связи с этим особенно выделяется 10-дневный возраст, когда увеличение площади серого вещества обусловлено активным ростом всех столбов. У взрослой крысы площадь серого вещества увеличивается преимущественно за счет роста дорсального рога (180-дневный возраст).

Обособлено, вне связи со столбами (рогами, промежуточной зоной) серого вещества, происходит постнатальное формирование серого вещества центральных структур спинного мозга – поля X. Именно, формирование. Дело в том, что постнатальное уменьшение площади поля X не позволяет употреблять термин «рост», но это не означает, что структуры поля X не развиваются. Вся сложность строения поля X заключается в его срединности, комиссуральности и, возможно, полифункциональности. Выделив структуры поля X, разбив его на части, мы обнаружили неоднозначные перестройки в строении его структур, переломным периодом которых явился 20 день жизни крысы. Если в первые 15 дней жизни отмечалось увеличение размеров дорсальной серой спайки, то с 20-дневного

возраста площадь её уменьшалась, и напротив, увеличивалась площадь вентральной серой спайки, а также устанавливалась стабильность размерных показателей центральных частей поля X. Отрицательный прирост площади поля X в 240-дневном возрасте, возможно, обусловлен положительным приростом площади дорсального рога в 180-дневном возрасте, что повлекло дальнейшую трансформацию поля X с перераспределением серого вещества в сторону уменьшения площади дорсальной серой спайки, принадлежащей полю X. Нами показано участие пластинки IV дорсального рога спинного мозга в формировании дорсальной серой спайки. В тоже время, не исключается факт постнатального удлинения грудных сегментов спинного мозга, что можно объяснить топографическим увеличением дорсовентрального продольного размера серого вещества, вытянутостью его рогов, которое обнаруживается у взрослых грызунов.

Пластинчатая организация серого вещества второго грудного сегмента спинного мозга определяется в трехдневном возрасте крысенка. При этом конфигурация серого вещества, размеры его пластинок меняются в течение всего исследуемого временного отрезка постнатального онтогенеза. В 90-дневном возрасте крысы уменьшается плотность расположения клеток во всех пластинках спинного мозга, но более компактно располагаются нейроны пластинок II, III, IV и X, с максимальной густотой в пластинке II, менее компактно – нейроны пластинок I, V и VII, самыми рассеянными по клеточной плотности являются пластинки VIII и IX. Конечно, нельзя исключать цитологический аспект. Безусловно, постнатальное уменьшение клеточной плотности является неотъемлемым фактом постнатального развития органов центральной нервной системы. В связи с этим, требуется детальный количественный анализ возрастного изменения нейронального состава пластинок.

Ядерная организация серого вещества второго грудного сегмента спинного мозга также является определяемой в трехдневном возрасте крысенка для дорсального, промежуточно-медиального, вставочного и промежуточно-латерального ядер. Максимальный прирост площади ядер наблюдается в возрасте 7 и 10 дней жизни крысы, что и определяет постнатальный период их активного

роста. Первыми и одновременно, топографического соответствия достигает дорсальное ядро (20-дневный возраст), затем ядра симпатических преганглионарных нейронов – промежуточно-латеральное и вставочное спинномозговое (30-дневный возраст), позднее промежуточно-медиальное ядро (60-дневный возраст). Установление окончательного расположения ядер в сером веществе спинного мозга соответственно топографии взрослой 90-дневной крысы обусловлено их перестройкой, вне зависимости от присущей функциональной специализации, которая сопровождается смещением ядер в вентральном направлении: для дорсального ядра – расширение его границ с переходом из дорсального рога в промежуточную зону; для промежуточно-медиального ядра – смещение из области дорсальной серой спайки в центральную часть поля X и соответствующую медиальную часть пластинки VII; для промежуточно-латерального ядра – смещение в центральную часть латеральной области пластинки VII; для вставочного спинномозгового ядра – смещение в центральную часть пластинки VII совместно с изменившейся топографией главного ядра. Тем не менее, в отличие от пластинок спинного мозга, процентное участие, определяемое по площади каждого изучаемого ядра, по отношению к площади всего серого вещества устанавливается стабильным в 10-дневном возрасте крысы, исключением являясь 3-дневный возраст для дорсального ядра.

Глава 3. НЕЙРОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА СПИННОГО МОЗГА

3.1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Нейроны спинного мозга в большинстве своем представлены интернейронами и в меньшей степени нейронами спинномозговых путей (проекционные нейроны). Систематизация нейронов серого вещества спинного мозга базируется на исходных вариабельных особенностях, обусловленных неоднородностью внутри-, межсегментарных и проекционных связей, структурных (форма, размер) и топографических характеристик. Связь структурных и функциональных особенностей нейронов позволит осмыслить имеющееся разнообразие спинальных нейронов и учитывать изменения нейронального состава серого вещества при различных патологических процессах.

3.1.1. Вставочные и проекционные нейроны

Несмотря на многочисленные исследования, по-прежнему отсутствует универсальная приемлемая схема классификации с единой номенклатурой, которая могла бы четко идентифицировать нейроны серого вещества спинного мозга, что является очень важным и необходимым с позиций определения дискретности нейронов в сером веществе и понимании их роли в формировании нейронных сетей спинного мозга.

Всё разнообразие структурных признаков, несомненно, построено на определении конкретных типов нейронов серого вещества спинного мозга и фактически сводится к первоначальному выделению двух основных типов нейронов, которые различают в зависимости от длины их аксонов. Еще S. Ramon у Cajal (1909) выделил в спинном мозге нейроны I типа Гольджи, имеющие длинные аксоны, выходящие за пределы спинного мозга и обеспечивающие связи с супраспинальными структурами, и нейроны II типа Гольджи, имеющие более

короткие и локально ограниченные аксоны, формирующие интраспинальные нервные связи, не выходящие за пределы спинного мозга (Todd, 2010).

Надо отдать должное, что по прошествии века, данная систематизация сохранилась, и более того, приобрела оттенок современного научного анализа. Возможность маркировки одного нейрона по наличию везикулярных переносчиков и определению синаптических входов убеждает, что большинство нейронов серого вещества спинного мозга имеют аксоны, которые ветвятся локально, оставаясь в пределах спинного мозга, и этот тип нейронов определяется как "интернейроны", и меньшая часть нейронов имеет аксоны, которые выходят за пределы спинного мозга, являясь "проекционными нейронами" (Todd, 2010).

В поверхностной области дорсального рога спинного мозга были выделены две различные категории нейронов – «проекционные» с относительно толстым аксоном, направленным контрлатерально вентролатерально в канатики (белое вещество) спинного мозга и «непроекционные» нейроны, аксоны которых были направлены ипсилатерально с обширным разветвлением дендритов внутри серого вещества спинного мозга (Grudt, Perl, 2002).

Следует обратить внимание, что обычно для деления нейронов употребляют термины, закрепленные в Международной гистологической терминологии (Terminologia Histologica, ТН, 2009): мотонейрон (двигательный нейрон), висцеральный двигательный нейрон, преганглионарный нейрон, автономный нейрон, комиссуральный нейрон, некомиссуральный нейрон, проекционный нейрон, ассоциативный нейрон, эфферентный нейрон, афферентный нейрон (сенсорный, чувствительный нейрон, первичный чувствительный нейрон), интернейрон (вставочный нейрон), нейрон спинномозгового пути.

В нейробиологии интернейроны делят по их функции, на основании анатомического расположения, исходя из направления их аксонов к определенным отделам центральной нервной системы, на проекционные – посылают свой аксон в ростральном или дистальном направлении, комиссуральные – аксоны направляются к областям противоположной половины мозга, интринзинтные – аксоны ограничены той областью, где находится их тело

(Немечек, 1978). Последние, по-видимому, и являются ипсилатеральными нейронами: некомиссуральными и не проекционными.

Интернейроны спинного мозга представляют собой наиболее распространенный класс нейронов у млекопитающих (Scheibel, Scheibel, 1968, 1969; Jankowska, Lindström, 1973; Beal, Cooper, 1978; Ribeiro-da-Silva, 2004; Schoenen, Faull, 2004). В каждой части (столбах) серого вещества спинного мозга выделяют интернейроны возбуждающие и ингибиторные, соотнося их с принадлежностью к пластинкам (Brumovsky, 2006; Jankowska et al., 2009; Hantman, Jessell, 2010) или с клеточной морфологией (Cabot et al., 1994; Craig et al., 2002; Liu et al., 2010).

Согласно ТН (2009) интернейроны спинного мозга являются вставочными нейронами, могут быть глутаматергическими или глицинергическими и выполнять многочисленные функции. Некоторые глицинергические вставочные нейроны, хорошо известные как клетки Реншоу, вместе с другими нейронами участвуют в образовании межсегментных связей, включающих проприоспинальные и спино-спинальные волокна.

В тоже время, интернейроны являются вставочными нейронами применительно к их расположению между афферентным и эфферентным нейронами (Ноздрачев, Маслюков, 2019), что было впервые описано Ч. Шеррингтоном (1906) именно как «internuncial neurons» (вставочные нейроны) – нейроны, которые получают конвергентные входы, не только от афферентных нейронов, но и от других групп интернейронов, в общих рефлекторных путях, где мотонейроны обязательно являются конечными (Burke, 2007).

3.1.2. Морфометрия спинальных нейронов

Что касается размеров нейронов, то в литературе чаще встречается их качественная характеристика: мелкие – крупные, крупнее – мельче. Иногда приводятся размеры конкретных нейронов.

В пластинке I у крысы выделяют нейроны: мелкие с диаметрами 5-10 мкм (Molander et al., 1989) и 9-13 мкм (Barber et al., 1982); средние 10-15 мкм (Гилерович и др., 2007) и крупные 30-50 мкм (Grudt, Perl, 2002; Todd, 2010). Последние, вероятно, являются гигантскими клетками Вальдейера (Nogradí, Vrbova, 2006; Polgár et al., 2008) и выполняют функцию проекционных нейронов пластинки I (Todd, 2010). В тоже время показано, что крупные клетки являются немногочисленными, располагаются в количестве 3-4 в пределах пластинки на поперечном срезе спинного мозга и у крысы имеют размер 15x5 мкм (Molander et al., 1989).

В пластинке II у крысы большинство нейронов имеют диаметр 10,5 мкм и округлую форму, диаметр 10,5x8 мкм и веретеновидную форму (Гилерович и др., 2007; Molander et al., 1989) и, практически, не отличаются от мелких и средних нейронов пластинки I, хотя обычно декларируется, что последние крупнее (Barber et al., 1982; Grgurevic et al., 1999; Ristanovic et al., 2006). На границе пластинок II и III обнаруживаются единичные крупные мультиполярные нейроны, которые имеют диаметр 45x20 мкм и по своим размерам соответствуют нейронам пластинки IV (Grgurevic et al., 1999). Предполагается, что эти крупные нейроны являются смещенными эктопическими клетками из пластинки IV, имеющими длинные дендритные отростки, распространяющиеся дорсовентрально до 250 мкм и медиолатерально до 200 мкм (Ristanovic et al., 2006). Самыми мелкими в пластинке II являются нейроны округлой формы, чей диаметр тела не превышает 8 мкм (Molander et al., 1984, 1989; Гилерович и др., 2007)

Размеры нейронов **пластинки III** с диаметрами от 8 мкм до 10,5 мкм, также мало отличаются от размеров нейронов пластинки I и II у крысы (Bhardwaj et al., 2001), но в области утолщений СМ у мыши и обезьяны они крупнее (Pawlowski et al., 2013). При этом, наибольшие размеры имеют нейроны веретеновидной формы, а наименьшие размеры присущи клеточной популяции исключительно округлых форм (Bhardwaj et al., 2001).

Явное отличие нейронов дорсального рога появляется **в пластинке IV**, где размеры клеток достигают 26x12 мкм, 10x30 мкм, 35-45 мкм (Гилерович и др.,

2007; Coggeshall, Willis, 1991; Bhardwaj et al., 2001; Todd, 2002), что сопоставимо с крупными нейронами пластинки V, которые имеют размеры 30-40 мкм в диаметре (Ritz, Greenspan, 1985; Youn, 2002). В пластинке IV у крысы преобладают нейроны крупных размеров в популяции клеток веретеновидной формы (Bhardwaj et al., 2001). У человека в пластинке IV крупные размеры имеют типичные антенно-подобные нейроны, имеющие размер 50-75 мкм, а нейроны средних размеров – 25-40 мкм являются наиболее многочисленными (Schoenen, Faull, 2004). Гетерогенность нейронов пластинки IV у крысы отмечается большинством исследователей в связи с разнообразием их размеров – от мелких 8-11 мкм до крупных 35-45 мкм в диаметре (Coggeshall, Willis, 1991; Todd, 2002; Гилерович и др., 2007), или же – от 7 до 23 мкм в диаметре (Barber et al., 1982; 1984), что отличает их от однородного размерного ряда нейронов пластинки III.

Пластинка V характеризуется появлением в большинстве более крупных клеток, чем в пластинке IV (Molander et al., 1984, 1989). Другие авторы выделяют вариабельность размеров нейронов у крысы в пластинке - от 8-10 мкм до 30-40 мкм в диаметре (Youn, 2002), при этом у кошки самые крупные нейроны пластинки V по морфологии являются не отличимыми от мотонейронов вентрального рога (Ritz, Greenspan, 1985). В тоже время, у грызунов нейроны дорсального рога являются самыми малыми, площадь которых не превышает 300 мкм² (Freire et al., 2008).

В области дорсального ядра выделяют популяции средних – 20-30 мкм в диаметре и крупных – 30-40 мкм в диаметре нейронов (Mann, 1973). К крупным относят нейроны веретеновидной формы, имеющие размеры 10x30 мкм (Molander et al., 1984, 1989).

В пластинке VII у крысы присутствует однородная популяция нейронов с диаметрами 20-30-40 мкм, к которым не относят преганглионарные нейроны (Barber et al., 1984). Клеточный состав **промежуточно-латерального ядра** делят на три размерных классах: крупные клетки имеют размеры 28x24 мкм, 42x25 мкм, 48x30 мкм; средние клетки – 22x19 мкм, 30x18 мкм; мелкие – от 18 до 23 мкм в диаметре (Жукова, Брагина, 1981). Размеры симпатических преганглионарных

нейронов различаются в зависимости от их топографии: главное ядро содержит клетки, имеющие размеры от 14x30 мкм до 28x49 мкм; вставочное – 15x20 мкм, центральное ядро – 10x30 мкм (Barber et al., 1984). Как видно, размер преганглионарных симпатических нейронов у крысы разнообразен, крупные нейроны которых (30-40 мкм в диаметре) являются структурно сходными с мотонейронами (Calka et al., 2008).

В пластинке VIII, нейроны более разнообразны и крупнее, чем в пластинке VII (Grant, Koerber, 2004). В пластинке VIII присутствуют звёздчатые крупные клетки размером 25x25 мкм, структурно подобные мотонейронам (20x30 мкм), но отличительными характеристиками которых являются более округлая форма тела клетки и периферийность ядра (Molander et al., 1989; Grant, Koerber, 2004).

Напротив, **в поле X** нейроны имеют меньшие размеры, чем в рядом расположенных пластинках (Гилерович и др., 2007; Grant, Koerber, 2004). У крысы нейроны поля X представлены клетками средних и малых размеров – от 11 до 22 мкм в диаметре (Barber et al., 1982, 1984). У агутиевых грызунов также в окружности центрального канала преобладают нейроны средних размеров, площадь которых составляет 350-420 мкм² (Freire et al., 2008).

Самыми крупными считаются мотонейроны **пластинки IX**, но их детальное исследование показывает, что они имеют различные размеры. Крупные α -мотонейроны у крысы имеют размеры 40x55 мкм (Гилерович и др., 2007; Barber et al., 1982), у мыши – более 30 мкм (Kong et al., 1998), у свиньи – от 40 до 80 мкм в диаметре (Calka et al., 2008), у человека – 60-80 мкм (Schoenen, Faull, 2004). У агутиевых грызунов площадь сечения крупных мотонейронов достигает 500-600 мкм² (Freire et al., 2008). Часть авторов у крысы не выделяет размерных классов в группе мотонейронов, относя к ним клетки с диаметром 20-30 мкм (Molander et al., 1984, 1989), или выделяет крупные мотонейроны, имеющие площадь свыше 700 мкм² (65%) и малые, у которых площадь ниже 699 мкм² (35%) (Ahn et al., 2006). Одну треть всех нейронов в моторном пуле составляют γ -мотонейроны (Экклс, 1959), имеющие малые размеры (Molander et al., 1984; Calka et al., 2008).

Размерная характеристика мотонейронов, как и топографическая, соответствует соматотопическому принципу (Оленев, 1987; Н. Джон и др., 2008): размеры шейных мотонейронов превышают таковые поясничных (Яценко и др., 2012; Molander et al., 1984, 1989), размеры мотонейронов латеральных ядер превышают размеры мотонейронов медиальных ядер (Порсева, 2014; Schoenen, Faull, 2004). Самыми мелкими нейронами вентрального рога, локализованными, как правило, в пластинке IX, являются клетки Реншоу, которые у крысы имеют размеры 10x20 мкм (Barber et al., 1982) и не превышают площади сечения в 70 мкм² (Порсева, 2014).

3.1.3. Аксональные проекции спинальных нейронов

Анализ опубликованных данных о размерных характеристиках нейронов пластинок серого вещества спинного мозга показывает их противоречивость, различия на разных уровнях спинного мозга, у различных млекопитающих. Чаще всего функциональную принадлежность нейронов рассматривают в совокупности размерных и топографических характеристик нейронов спинного мозга, соотнося с формой клеточных тел и аксональными проекциями.

В пластинке I клетки с толстым длинным аксоном, локализованные в латеральной части пластинки, обеспечивают проекционные связи с вышележащими структурами (Nogradi, G. Vrbova, 2006; Ribeiro-da-Silva, 2004). В медиальной части пластинки I локализуются нейроны, обеспечивающие контрлатеральные связи с интернейронами противоположной половины спинного мозга (Grudt, Perl, 2002), то есть являются по сути комиссуральными. Ипсилатеральные соединения образуют интернейроны, распространенные по всей толщине пластинки I и имеющие многочисленные отростки (Grudt, Perl, 2002).

Отмечено также, что крупные клетки латеральной части пластинки связаны с супраспинальными структурами – ядрами парабрахиальной области, ретикулярной формации и солитарного тракта, центральным серым веществом среднего мозга, гипоталамусом, таламусом, обеспечивающими контроль

сердечно-сосудистой и дыхательной функций (Esteves et al., 1993; Ribeiro-da-Silva, 2004; Gauriau, Bernard, 2004; Spike et al., 2003). К этим проекционным нейронам пластинки I, формирующим спиноталамический тракт, относят "гигантские" нейроны (клетки Вальдейера) (Todd, 2002). У агутиевых грызунов к проекционным нейронам относят крупные клетки, имеющие интенсивную окрашенность цитоплазмы и являющихся клетками I типа Гольджи с площадью сечения 250-300 мкм² (Freire et al., 2008).

Функциональная специфичность нейронов пластинки I объясняется различной скоростью проведения импульсации от медленной у веретеновидных клеток, имеющих немиелинизированные аксоны, до быстрой у полимодальных нейронов (пирамидальные и мультиполярные), имеющих миелиновые аксоны (Lima, Coimbra, 1983; Molander et al., 1989; Grudt, Perl, 2002; Schoenen, Faull, 2004). Но, при иммуногистохимическом исследовании белков нейрофиламентов 200 кДа, нейронная пластинка I является иммунонегативным (Porseva, 2014), что обусловлено малочисленностью проекционных нейронов и их топографической обособленностью. В поясничной части спинного мозга у крысы только 5% нейронов пластинки I являются проекционными, при этом из них до таламуса доходит менее 5% нейронов, а 95% – связаны с боковой парабрахсиальной областью (Gauriau, Bernard, 2004), с преимущественными контрлатеральными спинальными проекциями (Spike et al., 2003).

Таким образом, совсем незначительная доля нейронов участвует непосредственно в восприятиях ноцицепции, что подтверждается более многогранными функциями этой пластинки, включающие и мотивационно-аффективное поведение и связь с автономными функциями. Часть авторов, не обнаруживает корреляций между структурой и функцией различных клеток пластинки I, указывая на широкое присутствие идентичных морфологических типов нейронов с иной функцией в других пластинках дорсального рога спинного мозга (Light, Willcockson, 1999; Grant, Koerber, 2004).

Пластинка II, собственно студенистое вещество, располагается вентральнее пластинки I. Основанием для её выделения является слой плотно

расположенных мелких клеток. Не так давно были определены местные нейронные связи в спинном мозге крысы с участием различных типов возбуждающих и тормозных интернейронов пластинки II (Lu, Perl, 2005). Практически все нейроны пластинки II функционально объединены в группу интернейронов (Yasaka et al., 2007; Lu, Perl, 2007; Todd, 2010; Pawlowski et al., 2013). Большинство интрнейронов образуют немиелинизированные волокна, но единичные интернейроны пластинки II дают проекции к интернейронам пластинок III, IV и V посредством миелиновых аксонов, что было обнаружено электронной микроскопией путем мечения их пероксидазой хрена (Light, Kavookjian, 1998).

В исследованиях с применением электрофизиологических методов определены синаптические контакты различных клеточных типов внутри пластинки II. Так, островковые клетки образуют ГАМК-ергические синапсы на центральных клетках, центральные клетки – глутаматергические синапсы на вертикальных клетках (Lu, Perl, 2005; 2007). При этом каждый морфологический тип клеток образует синапсы с более чем одним интернейроном (Yasaka et al., 2007).

Нейриты первичных афферентов в своём большинстве в спинном мозге образуют аксо-аксональные синапсы, что является субстратом пресинаптического торможения ГАМК-ергического генеза. В дорсальном роге холинергические аксональные бутоны, содержащие ГАМК участвуют в пресинаптическом торможении как ноцицептивной, так и неноцицептивной импульсации, поступающей с первичных афферентов, что показано и у крыс (Ribeiro-da-Silva, 2004). А обнаруженная солокализация ХАТ и ГАМК маловероятно допускает то, что эти аксональные бутоны в пластинке II образованы как первичными афферентами, так и симпатическими преганглионарными нейронами, что подтверждает их участие, как интернейронов, в пресинаптическом торможении (Pawlowski et al., 2013). Показано присутствие глутаматных рецепторов на аксонах первичных афферентов у крысы (Lee et al., 2002). Наличие глутамат-иммунореактивных синапсов на аксонах первичных афферентов демонстрирует

участие глутамата в регуляции поступающей афферентации в спинном мозге лягушки (Vesselkin et al., 2003), а наличие их на мембранах первичных афферентных нейронов позволяет не только модулировать афферентную активность, но и блокировать (Аданина и др., 2008).

Большинство нейронов пластинок I и III спинного мозга (Nazli, 2005), и практически все нейроны пластинки II (Randic, 1996; Nazli, 2005; Todd, 2010) являются внутренними, или интернейронами. Показана локальность аксональных ветвлений нейронов пластинки II и их коллатералей, которые не выходят вентрально за пределы пластинки и только имеют дорсальное распространение в пластинку I (Maxwell et al., 2007), что подтверждает отсутствие проекционных нейронов непосредственно в пластинке II.

Пластинки III и IV содержат различной формы мелкие и крупные нейроны собственного ядра дорсального рога, которые относят к проекционным, формирующим спиноталамические пути (Antal et al., 1991; Bhardwaj et al., 2001; Bhimaidevi et al., 2012). Интернейроны образуют многочисленные аксо-соматические синапсы с интернейронами дорсального рога, которые содержат ГАМК (Todd, 2002). Функциональное сходство интернейронов пластинок III и IV объясняется одинаковостью их структурных характеристик (Antal et al., 1991; Bhimaidevi et al., 2012). В тоже время, часть авторов (Ralston III, 1982; Molander et al., 1984; Schoenen, Faull, 2004) объединяют интернейроны пластинки IV с пластинками V-VI в "wide dynamic range neurons", в которых нервные клетки имеют самые большие размеры из нейронов дорсального рога и обеспечивают связь с супраспинальными структурами – продолговатым мозгом и парабрахиальной областью (Bishop, 1980; Todd, 2002). Крупные нейроны пластинки IV являются как интернейронами, аксоны которых оканчиваются на нейронах пластинки V (Youn, 2002), так и проекционными нейронами, формирующими тракты бокового и дорсального канатиков (Brown, Fyffe, 1981; Todd, 2010). Это свидетельствует о множестве мнений не только относительно клеточного формирования собственного ядра, но и его функционального значения.

Аксональные проекции нейронов *пластинки V* свидетельствуют о принадлежности нейронов к комиссуральным и ипсилатеральным премоторным интернейронам (Ritz, Greenspan, 1985; Miles et al., 2007; Liu et al., 2010; Stepien et al., 2010; Coulon et al., 2011). Аксоны нейронов также достигают и белого вещества латеральных канатиков (Schoenen, Faull, 2004).

Ряд авторов медиальные части пластинок дорсального рога выделяют в особую область, где локализуются интернейроны участвующие в локомоторной активности (Tang et al., 2003; Miles et al., 2007; Porseva et al., 2015). Здесь же локализуют симпатические интернейроны, связанные с преганглионарными симпатическими нейронами (Cabot et al., 1994).

В пластинке VII располагаются комиссуральные интернейроны, которые участвуют в формировании премоторных путей (Jankowska et al., 2009), а также разделительные клетки, аксональные проекции которых направлены от центрального канала к внешнему краю серого вещества в боковые канатики (Barber et al., 1984). Разделительные нейроны пластинки VII формируют связи, как с вышележащими, так и с нижележащими уровнями спинного мозга протяженностью в 3-4 сегмента (Barber et al., 1984).

У крысы аксоны нейронов *пластинки VIII* также переходят на противоположную сторону и являются комиссуральными (Гилерович и др., 2007), обеспечивают связи с ретикулярной формацией (Grant, Koerber, 2004).

Премоторные нейроны локализуются в *поле X*, что было определено по моносинаптическим связям с мотонейронами путем трансинаптической и ретроградной маркировки у крысы и у мыши (Miles et al., 2007; Liu et al., 2010; Stepien et al., 2010). Определены проекционные связи интернейронов поля X и с секреторными клетками гипоталамуса у кошки (Katter et al., 1991). Нейроны поля X участвуют в генерализации возбуждения, аналогично ретикулярной формации стволовых структур (Freire et al., 2008) и оказывают модулирующее восходящее и нисходящее влияние на двигательные нейроны (Barber et al., 1982).

Большинство премоторных нейронов дают аксональные проекции ипсилатерально (Skup et al., 2012), и только небольшая часть контрлатерально, но

в идентичные функциональные группы мотонейронов (Stepien et al., 2010; Coulon et al., 2011). К премоторным нейронам относят клетки Реншоу – короткоаксонные ингибиторные нейроны, участвующие в возвратном торможении (Экклс, 1949; Barber et al., 1982; Stepien et al., 2010). На грудном уровне у мыши и крысы медиальная группа мотонейронов иннервирует эпаксиальную мускулатуру, латеральная группа – межреберные мышцы (Peterson., 1989; Sengul et al., 2012, Beliez et al., 2015).

3.1.4. Спинальные входы и проекции афферентных нейронов

Все нейроны дорсального рога спинного мозга получают входные проекции от аксонов сенсорных нейронов и от интернейронов, как возбуждающих, так и ингибиторных. Представления о том, как эти нейрональные схемы организованы и по какому принципу происходят взаимодействия между нейронами, до сих пор ограничены. Так, если есть прямые контакты между сенсорными нейронами и интернейронами, то есть такие же контакты между сенсорными нейронами и проекционными нейронами. Часть исследований устанавливает связь морфологических типов нейронов с поступающей афферентацией.

В пластинке I специфичными ноцицептивными нейронами являются веретеновидные клетки, на которых оканчиваются А δ -волокна афферентов, проводящие сверхсильные тепловые и механические раздражения (Grudt, Perl, 2002; Todd, 2010). К полимодальным нейронам относятся мультиполярные клетки, на которых преобладают входы от С-волокон афферентов, связанных с тепловыми и холодowymi рецепторами (Yu et al., 1999; Ruscheweyh et al., 2011), частично на них же заканчиваются А β -волокна афферентов, связанные с тактильными рецепторами (Almarestani et al., 2007; Ghamdi et al., 2009). Мультиполярные клетки, в своём большинстве, также являются ноцицептивными, реагируют на высокие и низкие температуры (Todd, 2010). Пирамидальный тип нейронов является узкоспецифичным и реагирует только на слабые холодowe раздражения (Yu et al., 1999; Almarestani et al., 2007; Todd, 2010).

Проекционные нейроны пластинки I относят к клеткам широкого динамического диапазона, тем самым имея прямые синаптические контакты с Аδ-волоконными афферентами (Grudt, Perl, 2002) и опосредованные через глутаматергические интернейроны пластинок II и III, обеспечивающие проведение вредных стимулов (Polgár et al., 2008). На проекционных нейронах пластинки I также переключаются серотонинергические аксоны от структур продолговатого мозга (Polgár et al. 2002).

В пластинке II островковые клетки и большинство центральных клеток получают входы от С-волокон, в то время как вертикальные и радиальные клетки могут получать моносинаптические входы как от С-, так и Аδ-волокон афферентов (Grudt, Perl, 2002; Hantman et al., 2004; Yasaka et al., 2007). При этом С-волокна являются пресинаптическими к вертикальным и радиальным клеткам (Uta et al., 2010). Другие считают, что С-волокна являются пресинаптическими ко всем типам клеток пластинок I и II (Lu, E.R. Perl, 2005).

Некоторые авторы (Molander et al., 1984, 1989; Grant, Koerber, 2004) выделяют в пластинке II две зоны: По – внешнюю (outer), интенсивно окрашенную с более плотно расположенными клетками, Пи – внутреннюю (inner), с диффузно локализованными клетками. По мнению R. Ruscheweyh et al. (2011) во внешней части оканчиваются ноцицептивные волокна, во внутренней части – мультимодальные волокна. Другие, учитывая наличие в пластинке II у крысы синаптических гломерул (Bishop, 1980; Coimbra, 1982; Ribeiro-da-Silva, 2004), делят ее на ПА и ПВ, соответствующие По и Пи. Кроме того, пластинку ПВ делят на две подпластинки: ПВd – соответствует дорсальной части внутренней зоны пластинки II; ПВv – соответствует более объемной вентральной части пластинки Пи.

Синаптические гломерулы – клубочки, представляющие собой сложные синаптические структуры, состоящие из первичных сенсорных аксональных бутонов, окруженных несколькими дендритами интернейронов спинного мозга – присутствуют в изобилии только в пластинке ПВ, в частности, в её подпластинке d. Имеющиеся данные показывают, что гломерулы являются системой

интеграции, обеспечивающей передачу сенсорной импульсации на несколько интернейронов спинного мозга с помощью одного аксонального бутона (Ribeiro-da-Silva, 2004).

Имеется и другая точка зрения на структуру пластинки II. L. Rolando (1824) разделил желеобразное вещество в сером веществе дорсального рога спинного мозга на внешнюю, более тонкую область - маргинальную (краевую) или губчатую, содержащую нейроны крупного размера, которая в настоящее время соответствует пластинке I, и внутреннюю, более широкую компактную область, состоящую из мелких нейронов, называемую студенистое вещество (желатинозная субстанция), которое непосредственно соответствует пластинке II (Beal, Cooper, 1978).

J. Szentagothai (1964), M.E. Scheibel, A.B. Scheibel (1968) при окраске серого вещества спинного мозга по Гольджи не наблюдали значительных различий в структуре нейронов пластинок II и III, объединив их в единый студенистый комплекс. P.D. Wall (1967), S. Gobel (1978), B. Bishop (1980) объединили в студенистое вещество наружную зону, которая соответствует пластинке II и внутреннюю зону, которая соответствует пластинке III, на основании того, что в эти области приходит импульсация от всех известных типов рецепторов первичных афферентов, где и претерпевает комплексную интегративную обработку.

На современном этапе исследований появились новые основания объединить пластинки I и II в поверхностную область дорсального рога ввиду того, что однотипные их нейроны участвуют в образовании локальных цепей, связанных с сенсорными нейронами, тонкие миелинизированные A δ - и немиелинизированные C-волокна которых, проводят импульсы термо- и ноцицептивной чувствительности (Kumazawa et al., 2004; Lu, Perl, 2005; Pinto et al., 2008). Однако, в пластинке II заканчивается и часть механорецептивных волокон (Todd, 2010).

Синаптические терминалы, организованные в виде клубочков являются основными морфологическими структурами поверхностной области дорсального

рога и представляют собой фундаментальный субстрат для модуляции сенсорной информации, где большая дорсальная часть этой области содержит клубочки, являющиеся центральными терминалями немиелинизированных афферентных нейронов, и меньшая вентральная часть содержит клубочки от миелинизированных волокон (Ribeiro-da-Silva, 2004). Очевидно, это отражает функциональную организацию специфичности пластинок, где во внешней части пластинки II преимущественно оканчиваются волокна ноцицептивных афферентных нейронов (Ruscheweyh et al., 2011). Нейроны пластинки I получают моносинаптические входы от А- и С-волокон и находятся под постоянным контролем ГАМК-ергических интернейронов пластинки II (Fenselau et al., 2011). При этом аксоны не покидают пластинки II, а наоборот дендриты пластинки I распространяются в пластинку II (Kato et al., 2009). Нейрональная многотипность поверхностной области дорсального рога спинного мозга предполагает абсолютную надёжность для возможностей модуляции ноцицептивной импульсации (Yu et al., 1999; Youn, 2002; Andrew, 2009).

Пластинки III и IV относят к глубокой области дорсального рога спинного мозга (Schneider, 2008), в которую проецируется импульсация от механорецепторов (давление, растяжение, прикосновение, вибрация), образованных крупными миелиновыми А-волоконными афферентами (Lu, 2008; Takazawa, MacDermott, 2010).

Обычно, в пластинках III и IV выделяют три участка концентрации интернейронов: латеральный, срединный, медиальный, что объясняется проявлением первичной соматотопии, то есть гистотопографическим обособлением групп нейронов, принимающих импульсы различной модальности (Molander, Grant, 1986; Пивченко, 1993). В то же время, в глубокой области дорсального рога описывают проекции первичных афферентов к интернейронам: медиальным – проекция дистальных афферентов, к латеральным – проекция проксимальных афферентов (Schoenen, Faull, 2004).

Несмотря на то, что интернейроны поверхностной области дорсального рога являются основной постсинаптической мишенью для аксонов афферентов,

существуют прямые синаптические связи между волокнами афферентов и проекционными нейронами пластинки III. Сочетание методов пэтч-кламп и транснейрональной маркировки нейронов показало, что проекционные нейроны пластинки III образуют моносинаптические соединения с пептидергическими афферентными A δ -волоконками (Grudt, Perl, 2002), преимущественно содержащими вещество P (Todd, 2010). Дендриты очень крупных клеток пластинки IV, являющихся проекционными нейронами, прослеживаются в пластинках II и III как у кошки, так и у крысы (Brown, Fyffe, 1981; Grant, H.R. Koerber, 2004). В пластинках глубокой области дорсального рога крупные нейроны также являются и интернейронами, которые образуют синаптические соединения с волокнами первичных афферентов и аксонами ГАМК-ергических интернейронов самой глубокой области (Todd, 2002), а также с серотонинергическими аксонами, проецирующимися из продолговатого мозга (Stewart, Maxwell, 2000; Polgár др. 2002)

Физиологическая классификация интернейронов дорсального рога подразумевает реакцию их либо на один вид стимула, либо одновременно на различные. Последние – мультирецептивные, чаще всего располагаются в глубокой области дорсального рога, в частности *в пластинке V*, представлены крупными интернейронами, с максимальной их концентрацией в латеральной сетевидной части пластинки (Ritz, Greenspan, 1985). Дендритные проекции обнаруживают нейрональные связи крупных нейронов пластинки V с пластинками VII, III и IV, I и II, аксональные проекции свидетельствуют о принадлежности нейронов к комиссуральным и ипсилатеральным премоторным интернейронам (Miles et al., 2007; Liu et al., 2010; Stepien et al., 2010).

Нейроны пластинок III, IV, V, VI обеспечивают интеграцию сенсорной информации с информацией, которая спускается от супраспинальных структур мозга. Нейроны пластинок IV-VI утолщений спинного мозга у крыс получают моносинаптические влияния от групп мышечных и кожных афферентов конечностей, нижележащие сегменты – влияния от вышележащих, а также от

путей пирамидной и экстрапирамидной систем, включая и ретикулярную формацию (Bett, Sandkuhler, 1995).

Пластинки I и V получают проекции от висцеральных афферентных волокон только путем висцеро-соматической конвергенции, не обнаруживая в их составе нейронов, формирующих соединения исключительно только с висцеральными афферентами (Cervero, Tattersall, 1987), что в принципе подтверждает теорию висцеральной боли механизмами активации соматосенсорных путей.

В области медиального края дорсального рога обнаружены премоторные интернейроны, которые обеспечивают моносинаптические ипсилатеральные (52%) и контрлатеральные связи (3%) и являются мультимодальными нейронами, на которых оканчиваются ноцицептивные волокна поверхностной области дорсального рога, первичные проприорецепторы, а также корковые нейроны (Levine et al., 2014).

В пластинке VII и VIII нейроны являются комиссуральными интернейронами, которые участвуют в формировании премоторных путей от ипсилатеральной группы интернейронов, связанных с проприорецепторами. Комиссуральные интернейроны активируются ретикулоспинальными проекциями (Jankowska et al., 2009). Проекция к преганглионарным нейронам автономной нервной системы обнаружены и от группы мультиполярных нейронов, локализованной в белом веществе спинного мозга вентролатерально от латерального края дорсального рога, обозначаемой как латеральные спинальные ядра, которые присутствуют на всех уровнях спинного мозга (Molander et al., 1984, 1989; Grant, Koerber, 2004; Schoenen, Faull, 2004; Heise, Kayalioglu, 2009).

В поле X нейроны получают комплексный мультисенсорный вход от афферентов различных типов и различного происхождения (Grant, Koerber, 2004). Нейроны поля X получают как висцеросенсорные, так и соматосенсорные входы (Freire et al., 2008). На нейронах заканчиваются серотонинергические и моноаминергические терминалы стволовых структур (Sławińska et al., 2014). Показано, что интернейроны поля X не получают прямых синапатических

контактов от волокон афферентов (Zagoraiou et al., 2009), а только через их ассоциативные связи через возбуждающие или ингибиторные интернейроны, которые располагаются в медиальных частях пластинок IV-VI (Jankowska et al., 2009).

К премоторным нейронам относят не все интернейроны, а только их популяцию, напрямую связанную с мотонейронами. К группе премоторных интернейронов, таким образом, относится часть интернейронов дорсального рога, часть интернейронов области медиального края дорсального рога, разделительные клетки промежуточной зоны, часть интернейронов поля X, клетки Реншоу, Ia и Ib ингибиторные нейроны. По размерам премоторные нейроны относятся, как правило, к малым или средним, их форма многообразна и не имеет специфики (Porseva et al., 2015).

Известно, что клетки Реншоу (Alvarez, Fyffe, 2007), Ia и Ib ингибиторные интернейроны, интернейроны в ди- и полисинаптических рефлексорных схемах, а также участвующие в обеспечении нисходящих влияний являются "классическими интернейронами" (Nogradi, Vrbova, 2006; Goulding, 2009; Alvarez et al., 2013). Большинство α -мотонейронов получают прямой проприоцептивный вход, полученный из группы Ia-интернейронов, тогда как γ -мотонейроны не имеют прямого входа от проприоцептивных афферентов (Friese et al., 2009).

3.1.5. Структурно-функциональные изменения спинальных нейронов в постнатальном онтогенезе

Нейрональный состав серого вещества спинного мозга, очевидно, отражает функционально согласованные объединения клеток, которые могут быть идентифицированы морфологически как конкретные клеточные популяции, наиболее многочисленными из которых являются интернейроны, играющие ведущую роль в реализации функций нейронных сетей спинного мозга. В связи с этим представляется важным изучение состояния клеточного состава серого вещества в постнатальном периоде онтогенеза.

ГАМК играет важную роль в работе нейронных сетей спинного мозга, и, что интересно, в онтогенезе его функциональное действие переходит от возбуждающего к ингибиторному (Serrando et al., 2002; Vascèi et al., 2003; Punnakkal et al., 2014). Это онтогенетическое переключение имеет место у всех позвоночных, но на разных стадиях развития в зависимости от типа нейронной сети: между 13-15 эмбриональным днем и первой постнатальной неделей у крысы (Branchereau et al., 2002). Имеются предположения о незрелости у новорожденных животных ингибирующих систем спинного мозга (Vascèi et al., 2003), что предполагает более расширенную восприимчивость полей афферентации у нейронов дорсального рога.

Постнатальные изменения в рефлекторной чувствительности обусловлены разными временными сроками вставания аксонов первичных афферентов в серое вещество спинного мозга крысы: А-волокна начинают вставать в эмбриональном периоде раньше, чем С-волокна (Fitzgerald, Jennings, 1999). В раннем постнатальном периоде вставание аксонов первичных афферентов не является топически точным и не соответствует пластинчатой организации взрослого животного (Wheaton et al., 2015). Так, у новорожденных терминали А β -волокон прослеживаются во всех пластинках дорсального рога, а у взрослых ограничены только глубокой областью дорсального рога. Показано, что вывод их из поверхностной области осуществляется до 21 дня постнатальной жизни. При этом, С-волокна первоначально врастают в поверхностную область дорсального рога спинного мозга, и только к 21-му дню соответствуют топике взрослого животного (Fitzgerald, Jennings, 1999). Медленное созревание афферентных С-волокон и преобладание А-волокон в раннем постнатальном периоде связано с регуляцией рецепторов NMDA, чувствительных к глутамату, которые в спинном мозге новорожденного имеют более высокую концентрацию по сравнению с взрослым животным (Serrando et al., 2002; Vascèi et al., 2003). Доказательства того, что ноцицептивные сигналы обрабатываются по-разному в спинном мозге новорожденных и взрослых также подкрепляются электрофизиологическими данными с центральных терминалей, меченых висцеральных афферентов по

широко распространенным полям, включающим несколько пластинок – I, II, IV и поле X (Sugiura et al., 1989). При этом, по ростокаудальной оси спинного мозга в шейных C2–C4, грудных T8–T10 и поясничных L3–L5 сегментах спинного мозга у мышей обнаружено относительное постоянство и однородность периферийных синаптических входов с отличными свойствами выхода нейронов (Tadros et al., 2012).

Расширение дендритных полей мотонейронов также ограничено временным интервалом: в шейных сегментах спинного мозга с 2-ого по 10-й день постнатальной жизни (Curfs et al., 1993), в поясничных сегментах – первыми тремя неделями жизни (Kalb, 1994), что связывают с ростом количества дендритов (Kalb, 1994), образованием многочисленных длинных шипиков на поверхности перикариона и дендритов с последующей их регрессией (Cummins, Stelzner, 1984). Степень развития дендритных арборизаций, протяженность аксонов и развитие их коллатералей коррелирует с размерами тел нейронов, усложнение ветвлений приводит к нарастанию полиморфизма и к более тонкой функциональной специализации нейронов центральной нервной системы (Цехмистренко, Черных, 2012).

И количество, и положение, мотонейронов в нижних шейных сегментах спинного мозга крысы остаются неизменными на протяжении постнатального развития (Curfs et al., 1993). При этом площадь поперечного сечения мотонейронов в течение первого месяца постнатальной жизни увеличивается на 50%, сопровождая рост дендритов в радиальном и ростокаудальном направлениях (Kalb, 1994). Так, в эмбриональном периоде показана продольная ориентация дендритных сплетений мотонейронов, различий вдоль ростокаудальной оси спинного мозга в моделях нейронных ответов трансмембранных потенциалов шейных и поясничных сегментов спинного мозга не выявляется (Yoshiyasu et al., 1999). Формирование поперечной ориентации дендритов мотонейронов находится в тесном пространственном соотношении под влияниями как проприоцептивной системы, так и нейрональной системы

головного мозга и продолжается в постнатальном онтогенезе (Shneider et al., 2009).

В раннем постнатальном онтогенезе беспородных собак площадь ядра и нейроплазмы мотонейронов спинного мозга имеет тенденцию к увеличению: первый период увеличения – от рождения до 2-х недель, связан с более интенсивным ростом ядра по отношению к нейроплазме; второй период – от 2-х недель до шести месяцев, связан с тем, что площадь нейроплазмы нарастает в большей степени, чем площадь ядра (Писалева, 2012). В некоторых работах отмечают, что в первые две недели постнатального периода размеры мотонейронов существенно не меняются, но уменьшается их плотность расположения в сером веществе спинного мозга, а к 5-му дню жизни появляются множественные клетки-тени (Hori, Hoshino, 2012). Уменьшение количества мотонейронов в шейных сегментах спинного мозга в два раза отмечают на 4-й день постнатальной жизни по сравнению с показателями эмбрионального периода крысы, и до единичных на поперечном срезе спинного мозга — на 14-й день жизни (Sendtner et al., 2000).

В постнатальном периоде происходит количественное перераспределение различных типов нервных клеток в средних грудных сегментах спинного мозга у лягушки, курицы, собаки, свиньи и быка, что, в свою очередь, отражается на их соотношении: число малых нейронов с развитием организма уменьшается, а больших — соответственно увеличивается (Сокульский, 2014).

С. Finazzo (1994) отмечает к годовалому возрасту уменьшение плотности клеток в грудных сегментах спинного мозга крысы в пластинках I, II, III, VII и IX с одновременным уменьшением размеров мотонейронов, пластинки IV и области симпатических преганглионарных нейронов. При этом, с возрастом крысы увеличивается число клеток промежуточно-латерального ядра, пластинок IV и VIII, а количественный состав пластинок V, VI и поля X в течение года жизни животного не меняется.

Увеличение числа нейронов в раннем постнатальном периоде связывают с уменьшением запрограммированной клеточной гибели и увеличением клеточной

пролиферации (Kolb et al., 2007), что регистрируется периодом образования аксонов нейронами в результате непрерывной синаптической реорганизации и является основой развития центральной нервной системы и ее пластичности (Goda, Davis, 2003). В шейных сегментах спинного мозга показано как увеличение количества нейронов, так и увеличение площади серого вещества занимаемой ими, у стареющих (30 месячных) крыс, что предполагает созревание ранее существовавших нейробластов и/или возможный нейрогенез, который происходит в течение всей жизни (Portiansky et al., 2011).

Уменьшение количества нейронов, вполне вероятно, имеет генез апоптоза (Hori, Hoshino, 2012) в результате гибели именно аксотомированных нейронов (Li et al., 1998), имеющих, как правило, высокую активность каспазы-3 (Vanderluit et al., 2000). Сокращение и изменение синапсов наблюдается в течение первых 3-х недель жизни в грудном спинном мозге у крысы (Cummings, Stelzner, 1984), в начале развития количество аксонов и синапсов в спинном мозге превышает аналогичные показатели у взрослых крыс (Chung, Coggeshall, 1984).

Постепенное уменьшение числа клеток и соответствующее уменьшение их суммарных площадей рассматривается как один из узловых признаков проявления нейронального апоптоза. В грудном отделе спинного мозга процессы нейронального апоптоза являются более распространенными и наблюдаются в дорсальных рогах, промежуточной зоне, вентральных рогах, но развиваются медленнее, чем в остальных отделах спинного мозга (Телешева, 2005).

Апоптоз играет фундаментальную роль в контроле конечного числа нейронов и глиальных клеток. Предполагается существование двух критических периодов в апоптотической смерти клетки, имеющих различные механизмы. Первый возникает в период нейрогенеза, не связан с формированием синапсов (Lossi, Merighi, 2003) и наблюдается в пролиферативных зонах конечного мозга в течение первого триместра беременности (Zescevic et al., 2011). Второй связан с дифференцировкой клеток, синаптогенезом, и наблюдается в раннем постнатальном периоде в спинном мозге у новорожденных мышат (Prasad et al., 2008) и до 10-14 дня жизни у крысят (Bardoni et al., 1998).

Уменьшение количества нейронов в раннем постнатальном периоде, возможно, объясняется гибелью нейронов, связанной с высокой активностью глутаматных рецепторов, которые преобладают в раннем постнатальном периоде онтогенеза и запускают процесс клеточной смерти (Punnakkal et al., 2014). Уменьшение количества нейронов в зрелом возрасте, возможно, является следствием адаптации организма к факторам, вызывающим деструкцию нейронов (Ситникова и др., 2012).

3.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.2.1. НЕЙРОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА ГРУДНОГО СПИННОГО МОЗГА У ВЗРОСЛОЙ КРЫСЫ

Во многих областях центральной нервной системы наблюдаются вариации нейропиля – пространство, заполненное сплетением дендритов, нейритов и отростков глии (Немечек, 1978). Ни окраска тионином, ни импрегнация нейрофибрилл серебром, применяемые для изучения морфологических особенностей окончаний функционально различных нейронов, не способствуют распознаванию дендритов или аксонов (Б. Ромейс, 1954). Изучение цитоархитектоники по методу Ниссля заключается в составлении карт спинного мозга по форме, размерам и расположению клеточных тел нейронов, а также по особенностям тигроида (вещества Ниссля) в их цитоплазме, нейропиле при этой методике выглядит более однородным (Grant, Koerber, 2004; Schoenen, Faull, 2004; Яценко, Т.М. Лютикова, 2012; Sengul et al., 2013), так как составные части клеток сильнее удерживают краситель, чем масса волокон (Б. Ромейс, 1954). Определение морфологических типов нейронов серого вещества спинного мозга на основании структурных признаков включает анализ не только формы тела клетки и особенности ветвления проксимальных частей отростков, но и анализ топографии клеток в сером веществе, их размеры, плотность расположения, особенности строения нисселевского вещества, межнейрональные связи.

3.2.1.1. Нейрональный состав пластинок дорсального рога спинного мозга

В 90-дневном возрасте крысы на поперечном срезе спинного мозга во всех пластинках дорсального рога присутствует четыре типа нейронов, различающихся формой клеточного тела: овальные, веретеновидные, треугольные и многоугольные (Рис. 3.1.).

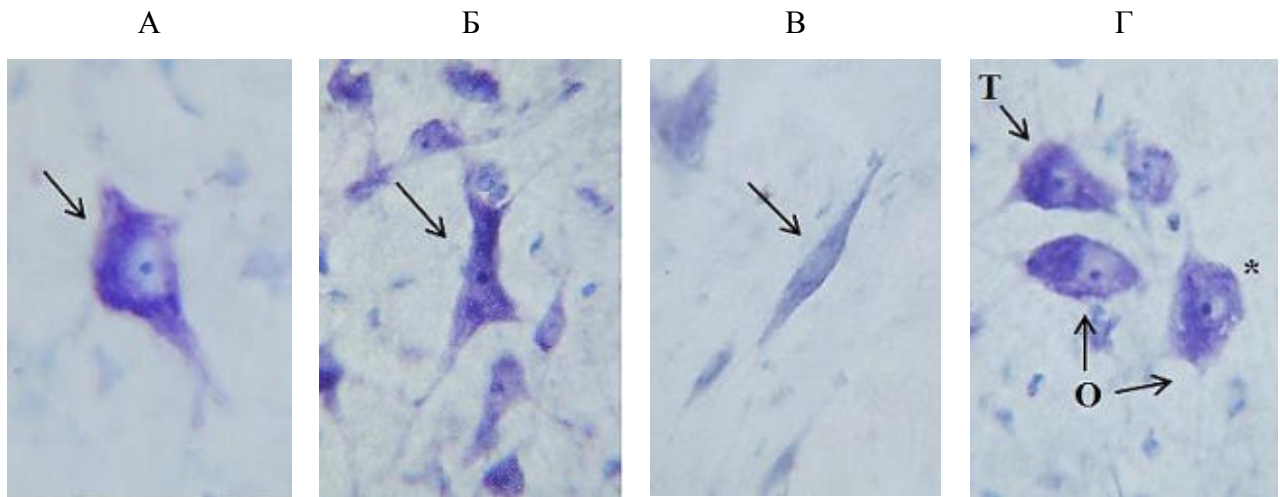


Рисунок 3.1. Форма нейронов дорсального рога второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Нислю. Об. 40, ок. 10.

Стрелками обозначены нейроны, форма тела которых:

А, Б – многоугольная;

В – веретеновидная;

Г – овальная (О), треугольная (Т).

Как видно, мультиполярность не всегда отражает форму сомы нейрона: как треугольная форма тела нейрона, по сути, представленная мультиполярной клеткой, то есть имеет более двух отростков, так и овальная форма тела нейрона тоже может являться мультиполярной клеткой, где от тела нейрона отходит более двух отростков (Рис. 3.1. Г, клетка помечена символом *).

Количественные данные распределения по форме структурных типов нейронов в пластинках дорсального рога спинного мозга представлены в *Таблице 3.1.*

Пластинка I характеризуется равномерным распределением овальных, веретеновидных и треугольных нейронов, относительное содержание которых не превышает 30 % и находится в пределах 28,0-29,3%. При этом, топографически все клеточные формы выявляются на всей площади пластинки, ориентация клеточных тел медиолатеральная. От единичных многоугольных и веретеновидных нейронов отростки направляются вентрально, пересекая границу с пластинкой II (Рис. 3.2.), возможно являясь дендритами (Kato et al., 2009).

Абсолютное (АК, $X \pm Sx$) и относительное количество (ОК, %) морфологических типов нейронов в пластинках дорсального рога во втором грудном сегменте спинного мозга в 90-дневном возрасте крысы

Пластинки дорсального рога	Овальные		Веретеновидные		Треугольные		Многоугольные	
	АК	ОК	АК	ОК	АК	ОК	АК	ОК
Пластинка I	6,6±0,1	29,3	6,5±0,1	28,9	6,3±0,1	28,0	3,1±0,1	13,8
Пластинка II	68,8±0,2	74,6	14,7±0,2	15,9	4,9±0,1	5,3	3,9±0,1	4,2
Пластинка III	64,3±0,2	79,9	9,8±0,2	12,2	3,8±0,1	4,7	2,6±0,1	3,2
Пластинка IV	47,5±0,2	57,2	19,8±0,1	23,8	10,4±0,1	12,5	5,4±0,1	6,5
Пластинка V	42,4±0,3	47,4	16,5±0,2	18,4	15,9±0,1	17,8	14,7±0,2	16,4

Выделяется область латеральной трети пластинки, где располагаются нейроны веретеновидной, треугольной и многоугольной форм, имеющие относительно большие размеры тела – $145,3 \pm 5,4 \text{ мкм}^2$, количество которых на срезе в пластинке составляет $3,5 \pm 0,01$ и $15,5\%$ от общего количества нейронов пластинки. Из выявленных типов нейронов самые малые размеры имеют клетки – овальной формы (до 70 мкм^2), наибольшие – веретеновидной формы, нейроны треугольной и многоугольной форм тел занимают промежуточные размеры (до 90 мкм^2).

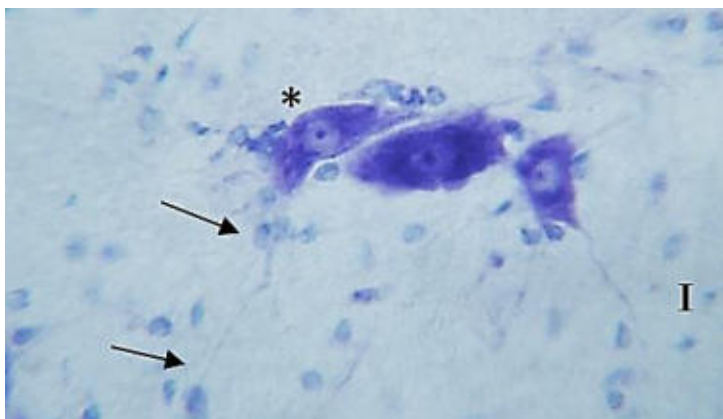


Рисунок 3.2. Нейроны пластинки I дорсального рога второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Нисслю. Об. 40, ок. 10.

Символом * обозначен веретеновидный нейрон.

Стрелками обозначена протяженность отростка.

Пластинка II по распределению соответствующих типов нейронов явно отличается от пластинки I. Более половины всех нейронов представлено клетками овальной формы тела, доля которых составила 74,6%. Минимальный процент нейронов пластинки II имеет треугольную и многоугольную формы тела, что не превысило относительного содержания в 5% для каждой популяции клеток. Соответственно этому, доля веретеновидных нейронов уменьшилась до 15,9%, но общее количество нейронов этой формы в пределах пластинки II превысило аналогичные показатели пластинки I в 2,3 раза.

Нейроны крупных размеров (Grgurevic et al., 1999; Ristanovic et al., 2006) имеют треугольную, веретеновидную и многоугольную формы тела, топографически определяются в медиальной и латеральной областях пластинки, количество которых на срезе в пластинке составляет $3,9 \pm 0,01$ и 4,3% от общего количества нейронов пластинки (Рис. 3.3.).

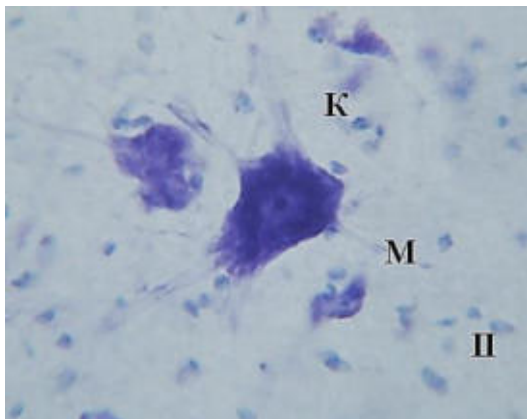


Рисунок 3.3. Нейроны пластинки II дорсального рога второго грудного сегмента спинного мозга крысы.

Окраска по Нисслю. Об. 40, ок. 10.

К – крупный нейрон.

М- мелкий нейрон.

Веретеновидная популяция клеток заполняет вентральную область пластинки, что топографически соответствует её внутренней зоне (Pi), по-видимому, обеспечивая связи с пластинкой III (Light, Kavookjian, 1998) в виду значительной вентральной протяженности отростков, которые прослеживаются в дорсальной части пластинки III (Рис.3.4.). Данные отростки, возможно, являются дендритами, так как показана локальность аксональных ветвлений нейронов непосредственно в границах самой пластинки II (Maxwell et al., 2007).

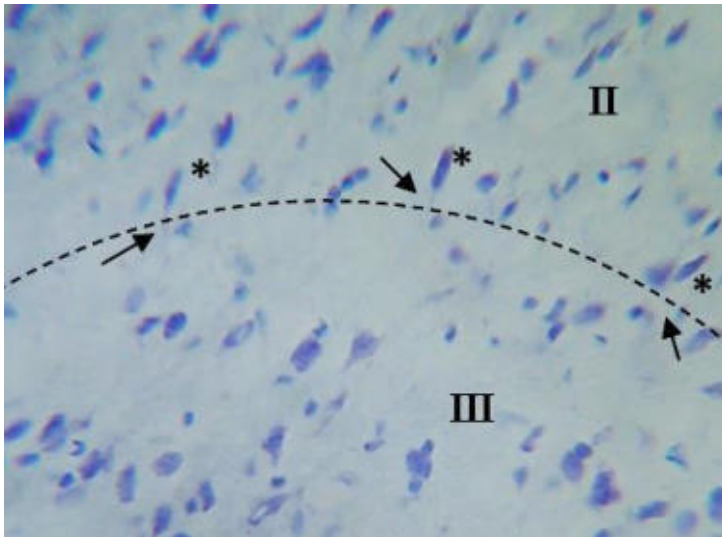


Рисунок 3.4. Нейроны пластинок II и III дорсального рога второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Нисслю. Об. 20, ок. 10.

Символом * обозначены веретеновидные нейроны.

Стрелками обозначено направление отростков.

Действительно, внутренняя зона пластинки (вентральная область) представлена клетками расположенными диффузно (Grant, Koerber, 2004), в отличие от внешней зоны (дорсальная область), где клетки располагаются более плотно. Из выявленных типов нейронов самые малые размеры имеют клетки – овальной формы ($62,3 \pm 5,6 \text{ мкм}^2$), наибольшие – веретеновидной формы (более 80 мкм^2), нейроны треугольной и многоугольной форм тел занимают промежуточные размеры (70 мкм^2).

Пластинка III по распределению клеточных форм повторяет пластинку II. Большая часть нейронов представлена овальными клетками, содержание которых возросло до 80%, меньшая часть – нейронами треугольной и многоугольной форм тела, доля которых не превысила 5%. Отмечается уменьшение, как абсолютного, так и относительного количества веретеновидных форм нейронов. Последние преобладают в вентральной части пластинки III, отростки которых прослеживаются вентрально в дорсальную часть пластинки IV (Рис. 3.5.), возможно, функционально являясь интернейронами, формирующими межнейрональные связи внутри глубокой области дорсального рога спинного мозга (Todd, 2002).

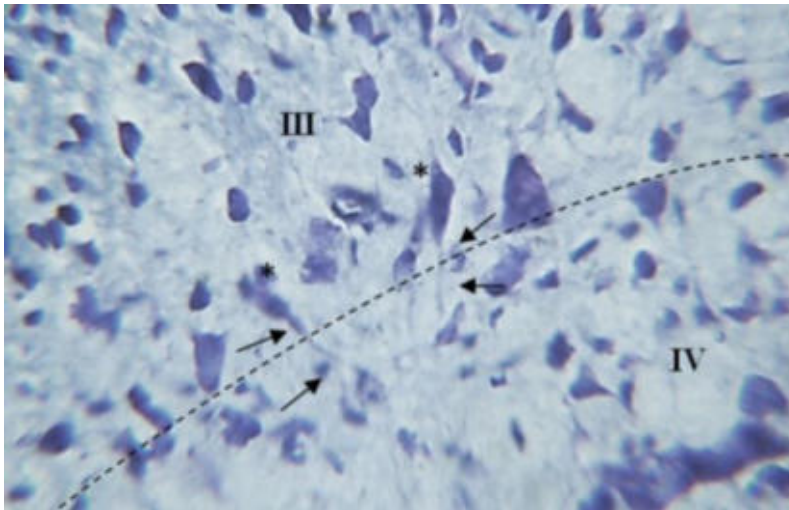


Рисунок 3.5. Нейроны пластинок III и IV дорсального рога второго грудного сегмента спинного мозга крысы.

Окраска по Ниссляу.

Об. 20, ок. 10.

Символом * обозначены веретеновидные нейроны.

Стрелками обозначено направление отростков

В тоже время, веретеновидные и овальные нейроны имеют наибольшие размеры, локализуясь в медиальной и латеральной областях вентральной части пластинки, отростки которых также дают проекции в дорсальную часть пластинки IV. Как видно, максимальные размеры нейронов не исключают принадлежность веретеновидных форм нейронов, как к проекционным, так и к интернейронам спинного мозга. Наибольшие размеры также имеют нейроны треугольной и многоугольной формы пластинки III, топографически выявляются в медиальной и латеральной областях пластинки вентральнее, располагаясь вблизи с границей пластинки IV, средние размеры которых составляют $218,3 \pm 24,5 \text{ мкм}^2$, количество на срезе в пластинке – $6,5 \pm 0,01$ и $8,1\%$ от общего количества нейронов пластинки. Из выявленных типов нейронов самые малые размеры имеют клетки овальной формы $82,6 \pm 14,7 \text{ мкм}^2$.

Пластинка IV характеризуется иным распределением форм нейронов. Так, в отличие от нейронального состава пластинки III, отмечается как абсолютное, так и относительное увеличение веретеновидных (более 20%), треугольных (более 10%) и многоугольных (более 5%) форм клеточных тел нейронов. При этом уменьшается содержание овальных нейронов, процент которых составляет чуть больше половины всей нейрональной популяции пластинки III. Нейроны наибольших размеров топографически располагаются в двух областях пластинки: в латеральной трети – треугольной и многоугольной формы; в области медиального края дорсального рога – веретеновидной формы (Рис.3.6.).

Количество нейронов относительно крупных размеров превышает показатели пластинки III и составляет $9,4 \pm 0,01$ и $11,3\%$ от общего количества нейронов пластинки IV, средняя площадь которых составляет $312,6 \pm 31,4 \text{ мкм}^2$.

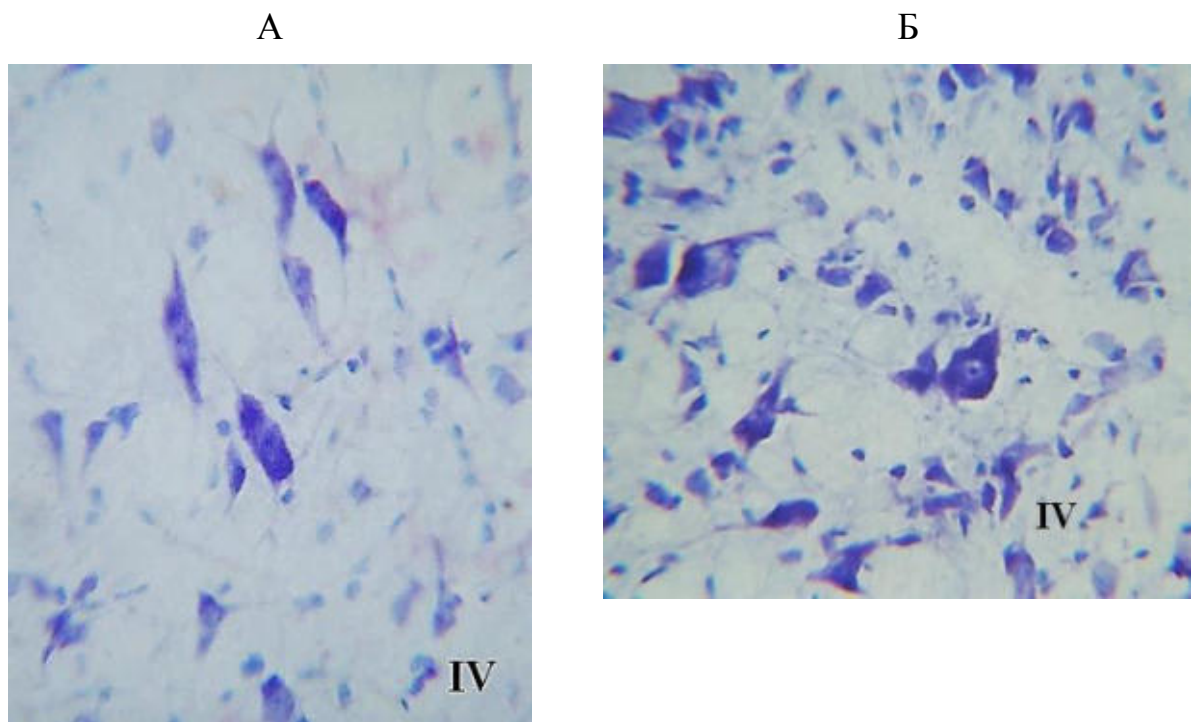
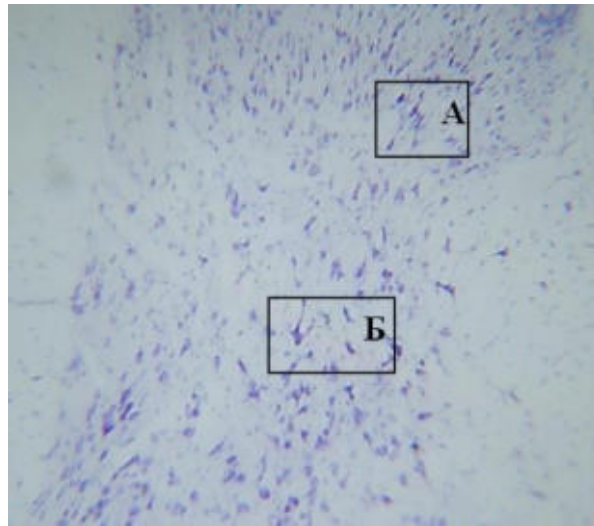


Рисунок 3.6. Крупные нейроны в области медиального края (А) и латеральной трети (Б) пластинки IV дорсального рога второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Нислю. Об. 20, ок. 10.

Увеличение количества нейронов наибольших размеров в пластинках III и IV (около 10%) предполагает их участие в проекционных связях собственного ядра дорсального рога спинного мозга (Antal et al., 1991; Youn, 2002; Todd, 2010; Vhimaidevi et al., 2012). Определяются межнейрональные связи как с пластинкой III, так и с пластинкой V. Отростки нейронов дорсальной части пластинки IV пересекают дорсально границу с пластинкой III и прослеживаются в вентральной части пластинки III, располагаясь по всей длине границы указанных пластинок. Отростки крупных нейронов латеральной трети пластинки IV прослеживаются вентрально в дорсальной части латеральной области пластинки V (Рис. 3.7. А).



Об. 10, ок. 10.

А

Б

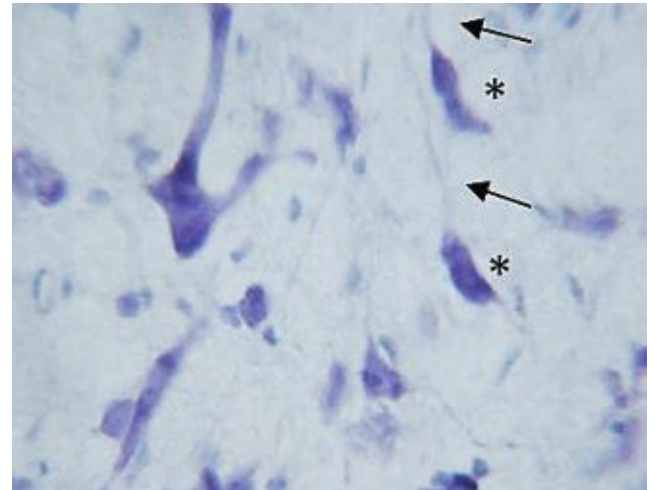
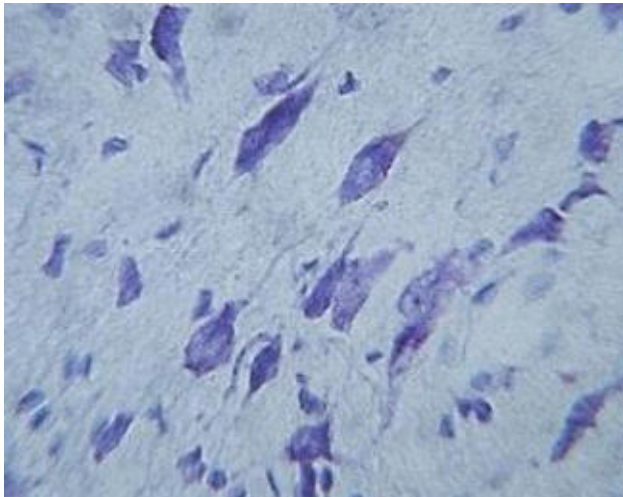


Рисунок 3.7. Нейроны пластинки IV (А) и пластинки V (Б) дорсального рога второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Нисслю.

А, Б – части рисунка, обозначенные соответствующими прямоугольниками: об. 20, ок. 10. Объяснения в тексте.

Символом * обозначены нейроны. Стрелками обозначено направление отростков.

В области медиального края дорсального рога, куда из шейки дорсального рога продолжается пластинка IV, наблюдается изменение направленности, как тел нейронов, так и их отростков: разнонаправленность нейронов, присущая пластинке IV, сменяется дорсовентральной направленностью нейронов медиального края (Рис. 3.6. А). В области дорсальной серой спайки направленность нейронов меняется на медиолатеральную (поперечную), нейроны представлены овальными и веретеновидными формами. Из выявленных типов

нейронов самые малые размеры имеют клетки овальной формы ($85,3 \pm 17,5 \text{ мкм}^2$), наибольшие – веретеновидной формы (более 300 мкм^2).

Пластинка V по распределению клеточных форм отличается от пластинки IV, что проявляется увеличением абсолютного и относительного содержания треугольных (17,8%) и многоугольных (16,4%) форм нейронов, и уменьшением овальных (менее 50%) и веретеновидных (менее 20%) форм нейронов. Также отмечается укрупнение нейронов ($23,1 \pm 0,03$ клеток в пластинке) до 25,6% от общего количества нейронов в пластинке на поперечном срезе спинного мозга, которые представлены всеми формами, но количество их увеличивается в вентральных частях пластинки.

В области верхней трети латерального края шейки дорсального рога от нейронов относительно крупных размеров треугольной и многоугольной формы отходят отростки, которые в латеральном направлении прослеживаются в белом веществе латерального канатика. Латеральная часть пластинки V внешне напоминает сетчатую структуру из-за наличия нейронов с различным направлением отростков.

В дорсальной части пластинки V от нейронов веретеновидной и овальной формы тела отходят отростки в дорсальном направлении в вентральную часть пластинки IV (Рис. 3.7. Б), тела этих нейронов располагаются дорсовентрально и не являются популяцией нейронов, имеющих наибольшие размеры. Из выявленных типов нейронов самые малые размеры имеют клетки овальной формы ($134,4 \pm 15,3 \text{ мкм}^2$), наибольшие размеры – нейроны многоугольной, веретеновидной и треугольной формы (более 300 мкм^2).

Количество нейронов в пластинках дорсального рога спинного мозга представлено в *Таблице 3.2*.

Количество нейронов ($X \pm S_x$) в пластинках дорсального рога во втором грудном сегменте спинного мозга в 90-дневном возрасте крысы

Пластинки дорсального рога	На площади пластинки, N	На стандартной площади $0,001 \text{ мм}^2$, N_p
Пластинка I	$22,5 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$
Пластинка II	$92,3 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,3$
Пластинка III	$80,5 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,2$
Пластинка IV	$83,1 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,1$
Пластинка V	$89,5 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,1$

Наибольшее число нейронов определяется в пластинке II, что наблюдается у всех млекопитающих (Ribeiro-da-Silva, 2004; Schoenen, Faull, 2004; Yasaka et al., 2007; Sengul et al., 2012). Но, и в пластинке V также количество нейронов является превалирующим (около 90 клеток на срезе). В тоже время, в связи с большей площадью пластинки V ($0,166 \text{ мм}^2$), превышающей в 1,9 раза площадь пластинки II ($0,0087 \text{ мм}^2$), плотность расположения клеток уменьшается более чем в 2 раза, что является характерным и для пластинки IV. Минимальное количество клеток наблюдается в пластинке I, но и площадь её также является минимальной ($0,027 \text{ мм}^2$), что предопределяет более высокую клеточную плотность.

Таким образом, при более высоком абсолютном количестве нейронов в пластинках II, III, IV и V, наибольшая клеточная плотность наблюдается в пластинках I, II и III, при максимальной густоте клеток в пластинке II. Действительно, многими авторами указывается одно из оснований для выделения студенистого вещества (пластинка II) – высокая плотность расположения мелких клеток (Lu, Perl, 2005; Todd, 2010; Pawlowski et al., 2013).

3.2.1.2. Нейрональный состав пластинки VII промежуточной зоны спинного мозга

В пластинке VII выявляются такие же формы нейронов, как и в дорсальном роге спинного мозга (Рис. 3.8.), но по распределению соответствующих типов нейронов имеются явные отличия от нейронального состава глубокой области дорсального рога. Около половины всех нейронов пластинки представлено клетками треугольной формы тела ($44,2 \pm 0,3$ клеток в пластинке), доля которых составила 47,7% (Рис. 3.8. А-Е). Минимальный процент нейронов пластинки имеет веретеновидную форму тела, что составляет 10,8% ($10,0 \pm 0,03$ клеток в пластинке). Доля овальных форм нейронов составила 18,1%, многоугольных форм – 23,4%, соответственно общее количество нейронов этих форм на срезе в пластинке – $16,8 \pm 0,3$ и $21,7 \pm 0,2$.

Нейроны крупных размеров имеют треугольную, овальную и многоугольную формы тела, топографически в своём большинстве определяются в центральной области пластинки (Рис. 3.8. А), количество которых на срезе в пластинке составляет $15,9 \pm 0,01$ и 17,2% от общего количества нейронов в пластинке, размеры их составляют $453,5 \pm 22,7$ мкм². Нейроны центральной части пластинки имеют дорсовентральную ориентацию тел, возможно являясь премоторными нейронами, проекции отростков которых уходят в пластинку VIII вентрального рога (Miles et al., 2007; Liu et al., 2010).

В медиальной части пластинки VII, вентральнее нейронов промежуточно-медиального ядра, локализуются нейроны веретеновидной и овальной формы тела с медиолатеральной ориентацией, возможно, являясь комиссуральными, отростки которых через вентральную серую спайку соединяют правую и левую половины спинного мозга (Jankowska et al., 2009). Общее количество нейронов в пластинке VII является преобладающим и составляет $92,7 \pm 0,5$ клеток на поперечном срезе, на стандартную площадь в $0,001$ мм² приходится $0,8 \pm 0,1$ нейрона. Из выявленных типов нейронов самые малые средние размеры имеют клетки веретеновидной формы (до 100 мкм²), наибольшие размеры – многоугольной формы (более 300 мкм²).

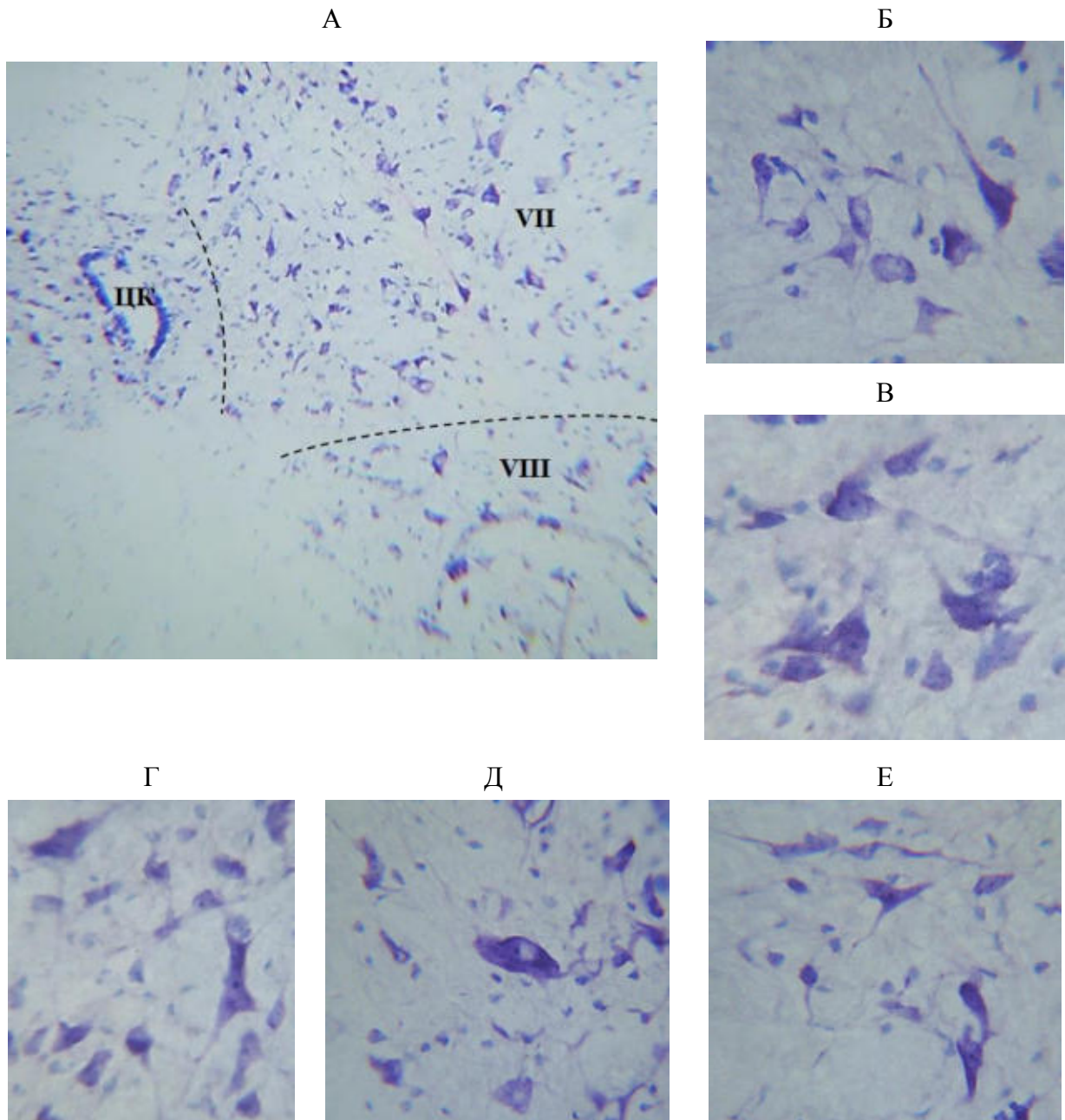


Рисунок 3.8. Нейроны пластинки VII промежуточной зоны второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Нислю.

А. Гистотопография пластинки VII: об. 10, ок. 10; ЦК – центральный канал.

Б - Е. Нейроны различных форм тела и ориентации отростков: об. 20, ок. 10.

3.2.1.3. Нейрональный состав пластинок вентрального рога спинного мозга

Пластинка VIII характеризуется значительным уменьшением общего количества нейронов на срезе – $45,2 \pm 0,4$ клеток, что в 2 раза меньше по сравнению с количеством нейронов пластинки VII промежуточной зоны спинного мозга. Клеточная плотность также уменьшается до $0,3 \pm 0,1$ клеток на стандартной площади пластинки ($0,001 \text{ мм}^2$), что подтверждает данные гистотопографического анализа, проведенного в Главе 2. Но, доленое распределение форм нейронов близко к тому, которое наблюдалось в пластинке VII. Так, более половины нейронов пластинки VIII приходится на многоотростчатые клетки треугольной и многоугольной форм клеточного тела. При этом соотношение их выравнивается: относительное содержание треугольных нейронов составляет 29,2% ($13,2 \pm 0,2$ клеток на срезе), многоугольных нейронов – 32,5% ($14,7 \pm 0,3$ клеток на срезе). Увеличивается содержание веретеновидных форм до 16,4% ($7,4 \pm 0,1$ клеток на срезе) и незначительно повышается доля овальных форм – до 21,9% ($9,9 \pm 0,2$ клеток на срезе).

Отличительной особенностью пластинки VIII является то, что количество нейронов крупных размеров увеличивается до 45,6% ($29,6 \pm 0,4$ клеток на срезе), которые имеют в основном многоугольную форму тела (Рис. 3.9.). Крупные нейроны распределяются равномерно в пределах всей площади пластинки.

Таким образом, в пластинке VIII вентрального рога присутствуют всё те же формы нейронов, которые характерны в целом, как для дорсального рога, так и для промежуточной зоны спинного мозга, но с уменьшением, как общего количественного нейронального состава пластинки, так и абсолютного содержания их отдельных клеточных форм. Из выявленных типов нейронов самые малые средние размеры имеют клетки овальной формы (до 150 мкм^2), наибольшие размеры – многоугольной формы (более 400 мкм^2).

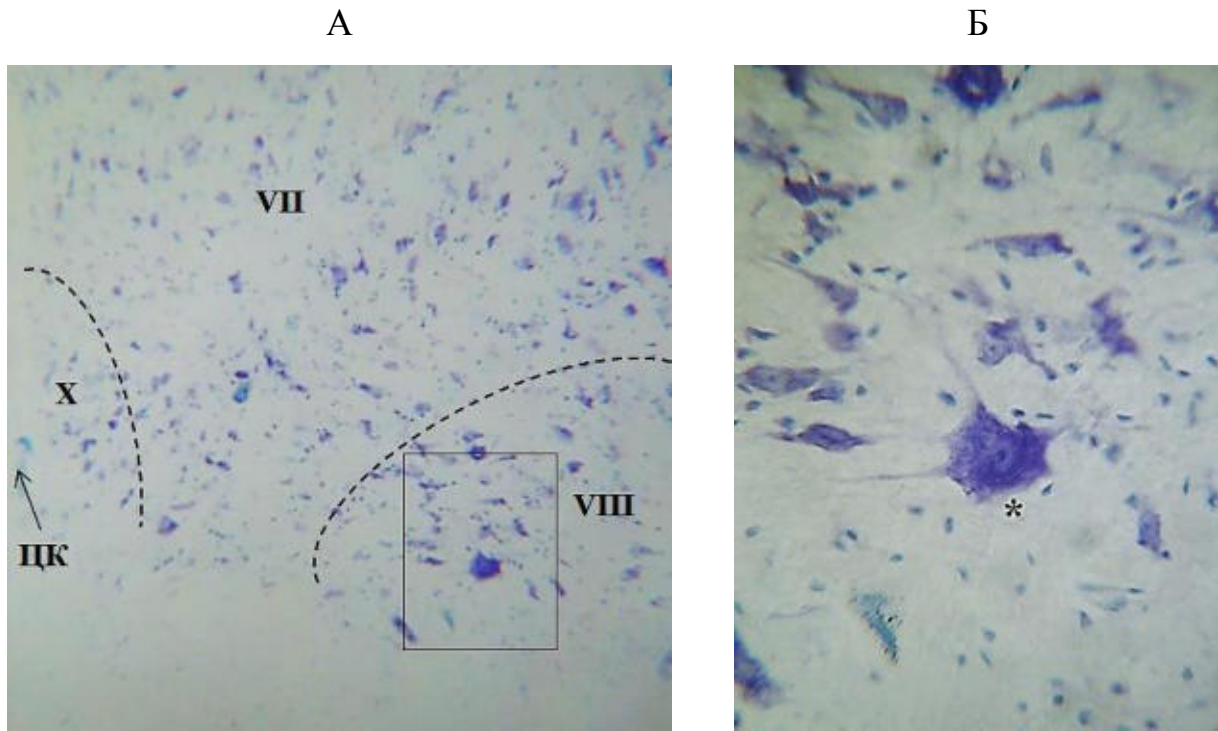


Рисунок 3.9. Нейроны пластинки VIII вентрального рога второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Нисслю.

А. Гистотопография пластинки VIII: об. 10, ок. 10. ЦК – центральный канал. Римскими цифрами обозначены пластинки.

Б. Часть рисунка «А», выделенная прямоугольником.

Символом * обозначен крупный нейрон. Об. 20, ок. 10.

Клеточный состав *пластинки IX* представлен в основном двигательными нейронами (Рис. 3.10.). Мы не проводили количественного анализа распределения форм мотонейронов в пределах пластинки IX, так как у каждого мотонейрона имела место быть неправильность формы. Даже у внешне, приближенного к овальной или округлой форме клеточного тела мотонейрона, определялась выраженная многоугольность (Рис. 3.10. Б).

В обеих частях пластинки IX (вентромедиальная, вентролатеральная группа) выявлялись мотонейроны различных размеров, которые были разделены на две популяции клеток – крупных (средняя площадь более 400 мкм^2) и мелких (средняя площадь до 200 мкм^2) размеров.

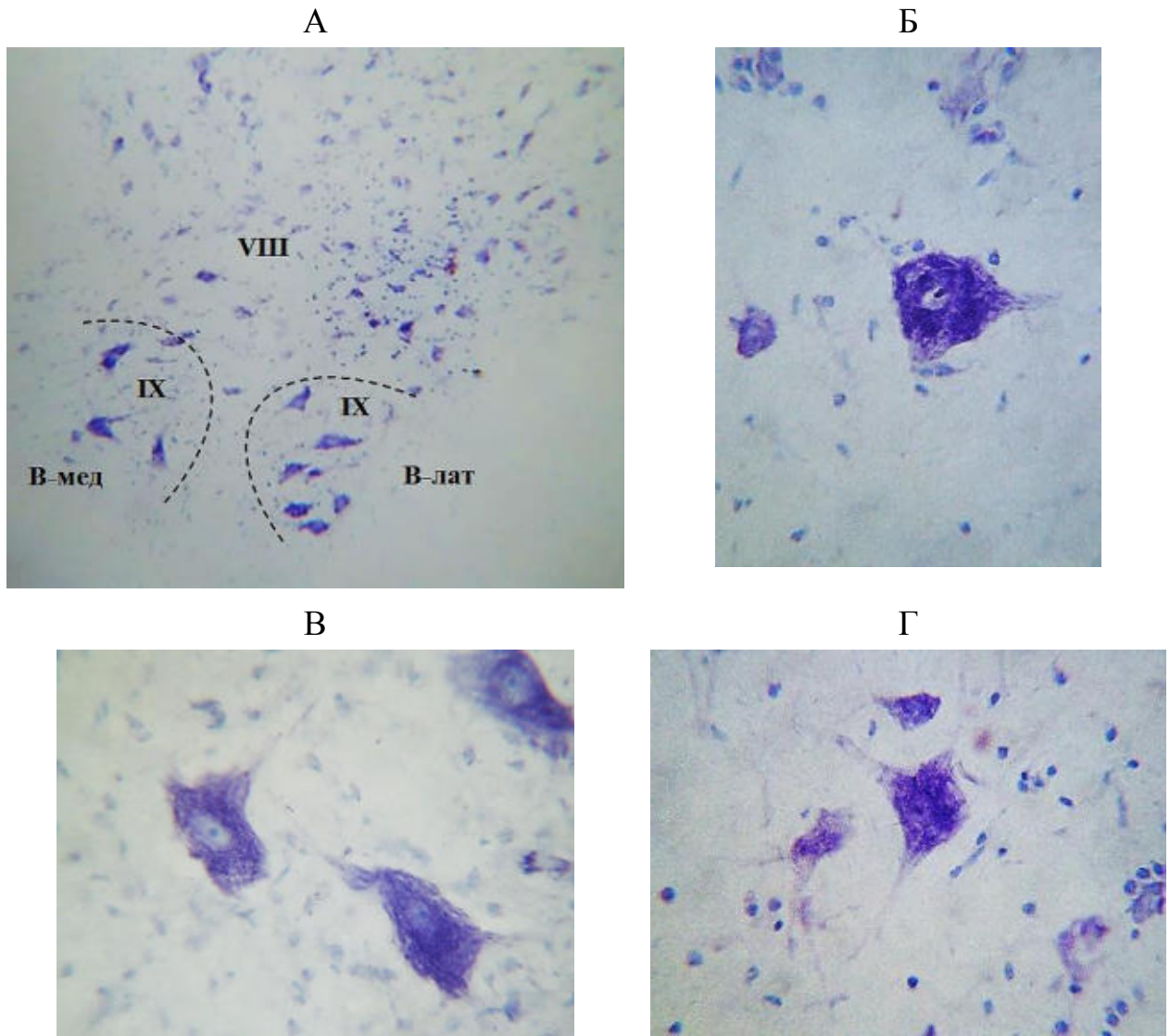


Рисунок 3.10. Мотонейроны вентрального рога второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Нисслю.

А. Гистотопография пластинки IX: об. 10, ок. 10.

Римскими цифрами обозначены пластинки.

В-мед: вентромедиальные мотонейроны. В-лат: вентролатеральные мотонейроны.

Б-Г. Мотонейроны. Об. 20, ок. 10.

На *Рисунке 3.11.(А)* представлены мотонейроны двух различных размерных популяций, при этом визуально определяется их многоотростчатость, характерная для мотонейронов глыбчатость тигроидного вещества, то есть их структурное сходство, что позволяет отнести эту группу мелких нейронов именно к двигательным нейронам – γ -мотонейронам (Calka et al., 2008; Friese et al., 2009).

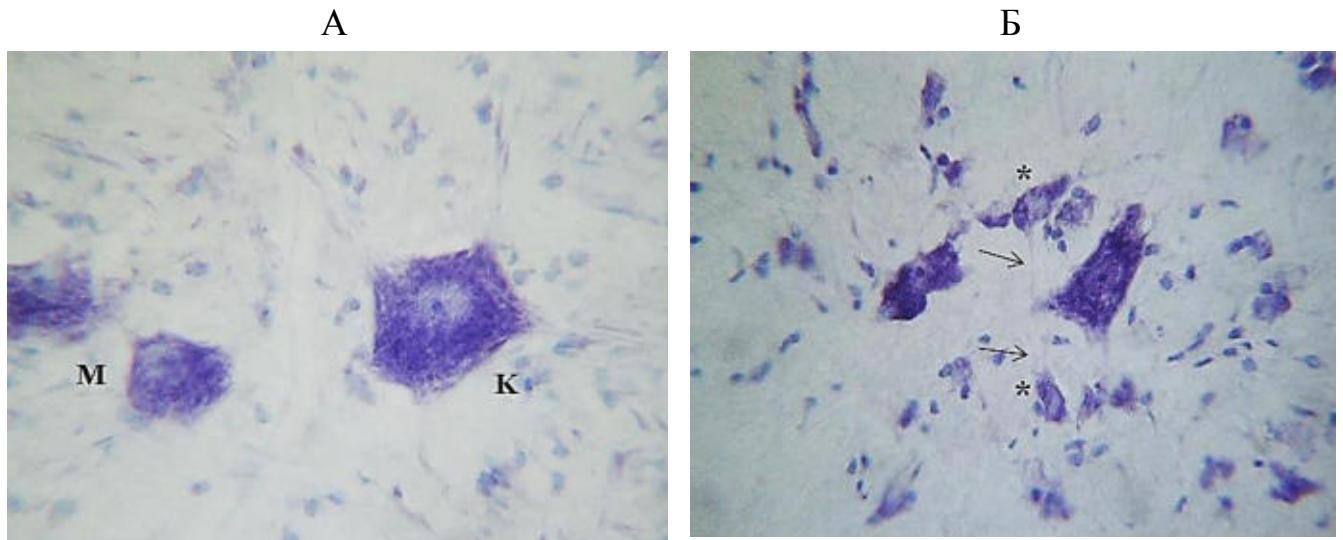


Рисунок 3.11. Нейроны пластинки IX вентрального второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Ниссля. Об. 20, ок. 10.

А. Крупный (К) и малый (М) мотонейроны.

Б. Символом * обозначен интернейрон, стрелкой его отросток.

Действительно, в нашем исследовании обнаруживается структурное сходство по форме тел нейронов (многоугольность = многоотростчатость) пластинки VIII (Рис. 3.9. Б) и мотонейронов спинного мозга (Рис. 3.10. Б; Рис. 3.11. А), а также по наличию гомологичности глыбчатости тигроида в нейроплазме. Но, в части работ, авторами показана связь принадлежности к интернейронам вентрального рога, обусловленная их округлостью формы клеточного тела (Molander et al., 1989; Grant, Koerber, 2004). Действительно, некоторые мотонейроны вентрального рога могут иметь сому тела, приближенную к округлой (Рис. 3.10. Б; Рис. 3.11. А – малый мотонейрон). При анализе количественных характеристик отростков мотонейронов мы обнаружили, что на поперечном срезе спинного мозга от тел мотонейронов отходит максимально до 5 отростков, в большинстве мотонейронов – 3-4 отростка. Отростки, отходящие от тел интернейронов вентрального рога – пластинки VIII, являются всегда более многочисленными: нами было определено более 5 отростков, количество которых было максимальным в количестве 7-8 отростков (Рис. 3.9. Б), что возможно

является критерием в определении принадлежности нейронов вентрального рога непосредственно к интернейронам.

В тоже время, нами обнаружена в пластинке IX еще одна популяция нейронов мелких размеров, площадь которых составила $64,7 \pm 8,5$ мкм², на *Рисунке 3.11. (Б)* клетки помечены символом *. Данная популяция мелких нейронов имеет овальную или треугольную форму, от тела которых отходит 2-3 отростка, один из которых направляется к отростку мотонейрона (*Рис. 3.11. Б* – отростки указаны стрелками). Структура этих нейронов явно отличается от таковой мелких мотонейронов. Локализация и размеры клеток, распространение отростков, служат основанием (Alvarez, Fyffe, 2007) для отнесения их к той популяции интернейронов вентрального рога, которые именуются клетками Реншоу и обеспечивают ипсилатеральное моносинаптическое торможение мотонейронов (Goulding, 2009; Alvarez et al., 2013).

Количественные данные распределения нейронов пластинки IX вентрального рога спинного мозга представлены в *Таблице 3.3*.

Таблица 3.3.

Абсолютное (АК, $X \pm Sx$) и относительное количество (ОК, %) нейронов в пластинке IX вентрального рога во втором грудном сегменте спинного мозга в 90-дневном возрасте крысы

Типы нейронов	Вентромедиальная область		Вентролатеральная область	
	АК	ОК	АК	ОК
Крупные мотонейроны	$5,2 \pm 0,2$	58,4	$5,7 \pm 0,3$	59,4
Мелкие мотонейроны	$2,9 \pm 0,3$	32,6	$3,1 \pm 0,3$	32,3
Интернейроны	$0,8 \pm 0,1$	9,0	$0,8 \pm 0,1$	8,3

Клеточная плотность в обеих областях пластинки IX была одинаковой - $0,3 \pm 0,1$ клеток на стандартной площади в $0,001$ мм². Общее количество нейронов в областях пластинки IX значимо не различалось и составило в вентромедиальной области – $8,9 \pm 0,3$ клеток на срезе, в вентролатеральной – $9,6 \pm 0,2$ клеток на срезе.

Самой малочисленной популяцией в пластинке IX у крысы являются интернейроны. Показано, что у мышей в поясничном утолщении спинного мозга клетки Реншоу составляют 2-3 % от всех вентральных интернейронов, а соотношение их с мотонейронами составляет 1 к 5 (Alvarez, Fyffe, 2007). У крысы во втором грудном сегменте клетки Реншоу составляют 1,7% от всех интернейронов вентрального рога, а соотношение их составляет: 1 клетка Реншоу к 10 мотонейронам в вентромедиальной области, и к 11 мотонейронам в вентролатеральной области пластинки IX.

3.2.1.4. Нейрональный состав поля X спинного мозга

В поле X выявляются все формы интернейронов, которые были обнаружены в дорсальном роге, в промежуточной зоне и в пластинке VIII вентрального рога спинного мозга у крысы (Рис. 3.12.). Форма нейронов, локализованных в дорсальной серой спайке, показана на *Рисунке 2.6. (А)* в Главе 2.

Количественные данные распределения форм нейронов в различных частях поля X спинного мозга представлены в *Таблице 3.4.*

Таблица 3.4.

Абсолютное (АК, $X \pm S_x$) и относительное количество (ОК, %) морфологических типов нейронов в поле X во втором грудном сегменте спинного мозга в 90-дневном возрасте белой крысы

Поле X	Овальные		Веретеновидные		Треугольные		Многоугольные	
	АК	ОК	АК	ОК	АК	ОК	АК	ОК
Дорсальная серая спайка	19,4±0,3	42,7	6,9±0,2	15,3	11,0±0,3	24,2	8,1±0,1	17,8
Вентральная серая спайка	14,4±0,3	46,6	2,3±0,1	7,5	7,2±0,1	23,4	6,9±0,1	22,5
Центральная часть правая	22,8±0,2	53,9	2,5±0,1	5,9	7,3±0,1	17,3	9,7±0,1	22,9
Центральная часть левая	20,1±0,2	51,9	2,2±0,1	5,7	7,0±0,1	18,1	9,4±0,1	24,3

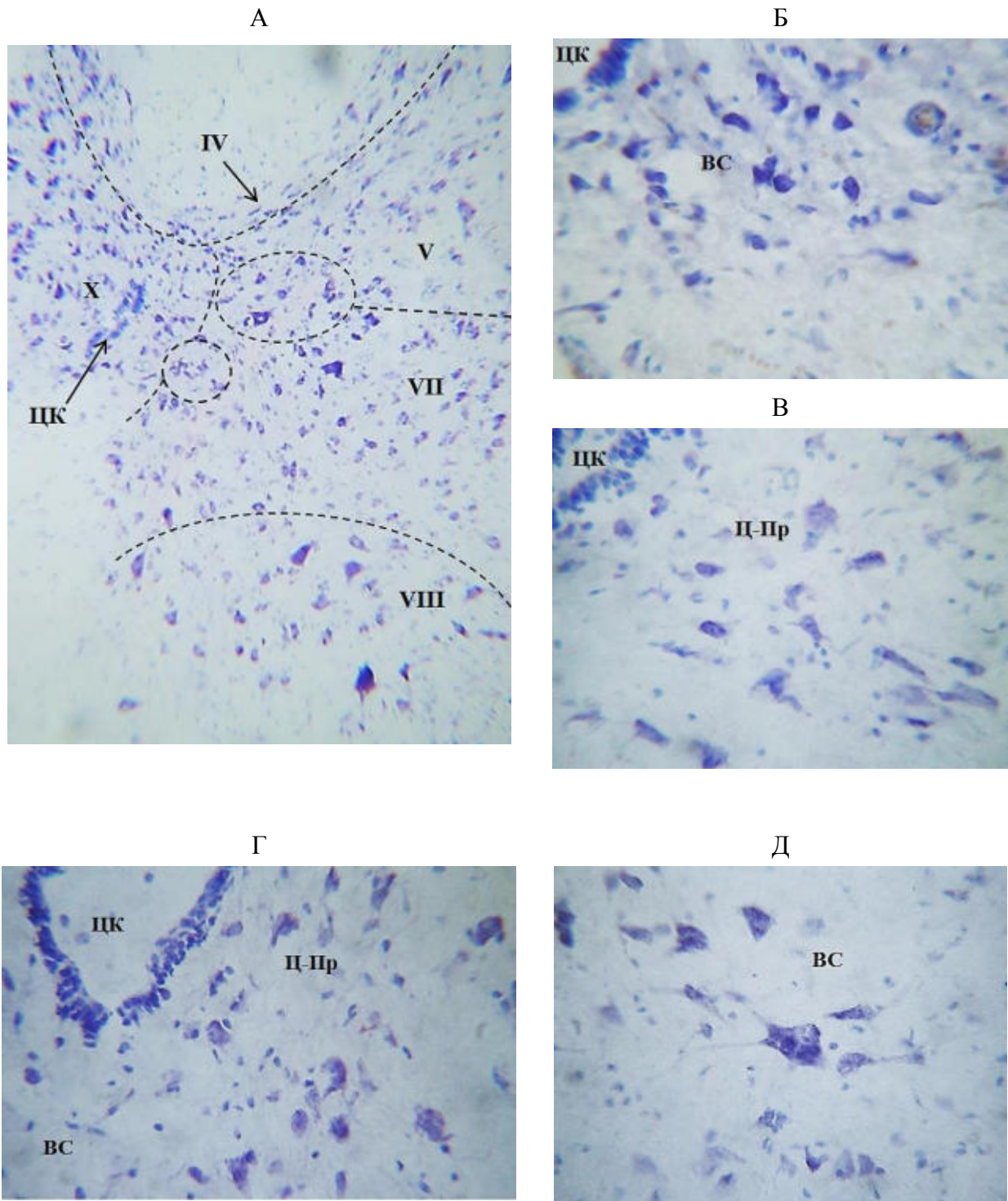


Рисунок 3.12. Нейроны поля X второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Нислю.

А. Гистотопография поля X: об. 10, ок. 10.

Римскими цифрами обозначены пластинки. ЦК – центральный канала.

Б, Д. Нейроны вентральной серой слайки (ВС). Об. 20, ок. 10.

В, Г. Нейроны правой центральной части (Ц-Пр). Об. 20, ок. 10.

Большая часть нейронов поля X имеет овальную форму тела, содержание которых больше в центральных частях поля (более 50%), и чуть меньше в его дорсальной серой спайке (чуть более 40%). Меньшая часть нейронов поля X представлена нейронами веретеновидной формы, содержание которых является максимальным в дорсальной серой спайке (15,3%) и минимальным в его центральных частях (5,7-5,9%). На долю нейронов треугольной и многоугольной форм тела в среднем приходится около 20%, но в области вентральной и дорсальной спаек преобладают треугольные формы, напротив, в центральных частях преобладающими являются нейроны многоугольных форм.

Плотность расположения нейронов в поле X составляет 4 клетки в 0,001 мм² (Табл. 3.5.). Но, с учетом выделения частей в поле X, обнаруживаются различия клеточной плотности: более высокая заполняемость нейронами характерна для центральных частей (в среднем 6-7 клеток), менее – для серых спаек (2-3 клетки). При этом, абсолютное количество нейронов на срезе является максимальным в области дорсальной серой спайки.

Таблица 3.5.

Количество нейронов ($X \pm S_x$) в поле X во втором грудном сегменте спинного мозга в 90-дневном возрасте крысы

Поле X	На площади поля, N	На стандартной площади 0,001 мм ² , N_p
Дорсальная серая спайка	45,4±0,4	3,1±0,5
Вентральная серая спайка	30,8±0,3	2,4±0,5
Центральная часть правая	42,3±0,2	6,9±0,9
Центральная часть левая	38,7±0,3	6,8±0,8
Общее количество	157,2±0,6	4,0±0,6

Из выявленных типов нейронов самые малые размеры имеют клетки овальной формы (до 100 мкм²), наибольшие размеры – многоугольной формы (более 200 мкм²). Мелкие клетки преимущественно располагаются в центральных частях и в вентральной серой спайке, в дорсальном направлении поля X клетки

укрупняются и в дорсальной серой спайке имеют наибольшие средние размеры (234,6 мкм²).

3.2.1.5. Нейрональный состав ядер спинного мозга

В дорсальном, промежуточно-медиальном, вставочном и промежуточно-латеральном ядрах выявляются различные формы нейронов: овальные, веретеновидные, треугольные, многоугольные (Рис. 3.13.)

Большая часть нейронов дорсального ядра имеет треугольную форму (более 30%), меньшая часть – веретеновидную (16,4%), овальные и многоугольные нейроны определяются в равных количественных соотношениях (22,6%) и занимают промежуточные значения (Табл. 3.6.).

Таблица 3.6.

Абсолютное (АК, $X \pm S_x$) и относительное количество (ОК, %) морфологических типов нейронов в ядрах второго грудного сегмента спинного мозга в 90-дневном возрасте крысы

Ядра спинного мозга	Овальные		Веретеновидные		Треугольные		Многоугольные	
	АК	ОК	АК	ОК	АК	ОК	АК	ОК
Дорсальное	3,3±0,1	22,6	2,4±0,1	16,4	5,6±0,1	38,4	3,3±0,1	22,6
Промежуточно-медиальное	4,0±0,1	26,7	2,0±0,1	13,3	4,5±0,1	30,0	4,5±0,1	30,0
Вставочное	2,4±0,1	31,6	0,9±0,1	11,8	2,4±0,1	31,6	1,9±0,1	25,0
Промежуточно-латеральное	4,5±0,1	37,8	1,2±0,1	10,1	3,7±0,1	31,1	2,5±0,1	21,0

В промежуточно-медиальном ядре преобладающими являются треугольные и многоугольные формы нейронов, на долю которых приходится 30% от общего количества нейронов, в минимальном количестве выявляются веретеновидные формы нейронов, количество овальных форм значительное, но составляет менее одной трети клеток ядра (26,7%).

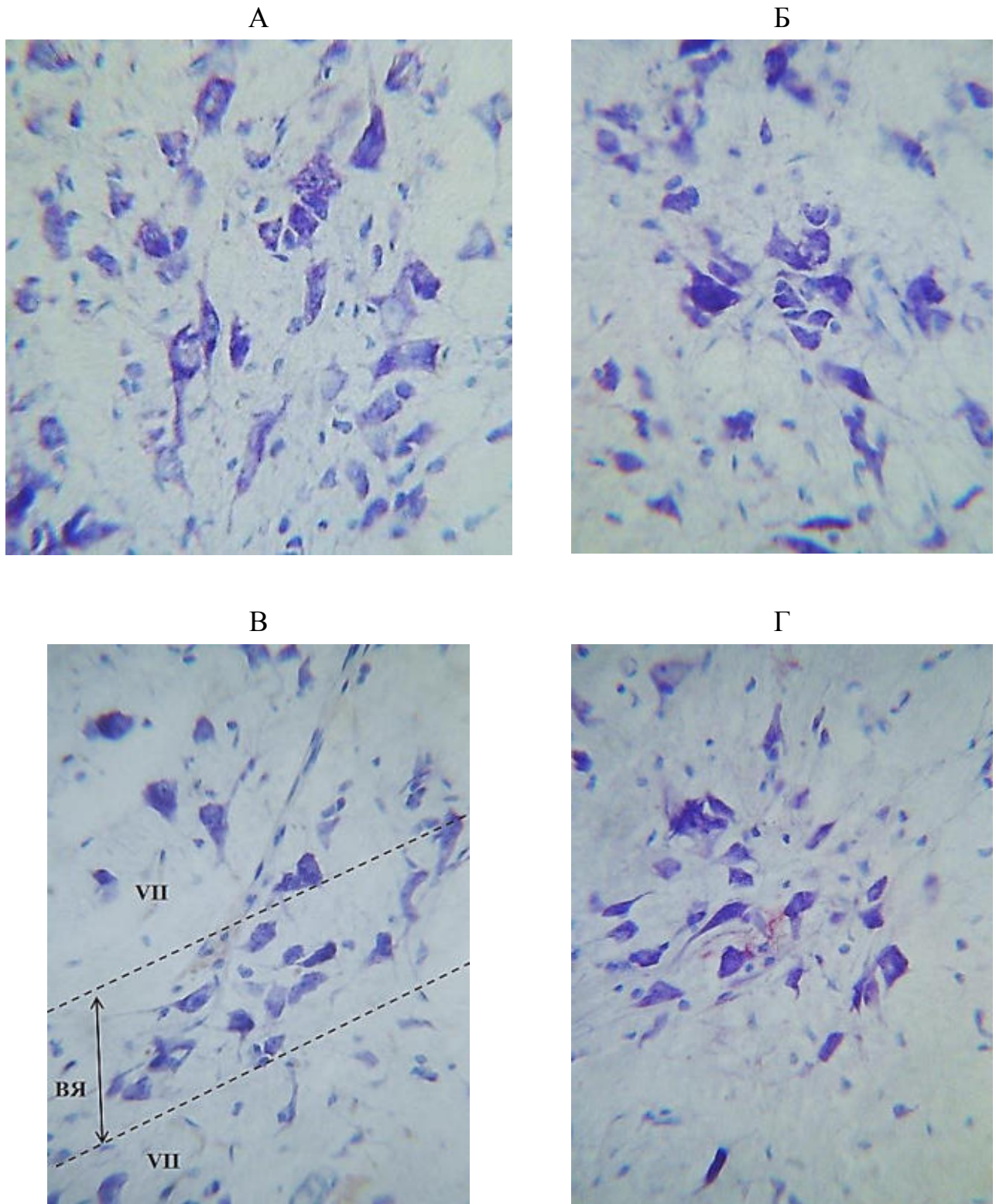


Рисунок 3.13. Нейроны ядер второго грудного сегмента спинного мозга крысы. Окраска по Нислю. Об. 20, ок. 10.
 А. Дорсальное ядро. Б. Промежуточно-медиальное ядро.
 В. Вставочное ядро (ВЯ), локализованное в пластинке VII. Область ядра ограничена пунктирными линиями и обозначена двойной стрелкой.
 Д. Промежуточно-латеральное ядро.

В области вставочного ядра большая часть нейронов также представлена треугольными и овальными формами (более 30%), меньшая часть имеет веретеновидную форму (до 12%). Распределение клеточных форм в области промежуточно-латерального отличается от такового вставочного ядра, где преобладающей формой нейронов являются овальные клетки (37,8%). При этом веретеновидные формы нейронов также являются минимальными (10,1%), но одна треть клеток промежуточно-латерального ядра имеет треугольные формы (31,1%) и одна пятая часть клеток имеет многоугольные формы (21,0%).

Количество нейронов в ядрах на срезе спинного мозга представлено в *Таблице 3.7.*

Таблица 3.7.

Количество нейронов ($X \pm Sx$) в ядрах второго грудного сегмента спинного мозга в 90-дневном возрасте крысы

Ядра спинного мозга	На площади ядра, N	На стандартной площади $0,001 \text{ мм}^2$, N_p
Дорсальное	$14,6 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$
Промежуточно-медиальное	$15,0 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$
Вставочное	$7,6 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
Промежуточно-латеральное	$11,6 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$

Максимальная клеточная плотность выявляется в промежуточно-медиальном ядре, что обусловлено его наименьшей площадью среди всех изучаемых ядер. Чуть меньшая плотность расположения нейронов отмечается в дорсальном ядре, но как абсолютное количество нейронов на срезе является преобладающим, так и площадь ядра превышает таковую промежуточно-медиального ядра на 72,7%. Менее плотная заполняемость нейронами дорсального ядра обусловлена и наличием популяции нейронов, имеющих средние размеры более 300 мкм^2 (19,9%), количество которых на срезе – $6,9 \pm 0,1$ клеток. Крупные нейроны дорсального ядра имеют треугольную и многоугольную форму тела. Наименее плотно располагаются нейроны в

симпатических ядрах, что обусловлено их большей площадью, которая максимальна у промежуточно-латерального ядра.

Самые малые средние размеры имеют нейроны промежуточно-медиального ядра ($177,7 \text{ мкм}^2$), самыми крупными являются нейроны дорсального ядра ($270,6 \text{ мкм}^2$). Размеры нейронов симпатических ядер занимают промежуточное положение, но средняя площадь клеток промежуточно-латерального ядра ($229,6 \text{ мкм}^2$) превышает таковую клеток вставочного ядра ($194,4 \text{ мкм}^2$). Как видно, самые малые размеры имеют нейроны промежуточно-медиального ядра, как и нейроны, прилежащих центральных частей поля X.

3.2.1.6. Заключительные замечания

Учение о пластинчатом строении серого вещества спинного мозга имеет свои неопределенности и условности, число которых увеличивается при изучении топографии, формы и размера тел нервных клеток. Анализ опубликованных данных о клеточном составе пластинок серого вещества спинного мозга показывает, во-первых, их противоречивость, во-вторых, различия в ряду изученных позвоночных. Очевидным является и использование различного понятийного аппарата. Так, в основу классификации нейронов серого вещества спинного мозга положены форма тела клетки и дендроархитектоника (Molander et al., 1989; Lu, Perl, 2005; Freire et al., 2008; Todd, 2010; Pawlowski et al., 2013). При этом в части работ показано, что тела клеток вытянуты в плоскости поперечного среза, а проксимальные части отростков прослеживаются в rostrocaudальном направлении в плоскости продольного среза (Гилерович и др., 2007; Grant, Koerber, 2004; Yasaka et al., 2007), в других работах отмечено, что тела клеток вытянуты в плоскости продольного среза (Nogradi, Vrbova, 2006; Порсева, 2013).

Несовпадение данных литературы о форме нейронов пластинок серого вещества объясняется разницей в направлении срезов спинного мозга:

- на продольных срезах выявляется веретеновидная форма нейронов (Гилерович и др., 2007; Almarestani et al., 2007);

- на поперечных срезах она является округлой или овальной (Molander et al., 1989; Порсева, 2013);
- при стереометрическом анализе нейрон имеет пирамидальную форму;
- при планиметрическом анализе – треугольную форму (Гилерович и др., 2007; M.E. Scheibel, A.B. Scheibel, 1968; Molander et al., 1984, 1989).

Возможно, что мультиполярный тип нейронов (Nogradi, Vrbova, 2006; Almarestani et al., 2007) отражает их внешнюю морфологию – как клеток, имеющих отростчатую или многогранную форму (Terminologia Histologica, 2009), а на поперечном срезе многоугольную форму, и в тоже время мультиполярный нейрон может иметь как овальную, так и округлую форму тела (Yasaka et al., 2007; Todd, 2010), что нами также было проиллюстрировано. Соответственно этому, выделение биполярных и мультиполярных нейронов (Freire et al., 2009), а также звездчатых или радиальных нейронов (Ribeiro-da-Silva, 2004; Nogradi, Vrbova, 2006; Todd, 2010), определяет полюсную ориентацию нейронов и количество их отростков, а далеко не форму клеточного тела. Это отражает тот факт, что критерии для идентификации спинальных нейронов могут быть более чем разнообразными. В связи с этим, нами были определены на поперечном срезе в сером веществе спинного мозга четыре структурных типа нейронов на основании их сечения форм клеточных тел: овальные, веретеновидные, треугольные и многоугольные. Полученные данные свидетельствуют, что в целом, серое вещество спинного мозга у взрослой крысы имеет одинаковый набор морфологических форм нейронов, но различную их гистотопографию соответственно его пластинчатости, что, по-видимому, обусловлено разнотипностью функций. Интерпретация морфологических данных усложняется в связи с наличием в сером веществе спинного мозга, как проекционных, так и собственно интернейронов (Grudt, Perl, 2002; Miles et al., 2007; Todd, 2010; Coulon et al., 2011).

Связь размерных характеристик нейронов с их разделением на собственно интернейроны и проекционные нейроны указана многими авторами (Freire et al., 2008; Todd, 2010; Bhimaidevi et al., 2012): одним из критериев отличия

проекционного нейрона от собственно интернейрона является размер клеточного тела. Нами выявлена определенная специфичность в локализации крупных нейронов в пластинках II, III и IV дорсального рога, которая обусловлена их топическим расположением в медиальных и латеральных областях пластинок. Крупные нейроны, возможно, могут являться собственно интернейронами, участвующими в межламинарных связях, единичные нейроны крупных размеров присутствуют и в вентральных частях пластинок II, III и IV, отростки которых прослеживаются в соответствующих пластинках, расположенных вентральнее. Возможно, эти нейроны дают проекции к спинальным интернейронам посредством миелиновых аксонов (Light, Kavookjian, 1998). В медиальных областях локализуются нейроны, обеспечивающие контрлатеральные соединения (Grudt, Perl, 2002).

При анализе распределения структурных типов нейронов, выделяемых на основании их форм тела, мы не обнаружили значительных различий в их количественном содержании в пластинках II и III дорсального рога, что согласуется с данными, полученными более полувека назад, в которых обе пластинки объединили в один структурный студенистый комплекс (Szentagothai, 1964; Beal, Cooper, 1978). В тоже время, однотипность обусловлена выделением в пластинке II соответствующих зон (Ribeiro-da-Silva, 2004; Ruscheweyh et al., 2011), где внутренняя зона, то есть вентральная область пластинки является не только структурно (Molander et al., 1984; 1989), но и функционально подобной пластинке III. Нами было показано, что отростки нейронов морфологически однотипных нейронов, локализованных в вентральных областях пластинок II и III – веретеновидных, распространяются вентрально, пересекая границы пластинок, и продолжают в дорсальные части соответствующих пластинок, расположенных вентрально: из пластинки II в пластинку III, из пластинки III в пластинку IV. При этом, данные межламинарные нейрональные связи прослеживаются и в пластинках глубокой области дорсального рога спинного мозга, которые также формируются веретеновидными нейронами. Так, отростки нейронов пластинки IV распространяются в дорсальную часть пластинки V. Более

того, формируются связи в дорсальном направлении: отростки веретеновидных и овальных нейронов пластинки V пересекают границу пластинки IV, а отростки нейронов пластинки IV пересекают границу пластинки III, продолжаясь в вентральные части соответствующих пластинок, расположенных дорсальнее. Таким образом, выделение пластинок III, IV и V в глубокую область дорсального рога, не исключает и участия внутренней зоны пластинки II, куда приходит импульсация от всех типов рецепторов первичных афферентов, являясь по сути мультирецептивной, что обеспечивает их комплексную интеграцию.

Овальной формы нейроны являются самой многочисленной популяцией клеток в пластинках дорсального рога спинного мозга, что не исключает их участия, как в формировании проекционных путей, так и собственно внутриспинальных связях. Межламнарные нейрональные связи формируются преимущественно нейронами веретеновидной формы тела в пластинках II и III, веретеновидной и овальной формы тела в пластинках IV и V. Нами не были определены проекции отростков у нейронов, имеющих треугольную и многоугольную формы клеточных тел, популяционная численность которых преобладает в пластинках I, IV и V, по сравнению с пластинками II, III. Показано, что эти формы нейронов также в большинстве своём имеют относительно крупные размеры (более 300 мкм²). Возможно, эти типы нейронов обеспечивают конвергенцию сенсорной и супраспинальной импульсации, что подтверждается объединением нейронов пластинки I, IV и V в функционально различные кластеры, обеспечивающие связи в широких динамических диапазонах, включающих и висцеро-соматическую конвергенцию. В тоже время, функциональная специфичность спинальных нейронов обусловлена наличием миелиновых аксонов (Grudt, Perl, 2002). Крупные нейроны пластинки V, дающие отростки в боковой канатик могут быть как внутриспинальными, дающими проекции в латеральные спинальные ядра (Liu et al., 2010; Coulon et al., 2011), так и проекционными, формирующими тракты бокового канатика (Schoenen, Faull, 2004). По-видимому, мультиполярность треугольных и многоугольных форм нейронов является прерогативой не только интернейронов спинного мозга.

Показано, что крупные нейроны пластинки V и VIII, имеющие звездчатую форму, являются сходными по морфологии с мотонейронами вентрального рога спинного мозга (Ritz, Greenspans, 1985; Molander et al., 1989; Grant, Koerber, 2004). В окраске нервных клеток методом Ниссля участвуют как ядерные структуры, так и вещества, находящиеся в цитоплазме клеток, – тигроидные глыбки, глыбки Ниссля или вещество Ниссля (Б. Ромейс, 1954). Мы не обнаружили сходства между интернейронами пластинки V дорсального рога и пластинки VIII вентрального рога: различие заключалось в отсутствии в интернейронах характерной для мотонейронов глыбчатости тигроидного вещества, нейроплазма крупных нейронов пластинки V имела гомогенную окраску.

Из всех пластинок серого вещества наибольшая клеточная плотность наблюдалась в поле X. Данные, полученные на различных млекопитающих (Freire et al., 2009; Sengul et al., 2012; Pawlowski et al., 2013), в том числе и на крысе (Molander et al., 1989; Yasaka et al., 2010), определяют наибольшее количество нейронов характерным для нейрональной организации пластинки II серого вещества спинного мозга. Действительно, из всех пластинок дорсального рога, пластинка II имеет, как максимальную клеточную плотность, так и максимальное абсолютное количество нейронов (Табл. 3.2.). Учитывая то, что мы анализировали всё поле X, включая правую и левую половины спинного мозга, то, возможно, абсолютное количество нейронов в поле X будет меньше, чем в пластинке II, если рассматривать только одну половину спинного мозга, что является затруднительным с позиций комиссуральности или срединности поля X. Но, независимо от этого, клеточная плотность поля X останется прежней и максимальной, что обусловлено в первую очередь малой площадью поля X, которая является минимальной среди всех пластинок спинного мозга, во-вторых, малыми размерами интернейронов, локализованных непосредственно в поле X.

По нейрональному составу общим для всех исследуемых ядер является то, что минимальное количество нейронов имеет веретеновидную форму. Обнаруживается определенное сходство в относительном содержании клеточных форм вставочного и промежуточно-латерального ядер.

Определение принадлежности спинальных нейронов к популяциям интернейронов или к проекционным нейронам предполагает определенные трудности, в которых отдельные нейроны проецируются к более, чем одной мишени, что связано с различными анатомическими и нейрхимическими особенностями клеток (Spike et al., 2003; Almarestani et al., 2007). Безусловно, комплексный анализ их нейрхимических характеристик должен внести ясность в структурную специфичность пластинок. А детально изученное строение пластинок серого вещества спинного мозга, топографии, размеров, формы нейронов, их нейрхимических характеристик позволит представить структурно-функциональную характеристику нервных клеток серого вещества спинного мозга.

3.2.2. ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА ГРУДНОГО СПИННОГО МОЗГА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫСЫ

3.2.2.1. Возрастные особенности нейронального состава пластинок дорсального рога спинного мозга

В пластинке I в возрасте 3 и 5 дней жизни крысенка присутствуют клетки веретеновидной, овальной, треугольной и многоугольной форм, которые равномерно распределены в центральной части пластинки. Отмечается скопление клеток в медиальной части пластинки преимущественно треугольных форм, в латеральной части пластинки располагаются одиночные относительно крупные веретеновидные нейроны. В латеральной части пластинки клетки располагаются менее плотно, чем в медиальной части пластинки и имеют более крупные размеры. В 7-дневном возрасте в латеральной части пластинки располагаются клетки не только веретеновидной, но и треугольной и многоугольной форм. Овальные клеточные формы распределяются равномерно по всей площади пластинки. Гистотопография клеточных форм в последующие возраста не меняется. Абсолютное количество нейронов в пластинке увеличивается к 10-дневному возрасту на 72,8%, после чего не меняется до 20-дневного возраста крысы, затем постепенно уменьшается и в 90-дневном возрасте, соответствует численности клеток, характерной для трехдневного возраста (чуть более 20 клеток на площади пластинки) (Табл. 3.8., показатель N). В отличие от этого, клеточная плотность меняется совершенно по-иному. Так, максимальная плотность отмечается только в трехдневном возрасте крысы, затем плотность уменьшается постепенно до 10-дневного возраста крысы, и продолжая также уменьшаться постепенно до 60-дневного возраста крысы. В 90-дневном возрасте показатель плотности расположения клеток стабилизируется и не меняется до 360-дневного возраста крысы (Табл. 3.8., показатель N_p). Изменение общей численности нейронов в пластинке I сопровождается изменением относительного содержания различных структурных форм клеток. В трехдневном возрасте крысы

основная масса нейронов пластинки I образована овальными формами (81,7%), доля многоугольных форм не превышает 2%, соответственно этому веретеновидные и треугольные формы составляют до 8-9%. С возрастом крысы отмечается постепенное уменьшение относительного содержания овальных форм до 55,7% к 10-дневному возрасту, и скачкообразное – к 90-дневному возрасту до 29,3%, после чего доля овальных форм не меняется и до конца наблюдения не превышает 30%. Соответственно этому, в постнатальном развитии крысы отмечается увеличение всех других форм в пластинке I: доли веретеновидных и треугольных форм к 10-дневному возрасту повышаются до 18%, а многоугольных – до 9%. Последующее увеличение их содержания отмечается в 90-дневном возрасте, где доли веретеновидных и треугольных форм составляют до 30% каждая, а многоугольных форм – до 14%. Площадь сечения нейронов пластинки I также увеличивается с возрастом крысы (в 3-дневном возрасте – $34,3 \pm 0,9$ мкм²), но более прогрессивно к 10-дневному возрасту, достигая среднего значения площади – $80,5 \pm 4,8$ мкм², после чего увеличивается в 30-дневном возрасте до $92,9 \pm 12,4$ мкм² и в 90-дневном возрасте до $97,4 \pm 9,3$ мкм², и значимо не меняется до конца наблюдения.

В пластинке II уже в возрасте 3 и 5 дней жизни присутствуют все клеточные формы, наблюдается очень плотное расположение клеток в дорсальной и медиальной частях пластинки. До 20-дневного возраста относительно крупные клетки веретеновидной, треугольной и многоугольной форм располагаются в латеральной трети пластинки. С 30-дневного возраста клетки относительно крупных размеров наблюдаются и в медиальной трети пластинки. Абсолютное количество нейронов в пластинке увеличивается к 10-дневному возрасту на 14%, после чего уменьшается в 30-дневном возрасте на 22,5% и в 90-дневном возрасте – на 33,0% по отношению к показателям предыдущих возрастов (Табл. 3.8., показатель N).

Количество нейронов в пластинках дорсального рога второго грудного сегмента
спинного мозга в различные возраста белой крысы

Возраст крысы (дни жизни)	Пластинка I		Пластинка II		Пластинка III		Пластинка IV		Пластинка V	
	N	N_p	N	N_p	N	N_p	N	N_p	N	N_p
3	23,9±0,5	1,8	166,8±0,6	4,7	162,5±0,4	4,2	184,2±0,6	3,7	227,3±1,1	4,7
5	24,8±0,4	1,6	172,9±0,4*	4,2	156,5±0,8	3,4	178,5±0,7	3,6	216,9±0,6*	3,9
7	35,8±0,2*	1,7	181,6±0,4*	3,4	159,6±0,8	2,6	181,9±0,5	2,7	198,5±0,7*	2,5
10	41,3±0,4*	1,4	190,8±0,4*	2,9	162,1±0,7	2,2	180,6±0,5	2,4	167,1±0,7*	1,4
15	40,6±0,3	1,4	168,6±0,4*	2,1	137,3±0,7*	1,6	168,9±0,5*	1,4	149,3±0,9*	1,3
20	40,3±0,3	1,3	165,3±0,3	1,9	136,9±0,3	1,5	166,6±0,4	1,4	148,7±0,7	0,9
30	31,2±0,3*	1,3	122,8±0,4*	1,4	116,2±0,2*	1,3	138,6±0,7*	1,1	117,8±0,5*	0,7
60	33,6±0,2	1,2	121,8±0,3	1,4	115,7±0,2	1,3	135,5±0,4	0,9	116,2±0,5	0,7
90	22,5±0,2*	0,8	92,3±0,3*	1,1	80,5±0,3*	0,9	83,1±0,3*	0,5	89,5±0,4*	0,5
120	21,1±0,3	0,8	96,2±0,3	1,1	71,2±0,3	0,8	78,9±0,3	0,5	85,3±0,5	0,5
150	21,1±0,2	0,7	99,3±0,3	1,1	73,6±0,3	0,8	82,7±0,3	0,5	90,4±0,4	0,5
180	19,6±0,2	0,7	91,9±0,3	0,9	79,3±0,3	0,7	81,3±0,3	0,4	93,6±0,4	0,4
240	18,1±0,2	0,7	92,9±0,3	1,0	73,8±0,2	0,7	77,5±0,2	0,4	93,5±0,4	0,4
360	19,5±0,2	0,8	83,5±0,3	1,0	79,5±0,2	0,8	80,9±0,2	0,4	91,3±0,4	0,4

* - изменения достоверны в сравнении с данными предыдущего возраста, $P < 0.05$

Напротив, плотность расположения клеток в пластинке II уменьшается с возрастом крысы, максимальной она является в трехдневном возрасте, где на стандартную площадь среза приходится 4-5 клеток. Значительное уменьшение клеточной плотности отмечается в первые 10 дней, практически в два раза с последующим уменьшением в возрасте 30 и 90 дней жизни, после чего до конца наблюдения она не меняется и составляет в среднем до 1 клетки на стандартной площади среза (Табл. 3.8., показатель Np). При этом, относительное содержание овальных форм с возрастом значимо не меняется и в трехдневном возрасте также, как и у взрослой 90-дневной крысы превышает 70%.

Таким образом, особенностью распределения клеточных форм в пластинке II является незначительное присутствие треугольных и многоугольных форм, доля которых не превышает 5%, а также стабильность относительного содержания всех клеточных форм в течение всего изучаемого онтогенеза. Площадь сечения нейронов пластинки II увеличивается с возрастом крысы: в трехдневном возрасте она составляет $31,6 \pm 0,7$ мкм², к 10-дневному возрасту достигает среднего значения $59,4 \pm 4,4$ мкм², после чего постепенно увеличивается к 90-дневному возрасту до $68,7 \pm 5,8$ мкм², значимо не меняясь до 360-дневного возраста крысы.

В пластинке III в возрасте 3 и 5 дней жизни крысенка присутствуют клетки веретеновидной, овальной, треугольной и многоугольной форм. Отмечается скопление клеток в медиальной части пластинки преимущественно треугольных форм, в латеральной части пластинки располагаются одиночные относительно крупные веретеновидные нейроны. Отростки клеток латеральной трети пластинки прослеживаются в пластинке IV. В латеральной части пластинки клетки располагаются менее плотно, чем в медиальной части пластинки и имеют относительно более крупные размеры. В 7-дневном возрасте в латеральной части пластинки располагаются клетки не только веретеновидной, но и треугольной и многоугольной форм. Овальные клеточные формы распределяются равномерно по всей площади пластинки. Гистотопография клеточных форм в последующие возраста не меняется. Абсолютное количество нейронов в пластинке не меняется

до 10-дневного возраста, после чего уменьшается в 15-дневном возрасте на 15,3%, в 30-дневном возрасте – на 15,1%, в 90-дневном возрасте – на 30,4%, по сравнению с показателями предыдущих возрастов, значимо не меняясь в последующие возраста онтогенеза (Табл. 3.8., показатель N). Клеточная плотность в процессе развития крысы уменьшается уже с трехдневного возраста крысенка, поэтому максимальной она является только в этом возраст: плотность расположения клеток уменьшается постепенно к 10-дневному возрасту крысы – от 4 до 2 клеток, и к 90-дневному возрасту на стандартной площади определяется менее 1 клетки (Табл. 3.8., показатель N_p).

Распределение клеточных форм в пластинке III повторяет хронологическую картину, характеризующую пластинку II. Так, относительное содержание овальных форм с возрастом значимо не меняется и в трехдневном возрасте также, как и у взрослой 90-дневной крысы превышает 75%. На долю треугольных и многоугольных форм приходится до 5% нейронов пластинки, а доля веретеновидных нейронов не превышает 15%. Площадь сечения нейронов пластинки III увеличивается с возрастом крысы: в трехдневном возрасте она составляет $38,5 \pm 0,7$ мкм², к 10-дневному возрасту достигает среднего значения $99,3 \pm 6,2$ мкм², после чего постепенно увеличивается к 90-дневному возрасту до $128,4 \pm 4,5$ мкм², значимо не меняясь до 360-дневного возраста крысы.

В пластинке IV в возрасте 3 и 5 дней жизни присутствуют все определяемые формы клеточных тел. При этом, веретеновидные формы преобладают в её медиальной части и прослеживаются в области дорсальной серой спайки. Также, относительно крупные нейроны располагаются преимущественно в латеральной и медиальной части пластинки, но представлены различными клеточными формами. В 15-дневном возрасте относительно крупные клетки располагаются и в центральной части пластинки, преимущественно треугольной формы. Гистотопография клеточных форм в последующие возраста не меняется. Абсолютное количество нейронов в пластинке не меняется до 10-дневного возраста и составляет от 178,5 до 184,2 (Табл. 3.8., показатель N). После чего уменьшается в 15-дневном возрасте на 6,5%, в 30-дневном возрасте на

25,7% и в 90-дневном возрасте – на 38,7% , по сравнению с показателями предыдущих возрастов. В отличие от этого, клеточная плотность меняется совершенно по-иному. Так, максимальная плотность отмечается только в трехдневном возрасте крысы, затем плотность уменьшается постепенно до 10-дневного возраста крысы, и продолжая также уменьшаться постепенно до 60-дневного возраста крысы. В 90-дневном возрасте показатель плотности расположения клеток стабилизируется и не меняется до 360-дневного возраста крысы (Табл. 3.8., показатель N_p). Изменение общей численности нейронов в пластинке IV сопровождается изменением относительного содержания различных структурных форм клеток.

В трехдневном возрасте крысы основная масса нейронов пластинки IV образована овальными формами (64,1%), доля веретеновидных форм не превышает 20%, соответственно этому треугольные и многоугольные формы составляют до 8% каждая. С возрастом крысы отмечается постепенное уменьшение относительного содержания овальных форм. Доля веретеновидных форм в течение всего периода изменяется мало, а процент многоугольных незначительно уменьшается, но увеличивается содержание треугольных форм до 10% в 10-дневном возрасте и до 12% в 20-дневном возрасте. В последующие возраста соотношение между различными клеточными формами не меняется. Напротив, в области медиального края дорсального рога нейроны имеют преимущественно овальную и веретеновидную форму и в течение всего периода развития, площадь сечения их относительно меньше, чем в целом в пластинке IV. Площадь сечения нейронов пластинки IV с возрастом крысы (в 3 дневном возрасте – $47,7 \pm 4,4$ мкм²), прогрессивно увеличивается к 10-дневному возрасту, достигая среднего значения по параметру площади – $128,7 \pm 7,5$ мкм², после чего увеличивается в 30-дневном возрасте до $146,5 \pm 11,7$ мкм² и в 90-дневном возрасте до $154,4 \pm 9,6$ мкм², и значимо не меняется до конца наблюдения.

В пластинке V в возрасте 3 и 5 дней жизни присутствуют клетки веретеновидной, овальной, треугольной и многоугольной форм. Овальные и веретеновидные формы большей частью концентрируются в дорсальной части

пластинки, напротив – многоугольные и треугольные формы в вентральной части пластинки. Также имеется медиолатеральное расположение нейронов в зависимости от их размерных характеристик: в латеральной и вентральной части пластинки локализуются нейроны относительно крупных размеров. В 7-дневном возрасте в связи с удлинением шейки рога распределение структурных форм и их размерных характеристик еще более визуализируется и сохраняется, не меняясь до конца наблюдения. Абсолютное количество нейронов в пластинке V является максимальным в 3 дневном возрасте, после чего постепенно уменьшается во все исследуемые возраста вплоть до 15-дневного возраста крысы. Следующее значимое уменьшение количества отмечается в возрасте 30 и 90 дней жизни (Табл. 3.8., показатель N). В целом к 90-дневному возрасту количество нейронов в пределах пластинки уменьшается на 64,1% по сравнению с данными 3 дневного возраста. Клеточная плотность в пластинке также уменьшается: более значительно в возрасте 7 и 10 дней до двух и одной клетки на стандартной площади среза, и в 90-дневном возрасте – показатель становится минимальным (Табл. 3.8., показатель N_p). Изменение общей численности нейронов в пластинке V сопровождается изменением относительного содержания различных структурных форм клеток.

В трехдневном возрасте крысы около половины нейронов пластинки имеют овальную форму (53,8%), доля веретеновидных форм чуть превышает 20%, треугольных форм составляет 14,8%. Минимальное количество приходится на многоугольные формы (9,4%). До 10-дневного возраста изменяется содержание только веретеновидных и многоугольных форм – первые уменьшаются, а вторые увеличиваются и достигают показателей, характерных для взрослой крысы. В 15-дневном возрасте изменяется соотношение овальных и треугольных форм – первые уменьшаются, а вторые увеличиваются также до показателей, характерных для взрослой крысы. В последующие возраста соотношение между различными клеточными формами не меняется. Площадь сечения нейронов пластинки V с возрастом крысы (в 3-дневном возрасте – $54,2 \pm 5,6$ мкм²), прогрессивно увеличивается к 10-дневному возрасту, достигая среднего значения

по параметру площади – $178,7 \pm 7,5$ мкм², после чего постепенно увеличивается в 90-дневном возрасте до $214,4 \pm 9,6$ мкм², и значимо не меняется до конца наблюдения.

Таким образом, с трехдневного возраста крысы в пластинках определяются все выделяемые клеточные формы, что подтверждает разнообразие нейронов. Безусловно, в данных обзора литературы в исследованиях серого вещества спинного мозга выделяются и округлые формы. Мы видели приближенные к кругу формы клеток только в очень ранних сроках наблюдения – в возрасте 3 и 5 дней жизни. Но при морфометрическом анализе эти формы являются только приближенными к кругу, диаметры их различаются. На *Рисунке 3.14* показаны определяемые различные клеточные формы интернейронов пластинок дорсального рога спинного мозга в раннем постнатальном онтогенезе крысы.

3.2.2.2. Возрастные особенности нейронального состава пластинки VII спинного мозга

В трехдневном возрасте в пластинке уже определяются овальные, веретеновидные, треугольные и многоугольные нейроны. Абсолютное количество нейронов в этом возрасте составляет $268,6 \pm 0,8$ в пределах области пластинки. С возрастом животного количество клеток на срезе уменьшается в 5-дневном возрасте до $239,9 \pm 1,12$ клеток, в 7-дневном возрасте – до $191,9 \pm 0,6$, в 10-дневном возрасте – до $147,8 \pm 0,7$, после чего не меняется до 15-дневного возраста крысы. В 20-дневном возрасте количество клеток вновь уменьшается до $128,1 \pm 0,7$, далее продолжая уменьшаться в 60-дневном возрасте ($109,1 \pm 0,9$), в 90 ($92,7 \pm 0,5$) и 180- ($79,9 \pm 0,3$) дневных возрастах крысы. Как видно, к 90-дневному возрасту крысы нейрональный состав пластинки уменьшается более, чем в два раза. При этом, наибольшее уменьшение количества клеток отмечается в возрасте 7 и 10 дней жизни крысы, снижение составляет соответственно 20% и 23%.

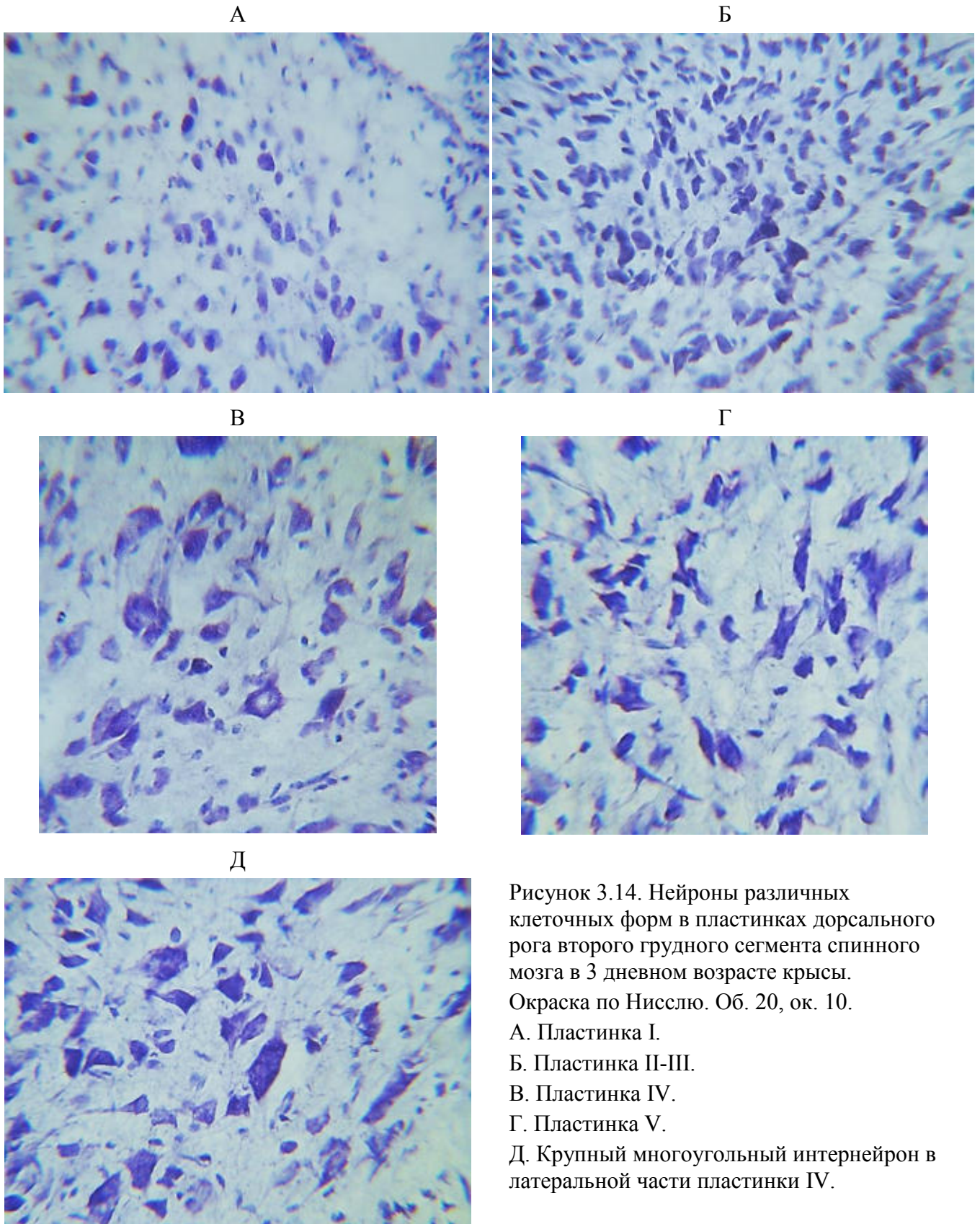


Рисунок 3.14. Нейроны различных клеточных форм в пластинках дорсального рога второго грудного сегмента спинного мозга в 3 дневном возрасте крысы. Окраска по Ниссля. Об. 20, ок. 10.
 А. Пластинка I.
 Б. Пластинка II-III.
 В. Пластинка IV.
 Г. Пластинка V.
 Д. Крупный многоугольный интернейрон в латеральной части пластинки IV.

Клеточный состав симпатических, промежуточно-медиального и дорсального ядер, локализованных в этой пластинке анализировали ниже. В возрасте 3 и 5 дней жизни на стандартной площади среза в пластинке VII определяется до 5 клеток, в 7-дневном возрасте их меньше – 3 клетки, а в 10-дневном возрасте клеточная плотность значительно уменьшается до 1,5 клеток. В возрасте 20 и 30 дней жизни присутствует 1 клетка, а с 60-дневного возраста плотность еще больше снижается и выявляется менее одной клетки с максимальным снижением в 180-дневном возрасте - до 0,6 нейрона.

Распределение различных морфологически типов нейронов, определяемых по их форме тела, в постнатальном развитии крысы меняется разнонаправленно. Так, в трехдневном возрасте крысы большая часть нейронов представлена треугольными формами (52,4%), содержание других клеточных форм не различается и составляет 16%. С возрастом крысы отмечается уменьшение процента треугольных форм, значительное в 20-дневном возрасте (до 42,4%) с последующим увеличением в 90-дневном возрасте и в 180-дневном возрасте (до 51,5%). Соответственно этому, в 20-дневном возрасте увеличивается доля овальных и многоугольных форм до 19% каждая, с последующим увеличением в 90 дневном возрасте крысы только процента многоугольных форм.

Площадь сечения нейронов пластинки VII с возрастом крысы (в 3-дневном возрасте – $67,1 \pm 3,6$ мкм²) увеличивается, но более прогрессивно к 10-дневному возрасту, достигая среднего значения площади – $97,5 \pm 4,8$ мкм², после чего постепенно увеличивается в 90-дневном возрасте до $278,8 \pm 7,6$ мкм², и значимо не меняется до конца наблюдения.

3.2.2.3. Возрастные особенности нейронального состава пластинок вентрального рога спинного мозга

В пластинке VIII в трехдневном возрасте определяются все определяемые клеточные формы, абсолютное количество которых составляет $89,3 \pm 0,6$ клеток. Количество клеток уменьшается по сравнению с данными предыдущего возраста: равномерно – в возрасте 5 и 7 дней жизни (на 7,6% и 6,5%); значительно в 10-

дневном возрасте – на 20%, после чего не меняется до 20-дневного возраста; затем вновь уменьшается в 30-дневном возрасте (на 16,3%) и незначительно в 90-дневном возрасте – на 10%. Максимальная плотность клеток отмечается в возрасте 3 и 5 дней жизни (до 4 клеток на стандартной площади), после чего резко уменьшается в 7-дневном возрасте от 2,1 клеток и до 0,6 клеток в 15-дневном возрасте. В последующие возраста плотность продолжает уменьшаться до 0,5 клеток в 20-дневном возрасте и до 0,4 – в 30-дневном возрасте, достигая показателей взрослой 90-дневной крысы. В последующие возраста плотность значимо не меняется.

До 7-дневного возраста около половины клеток пластинки имеют овальную форму. В 10-дневном возрасте их процент уменьшается до 40,2, продолжая уменьшаться до 32,4% в 20-дневном возрасте и до 27,6% в 60-дневном возрасте. С 90-дневного возраста овальные формы занимают пятую часть клеток пластинки. Доля веретеновидных форм, напротив, практически не меняется – от 17,3% в 3-дневном возрасте до 16,4% в 90-дневном возрасте, значимо не различаясь до конца наблюдения. Относительно содержание многоугольных и треугольных форм в трехдневном возрасте крысы составляет до 15% каждой формы. С возрастом доля этих форм увеличивается в 10-дневном возрасте до 20%, в 20-дневном возрасте до 25%, составляя к 90-дневному возрасту крысы каждая до трети всех клеточных форм пластинки.

Площадь сечения нейронов пластинки VIII с возрастом крысы (в 3-дневном возрасте – $78,5 \pm 5,3$ мкм²) увеличивается, но более прогрессивно к 10-дневному возрасту, достигая среднего значения площади – $177,3 \pm 3,9$ мкм², после чего увеличивается в 90-дневном возрасте до $341,4 \pm 4,5$ мкм², и значимо не меняется до конца наблюдения.

В пластинке IX в трехдневном возрасте определяются вентромедиальная и вентролатеральная группы нейронов, соответствующие расположению двигательных нейронов вентрального рога. Абсолютное количество медиальной группы составляет $19,6 \pm 2,6$, латеральной группы – $23,2 \pm 0,3$ клеток на срезе в пластинке. Количество клеток уменьшается в возрасте 7 и 10 дней жизни в

медиальной группе соответственно до $15,0 \pm 0,1$ и $9,1 \pm 0,1$, в латеральной группе – до $18,7 \pm 0,3$ и $10,4 \pm 0,1$. В последующие возраста количественный состав сохраняется. В возрасте 3 и 5 дней жизни крысенка разграничить популяцию двигательных нейронов на крупные и мелкие затруднительно, так как все мотонейроны имеют относительно небольшие размеры, а содержание более крупных или более мелких нейронов практически одинаково и составляет в трехдневном возрасте: в медиальной группе 48,7% и 51,2% соответственно; а в латеральной группе – 50,5% и 49,5%. Но, уже в 7 дневном возрасте, процент мелких нейронов уменьшается в обеих областях до 35%, незначительно снижается в 10-дневном возрасте, после чего не меняется до конца наблюдения. Площадь сечения мотонейронов интенсивно увеличивается в первые 30-дней жизни: от $97,7 \pm 4,6$ мкм² в 3-дневном возрасте; $121,4 \pm 5,3$ мкм² в 7-дневном возрасте; $244,5 \pm 7,8$ мкм² в 10-дневном возрасте; до $386,4 \pm 8,6$ мкм² в 30-дневном возрасте. Следующий прирост площади отмечается в 90-дневном возрасте – средние размеры мотонейронов составляют $514,3 \pm 12,5$ мкм². Дифференцировка интернейронов пластинки IX является затруднительной в связи с наличием мелких мотонейронов, сходностью форм тел с интернейронами. Но, разграничить становится возможным в момент последнего укрупнения мотонейронов – в 90-дневном возрасте, о чем описывалось выше.

3.2.2.4. Возрастные особенности нейронального состава структур поля X спинного мозга

В трехдневном возрасте поле X состоит из веретеновидных, овальных, треугольных и многоугольных нейронов (Рис. 3.15. А, Б). Анализ нейрональной численности поля X спинного мозга показал, что с трехдневного возраста и до 60-дневного возраста крысы отмечается постепенное уменьшение абсолютного количества нейронов в пределах поля X (Табл. 3.9., показатель *N*). Следующее возрастное значимое уменьшение количества нейронов отмечается в возрасте 180 и 240 дней жизни крысы.

Количество нейронов (N , $X \pm S_x$) в поле X и их плотность расположения (N_p) во втором грудном сегменте спинного мозга в различные возраста белой крысы

Возраст крысы, дни жизни	На площади поля X (N)	На стандартной площади 0,001 мм ² (N_p)				
		Поле X	Дорсальная серая спайка	Вентральная серая спайка	Центральная часть	
					правая	левая
3	397,0±0,4	8,6±1,1	5,0±0,9	8,6±0,8	14,4±2,2	14,6±3,1
5	383,9±1,4	8,5±0,9	4,9±0,8	8,0±0,9	14,4±3,0	14,6±2,9
7	247,9±1,8*	5,3 ±0,8*	4,0±0,6	7,3±0,7	6,8±1,1*	7,3±1,6*
10	214,8±0,9*	4,7±0,8	2,7±0,4*	8,6±0,8	8,1±1,3	8,5±1,5
15	200,2±0,8*	4,3±0,8	2,5±0,3	8,2±0,7	8,9±1,2	8,6±1,3
20	175,4±0,6*	4,1±0,8	2,5±0,3	3,6±0,3*	6,7±1,0	7,1±1,3
30	165,5±0,4*	3,9±0,8	2,6±0,3	2,9±0,6	6,5±0,9	6,8±1,0
60	157,6±0,5*	3,9±0,6	2,9±0,3	2,7±0,5	6,5±0,9	6,6±0,9
90	157,2±0,6	4,0±0,6	3,1±0,5	2,4±0,5	6,9±0,9	6,8±0,9
120	160,2±0,4	4,1±0,4	3,6±0,4	2,2±0,4	6,8±0,9	6,6±0,8
150	162,3±0,6	4,2±0,3	3,9±0,5	2,1±0,3	6,8±0,7	6,5±0,6
180	157,2±0,5*	4,0±0,3	3,6±0,4	2,1±0,3	6,6±0,7	6,5±0,7
240	144,4±0,5*	4,1±0,3	3,9±0,4	2,1±0,4	6,4±0,7	6,7±0,7
360	144,7±0,4	4,1±0,3	4,0±0,3	2,0±0,3	6,5±0,7	6,5±0,8

* - изменения достоверны в сравнении с данными предыдущего возраста, $P < 0.05$

Плотность расположения нтернейронов в поле X с возрастом животного уменьшается, но в различных его частях наблюдается разнонаправленность изменений. Так, в 7-дневном возрасте в поле X уменьшается клеточная плотность в 2 раза, вследствие значительного её уменьшения непосредственно в центральных частях поля (Рис. 3.15. В – 3-дневный возраст, Г – 7-дневный возраст). В первые 10 дней жизни отмечается уменьшение клеточной плотности в области дорсальной серой спайки, напротив, в вентральной серой спайке до 15-дневного возраста плотность клеток не меняется, а в 20-дневном возрасте резко уменьшается, продолжая снижаться вплоть до 90-дневного возраста крысы. При этом, с 30-дневного возраста общая численность нейронального состава поля X

уменьшается, а клеточная плотность в его частях стабилизируется и значимо не меняется до 360-дневного возраста крысы.

Таким образом, в дорсальной серой спайке в первые 10 дней жизни отмечается уменьшение плотности нейронов при увеличении ее площади, а с 20-дневного возраста и в последующие возраста при уменьшении площади дорсальной серой спайки плотность расположения нейронов увеличивается. Площадь частей поля X представлена в Главе 2, *Таблица 2.3*. Уменьшение площади вентральной серой спайки до 15-дневного возраста не сопровождается изменением клеточной плотности, с 20-дневного возраста отмечается уменьшение плотности расположения нейронов при увеличении её площади до 180-дневного возраста крысы. Более раннее – в 7-дневном возрасте – однонаправленное уменьшение плотности клеток и площади центральных областей поля X сменяется разнонаправленными изменениями характеристик – увеличение клеточной плотности и уменьшение площади в возрасте 10 и 15 дней жизни; и вновь однонаправленными изменениями – снижением показателей с 20-дневного возраста и их стабильностью в последующие возраста крысы.

Распределение различных форм интернейронов в поле X различалось в его частях. В области дорсальной серой спайки в трехдневном возрасте более половины клеток имеют овальную форму (59,0%), треть нейронов – веретеновидную форму (32,8%), треугольные и многоугольные форму находятся в равных соотношениях (по 4%). Доля треугольных и многоугольных нейронов увеличивается в возрасте 10 и 20 дней жизни: треугольных до 15,4% и 22,1% соответственно, а многоугольных до 12,3% и 17,1% соответственно. Процент овальных и веретеновидных нейронов уменьшается в аналогичных возрастах. К 30-дневному возрасту крысы состав дорсальной серой спайки сформирован и с возрастом крысы не меняется.

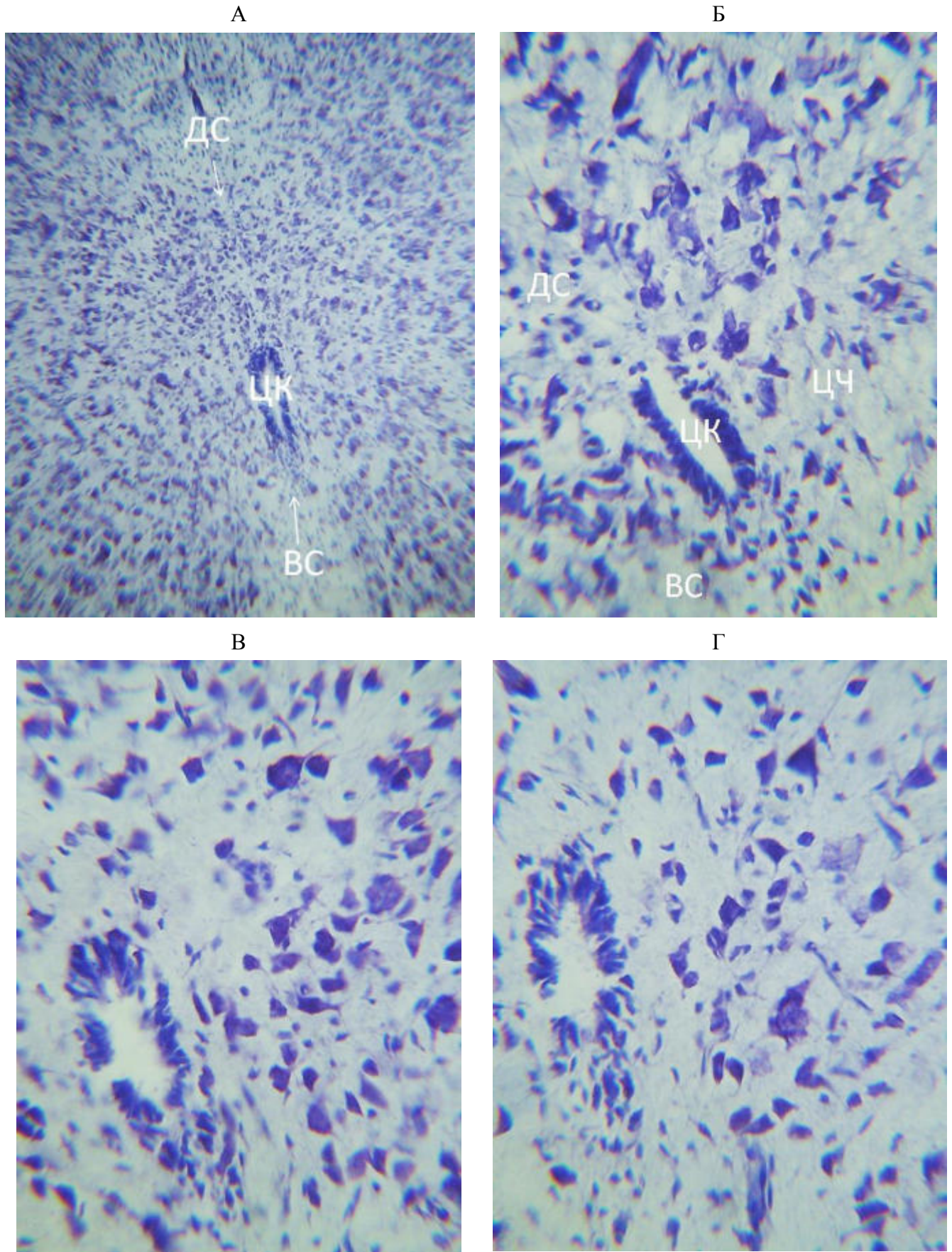


Рисунок 3.15. Интернейроны спинномозгового поля X второго грудного сегмента спинного мозга в различных возрастах крысы. Окраска по Нислю.

А. Об.10, ок. 10. Б-Г. Об. 20, ок. 10. Пояснения в тексте.

В области вентральной серой спайки в трехдневном возрасте крысы также половина клеток имеет овальные формы (50,1%), треть – веретеновидные (33,9%), треугольные и многоугольные формы немногочисленны (7-9%). С возрастом крысы доля овальных нейронов существенно не меняется, но веретеновидных значительно уменьшается в возрасте 10 и 20 дней жизни, соответственно этому увеличивается процент многоугольных и треугольных клеточных форм. К 30-дневному возрасту крысы состав, как дорсальной серой спайки, так и вентральной серой спайки является сформированным, соответствует показателям взрослой крысы в 90-дневном возрасте и в последующие возраста значимо не меняется. Распределение клеточных форм в центральных частях поля X отражает возрастные закономерности, характерные для области вентральной серой спайки.

Площадь сечения интернейронов поля X в трехдневном возрасте крысы составляет в дорсальной серой спайке – $49,6 \pm 2,4$ мкм², в вентральной серой спайке – $47,4 \pm 1,7$ мкм², в центральных частях – $45,7-52,2$ мкм² и значимо не различается. Интенсивный рост нейронов наблюдается в 10-дневном возрасте, в среднем во всех областях одинаково, достигая среднего значения по параметру площади – $138-144$ мкм², после чего увеличивается в 20-дневном возрасте до $167-182$ мкм², и в последующих возрастах постепенно увеличиваясь до 90-дневного возраста, после чего не меняется до конца наблюдения.

3.2.2.5. Возрастные особенности нейронального состава ядер спинного мозга

Дорсальное ядро

Анализ нейрональной численности ядра показал, что в трехдневном возрасте на срезе в области ядра определяется максимальное абсолютное количество нейронов $19,1 \pm 0,3$. С возрастом крысы отмечается значимое уменьшение общего количества нейронов на срезе – в 20-дневном возрасте до $17,2 \pm 0,2$, в 30-дневном возрасте до $15,3 \pm 0,2$. В последующие возраста абсолютное количество нейронов не меняется. При этом, клеточная плотность с возрастом крысы уменьшается от $2,9 \pm 0,2$ клеток на стандартной площади среза

($0,001 \text{ мм}^2$) в 3-дневном возрасте, до $1,5 \pm 0,1$ в 7-дневном возрасте и до $0,7 \pm 0,1$ в 20-дневном возрасте. В трехдневном возрасте наибольшее количество нейронов в ядре имеют овальную форму (до 43,5%), наименьшее количество – веретеновидную форму (15,8%), треугольные и многоугольные формы составляют 19-21%. С возрастом крысы отмечается уменьшение доли овальных форм и увеличение долей треугольных и многоугольных клеточных форм, изменения в соотношении клеточных форм регистрируются в 20-дневном возрасте.

Площадь сечения нейронов ядра в трехдневном возрасте составляет $42,4 \pm 2,3 \text{ мкм}^2$. Интенсивный рост площади отмечается в первые 10 дней жизни – до $122,3 \pm 5,4 \text{ мкм}^2$, после чего показатель постепенно повышается до 30-дневного возраста – до $164,5 \pm 6,4 \text{ мкм}^2$ и стабилизируется.

Промежуточно-медиальное ядро

В трехдневном возрасте на срезе в области ядра определяется абсолютное количество нейронов $11,7 \pm 0,2$. С возрастом крысы отмечается увеличение общего количества нейронов на срезе в 7-дневном возрасте до $12,7 \pm 0,2$ и в 10-дневном возрасте до $14,6 \pm 0,2$. В последующие возраста абсолютное количество нейронов не меняется. Плотность расположения клеток в ядре является максимальной в трехдневном возрасте и составляет $6,2 \pm 0,2$ клетки на стандартную площадь. С возрастом плотность уменьшается: в 7-дневном возрасте составляет $2,3 \pm 0,1$ клетки; в 10-дневном возрасте – $1,6 \pm 0,1$ клетки. В 15-дневном возрасте плотность соответствует показателю взрослой 90-дневной крысы. В трехдневном возрасте в ядре присутствуют овальные, треугольные и многоугольные нейроны в равных долях соотношениях, меньше веретеновидных форм (16,6%). С 10-дневного возраста доля веретеновидных форм уменьшается до 13,8%, а треугольных и многоугольных увеличивается до 30%. В последующие возраста нейрональный состав не меняется. Площадь сечения нейронов ядра в трехдневном возрасте составляет $39,7 \pm 20,9 \text{ мкм}^2$. Интенсивный рост площади отмечается в первые 10 дней жизни – до $92,1 \pm 3,5 \text{ мкм}^2$, после чего показатель постепенно повышается до

30-дневного возраста – до $124,2 \pm 4,7$ мкм^2 и в последующие возраста значимо не меняется.

Вставочное ядро

Анализ нейрональной численности ядра показал, что в трехдневном возрасте на срезе в области ядра определяется максимальное абсолютное количество нейронов $12,6 \pm 0,4$. С возрастом крысы отмечается уменьшение общего количества нейронов на срезе – в 7-дневном возрасте до $10,4 \pm 0,3$, в 10-дневном возрасте до $8,4 \pm 0,3$. В последующие возраста абсолютное количество нейронов значимо не меняется. Клеточная плотность с возрастом крысы также уменьшается от $2,1 \pm 0,1$ клетки на стандартной площади среза ($0,001 \text{ мм}^2$) в 3-дневном возрасте, до $0,7 \pm 0,1$ в 7-дневном возрасте и до $0,3 \pm 0,1$ в 10-дневном возрасте. В трехдневном возрасте наибольшее количество нейронов в ядре имеют овальную форму (41,2%), наименьшее количество – веретеновидную форму (13,6), треугольные и многоугольные формы составляют 25,4% и 19,8% соответственно. С возрастом крысы отмечается уменьшение доли овальных форм в возрасте 7 и 10 дней жизни до 36,4% и 30,3% соответственно, и увеличение доли треугольных (до 32%) и многоугольных (до 25%) форм, процент нейронов веретеновидных форм не меняется. Такое распределение клеточных форм сохраняется и в последующих возрастах. Площадь сечения нейронов ядра в трехдневном возрасте составляет $38,7 \pm 2,3$ мкм^2 . Интенсивный рост площади нейронов отмечается в первые 10 дней жизни – до $109,8 \pm 5,4$ мкм^2 , после чего показатель постепенно повышается до 30-дневного возраста – до $124,1 \pm 4,9$ мкм^2 и стабилизируется.

Промежуточно-латеральное ядро

Анализ нейрональной численности ядра показал, что в трехдневном возрасте на срезе в области ядра определяется максимальное абсолютное количество нейронов $14,4 \pm 0,5$. С возрастом крысы отмечается уменьшение общего количества нейронов на срезе – в 7-дневном возрасте до $12,7 \pm 0,4$, в 10-

дневном возрасте до $11,4 \pm 0,3$. В последующие возраста абсолютное количество нейронов значимо не меняется. Клеточная плотность с возрастом крысы также уменьшается от $1,4 \pm 0,1$ клетки на стандартной площади среза ($0,001 \text{ мм}^2$) в 3-дневном возрасте, до $0,9 \pm 0,1$ в 7-дневном возрасте и до $0,3 \pm 0,1$ в 10-дневном возрасте. В трехдневном возрасте наибольшее количество нейронов в ядре имеют овальную форму (42,9%), наименьшее количество – веретеновидную форму (12,1%), треугольные и многоугольные формы составляют 25,2% и 19,8% соответственно. С возрастом крысы отмечается уменьшение доли овальных форм в 7-дневном возрасте до 38,1%, увеличение доли треугольных (до 27,3%) и многоугольных (до 21,8%) форм, процент нейронов веретеновидных форм не меняется (12,8%). В 10-дневном возрасте доля веретеновидных форм еще снижается до 10,9%, а треугольных форм увеличивается до 30,0%. Такое распределение клеточных форм сохраняется и в последующих возрастах. Площадь сечения нейронов ядра в трехдневном возрасте составляет $39,2 \pm 1,5 \text{ мкм}^2$. Интенсивный рост площади отмечается в первые 10 дней жизни – до $115,9 \pm 5,4 \text{ мкм}^2$, после чего показатель постепенно повышается до 30-дневного возраста – до $147,3 \pm 5,2 \text{ мкм}^2$ и значимо не меняется до конца наблюдения.

3.2.2.6. Заключительные замечания

В дорсальном роге спинного мозга в трехдневном возрасте крысы максимальное количество нейронов определяется в пластинке V (227 клеток), минимальное - в пластинке I (23 клетки), промежуточные значения характерны для пластинок II, III и IV (162-184 клетки). В постнатальном онтогенезе количество нейронов в пластинках дорсального рога меняется разнонаправленно в более ранний период развития - в первые 20 дней жизни крысы. Так, в поверхностной области дорсального рога это проявляется в пластинках III и IV до 10-дневного возраста крысы количество нейронов не меняется. В пластинках II, III и IV отмечается уменьшение количества нейронов в 15-дневном возрасте и до 20-дневного возраста общее количество нейронов на срезе также не меняется.

В пластинке V, напротив, количество нейронов уменьшается до 15-дневного возраста крысы, без динамики в 20-дневном возрасте. С 30-дневного возраста различия нивелируются и количественные изменения являются общими для всех пластинок дорсального рога. Общие закономерности заключаются в возрастном уменьшении абсолютного количества нейронов во всех пластинках дорсального рога. При этом, определяется две возрастные волны резкого (скачкообразного) уменьшения количества клеток в пределах пластинок на срезе - в 30-дневном и в 90-дневном возрастах крысы. В *Таблице 3.8.* соответствующие возрасту крысы выделены цветом.

С чем связано выделяющееся из всех пластинчатых структур дорсального рога увеличение количества нейронов в пластинках I и II?

Интенсивный прирост площади дорсального рога происходит в возрасте 7 и 10 дней жизни крысенка, где он составляет более 30%, что нами показано в Главе 2. Но, в дорсальном роге до 10-дневного возраста доля площадей пластинок I, II и III от всей площади серого вещества уменьшается. И это не может объяснить увеличения нейрональной популяции этих пластинок. Но площадь каждой в отдельности пластинки увеличивается, хоть и не так интенсивно, по сравнению с другими пластинками дорсального рога спинного мозга. Поэтому, возможно, увеличение количества нейронов связано с особенной выявляемостью нейронов при гистологической окраске тионином. Применение метода Ниссля выявляет различную аффинность нейронов к красящему веществу, вплоть до его невосприимчивости – «выпадения» части клеток (Шуклин, Швалев, 2006; Порсева, Шилкин, 2011). В тоже время, увеличение абсолютного количества нейронов в пределах пластинок I и II до 10-дневного возраста, последующая максимальная стабильность количества нейронов в пластинке I – до 20-дневного возраста, и отсутствие изменений в количестве нейронов в пластинке III, то есть стабильность количественных характеристик до 10-дневного возраста, возможно, обусловлено постепенным вращением C-волокон в поверхностную область дорсального рога спинного мозга (Fitzgerald, Jennings, 1999). Особое место в структурно-функциональных изменениях нейронов занимает вопрос о сдвиге

метаболизма нуклеиновых кислот, а с тех пор, как Нисслем было обнаружено наличие вещества, которое представляет собой в цитоплазме нейронов в основном рибонуклеиновую кислоту, исследования о перераспределении и исчезновении этого вещества в нейроне при активации афферентов основательно отражены в монографии О.С. Меркуловой, Ю.А. Даринского (1982). Авторы подтверждают гипотезу, согласно которой слабое по интенсивности раздражение способствует повышению синтеза РНК и белков в цитоплазме нейрона. При этом, авторами показано, что различные функциональные воздействия на нейрон могут вызывать обратимые изменения белковых молекул. Что и находит отражение в повышенной восприимчивости к основному красителю особенно нейронов пластинок I, II и III. Общность структурной организации внешней части пластинки II и пластинки III обсуждены выше. В тоже время, в 7-дневном возрасте увеличение площади дорсального рога происходит за счет удлинения шейки дорсального рога и роста размера пластинки V, что и обусловило преимущественное уменьшение её количественного состава нейронов.

Вместе с тем, на фоне неоднозначных изменений абсолютных количественных характеристик, плотность расположения клеток на стандартной площади изменяется однонаправленно во всех пластинках дорсального рога. Так, в трехдневном возрасте наиболее плотная заполняемость наблюдается в пластинках II, III, IV и V (более 4 клеток). С возрастом плотность уменьшается, наиболее интенсивно в первые 20 дней жизни, когда в каждой пластинке выявляется до одной клетки на стандартной площади среза, а в 90-дневном возрасте она еще больше снижается – менее одной клетки на стандартной площади среза, и стабилизируется. Но, независимо от этого максимальная плотность расположения клеток наблюдается в пластинке II в течение всего периода онтогенеза. Как видно, определение плотности расположения клеток в пластинках не отражает возрастной динамики изменения абсолютного количества в пластинках дорсального рога. Нами было показано, что во всех пластинках в первые 20 дней жизни преобладают овальные формы клеток: в пластинках I, IV и V – более 50%, в пластинках II и III – более 70%. Возрастное изменение

распределения клеточных форм в пластинках меняется также разнонаправленно. В пластинках II и III динамика отсутствует, доля веретеновидных форм в пластинке I увеличивается, в пластинке V уменьшается. Но, с возрастом животного в пластинках I, IV и V отмечается увеличение процента треугольных и многоугольных форм, что является более выраженным в пластинке V.

В пластинке VII промежуточной зоны спинного мозга в трехдневном возрасте крысы выявляется нейронов больше (268 клеток), чем в какой-либо пластинке дорсального рога. С возрастом крысы, как абсолютное количество клеток, так и плотность расположения клеток уменьшаются, максимально в возрасте 7 и 10 дней жизни крысенка. Но, возрастная динамика уменьшения нейронов характеризует весь период наблюдаемого онтогенеза. При этом, около половины клеток пластинки имеют треугольные формы, что сохраняется весь период онтогенеза. Уменьшение количества клеток в более поздние сроки онтогенеза – в 180-дневном возрасте, возможно, обусловлено увеличением размеров дорсального рога. На фоне прироста площади только дорсального рога в 180-дневном возрасте крысы (Глава 2, Табл. 2.1., выделено цветом) не отмечается изменений в количественном составе пластинок дорсального рога, но регистрируется значимое уменьшение, как абсолютного количества, так и плотности расположения клеток в пластинке VII промежуточной зоны спинного мозга. По-видимому, происходит перераспределение нейронов, именно за счет увеличения размеров дорсального рога, что и приводит к резкому уменьшению нейронального состава пластинки VII.

В вентральном роге спинного мозга клеточный состав явно отличается от такового промежуточной зоны. Количество нейронов в пластинках вентрального рога является немногочисленным, по сравнению с таковыми дорсального рога и промежуточной зоны: в трехдневном возрасте крысы в пластинке VIII определяется 89 клеток, в пластинке IX – 42 клетки. В пластинке VIII, как и в пластинках дорсального рога, преобладающими являются овальные формы клеток, но с возрастом крысы увеличивается содержание многоугольных и треугольных форм нейронов. Абсолютное количество нейронов, как и клеточная

плотность, уменьшаются, но более интенсивно в 10-дневном возрасте. В отличие от этого, уменьшение мотонейронов в вентральном роге является более ранним и наблюдается в 7-дневном возрасте крысы. Показатели нейрональной численности достигают значений, характерных для взрослой 90-дневной крысы в 30-дневном возрасте в пластинке VIII и более рано – в 10-дневном возрасте в пластинке IX.

С возрастом крысы отмечается как уменьшение площади поля X, так и уменьшение численности его нейронального состава. При этом, однонаправленность уменьшения размерных и количественных характеристик в целом поля X не соответствует динамике возрастных изменений его конкретных, выделяемых нами областей. Так, в дорсальной серой спайке в первые 10 дней жизни отмечается уменьшение плотности нейронов при увеличении ее площади (Глава 2, Таблица 2.3.), с 20-дневного возраста и в последующие возраста при уменьшении площади дорсальной серой спайки плотность расположения нейронов увеличивается. Уменьшение площади вентральной серой спайки до 15-дневного возраста не сопровождается изменением клеточной плотности, с 20-дневного возраста отмечается уменьшение плотности расположения нейронов при увеличении ее площади до 180 дневного возраста крысы. Более раннее – в 7-дневном возрасте – однонаправленное уменьшение плотности клеток и площади центральных областей поля X сменяется разнонаправленными изменениями характеристик: увеличение клеточной плотности и уменьшение площади в возрасте 10 и 15 дней жизни; и вновь однонаправленными изменениями: снижением показателей с 20-дневного возраста и их стабильностью в последующие возраста крысы. Таким образом, увеличение количества нейронов в области дорсальной серой спайки, возможно, обусловлено возрастным уменьшением её площади, что и приводит к росту показателя, рассчитанному на единицу площади.

Анализ количественных характеристики ядер спинного мозга показал, что в постнатальном развитии крысы ранее стабилизируется количественный состав нейронов в ядрах промежуточной зоны – промежуточно-медиальном, вставочном и промежуточно-латеральном, где уже в 10-дневном возрасте отмечается

соответствие показателям взрослой 90-дневного возрасте крысы. Но, нейроны дорсального ядра достигают аналогичных характеристик только в 30-дневном возрасте крысы. При этом, наибольшее абсолютное количество нейронов определяется в дорсальном ядре, а максимальная клеточная плотность определяется в промежуточно-медиальном ядре во всех сроках наблюдения постнатального развития, что, по-видимому связано с наименьшей площадью промежуточно-медиального ядра. Распределение клеточных форм имеет общую возрастную закономерность в виде преобладания на ранних сроках развития доли овальных форм, но с возрастом крысы увеличивается процент треугольных и многоугольных форм в дорсальном ядре (20-дневный возраст), в ядрах промежуточной зоны (10-дневный возраст).

Анализируя размерные характеристики нейронов спинного мозга, мы пришли к неоднозначным заключениям. В целом, во всех пластинках спинного мозга имеет место быть возрастное увеличение размерных характеристик, которые мы определяли по площади сечения нейронов, с максимальным приростом показателя в 10-дневном возрасте крысы. Но, сроки становления параметров площади совершенно различаются в пластинках спинного мозга и ядрах серого вещества. Так, во всех пластинках отмечается постепенное увеличение размеров нейронов вплоть до 90-дневного возраста, после чего, средние размерные параметры нейронов стабилизируются. В отличие от этого, в ядрах спинного мозга стабилизация размерных параметров наступает раньше – уже в 30-дневном возрасте крысы.

Глава 4. НЕЙРОХИМИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА СПИННОГО МОЗГА

4.1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Накопленные к настоящему времени данные о гистохимической и иммуногистохимической характеристике нейронов спинного мозга только закладывают основы идентификации проекционных, комиссуральных и ипсилатеральных нейронов. Большинство структурных типов нейронов спинного мозга характеризуется определенными нейрохимическими особенностями, без установления которых невозможно определение структурированной основы межнейронных связей. Обобщение морфологических и нейрохимических характеристик предполагает формирование специфических нейрональных классов.

4.1.1. Дифференциация спинальных нейронов в пренатальном онтогенезе

Различия между спинальными интернейронами обусловлены экспрессией различных комбинаций факторов транскрипции в период эмбрионального развития (Рис. 4.1.). Одиннадцать классов ранних постмитотических нейронов (dI1-6, V0-3 и мотонейроны – MN) и два более поздних интернейрона (dIL_A и dIL_B) присутствуют в эмбриональном спинном мозге грызунов на 9,5-11 день (Alanynick et al., 2011).

Клеточные особенности спинного мозга позвоночных определяются во время развития вдоль трех основных пространственных осей эмбрионального тела – ростокаудального, дорсовентрального и медиолатерального (Francius et al., 2013). Различные клеточные популяции появляются в разное время в процессе развития (Lu et al., 2015).

Примерно в середине беременности предшественники выходят из клеточного цикла и начинают занимать характерные положения для установки, расширяют аксоны и экспрессируют факторы транскрипции и ферменты

биосинтеза нейротрансмиттеров. За последнюю неделю развития 23 класса нейронов могут быть определены по экспрессии транскрипционного фактора (Alaynick et al., 2011). Мотонейроны могут быть разделены на функционально отличные подтипы – α - и γ -мотонейроны в пределах одного моторного пула на основе их профиля транскрипционных факторов, по которому дифференцировка γ -мотонейронов продолжается в течение нескольких дней постнатального периода (Friese et al., 2009). Преганглионарные нейроны симпатической нервной системы являются наиболее дорсальными двигательными нейронами и могут быть идентифицированы также по экспрессии ХАТ, НАДФ-диафоразы (Francius, Clotman, 2010).

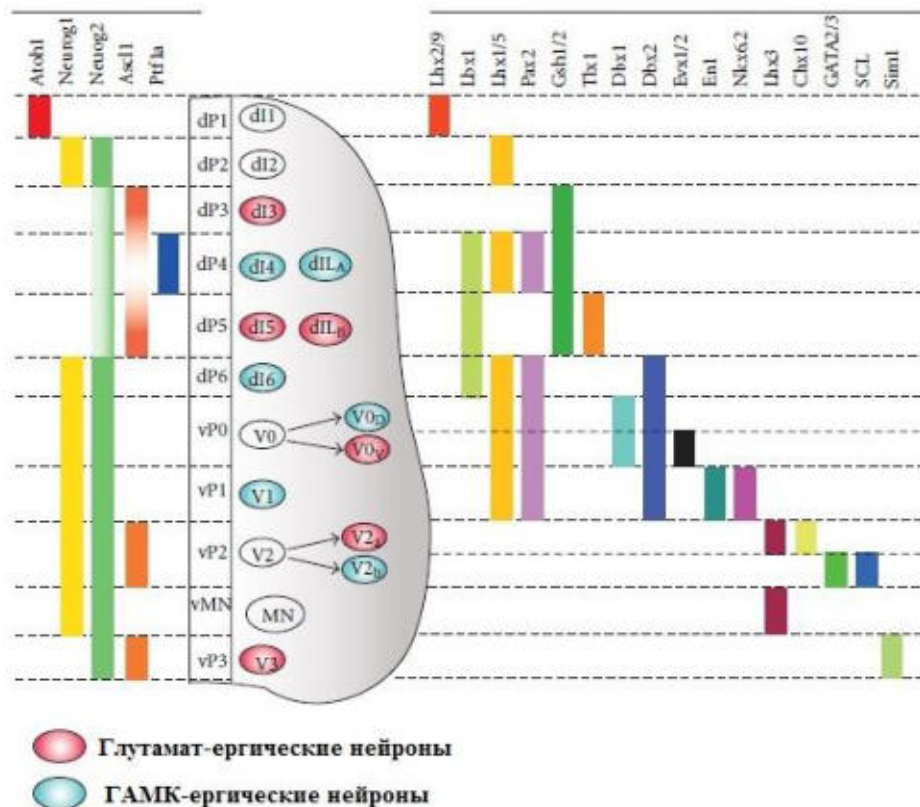


Рисунок 4.1. Спецификация эмбриональных нейронов в спинном мозге по направлениям комбинаторных кодов факторов транскрипции.

Представлена схематичная экспрессия факторов транскрипции в клетках-предшественниках (слева) и гомеодоменовых транскрипционных факторов в дифференцирующихся нейронах (справа).

Взято из статьи "GABAergic neuron specification in the spinal cord, the cerebellum, and the cochlear nucleus", К. Horii and M. Hoshino (2012).

Класс V0 нейронов между 10 и 18 эмбриональными днями у грызунов дифференцируется в комиссуральные интернейроны, дающие аксональные проекции как контрлатерально, так и преимущественно рострально, протяженностью от 2 до 4 сегментов спинного мозга, являющиеся ГАМК и глицинергическими (Lu et al., 2015). Около трети этих клеток содержат глутамат (Hori, Hoshino, 2012) и локализуются преимущественно в пластинке VIII спинного мозга (Lanuza et al., 2004).

При типировании класса V1 эмбриональных нейронов группой кальций-связывающих белков обнаружено, что данный класс не только служит источником клеток области вентрального рога, но и даёт популяции, объединяемые функционально, которые к 20 дневному постнатальному возрасту представлены: клетками Реншоу, тормозными интернейронами промежуточной области и проприоцептивными нейронами глубокой области дорсального рога спинного мозга, аксональные варикозности которых были более чем в 80% глицинергическими, остальные содержали ГАМК, при полном отсутствии иммунореактивности к глутамату и ацетилхолину (Alvarez et al., 2005).

Класс V2 нейронов дифференцируется в две субпопуляции интернейронов: V2a – ипсилатеральные глутаматергические и проекционные; V2b – ипсилатеральные глицин и ГАМКергические премоторные нейроны (Lu et al., 2015).

Класс V3 эмбриональных интернейронов, также как и класс V2, определяется в более ранние сроки (11,5-12,5 дни). V3 нейроны дифференцируются в возбуждающие комиссуральные интернейроны спинного мозга, которые после рождения локализуются как в вентральном роге, так и в глубокой области дорсального рога спинного мозга и объединяются в популяцию премоторных нейронов (Borowska et al., 2013).

Классы dI1-3 формируют краевую область дорсального рога и заполняют поверхностную область дорсального рога спинного мозга (Lee et al., 2000). Самые дорсальные предшественники, dP1-dP3, определяются между 9,5 и 10,5 днями, становятся постмитотическими и начинают мигрировать вентрально между 10,5 и

11,5 днями (Muller et al., 2002), образуют более глубокие слои дорсального рога спинного мозга (Lu et al., 2015). Расположенные более вентрально предшественники dP4–dP6 определяются между 10 и 12,5 днями, становятся постмитотическими и мигрируют либо дорсально, образуя более поверхностные слои дорсального рога, либо мигрируют вентрально в глубокий дорсальный рог и вентральный спинной мозг (Muller et al., 2002; Lu et al., 2015). Класс dI1 образует как ипсилатеральные, так и комиссуральные нейроны, дающие только ростральные проекции, являясь проприоцептивными интернейронами (Mieseгаes et al., 2009), а класс dI2 в основном комиссуральные нейроны, которые проецируют свои аксоны как в ростральном, так и в каудальном направлениях (Avraham et al., 2009). Так, множество dI5 интернейронов мигрирует вентрально, dI4-5 – как в латеральном направлении, так и в глубокую область дорсального рога спинного мозга (Lewis, 2006). Класс dI6 является одной из немногих популяций нейронов, которые во время эмбриогенеза мигрируют вентромедиально и локализуются в пластинках VII и VIII (Gross et al., 2002), предположительно участвуя в локомоции и формируя нейрональные связи с популяциями нейронов класса V0 (Dyck et al., 2012).

Глутаматергические возбуждающие интернейроны включают классы dI1-3, dI5, V2 и V3 нейронов, а также группу клеток более позднего происхождения дорсальных интернейронов – dILB (Lanuza et al., 2004). Классы dI4, dI6, V0 и V1, генерируют интернейроны, которые образуются во время первой волны нейрогенеза и более позднего происхождения – dILA, являются тормозящими (Pillai et al., 2007).

4.1.2. Изменения нейрохимических характеристик нейронов спинного мозга в онтогенезе

Общая характеристика всех интернейронов спинного мозга, изученных на сегодняшний день, заключается в том, что они получают комплексный мультисенсорный вход от афферентов различных типов и различного происхождения (Edgley, 2001; Jankowska, Edgley, 2010). Так, ещё до

формирования функционально организованных сенсорных путей, у эмбрионов обнаруживают спонтанные движения, именуемые эмбриональной моторикой, описанной более века назад Преьером – в 1885 году (Momose-Sato, Sato, 2013). Современные электрофизиологические исследования показали, что эмбриональные движения генерируются путем спонтанной активности спинальных мотонейронов (O'Donovan, 1999; Marder, Rehm, 2005), что до 18 дня эмбрионального развития у крысы зависит от наличия никотиновых рецепторов к ацетилхолину, а после 18 дня опосредуется глутаматергической передачей (Momose-Sato, Sato, 2013). При этом синхронность двигательной активности достигается параллельно с созреванием тормозных ГАМК/глицинергических сетей на более поздних стадиях развития (Kiehn, 2011). Изменение природы нейромедиатора в развивающемся спинном мозге происходит примерно в то время, когда аксоны мотонейронов достигают своих целей – скелетных мышц, и вполне возможно, что целевое получение ответных сигналов с мышц, является фактором, регулирующим как трансформацию трансмиттера, так и формирование нейронных сетей в спинном мозге (Fiumelli, Woodin, 2007; Wilhelm et al., 2009).

Нейроны промежуточной области и дорсального рога спинного мозга очень малого диаметра 1-3 мкм, имеющие рецепторы к глутамату (GluR1 - метаботропные рецепторы глутамата, в основном экспрессируются на постсинаптической мембране), присутствуют у крысы только в определенный период жизненного цикла – с 19 дня эмбрионального периода до 17 дня постнатального периода (Serrando et al., 2002).

Изучение количественных характеристик NMDA-рецепторов (N-метил-D-аспаратат) в нейронах спинного мозга методом автордиографии показало, что плотность их велика на 7 день жизни крысы, после чего резко снижается и практически отсутствует на третьей неделе постнатальной жизни (Kalb et al., 1994), по другим данным – максимальна до 9 дня постнатальной жизни и отсутствует на 14 день жизни крысы (Hogri et al., 2012). Показано также, что в эмбриональном периоде активность АХЭ в мотонейронах определяется с 14 дня, в симпатических преганглионарных нейронах и нейронах центральной области – с

19 дня, в нейронах дорсального рога – с 21 дня (Zhang, Dong, 1993). На 20 сутки эмбрионального развития уже четко выявляются четыре группы формирующихся холинергических нейронов, характерных для спинного мозга взрослых крыс: мелкие клетки дорсальных рогов, молодые нейроны центрального серого вещества, формирующиеся нейроны промежуточного серого вещества и клетки вентральных рогов (Колос, Коржевский, 2016).

Р.Е. Phelps et al. (1984) холинергические нейроны в спинном мозге выявляют сразу после рождения. Однако они достигают характеристик нейронов спинного мозга взрослых животных в разные сроки: делительные клетки – в первую неделю после рождения; нейроны поля X и пластинок III-VI – к 21 дню жизни; нейроны поверхностной области дорсального рога – к 28 дню жизни, мотонейроны – с 14 по 21 день постнатальной жизни.

А. Volekova et al. (2011) в постнатальном периоде описывают активность АХЭ в нейронах серого вещества спинного мозга практически в тех же пластинках (пластинки III-IV, пластинка X, область вегетативных ядер пластинки VII, мотонейроны вентрального рога), которая достигает максимальной к 21 дню, когда она становится сопоставимой с 3 месячными крысами. В постнатальном периоде, в 20 дневном возрасте у щенят (Писалева, 2013), в 10 дневном возрасте у крысят (Моторина, 1987), распределение и выраженность активности АХЭ в нейронах спинного мозга была почти идентична тем, которые наблюдаются у взрослых животных. Особенностью холинергической системы спинного мозга птиц является её сформированность уже в пренатальном периоде (Necker, 2004).

Увеличение активности АХЭ в нейронах в постнатальном периоде жизни связывают с морфологическим развитием нейронов спинного мозга и первоочередностью спонтанной моторики. Возможно, источниками модуляции мотонейронов являются обильные холинергические С-бутоны, окружающие их клеточные тела и повышающие возбудимость мотонейронов во время передвижения, которые исходят из дискретной группы интернейронов, локализованных латеральнее центрального канала и в области делительных интернейронов (Miles et al., 2007).

Появление в нейронах спинного мозга ГАМК-ергических нейронов имеет rostroкаудальную зависимость: на 11 день эмбрионального развития обнаруживаются иммунореактивные нейроны на уровне грудных сегментов, позднее, на 13 день эмбрионального развития – в поясничных сегментах (Allain et al., 2005).

После рождения, нейроны с ГАД-67 выявляются только в ограниченной области серого вещества – в дорсальном роге, а на 14-й день постнатального развития характер распределения их иммунореактивности аналогичен топографии ГАМК-ергических нейронов в спинном мозге взрослого животного (Huang et al., 2006). Методом антероградной маркировки также показано, что комиссуральные интернейроны спинного мозга у новорожденных крысят являются полностью ГАМК-ергической популяцией (Weber et al., 2007).

Плотность TRPV1-рецепторов также имеет rostroкаудальный градиент в спинном мозге и в два раза выше в поясничных сегментах по сравнению с шейными и грудными сегментами (Hwang, Valtschanoff, 2003). В постнатальном онтогенезе экспрессия TRPV1-рецепторов в первичных афферентах уменьшается (Acs, Blumberg, 1994), но расширяется зона экспрессии в дорсальном роге спинного мозга: у новорожденных крыс наблюдается только в пластинке I, а у 10 дневных крыс – в пластинках I и II (Doly et al. 2004).

Исследования последних лет показывают значение оксида азота в постнатальном онтогенезе как регулятора образования не только синапсов, но и дендритных арборизаций (Vincent, 2010; Ling et al., 2012). Распределение nNOS нейронов в мозге мышей во время эмбриогенеза свидетельствует о том, что оксид азота принимает участие как в формировании связей и дифференцировке нервных клеток, так и в программируемой гибели клеток.

Регуляция апоптоза в нервной системе осуществляется многочисленными сигнальными системами, за реализацию эффекторной фазы которого в нейроне ответственны каспазы (Roth, D'Sa, 2001; Buss et al., 2006). Следует отметить, что каспазы, расщепляя как ядерные, так и цитоплазматические белковые структуры нейрона, участвуют не только в эффекторной стадии, но и в фазе деградации

апоптоза, выступая в качестве основного повреждающего фактора в этом процессе. Тем самым распознавание ранних стадий пролиферативной активности и типа клеточной смерти нейронов становится очевидным.

В течение первого года жизни у крысы происходит уменьшение иммунореактивности в интернейронах дорсального рога грудных сегментов спинного мозга: к веществу Р – в пластинках I и II; к энкефалину – в пластинках I, II и III; к NPY – в пластинках I, II и X (Finazzo, 1994). Отмечено также, что иммунореактивность ноцицептивных С-волокон пептидергических к кальцитонин-ген-родственному пептиду и непептидергических к изолектину В4 увеличивается в течение двух месяцев жизни крысы, но при этом снижается общая ширина полос интенсивности этих маркеров, как процент от общей толщины дорсального рога поясничных сегментов СМ (Lorenzo et al., 2008).

Сроком обнаружения диафороза позитивных нейронов, локализованных в пластинках дорсального рога, в пластинке X и в области преганглионарных симпатических нейронов, является 21-й день постнатального развития (Volekova et al., 2011). В течение одного года жизни крысы число нейронов серого вещества спинного мозга, определяемых по активности НАДФН-диафорозы в грудных сегментах не меняется, а экспрессия этого фермента снижается от 6 месяцев до годовалого возраста крысы (Finazzo, 1994). Наиболее значимое возрастное снижение диафоразной активности характерно для ростральных сегментов спинного мозга – шейных (Телешева, 2006) и каудальных – крестцовых сегментов спинного мозга (Порсева, 2009 а).

В настоящее время первостепенное значение придается изучению особенностей нейромедиаторов в различном возрасте постнатального онтогенеза, что может способствовать выявлению характера обменных процессов в нейроне и возможностей адекватной его реакции на меняющиеся условия существования.

4.1.3. Физиологическая роль отдельных трансммиттеров в спинном мозге

Несмотря на далеко неполные данные о структурно-функциональной характеристике нейронов спинного мозга в постнатальном периоде, эмбриологические исследования внесли существенный вклад в понимание с одной стороны – многообразия нейронов спинного мозга, с другой – сходства многих из них по химическим признакам.

Накопленные к настоящему времени гистохимические, иммуногистохимические, электронно-микроскопические исследования позволяют весьма условно представить топографию в сером веществе спинного мозга нейронов и их окончаний, содержащих медиаторы и их предшественники, ферменты, белки. При этом чаще всего констатируется область или ядро, где локализуются клетки, содержащие тот или иной маркер.

Приведенные данные литературы свидетельствуют, что ГАМК- и глутаматергические нейроны в спинном мозге имеют весьма широкое распространение. В полной мере это относится к нейронам I и II пластинок: они связаны с аксонами первичных чувствительных нейронов, с интернейронами глубокой области дорсального рога. Являясь составной частью нейронных сетей, они участвуют в пресинаптическом торможении ноцицептивной и неноцицептивной импульсации, поступающей с первичных афферентов (Ribeiro-da-Silva, 2004), но не образуют прямых контактов с мотонейронами. Отличия в локализации глутаматергических и ГАМК-ергических нейронов весьма неопределенны, что позволяет предполагать полифункциональность каждого интернейрона, специфичность влияния которого на другие нейроны будет зависеть от приходящих афферентных притоков и проявляться в тормозном или возбуждающем действии. В пользу этого свидетельствует нахождение в нейронах всех пластинок дорсального рога глутаматдекарбоксилазы (ГАД), которая является ферментом, участвующим в синтезе ГАМК, катализирует превращение глутаминовой кислоты в γ -аминомасляную кислоту. В то же время ее субстрат, глутаминовая кислота, является медиатором процесса возбуждения, а продукт –

ГАМК – важнейшим медиатором процесса торможения в нейронах мозга. Это может означать, что один и тот же нейрон способен выполнять как ингибирующее, так и возбуждающее влияние на нейрон. Показана возможность как совместного выделения (ко-релиз) ГАМК и глутамата из пресинаптических терминалей нейронов, так и колокализация рецепторов глутамата и ГАМК в синапсе (Попов и др., 2016).

Известно, что нейроны серого вещества спинного мозга содержат огромное число нейрoхимических маркёров, но применение их для выделения отдельных структурно-функциональных групп нейронов свидетельствует, что одни присутствуют как в возбуждающих, так и тормозных интернейронах, другие определяются в ограниченных группах. Кроме того, в спинном мозге присутствуют интернейроны, являющиеся инертными - "спящими" или "несекреторными" (Grudt, Perl, 2002; Maxwell et al., 2007; Yasaka et al., 2007; Porseva, Shilkin, 2012). На долю таких клеток приходится до трети всей популяции интернейронов (Todd, 2010).

4.1.3.1. Ацетилхолин: ацетилхолинэстераза (АХЭ), холинацетилтрансфераза (ХАТ), везикулярный переносчик ацетилхолина (ВПА)

Холинергические нейроны в спинном мозге описаны у птиц (Necker, 2006) и целого ряда млекопитающих - крысы (Barber et al., 1984; Колос, Коржевский, 2016), мыши (Chan-Palay et al., 1982), морской свинки (Davidoff et al., 1989), кошки (Жукова, Брагина, 1981; Kimura et al., 1981), свиньи (Necker, 2004; Calka et al., 2008), приматов (Torres-da-Silva et al., 2016) и человека (Oda et al., 2004; Schoenen, Faull, 2004) по результатам определения:

- АХЭ – фермента, разрушающего ацетилхолин;
- ХАТ – фермента, катализирующего образование ацетилхолина;
- везикулярного переносчика ацетилхолина (ВПА) (vesicular acetylcholine transporter, VAChT) – маркёра холинергических терминалей.

Холинергические нейроны найдены во всех частях серого вещества спинного мозга: дорсальном роге, вентральном роге, промежуточной зоне, вокруг

центрального канала (Calka et al., 2008; Колос, Коржевский, 2016; Torres-da-Silva et al., 2016).

В дорсальном роге АХЭ содержащие нейроны локализованы в пластинках I-III, в медиальных частях пластинок V-VI (Barber et al., 1984), в пластинках III-V (Descarries, Mechawar, 2008). При этом не указываются особенности топографии и количественное представительство клеток в пластинках, форма и размеры АХЭ позитивных нейронов. Только в некоторых работах отмечается, что меньшее количество окрашенных клеток обнаружено в области центрального канала и в основании дорсального рога спинного мозга (Oda et al., 2004; Schoenen, Faull, 2004; Calka et al., 2008).

В промежуточной зоне серого вещества спинного мозга АХЭ содержащие нейроны представлены преганглионарными симпатическими нейронами (Koelle, 1962; Necker, 2004) и разделительными клетками (Barber et al., 1984).

Преобладающее число нейронов, содержащих АХЭ, находится в вентральном роге, где в пластинке IX локализируются ядра, состоящие из соматических двигательных нейронов, холинергическая природа которых со времен Ленгли только подтверждается (Aquilonius et al., 1981; Barber et al., 1984; Necker, 2006; Descarries, Mechawar, 2008).

АХЭ-позитивные нейроны в спинном мозге обычно идентифицируют с визуализируемыми ХАТ-иммунореактивными нейронами и по содержанию ВПА (Oda et al., 2004; Calka et al., 2008). В то же время установлено, что в пластинках I-IV выявляются только ХАТ-иммунореактивные волокна (Barber et al., 1984; Torres-da-Silva et al., 2016), ХАТ-иммунореактивные нейроны в виде рассеянных клеток определяются только в грудных сегментах спинного мозга, в отличие от его утолщений, где иммунореактивные клетки концентрируются в виде групповых скоплений от трёх до десяти нейронов (Calka et al., 2008). В то же время, в шейных сегментах спинного мозга выявляются единичные клетки, экспрессирующие ХАТ в пластинках II-IV дорсального рога (Колос, Коржевский, 2016).

Как видно, наличие АХЭ и ХАТ в нейронах не всегда совместно: в промежуточно-медиальном ядре только около половины ХАТ иммунореактивных нейронов являлись АХЭ-позитивными (Calka et al., 2008). Это ставит под сомнение правомочность применения термина холинергический при обнаружении в нейроне активности АХЭ, тем более, что обнаруженная АХЭ гистохимическим методом присутствует как в холинергических, содержащих ХАТ, так и в холинорецепторных нейронах (Nogradi, 2006; Torres-da-Silva et al., 2016).

Высокие уровни активности как АХЭ, так и ХАТ обнаружены в мотонейронах, вегетативных ядрах спинного мозга и в нейронах пластинок I, III (Aquilonius et al., 1981), но ВПА обнаружен в небольшом количестве дендритов нейронов пластинок II-III дорсального рога (Pawlowski et al., 2013).

Нейропиль вентрального рога содержит АХЭ, ХАТ, ВПА бутоно-подобные структуры, образующие корзинки, окружающие мотонейроны (Barber et al., 1984; Calka et al., 2008; Колос, Коржевский, 2016). Очевидно, они принадлежат премоторным нейронам, к которым относят нейроны поля X, разделительные клетки промежуточной области, клетки Реншоу вентрального рога, интернейроны медиальной области дорсального рога. Так, наибольшую выраженность иммуногистохимической реакции на ХАТ проявляют интернейроны пластинок VI-VII спинного мозга, оказывающие модулирующее влияние на мотонейроны (Колос, Коржевский, 2016).

Тела, отростки, терминали нейронов спинного мозга по рассмотренным маркерам имеют неодинаковую характеристику: тела некоторых нейронов содержат АХЭ и ХАТ, другие - только ХАТ или только АХЭ; в отростках некоторых нейронов определяется ХАТ, в терминалях – АХЭ, ХАТ, ВПА.

Очевидно, нет нужды доказывать, что термин «ергичность» имеет в настоящее время разное обоснование – одни судят об «ергичности» по активности АХЭ, что имеет скорее историческое значение, другие определяют «ергичность» по наличию ХАТ, третьи – по совокупности определения АХЭ и ХАТ.

Существенно, что в дорсальном роге спинного мозга все аксональные ВПА-позитивные терминали проявляют иммунореактивность к ГАМК, но в

большинстве ГАМК иммунореактивных аксональных бутонов не обнаруживалась ХАТ. Важнее попыток констатации «ергичности» является то, что определение в терминалях нейронов таких медиаторов как ГАМК и глутамат позволяет не только связать выявляемый медиатор с формой и размерами нейрона, но и разделить интернейроны по их специфическим влияниям на другие группы нейронов: возбуждающие - глутаматергические; тормозные, ингибирующие – ГАМКергические, использующие γ -аминомасляную кислоту (ГАМК) и/или глицин.

Глутамат считают основным медиатором нейронов дорсальных рогов спинного мозга, который характеризует синаптические окончания всех классов волокон первичных афферентных нейронов, а также аксонов нейронов спинного мозга, максимальная концентрация которых отмечается в пластинках I, II, III, V. На эти нейроны конвергируют волокна первичных афферентов, передающие как «безвредные» сенсорные сигналы, так и ноцицептивные (Grudt, Perl, 2002). В части глутаматергических нейронов спинного мозга содержатся как опиоидные, так и НPY (нейропептид Y) рецепторы (Zhang et al., 1999).

Глутаматергические нейроны идентифицируются по наличию в нервной ткани везикулярных переносчиков глутамата (ВПГ) (Olave, Maxwell, 2003), где ВПГ2 обнаружен в аксонах интернейронов пластинки I и II, а ВПГ1 и ВПГ3 в аксонах первичных афферентов. При этом, глутаматергическими нейронами являются вертикальные, радиальные клетки и часть островковых клеток малых размеров (Maxwell et al., 2007; Kato et al., 2009). По-видимому речь идет о метаботропных рецепторах глутамата, которые участвуют в регуляции его экспрессии: I типа экспрессируются на постсинаптической мембране, II и III типа - на пресинаптическом окончании (Grueter, Winder, 2009). Эти нейроны обеспечивают как трансламинарную полисинаптичность входов волокон первичных афферентов (Kato et al., 2009), так и способность их дифференциации, что связано с различным набором субъединиц глутаматных рецепторов (Moreno-González, Zarain-Herzberg, 2006).

ГАМКергические нейроны присутствуют во всех пластинках дорсального рога спинного мозга с одинаковым количественным распределением во всех отделах спинного мозга (Magoul et al., 1987). Наибольшее их количество обнаружено в поверхностной области дорсального рога спинного мозга (Lu et al., 2008; Todd, 2010) с максимальной концентрацией в пластинке II, где до 30% от общего числа нейронов пластинки проявляют иммунореактивность к ГАМК (Polgár et al., 2003).

К структурным типам ГАМКергических нейронов относят: в поверхностной области дорсального рога – островковые (Todd, 2010) и стебельчатые клетки (Barber et al., 1982), не превышающие 13 мкм в диаметре; в глубокой области дорсального рога – нейроны, не превышающие 19 мкм в диаметре; в пластинках VIII и X – нейроны, средние размеры которых не превышают диаметра в 16 мкм (Barber et al., 1982). Часть авторов в популяциях ГАМКергических нейронов обнаруживает все нейрональный структурные типы, обнаруженные в описанных выше областях серого вещества спинного мозга (Maxwell et al., 2007).

ГАМКергические нейроны не всегда содержат глицин в качестве котрансмиттера (Todd, 2010): выделяют субпопуляции интернейронов, содержащих один тормозной медиатор – только ГАМК или только глицин (Yasaka et al., 2007), либо оба медиатора (Polgár et al., 2013). Аксоны ГАМК и глицин содержащих нейронов, которые относятся к ипсилатеральным, ветвятся локально в сером веществе спинного мозга выполняя пресинаптическое торможение первичных афферентов (Lu, Perl, 2007) не только в дендроаксональных, но и в аксоаксональных синапсах (Todd, 2010).

Как видно, отличия в локализации глутаматергических и ГАМК-ергических нейронов, также как и отличия их формы и размеров, весьма неопределенны, что позволяет предполагать полифункциональность каждого интернейрона, специфичность влияния которого на другие нейроны будет зависеть от приходящих афферентных притоков и проявляться в тормозном или возбуждающем действии. Из нервной ткани различных животных были выделены гомогенные препараты двух изоформ фермента — субъединицы ГАД65 и ГАД67,

которые различаются по молекулярной массе — 65 кДа и 67 кДа (Сухарева и др., 2001). Последние исследования показывают, что эти две изоформы выявляются в различных популяциях ГАМКергических нейронов, составляющих до 30% от общего числа нейронов пластинки II (Polgár et al., 2003), а их экспрессия напрямую зависит от различного приложения периферических стимуляций (Веселкин, Наточин, 2010; Nowak et al., 2011).

Считают, что холинергические аксональные бутоны отростков нейронов дорсального рога, содержащие ГАМК, участвуют в пресинаптическом торможении как ноцицептивной, так и неноцицептивной импульсации, поступающей с первичных афферентов (Ribeiro-da-Silva, 2004). Холинергические нейроны, располагающиеся в области пластинки X, на которых оканчиваются серотонинергические и моноаминергические терминалы стволовых структур (Sławińska et al., 2014), участвуют в модуляции двигательной активности мотонейронов, образуя с ними, в большинстве своём ипсилатеральные (Skup et al., 2012) моносинаптические соединения (Stepien et al., 2010) на телах и дендритах в виде крупных синпатических окончаний в форме С-бутонов (Nagy et al., 1993). Холинергические интернейроны пластинки X не получают прямых синпатических контактов от волокон первичных афферентов (Zagoraïou et al., 2009), а только через их ассоциативные связи через возбуждающие или тормозные интернейроны, которые располагаются в медиальных частях пластинки IV-VI (Jankowska et al., 2009). Функциональная роль нейронов пластинки X в спинном мозге до сих пор непонятна, а с учетом синаптических контактов и химической гетерогенности аксональных проекций (J. Leah et al., 1988), эту область рассматривают как внутреннюю вегетативную, выделяемую в «лимбическую область» центральной зоны спинного мозга (H. van Dijken et al., 1996).

Судя по данным физиологических, морфологических, гистохимических и иммуногистохимических исследований приведенных выше, к премоторным нейронам относят не все интернейроны, а только их популяцию, напрямую связанную с мотонейронами. Некоторые исследователи причисляют к премоторным и интернейроны, связанные с преганглионарными нейронами

промежуточной зоны спинного мозга. К группе премоторных интернейронов, таким образом, относится часть интернейронов дорсального рога, часть интернейронов области медиального края дорсального рога, разделительные клетки промежуточной зоны, часть интернейронов поля X, клетки Реншоу, располагающиеся в вентральном роге. Общим признаком для них некоторых считают, несмотря на малую доказательность, принадлежность к холинергическим (наличие АХЭ, ХАТ, ВПА), другие – наличие в терминалях ГАМК и/или глицина, глутамата. По размерам премоторные нейроны относятся, как правило, к малым или средним; их форма многообразна и не имеет специфики.

Распределение аксонов первичных афферентных волокон в сером веществе дорсального рога спинного мозга является строго упорядоченным в соответствии с размерами входящих волокон и их сенсорных модальностей. Известно, что в глубоких слоях дорсального рога спинного мозга оканчиваются механочувствительные Аβ-волокна первичных афферентов, в то время как в поверхностных слоях оканчиваются тонкие Аδ- и С-волокна, большая часть которых является ноцицептивными. Но, анализ литературы показывает, что обсуждение аксональных проекций первичных сенсорных нейронов в сером веществе спинного мозга не закончено, хотя решение этих вопросов было бы интересным в плане установления структурно-функциональных критериев разделения интернейронов на ипсилатеральные, комиссуральные, проекционные.

4.1.3.2. TRPV1, transient receptor potential vanilloid 1

TRPV1 (рецепторы временного потенциала, ваниллоидный тип 1) экспрессируются как в периферических, так и в центральных ветвях малых и средних (С- и Аδ-) сенсорных нейронов, объединяемых в популяцию ноцицептивных нейронов. Экспрессия и функция этих каналов активно исследуется с момента их клонирования в конце прошлого столетия (Caterina et al., 1997). Около 80% проекционных нейронов пластинки I дорсального рога

спинного мозга I экспрессируют рецептор NK1 к веществу P (Todd, 2002), тем самым участвуя в развитии термической гипералгезии (Mantyh et al., 1997). Иммуногистохимическое исследование показало, что существуют прямые контакты TRPV1-содержащих первичных афферентов с NK1-позитивными нейронами дорсального рога в пластинке I спинного мозга (Hwang et al., 2003). Было подтверждено, что TRPV1-положительные первичные афференты являются глутаматергическими, а контактные спинальные интернейроны содержат основные классы ионотропных глутаматных рецепторов (Hwang et al., 2004).

В спинном мозге присутствие TRPV1 показано на пресинаптических окончаниях первичных афферентов, непосредственно в дорсальном роге (Spicarova, Palecek 2008; Cavanaugh et al., 2011). При этом, тоническая активация TRPV1 обнаружена не только в модели периферического воспаления (Spicarova, Palecek, 2008), но и у интактных мышей (Park et al., 2011).

Иммуноцитохимическими методами показано присутствие белка TRPV1 и его мРНК в интернейронах желатинозной субстанции дорсального рога спинного мозга при капсаицин-индуцированной активации TRPV1 в органотипически культивируемых нейронах у постнатальных 8-12 дневных мышей (Ferrini et al. 2010). Экспрессия TRPV1 в ГАМК-ергических спинальных интернейронах обнаруживается при внутритекальном введении агонистов TRPV1 и является функциональной, обусловленной сенситизацией (Kim et al., 2012). Тем не менее, дискуссия о наличии или отсутствии TRPV1 постсинаптически в дорсальном роге спинного мозга продолжается.

4.1.3.3. Вещество P и кальцитонин-ген-родственный пептид

Нейропептиды – это полифункциональные высокоактивные вещества пептидной природы, синтезируются на рибосомах гранулярного эндоплазматического ретикулума в виде высокомолекулярных неактивных предшественников (препропептидов) (Bucelli et al., 2008). Из одного белкового предшественника образуются различные нейропептиды в различных тканях

(Krause et al., 1989). Вещество P выполняет функцию медиатора в окончаниях сенсорных аксонов малого диаметра дорсальных слоев спинного мозга, связанных с восприятием боли, относится к пептидам - тахикининам (нейрокинины, НК) (Николлс и др. 2008). Биологические действия опосредованы конкретными рецепторами клеточной поверхности НК1, НК2 и НК3, агонистом НК1 рецепторов является вещество P (Satake, Kawada, 2006). Кальцитонин-ген-родственный пептид – пептид, связанный с геном кальцитонина (кокальцигенин), в больших количествах обнаруживается в С-клетках щитовидной железы, но широко представлен центральной нервной системе, сердечно-сосудистой системе, органах желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системе. (Russo, 2015; González-Hernández et al., 2016). Одновременное содержание вещества P и кальцитонин-ген-родственного пептида в сером веществе дорсального рога спинного мозга показано только в аксональных терминалях первичных афферентов (Ribeiro-da-Silva, 2004), которые являются ноцицептивными и оканчиваются в пластинке I и наружной части пластинки II, а также проникают в глубокую область дорсального рога спинного мозга (Stewart, Maxwell, 2000; Todd, 2002).

В поверхностной области дорсального рога спинного мозга вещество P содержат терминальные аксоны немиелинизированных и тонких миелиновых первичных афферентов (Ribeiro-da-Silva, 2004), но иногда иммунореактивными являются и клеточные тела. В большинстве работ НК1 рецептор действительно не обнаруживают в нейронах пластинки II, но около 50% нейронов пластинки I содержит данный рецептор (Polgar et al., 2013). В других работах этот показатель выше - 80% (Todd, 2010). В глубокой области дорсального рога спинного мозга присутствуют крупные нейроны, имеющие рецепторы к нейрокинину1. Они образуют моносинаптические соединения с волокнами первичных афферентов, содержащими вещество P (Stewart, Maxwell, 2000; Todd, 2002). Некоторые вещество P-иммунореактивные волокна прослеживаются у человека в пластинке X и в области вентрального рога до пластинки IX, где находятся в тесной связи с перикарионами и проксимальными дендритами мотонейронов (Schoenen, Faull,

2004). Непосредственно само вещество Р содержится лишь в относительно небольшом числе топографически различных субпопуляций нейронов спинного мозга: веретеновидные нейроны пластинки I, нейроны пластинок III-IV, дендриты которых распространяются дорсально в пластинку I, нейроны промежуточно-латерального ядра (Brown et al., 1995). A.M. Vergnano et al. (2004) показали отсутствие связи вещества Р содержащих нейронов поверхностной области дорсального рога спинного мозга с их формой.

Большинство иммунореактивных волокон к кальцитонин-ген-родственному пептиду также проявляют иммунореактивность к соматостатину (Todd, 2017). Почти все нейроны, содержащие вещество Р в сером веществе дорсального рога спинного мозга у крысы содержат энкефалин, при этом в 50% энкефалин-иммунореактивных нейронов присутствует вещество Р. Нервные терминалы с энкефалином и с веществом Р образуют отдельные синапсы на общем дендрите, но также и показано, что бутоны с веществом Р являются пресинаптическими к энкефалин-иммунореактивным дендритам у крыс (Stewart, Maxwell, 2000). Энкефалин никогда не был обнаружен в нейронах первичных афферентов и очевидно, что сококализация вещества Р и энкефалина может быть использована в качестве маркера для вещества Р-иммунореактивных нервных терминалей, имеющих спинальное происхождение.

4.1.3.4 Белки нейрофиламентов

Нейрофиламенты представляют собой нитевидные образования толщиной 8-10 нм в цитоплазме нейронов, обеспечивают медленный аксональный транспорт и во взрослом организме располагаются, в основном в аксонах нервных клеток (Петрова и др., 2012). Наряду с кератинами эпителиальных клеток, десмином миоцитов, глиальными филаментами и виментиновыми филаментами клеток мезенхимного происхождения, они относятся к промежуточным филаментам (Ueno et al., 2011). Последние являются компонентами цитоскелета и по своей толщине занимают промежуточное положение между микротрубочками (24–25

нм) и актиновыми филаментами (7–8 нм). Нейрофиламенты содержатся в нервных клетках, и одной из их функций является обеспечение медленного аксонального транспорта (Perrone Capano et al., 2001; Shadiack et al., 2001; Wang et al., 2012). Нейрофиламенты состоят из трех субъединиц, которые представляют собой полипептиды с N-концевым головным доменом, C-концевым хвостовым доменом и центральным стержневым доменом (Wang et al., 2012). Субъединицы различаются по молекулярной массе: низкомолекулярные белки нейрофиламентов с молекулярной массой 68–73 кДа, средние — 140–160 кДа и высокомолекулярные — 195–200 кДа (Shaw et al., 2005; Ueno et al., 2011). В эмбриогенезе вначале синтезируются белки нейрофиламентов с молекулярной массой 68-73 кДа и 140-160 кДа, позднее с молекулярной массой 195-200 кДа (Коржевский и др., 2010). В процессе дифференцировки нервных клеток показана повышенная экспрессия низкомолекулярного компонента нейрофиламентов (Коржевский и др., 2010), что важно для оценки как пренатального онтогенеза, так и в исследованиях нейротрансплантации эмбриональных закладок спинного мозга (Петрова и др., 2013).

Сборка белков нейрофиламентов осуществляется в перикарионе, с последующей транспортировкой в аксон и фосфорилированием (Shaw et al., 2005; Петрова и др., 2012). Нарушения в метаболизме нейрофиламентов являются механизмами в патогенезе различных нейродегенеративных заболеваний (Liu et al., 2011; Wang et al., 2012). Так, разрушение аксонального транспорта нейрофиламентов является одной из ранних патологических картин в трансгенной модели амиотрофического латерального склероза и является первичным патогенетическим механизмом, который индуцирует данную болезнь (Julien, Kriz, 2006).

Считается, что основой цитоскелета нейронов, имеющих большие размеры и длинные миелиновые аксоны являются белки нейрофиламентов (Xu et al., 1994), которые идентифицированы в нейронах различных частей головного мозга (Lopez-Picon et al., 2003; Perrot, Eyer, 2009; Kanning et al., 2010) и в мотонейронах спинного мозга (Mendonça et al., 2005; Wang et al., 2012). Высокомолекулярный

компонент нейрофиламентов служит маркером нейронов, образующих А-волокна популяций проприцептивных больших и тактильных средних нейронов (Коржевский и др., 2010).

Последние исследования показали, что особый интерес представляет белок нейрофиламентов с массой 200 кДа, степень фосфорилирования которого определяет взаимодействие между тремя белками нейрофиламентов (Shaw et al., 2005; Ueno et al., 2011). Считается, что нарушение структуры данного типа нейрофиламентов может изменять структуру всего комплекса цитоскелета аксонов и тем самым влиять на функционирование, как аксона, так и нейрона в целом (Shaw et al., 2005; Петрова и др., 2012).

У мыши белок нейрофиламентов 200 кДа определяется в крупных интернейронах пластинок IV-VII, VIII и поля X, до 25% нейронов пластинок V и VII в краниальных грудных сегментах спинного мозга проявляют совместную иммунореактивность к белку нейрофиламентов 200 кДа и к ХАТ (Порсева и др., 2016). Возможно, это связано с генетическим родством некоторых премоторных нейронов с мотонейронами.

4.1.3.5. Кальций-связывающие белки: кальбиндин 28 кДа, кальретинин, парвальбумин

Нейроны спинного мозга проявляют иммунореактивность к большому количеству кальций-связывающих белков: кальбиндину, кальмодулину, парвальбумину, кальретинину (Kim et al., 2002; Megias et al., 2003; Fahandejsaadi et al., 2004; Anelli, Heckman, 2005). В зависимости от концентрации ионов кальция, кальций-связывающие белки по-разному взаимодействуют со своими белками-мишенями и регулируют их активность (Schwaller, 2012). Кальретинин участвует в регуляции уровня возбудимости клетки и процессах синаптической пластичности, в частности индукции долговременной потенциации в нейронах гиппокампа (Camp, Wijesinghe, 2009). У мышей-мутантов, не содержащих кальретинина, отмечаются изменения функциональных характеристик нейронов

центральной нервной системы, в частности увеличенная частота импульсации клеток Пуркинье и более короткие межспайковые интервалы (Cheron et al., 2008).

Кальбиндин выполняет функцию не только кальциевого буфера, но и кальциевого сенсора, регулирует внутриклеточные ответы на физиологические стимулы и защищает клетки от кальций-опосредованной нейротоксичности (Lee et al., 2006). Кальбиндин защищает клетки от процессов апоптоза путем ингибирования ключевого фермента капазы-3 (Bellido et al., 2000). Среди факторов, регулирующих развитие синапсов и их пластичность, важную роль играет поддержание определенной концентрации ионов кальция, что обеспечивается, в том числе и кальбиндином (Schwaller, 2012).

Нейроны, содержащие кальбиндин локализованы в определенных областях серого вещества спинного мозга: у крысы - в пластинках I, II, IV, в области центрального канала, в вентральном роге медиально от латеральной группы мотонейронов (Antal et al., 1990); у пресмыкающихся – в пластинках I и II, в промежуточной области и в вентральном роге (Morona et al., 2006). Последние исследования показали, что нейроны с кальбиндином рассеяны на всем протяжении серого вещества у мыши (Порсева и др., 2014; Kim et al., 2008), крысы (Порсева, 2014; Kim et al., 2002), кошки (Anelli, Heckman, 2005; Merkulyeva et al. 2016), кролика (Lee et al., 2004), человека (Schoenen, Faull, 2004) и располагаются во всех пластинках дорсального рога, в симпатических преганглионарных нейронах, в промежуточной области, в пластинке X, в вентральном роге.

У кошки распределение кальбиндин связывают с размерными характеристиками нейронов спинного мозга, где он выявляется в малых нейронах пластинок I, II, III и X, в малых и средних нейронах пластинок III-VI, в средних и крупных нейронах пластинок VI-VIII (Anelli, Heckman, 2005; Merkulyeva et al., 2016).

У мыши нейроны поверхностной области дорсального рога, содержащие кальбиндин, описываются как «атипичные» интернейроны дорсального рога (Todd, Lewis, 1986), которые имеют малые размеры и округлую форму, отличную

от всех имеющихся морфологических клеточных групп этой области у мышей (Порсева и др., 2014). Данные электронной микроскопии показали, что кальбиндин и парвальбумин преимущественно выявляются в дендритах или клеточных телах в поверхностной области дорсального рога спинного мозга у крысы (Yoshida et al., 1990).

Кальбиндин-иммунореактивные интернейроны глубокой области дорсального рога спинного мозга по характеру ветвления их отростков относят к антенноподобным нейронам (*antenna-like neurons*) с асимметричным ветвлением дендритного дерева, дорсальные ветви которого длинные, а вентральные короткие (Schoenen, Faull, 2004). Данный тип кальбиндин-иммунореактивных интернейронов крупных размеров выявляется и в пластине IV, указывая на сходство между интернейронами пластин III и IV, что совпадает с данными других исследователей (Antal et al., 1990; Bhimaidevi et al., 2012).

Часть авторов по распределению кальбиндина в нейронах спинного мозга выделяют несколько топографических областей их локализации: сильно иммунореактивные нейроны локализованы дорсомедиально; умеренно иммунореактивные нейроны расположены латерально; к слабо иммунореактивным нейронам относят вентромедиальную группу мотонейронов (Megias et al., 2003).

В вентральном роге спинного мозга иммунореактивность к кальбиндину проявляют как мотонейроны, так и интернейроны, включая клетки Реншоу (Fahandejsaadi et al., 2004; Anelli, Heckman, 2005; Morona et al., 2006). В пластинке VIII вентрального рога спинного мозга выявляются иммунореактивные интернейроны с кальбиндином средних и крупных размеров на всех уровнях спинного мозга в ряду позвоночных животных - от амфибий до млекопитающих (Megias et al., 2003; Fahandejsaadi et al., 2004; Anelli, Heckman, 2005; Morona et al., 2006, 2007). Часть авторов описывает кальбиндин-иммунореактивные нейроны пластинки VIII, как типичные вставочные нейроны, ссылаясь на их серотонинергическую иммунореактивность (Megias et al., 2003). Было также доказано, что данная популяция иммунореактивных интернейронов не содержит

гефирин (gephyrin), являющийся адаптерным белком комплекса глициновых рецепторов и специфическим маркером клеток Реншоу (Geiman et al., 2000; Alvarez, Fyffe, 2007).

По данным физиологических исследований (Экклс, 1959; Renshaw, 1946; Kim et al., 2008) клетки Реншоу представляют особую группу интернейронов, расположенных в вентромедиальной области вентрального рога спинного мозга, содержащих кальций-связывающий белок кальбиндин (Arvidsson et al., 1992; Blanchard et al., 2009), являющийся их "потенциальным маркером" (Carr et al., 1998; Alvarez, Fyffe, 2007) и выполняющим роль буфера для связывания избытка ионов кальция (Kim et al., 2008; Schwaller, 2012), образующегося при усилении тормозного влияния клеток на мотонейроны (Geiman et al., 2000; Alvarez, Fyffe, 2007).

Кроме кальбиндина нейроны спинного мозга проявляют иммунореактивность и к другим кальций-связывающим белкам, локализация которых с КАБ не всегда совпадает. Установлено, что кальбиндин и кальретинин содержатся в 17-20% клеток дорсального рога спинного мозга пресмыкающихся (Morona et al., 2006). В спинном мозге кошки солокализация кальбиндина с парвальбумином показана в 1-2% клеток, локализованных в вентральной и промежуточной части пластинки VII и в пластинке X, а с кальретинином – в 0,3% клеток, локализованных в пластинке II. При этом, совместное содержание парвальбумина и кальретинина наблюдалось в 6% клеток, расположенных в вентральной части пластинки VII и в пластинке VIII (Anelli, Heckman, 2005).

У крысы содержание кальций-связывающих белков соотносят с формой нейрона: на поперечном срезе спинного мозга кальбиндин и парвальбумин обнаруживают в биполярных и мультиполярных нейронах круглой, овальной, полигональной формы (Kim et al., 2002), при этом, число парвальбумин содержащих нейронов превышает таковое с кальбиндином в два раза.

По данным К. Ren, М.А. Ruda (1994), кальбиндин локализован в нейронах пластинки I и в субэпендимального слоя пластинки X, парвальбумин – в нейронах внутренней части пластинки II, кальретинин – в нейронах пластинок V и VI, в

мотонейронах пластинки IX, кальбиндин и кальретинин – в нейронах пластинки II и в симпатических преганглионарных нейронах, кальбиндин, кальретинин и парвальбумин – в нейронах вентромедиальной части дорсального рога.

В последних публикациях показана солокализация кальбиндина и ХАТ в нейронах вентрального рога спинного мозга. Разброс показателей холинергических нейронов, содержащих кальбиндин велик: от 2% у черепахи, 18-24% у геккона, до 56% у человека (Morona et al. 2006, 2007; Fahandejsaadi et al., 2004). При этом, авторы относят эту популяцию кальбиндин-иммунореактивных нейронов исключительно к мотонейронам (Morona et al. 2006; Fahandejsaadi et al., 2004). В пользу этого свидетельствуют данные, что именно крупные α -мотонейроны пластинки IX спинного мозга проявляют иммунореактивность не только к кальбиндину, но и к другим кальций-связывающим белкам – парвальбумину, кальретинину (Arvidsson et al., 1992; Fahandejsaadi et al., 2004), что подтверждается одновременным маркированием белков и ХАТ: у обезьян 63% мотонейронов с ХАТ содержали парвальбумин, 53% мотонейронов с ХАТ содержали кальретинин и 56% – содержали кальбиндин (Fahandejsaadi et al., 2004); у крысы и мыши мотонейроны с ХАТ и кальбиндином были единичными (Порсева и соавт., 2014; Kim et al., 2008). Показано, что терминали кальбиндин-иммунореактивных нейронов, проецирующиеся в промежуточно-латеральный столб спинного мозга содержат или глутамат, или ГАМК, или совместно ГАМК с глутаматом (Llewellyn-Smith et al., 2002).

В спинном мозге крысы показана солокализация кальбиндина с нейропептидами в интернейронах поверхностной области дорсального рога: в 75% нейронов с нейротензином, в 44-46% нейронов с веществом Р и в незначительном проценте нейронов с энкефалином и соматостатином (Yoshida et al., 1990). Часть нейронов спинного мозга, содержащих кальбиндин, иммунореактивны к белку нейрофиламентов с молекулярной массой 200 кДа (Порсева, 2014). При высоких концентрациях ионов кальция внутри клетки происходит выраженная деградация белков нейрофиламентов (Banik et al., 1997; Fasani et al., 2004) и гибель клетки (Caillard et al., 2000).

4.1.3.6. Оксид азота – газ, низкомолекулярный липидо- и водорастворимый нейромедиатор, NO-синтаза, НАДФН-диафораза

В гистохимических исследованиях экспрессию NO, как правило, определяют по активности НАДФН-диафоразы, коферменте NO-синтазы (NOS), или иммуногистохимическим методом определения экспрессии NOS. Сравнительными исследованиями с применением антител против nNOS и гистохимическим определением НАДФН-диафоразы установлено, что высокая активность НАДФН-диафоразы, обнаруживаемая в отдельных нервных клетках, сопровождается экспрессией NOS (Vizzard et al., 1994; Охотин, Шуклин, 2006; Коржевский и др., 2007). В нейронах пластинок I-III дорсального рога НАДФН-диафораза является «надежным» маркером NOS в спинном мозге крысы (Laing et al., 1994). Ряд авторов указывает, что гистохимический метод определения НАДФН-диафоразы является маркером конститутивных нейрональной (nNOS или NOS1) и эндотелиальной (eNOS или NOS3), которые вырабатывают сравнительно низкие концентрации NO (Vizzard et al., 1994; Охотин, Шуклин, 2006; Коржевский и др., 2007), что указывает на их физиологический синтез. Другие считают, что НАДФН-диафораза связана с индуцибельной изоформой NOS (iNOS или NOS2), которая синтезирует высокие концентрации NO, и образуется при повреждении, то есть может служить показателем как патологии нервной клетки (Martin et al., 1997; Матвеева и др., 2006), так и адаптационного процесса (Gookin et al., 2002). В настоящее время предлагается отказаться от выделения буквенных наименований изоформ NOS и перейти на цифровые обозначения в связи с участием конститутивных NOS (cNOS) в дополнительном синтезе, а iNOS в физиологическом синтезе оксида азота, а также тканевой неспецифичностью изоформ NOS (Покровский, 2011). Одним из путей активации нейрональной NO-синтазы в спинном мозге является выброс терминалями первичных афферентов вещества Р в результате стимуляции ноцицепторов (Valtschanoff et al., 1992).

Нейромодуляторную функцию и нейропротекторные свойства кальций-связывающих белков ассоциируют с их распределением в

NO-ергических нейронах спинного мозга. Оксиду азота (NO) как нейромедиатору придают особое значение. Его действие не ограничивается тормозным влиянием на нейроны – NO регулирует проницаемость и сократимость сосудов, участвует в реализации репаративных процессов, синаптической пластичности и, как и кальций-связывающие белки, влияет на ионные каналы плазматической мембраны нейрона.

У пресмыкающихся показано присутствие NOS в 6% кальбиндин-иммунореактивных нейронов в дорсальном роге и в 10% в вентральном роге, в 9-13% нейронов с кальретинином в дорсальном роге и в 14% в вентральном роге (Morona et al., 2006, 2007). При этом интернейроны иммунореактивные к кальбиндину являются преимущественно возбуждающими (Antal et al., 1990), а NO-ергические – тормозными нейронами, содержащими ГАМК (Nazli, Morris, 2000; Dougherty et al., 2009). В спинном мозге у новорожденных и взрослых крыс присутствуют холинергические нейроны, экспрессирующие NOS, что позволяет предполагать их формирование в пренатальном онтогенезе (Колос, Коржевский, 2015). Нейроны пластинок I-III дорсального рога иммунореактивные к ГАМК и все холинергические нейроны содержат НАДФН-диафорузу у взрослых крыс (Laing et al., 1994).

Нельзя считать, что распределение НАДФН-диафразы в нервной системе изучено детально. Некоторые исследователи указывают на локализацию НАДФН-диафразы в телах и отростках нервных клеток (Коржевский и др., 2007; Порсева, Шилкин, 2010; Черток, Коцюба, 2013; Saito et al., 1994; Freire et al., 2009), часть исследователей выявляет активность фермента в любом объекте исследований (Чусовитина, Вараксина, 2003; Матвеева и др., 2006), другие отмечают видовые и органные его особенности (Мотавкин и др., 2000; Охотин, Шуклин, 2006; Marsala et al., 2003; Necker, 2006; Freire et al., 2009).

Топография НАДФН-диафразы, как ключевого фермента митохондриального окислительного метаболизма, аналогична на протяжении всех уровней спинного мозга у грызунов агути, у которых диафорозо-позитивные нейроны распределены во всех областях серого вещества спинного мозга с

количественным приоритетом в дорсального роге и в области центрального канала (Freire et al., 2009). Показана одинаковая ферментативная активность в нейронах спинного мозга птиц и млекопитающих, у голубей НАДФН-диафороза-позитивные нейроны выявляются в пластинке II и около центрального канала спинного мозга (Necker, 2006).

Нитроксидазические нейроны локализованы в определенных областях серого вещества спинного мозга: в поверхностных слоях дорсальных рогов серого вещества, в центральном сером веществе и области пластинок VI-VII (Колос, Коржевский, 2015). По данным D. Kluchova et al. (2001), P. Patlevič et al. (2013) в нейронах вентрального рога спинного мозга крысы и кролика НАДФН-диафороза не выявляется. В других исследованиях отмечена активность НАДФН-диафорозы в мотонейронах спинного мозга у грызунов, но только при моделировании нейродегенеративных заболеваний нижних спинальных мотонейронов (Kauri et al., 1999; Gonzales et al., 2004).

В спинном мозге нейроны с НАДФН-диафорозой локализуются не только в сером веществе, единичные клетки встречаются и в белом веществе дорсального и вентрального канатиков на границе с серым веществом, обеспечивая межсегментарные связи (Valtschanoff et al., 1992; Marsala et al., 2003; Freire et al., 2009). На основании топографии диафороза-позитивных нейронов их делят на две популяции – интенсивно окрашенные, сходные с нейронами I типа Гольджи, и слабоокрашенные, сходные с нейронами II типа Гольджи (Saito et al., 1994; Freire et al., 2009), предполагая, что наличие обоих типов НАДФН-диафороза-позитивных нейронов является универсальным в спинном мозге млекопитающих. НАДФН-диафороза-позитивными нейронами являются преганглионарные симпатические нейроны в спинном мозге различных млекопитающих (Valtschanoff et al., 1992; Foster, Phelps, 2000; Kluchova et al., 2001; Marsala et al., 2003). В области пластинки X спинного мозга у собаки авторы выделяют две популяции клеток с активностью НАДФН-диафорозы: субэпендимальную, представленную продольно ориентированными биполярными нейронами малых

размеров и перицентральной, образованную крупными, интенсивно окрашенными нейронами полигональной формы (Marsala et al., 1998).

Как видно, до настоящего времени в научных исследованиях мнение о NO-ергических нейронах спинного мозга основывается на результатах гистохимического выявления НАДФН-диафоразы, реже – нейрональной NOS.

4.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.2.1. НЕЙРОХИМИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА ГРУДНОГО СПИННОГО МОЗГА У ВЗРОСЛОЙ КРЫСЫ

4.2.1.1. ХАТ-иммунопозитивные структуры серого вещества спинного мозга

Нейроны, содержащие холинацетилтрансферазу выявляются в дорсальном роге, промежуточной зоне, вентральном роге и поле X на поперечном срезе спинного мозга у взрослой крысы (Рис. 4.2.). Цитоплазма тел иммунореактивных нейронов имеет зеленую флюоресценцию, интенсивность которой в различных областях серого вещества различается. Наиболее яркое свечение нейроплазмы обнаруживается в нейронах вентрального рога (Рис.4.2. А; Рис.4.2. Б) и промежуточной зоны (Рис.4.2. Г, Д; Рис.4.2. А), менее интенсивное в нейронах дорсального рога и поля X (Рис. 4.2. Б). В нейронах с более ярким свечением нейроплазмы ХАТ распределяется диффузно, с менее ярким свечением – в виде мелких гранул (зернистость) и полюсно. Все выявляемые нейроны имеют иммунопозитивность отростков, которая в различных областях серого вещества различается. В дорсальном роге отростки иммунореактивных нейронов короткие, проследить их распространенность не представляется возможным. В отличие от этого, интернейроны промежуточной зоны и вентрального рога обнаруживают выявляемость и дифференцированность более длинных отростков.

В дорсальном роге иммунореактивные нейроны определяются в его глубокой области – пластинках III, IV и V (Рис. 4.2. Б, Д), а также в области медиального края дорсального рога. ХАТ-иммунореактивные интернейроны в пластинках поверхностной области дорсального рога спинного мозга не выявлены.

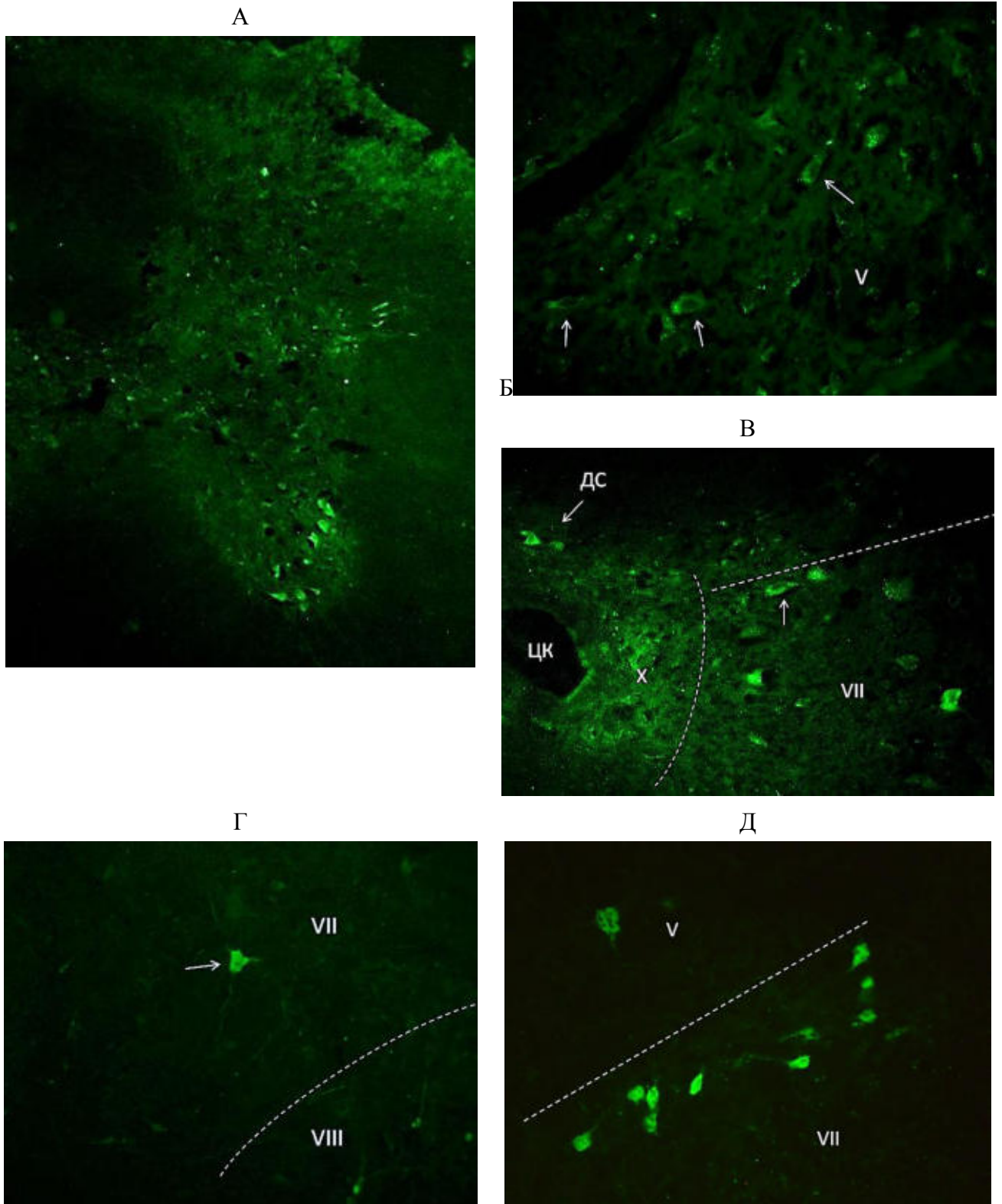


Рисунок 4.2. Топография нейронов с холинацетилтрансферазой в спинном мозге в 90-дневном возрасте крысы. А. Об. 4, ок.10. Б. Об. 20, ок. 10. В-Д. Об. 10, ок. 10.

Пунктирными линиями обозначены пластинки - римскими цифрами (V, VII, VIII). Стрелками указаны нейроны.

ДС-дорсальная серая спайка. ЦК – центральный канал.

Нейроны зеленого цвета с холинацетилтрансферазой (ХАТ).

В пластинках III и IV присутствуют иммунореактивные интернейроны овальной и веретеновидной формы тела, последние преобладают, ориентация клеточных тел дорсовентральная. Встречаются единичные овальной формы интернейроны в пластинке IV, располагаются вентрально, практически у границы с пластинкой V, ориентация клеточных тел которых медиолатеральная. В области медиального края дорсального рога интернейроны имеют овальную и веретеновидную формы, вытянуты дорсовентрально, параллельно краю рога. Интернейроны данной области также прослеживаются и в области дорсальной серой спайки (Рис. 4.2. В – в области дорсальной серой спайки (ДС) клетки указаны стрелкой). В пластинке V ХАТ-иммунореактивные интернейроны крупнее, чем в пластинке IV, появляются многоугольные формы, а ориентация клеточных тел только дорсовентральная.

Иммунореактивные интернейроны области медиального края (пластинка IV), которые идентифицируются в дорсальной серой спайке, отличаются по структурным характеристикам от интернейронов дорсальной серой спайки непосредственно поля X. Иммунореактивные интернейроны поля X располагаются вентральнее, являются относительно крупнее, имеют преимущественно многоугольную форму, которая характерная для практически всех ХАТ-содержащих нейронов поля X, локализованных и в вентральной серой спайке и в центральных частях. В каждой области поля X выявляются единичные иммунореактивные интернейроны и не на каждом срезе спинного мозга.

В промежуточной зоне спинного мозга, в пластинке VII, выявляются три популяции иммунореактивных к ХАТ интернейронов, одна из которых представлена клетками, расположенными в дорсальной части пластинки VII – на границе с пластинкой V дорсального рога. Популяцию формируют овальной и веретеновидной формы интернейроны, которые в виде клеточной "цепочки" располагаются на протяжении серого вещества от медиальной части пластинки VII к её латеральной части вплоть до латерального края серого вещества дорсальнее области латерального рога.

Мы предполагаем, что эта популяция интернейронов является топографически выделенной группой "разделительных нейронов", обозначенных в исследованиях R.P. Barber et al. (1984). Термином "разделительные нейроны" авторы обозначали клетки, которые локализуются непосредственно на границе дорсального и вентрального рогов спинного мозга. Они указывали на трудность выделения этой клеточной популяции на уровнях спинного мозга, содержащих автономные спинальные ядра в виду близости их расположения. Действительно, во втором грудном сегменте спинного мозга в пластинке VII промежуточной зоны вентральнее и вблизи от разделительных нейронов располагаются ХАТ-иммунореактивные симпатические преганглионарные нейроны, которые локализованы как в области вставочного ядра, так и в области промежуточно-латерального ядра (Рис. 4.2. А). При этом, ХАТ-иммунореактивные нейроны вставочного ядра топографически подобны разделительным нейронам, также формируют цепочку клеток, простирающуюся от медиальной части пластинки до латерального рога серого вещества. Но, последние располагаются в пластинке VII чуть вентральнее разделительных нейронов. В чём и заключается трудность топического их выделения. Анализируя структурные характеристики ХАТ-иммунореактивных интернейронов данных популяций, мы обнаружили, что морфология нейронов вставочного ядра отличается от таковой разделительных нейронов. Симпатические преганглионарные нейроны являются относительно крупнее, в популяции преобладают треугольные формы клеток, что сближает их с аналогичными характеристиками нейронов промежуточно-латерального ядра, локализация которых не представляет трудностей и не вызывает сомнений.

Таким образом, в промежуточной зоне спинного мозга мы выделили две популяции ХАТ-иммунореактивных нейронов: разделительные нейроны и симпатические преганглионарные нейроны.

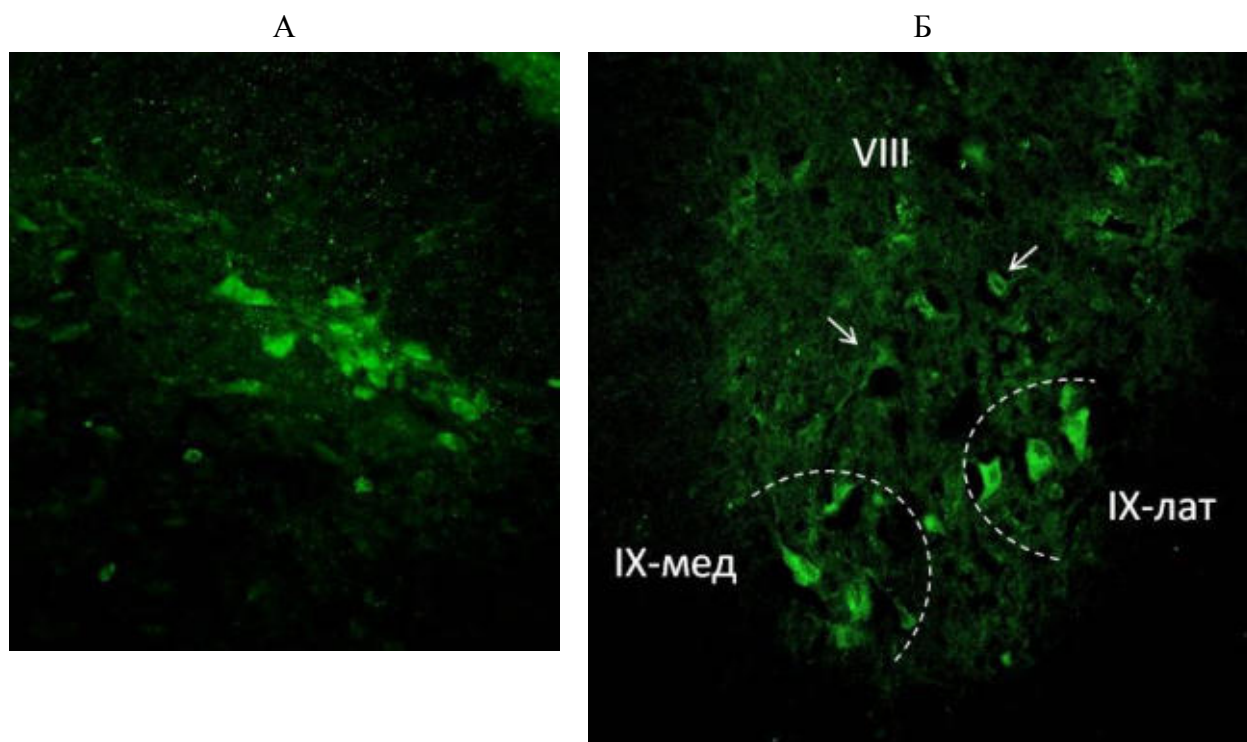


Рисунок 4.3. Нейроны с холинацетилтрансферазой в латеральном и вентральном рогах спинного мозга в 90-дневном возрасте крысы.

А. Область латерального рога. Об. 20, ок. 10.

Б. Вентральный рог. Об. 10, ок. 10.

Пунктирными линиями обозначены вентромедиальное (IX-мед) и вентролатеральное (IX-лат) ядра пластинки IX.

Стрелками указаны нейроны. Нейроны зеленого цвета с холинацетилтрансферазой (ХАТ).

Третья популяция иммунореактивных клеток, выявляемая в промежуточной зоне, также топографически соответствует пластинке VII. Эти иммунореактивные интернейроны располагаются диффузно, как правило, одиночно (Рис. 4.2. Г – клетка указана стрелкой), выявляются как в медиальной, так и в центральной частях пластинки VII. Иммунореактивные интернейроны этой популяции имеют овальную и многоугольную формы, от тел которых отходят 2 или 3-4 радиальных отростка, ориентированных как медиолатерально, так и дорсовентрально. Максимальная протяженность отростков составляет до 80 мкм как в дорсальном направлении к пластинке V дорсального рога, так и в вентральном направлении к пластинке VIII вентрального рога спинного мозга.

В пластинке VIII вентрального рога иммунореактивные интернейроны выявляются преимущественно в её центральной части, имеют относительно

крупные размеры, тем самым мало отличаются от крупных мотонейронов пластинки IX (Рис. 4.3. Б – клетки указаны стрелками). Клеточные тела иммунореактивных интернейронов ориентированы как дорсовентрально, так и медиолатерально. Интернейроны имеют многоугольную форму тела с длинными флюоресцентными отростками, ветвящимися в вентральном направлении к пластинке IX. В вентральном роге нейроны с ХАТ выявляются в виде групп в медиальной и латеральной областях вентральной трети рога, что соответствует локализации мотонейронов в пластинке IX (Рис. 4.3. Б). Цитоплазма тел мотонейронов имеет очень яркую зеленую флюоресценцию, ядра иммунонегативны.

Количественный анализ и размерные характеристики популяций нейронов, содержащих холинацетилтрансферазу представлены в *Таблице 4.1*. Подсчет ХАТ-иммунореактивных нейронов показал, что во втором грудном сегменте спинного мозга максимальное количество клеток выявляется в области локализации ядер симпатических преганглионарных нейронов промежуточной зоны, а максимальную выявляемость проявляют не только симпатические преганглионарные нейроны, но и мотонейроны спинного мозга. Доля ХАТ-иммунореактивных нейронов в этих областях превышает 90%. Минимальное количество клеток выявляется в центральных структурах спинного мозга – в поле X, и в области медиального края дорсального рога (пластинка IV). Средняя площадь ХАТ-содержащих клеток составляет 143,2-522,2 мкм². При этом самыми крупными являются мотонейроны пластинки IX, а самыми мелкими – интернейроны пластинки III. Из популяций интернейронов самыми крупными являются клетки вентрального рога – пластинки VIII (более 300 мкм²). Средние размеры менее 200 мкм² характерны для интернейронов пластинок III и IV. Большинство иммунореактивных клеточных популяций имеет размеры от 200 до 300 мкм², локализованных в пластинках V и VII.

Абсолютное (АК), относительное количество (ОК) и площадь (S) интернейронов с холинацетилтрансферазой во втором грудном сегменте спинного мозга в 90-дневном возрасте белой крысы ($X \pm Sx$)

Области серого вещества	АК	ОК, %	S, мкм ²
Дорсальный рог			
Пластинка III	2,4±0,1	3,0±0,4	143,2±14,1
Пластинка IV	2,7±0,2	3,4±0,5	198,4±10,9
Область медиального края	0,8±0,1	1,0±0,1	182,1±13,5
Пластинка V	4,7±0,2	5,5±0,4	238,6±9,4
Промежуточная зона			
Медиальная и центральная часть пластинки VII	2,3±0,1	2,4±0,2	279,1±11,9
Дорсальная часть пластинки VII (разделительные интернейроны)	4,4±1,3	4,5±0,7	204,4±8,5
Симпатические преганглионарные нейроны	18,4±2,6	92,0±3,4	234,5±8,2
Вентральный рог			
Пластинка VIII	3,4±0,2	7,2±1,5	321,6±14,7
Пластинка IX-мед	8,5±0,1	94,4±2,3	522,2±38,3
Пластинка IX-лат	8,8±0,1	92,5±2,1	514,5±35,9
Центральные структуры			
Поле X	0,9±0,1	0,7±0,1	214,4±19,8

4.2.1.2. Структуры серого вещества спинного мозга, содержащие TRPV1, вещество P и кальцитонин-ген-родственный пептид

На поперечном срезе спинного мозга в его сером веществе клетки, иммунореактивные к TRPV1, веществу P и кальцитонин-ген-родственному пептиду не выявляются. Определяется только флюоресценция нервных волокон в поверхностной области дорсального рога (Рис. 4.4.). Пластинка I содержит волокна как TRPV1, так и вещества P и кальцитонин-ген-родственного пептида. В пластинке II TRPV1-волокна практически не выявляются (Рис. 4.4. Г). Иммунореактивные волокна как с веществом P, так и с кальцитонин-ген-родственным пептидом прослеживаются только во внешней части пластинки II (Рис. 4.4. А-В). Более яркая флюоресценция характеризует волокна с TRPV1 и с кальцитонин-ген-родственным пептидом. В волокнах, содержащих вещество P, флюоресценция также интенсивная, но чуть менее яркая по сравнению с флюоресценцией волокон с TRPV1 и кальцитонин-ген-родственным пептидом. В пластинках глубокой области дорсального рога выявляются одиночные флюоресцентные волокна, наиболее часто в пластинке IV, ориентация которых дорсовентральная. Волокна данной области проявляют иммунореактивность к TRPV1, веществу P и кальцитонин-ген-родственному пептиду. В окружности клеточных тел иммунонегативных интернейронов пластинок I и II, на цитоплазматической мембране располагаются иммунореактивные структуры (Рис. 4.4. Д, иммунонегативные интернейроны указаны стрелками), похожие на синаптические, по-видимому, являются аксосоматическими синапсами. В пользу того, что эти иммунореактивные структуры являются пресинаптическими, говорит отсутствие иммунореактивных нейронов, окрашенность только нейропиля, и ограниченность в выявляемости только пластинкой I и внешней частью пластинки II (По зона) дорсального рога, куда непосредственно и осуществляют свои входы аксоны ноцицептивных первичных афферентов (Ruscheweyh et al., 2011).

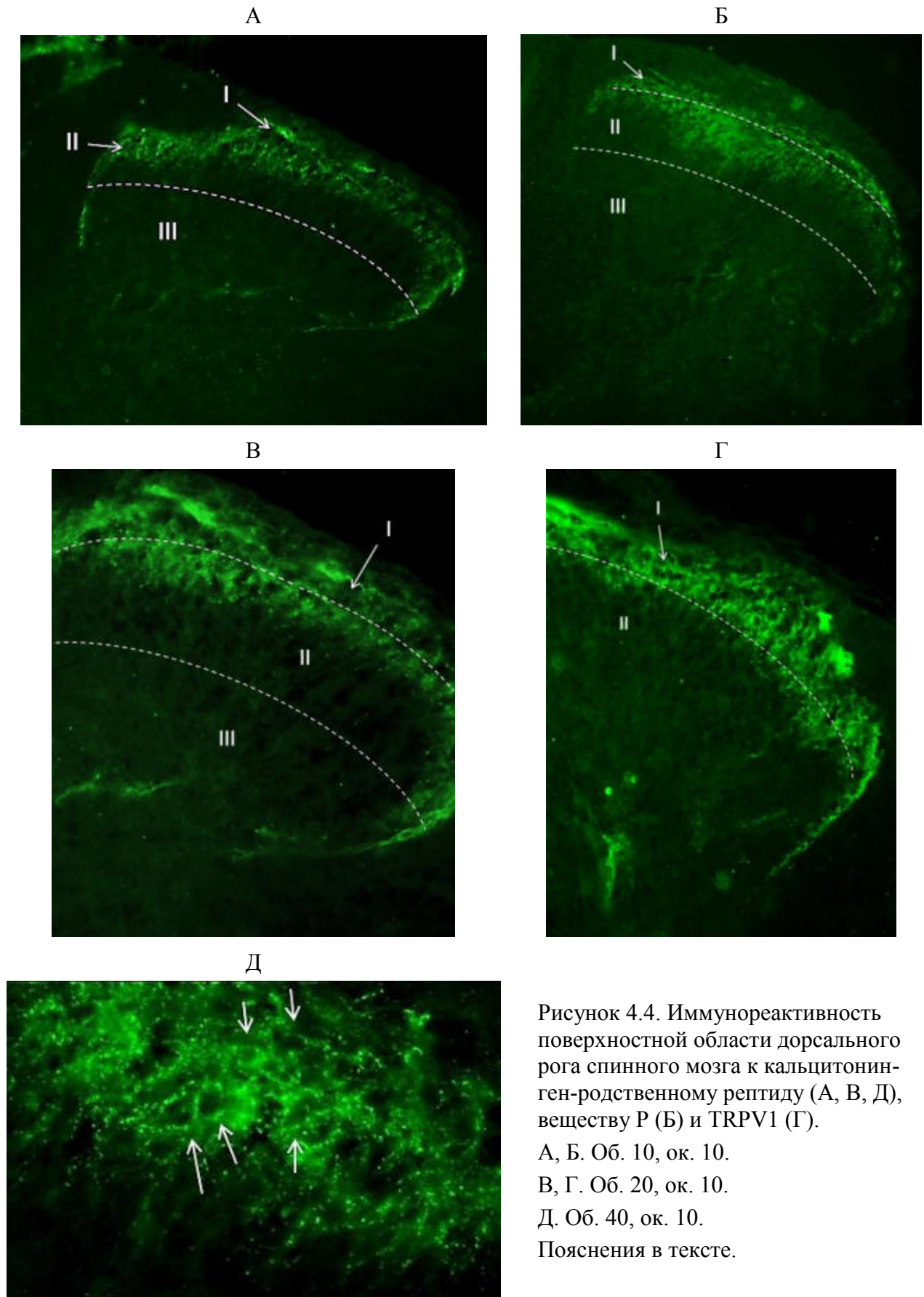


Рисунок 4.4. Иммунореактивность поверхностной области дорсального рога спинного мозга к кальцитонин-ген-родственному репиду (А, В, Д), веществу Р (Б) и TRPV1 (Г).

А, Б. Об. 10, ок. 10.

В, Г. Об. 20, ок. 10.

Д. Об. 40, ок. 10.

Пояснения в тексте.

4.2.1.3. Иммунореактивность структур серого вещества спинного мозга к высокомолекулярному белку нейрофиламентов

Нейроны, содержащие белок нейрофиламентов 200 кДа выявляются в дорсальном роге, промежуточной зоне, вентральном роге и поле X на поперечном срезе спинного мозга у взрослой крысы (Рис. 4.5.). Цитоплазма тел иммунореактивных нейронов имеет яркую красную флюоресценцию, интенсивность которой в различных областях серого вещества одинакова. Все выявляемые нейроны имеют прокрашиваемость отростков.

В дорсальном роге иммунореактивные нейроны выявляются в его глубокой области – пластинках III, IV и V (Рис. 4.5. Б, Г), а также в области локализации дорсального ядра спинного мозга, которое располагается непосредственно на границе дорсального рога и промежуточной зоны медиально в области основания рога (медиальные части пластинки V дорсального рога и пластинки VII промежуточной зоны) (Рис. 4.7. Б, В – область дорсального ядра выделена овалом). В области медиального края дорсального рога выявляется популяция интернейронов, клетки которой не отличаются по структурным характеристикам от иммунореактивных интернейронов пластинок дорсального рога спинного мозга (Рис. 4.5. Г).

На *Рисунках 4.5. (А, Б) и 4.6. (А, Д)* ясно визуализируется иммунонегативность поверхностной области дорсального рога – пластинок I и II. Известно, что в поверхностной области дорсального рога спинного мозга преобладают безмиелиновые нервные волокна (Rexed, 1952; Light et al., 1979), что подтверждает иммунонегативность интернейронов этих пластинок, так как белки нейрофиламентов маркируют нейроны, имеющие большие размеры и длинные миелиновые аксоны (Perrot, Eyer, 2009; Kanning et al., 2010). При этом, поверхностная область дорсального рога спинного мозга грызунов содержит большое количество интернейронов, иммунореактивных к кальбиндину 28 кДа (Porseva et al., 2015).

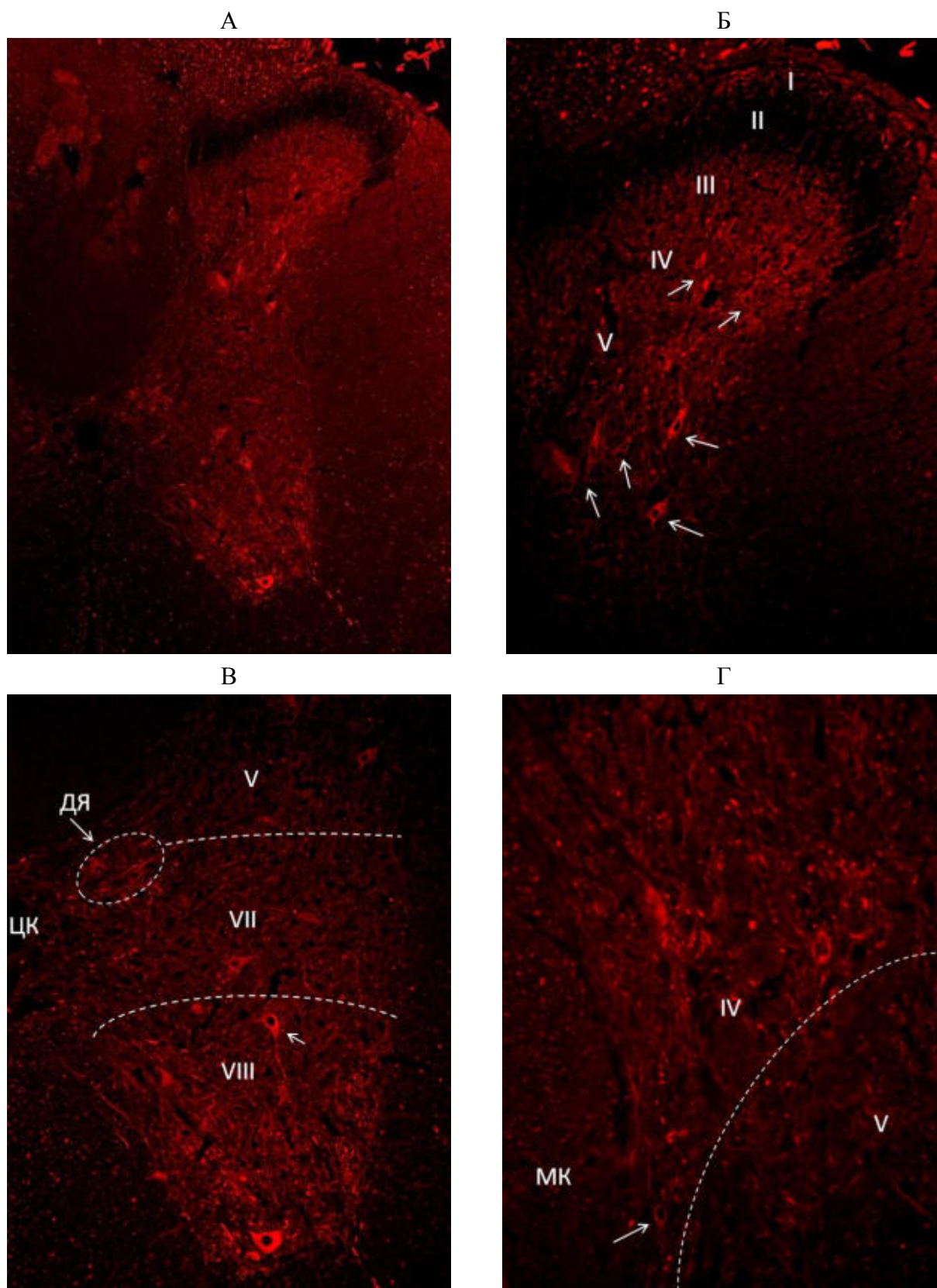


Рисунок 4.5. Нейроны с белком нейрофиламентов 200 кДа в спинном мозге в 90-дневном возрасте крысы. А. Об. 4, ок.10. Б-В. Об. 10, ок. 10. Г. Об. 20, ок. 10.

Пунктирными линиями обозначены пластинки - римскими цифрами (I, II, III, IV, V, VII, VIII) и дорсальное ядро (ДЯ). Стрелками указаны нейроны.

МК – область медиального края дорсального рога. ЦК – центральный канал.

Нейроны красного цвета с белком нейрофиламентов. Пояснения в тексте.

В пластинке III дорсального рога выявляются лишь единичные иммунореактивные интернейроны (Рис. 4.5. Б; рис. 4.6. А, Б, В), в пластинке IV интернейронов больше – выявляется от 1 до 3 клеток (Рис. 4.5. Б). Популяция клеток пластинки V является более многочисленной (Рис. 4.5. Б – клетки указаны стрелками), так как содержит как одиночные иммунореактивные интернейроны, так и группы нейронов, формирующих кластеры от 2 до 3 клеток (Рис. 4.6. Е – клеточные группы выделены прямоугольниками), которые располагаются одинаково равномерно в пределах различных частей пластинки.

На основании дендроархитектоники выделяют различные типы интернейронов, специфичные для каждой пластинки дорсального рога спинного мозга. Интернейроны, содержащие белок нейрофиламентов в пластинке III, по характеру ветвления их отростков можно отнести к антенноподобным нейронам (*antenna-like dendritic organization*) с их асимметричным ветвлением дендритного дерева (Schoenen, Faull, 2004), дорсальные ветви которого длинные, а вентральные короткие (Рис. 4.6. А-Г – интернейрон обозначен стрелкой в пластинке III). Данный тип нейронов выявляется и в пластинке IV (Рис. 4.6. А, Б – интернейрон обозначен стрелкой в пластинке IV), является наиболее типичным и указывает на сходство между интернейронами пластинок III и IV, что совпадает с данными других исследователей (Antal et al., 1991; Bhimaidevi et al., 2012).

Асимметричность ветвления отростков обусловлена большей обширностью дендритных арборизаций. Эти крупные интернейроны имеют дендриты, ориентированные дорсально, в то время как их аксоны отходят от вентральной области перикариона. Показано у кошки и человека, что дорсальные ветви этих нейронов могут подниматься вертикально в пластинку II, тем самым обеспечивая связи с вышележащими сегментами (Schoenen, Faull, 2004). Не симметричность распространения дендритов связана с преимущественным их медиолатеральным направлением, которое является преобладающим над ростокаудальным.

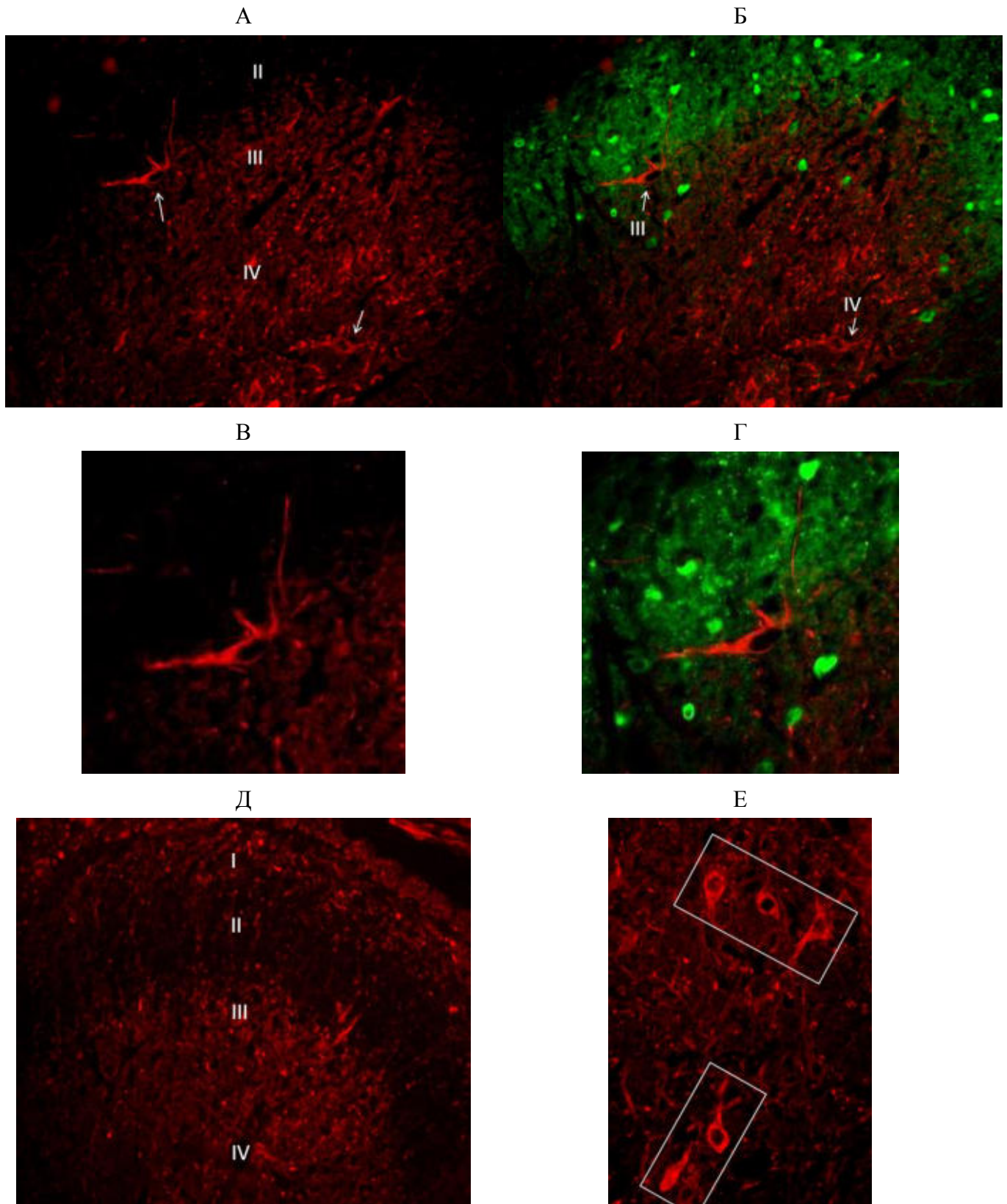


Рисунок 4.6. Нейроны с белком нейрофиламентов 200 кДа в спинном мозге в 90-дневном возрасте крысы. Об. 20, ок.10.

В: фрагмент рисунка А. Г: фрагмент рисунка Б.

Римскими цифрами обозначены пластинки. Стрелками указаны нейроны.

Нейроны красного цвета с белком нейрофиламентов.

Нейроны зеленого цвета с кальбиндином 28 кДа.

Медиолатеральная направленность отростков действительно наблюдается у данных нейронов, что ясно видно на *Рисунке 4.6. (А, Б)*, а также прослеживается направленность отростков в пластинку II (*Рис. 4.6. А-Г*). Доминирующее боковое направление дендритов антенноподобных нейронов предусматривает ввод от кортикоспинального тракта (Schoenen, Faull, 2004), оказывая нисходящий контроль и участие в сенсорных механизмах глубокой области дорсального рога спинного мозга. Считается, что нейроны антенноподобного типа с клеточными телами, расположенными в пластинке III, и большими дендритными арборизациями, простирающимися от пластинки I до пластинки IV, обеспечивают интеграцию широкого спектра входных сигналов как от внутриспинальных, так и от первичных афферентных Аβ-, Аδ-, С-волокон (Fernandes et al., 2018). При этом, аксоны крупных антенноподобных клеток пластинки III имеют интенсивное разветвление в пластинках III-IV и в половине случаев дают коллатерали, направленные дорсально в пластинку I, которые определяются при селективной активации С-волокон.

Но, ряд авторов разделяет интернейроны в пластинках III и IV на основании меньшего размера клеток в пластинке III (Ralston, 1982; Schoenen, Faull, 2004). Учитывая тот факт, что в пределах обеих пластинок локализуются сходные интернейроны очень крупных размеров, с аналогичной дендроархитектоникой, возможно и общей функцией, мы объединили интернейроны пластинок III и IV в одну популяцию иммунореактивных клеток, которая относится к антенноподобным интернейронам.

Как правило, антенноподобные нейроны являются плохо отличимыми от звездчатых нейронов (stellate neurons) пластинки II. В данном исследовании трудностей с топографической принадлежностью иммунореактивных интернейронов к пластинкам серого вещества не возникает, так как критерием дифференцирования пластинок II и III послужило их непосредственное мечение белком нейрофиламентов 200 кДа, которое выявило иммунонегативность поверхностной области дорсального рога спинного мозга.

В пластинке IV, кроме антенноподобных нейронов, выявляются также овальной, веретеновидной и многоугольной форм, расположенные дорсовентрально с распространением отростков дорсально в пластинку III и вентрально в пластинку V.

В области всего медиального края дорсального рога спинного мозга (пластинка IV) на каждом срезе выявляются интернейроны, содержащие белок нейрофиламентов, овальной и веретеновидной формы с очень длинными флюоресцентными мечеными отростками, ветвящимися преимущественно в дорсовентральном направлении. Длина этих отростков достигает 500 мкм (Рис. 4.5. Г; Рис. 4.7. А, Б). Клеточные тела иммунореактивных интернейронов ориентированы параллельно дорсовентральной оси. Ориентация тел и отростков интернейронов этой области подобна структуре популяции иммунореактивных интернейронов пластинки V (Рис. 4.5. Б; Рис. 4.6. Е), где в отличие от пластинок III и IV, интернейроны имеют только дорсовентральную ориентацию клеточных тел. Но, есть и отличия в форме тел – в пластинке V она овальная, треугольная и многоугольная, а в области медиального края дорсального рога (пластинка IV) – преимущественно веретеновидная. Особенностью иммунореактивных интернейронов области медиального края является распространенность отростков в дорсальную серую спайку с переходом на противоположную половину в дорсальный рог спинного мозга (Рис. 4.7. А, Б).

Вентральнее популяции иммунореактивных клеток области медиального края в дорсальной серой спайке также выявляются интернейроны, которые топографически соответствуют спинномозговому полю X.

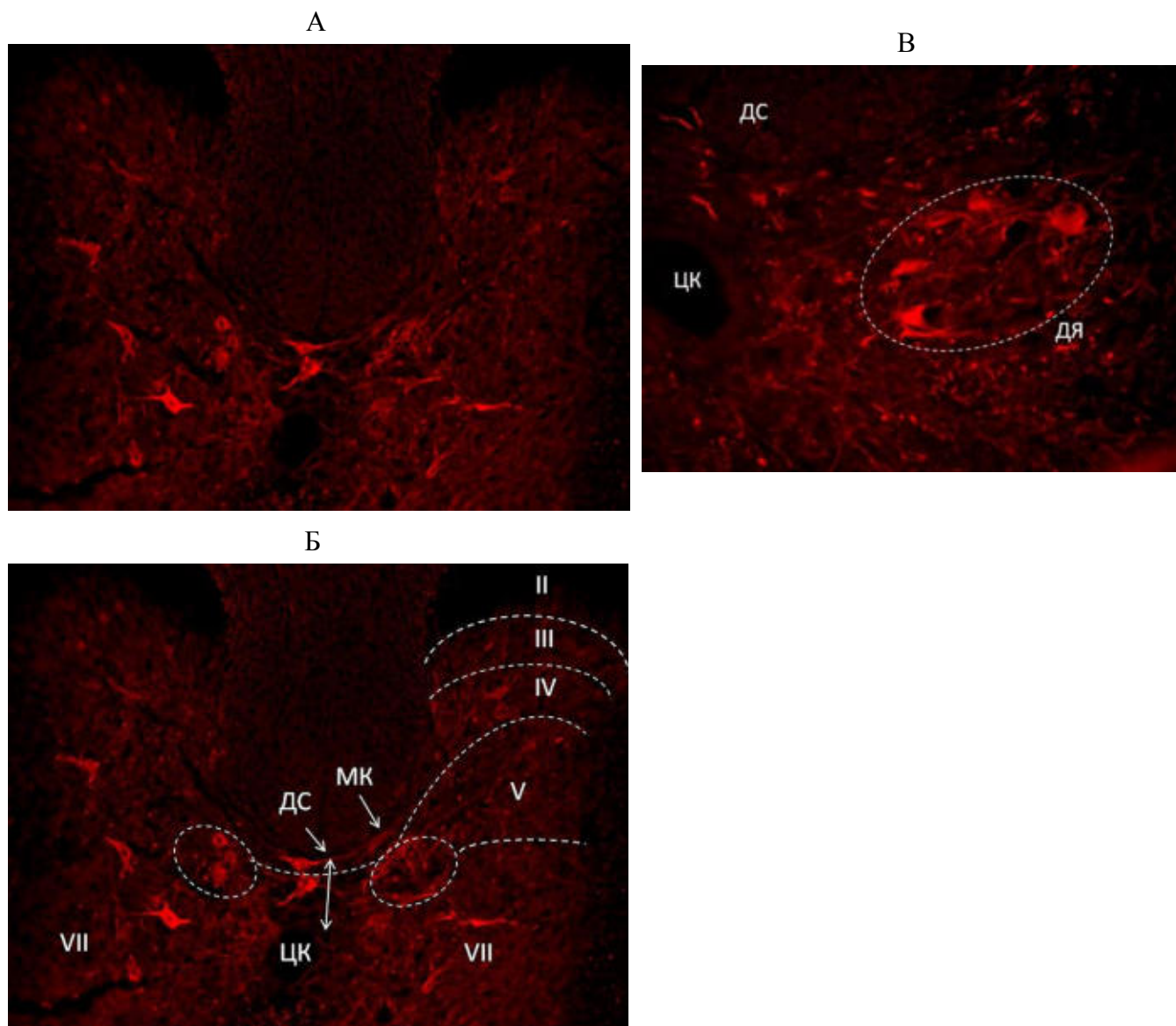


Рисунок 4.7. Топография нейронов с белком нейрофиламентов 200 кДа в спинном мозге в 90-дневном возрасте крысы.

А, Б. Об. 10, ок. 10. В. Об. 20, ок. 10. Б: топография рисунка А.

Пунктирными линиями обозначены пластинки - римскими цифрами (II, III, IV, V, VII) и дорсальное ядро (ДЯ).

ДС – дорсальная серая спайка, МК – область медиального края дорсального рога, ЦК – центральный канал.

Нейроны красного цвета с белком нейрофиламентов.

Интернейроны, содержащие белок нейрофиламентов, в дорсальной серой спайке поля X являются такими же крупными клетками, размеры которых практически не отличаются от иммунореактивных интернейронов пластинок дорсального рога спинного мозга. Они имеют многоугольную форму тела, их отростки распространяются:

- в промежуточную зону спинного мозга – в центральные части пластинки VII, где располагаются морфологически подобные нейроны, также имеющие многоугольную форму и медиолатеральную ориентацию отростков;
- в область дорсального ядра – к его иммунореактивным нейронам, которые имеют очень крупные размеры, но различную форму клеточных тел – овальную, веретеновидную, многоугольную (Рис. 4.7. – область дорсального ядра выделена овалом).

В промежуточной зоне спинного мозга выявляется два типа иммунореактивных нейронов, которые локализуются преимущественно в центральной области пластинки VII (Рис. 4.5. В; Рис. 4.7. Б). Интернейроны имеют крупные размеры и многоугольность клеточных форм, различия касаются направленности тел и ориентации их отростков. Сома интернейронов в первого типа вытянута в медиолатеральном направлении с боковым и дорсальным распространением иммунореактивных отростков, которые, однако, не выходят за пределы промежуточной зоны спинного мозга. Второй тип клеток имеет вытянутость в дорсовентральном направлении, как клеточных тел, так и отростков, которые отходят вентрально и являются более длинными (до 700 мкм), распространяясь в пластинку VIII, а дорсальные короткие отростки ветвятся локально.

В вентральном роге в пластинке VIII иммунореактивные интернейроны выявляются преимущественно в центральной её части, тоже имеют крупные размеры, с очень длинными флюоресцентными мечеными отростками, ветвящимися в дорсовентральном направлении (Рис. 4.5. В; Рис. 4.8. А; клетки указаны стрелками). Длина отростка, следующего вентрально, в область верхушки вентрального рога достигает 800 мкм. Клеточные тела

иммунореактивных интернейронов ориентированы параллельно дорсовентральной оси, имеют многоугольную форму. Ориентация тел и отростков интернейронов пластинки VIII подобна структуре иммунореактивных интернейронов пластинки V, части интернейронов пластинок IV и VII.

В вентральном роге нейроны с белком нейрофиламентов 200 кДа располагаются в виде групп в медиальной и латеральной области вентральной трети рога, что соответствует локализации мотонейронов в пластинке IX (Рис. 4.8. А, Б).

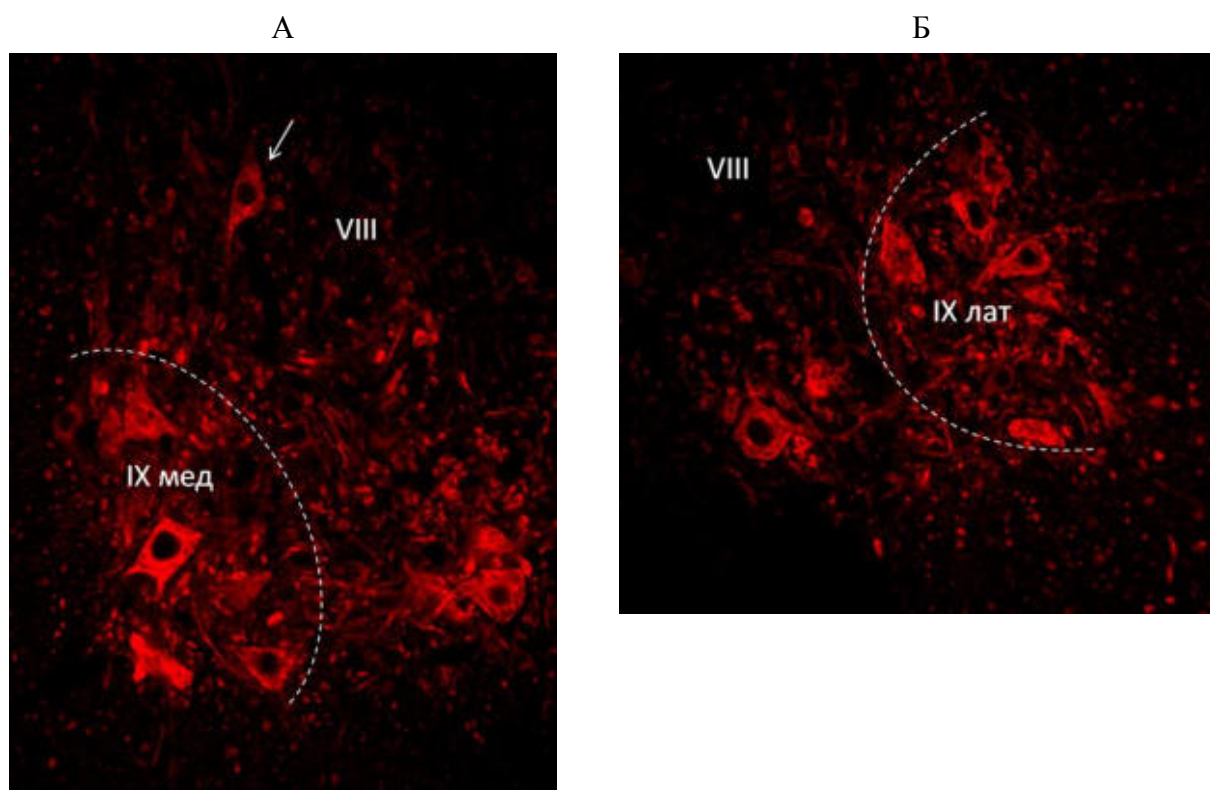


Рисунок 4.8. Нейроны с белком нейрофиламентов 200 кДа в вентральном роге спинного мозга в 90- дневном возрасте крысы. А, Б. Об. 20, ок.10.

Пунктирными линиями обозначены группы мотонейронов пластинки IX: мед – медиальная; лат – латеральная.

В пластинке VIII стрелкой обозначен иммунореактивный интернейрон.

Нейроны красного цвета с белком нейрофиламентов.

При сопоставлении срезов иммунореактивных к белку нейрофиламентов с флюоресцентным Нисслем, а также при количественном подсчете клеток в области пластинки IX, мы обнаружили несоответствие: в части мелких нейронов пластинки IX отсутствует иммунореактивность к белку нейрофиламентов. Возможно, не все мотонейроны являются содержащими белок нейрофиламентов, или этот белок отсутствует только в интернейронах, локализованных непосредственно в пластинке IX. С этой целью, мы провели иммуногистохимическое выявление на одном срезе ХАТ и белка нейрофиламентов 200 кДа. Ранее нами была показана на срезе ХАТ-иммунореактивность всех мотонейронов пластинки IX во втором сегменте спинного мозга у взрослой крысы.

Полученные результаты свидетельствуют, что иммунореактивностью к белку нейрофиламентов обладают не все мотонейроны – часть мелких нейронов являются содержащими ХАТ, но иммунонегативными к белку нейрофиламентов (Рис. 4.9. А, Б – мелкие ХАТ-иммунореактивные нейроны указаны стрелками). Мелкие нейроны, проявляющие иммунореактивность к ХАТ имеют размеры до 100 мкм^2 , что не исключает их принадлежности и к интернейронам. Таким образом, в пластинке IX присутствуют:

- популяция мотонейронов, содержащая ХАТ и белок нейрофиламентов;
- популяция мелких нейронов, содержащая ХАТ и иммунонегативная к белку нейрофиламентов.

Количественный анализ и размерные характеристики популяций нейронов, содержащих белок нейрофиламентов 200 кДа представлены в *Таблице 4.2*.

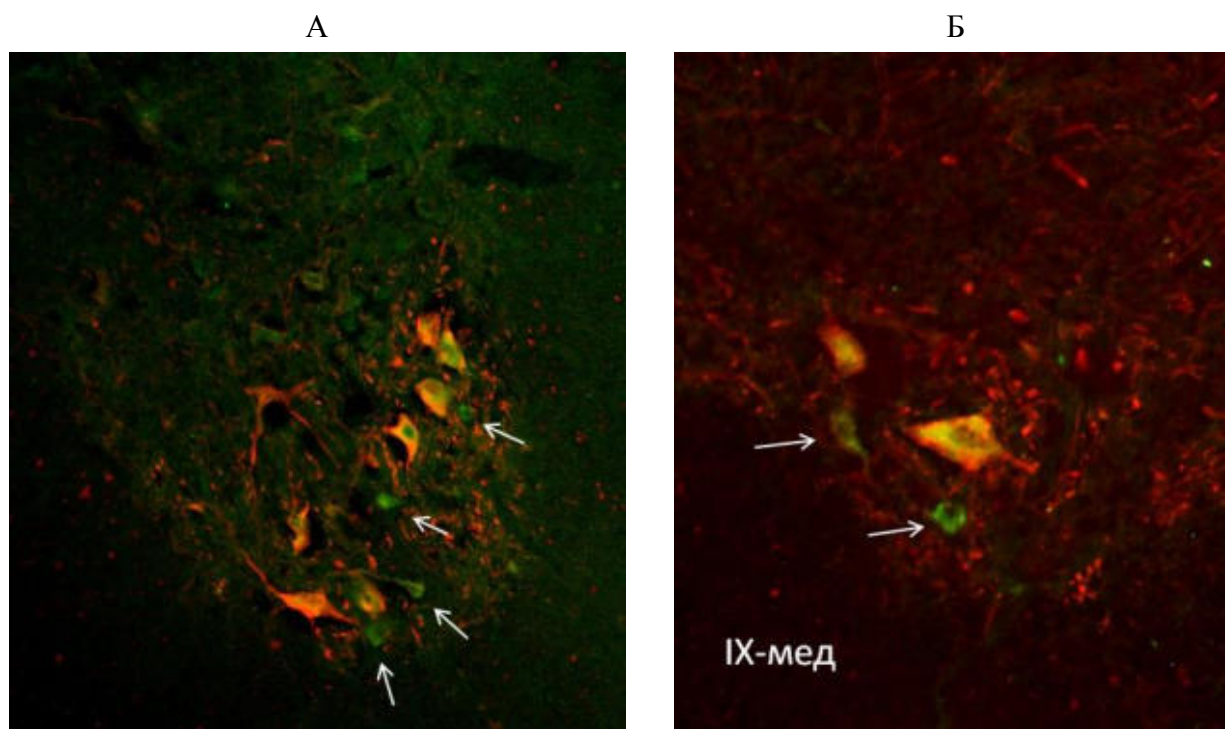


Рисунок 4.9. Нейроны с белком нейрофиламентов 200 кДа и холинацетилтрансферазой в пластинке IX спинного мозга в 90-дневном возрасте крысы.

А. Об. 10, ок.10. Б. Об. 20, ок.10. IX-мед – вентромедиальная группа мотонейронов.

Нейроны желто-красного цвета с белком нейрофиламентов и холинацетилтрансферазой.

Нейроны зеленого цвета с холинацетилтрансферазой (ХАТ).

Подсчет интернейронов показал, что максимальную иммунореактивность к белку нейрофиламентов проявляют мотонейроны пластинки IX, где белок нейрофиламентов экспрессируют до 80% клеток. Треть нейронов дорсального ядра содержат белок нейрофиламентов. Абсолютное количество выявляемых интернейронов в пластинке V не отличается от области дорсального ядра, но плотность их распределения низкая из-за большей площади пластинки V, что отличает её количественные характеристики от аналогичных у дорсального ядра. Меньше выявляется клеток в пластинке VII промежуточной зоны и в пластинке VIII вентрального рога, абсолютное количество которых является идентичным.

Абсолютное (АК), относительное количество (ОК) и площадь (S) нейронов с белком нейрофиламентов 200 кДа во втором грудном сегменте спинного мозга в 90-дневном возрасте белой крысы ($X \pm S_x$)

Области серого вещества	АК	ОК, %	S, мкм ²
Дорсальный рог			
Пластинка III	1,3±0,1	1,6±0,7	392,5±10,3
Пластинка IV	1,8±0,1	2,3±0,9	390,0±9,9
Медиальный край дорсального рога	1,6±0,1	2,0±0,7	321,4±14,3
Пластинка V	4,2±0,1	4,7±2,1	411,0±9,1
Дорсальное ядро	4,5±0,1	30,8±4,1	284,3±9,6
Промежуточная зона			
Пластинка VII	2,7±0,1	2,8±0,7	410,3±10,9
Вентральный рог			
Пластинка VIII	2,9±0,1	6,2±1,4	454,6±11,5
Пластинка IX-мед	6,3±0,3	70,0±2,1	662,7±13,1
Пластинка IX-лат	8,1±0,2	81,0±2,2	623,3±13,9
Центральные структуры			
Поле X: дорсальная серая спайка	0,9±0,1	2,1±0,4	352,8±22,1

Незначительное количество иммунореактивных интернейронов определяется в пластинках III и IV, в поле X. Средняя площадь клеток, содержащих белок нейрофиламентов составляет 284,3-662,7 мкм². При этом самыми крупными являются мотонейроны пластинки IX, а самыми мелкими – нейроны дорсального ядра. Большая часть клеточных популяций имеет средние размеры от 300 до 400 мкм² – клетки пластинок III, IV, V, VII, VIII, поля X.

4.2.1.4. Распределение кальбиндина 28 кДа в сером веществе спинного мозга

На поперечном срезе спинного мозга выявляются нейроны, содержащие кальбиндин 28 кДа во всех пластинках, включая поле X (Рис. 4.10. А, Рис. 4.12. А, Рис. 4.13. А). Интенсивность свечения иммунореактивных интернейронов не меняется в пределах пластинок серого вещества. В пластинках I и II дорсального рога на каждом срезе располагаются интернейроны с кальбиндином, которые имеют преимущественно овальную форму, свечение в них характерно только для клеточных тел (Рис. 4.10. В, Г – клетки указаны стрелками), немногочисленными являются нейроны веретеновидной формы тела. При этом, нейроны пластинки I являются относительно больше по размерам в сравнении с иммунореактивными интернейронами пластинки II (Рис. 4.10. Г – нейроны пластинки I указаны стрелками). В пластинках III и IV на каждом срезе выявляются овальные и веретеновидные иммунореактивные интернейроны, флюоресценция в которых обнаруживается не только в клеточных телах, но и в отростках клеток. Тела клеток располагаются вдоль дорсовентральной оси, их отростки протяженностью до 20 мкм распространяются в дорсальном и вентральном направлениях (Рис. 4.10. Б – интернейроны зеленого и желто-зеленого цвета). В пластинке V выявляется от 1 до 4 иммунореактивных интернейронов преимущественно веретеновидной формы, расположенных параллельно дорсовентральной оси, флюоресцирующие отростки которых длиной до 10 мкм распространяются в дорсальном направлении, а длиной до 20 мкм – в вентромедиальном и вентральном направлении. В области медиального края дорсального рога спинного мозга выявляется от 1 до 4 иммунореактивных интернейронов овальной и веретеновидной формы с более длинными флюоресцирующими отростками – до 35 мкм, ориентированными в дорсовентральном направлении, распространяясь в область дорсальной серой спайки (Рис. 4.11, Рис. 4.12. А).

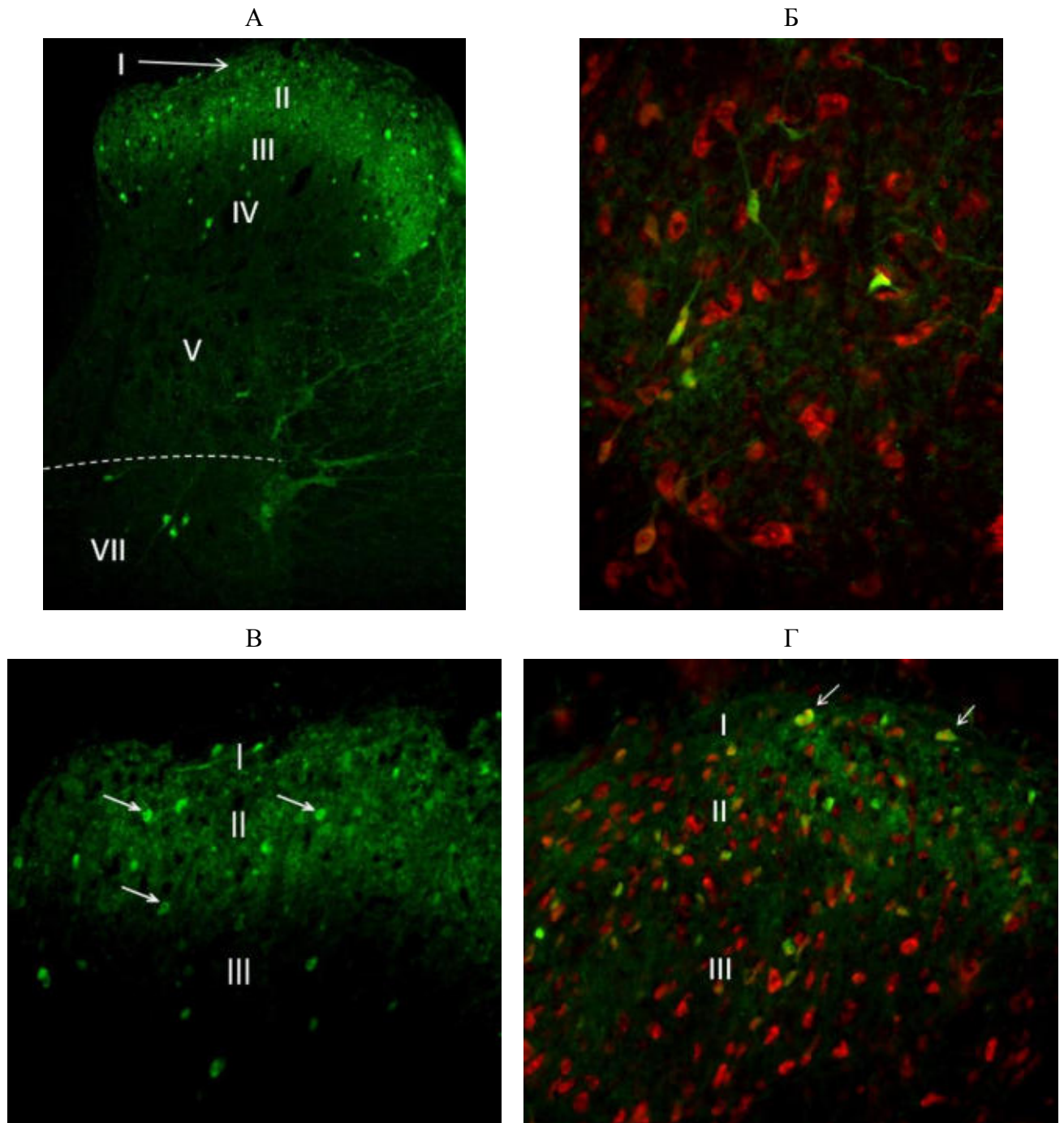


Рисунок 4.10. Кальбиндин-иммунореактивные интернейроны дорсального рога спинного мозга в 90 дневном возрасте крысы.

Римскими цифрами обозначены пластинки, стрелками указаны интернейроны.

А. Об. 10, ок.10. Б. Об. 40, ок. 10. В, Г. Об. 20, ок.10.

А, В: Интернейроны зеленого цвета с кальбиндином.

Б, Г: Интернейроны зеленого и желто-зеленого цвета с кальбиндином, красного цвета – окраска флюоресцентным Нисслем.

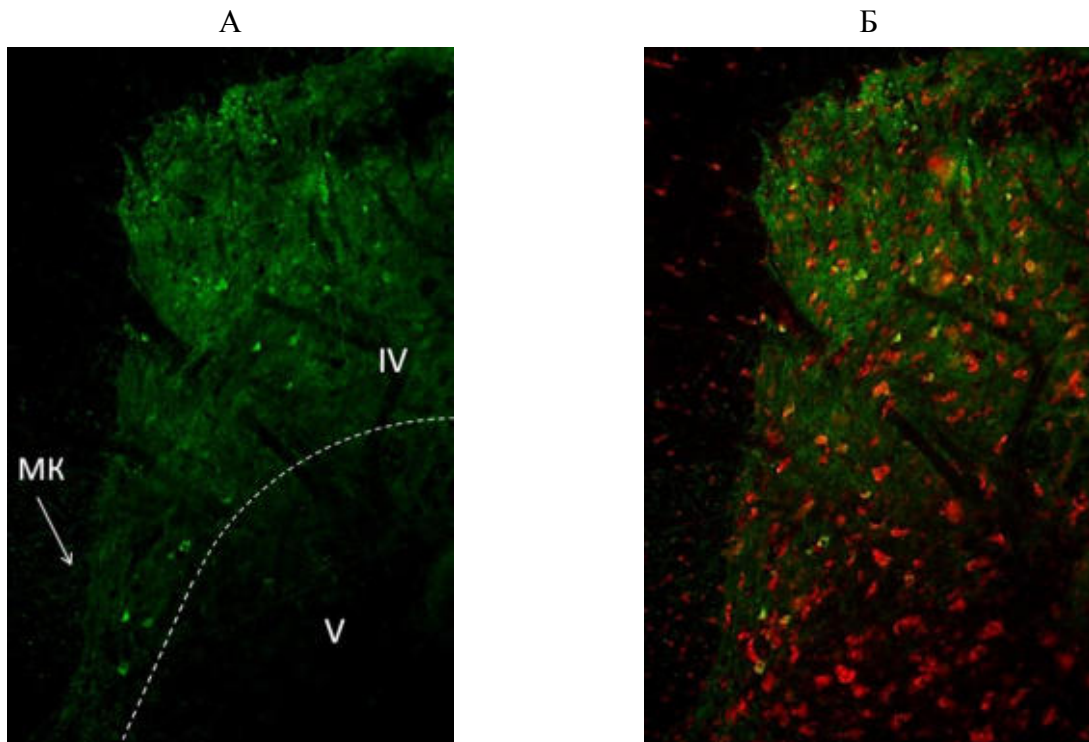


Рисунок 4.11. Кальбиндин-иммунореактивные интернейроны в области медиального края дорсального рога спинного мозга в 90 дневном возрасте крысы. Об. 10, ок.10.

Римскими цифрами обозначены пластинки.

МК – область медиального края дорсального рога.

А: Интернейроны зеленого цвета с кальбиндином.

Б: Интернейроны зеленого и желто-зеленого цвета с кальбиндином, красного цвета – окраска флюоресцентным Нисслем.

В промежуточной зоне спинного мозга, а именно в пластинке VII, выявляются три популяции иммунореактивных к кальбиндину интернейронов, одна из которых представлена клетками, расположенными в дорсальной части пластинки VII – в виде "цепочки" интернейронов, направляющихся от дорсальной серой спайки до латерального края серого вещества пластинки VII дорсальнее области расположения промежуточно-латерального ядра (Рис. 4.12. А – клетки указаны стрелками). Иммунореактивные нейроны данной популяции располагаются параллельно медиолатеральной оси, имеют преимущественно веретеновидную форму тел, но также выявляются и интернейроны овальной формы, тела которых также вытянуты медиолатерально.

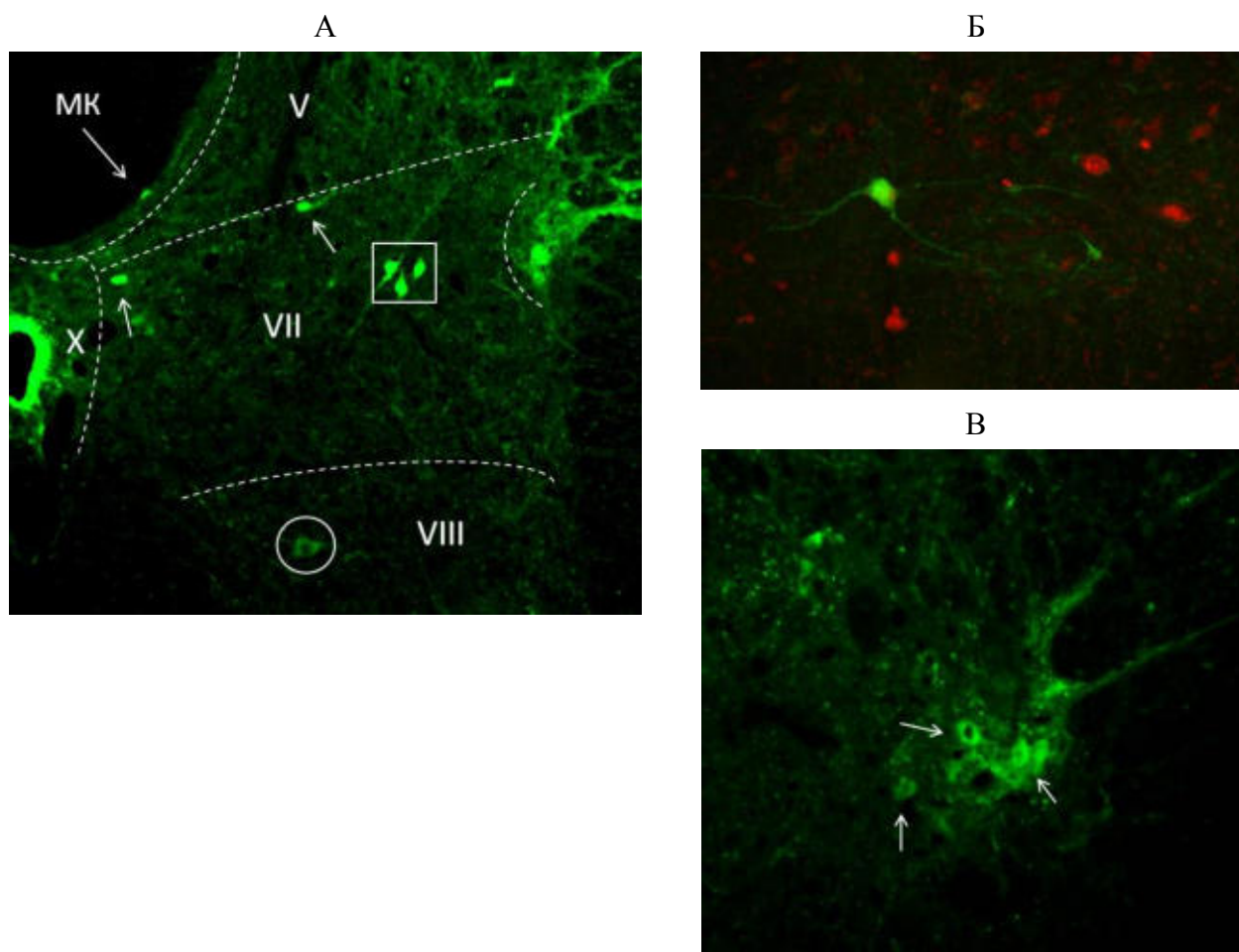


Рисунок 4.12. Интернейроны с кальбиндином в промежуточной зоне и вентральном роге спинного мозга в 90 дневном возрасте крысы.

Римскими цифрами обозначены пластинки.

А: Об. 10, ок.10. Б, В: Об. 20, ок. 10.

Интернейроны зеленого цвета с кальбиндином, красного цвета – окраска флюоресцентным Нисслем.

Пояснения в тексте.

От клеточных тел этой популяции интернейронов отходят 2-3 отростка, которые распространяются также в медиолатеральном направлении, переплетаясь с отростками соседних клеток, формирующих популяцию. На поперечных срезах спинного мозга популяцию образуют от 2 до 5 интернейронов.

Вторая популяция иммунореактивных клеток, выявляемая в промежуточной зоне, также топографически соответствует пластинке VII. Эти иммунореактивные интернейроны располагаются диффузно, как одиночно, так и образуют в центральных областях пластинки нейрональные группы из 2-3 клеток (Рис. 4.12. А – группа клеток выделена квадратом). Иммунореактивные интернейроны этой

популяции имеют овальную и веретеновидную форму, от тел клеток отходят 2-3 отростка, ориентированных дорсовентрально с максимальной протяженностью до 120 мкм в дорсальном направлении с распространением в пластинку V дорсального рога. В медиальной области пластинки VII, примыкающей к пластинке X, выявляются исключительно одиночные клетки, которые находятся на расстоянии до 130 мкм от центрального канала (Рис. 4.12. Б). Данные иммунореактивные интернейроны имеют овальную, но чаще многоугольную форму клеточных тел, от которых отходят 3-4 радиальных отростка, распространяющиеся как медиолатерально, так и вентрально – с максимальной протяженностью до 140 мкм к пластинке VIII вентрального рога. Имеется характерная структурная особенность этих иммунореактивных интернейронов, которая заключается в асимметрии ветвления отростков, где обширность ветвления наблюдается от вентральной поверхности перикариона при отсутствии арборизаций от дорсальной его области.

Третья популяция иммунореактивных интернейронов располагается в области локализации промежуточно-латерального ядра в латеральном роге спинного мозга (Рис. 4.12. А – область ядра отделена пунктирным полукругом, Г – клетки указаны стрелками). Клетки данной популяции имеют овальную и многоугольную форму тела, отростки являются очень короткими и не выходят за пределы области ядра. На каждом срезе выявляется от 3 до 5 иммунореактивных клеток. Топографическая выявляемость этой популяции не вызывает сомнений в принадлежности их к симпатическим преганглионарным нейронам. Более того, присутствуют единичные нейроны треугольной и овальной формы тел, локализованные и в области вставочного ядра. Отличием данных нейронов является наличие коротких отростков и меньшие размеры по сравнению с иммунореактивными интернейронами центральной и медиальной областей пластинки VII. А отличием от популяции разделительных нейронов являются большие размеры и отсутствие веретеновидных форм нейронов в проекции вставочного ядра.

В вентральном роге также определяются две популяции иммунореактивных к кальбиндину интернейронов, одна из которых образована мелкими клетками, располагается на вершущке вентрального рога, что топографически соответствует пластинке VIII и IX (Рис. 4.13. А, В). Характерной особенностью топографии данных интернейронов является их расположение и в зоне локализации мотонейронов пластинки IX (Рис. 4.13. В). Калибиндин-иммунореактивные нейроны этой популяции выявляются в количестве от 1 до 3 клеток на срезе, имеют овальную или треугольную формы, от тел клеток отходят 3-4 тонких отростка, ветви которых протяженностью до 70 мкм прослеживаются или в пластинке VIII – в области вершущки вентрального рога, или в пластинке IX – при непосредственной их локализации в области групп мотонейронов.

Учитывая малые размеры этой популяции кальбиндин-иммунореактивных нейронов, отросчатость и мультиполярность, а также место их локализации как в области пластинки IX, так и в вентральной области пластинки VIII, мы решили определить их принадлежность: являются ли они мелкими мотонейронами пластинки IX, или популяцией интернейронов, локализованных в пластинке IX.

Ранее, нами была определена ХАТ-иммунопозитивность и иммунонегативность к белку нейрофиламентов 200 кДа в мелких нейронах пластинки IX вентрального рога спинного мозга (Рис. 4.9.). Мы провели иммуногистохимическое выявление на одном срезе ХАТ и белка кальбиндина 28 кДа.

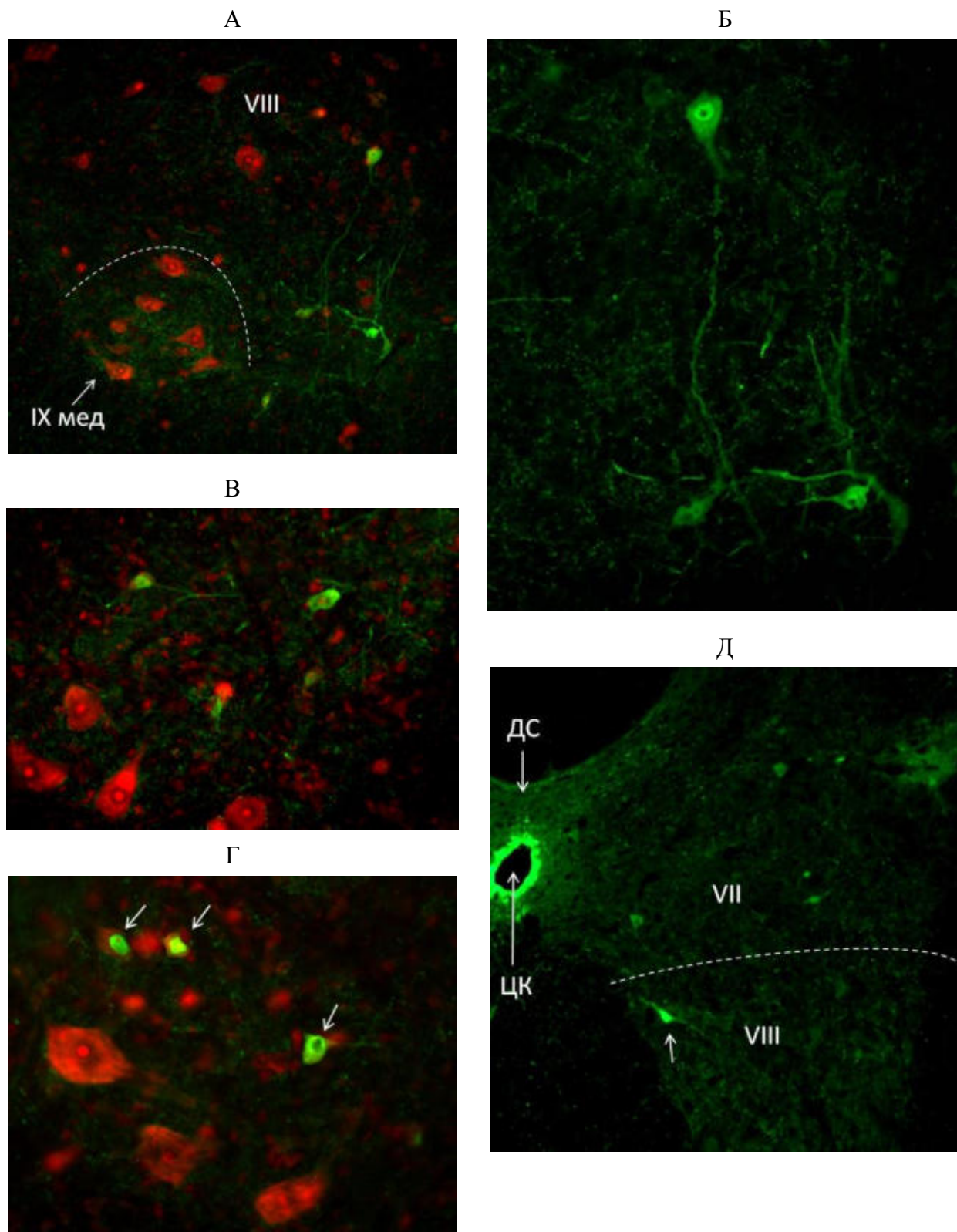


Рисунок 4.13. Интернейроны с кальбиндином в вентральном роге спинного мозга в 90 дневном возрасте крысы.

Римскими цифрами обозначены пластинки.

А, Д: Об. 10, ок.10. Б, Г: Об. 40, ок. 10. В: Об. 20, ок.10.

Интернейроны зеленого цвета с кальбиндином, красного цвета – окраска флюоресцентным Нисслем.

Пояснения в тексте.

Результаты свидетельствуют, что иммунореактивность к кальбиндину (Рис. 4.14. В – интернейроны с кальбиндином указаны стрелками) этой популяции мелких интернейронов не подтверждается содержанием в них ХАТ (Рис. 4.14. Б – мотонейроны с ХАТ указаны стрелками). *Рисунок 4.14.* (А) является совмещением аналогичных структур, выявленных при определении ХАТ (Б) и кальбиндина (В). Следовательно, в пластинке IX присутствуют различные клеточные популяции: мотонейроны с белком нейрофиламентов и ХАТ; мелкие мотонейроны с ХАТ; интернейроны с кальбиндином.

Таким образом, локализация и мелкие размеры клеток, распространение отростков, служат основанием (Alvarez, Fyffe, 2007) для отнесения их к той популяции интернейронов вентрального рога, которые именуется клетками Реншоу и обеспечивают ипсилатеральное моносинаптическое торможение мотонейронов (Goulding, 2009; Alvarez et al., 2013). Клетки Реншоу представляют особую группу интернейронов, расположенных в вентральном роге спинного мозга (Экклс, 1959; Kim et al., 2008), содержат кальций-связывающий белок кальбиндин (Anelli, Heckman, 2005), который является их «потенциальным» маркером (Alvarez et al., 2005). Кальбиндин выполняет роль буфера для связывания избытка катионов кальция (Schwaller, 2012), образующегося при усилении тормозного влияния клеток на мотонейроны (Goetz et al., 2015). В части мелких интернейронов выявляется или иммунопозитивность ядра, или более интенсивная его окраска по сравнению с нейроплазмой (Рис. 4.13. Г – клетки указаны стрелками).

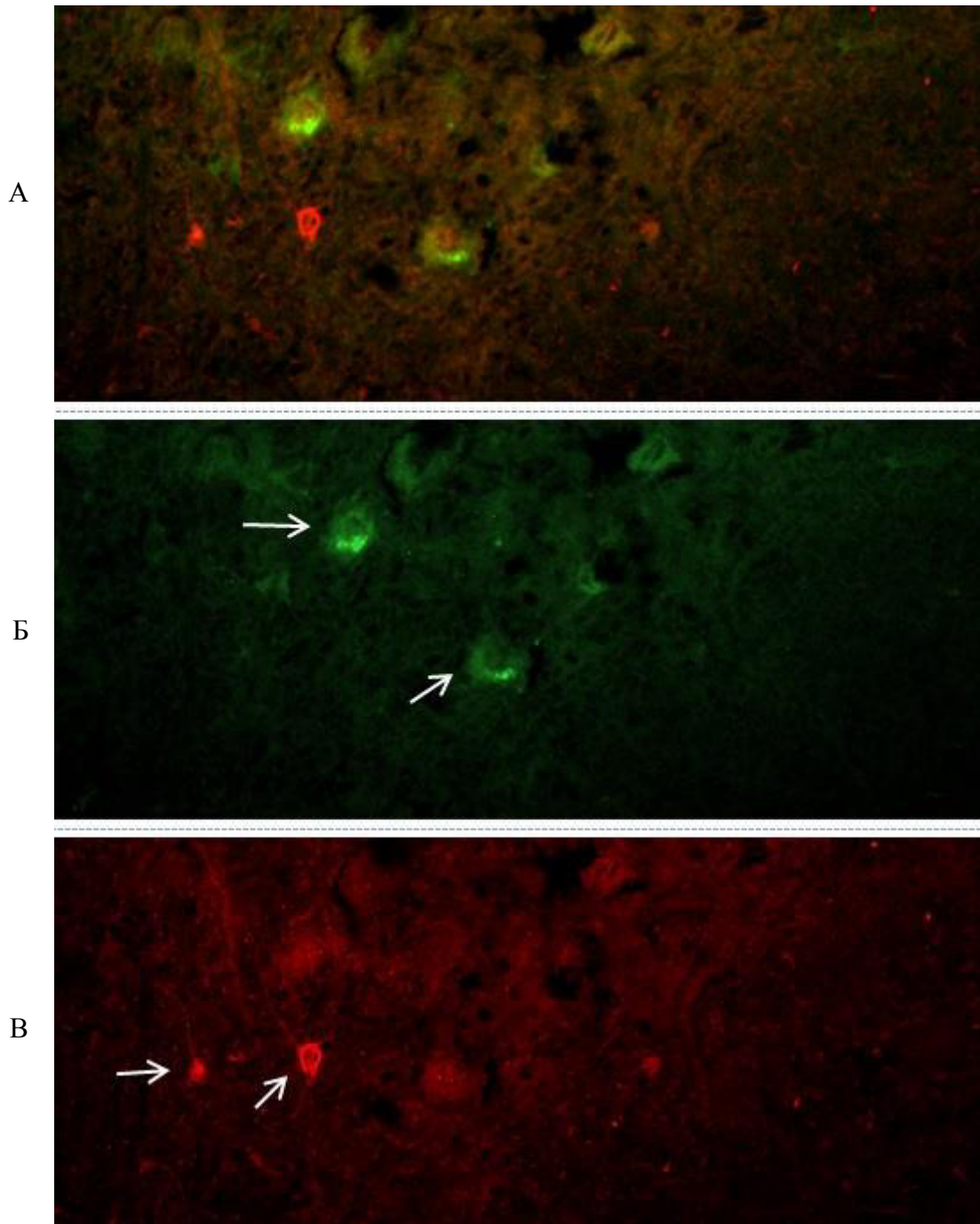


Рисунок 4.14. Нейроны с белком кальбиндином и холинацетилтрансферазой в пластинке IX спинного мозга в 90 дневном возрасте крысы. Об. 20, ок. 10. Интернейроны красного цвета с кальбиндином 28 кДа. Мотонейроны зеленого цвета с холинацетилтрансферазой (ХАТ).

Вторая популяция иммунореактивных клеток вентрального рога обнаруживается в пластинке VIII, в её медиальной (Рис. 4.12. А – клетка обозначена кругом; Рис. 4.13. Д – клетка указана стрелкой) и центральной областях (Рис. 4.13. А, Б – крупный интернейрон). Выявляемые кальбиндин-иммунореактивные интернейроны имеют многоугольную форму тела, от которого отходят 3-4 отростка, представлены одиночными клетками. В медиальной области пластинки VIII иммунореактивные интернейроны имеют относительно короткие отростки по сравнению с интернейронами центральной области. Клеточные тела располагаются преимущественно медиолатерально (поперек вентрального рога), а их отростки распространяются дорсально с направлением к вентральной серой спайке и вентрально в центральную область самой пластинки VIII. В центральной области иммунореактивные интернейроны имеют очень длинные отростки, отходящие от вентральной поверхности перикариона и непосредственно направляющиеся как к вершине вентрального рога, так и в область пластинки IX, большей частью к мелким кальбиндин-иммунореактивным интернейронам (Рис. 4.13. Б). Число иммунореактивных интернейронов данной популяции является минимальным – выявляются единичные клетки. Средняя площадь сечения выявляемых иммунореактивных интернейронов превышает 300 мкм^2 , что больше размеров иммунонегативных мотонейронов. По топографии, отличающейся от локализации мотонейронов в пластинке IX, размерам, характеристике отростков, крупные единичные кальбиндин-иммунореактивные нейроны пластинки VIII следует отнести интернейронам, тем более, что мотонейроны не проявляют иммунореактивность к кальбиндину у взрослых животных (Anelli, Neckman, 2006). Это совпадает с рядом исследований, относящих подобные нейроны к крупным мультиполярным интернейронам, выполняющим премоторную функцию (Puskár, Antal, 1997).

В поле X выявляются кальбиндин-иммунореактивные нейроны, во всех его частях. В области вентральной серой спайки и в центральных частях форма тел интернейронов овальная и многоугольная. В области дорсальной серой спайки располагаются интернейроны преимущественно овальной формы, что отличает их

от веретеновидных иммунореактивных интернейронов пластинки IV дорсального рога (область медиального края), которая заходит в дорсальную серую спайку. Интернейроны в дорсальной серой спайке поля X локализуются вентральнее и имеют короткие отростки в отличие от более длинных отростков у иммунореактивных интернейронов пластинки IV.

Количественный анализ и размерные характеристики популяций нейронов, содержащих кальбиндин 28 кДа представлены в *Таблице 4.3*.

Подсчет кальбиндин-иммунореактивных интернейронов показал, что во втором грудном сегменте спинного мозга максимальное количество клеток выявляется в дорсальном роге – в пластинке II, минимальное количество в вентральном роге – в пластинке VIII и в центральных структурах – поле X. Пятая часть клеток симпатических ядер содержит кальбиндин. Средняя площадь кальбиндин содержащих клеток составляет 46,2-355,4 мкм². При этом самыми крупными являются интернейроны пластинки VIII, а самыми мелкими – интернейроны пластинки II. Промежуточные размеры имеют клетки пластинки V дорсального рога, но самые большие размеры среди иммунореактивных клеток всех областей. Большая часть клеточных популяций имеет размеры до 100 мкм² – клетки пластинок III и IV, промежуточной зоны (пластинка VII), поля X и клетки Реншоу. Таким образом, в сером веществе спинного мозга кальбиндин-иммунореактивные интернейроны располагаются во всех его пластинках, но более плотно в пластинке II, что согласуется с данными других исследований (Antal et al., 1990; Kim et al., 2002).

Абсолютное (АК), относительное количество (ОК) и площадь (S) интернейронов с кальбиндином во втором грудном сегменте спинного мозга в 90-дневном возрасте белой крысы ($X \pm Sx$)

Области серого вещества	АК	ОК, %	S, мкм ²
Дорсальный рог			
Пластинка I	7,2±0,2	32,7±3,4	54,8±2,5
Пластинка II	23,3±1,1	22,4±2,9	46,2±1,0
Пластинка III	4,1±0,5	5,1±2,2	73,8±8,1
Пластинка IV	4,5±0,4	5,6±1,9	76,7±7,9
Область медиального края	1,0±0,3	1,3±0,8	71,4±2,5
Пластинка V	0,7±0,2	0,9±0,3	146,6±10,2
Промежуточная зона			
Медиальная и центральная часть пластинки VII	1,3±0,1	1,4±0,6	102,2±4,1
Дорсальная часть пластинки VII (разделительные интернейроны)	4,1±0,7	4,3±2,1	91,4±3,5
Симпатические преганглионарные нейроны	4,3±0,7	21,5±4,7	97,6±6,3
Вентральный рог			
Пластинка VIII	0,4±0,1	0,8±0,2	355,4±24,4
Вентральная часть пластинки VIII и пластинка IX (клетки Реншоу)	0,8±0,1	4,2±2,3	73,8±6,7
Центральные структуры			
Поле X	0,4±0,1	0,3±0,1	89,5±2,8

4.2.1.5. Распределение нейрональной NO-синтазы в сером веществе спинного мозга

На поперечном срезе спинного мозга выявляются нейроны, содержащие nNOS в пластинках дорсального рога, в промежуточной зоне и в поле X. Иммунореактивные к nNOS нервные клетки отсутствуют в пластинках вентрального рога спинного мозга. Интенсивность свечения иммунореактивных интернейронов не меняется в пределах пластинок серого вещества.

В пластинках I и II дорсального рога на каждом срезе располагаются интернейроны, которые имеют преимущественно овальную форму, свечение в них характерно только для клеточных тел (Рис. 4.15, А), нейроны веретеновидной формы тела присутствуют в виде одиночных клеток. При этом, нейроны пластинки I являются относительно больше по размерам в сравнении с иммунореактивными интернейронами пластинки II. В нейронах поверхностной области дорсального рога позитивностью обладает только нейроплазма, нервные отростки не определяются, ядра клеток всегда иммунонегативны.

В пластинках III и IV на каждом срезе выявляются также преимущественно нейроны овальной формы тела, веретеновидные формы являются единичными, но флюоресценция обнаруживается не только в клеточных телах, но и в отростках клеток. Тела клеток располагаются вдоль дорсовентральной оси, их отростки протяженностью до 20 мкм распространяются в дорсальном и вентральном направлениях. В пластинке V выявляется от 1 до 4 иммунореактивных интернейронов овальной и треугольной формы, клеточные тела которых вытянуты также в дорсовентральном направлении с более длинными отростками, направленными дорсально – до 40 мкм. Отростки иммунореактивных нейронов глубокой области дорсального рога не покидают границы пластинок, в которых выявляются.

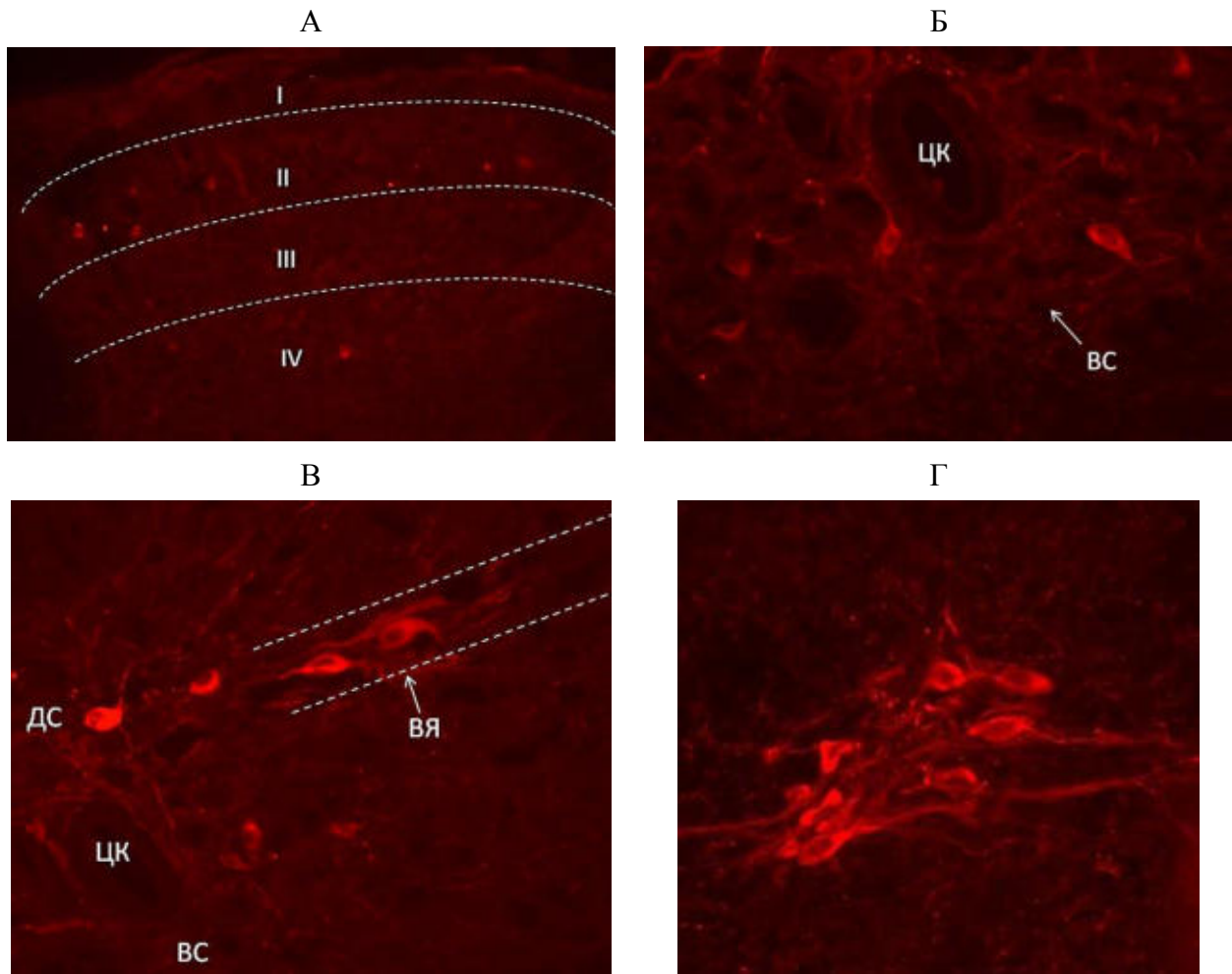


Рисунок 4.15. Структурные типы нейронов, содержащих nNOS в спинном мозге в 90-дневном возрасте крысы. А. Об. 10, ок.10. Б-Г. Об. 20, ок.10.

А. Овальные и веретеновидные интернейроны в пластинке II.

Б. Овальный интернейрон в области медиального края дорсального рога (пластинка IV).

В. Овальный интернейрон в пластинке V.

Г. Интернейроны различных форм в дорсальной серой спайке поля X.

ЦК-центральный канал.

Д. Веретеновидные интернейроны вставочного ядра (пластинка VII).

Е. Нейроны различных форм промежуточно-латерального ядра.

В промежуточной зоне спинного мозга определяются две популяции nNOS-иммунореактивных нейронов в различных топографических областях. Первая популяция иммунореактивных клеток топографически соответствует центральной части пластинки VII. Эти иммунореактивные интернейроны располагаются диффузно и одиночно, имеют овальную и веретеновидные форму, от тел клеток отходят 2-3 отростка, ориентированных медиолатерально с максимальной протяженностью в медиальном направлении к области вентральной серой спайки, но не выходят за пределы границ пластинки до 40 мкм. Отростки, отходящие от латеральной поверхности перикариона очень короткие, проследить их не возможно.

Вторая популяция иммунореактивных интернейронов располагается в области локализации промежуточно-латерального ядра латерального рога спинного мозга (Рис. 4.14. Г) и в области локализации вставочного ядра (рис. 4.14. В – область ядра выделена пунктиром, обозначена стрелкой). Клетки данной популяции имеют овальную, веретеновидную и многоугольную формы тела, отростки являются длинными и выходят за пределы области ядра, распространяются в медиолатеральном направлении: в белое вещество латерального канатика; в серое вещество центральной части пластинки VII – в область локализации нейронов вставочного ядра. На каждом срезе выявляется от 4 до 8 иммунореактивных клеток в области главного ядра. В области вставочного ядра иммунореактивные нейроны имеют аналогичную форму тела, но вытянуты в медиолатеральном направлении, отростки их более короткие. В области вставочного ядра на каждом срезе присутствует от 2 до 4 иммунореактивных нейронов, с максимальной численностью в медиальной части пластинки VII так, что обнаруживается их топографическая связь с областью дорсальной серой спайки поля X (Рис. 4.15. В). Топографическая выявляемость этой популяции не вызывает сомнений в принадлежности их к симпатическим преганглионарным нейронам.

В поле X выявляются nNOS-иммунореактивные нейроны, во всех его частях. В области вентральной серой спайки и в центральных частях форма тел интернейронов различная (Рис. 4.15. Б). Отростки нейронов, локализованных в вентральной серой спайки переходят на противоположную сторону, но не выходят из поля X. В области дорсальной серой спайки располагаются интернейроны преимущественно овальной формы (Рис. 4.15. В), что отличает их от веретеновидных иммунореактивных интернейронов пластинки IV дорсального рога (область медиального края). В целом, группового скопления иммунореактивных нейронов в области дорсальной серой спайки не отмечается. Все иммунореактивные интернейроны равномерно распределяются в сером веществе, располагаясь вокруг области центрального канала. На каждом срезе присутствует от 3 до 5 клеток.

Количественный анализ и размерные характеристики популяций нейронов, содержащих nNOS-синтазу представлены в *Таблице 4.4*.

Подсчет nNOS-иммунореактивных нейронов показал, что во втором грудном сегменте спинного мозга наибольшее количество клеток выявляется в пластинке II и в промежуточной зоне – в области локализации ядер симпатических преганглионарных нейронов. Наименьшее количество клеток выявляется в пластинке I, в области медиального края дорсального рога и в пластинке VII (до 1 клетки на срезе). В глубокой области дорсального рога и в поле X на срезе выявляется в среднем 2-3 клетки. Средняя площадь nNOS-содержащих клеток составляет 66,4-200,2 мкм². При этом самыми крупными являются симпатические преганглионарные нейроны, также наибольшие размеры имеют интернейроны пластинок VII и V. Самыми мелкими являются интернейроны поверхностной области дорсального рога, но размеры их в пластинке I превышают таковые в пластинке II. Размеры популяций нейронов пластинок III, IV и поля X значимо не различаются и не превышают 150 мкм². В целом все nNOS-иммунореактивные нейроны относятся к классу малых нейронов, площадью до 200 мкм².

Таблица 4.4.

Абсолютное (АК), относительное количество (ОК) и площадь (S) интернейронов с nNO-синтазой во втором грудном сегменте спинного мозга в 90-дневном возрасте белой крысы ($X \pm Sx$)

Области серого вещества	АК	ОК, %	S, мкм ²
Дорсальный рог			
Пластинка I	0,8±0,1	3,6±1,4	74,2±4,6
Пластинка II	6,5±0,2	7,2±3,5	66,4±1,1
Пластинка III	2,1±0,3	2,6±0,8	140,8±6,9
Пластинка IV	2,3±0,3	2,9±1,4	146,5±10,2
Область медиального края	0,9±0,2	1,2±0,7	135,7±12,6
Пластинка V	2,4±0,3	2,7±1,1	189,6±14,7
Промежуточная зона			
Центральная часть пластинки VII	1,0±0,1	1,1±0,6	192,9±6,5
Симпатические преганглионарные нейроны	7,4±0,3	37,0±5,3	200,2±4,7
Центральные структуры			
Поле X	3,5±0,4	2,9±1,4	145,8±7,6

4.2.1.6. Распределение НАДФН-диафоразы в сером веществе спинного мозга

Продукт гистохимической реакции при выявлении НАДФН-диафоразы методом Р. Лилли (1969) определяется в цитоплазме и в отростках клеток (Рис. 4.16., 4.17.). Интенсивность реакции в цитоплазме максимальна, не меняется в пределах поперечного среза серого вещества и не зависит от топографической принадлежности позитивных клеток. При этом, все клетки, содержащие НАДФН-диафорузу имеют сине-фиолетовый цвет перикариона. НАДФН-диафоруза-позитивные нейроны выявляются во всех пластинках дорсального рога (Рис. 4.16. Б, В), в промежуточной зоне (Рис. 4.16. А, Д), в поле Х (Рис. 4.16. В, Г, Д). В вентральном роге спинного мозга НАДФН-диафоруза-позитивные структуры отсутствуют (Рис. 4.16. А). Сопоставление выявленных НАДФН-диафоруза-позитивных клеток с нейронами спинного мозга, окрашенными тионином по методу Ниссля, позволяет отнести их к интернейронам. В пользу этого свидетельствуют размеры, топография, их связи друг с другом.

В пластинках I и II дорсального рога на каждом срезе выявляются интернейроны с НАДФН-диафорузой преимущественно овальной формы, веретеновидные формы являются единичными (Рис. 4.17. А – клетки указаны стрелками). Нейроны пластинки I являются относительно больше по размерам в сравнении с позитивными интернейронами пластинки II. В пластинках III, IV и V на каждом срезе выявляются также овальные и веретеновидные клетки с более длинными отростками (Рис. 4.16. В, Рис. 4.17. Б, В). Клеточные тела располагаются или дорсовентрально, или медиолатерально. В пластинке V и в области медиального края дорсального рога спинного мозга отростки НАДФН-диафоруза-содержащих интернейронов имеют максимальную длину, определяется их протяженность до 50 мкм в дорсальном направлении, При этом, отросток, отходящий вентрально всегда короче отростка, отходящего дорсально.

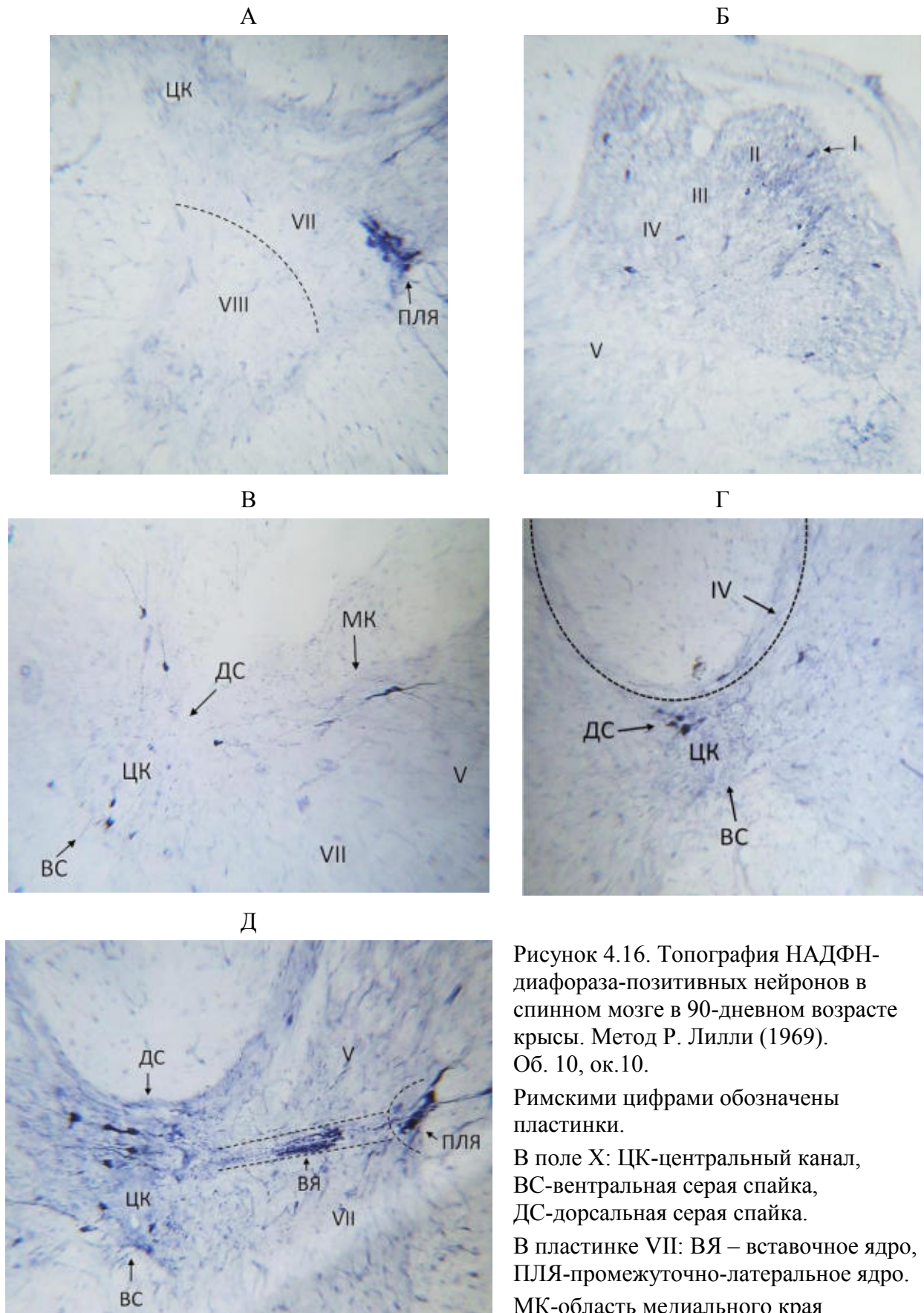


Рисунок 4.16. Топография НАДФН-диафороза-позитивных нейронов в спинном мозге в 90-дневном возрасте крысы. Метод Р. Лилли (1969). Об. 10, ок.10.

Римскими цифрами обозначены пластинки.

В поле X: ЦК-центральный канал, ВС-вентральная серая спайка, ДС-дорсальная серая спайка.

В пластинке VII: ВЯ – вставочное ядро, ПЛЯ-промежуточно-латеральное ядро. МК-область медиального края дорсального рога.

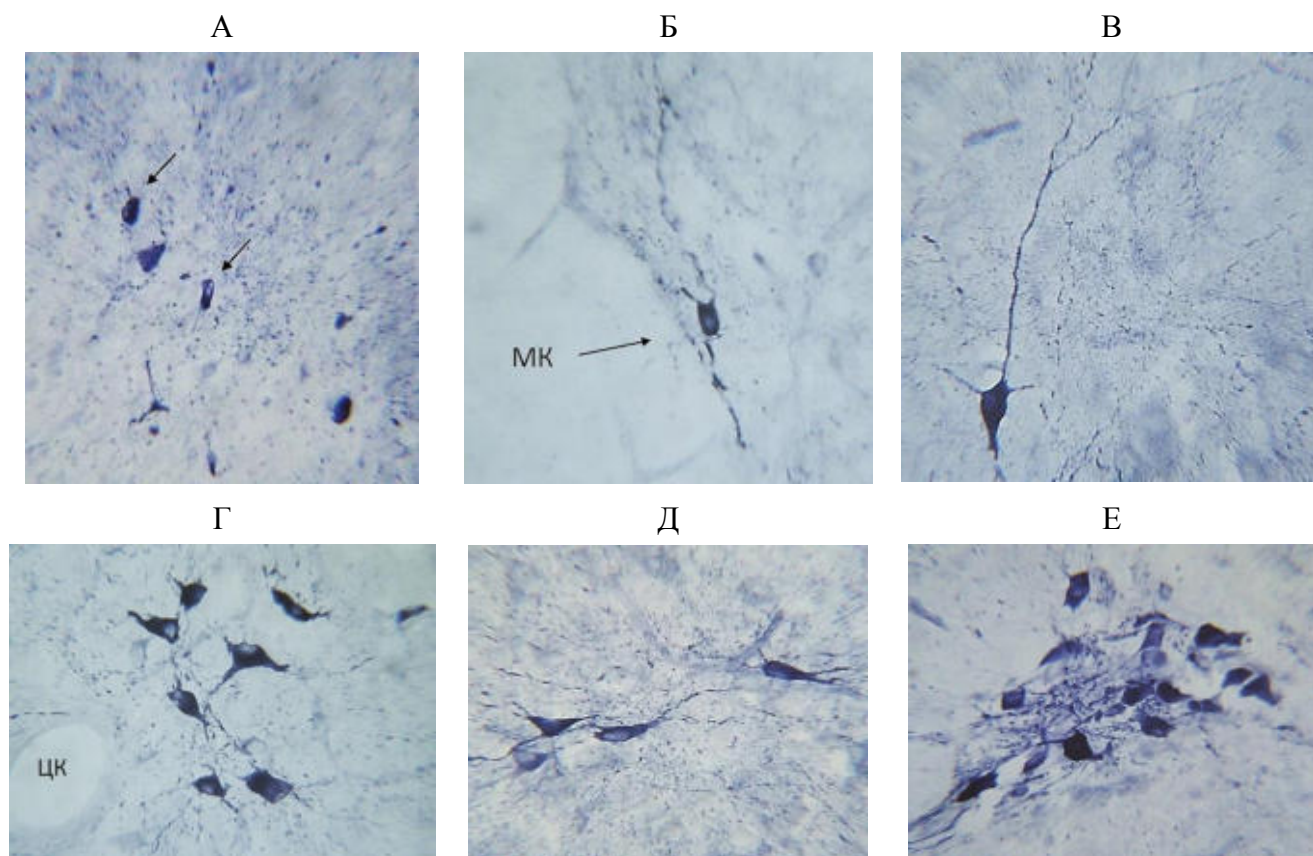


Рисунок 4.17. Структурные типы нейронов, содержащих НАДФН-диафоруазу в спинном мозге в 90 дневном возрасте крысы. Метод Р. Лилли (1969). Об. 20, ок.10.

А. Овальные и веретеновидные интернейроны в пластинке II.

Б. Овальный интернейрон в области медиального края дорсального рога (пластинка IV).

В. Овальный инетрнейрон в пластинке V.

Г. Интернейроны различных форм в дорсальной серой спайке поля X.

ЦК-центральный канал.

Д. Веретеновидные интернейроны вставочного ядра (пластинка VII).

Е. Нейроны различных форм промежуточно-латерального ядра.

Позитивные интернейроны области медиального края также определяются и в дорсальной серой спайке, где ориентация их клеточных тел меняется на медиолатеральную.

В промежуточной зоне спинного мозга выявляется популяция НАДФН-диафоруаза-позитивных нейронов, клетки которой локализуются в центральной части пластинки VII и в области латерального рога. Объединение этих двух топографических областей расположения позитивных клеток обусловлено их общей функцией и принадлежностью к симпатическим преганглионарным нейронам. На *Рисунке 4.16*. ясно видно скопление нейронов с

НАДФН-диафоразой в области промежуточно-латерального ядра (А, Д) и вставочного ядра (Д), область которого выделена пунктиром. Позитивные клетки области главного ядра имеют овальную и многоугольную форму, отростки которых короткие и не покидают области латерального рога. На каждом срезе выявляется от 5 до 14 клеток с НАДФН-диафоразой в латеральном роге (Рис. 4.17. Е). В области вставочного ядра форма нейронов меняется, в большинстве своём это веретеновидные и треугольные клетки с более длинными отростками (Рис. 4.17. Д), клеточные тела вытянуты медиолатерально, а их отростки распространяются в медиолатеральном направлении вплоть до дорсальной серой спайки поля X.

В центральной части пластинки VII промежуточной зоны спинного мозга выявляются одиночные мелкие клетки, имеющие овальную, веретеновидную или многоугольную форму, клеточные тела которых вытянуты дорсовентрально. Отростки этой популяции НАДФН-содержащих нейронов распространяются в дорсальном направлении к пластинке V и вентромедиальном направлении к медиальной части пластинки VII. Отростки длиннее таковых вставочных нейронов, но за пределы пластинки не выходят.

В спинномозговом поле X выявляются НАДФН-диафороза-позитивные интернейроны в окружности всего центрального канала (Рис. 4.16. В-Д) – с максимальной густотой в области дорсальной серой спайки (Рис. 4.17. Г). Позитивные интернейроны поля X имеют различную форму тел и в большинстве своём являются многоугольными и овальными клетками, отростки некоторых пересекают латеральную границу поля X и прослеживаются в медиальной части пластинки VII в области локализации нейронов вставочного ядра. В дорсальной серой спайке поля X ближе к границе с белым веществом заднего канатика присутствуют единичные интернейроны, структурно отличающиеся от лежащих вентральнее позитивных интернейронов. Этот тип нейронов имеет веретеновидную форму с очень длинными отростками, которые распространяются вдоль медиального края дорсального рога в глубокие его слои. В вентральной серой спайки и в центральных частях поля X также присутствуют

НАДФН-диафрала-позитивные интернейроны с короткими отростками, которые не выходят за пределы границ поля. Форма этих клеток овальная и многоугольная.

При использовании метода, описанного V.T. Hope, S.R. Vincent (1989) НАДФН-диафрала-позитивные клетки выявляются во всех пластинках спинного мозга (Рис. 4.18.). Кроме того, позитивность обнаружена и в многочисленных мелких клетках белого вещества – во всех его канатиках (Рис. 4.18. Б). НАДФН-диафрала определяется в мотонейронах вентрального рога спинного мозга, где интенсивность реакции также максимальна. При этом, все многоугольные нейроны пластинки IX имеют большие размеры и темный сине-фиолетовый цвет перикариона (Рис. 4.18. А). Напротив, при окраска методом Р. Лилли (1969) окрашенность конечного продукта гистохимической реакции в цитоплазме мотонейронов не отличается от фоновой окраски среза (Рис. 4.16. А). В пластинках дорсального рога на каждом срезе выявляются интернейроны с НАДФН-диафразой овальной, веретеновидной и многоугольной форм (Рис. 4.18. В). В дорсовентральном направлении позитивные клетки укрупняются, и в пластинке V имеют самые большие размеры среди клеток всех пластинок дорсального рога спинного мозга (Рис. 4.18. Д). Выявляются многочисленные НАДФН-диафрала-содержащие интернейроны и в промежуточной зоне, и в области спинномозгового поля X (Рис. 4.18. Г). Форма этих клеток различная, определенные топографические популяции выделить сложно, так как отмечается большая численность позитивных клеток на срезе в сером веществе. Но, также НАДФН-диафрала определяется в преганглионарных нейронах в областях локализации симпатических ядер. Интернейроны пластинки VIII вентрального рога также содержат НАДФН-диафразу, форма клеточных тел их различная, но размеры относительно мотонейронов небольшие.

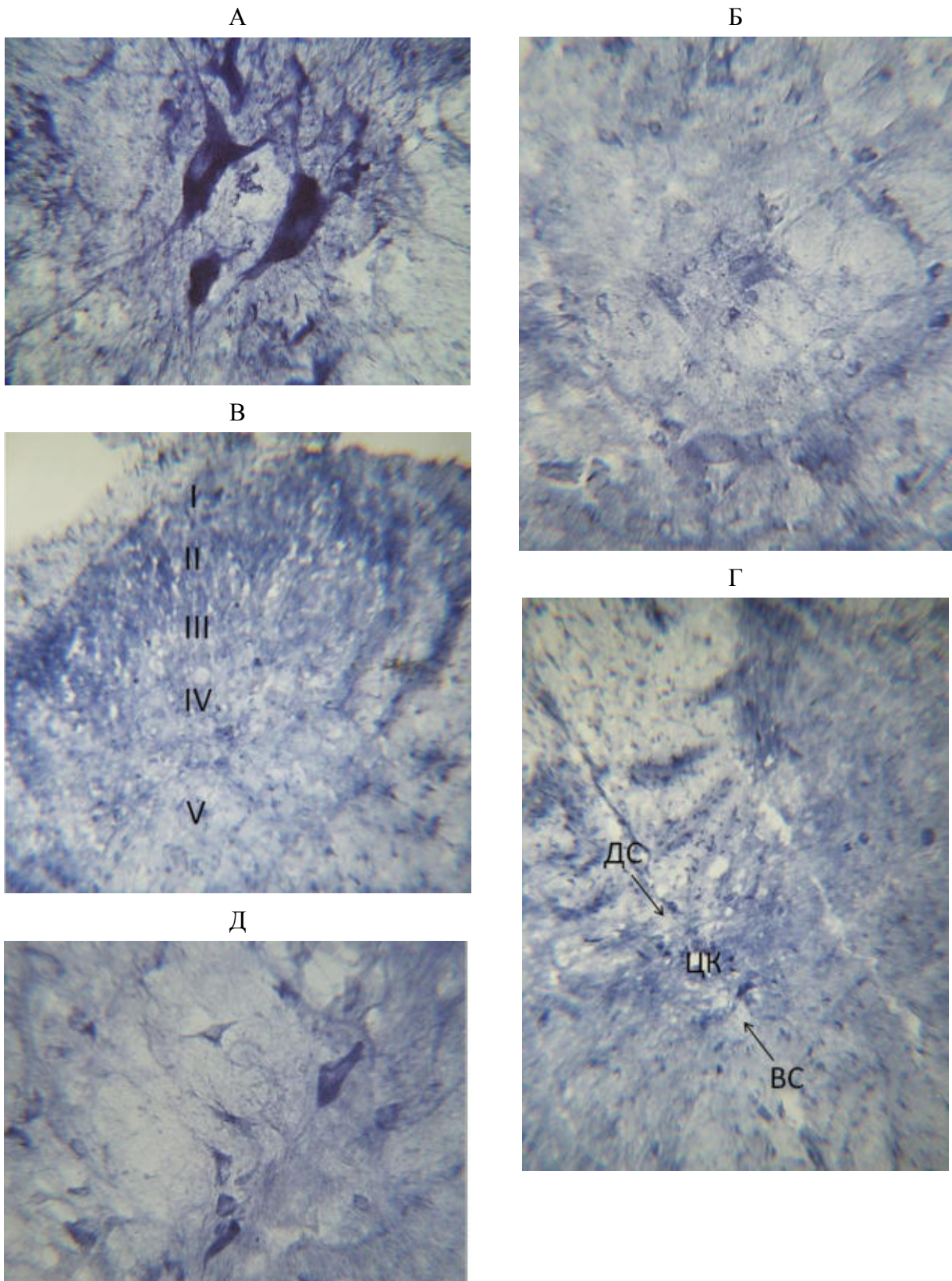


Рисунок 4.18. НАДФН-диафораза в нейронах спинного мозга в 90-дневном возрасте крысы. Метод V.T. Норе, S.R. Vincent (1989). А, Б, Д. Об. 20, ок.10.В, Г.О б.10, ок. 10. Пояснения в тексте.

Количественный анализ и размерные характеристики популяций нейронов, содержащих НАДФН-диафорузу, представлены в *Таблице 4.5*.

Средняя площадь нейронов, содержащих НАДФН-диафорузу в сером веществе спинного мозга не превышает 200 мкм^2 , по сути являясь клетками малых размеров. В тоже время, методом V.T. Норе, S.R. Vincent (1989) в вентральном роге определяется популяция интернейронов средних размеров (300 мкм^2) и крупных размеров – мотонейронов (более 400 мкм^2). При обоих методах окраски самыми мелкими интернейронами являются клетки поверхностной области дорсального рога. Площадь более 150 мкм^2 импееют НАДФН-позитивные симпатические преганглионарные нейроны и нейроны пластинки V. В остальных пластинках спинного мозга, включая поле X средняя площадь не превышает 150 мкм^2 . При этом, практически во всех выявляемых топографических областях нейроны с НАДФН-диафоразой, окрашенные методом Р. Лилли (1969) имеют меньшие размеры.

Подсчет нейронов с НАДФН-диафоразой показал, что данные полученные различными гистохимическими методами значимо разнятся. Так, при окраске методом Р. Лилли (1969) самая многочисленная популяция позитивных клеток определяется в пластинке II и в области локализации симпатических преганглионархы нейронов (8-9 клеток на срезе). Чуть меньше выявляется клеток в пластинке III и в поле X (до 5 клеток на срезе) Напротив, единичные клетки локализуются в области медиального края дорсального рога, чуть больше их (1-2 клетки на срезе) в пластинках I и VII. В пластинке IV на срезе выявляется в среднем от 3 до 4 клеток.

При окраске методом V.T. Норе, S.R. Vincent (1989) самая многочисленная популяция интернейронов с НАДФН-диафоразой определяется в пластинке II (18-19 клеток на срезе). Многочисленными по содержанию позитивных клеток являются и пластинки глубокой области дорсального рога (10-12 клеток на срезе). Минимальное количество позитивных нейронов выявляется в пластинке I и в области медиального края дорсального рога (3-4 клетки на срезе). В пластинках

промежуточной зоны, вентрального рога, симпатических ядрах и в поле X выявляется в среднем от 5 до 8 клеток на срезе.

Полученные результаты свидетельствуют, что, как гистологическая картина выявляемости НАДФН-диафоразы в сером веществе, так и морфометрические характеристики нейронов с НАДФН-диафоразой различаются при применении различных гистохимических методов.

Таблица 4.5.

Абсолютное (АК), относительное количество (ОК) и площадь (S) интернейронов с НАДФН-диафоразой во втором грудном сегменте спинного мозга в 90-дневном возрасте белой крысы ($X \pm Sx$)

Области серого вещества	Метод Р. Лилли			Метод V.T. Hope, S.R. Vincent		
	АК	ОК, %	S, мкм ²	АК	ОК, %	S, мкм ²
Дорсальный рог						
Пластинка I	1,8±0,1	8,1±2,5	71,5±6,2	3,6±0,2*	16,4±4,7*	70,8±8,5
Пластинка II	8,4±0,4	8,8±3,1	58,4±1,6	18,5±0,3*	19,4±4,5*	61,4±7,3
Пластинка III	5,4±0,3	6,8±2,3	111,4±4,3	12,4±0,2*	15,0±3,9*	134,3±9,5
Пластинка IV	3,1±0,2	3,9±1,4	132,2±4,5	11,5±0,2*	14,4±4,1*	148,5±11,2
Медиальный край дорсального рога	0,9±0,1	1,1±0,5	124,3±4,7	3,4±0,2*	4,3±1,7	125,4±10,8
Пластинка V	2,5±0,1	2,8±0,9	172,1±11,4	10,6±0,2*	11,8±3,5*	181,6±16,4
Промежуточная зона						
Центральная часть пластинки VII	1,4±0,1	1,5±0,3	145,7±3,2	7,8±0,2*	8,2±3,6*	163,5±6,3
Симпатические преганглионарные нейроны	8,5±0,4	42,5±4,1	176,4±5,9	7,1±0,3	35,5±2,9	179,8±5,2
Вентральный рог						
Пластинка VIII	—	—	—	5,4±0,3	12,0±5,4	309,3±19,5
Пластинка IX-мед	—	—	—	6,1±0,3	67,8±3,4	489,3±20,8
Пластинка IX-лат	—	—	—	7,2±0,3	72,0±3,6	484,2±21,9
Центральные структуры						
Поле X	4,8±0,2	4,0±1,3	123,7±6,4	7,7±0,3	6,4±2,5	142,4±5,9

* P<0,05

К сожалению, как иммуногистохимические, так и гистохимические методы определения активности фермента не достаточно стандартизованы, что может отражаться на результатах реакции. Гистохимический метод выявления НАДФН-диафотазы, судя по данным литературы, предусматривает приготовление инкубационной среды либо на трис-буфере рН 8,0 (Дюйзен и др., 2003; Чусовитина, Варакин, 2003; Матвеева и др., 2006; Kaur et al., 1999; Freire et al., 2008), либо на фосфатном буфере рН 7,4 (Шуклин, Швалев, 2006; Коржевский и др., 2007; Marsala et al., 2003). В спинном мозге часть исследователей выявляет НАДФН-диафотазу во всех пластинках серого вещества, в том числе и в белом веществе, у различных видов млекопитающих, включая и крысу (Valtschanoff et al., 1992; Marsala et al., 2001; Freire et al., 2008; Bombardi et al., 2013; Schiaveto-de-Souza et al., 2013; Torres-da-Silva et al., 2016). В других исследованиях НАДФН-диафотазу не определяют в вентральном роге спинного мозга (Vizzard et al., 1995; Kluchova et al., 2001; Patlevič et al., 2013). Возможно, разница объясняется или особенностями проведения гистохимической реакции, или подходами к трактовке ее результатов.

Собственный опыт использования различных инкубационных сред при выявлении НАДФН-диафотазы свидетельствует, что результаты гистохимической реакции различаются. При использовании среды с рН 8,0 НАДФН-диафотазы выявляется в мотонейронах вентральных рогов, так и в большинстве нейронов дорсального рога, промежуточной зоны и поля X. При этом очевидно, что нейроны значительно не отличаются по распределению конечного продукта гистохимической реакции, который прокрашивает их ядерную зону. Эти обстоятельства мешают детальному анализу распределения НАДФН-диафотазы в различных нейронах, определению морфометрических параметров нервных клеток, что особенно важно при сравнительных исследованиях. Не менее важным является и подсчет числа нервных клеток обладающих активностью НАДФН-диафотазы.

4.2.1.7. Заключительные замечания

Результаты проведенных гистохимических и иммуногистохимических исследований доказывают гетерогенность спинальных нейронов, располагающихся в дорсальном роге, промежуточной зоне, вентральном роге и в центральных структурах серого вещества грудных сегментов спинного мозга, а также в пределах границ спинальных пластинок. Об этом свидетельствует форма и количество нервных отростков, их длина, распространенность, площадь сечения, число, топография спинальных нейронов, содержащих холинацетилтрансферазу, TRPV1, вещество P, кальцитонин-ген-родственный пептид, белок нейрофиламентов 200 кДа, кальбиндин 28 кДа, нейрональную Но-синтазу, НАДФН-диафорузу.

Дорсальный рог

- *Пластинка I* – присутствуют популяции клеток овальных и веретеновидных форм малых размеров, ориентированные в дорсовентральном направлении, содержащие кальбиндин, nNOS и НАДФН-диафорузу. Интернейроны с кальбиндином имеют более мелкие размеры и представляют более многочисленную популяцию (32,7%), с nNOS - самую малочисленную (3,6%). Размеры nNOS- и НАДФН-содержащих интернейронов не различаются.
- *Пластинка II* – присутствуют популяции клеток овальных и веретеновидных форм малых размеров, ориентированные в дорсовентральном направлении, содержащие кальбиндин, nNOS и НАДФН-диафорузу. Интернейроны с кальбиндином имеют более мелкие размеры и представляют более многочисленную популяцию (22,4%), с nNOS и НАДФН-диаофразой более малочисленную - 7,2% и 8,8% соответственно. Размеры nNOS- и НАДФН-содержащих интернейронов не различаются.
- *Пластинки III и IV* – присутствуют популяции клеток:
 - овальных и веретеновидных форм малых размеров, с ориентацией или дорсовентрально, или медиолатерально, содержащие ХАТ, кальбиндин, nNOS и НАДФН-диафорузу;

- овальных, веретеновидных и многоугольных форм средних размеров, ориентированные дорсовентрально, содержащие белок нейрофиламентов;
- овальных форм средних размеров, ориентированные медиолатерально, содержащие белок нейрофиламентов (антенноподобные нейроны).
- *Область медиального края дорсального рога* – присутствуют популяции клеток овальных и веретеновидных форм, с дорсовентральной ориентацией, с продолжением отростков в область дорсальной серой спайки, малых размеров – содержащие ХАТ, кальбиндин, nNOS и НАДФН-диафору, а также средних размеров – белок нейрофиламентов.
- *Пластинка V* – присутствуют популяции клеток:
 - овальных и веретеновидных форм, ориентированные дорсовентрально, малых размеров – содержащие кальбиндин, nNOS и НАДФН-диафору, средних размеров – ХАТ; крупных размеров – белок нейрофиламентов;
 - многоугольных форм с дорсовентральной ориентацией, средних размеров – содержащие ХАТ, крупных размеров – белок нейрофиламентов.

Относительное содержание клеточных популяций в пластинках дорсального рога не превышает 3% с экспрессией nNOS, 5% - с ХАТ, белком нейрофиламентов и кальбиндином. Доля НАДФН-содержащих нейронов уменьшается в дорсовентральном направлении от 6,8% в пластинке III до 2,8% в пластинке V.

Дорсальное ядро содержит популяцию нейронов различных форм средних размеров, содержащих белок нейрофиламентов (30,8%).

Промежуточная зона

- *Пластинка VII* – присутствуют популяции клеток:
 - в дорсальной части пластинки – овальных и веретеновидных форм, ориентированные медиолатерально, малых размеров с кальбиндином, средних размеров с ХАТ (разделительные нейроны), доля которых не превышает 4%;
 - в центральной части пластинки – овальных, веретеновидных и многоугольных форм, с медиолатеральной ориентацией, малых размеров – содержащие кальбиндин, nNOS и НАДФН-диафору, средних размеров – ХАТ, крупных

размеров – белок нейрофиламентов; и дорсовентральной ориентации средних размеров с ХАТ и крупных размеров с белком нейрофиламентов, доля которых не превышает 2%;

- симпатические преганглионарные нейроны – различных форм в области промежуточно-латерального ядра и преимущественно овальных и треугольных форм в области вставочного ядра, расположенные медиолатерально, малых размеров с nNOS и НАДФН-диафоразой (37% и 42,5% соответственно) и средних размеров с ХАТ (92%).

Вентральный рог

- *Пластинка VIII* – присутствуют популяции клеток:
 - многоугольных форм с преимущественной медиолатеральной ориентацией тел и отростков, имеющие средние размеры и содержащие кальбиндин и ХАТ;
 - многоугольных форм с преимущественной дорсовентральной ориентацией тел и отростков, имеющие средние размеры и содержащие ХАТ, крупные размеры – содержащие белок нейрофиламентов.

Доля нейронов, экспрессирующих ХАТ и белок нейрофиламентов составляет 7% и 6% соответственно, нейроны с кальбиндином очень редкие (0,8%).

- *Пластинка IX* – присутствуют популяции клеток:
 - мотонейроны, содержащие ХАТ (более 90%) и белок нейрофиламентов (до 80%);
 - мелкие многоугольные нейроны, содержащие кальбиндин (клетки Реншоу).

Спинномозговое поле X

- *Дорсальная серая спайка* – присутствуют популяции клеток преимущественно овальной формы с медиолатеральной ориентацией клеточных тел и отростков, малых размеров – содержащие кальбиндин, nNOS и НАДФН-диафоруазу, средних размеров – содержащие ХАТ и белок нейрофиламентов;
- *Вентральная серая спайка и центральные части* – присутствуют популяции клеток различных форм и ориентаций, малых размеров с кальбиндином, nNOS и НАДФН-диафоразой, средних размеров с ХАТ.

В пределах обозначенных пластинок или ядер выделенные популяции по своим размерным характеристикам распределяются следующим образом – самые малые размеры имеют нейроны, экспрессирующие кальбиндин, крупнее нейроны с НАДФН-диафоразой, еще крупнее с nNOS, затем с ХАТ и самыми крупными являются нейроны с белком нейрофиламентов.

Детально изученное строение пластинок серого вещества спинного мозга, топографии, размеров, формы нейронов, их нейрохимических характеристик можно сопоставить с имеющимися физиологическими данными и таким образом представить структурно-функциональную характеристику нервных клеток серого вещества спинного мозга.

4.2.2. ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОХИМИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА ГРУДНОГО СПИННОГО МОЗГА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫСЫ

Нейрохимические особенности нейронов изучали в сером веществе второго грудного сегмента спинного мозга у крыс 3, 10, 20, 30, 60 и 90 дневных возрастов. Вариации количественного состава пластинок и ядер серого вещества спинного мозга в постнатальном онтогенезе изучены в Главе 3. В связи с возрастным уменьшением абсолютного количества нейронов в изучаемых областях серого вещества, для выявления закономерностей их нейрохимических особенностей использовали показатель относительного содержания нейронов в популяциях, определяемых по экспрессии ХАТ, TRPV1, вещества Р, кальцитонин-ген-родственного пептида, белка нейрофиламентов 200 кДа, кальбиндина 28 кДа, ферментативной активности НАДФН-диафоразы.

4.2.2.1. Возрастные особенности распределения холинацетилтрансферазы в сером веществе спинного мозга

В сером веществе спинного мозга во всех изучаемых возрастах крысы выявляются нейроны, содержащие холинацетилтрансферазу, в дорсальном роге, в промежуточной зоне, в вентральном роге и в поле Х (Рис. 4.19.). Интенсивность флюоресценции иммунореактивных интернейронов с возрастом крысы меняется и является различной в выявляемых областях серого вещества. С трехдневного возраста крысы интенсивной флюоресценцией обладают нейроны промежуточной зоны и вентрального рога (Рис. 4.18. Б). Менее интенсивная флюоресценция наблюдается в интернейронах пластинок дорсального рога и поля Х (Рис. 4.18. А), но данное свечение превышает фоновое, и идентифицировать иммунореактивные нейроны представляется возможным уже с трехдневного возраста крысы. В пластинках поверхностной области дорсального рога спинного мозга ХАТ-иммунореактивные нейроны не выявляются.

В пластинках III, IV и в области медиального края дорсального рога присутствуют иммунореактивные интернейроны овальной и веретеновидной

формы тела, в пластинке V к ним добавляются многоугольные формы. В пластинке III, IV и V ориентация клеточных тел и отростков, как дорсовентральная, так и медиолатеральная. В области медиального края дорсального рога ХАТ-иммунореактивные нейроны располагаются дорсовентрально. Особенностью развития ХАТ-иммунореактивных нейронов дорсального рога является относительно большая протяженность иммунореактивных отростков, по сравнению со взрослой крысой, где экспрессия ХАТ наблюдается только в их проксимальных частях, расположенных непосредственно от места ветвления у перикариона. До 20-дневного возраста крысы возможно проследить нейрональные связи популяций нейронов, содержащих ХАТ настолько, насколько позволяет длина их иммунореактивных отростков. С 30-дневного возраста экспрессия ХАТ в отростках нервных клеток ограничена. Так, в пластинках III, IV и V у части нейронов более длинные отростки прослеживаются в дорсальном направлении, у части нейронов, напротив – в вентральном направлении. Но отростки не покидают границ соответствующих пластинок. В области медиального края дорсального рога отростки нейронов более длинные и обнаруживаются в дорсальной серой спайке. В промежуточной зоне спинного мозга популяции нейронов как вставочного ядра, так и «разделительных нейронов», имеют медиолатеральную направленность клеточных тел, представлены овальными и веретеновидными клетками, в области вставочного ядра треугольные формы. В промежуточно-латеральном ядре форма нейронов различная, иммунореактивные отростки прослеживаются в белом веществе бокового канатика (Рис. 4.19. В).

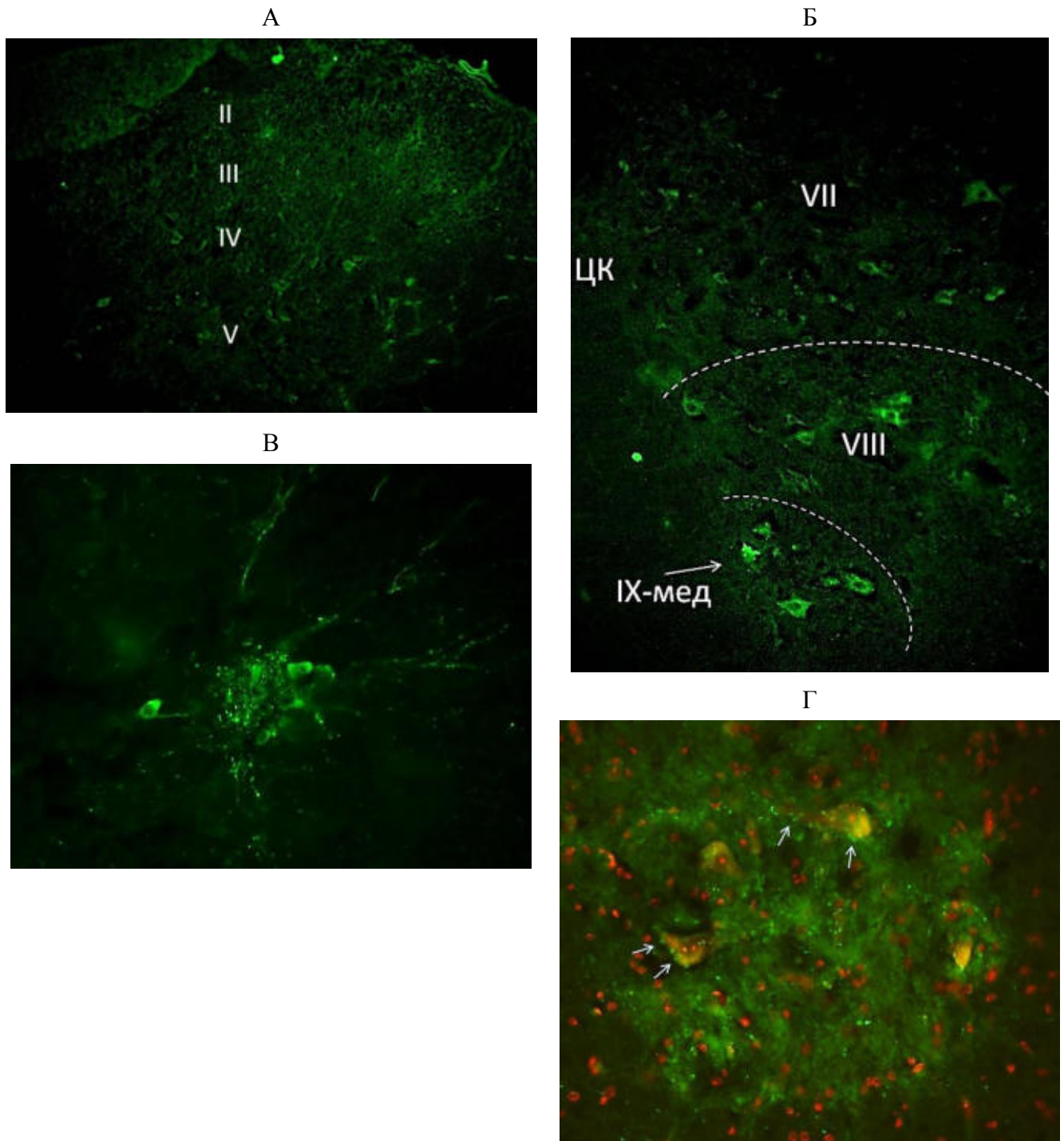


Рисунок 4.19. Топография нейронов с холинацетилтрансферазой в спинном мозге в 20-дневном возрасте крысы. А, Б. Об. 10, ок.10. В, Г. Об. 20 ок. 10.

Римскими цифрами обозначены пластинки. ЦК – центральный канал.

А-В. Нейроны зеленого цвета с холинацетилтрансферазой (ХАТ).

Г. Мотонейроны желто-зеленого цвета с ХАТ. Пояснения в тексте.

В пластинке VII большинство нейронов с ХАТ имеют медиолатеральную направленность овальных, многоугольных форм нейронов. У многоугольных форм нейронов отростки прослеживаются не только в медиальном направлении к полю X, но и в вентральном направлении к пластинке VIII вентрального рога. В области вентрального рога ХАТ-иммунореактивные нейроны выявляются и в пластинке VIII и в пластинке IX. Также как и у взрослой крысы ХАТ-иммунореактивные интернейроны по размерам являются сопоставимыми с мотонейронами пластинки IX. Топография ХАТ-иммунореактивных мотонейронов меняется с возрастом крысы, где к 20-дневному возрасту крысы апикальная группа мотонейронов смещается в вентромедиальную область рога.

В 10 дневном возрасте крысы в области нейроплазмы иммунореактивных мотонейронов пластинки IX выявляются точечные структуры, обладающие интенсивным свечением, которые не обнаруживаются в кариоплазме. Данные ХАТ-иммунореактивные структуры также присутствуют и в 20 дневном возрасте крысы, определяются по ходу нервных отростков иммунореактивных мотонейронов (Рис. 4.19. Г – ХАТ-иммунореактивные структуры в нейроплазме и отростках мотонейронов обозначены стрелками). Во всех мотонейронах идентифицируется ядрышко, которое является иммунонегативным, в части мотонейронов их больше одного. Обнаруженные ХАТ-иммунореактивные структуры в пластинке IX по-видимому являются пресинаптическими, образуя аксосоматические и аксодендритические синапсы на мотонейронах. Отростки мотонейронов, их толщину, данным методом и только на поперечном срезе серого вещества идентифицировать не представляется возможным, но в пользу того, что они являются дендритами, свидетельствует их топографическое расположение – протяженность больше в дорсальном направлении и отсутствие участия в формировании вентрального корешка.

Подсчет количества иммунореактивных нейронов показала, что с возрастом крысы относительное содержание их значимо не меняется. В постнатальном развитии крысы самой малочисленной популяцией являются интернейроны поля X, их процент не превышает единицы. Популяции интернейронов в дорсальном

роге составляют до 5% от общего количества нейронов в его пластинках. Чуть больше нейронов выявляется в пластинке VIII (до 8%), а максимальное количество ХАТ-иммунореактивных нейронов определяется в области локализации двигательных соматических и автономных ядер. Если в целом, количество нейронов в пластинках дорсального рога, в пластинках VII, VIII и в поле X с возрастом крысы является стабильным, то относительное содержание популяций ХАТ-иммунореактивных мотонейронов и симпатических преганглионарных нейронов с возрастом крысы увеличивается. В трехдневном возрасте от 71,4% и 82,5% соответственно в симпатических ядрах и в пластинке IX, к 10-дневному возрасту до показателей, характерных 90 дневной взрослой крысе.

Возрастная динамика изменения размеров иммунореактивных нейронов, определяемая по параметру их площади сечения соответствует возрастным изменениям размерных характеристик всей нейрональной популяции каждой конкретной области (пластинка/ядро). Интенсивный рост иммунореактивных нейронов отмечается в 10-дневном возрасте. При этом, в трехдневном возрасте размер ХАТ-иммунореактивных нейронов в пластинках дорсального рога, в ядрах и пластинке VII промежуточной зоны, в поле X и в вентральном роге не превышают 100 мкм^2 . Но, уже в 10 дневном возрасте иммунореактивные нейроны пластинок III и IV дорсального рога превышают размеры 100 мкм^2 , а других областей – 200 мкм^2 и относятся к популяции нейронов средних размеров. К 20-дневному возрасту размерные характеристики иммунореактивных интернейронов и симпатических преганглионарных нейронов соответствуют таковым взрослой 90-дневной крысе. Увеличение размеров мотонейронов наблюдается в 30-дневном возрасте до класса крупных нейронов (более 400 мкм^2).

4.2.2.2. Возрастные особенности распределения TRPV1, вещества Р и кальцитонин-ген-родственного пептида в сером веществе спинного мозга

Во всех изученных возрастах крысы на поперечном срезе серого вещества спинного мозга нейроны, иммунореактивные к TRPV1 и веществу Р не выявляются. Определяется только иммунореактивность к кальцитонин-ген-родственному пептиду популяции клеток относительно крупных размеров, локализованных в вентральном роге в области пластинки IX – в мотонейронах. Иммунореактивность мотонейронов наблюдается только до 10-дневного возраста крысы (Рис. 4.19.). С 20-дневного возраста крысы область вентрального рога является иммунонегативной, что сохраняется вплоть до 90-дневного возраста крысы. Как видно на *Рисунке 4.20.* экспрессия кальцитонин-ген-родственного пептида в мотонейронах является очень слабой, флюоресценция иммунореактивных клеток не отличается от фонового свечения среза.

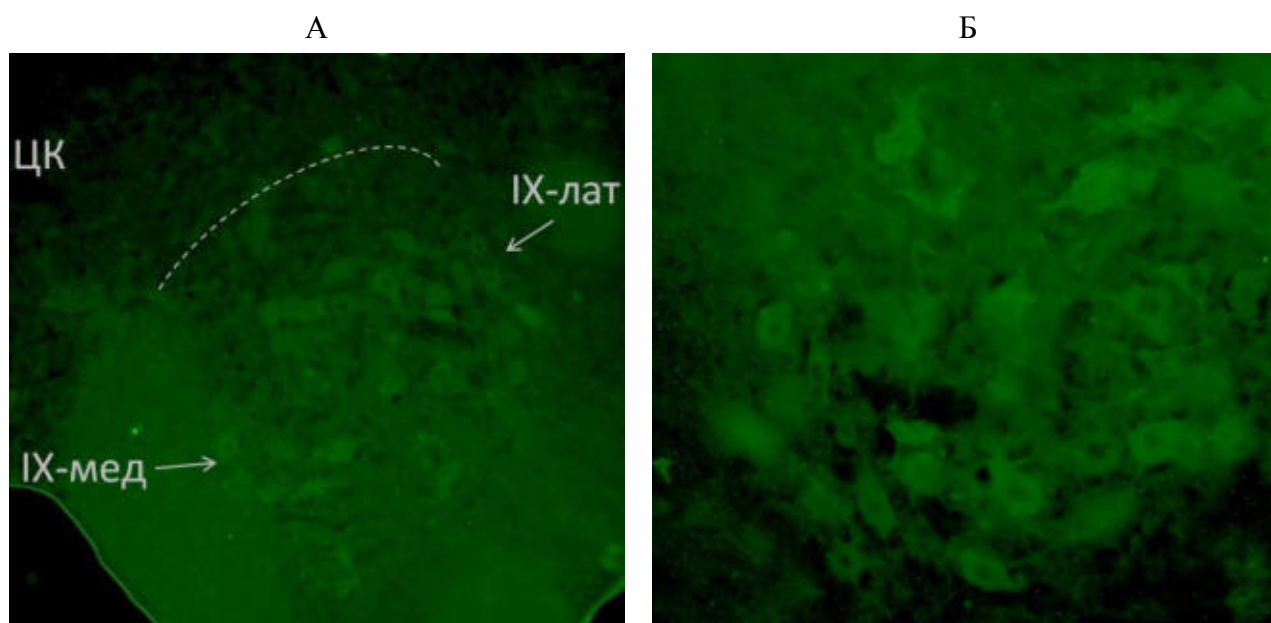


Рисунок 4.20. Иммунореактивность к кальцитонин-ген-родственному пептиду в мотонейронах вентрального рога спинного мозга в 3 дневном (А) и 10 дневном (Б) возрастах крысы. А. Об. 10, ок.10. Б. Об. 20 ок. 10.

Римскими цифрами обозначены пластинки. ЦК – центральный канал. Нейроны зеленого цвета с кальцитонин-ген-родственным пептидом.

С 3 дневного возраста крысы в поверхностной области дорсального рога определяется флюоресценция нервных волокон, содержащих TRPV1, вещество Р и кальцитонин-ген-родственный пептид. При этом, в трехдневном возрасте зона свечения ограничена только пластинкой I, что также сохраняется и в 10-дневном возрасте. В отличие от этого, в 20-дневном возрасте наблюдается расширение зоны свечения нервных волокон, которая распространяется вентрально на внешнюю часть пластинки II, что является характерным только для флюоресцентных нервных волокон, содержащих вещество Р и кальцитонин-ген-родственный пептид. Изменения топографии нервных волокон с TRPV1 в дорсальном роге спинного мозга в постнатальном развитии крысы не отмечается.

4.2.2.3. Возрастные особенности распределения высокомолекулярного белка нейрофиламентов в сером веществе спинного мозга

Во всех исследуемых возрастах крысы на поперечном срезе спинного мозга нейроны, содержащие белок нейрофиламентов 200 кДа выявляются в дорсальном роге, промежуточной зоне, вентральном роге и поле X. Нейроны с экспрессией белка нейрофиламентов имеют яркую красную флюоресценцию, белок находится в нейроплазме и в отростках клеток (Рис. 4.21.; 4.22.) Кроме того, выявляются многочисленные нервные волокна в областях локализации иммунореактивных нейронов. Отсутствует экспрессия белка нейрофиламентов в пластинках дорсального рога спинного мозга (Рис. 4.21. А).

Во всех исследуемых возрастах крысы в дорсальном роге иммунореактивные нейроны выявляются в его глубокой области – пластинках III, IV и V (Рис. 4.21. А; Рис. 4.22. А), а также в области локализации дорсального ядра спинного мозга (Рис. 4.21. Б; Рис. 4.22. Б).

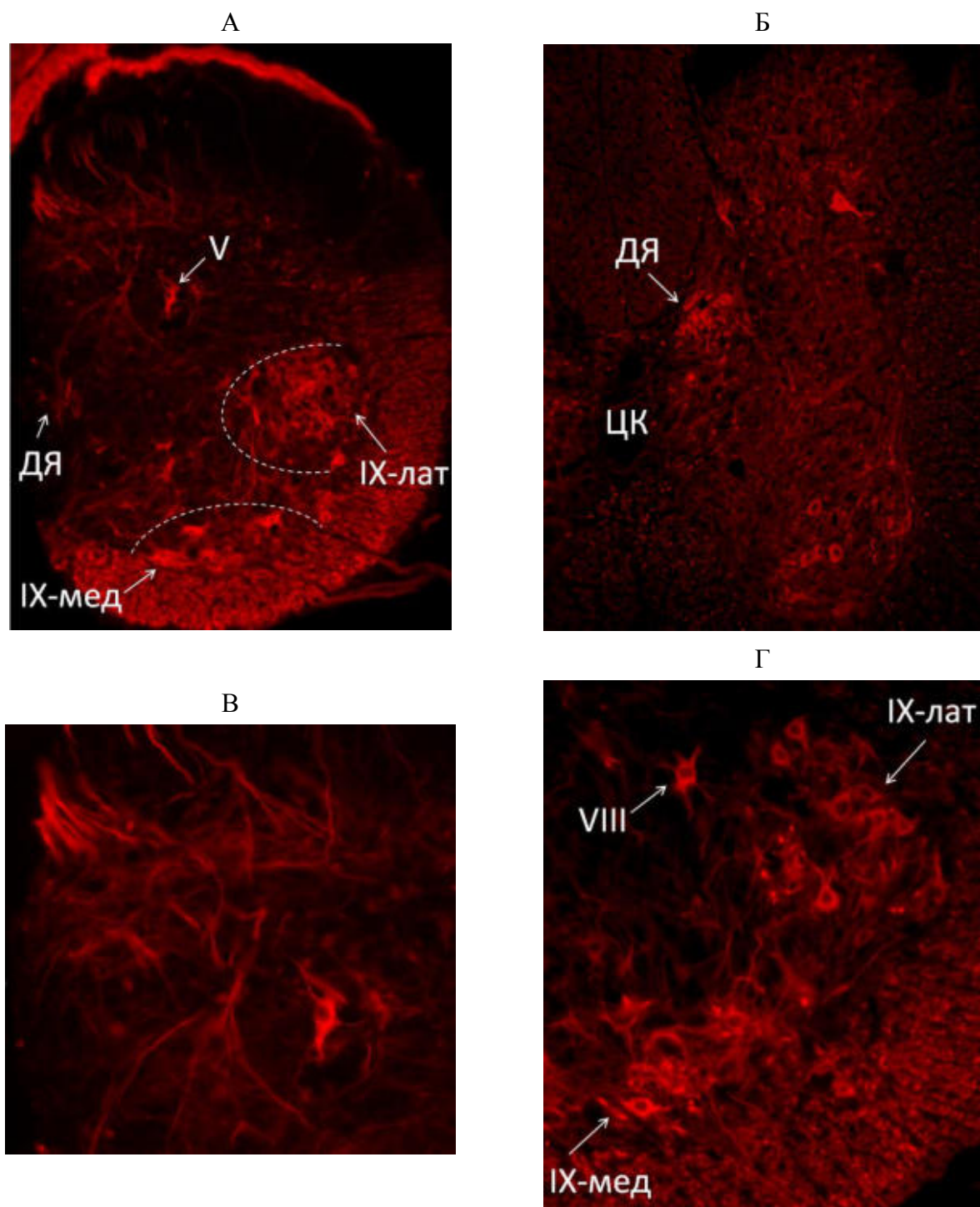


Рисунок 4.21. Топография нейронов с белком нейрофиламентов 200 кДа в спинном мозге в трех дневном (А, В, Г) и 10 дневном (Б) возрастах крысы.

А, Б. Об. 4, ок.10. В, Г. Об. 20, ок.10. В, Г - части рисунка А.

Пунктирными линиями обозначены группы мотонейронов пластинки IX:
мед – медиальная; лат – латеральная; римскими цифрами – пластинки (V, VIII, IX);
ДЯ - дорсальное ядро; ЦК – центральный канал.

Нейроны красного цвета с белком нейрофиламентов.

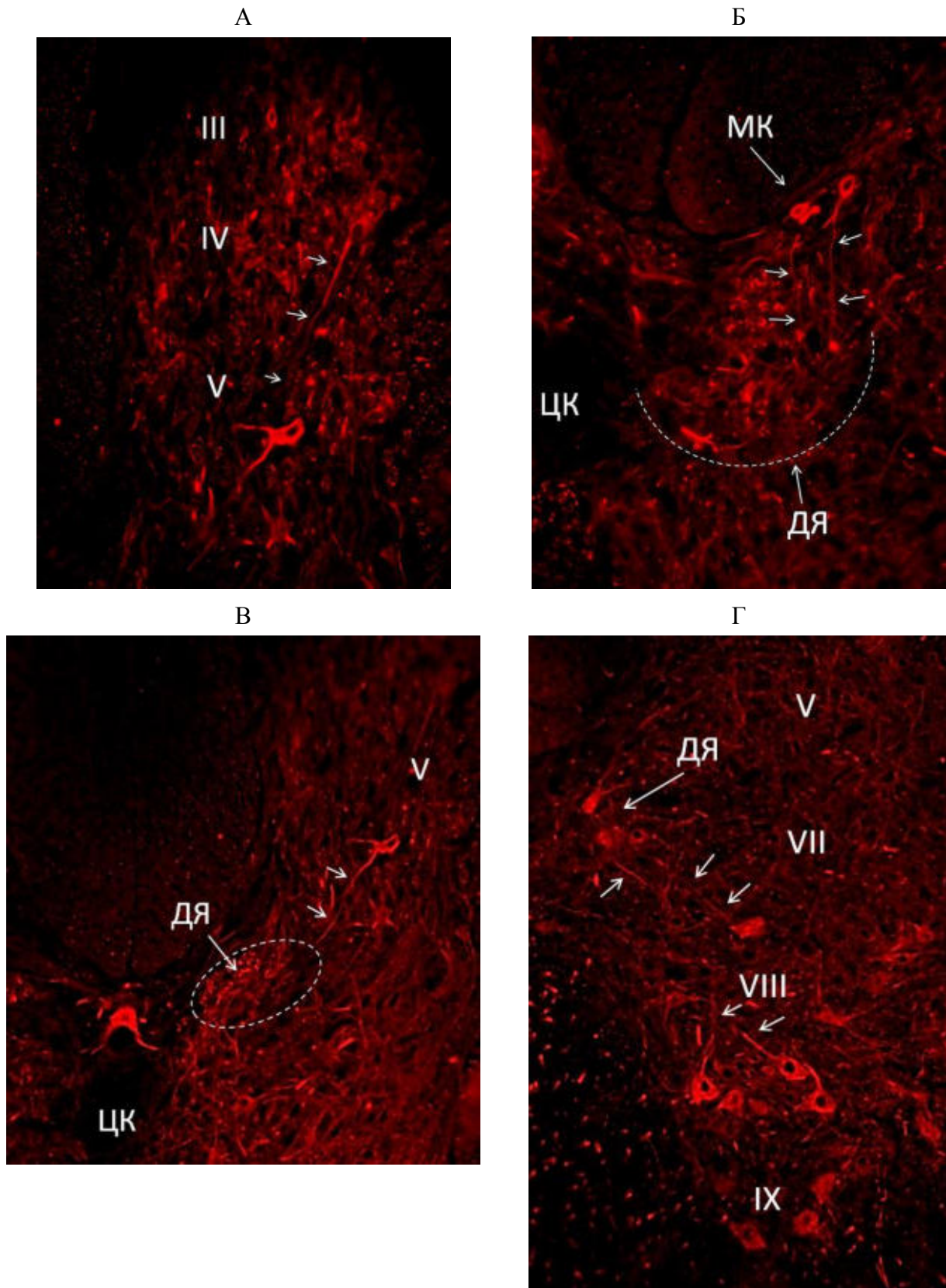


Рисунок 4.22. Топография нейронов с белком нейрофиламентов 200 кДа в спинном мозге в 20-дневном возрасте крысы. А, Б. Об. 20, ок.10. В,Г. Об. 10, ок. 10.

Обозначения: римские цифры – пластинки (III, IV, V); ДЯ - дорсальное ядро; МК – область медиального края дорсального рога; ЦК – центральный канал. Нейроны красного цвета с белком нейрофиламентов. Пояснения в тексте.

В области медиального края дорсального рога выявляется популяция интернейронов, клетки которой также структурно подобны нейронам дорсального рога, проявляющим экспрессию белка нейрофиламентов (Рис. 4.22. Б, обозначены стрелкой). Все иммунореактивные нейроны в пластинках дорсального рога имеют или овальную, или многоугольную форму тела, и являются популяциями нейронов, имеющих относительно крупные размеры по сравнению с размерами иммунонегативных нейронов соответствующих пластинок. При этом, овальные формы иммунореактивных нейронов локализируются преимущественно в пластинках III и IV, и в области медиального края дорсального рога спинного мозга. Экспрессия белка нейрофиламентов в овальных и многоугольных нейронах наблюдается в пластинке V дорсального рога. В пластинках III и IV иммунореактивные нейроны имеют как медиолатеральную, так и дорсовентральную направленность клеточных тел, которая сменяется дорсовентральной ориентацией в пластинке V и в области медиального края дорсального рога спинного мозга. В области дорсального ядра форма нейронов различная, но размеры нейронов являются самыми крупными по сравнению с иммунонегативными клетками ядра.

С трехдневного возраста крысы представляется возможным по экспрессии белка нейрофиламентов в отростках нейронов проследить их направленность и распространенность, что сохраняется до 20-дневного возраста крысы. В некоторых областях отростки нейронов покидают свои топографические зоны выявляемости и прослеживаются в рядом лежащих областях (пластинка/ядро) серого вещества спинного мозга. Так, в области пластинки IV дорсального рога, от нейронов овальной формы, вытянутых дорсовентрально, отходит от вентральной поверхности их тела длинный отросток, пересекающий границу с пластиной V – и прослеживается вплоть до места локализации иммунореактивных нейронов непосредственно пластинки V (Рис. 4.22. А – протяженность отростка обозначена стрелками). В области медиального края дорсального рога от тел овальных нейронов также отходит более длинный и более крупный отросток, и также прослеживается в вентральном направлении, но в области локализации

иммунореактивных нейронов дорсального ядра (Рис. 4.22. Б – направленность отростков обозначена стрелками). От единичных многоугольных иммунореактивных нейронов пластинки V более длинный и крупный отросток распространяется в вентромедиальную область дорсального рога и прослеживается в области локализации дорсального ядра (Рис. 4.22. В – направленность отростка обозначена стрелками).

В целом, на *Рисунке 4.21. (А)* отчетливо визуализируется топография нервных волокон: в более дорсально расположенных пластинках глубокой области дорсального рога волокна имеют преимущественно дорсовентральное расположение, в более вентрально расположенной пластинке V – нервные волокна располагаются вентромедиально с проекциями в область дорсального ядра.

В пластинке VII промежуточной зоны спинного мозга нейроны имеют овальную, веретеновидную и многоугольную формы клеточных тел, наибольший диаметр которых вытянут медиолатерально, но у части нейронов отростки прослеживаются в дорсомедиальном направлении – в область локализации дорсального ядра (Рис. 4.22. Г – направленность отростков обозначена стрелками), у части нейронов в дорсальном направлении в область пластинки V, у части нейронов в вентральном направлении к иммунореактивным интернейронам пластинки VIII. При этом, отростки нейронов пластинки VII не выходят за пределы границ, удается проследить только их направление. В тоже время, у иммунореактивных интернейронов пластинки VIII отмечается направленность отростков как в дорсальном направлении в пластинку VII, так и вентральном направлении к мотонейронам пластинки IX. Интернейроны пластинки VIII в большинстве своём имеют многоугольную форму, тела которых, вытянуты как медиолатерально, так и дорсовентрально. Нейроны с дорсовентральной ориентацией дают отростки в направлении пластинки IX, а нейроны с медиолатеральной ориентацией – в направлении пластинки V, преимущественно в её медиальную область.

В 20-дневном возрасте крысы в связи с изменением топографии пластинки IX, происходит смещение апикальной границы пластинки IX в вентромедиальную область рога, что также изменяет топографию мотонейронов, содержащих белок нейрофиламентов. При этом, на *Рисунках 4.21. (Г), 4.22. (Г)* отчетливо визуализируется, что размеры мотонейронов пластинки IX являются сопоставимыми с интернейронами пластинки VIII, что является характерным для всех возрастов наблюдаемого онтогенеза крысы. Также, гистологически определяется вентральная направленность отростков иммунореактивных мотонейронов с формированием зоны выхода вентрального корешка (Рис. 4.21. Г). С 30-дневного возраста крысы в подавляющем большинстве иммунореактивных нейронов различных областей серого вещества спинного мозга экспрессия белка нейрофиламентов наблюдается только в проксимальных частях отростков, непосредственно вблизи перикариона.

Подсчет количества иммунореактивных нейронов показала, что в виду их более многочисленной выявляемости в раннем периоде онтогенеза, возрастная динамика заключается в постоянстве их относительного содержания уже с трехдневного возраста крысы, что не отличает их от таковых показателей процентного содержания у взрослой 90-дневного возраста крысы. При этом, в постнатальном развитии крысы самой малочисленной популяцией являются интернейроны пластинки III, IV и поля X, где количество клеток не превышает 2%. В пластинке VII и VIII содержится до 3% и 5% иммунореактивных нейронов соответственно. Больше численность популяции интернейронов, содержащих белок нейрофиламентов, в пластинке VIII – до 7%. Еще больше содержится иммунореактивных нейронов в области дорсального ядра – до 30%. Но, самой многочисленной является популяция мотонейронов, где экспрессию белка проявляет до 80% от общей численности нейронов пластинки IX.

Возрастная динамика изменения размеров иммунореактивных нейронов, определяемая по параметру их площади сечения, также соответствует возрастным изменениям размерных характеристик всей нейрональной популяции каждой конкретной области (пластинка/ядро). Интенсивный рост иммунореактивных

нейронов отмечается в 10-дневном возрасте. При этом, в трехдневном возрасте размер всех иммунореактивных нейронов превышает 100 мкм^2 , но не выходит за пределы 200 мкм^2 , являясь по сути популяцией нейронов малых размеров. Но, уже в 10-дневном возрасте иммунореактивные нейроны пластинок III, IV и дорсального ядра превышают размеры 200 мкм^2 и относятся к популяции нейронов средних размеров. А иммунореактивные нейроны пластинки V, промежуточной зоны, вентрального рога и поля X превышают размеры 300 мкм^2 . С 30-дневного возраста за счет преимущественного роста мотонейронов их размер увеличивается до крупных (более 400 мкм^2).

4.2.2.4. Возрастные особенности распределения кальбиндина 28 кДа в сером веществе спинного мозга

В сером веществе спинного мозга во всех изучаемых возрастах крысы выявляются нейроны, содержащие кальбиндин 28 кДа, в дорсальном роге, в промежуточной зоне, в вентральном роге и в поле X (Рис. 4.23. А). Интенсивность флюоресценции иммунореактивных интернейронов является одинаковой для всех определяемых областей серого вещества и не меняется с возрастом крысы. Во всех исследуемых возрастах иммунореактивные интернейроны выявляются во всех пластинках дорсального рога.

В пластинках I и II располагаются иммунореактивные интернейроны, которые имеют овальную и веретеновидную форму, флюоресценция наблюдается в нейроплазме. В части нейронов пластинки I и II иммунореактивность проявляют отростки, что является характерным до 20-дневного возраста.

В пластинах III и IV иммунореактивные интернейроны проявляют иммунореактивность как нейроплазмы, так и проксимальных частей отростков. Форма интернейронов овальная и веретеновидная, максимальные диаметры клеточных тел вытянуты дорсовентрально, отростки не покидают границ пластинок.

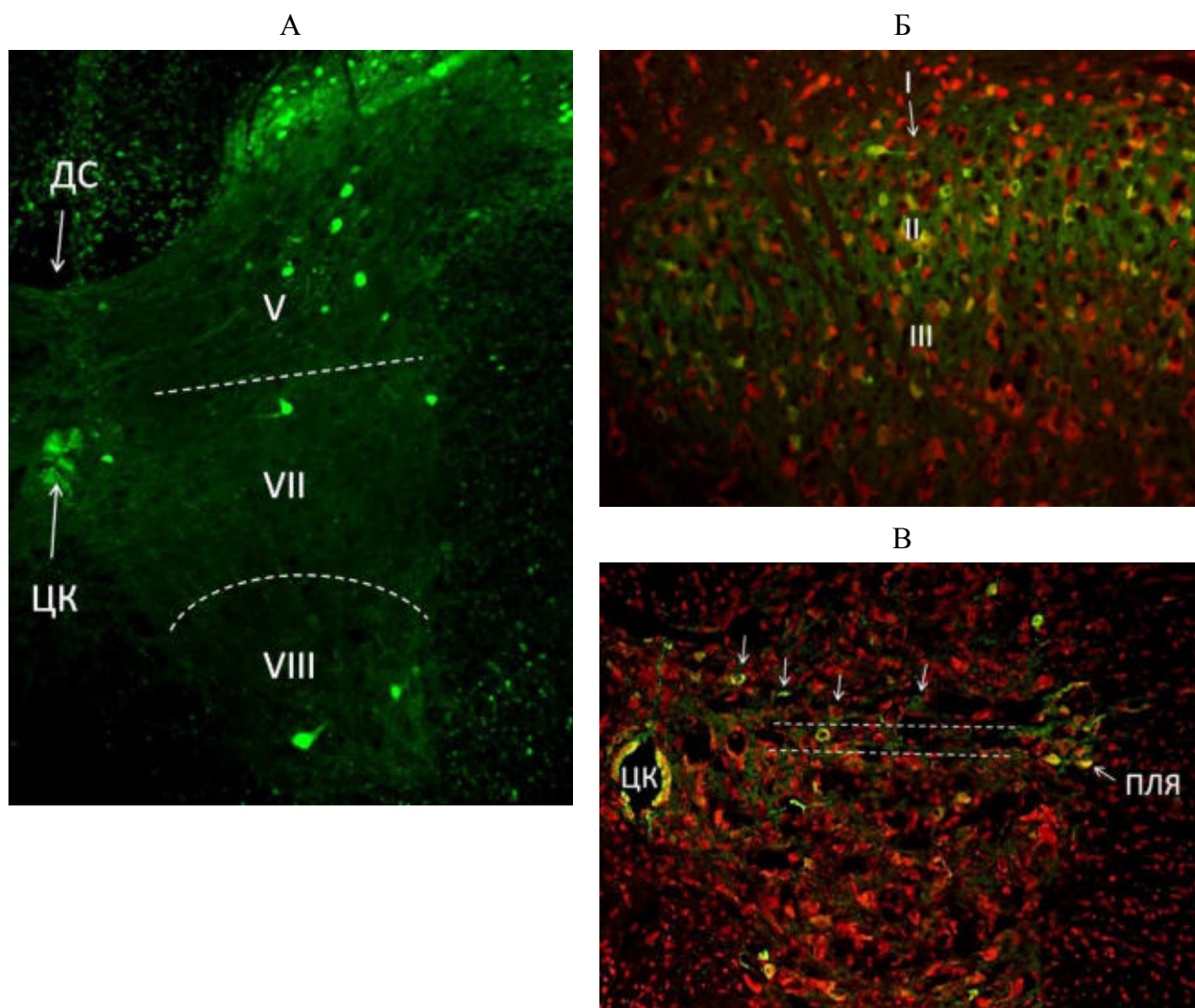


Рисунок 4.23. Кальбиндин-иммунореактивные нейроны спинного мозга в 7 дневном (А) и 20 дневном (Б,В) возрастах крысы. А. Об. 4, ок.10. Б, В. Об. 10, ок. 10.

Обозначения: Римские цифры – пластинки; ДС-дорсальная серая спайка; ЦК-центральный канала; ПЛЯ-промежуточно-латеральное ядро.

А: Нейроны зеленого цвета с кальбиндином.

Б, Г: Нейроны зеленого и желто-зеленого цвета с кальбиндином, красного цвета – окраска флюоресцентным Нисслем. Пояснения в тексте.

Отростки иммунореактивных нейронов поверхностной области дорсального рога не выходят за границы пластинок, так как флюоресценцией обладают только лишь проксимальные части отростков. Но, ориентация тел и отростков в пластинке I медиолатеральная, в отличие от пластинки II – где клетки и их отростки располагаются дорсовентрально (Рис. 4.23. Б).

В пластинке V в ранние сроки наблюдения – до 20-дневного возраста выявляются интернейроны преимущественно овальных форм, с возрастом крысы они вытягиваются и преобладающими становятся веретеновидные формы клеточных тел. Иммунореактивность проявляют отростки, ориентация которых дорсовентральная, с направлением вентрально в пластинку VII и дорсально в пластинку IV. Но, также проследить их протяженность не представляется возможным из-за их иммунореактивности, что проявляется флюоресцентной «укороченностью».

В области всего медиального края дорсального рога спинного мозга на каждом срезе выявляются иммунореактивные интернейроны овальной и веретеновидной формы с более длинными флюоресцентно мечеными отростками, ветвящимися преимущественно в дорсовентральном направлении, которые прослеживаются в области дорсальной серой спайки. В период более раннего развития, который в данном наблюдении ограничивается 20 днями жизни крысы, достаточно не трудно дифференцировать в дорсальной серой спайке области, относящиеся непосредственно к полю X и к пластинке IV, ввиду значительного размера и дорсовентральной протяженности серой спайки. Более дорсально (в пластинке IV) располагаются нейроны с более длинными иммунореактивными отростками, более вентрально (поле X) отростки нейронов являются относительно короткими.

В промежуточной зоне спинного мозга кальбиндин выявляется в нейронах как пластинки VII, так и в области локализации симпатических ядер. До 20-дневного возраста крысы популяция «разделительных нейронов» является трудно определяемой ввиду топографической близости с нейронами вставочного ядра, которые локализуются вблизи и несколько вентральнее. На *Рисунке 4.23. (В)* популяция «разделительных нейронов» обозначена стрелками. При этом, отчетливо визуализируется связь данной популяции именно с областью дорсальной серой спайки поля X, из которой фактически иммунореактивные нейроны «уходят» или «прослеживаются» в дорсальной части промежуточной зоны спинного мозга. Клеточная популяция области промежуточно-латерального

ядра является более многочисленной, но и в пластинке VII выявляется относительно больше иммунореактивных нейронов по сравнению с 90-дневной взрослой крысой.

В вентральном роге спинного мозга интернейроны, содержащие кальбиндин выявляются как в пластинке VIII, так и в области пластинки IX. Отличием являются их размерные характеристики: относительно крупные размеры интернейронов в пластинке VIII, и мелкие размеры клеток Реншоу в пластинке IX вентрального рога. В пластинке VIII иммунореактивные нейроны имеют многоугольную форму, направленность отростков медиолатеральная. В поле X кальбиндин-иммунореактивные интернейроны располагаются во всех областях, форма клеточных тел овальная и многоугольная, в вентральных областях поля X клетки мельче, чем в дорсальных областях.

Подсчет количества иммунореактивных нейронов показала, что с возрастом крысы относительное содержание меняется только в поверхностной области дорсального рога спинного мозга, в других областях с возрастом крысы относительное содержание выявляемых популяций нейронов с кальбиндином значимо не меняется. Происходит уменьшение доли иммунореактивных нейронов в пластинках I и II с 10-дневного возраста до 20-дневного возраста: в пластинке – с 41,4% до 34,5%, в пластинке II – с 30,3% до 23,2%. В последующие возраста в пластинках поверхностной области дорсального рога процентное соотношение иммунореактивных нейронов стабилизируется.

В постнатальном развитии крысы самой малочисленной популяцией являются интернейроны пластинок V, VIII и поля X, где доля клеток не превышает 1%. В пластинках III, IV и VII относительное содержание иммунореактивных не превышает 6%. В области ядер симпатических преганглионарных нейронов содержится до 20% нейронов с кальбиндином. Самой многочисленной популяцией являются интернейроны, локализованные в поверхностной области дорсального рога, доля которых в пластинке I составляет 30%, а в пластинке II 20%. Отношение клеток Реншоу к мотонейронам также с возрастом крысы не меняется и не отличается от показателей, определяемых при

окраске тионином: 1 клетка Реншоу на 10 мотонейронов в вентромедиальной области, и на 11 мотонейронов в вентролатеральной области пластинки IX.

Возрастная динамика изменения размеров иммунореактивных нейронов, определяемая по параметру их площади сечения соответствует возрастным изменениям размерных характеристик всей нейрональной популяции каждой конкретной области (пластинка/ядро). Интенсивный рост иммунореактивных нейронов отмечается в 10-дневном возрасте. При этом, в трехдневном возрасте размер иммунореактивных нейронов в пластинках дорсального рога, в ядрах и пластинке VII промежуточной зоны, в поле X и в вентральном роге (клетки Реншоу) не превышают 50 мкм^2 , в последующие возраста – не превышают 100 мкм^2 . Только в пластинке VIII вентрального рога размеры нейронов составляют в трехдневном возрасте крысы $64,2 \pm 5,7 \text{ мкм}^2$. В 10-дневном возрасте отмечается увеличение размеров популяций иммунореактивных нейронов пластинки V и VIII (более 100 мкм^2). В 20-дневном возрасте увеличиваются размеры только популяции иммунореактивных нейронов пластинки VIII, которые составляют $234,6 \pm 8,4 \text{ мкм}^2$. В последующие возраста увеличивается размер только интернейронов пластинки VIII, который к 90-дневному возрасту крысы превышает 300 мкм^2 . Во всех исследуемых возрастах крысы самые минимальные размеры имеют иммунореактивные интернейроны пластинки II (до 50 мкм^2).

4.2.2.5. Возрастные особенности распределения нейрональной NO-синтазы в сером веществе спинного мозга

На поперечном срезе спинного мозга во всех изученных возрастах крысы выявляются нейроны, содержащие nNOS в пластинках дорсального рога, в промежуточной зоне и в поле X. Иммунореактивные к nNOS нервные клетки отсутствуют в вентральном рога спинного мозга. Интенсивность свечения иммунореактивных интернейронов не меняется с возрастом крысы.

Во всех пластинках дорсального рога располагаются иммунореактивные интернейроны овальной и веретеновидной формы тела, ориентированные дорсовентрально, флюоресценцию проявляют как нейроплазма, так и отростки

клеток. Отростки иммунореактивных нейронов дорсального рога не покидают границы пластинок, в которых выявляются. Отростки иммунореактивных интернейронов области медиального края дорсального рога распространяются вентрально в область дорсальной серой спайки.

В промежуточной зоне спинного мозга иммунореактивность к nNOS проявляют нейроны симпатических ядер, локализованные в промежуточно-латеральном и вставочном ядрах. В центральной части пластинки VII иммунореактивные интернейроны не образуют клеточные группы и располагаются одиночно. Большинство иммунореактивных нейронов промежуточной зоны имеют овальную или веретеновидную формы, в области латерального рога форма нейронов различная. Но все nNOS-содержащие нейроны имеют медиолатеральную ориентацию клеточных тел и направленность их отростков.

В поле X выявляются nNOS-иммунореактивные нейроны во всех его частях, располагаются по окружности центрального канала, отростки которых переплетаются друг с другом. В области вентральной серой спайки и в центральных частях форма тел интернейронов различная, в области дорсальной серой спайки располагаются интернейроны преимущественно овальной формы. В дорсальной серой спайке интернейроны располагаются медиолатерально, их отростки относительно короче отростков нейронов, локализованных дорсальнее. На ранних сроках наблюдения (до 10-дневного возраста) определяются групповые скопления до 7-8 клеток в области дорсальной серой спайки, в других областях поля X иммунореактивные интернейроны равномерно распределяются в сером веществе, располагаясь вокруг центрального канала.

Подсчет количества иммунореактивных нейронов показала, что с возрастом крысы относительное содержание меняется только в поверхностной области дорсального рога спинного мозга. Происходит уменьшение доли nNOS-иммунореактивных нейронов в пластинках I и II с 10 дневного возраста (11,2%) до 20-дневного возраста (7,6%). Другие топографически выделяемые популяции

нейронов, содержащие nNOS с развитием крысы имеют стабильное относительное содержание и соответствуют показателям взрослой 90-дневного возраста крысы.

Возрастная динамика изменения размеров позитивных нейронов, определяемая по параметру их площади сечения соответствует возрастным изменениям размерных характеристик всей нейрональной популяции каждой конкретной области (пластинка/ядро). Интенсивный рост нейронов с nNOS отмечается в 10-дневном возрасте. При этом, в трехдневном возрасте размер нейронов в пластинках дорсального рога, в пластинке VII и в поле X не превышает 50 мкм^2 , в области симпатических ядер составляет $67,3 \pm 7,8 \text{ мкм}^2$. В 10-дневном возрасте иммунореактивных нейронов пластинок I и II превышают 50 мкм^2 , в других областях превышают 100 мкм^2 . А в 20-дневном возрасте соответствуют показателям взрослой 90-дневного возраста крысы, в целом являясь нейронами малых размеров, площадь которых не превышает 200 мкм^2 .

4.2.2.6. Возрастные особенности распределения НАДФН-диафразы в сером веществе спинного мозга

Во всех изученных возрастах крысы НАДФН-диафараза определяется в нейронах дорсального рога, промежуточной зоны и поля X (Рис. 4.24). В вентральном рога нейроны, содержащие НАДФН-диафаразу не выявляются. Продукт гистохимической реакции при определении НАДФН-диафаразы выявляется в цитоплазме и в отростках клеток. Интенсивность реакции в цитоплазме является максимальной и не зависит как от областей локализации нейронов, содержащих НАДФН-диафаразу в сером веществе спинного мозга, так и от изучаемого возраста крысы. При этом все НАДФН-диафараза-позитивные клетки имеют темно-синий цвет перикариона.

В дорсальном роге спинного мозга нейроны, содержащие НАДФН-диафаразу выявляются во всех пластинках и имеют веретеновидную и овальную формы клеточных тел. Во всех пластинках позитивные нейроны располагаются дорсовентрально, в пластинке V также присутствуют интернейроны с медиолатеральной ориентацией клеточных тел.

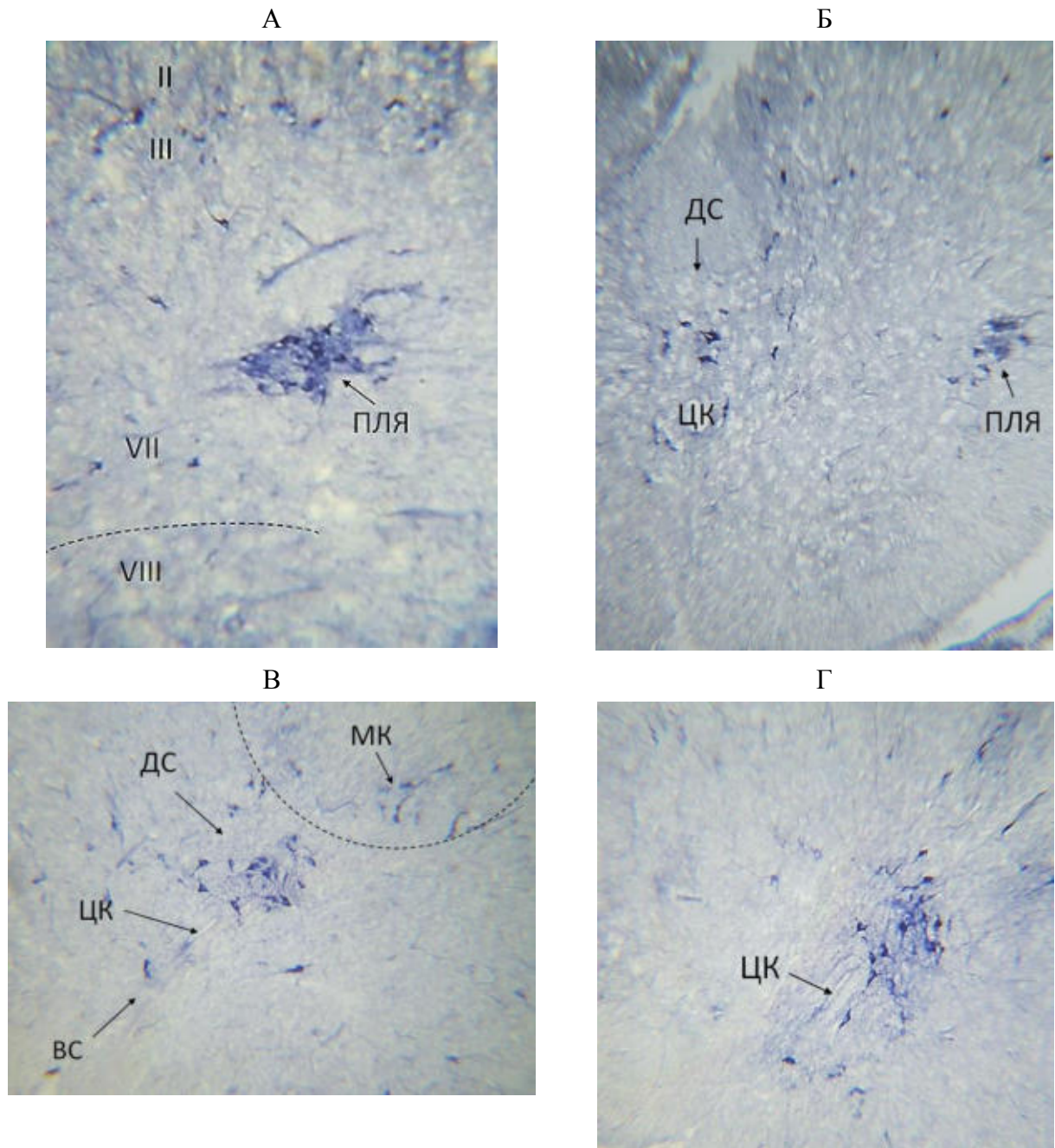


Рисунок 4.24. Топография НАДФН-диафораз-позитивных нейронов в спинном мозге в трехдневном (А, В) и 10 дневном (Б, Г) возрастах крысы. Метод Р. Лилли (1969).

А, В, Г. Об. 10, ок.10. Б. Об. 4, ок. 10.

Римскими цифрами обозначены пластинки.

В поле X: ЦК-центральный канал, ВС-вентральная серая спайка, ДС-дорсальная серая спайка.

В пластинке VII: ПЛЯ-промежуточно-латеральное ядро.

МК-область медиального края дорсального рога.

В области медиального края дорсального рога спинного мозга отростки НАДФН-диафороза-содержащих интернейронов имеют самую максимальную протяженность, направляются в область дорсальной серой спайки. Вентральнее последних в области дорсальной серой спайки непосредственно поля X присутствует многочисленная популяция позитивных интернейронов, формирующая групповые клеточные скопления (Рис. 4.24. В, Г), большинство из которых, имеют медиолатеральную ориентацию. Отростки этой популяции клеток переплетаются между собой, часть которых уходит в центральные области поля X, часть проецируется в медиальную область пластинки VII, топографически соответствующую вставочному ядру.

НАДФН-диафороза-позитивные интернейроны в поле X располагаются по окружности центрального канала, представлены овальными, веретеновидными и многоугольными формами. Темноокрашенные отростки позитивных интернейронов центральных частей и вентральной серой спайки распространяются в сером веществе промежуточной зоны спинного мозга.

НАДФН-диафороза-позитивные интернейроны, сгруппированные в области симпатических ядер имеют веретеновидные, овальные, многоугольные и треугольные формы тел. Отростки позитивных нейронов промежуточно-латерального ядра направляются радиально из серого вещества латерального рога в белое вещество латерального канатика. На некоторых срезах в белом веществе располагаются тела НАДФН-диафороза-позитивных клеток, морфологически не отличающихся от выделяемых типов интернейронов, локализованных в сером веществе спинного мозга. От области локализации промежуточно-латерального ядра в промежуточной зоне и до дорсальной серой спайки поля X располагаются нейроны вставочного ядра, преобладают овальные и треугольные формы, ориентация клеточных тел и отростков медиолатеральная. В пластинке VII вне зоны локализации симпатических ядер присутствуют позитивные нейроны овальных и многоугольных форм, имеющие медиолатеральную ориентацию, отростки не покидают границ пластинки.

Подсчет количества иммунореактивных нейронов показала, что с возрастом крысы относительное содержание меняется только в поверхностной области дорсального рога спинного мозга. Происходит уменьшение доли НАДФН-диафороза-позитивных нейронов в пластинках I и II с 10-дневного возраста (14,8%) до 20-дневного возраста (10,5%). Другие топографически выделяемые популяции нейронов, содержащие НАДФН-диафорузу с развитием крысы имеют стабильное относительное содержание и соответствуют показателям взрослой 90-дневного возраста крысы.

Возрастная динамика изменения размеров позитивных нейронов, определяемая по параметру их площади сечения соответствует возрастным изменениям размерных характеристик всей нейрональной популяции каждой конкретной области (пластинка/ядро). Интенсивный рост нейронов с НАДФН-диафорозой отмечается в 10-дневном возрасте. При этом, в трехдневном возрасте размер нейронов в пластинках дорсального рога, в пластинке VII и в поле X не превышает 50 мкм^2 , в области симпатических ядер составляет $57,6 \pm 6,7 \text{ мкм}^2$. В 10-дневном возрасте позитивные нейроны всех областей превышают 50 мкм^2 , а к 20-дневному возрасту размерные характеристики нейронов соответствуют таковым взрослой 90-дневного возраста крысы и превышают 100 мкм^2 у нейронов, локализованных в глубокой области дорсального рога, в поле X и в промежуточной зоне спинного мозга.

4.2.2.7. Заключительные замечания

Все нейроны спинного мозга в эмбриогенезе происходят только из 11 доменов-предшественников, каждый из которых производит какую-то одну – независимую линию нейронов. При этом, каждая линия дифференцируется в несколько подтипов нейронов, распределение которых в спинном мозге, в принципе, имеет общие свойства, то есть отражает пластинчатое строение его серого вещества, соответствуя дорсовентральной и медиолатеральной топографии с направлением аксонов ипсилатерально и комиссурально, и рострокаудальной топографии, обусловленной направлением нервных отростков в восходящем и

нисходящем направлении. Из данных обзора следует, что тип взрослого спинального интернейрона определяется еще до рождения крысы – то есть до установления нейрональных связей. Из результатов, полученных в ходе исследования, мы определили наличие популяций спинальных нейронов, определяемых по их нейрохимической специфичности. При этом, топография определяемых структурных и нейрохимических типов нейронов не меняется с возрастом животного и соответствует пластинчатому распределению 3 дневного возраста крысы.

Более того, количественные характеристики также являются стабильными уже с трехдневного возраста, то есть относительное содержание большинства популяций нейронов не меняется с возрастом крысы. Исключением из этой закономерности является количественный состав нейрохимических популяций интернейронов поверхностной области дорсального рога. Популяции нейронов пластинок I и II, содержащие кальбиндин, nNOS и НАДФН-диафорузу, уменьшают своё процентное содержание с возрастом крысы – с 10- до 20-дневного возраста. Чем это может быть обусловлено? Увеличение абсолютного количества нейронов в пластинках I и II до 10-дневного возраста крысы, определённая нами по окраске методом Ниссля (Глава 3), может объяснить отсутствие возрастной динамики в относительном количественном содержании популяций в этот период онтогенеза. Но, вряд ли может объяснить максимальную выявляемость веществ в нейронах до 10-дневного возраста крысы, так как стабильность абсолютного количества нейронов в пластинке III также подтверждена окраской тионином, в которой количественные характеристики популяций нейронов, содержащих кальбиндин, nNOS и НАДФН-диафорузу стабильны с трехдневного возраста крысы. В последующие возраста вплоть до 90-дневного возраста крысы абсолютное количество нейронов, выявляемых методом Ниссля в пределах пластинок уменьшается. При этом, уменьшается и относительное содержание популяций нейронов содержащих кальбиндин, nNOS и НАДФН-диафорузу, но только до 20-дневного возраста крысы, а в последующие возраста остается неизменным и соответствует показателям взрослой 90-дневного

возраста крысе. Анализ совокупности определяемых нейрохимических популяций вносит ясность в возрастную динамику изменения количества популяций в пластинках поверхностной области дорсального рога спинного мозга. Экспрессия кальцитонин-ген-родственного пептида является временно высокой во время формирования нервно-мышечных соединений в онтогенезе, что связано с ранними стадиями синаптогенеза: экспрессия кальцитонин-ген-родственного пептида усиливает высвобождение нейротрофических факторов и способствует формированию соединений (Kim et al., 2016). По мере формирования синапсов, экспрессия кальцитонин-ген-родственного пептида снижается. Данный феномен находит подтверждение в нашем исследовании, мы также обнаружили временную иммунореактивность к кальцитонин-ген-родственному пептиду у мотонейронов пластинки IX до 10-дневного возраста крысы. Но, в поверхностной области дорсального рога нами показано расширение зон проекций нервных волокон, содержащих вещество P и кальцитонин-ген-родственный пептид в 20-дневном возрасте крысы, то есть увеличение экспрессии этих нейропептидов наблюдается позднее, чем в мотонейронах вентрального рога. По-видимому, это обусловлено разными временными сроками вставания аксонов первичных афферентов в серое вещество спинного мозга крысы: А-волокна начинают вставать в эмбриональном периоде, а С-волокна врастают до 21 дня постнатальной жизни (Fitzgerald, Jennings, 1999). Расширение дендритных полей мотонейронов также ограничено временным интервалом – в ростральных сегментах 10 днём постнатальной жизни, в более каудальных сегментах – тремя неделями жизни, что связывают с ростом количества дендритов и последующей их регрессией (Cummings, Stelzner, 1984; Kalb, 1994). В нашей работе мы обнаружили ХАТ-иммунореактивные структуры подобные синаптическим в отростках и соме мотонейронов только в раннем периоде онтогенеза, ограниченным 20-дневным возрастом крысы, что согласуется с данными других исследований (Bolekova et al., 2011). По-видимому, экспрессия кальбиндина, nNOS и НАДФН-диафоразы в большем количестве нейронов в пластинках I и II дорсального рога спинного мозга обусловлена или активным синаптогенезом

врастающих волокон первичных афферентов, или расширением дендритных полей этих позитивных нейронов. Показано, что развитие дендритных арборизаций, протяженность аксонов и развитие их коллатералей коррелирует с размерами тел нейронов, усложнение ветвлений приводит к нарастанию полиморфизма и к более тонкой функциональной специализации нейронов центральной нервной системы (Цехмистренко, Черных, 2012). Увеличение размеров популяция нейронов в постнатальном развитии крысы характеризуется гетерохронностью. Так, наиболее быстро растут и достигают размерных характеристик взрослых нейронов – популяции нейронов, экспрессирующие: белок нейрофиламентов и кальбиндин – 10-дневный возраст крысы; ХАТ, nNOS и НАДФН-диафоруазу – 20-дневный возраст крысы. Но, более длительно мотонейроны, содержащие ХАТ и белок нейрофиламентов (30-дневный возраст крысы) и кальбиндин-иммунореактивные интернейроны пластинки VIII (90-дневный возраст крысы). При этом, популяции нейронов, экспрессирующие какое-либо вещество, имеют свои конкретные структурные признаки, которые характеризуют всю позитивную популяцию в целом вне зависимости от её топографической принадлежности в сером веществе спинного мозга. Таким образом, межнейрональные связи формируются уже через имеющиеся структурно-функциональные клеточные элементы, обусловленные генетическими механизмами происхождения спинальных нейронов (Friese et al., 2009; Alvarez et al., 2013; Francius et al., 2013; Floyd et al., 2018).

Глава 5. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СПИННОМОЗГОВОГО УЗЛА

5.1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обширная литература свидетельствует о сложной организации спинномозгового узла как афферентного центра. Сложности в изучении вопросов развития общих видов чувствительности заключаются в том, что у всех позвоночных основная схема рецепторной системы представлена периферическим чувствительным нейроном. Несомненно, научный интерес к дифференцированности чувствительного нейрона связан с растущими требованиями к общей чувствительности как с позиций адаптационного влияния фармакологических препаратов и интерпретации клинических фактов, так и с позиций изучения организации афферентного центра в исследованиях нейрофизиологов.

5.1.1. Нейрохимическое разнообразие сенсорных нейронов

Чувствительные узлы представляют собой гетерогенную популяцию нейронов (Золотарев, Ноздрачев, 2001; Рагинов, Челышев, 2003; Holzer, Maggi, 1998; Aimi et al., 1991; Hall et al., 1997; Russo et al., 2010), разнообразие которых установлено различными методами исследования. Сенсорные нейроны неоднородны по морфологическим, гистохимическим, иммуноцитохимическим, рецепторным характеристикам (Берсенеv, 1980; Bridges et al., 2003; Babes et al., 2004; Fuchs et al., 2005), а также по связям с органами – мишенями иннервации (Aoki et al., 2004; Emanuilov et al., 2005; Ivanusic, 2009). Как правило, в работах отмечаются (Piper, Docherty, 2000; Aoki et al., 2004; Bombardi et al., 2010; Russo et al., 2010) неоднородность нервных клеток по размерам, характеру базофильной субстанции, по содержанию различных белков, липидов, ферментов, медиаторов. В некоторых работах обсуждаются вопросы топографии нервных клеток. Для части чувствительных узлов типичным является топический принцип

локализации нервных клеток, то есть топографическая общность нейронов, отростки которых формируют конкретную ветвь узла и связаны с общей мишенью иннервации (Bossowska et al., 2009; Le Pichon, Chesler, 2014).

Традиционно считалось, что афферентные нейроны лишь воспринимают действие раздражителей и передают возбуждение эфферентным нейронам или интернейронам. Однако, в последнее время установлено существование особой группы нейронов: афферентные с эфферентной функцией, терминали которых выделяют нейропептиды, обеспечивая реализацию "локальной эфферентной функции". Таким образом, часть афферентных волокон выполняет чисто афферентную функцию, другая часть только местную эфферентную функцию, и, наконец, третья группа волокон способна осуществлять двойную функцию – и афферентную и местную эфферентную (Holzer, Maggi, 1998; Золотарев, Ноздрачев, 2001; Cervero, Laird, 2004). Более того, у речной миноги показано существование эфферентных волокон в дорсальных корешках, представляющих собой коллатерали аксонов первичных афферентов, что предполагает наличие определенного класса сенсорных нейронов, обладающих эфферентной функцией (Аданина, Веселкин, 2017).

В настоящее время первостепенное значение придается изучению особенностей нейромедиаторов, что может способствовать выявлению характера обменных процессов в нейроне и возможностей адекватной его реакции на меняющиеся условия существования. Вероятно, это объясняется значением первичных и вторичных мессенджеров в обеспечении многообразных процессов, имеющих существенное значение для понимания функции нейрона и его изменений при воздействии антропогенных факторов.

Белок нейрофиламентов 200 кДа является маркером крупных нейронов чувствительных узлов, имеющих миелинизированные аксоны и реагирующих на механические стимулы (Perry et al., 1991; Lawson, Waddell, 2001). Белок нейрофиламентов 200 кДа в цитоплазме сенсорных нейронов как правило распределяется гомогенно, флюоресценцией обладают не только клеточные тела, но и волокна, что является индикатором их миелинизации (Петрова и др., 2012).

Имеются видовые различия, касающиеся содержания нейронов с белком нейрофиламентов 200 кДА в чувствительных узлах. Его экспрессия обнаруживается в 45% нейронов нижних грудных и верхних поясничных узлов овец, в 15% нейронов нижних поясничных узлов и 30% нейронов верхних грудных и поясничных узлов крыс (Порсева и др., 2013; Russo et al., 2010). Экспрессия белка нейрофиламентов 200 кДА обнаруживается в 40% нейронов, иннервирующих большеберцовую кость, примерно в том же количестве – 43% в нейронах, иннервирующих кожу (Ivanusic, 2009).

За последнее время был клонирован целый ряд температурно-чувствительных ионных каналов из семейства TRP-каналов (TRP, транзиторный рецепторный потенциал). Семейство рецепторов TRP представляет собой различные типы, ассоциированные с неспецифическими ионными каналами, предназначенными для переноса преимущественно ионов кальция и натрия (Clapham, 2003; Spicarová et al., 2014).

Рецепторы TRPV1 (ваниллоидные или капсаициновые) чувствительны к капсаицину, теплу и низкому значению pH (Gavva, 2008; Holzer, 2008). TRPV1 рецепторы локализуются преимущественно на мембранах первичных афферентов, участвующих в передаче ноцицептивных сигналов и формировании нейрогенного воспаления (Szallasi, 2002; Szolcsanyi, 2004; Gavva, 2008; Dux et al., 2012). Установлено также, что TRPV1-рецепторы локализуются в С-волокнах и их ветвлениях, образованных нейронами чувствительных узлов малого и среднего размеров (Золотарев, Ноздрачев, 2001; Piper et al., 2000; Ma, 2002; Spicarová et al., 2014).

Наличие гетерогенных популяций афферентных нейронов, различных по рецепторному и нейрохимическому составу дает возможность избирательного влияния на отдельные группы нейронов при помощи фармакологических препаратов. Введение капсаицина в нейротоксических дозах вызывает изменения нейрофиламентного состава нейронов чувствительных узлов (Ferri et al., 1990; Clapham, 2003), приводит к уменьшению средней площади сечения нейронов, содержащих белок нейрофиламентов 200 кДА, нивелирует сегментарные

различия размерных характеристик нейронов и изменяет динамику роста этих клеток (Порсева, 2011). В периода наблюдения, который составил один год, после введения токсической дозы капсаицина, в грудных и поясничных чувствительных узлах доказывается гибель более крупных чувствительных клеток, содержащих белок нейрофиламентов 200 кДа. Учитывая это и данные литературы о возможной сококализации TRPV1-рецепторов с рецепторами нейронов, содержащих белок нейрофиламентов 200 кДа (Yoshimura et al., 1998; Suzuki et al., 2003), можно говорить о повреждении капсаицином чувствительных нейронов, имеющих как немиелиновые С-волокна, так и миелиновые А-волокна (Spicarová, Palecek, 2008). Высокомолекулярный компонент нейрофиламентов служит маркером нейронов, образующих А-волокна популяций проприцептивных больших и тактильных средних нейронов (Yoshimura et al., 1998; Рагинов, Чельшев, 2003; Shaw et al., 2005; Коржевский и др., 2010). Таким образом, открываются новые перспективы в понимании нейрофизиологических механизмов боли, а также разработке подходов к лечению в связи с идентификацией роли трансмиссерных систем, участвующих в регуляции афферентной импульсации. На повреждение периферического отростка выраженная реакция отмечается именно в сенсорных нейронах, содержащих белок нейрофиламентов с молекулярной массой 200 кДа (Рагинов, Чельшев, 2003).

Активация TRPV1-рецепторов приводит к повышению проводимости неселективных катионных каналов, что усиливает выделение вещества Р и кальцитонин ген родственного пептида из терминалей первичных афферентов (Szolcsanyi, 2004; Vucelli et al., 2008; Спиридонов, Толочко, 2010).

Вещество Р и рецептор NK1 широко распространены в периферической нервной системе, участвуя центрально в воротном контроле боли и периферийно в развитии нейрогенного воспаления (Wiley et al., 2007; Thomson et al., 2008). Вещество Р активирует рецепторы и тем самым облегчает передачу импульса по путям проведения болевой чувствительности, вызывает сенситизацию ноцицепторов, высвобождение гистамина их тучных клеток, серотонина из

тромбоцитов, является мощным вазодилататором и хемоаттрактантом для лейкоцитов (Zieglgänsberger, 2019).

Кальцитонин-ген-родственный пептид является наиболее распространенным нейропептидом первичных афферентных нейронов, содержится в 30-40-50% нейронов чувствительного узла, имеющих С-, Аδ- и Аα/β-волокна (Lawson, Waddell, 2001; González-Hernández et al., 2016), большинство из которых являются ноцицепторами (Russell et al., 2014).

Все первичные афферентные содержат в качестве основного нейротрансмиттера глутамат (Todd, 2010), оказывая тем самым возбуждающее действие на постсинаптические нейроны спинного мозга. Малые клетки в чувствительных узлах в соответствии с нейрохимическим фенотипом делятся на 2 класса: пептидергические и непептидергические (Snider, McMahon, 1998). Отличием пептидергических нейронов является формирование не только аксо-дендритических, но и в большинстве своем аксо-аксональных синапсов (Ribeiro-da-Silva, 2004). Около 60% всех нейронов чувствительных узлов представлены малыми по диаметру клетками, имеющими немиелинизированные С-типа аксоны и Аδ-типа (McCarthy, Lawson, 1990). Электрофизиологические исследования установили, что около 90% этих клеток у мыши, крысы, обезьяны и человека выполняют ноцицептивную роль (Thomson et al., 2008; Russel et al., 2014), а около половины из них экспрессируют кальцитонин-ген-родственный пептид или вещество Р.

Таким образом, определенная надежда на выделение групп интернейронов, связанных с ноцицептивной чувствительностью, связана с выявлением в них нейропептидов. У крысы пептидергические первичные афференты в функциональном отношении являясь ноцицептивными (Lawson et al., 1997; Russel et al., 2014), оканчиваются в основном в пластинке I и во внешней части пластинки II (Todd, 2002), в нейронах которых, синтеза вещества Р и кальцитонин-ген-родственного пептида не обнаружено (Ribeiro-da-Silva, 2004).

На долю пептидергических нейронов приходится около 30% всех нейронов чувствительного узла у млекопитающих и человека (Franco-Cereceda et al., 1987; Ichikawa et al., 1993; Aoki et al., 2005), но существуют видовые особенности их распределения: у крысы число нейронов с веществом P не превышает 10%, у овец оно может достигать 42%. Количество клеток, содержащих кальцитонин-ген-родственный пептид, очень варьирует в зависимости от органа-мишени (Bennett et al., 1996), между представителями одного вида (Tonra, Mendell, 1998). В нейронах, иннервирующих кожу, кальцитонин-ген-родственный пептид определяется в 53%, а в чувствительных нейронах, посылающих волокна к кости – в 23% нейронов узла преимущественно малого и среднего размера (Ivanusic, 2009). Около половины нейронов, иммунопозитивных к кальцитонин-ген-родственному пептиду содержат вещество P, в свою очередь, почти все вещество P-иммунореактивные нейроны являются содержащими кальцитонин-ген-родственный пептид (Ichikawa et al., 1993). В тройничном ганглии взрослого человека обнаружено около 40% нейронов иммунореактивных к кальцитонин-ген-родственному пептиду, 18% нервных клеток проявляют иммунореактивность к веществу P. Менее 5% нейронов тройничного ганглия, содержащих кальцитонин-ген-родственный пептид, являются NOS-положительными (Tajti et al., 1999).

Кальцитонин-ген-родственный пептид является сильным вазодилататором (Luger, 2002; Russo, 2015). В зависимости от дозы он вызывает подавление нейрогенного сокращения гладких мышц (Gazelius et al., 1987) или, наоборот, их сокращение (Goodman, Iversen, 1986). Наряду с этим, кальцитонин-ген-родственный пептид вместе с веществом P инициируют развитие нейрогенного воспаления и гипералгезию желудка (Kondo et al., 2010; Zieglgänsberger, 2019), увеличивают сосудистую и тканевую проницаемость, активируют соединительнотканые клетки в периферических тканях (Holzer, 1992; Russo, 2015). В тоже время, кальцитонин-ген-родственный пептид может выступать ингибитором вещества P, поэтому его сосуществование с веществом P можно объяснить усилением передачи, опосредуемой веществом P, за счет его деградации (LeGreves et al., 1985). Предполагается, что вещество P и

кальцитонин-ген-родственный пептид нейронов поясничных узлов участвуют в регуляции интраганглионарного кровотока (Kobayashi et al., 2010).

Помимо нейропептидов, к числу нейротрансмиттеров относятся и мелкие молекулы, в частности внутриклеточный мессенджер - оксид азота (NO). Он образуется при окислении L-аргинина гемовым белком – NO-синтазой (NOS). NO обладает свойствами классического мессенджера, быстро диффундирует, является короткоживущим, может легко пересекать мембрану, попадать в соседние клетки без участия рецепторов. В нейронах нейрональная NOS (nNOS) расположена вблизи NMDA-глутаматного рецептора, поэтому быстро и интенсивно отвечает на вход ионов кальция.

Имеются достаточно противоречивые данные, свидетельствующие о проноцицептивном и антиноцицептивном действии NO в сенсорных нейронах. У человека большинство сенсорных нейронов блуждающего нерва являются NO-положительными и одновременно вещество P-негативными (Tajti et al., 1999). NO может играть роль в процессах сенситизации за счет синтеза цГМФ и последующего фосфорилирования специфических мембранных белков опосредованного через протеинкиназу C. NO также может активировать различные типы TRP каналов, потенцировать тетродотоксин-резистивные натриевые токи, что способствует воспалительной гиперальгезии и снижению болевого порога (Berta et al., 2017). Возможное антиноцицептивное действие NO связано с открытием АТФ-чувствительных калиевых каналов на мембране ноцицепторов, приводящее к гиперполяризации и снижению возбудимости (Petho, Reeh, 2012).

Фермент синтеза оксида азота – NO-синтаза (NOS) связана с НАДФН-диафоразой (Vizzard et al., 1994; Охотин, Шуклин, 2006; Коржевский и др., 2007). У крыс в чувствительных узлах с первого шейного по четвертый грудной и со второго поясничного до последнего крестцового данные клетки составляют менее 2% от общего количества нейронов узла, однако, их много (до 50%) с пятого грудного по первый поясничный узел (Terenghi et al., 1993). У овец с 13 грудного по 2 поясничный узел, процент нейронов, содержащих NOS,

составляет 44% (Russo et al., 2010). Что касается нейронов чувствительных узлов шейного, грудного, поясничного и крестцового уровней крысы, то их состав гетерогенен: активность НАДФН-диафоразы выявляется преимущественно в мелких и средних нервных клетках, количественное содержание которых возрастает в кранио-каудальном направлении (Rybarova et al., 1999).

Методом двойной метки в нейронах чувствительных узлов уровней T5-L1 выявлена солокализация НАДФН-диафоразы с кальцитонин-ген-родственным пептидом и веществом P (Rybarova et al., 2000). Известно, что через диафоразопозитивные нейроны тораколумбального отдела спинного мозга проходит афферентная импульсация к внутренним органам (Aimi et al., 1991). В грудных и поясничных чувствительных узлах около 1% нейронов содержат совместно NOS и белок нейрофиламентов 200 кДа у взрослой крысы (Маслюков и др., 2014). В то же время, в поясничных спинномозговых ганглиях у крысы активность НАДФН-диафоразы выявляется во всех размерных классах нейронов узлов (мелкие, промежуточные, крупные) и имеет одинаковое распределение (Miyata H. et al., 1997).

Использование гистохимических методов и избранный подход к оценке результатов позволяют доказательно считать, что активностью НАДФН-диафоразы в шейном узле спинномозгового нерва обладают 4-5% клеток (Порсева, Шилкин, 2011). ХАТ обнаруживается в половине нейронов афферентного узла преимущественно в клетках средних и малых размеров (Мотавкин, Охотин, 1983). Е.А. Колос, Д.Э. Коржевский (2016) показали ХАТ-иммунопозитивность всех нейронов и их отростков в шейных чувствительных узлах половозрелой крысы, описывая экспрессию ХАТ как слабую иммунореактивность по выраженности цитоплазматической окраски, что объясняют наличием в периферической нервной системе особого варианта фермента, обозначаемого как ХАТ периферического типа.

Кальций-связывающие белки участвуют в транс-клеточном транспорте ионов кальция и модулируют эффекты, возникающие в ответ на изменения внутриклеточной концентрации кальция, функционируя в качестве своеобразного

буфера и обеспечивая кальциевый гомеостаз (Neher, 2008; Schwaller, 2009), широко представлены в периферической нервной системе. В чувствительных узлах взрослой крысы процент нейронов, экспрессирующих кальретинин составляет 5-8% (Ambrus et al., 1998), кальбиндин – 20-30% (Carr et al., 1989), парвальбумин – 25% (Medici, Shortlan, 2015). Аналогичный процент кальбиндин-иммунореактивных нейронов выявляется и в других узлах – чувствительном узле блуждающего нерва и тройничном ганглии (Ruan et al., 2004). Кальций-связывающие белки экспрессируются различными популяциями сенсорных нейронов поясничных узлов у крысы: кальбиндин – нейронами малых размеров, парвальбумин – крупных размеров (Honda, 1995). Парвальбумин идентифицирует популяцию проприоцептивных крупных и средних размеров нейронов чувствительного узла (Medici, Shortlan, 2015). Методом двойного мечения обнаружена совместная локализация кальбиндина и вещества Р в сенсорных нейронах (Li et al., 2005), напротив солокализация кальций-связывающих белков с кальцитонин-ген-родственным пептидом обнаруживается лишь в единичных нейронах (Medici, Shortlan, 2015).

Дисфункция кальциевой буферной системы в чувствительных нейронах может приводить к их дегенерации (Gibbons et al., 1993). Показана устойчивость нейронов, содержащих кальций-связывающие белки, к глутамат-индуцированной нейротоксичности (Szallasi, Blumberg, 1999; Punnakkal et al., 2014).

Новые перспективы в понимании нейрофизиологических механизмов чувствительности открылись в связи с идентификацией и исследованием функциональной роли нейротрансмиттерных систем, участвующих в регуляции афферентной импульсации. Большинство сенсорных нейронов являются модально-специфичными в физиологических условиях, но эта специфичность нарушается при различных патологических процессах, таких как воспаление или же повреждение ткани (Berta et al., 2017). Крупные сенсорные нейроны являются низкопороговыми, быстро проводящими и обладают миелинизированными А α - и А β -волоконками, которые осуществляют проприоцепцию и механорецепцию. Мелкие сенсорные нейроны имеют высокий порог активации и являются

ноцицепторами, передающими боль, дающие либо тонкие миелиновые А δ -волокна средней скорости, либо немиелинизированные С-волокна с медленной проводимостью (Ноздрачев, Маслюков, 2019).

У крысы все нейроны поясничных узлов распределяют по параметру площади на две популяции – крупных (более 1500 мкм²) и малых (менее 1500 мкм²) размеров, последние составляют около 70 % нейронов узла (Kishi et al., 2002). Нейроны нижних поясничных узлов у крысы классифицируют в зависимости от их диаметра на малые (менее 30 мкм), средние (30-45 мкм) и большие (более 45 мкм) (Ma, LaMotte, 2005).

В грудных чувствительных узлах у крысы нейроны классифицируют по диаметру сомы на малые (менее 30 мкм), средние (30-39 мкм) и большие (более 40 мкм) (Ghorbani et al., 2013). X. Zhao et al. (2013) у крысы в чувствительных узлах также выделяют три размерных типа нейронов, но показатели диаметра нейронов отличаются: для нейронов малых размеров составляют менее 25 мкм; для средних – 25-35 мкм; для крупных – более 35 мкм.

В тройничном узле у крысы нейроны в зависимости от их диаметра делят на малые (менее 22 мкм), средние (22-29 мкм) и большие (более 29 мкм) (Sankaran et al., 2016). У мыши нейроны поясничных чувствительных узлов на основании показателя площади сечения клеточного тела распределяют на две популяции: крупных (500–1950 мкм²) и малых (50–500 мкм²) размеров (Hiura, Sakamoto, 1987). У собак в чувствительных спинальных узлах нейроны классифицируют в соответствии с их диаметром на крупные (более 40 мкм) и малые (менее или равно 40 мкм), в литературе описываемые соответственно как нейроны типа А и типа В (Schwarz et al., 2019). В большинстве работ к нейронам типа А относят крупные и светлые клетки, к нейронам типа В – маленькие и темные клетки (Andres, 1961; Lawson, Waddell, 2001; Schwarz et al., 2019).

Подробное описание ультраструктуры цитоплазматических компонентов, а также клеточных структур неизбежно привело к классификации нейронов по определенным морфологическим признакам перикариона. В определяющемся многообразии нейронов удастся сгруппировать их в два типа: нейроны типа А

характеризуются яркой нейроплазмой, выраженной субстанцией Ниссля, определяющимся аксоном и гофрированной ядерной мембраной; нейроны типа В имеют очень тонкие отростки и гладкую поверхность ядерной мембраны, относительно высококонтрастную нейроплазму, в которой тигроид распределен диффузно (Andres, 1961). Соответственно этому, Т. Tandrup (2004) показал, что клетки типа А имеют миелинизированные волокна, а клетки типа В – немиелинизированные волокна, при этом клетки типа В реагируют на аксотомию быстрее, чем клетки типа А. Y. Sugiura et al. (1988) определили сенсорные модальности, которые проявляют малые нейроны типа В, имеющие исключительно С-волокна: более малый диаметр нейронов характерен для механорецепторов и ноцицепторов, более большой диаметр имели нейроны, обеспечивающие исключительно механорецепторную чувствительность.

E.R. de Moraes et al. (2017) связывают размеры клеток с их сенсорной функцией на основании скорости проводимости и предполагают, что сенсорные модальности, связанные с быстрыми скоростями проводимости А α - и А β -волокон, вероятно, опосредованы нейронами с большими клеточными телами, тогда как медленно проводящие А δ - и С-волокна связаны с маленькими клеточными телами. Но, в некоторых исследованиях показано, что присутствуют в чувствительном узле ноцицепторы, имеющие крупные миелинизированные А-волокна, размеры клеточных тел которых являются переменными – от мелких до крупных (Djoughri, Lawson, 2004).

К сожалению, разные объекты, методы и задачи исследований создают сложности для обобщения имеющихся данных и сопоставления нейронов выявляемых популяций по морфологическим и гистофункциональным характеристикам.

5.1.2. Развитие сенсорных нейронов в пре- и постнатальном онтогенезе

Нейроны чувствительных узлов спинномозговых нервов развиваются из клеток нервного гребня, мигрирующих из дорсальной нервной трубки (Marmigère,

Ernfors, 2007; Liu, Ma, 2011). Вначале в закладках узлов появляются более крупные и светлые нейроны, которые впоследствии дифференцируются в проприоцептивные и механорецептивные нейроны с быстрыми миелинизированными А-волоконками. Позднее появляются мелкие и темные нейроны, которые будут дифференцироваться в нейроны с А δ - и С-волоконками, имеющими более разнообразные функциональные свойства (Liu, Ma, 2011; De Moraes et al., 2017).

В период с 11 по 13 день эмбриогенеза клетки спинальных чувствительных узлов у крысы представлены исключительно нейробластами, последующий рост и дифференцировка нейронов происходит в плодный период развития – с 15 дня, к началу которого завершается формирование чувствительных узлов как самостоятельных органных структур (Сысов и др., 1992). Однако, уже в раннем эмбриональном периоде показано наличие TRPV1-рецепторов в сенсорных нейронах (Jordt et al., 2003). Экспрессия различных типов рецепторов тирозинкиназ в нейронах спинальных узлов у грызунов впервые наблюдается в период нейрогенеза (между 10 и 13 эмбриональным днем).

Тирозинкиназы являются высокочувствительными к фактору роста нервов и нейротрофину 3 (Ernsberger, 2009). Сенсорная модальность нейрона чувствительного узла коррелирует с экспрессией подтипов тирозинкиназ: нейроны с А δ - и С-волоконками экспрессируют тирозинкиназу типа А, механорецепторы – типа В, проприоцепторы – типа С (Ernsberger, 2009; Liu, Ma, 2011). В эмбриогенезе крысы количество нейронов, содержащих рецепторы тирозинкиназ, возрастает с 12 по 18 день развития (Molliver, Snider, 1997). В постнатальном онтогенезе, напротив, доля этих нейронов снижается, а к 14-21 дню жизни их количество уменьшается почти вдвое и далее не изменяется (Molliver et al., 1997), что объясняется установлением связей с органами-мишенями (De Moraes et al., 2017). У взрослого человека тирозинкиназа тип В экспрессируется в разных по размеру сенсорных нейронах, тип А – преимущественно в малых клетках, тип С – в крупных (Josephson et al., 2001).

В постнатальном развитии крысы в чувствительных узлах отмечается увеличение как размеров нейронов (Ковригина, Филимонов, 1998; Румянцева, 2000), так и их количества (Сысов, 1996; Popken, Farel, 1997). Такая разница в числе нейронов между взрослыми и новорожденными крысами может быть вызвана либо пролиферацией нейронов, либо их поздней дифференцировкой (Popken, Farel, 1997). В части работ показана постнатальная стабильность количественных характеристик нейронов в симпатическом узле, которая обусловлена увеличением как размера нейронов, так и непосредственно объема самого узла (Ladd et al., 2012). В тоже время, вне зависимости от принадлежности нервных структур к центральным или периферическим органам нервной системы, имеется общая возрастная тенденция, которая заключается в постнатальном уменьшении числа нейронов (Lloyd, 2013) что объясняют текущей адаптацией и ремоделированием внутриорганных структур после рождения.

В последнее десятилетие активно обсуждаются вопросы взрослого нейрогенеза в периферической нервной системе (Kim, Sun, 2012): существование бромдезоксисуридин-положительных нейронов в симпатическом узле у животных различного возраста, постнатальная стабильность количественного нейронального состава нервных узлов (Ladd et al., 2012), экспрессия нестина нейронами чувствительных узлов взрослой крысы (Czaja et al., 2012). Существование нейрональных стволовых клеток вдоль желудочковой системы, включая третий и четвертый желудочки головного мозга и центральный канал спинного мозга (Martens et al., 2002) в тоже время не предполагает спонтанного нейрогенеза, что обусловлено ограниченной способностью к пролиферации в физиологических условиях: клетки представляют собой «спящие формы» (Kim, Sun, 2012). В отличие от центральной нервной системы, нейроны и глиальные клетки периферической нервной системы происходят из нервного гребня во время эмбрионального развития и сохраняются во взрослом чувствительном узле (Li et al., 2007). Спонтанного нейрогенеза в периферической нервной системе также не обнаружено, более того, пока неизвестно, могут ли вообще вновь созданные

нейроны периферической нервной системы быть интегрированы в существующие нейронные цепи (Kim, Sun, 2012).

Не все трансммиттеры или связанные с трансммиттерами нейропептиды выявляются одинаково во время жизни нейрона, в период развития уровни некоторых субстанций изменяются значительно (Popken, Farel, 1997). В постнатальном онтогенез параллельно с увеличением размеров нейронов изменяется процентное соотношение клеток, содержащих различные нейротрансммиттеры, которое может, как увеличиваться (Васильева и др., 2011; Маслюков и др., 2014), так и уменьшаться (Masliukov et al., 2015).

Нейроны, экспрессирующие белок нейрофиламентов 200 кДа обнаруживаются в эмбриональном периоде, процент их в чувствительных узлах меняется от 16 дня пренатального периода до момента рождения – возрастает с 12% до 30%. Тем не менее, часть исследований свидетельствует, что в первые две недели жизни процент этих нейронов также возрастает в чувствительных узлах на одну треть (Li et al., 2011). У крысы физиологическая функция С-волокон полностью не установлена до 2 недель после рождения, но А-волокна являются функционирующими уже к моменту рождения (Fitzgerald, Jennings, 1999; Woodbury, Koerber, 2003), что подтверждается наличием реакции на нейрофиламенты крупными сенсорными нейронами с миелинизированными Аβ-волоконками (Ririe et al., 2008).

В нейронах чувствительных узлов крысы вещество Р впервые обнаруживается на стадии E.19.5 и уровня взрослых животных достигает к рождению (Marti et al., 1987). Количество нейронов, проявляющих иммунореактивность к кальцитонин-ген-родственному пептиду в нейронах шейных узлов увеличивается в период от средней до поздней фетальной стадии (Molliver et al., 1997). Выявлено, что на стадии E15 в чувствительных узлах у крысы кальцитонин-ген-родственный пептид визуализируется в единичных клетках, очень мало таких клеток на стадии E18.5 (Hall et al., 1997) и на стадии E15 у мыши (Molliver et al., 1997). К 1-му дню жизни их количество устанавливается на уровне 20%. У взрослых особей фактор роста нервов в

нейронах чувствительных узлов регулирует экспрессию вещества Р и кальцитонин-ген-родственного пептида, часто солокализованных с тирозинкиназой А (Shadiack et al., 2001). В первую неделю жизни процент кальцитонин-ген-родственный пептид содержащих нейронов возрастает до 30% и далее не изменяется (Hall et al., 1997). В тоже время, показано, что у крыс количество нейронов, содержащих вещество Р или кальцитонин-ген-родственный пептид в чувствительных узлах является одинаковым как у новорожденных, так и у взрослых (Nothias et al., 1993). Интересно, что нейрохимический фенотип в отношении вещества Р и кальцитонин-ген-родственного пептида устанавливается в эмбриональном периоде еще до установления контакта с органами-мишенями иннервации. Культивирование эмбриональных нейронов чувствительных узлов в отсутствии органов-мишеней не влияет на экспрессию в них вышеуказанных нейропептидов (Hall et al., 1997).

В отношении возрастных изменений кальцитонин-ген-родственного пептида в периферических волокнах данные также противоречивы. Установлено, что в воздухоносных путях афферентные волокна, содержащие кальцитонин-ген-родственный пептид выявляются с момента рождения, причем у крысы содержание данного нейропептида не остается постоянным, а снижается с момента рождения до 21 дня жизни (Cadieux et al., 1986). В то же время, содержание кальцитонин-ген-родственного пептида в предсердии крысы возрастает после рождения, становится максимальным к 60 дню, и после чего уменьшается (Kuncová, Slavíková, 2000).

Иммунореактивность к кальбиндину 28 кДа появляется на 19 эмбриональный день в нейронах спинальных узлов у крысы, экспрессия которого к рождению аналогична взрослым животным (Enderlin et al., 1987). J.H. Zhang et al. (1990) обнаружили экспрессию кальбиндина в нейронах спинальных узлов на 16 эмбриональный день у крысы, постнатальное развитие сопровождалось увеличением количества нейронов с кальбиндином с достижением к 35 дневному возрасту крысы взрослых характеристик (Zhang et al., 1990). Обычно кальбиндин локализуется или в клеточных телах или в дендритах, но иногда

иммунореактивность проявляют аксонные терминалы (Yoshida et al., 1990). У новорожденных цыплят кальбиндин выявляется в двух популяциях клеток – в крупных А-клетках с огромными блоками шероховатого эндоплазматического ретикулума, и в небольших В-клетках с параллельными цистернами шероховатой эндоплазматической сети (Philippe, Droz, 1988). У новорожденных крысят нейроны с кальбиндином имеют большие и средние размеры, в постнатальном периоде добавляется иммунореактивность к кальбиндину и в малых нейронах (Zhang et al., 1990).

Данные по нейрохимическим характеристикам нейронов чувствительных узлов в постнатальном онтогенезе являются ограниченными. Ряд авторов отмечает, что в раннем постнатальном развитии крысы нейроны чувствительных узлов проявляют высокую ферментативную активность, которая с возрастом животного снижается или не изменяется (Румянцева, 2000), или повышается (Ковригина, Филимонов, 1998). Гетерогенность популяций нейронов чувствительных узлов обусловлена асинхронностью активности их ферментных систем, в результате чего формируются разные типы нейронов: крупные светлые нейроны, мелкие и более темные клетки (Ковригина, Филимонов, 1998). Большинство работ связано с выявлением нейротрофических рецепторов в нейронах у крыс различных возрастов (Molliver, Snider, 1997; Shadiack et al., 2001; Ernsberger, 2009; Liu, Ma 2011). В меньшей степени изучены сегментарные особенности распределение нейротрансмиттеров в спинномозговых узлах, которые связывают с рострокаудальным градиентом (Rybarova et al., 1999; Masliukov et al., 2014). Экспрессия TRPV1-рецепторов сенсорными нейронами является максимальной у новорожденных крыс по сравнению с взрослыми крысами и более выражена в каудальном направлении (Spicarová, Palecek, 2008).

Таким образом, в литературе недостаточно освещены процессы развития популяций сенсорных нейронов, что важно для понимания механизмов формирования морфофункционального ответа нейрона в норме и коррекции при патологических процессах.

5.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1.2.1. Нейрональный состав спинномозгового узла у взрослой крысы

На окрашенных тионином срезах спинномозговых узлов у взрослой крысы выявляются нейроны различных размеров, которые распределяются следующим образом:

- очень малые (до 300 мкм²) – 23,2±0,9%;
- малые (301-600 мкм²) – 19,6±0,2%;
- средние (601-900 мкм²) – 21,2±0,5%;
- крупные (901-1200 мкм²) – 11,4±0,9%;
- очень крупные (более 1200 мкм²) – 24,6±0,9%.

Средняя площадь сечения нейронов в чувствительных узлах в 90 дневном возрасте крысы составляет 1175,2±74,2 мкм², максимальный размер нейронов достигает 2430 мкм², а минимальный – 144 мкм².

На *Рисунке 5.1. (А, Б)* отчетливо видны нейроны различных размеров. При этом, даже на малом увеличении визуализируется их дифференцированность преимущественно на клетки крупных размеров, в совокупности доля которых составляет 36% от всех нейронов узла и на клетки малых размеров, доля которых составляет 42,8%. Наименьшая популяция нейронов представлена клетками средних размеров (21,2%).

В узле присутствуют клетки как малых размеров – темные с диффузным прокрашиванием цитоплазмы, так и крупных размеров – более светлые, содержащие хроматофильную зернистость (*Рис. 5.1. В, Г*).

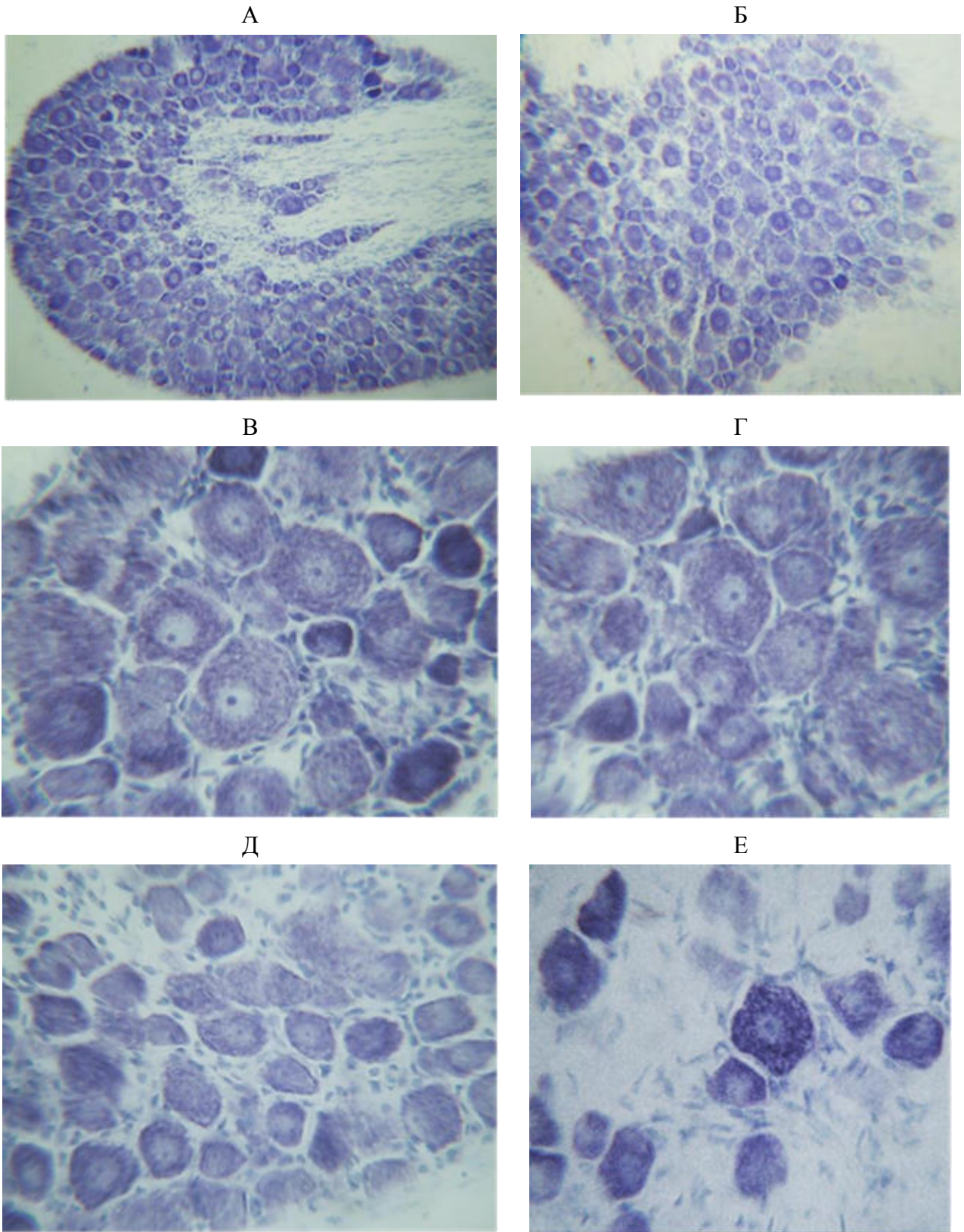


Рисунок 5.1. Нейроны второго грудного спинномозгового узла в 90 дневном возрасте крысы. Окраска по Нислю.

А, Б: Об. 10, ок. 10. В-Е: Об. 40, ок. 10. Пояснения в тексте.

Кариоплазма темных малых нейронов окрашена в темно-синий цвет, в некоторых хроматофильных нейронах ядро оказывается более светлым с видимым ядрышком, в части нейронов контуры ядра и ядрышка различаются с трудом из-за выраженной базофилии. В популяции нейронов средних размеров в основном отсутствуют клетки с интенсивным окрашиванием нисслевского вещества (Рис. 5.1. Д – мелкие частицы тигроида распределяются равномерно), идентичные тинкториальные свойства проявляют и некоторые нейроны малых размеров.

В немногочисленных нейронах крупных размеров (Рис. 5.1. Е – крупная клетка в центре препарата) выявляется более интенсивная окраска цитоплазмы, которая в одних случаях не является отличимой от таковой у малых нейронов (Рис. 5.1. Е – клетки мелких размеров располагаются в окружности крупного нейрона), но явно отличается от малых пикноморфных нейронов (Рис. 5.1. Б, темные малые нейроны). Хроматофилия этих крупных нейронов не сопровождается диффузным прокрашиванием цитоплазмы, сохраняются крупные и в большей степени мелкие частицы нисслевского вещества, которые уплотняются и более интенсивно окрашиваются красителем.

В целом, структурная картина градации нейронов на типы на основании их размеров и распределении субстанции Ниссля в нейроплазме соответствует представлениям мелкий=темный и крупный=светлый нейрон, но также есть и особенности: некоторые нейроны, в большинстве своём немногочисленные не соответствуют этим характеристикам, а проявляют противоположные тинкториальные свойства, где крупный=темный и мелкий=светлый.

Гистохимический и иммуногистохимический анализ срезов спинномозговых узлов показал выявляемость нейронов, содержащих: TRPV1, вещество Р, кальционин-ген-родственный пептид, белок нейрофиламентов 200 кДа, кальбиндин 28 кДа, нейрональную NO-синтазу, НАДФН-диафорузу.

Количественный анализ позитивных популяций нейронов представлен в *Таблице 5.1.*

Нейрохимический профиль второго грудного спинномозгового узла
в 90-дневном возрасте крысы ($X \pm Sx$)

Популяция, содержащая	Площадь сечения, мкм^2	Доля нейронов в узле, %
TRPV1	416,2 \pm 74,2	41,3 \pm 2,7
Вещество Р	280,7 \pm 8,5	6,5 \pm 0,4
Кальцитонин-ген-родственный пептид	462,7 \pm 23,1	26,3 \pm 1,5
Белок нейрофиламентов 200 кДа	1148,9 \pm 36,8	29,0 \pm 1,8
Кальбиндин 28 кДа	439,2 \pm 26,9	26,0 \pm 3,1
nNOS (нейрональная NO-синтаза)	478,3 \pm 12,7	52,7 \pm 2,2
НАДФН-диафороза (Р. Лилли)	367,0 \pm 28,0	12,6 \pm 1,7
НАДФН-диафороза (V.T. Норе, S.R. Vincent)	485,7 \pm 22,3	67,3 \pm 2,4

Большая часть иммунореактивных нервных клеток узла принадлежит популяциям, содержащим TRPV1 или nNOS, с максимальной нейрональной иммунореактивностью к nNOS (52,7%). Меньшая часть нейронов узла представлена популяциями нейронов, содержащими вещество Р и НАДФН-диафорузу (12,6%), с минимальной нейрональной иммунореактивностью к веществу Р (6,5%). Популяции нейронов, иммунореактивные к кальцитонин-ген-родственному пептиду, кальбиндину и белку нейрофиламентов в количественном распределении занимают промежуточное положение, и их доли практически не отличаются (около 30%).

Изучение площади сечения иммунореактивных нейронов показало (Табл. 5.1.), что наибольшие размеры имеет популяция нейронов, содержащих белок нейрофиламентов, которая является преимущественно популяцией нейронов крупных размеров. Популяция вещества Р-иммунореактивных нейронов имеет наименьшие размеры и в основном представлена нейронами очень малых размеров. Размеры популяций нейронов, содержащих TRPV1, кальцитонин-ген-родственный пептид, кальбиндин, nNOS и НАДФН-диафорузу имеют малые размеры.

Вызывает неподдельный интерес значимая разница в выявляемости иммуногистохимическим методом nNOS и гистохимическим методом НАДФН-диафоразы по Р. Лилли (1969). Безусловно, данные других исследований, включающие изучение распределения nNOS и НАДФН-диафоразы, подтверждают различную их выявляемость в структурах центральной и периферической нервной системы (Vizzard et al., 1994; Охотин, Шуклин, 2006; Коржевский и др., 2007; Черток, Коцюба, 2013; Suzuki et al., 2002). Вероятно, это объясняется значением фермента в обеспечении многообразных процессов, имеющих существенное значение для понимания функции нейрона и его изменений в различных условиях. Считается, что НАДФН-диафораза участвует в способности нейронов к реализации репаративных процессов, обеспечивает процессы синаптической пластичности (Дюйзен и др., 2003; Шуклин, Швалев, 2006; Коцюба и др., 2009), рецепцию изменений сосудистого тонуса, гистохимически маркируя сосуды (Норе, Vincent, 1989).

В гистохимических исследованиях уровень секреции NO, как правило, определяется по активности НАДФН-диафоразы, которая рассматривается как кофермент NOS, являясь источником электронов для простатической группы NOS, о количественном синтезе NO судят по НАДФН-диафореазе (Норе et al., 1991; Коржевский, Отеллин, 1996; Zhou et al., 1998; Шуклин, Швалев, 2006; Коржевский и др., 2007). Возможно, разница объясняется особенностями проведения гистохимической реакции, либо в подходах к трактовке ее результатов. В связи с этим, мы исследовали аналогичные объекты гистохимическим методом определения НАДФН-диафоразы, предложенным Э.Пирс (1962), но чаще цитируемом как метод, описанный V.T. Норе, S.R. Vincent (1989). В *Таблице 5.1.* полученные данные выделены цветом.

Как видно, доли нейронов, содержащих НАДФН-диафорузу, выявляемую гистохимическими методами значимо отличаются, но последние данные приближены к таковым показателям nNOS-иммунореактивности нейронов спинномозгового узла.

Почему же такие различия в полученных результатах?

1. При использовании метода V.T. Hope, S.R. Vincent (1989).

В узлах выявляется НАДФН-диафораза практически во всех нейронах. Долю позитивных клеток определить очень сложно, так как большинство нейронов узла независимо от их размеров являются диафораза-активными с сине-фиолетовой окраской цитоплазмы резко превышающей фоновую окраску среза (Рис. 5.2. А, В).

2. При использовании метода Р. Лилли (1969).

НАДФН-диафораза определяется не во всех нейронах спинномозговых узлов (Рис. 5.2. Б, Г). Цветовая гамма продукта реакции, определяемого в цитоплазме нейронов имеет широкий спектр – от фонового бледно-голубого и голубого прокрашивания до темного сине-фиолетового цвета. Ядро остаётся не прокрашенным. При этом обнаруживается, что популяция нейронов узла неоднородна по активности НАДФН-диафоразы. Часть нейронов лишена активности НАДФН-диафоразы, другие, обычно крупные клетки, по окраске не отличаются от фона. Мелкие и средние нейроны, как правило, имеют высокую активность фермента.

Сравнительными исследованиями с применением антител против NOS и гистохимическим определением НАДФН-диафоразы установлено, что высокая активность фермента, обнаруживаемая в отдельных нервных клетках, сопровождается экспрессией NOS (Коржевский, Отеллин, 1996; Охотин, Шуклин, 2006; Ma et al., 1997). Специфичность реакции цитоплазмы нейронов на нейрональную NOS подтверждается тождественным распределением иммунопозитивных нейронов и клеток, дающих положительную реакцию на НАДФН-диафорузу.

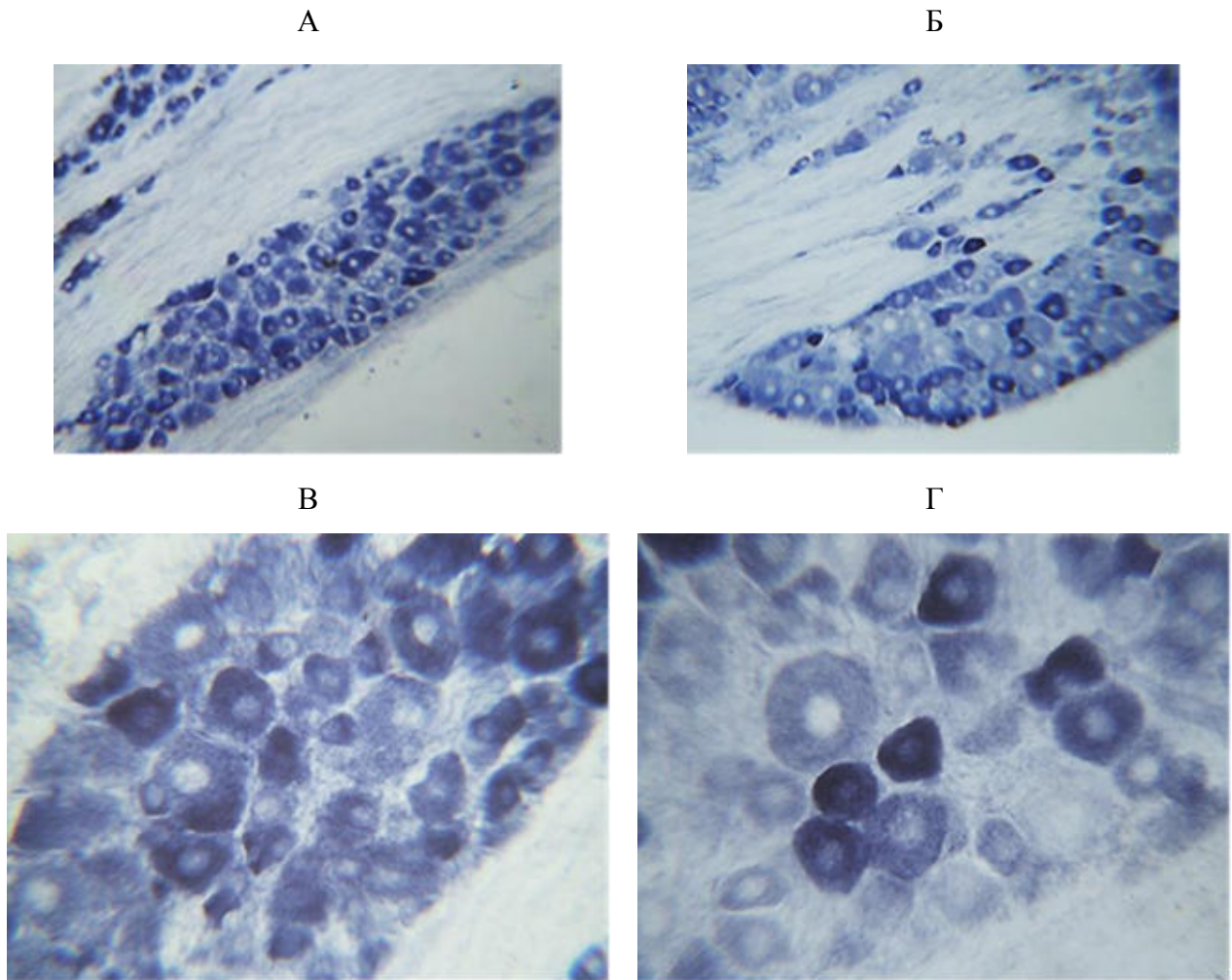


Рисунок 5.2. НАДФН-диафораза в нейронах второго грудного спинномозгового узла в 90-дневном возрасте крысы.

А, Б: Об. 10, ок. 10. В, Г: Об. 40, ок. 10.

А, В: Метод V.T. Норе, S.R. Vincent (1989).

Б, Г: Метод Р. Лилли (1969).

Проведенный гистохимический анализ показывает, что при использовании метода V.T. Норе, S.R. Vincent (1989) нейроны значительно не отличаются по выраженности активности фермента. Это мешает детальному анализу распределения ферментативной активности в различных нейронах, ее локализации в нейроплазме, определению морфометрических параметров нервных клеток, что особенно важно при сравнительных исследованиях. Не менее важным является и подсчет числа нервных клеток обладающих активностью НАДФН-диафоразы.

Анализируя данные литературы (Шуклин, Швалев, 2006; Черток, Коцюба, 2013) можно прийти к выводу, что в сравнительных исследованиях следует считать клетками с НАДФН-диафоразной активностью – нейроны, сечение которых прошло через ядро, а активность фермента существенно отличается от фоновой, определяемой в окружающих тканях. Показано, что при гистохимическом выявлении НАДФН-диафоразы в периферической нервной системе нейрональную NOS содержат только темно-окрашенные, но не слабо или даже умеренно окрашенные нервные клетки (Шуклин, Швалев, 2006).

Учитывая полученные результаты, мы провели гистохимический анализ выявляемости ферментативной активности НАДФН-диафоразы в чувствительных узлах различных сегментарных уровней: четвертый шейный (С4), четвертый поясничный (L4) и второй крестцовый (S2).

При сопоставлении результатов обоих гистохимических методов сохраняется гистологическая картина распределения и выявляемости НАДФН-диафоразы, которая идентична обнаруженной во втором грудном спинномозговом узле (Рис. 5.3.). При этом, каких-либо особенностей в специфичности реакции цитоплазмы чувствительных нейронов различных сегментарных уровней не определяется.

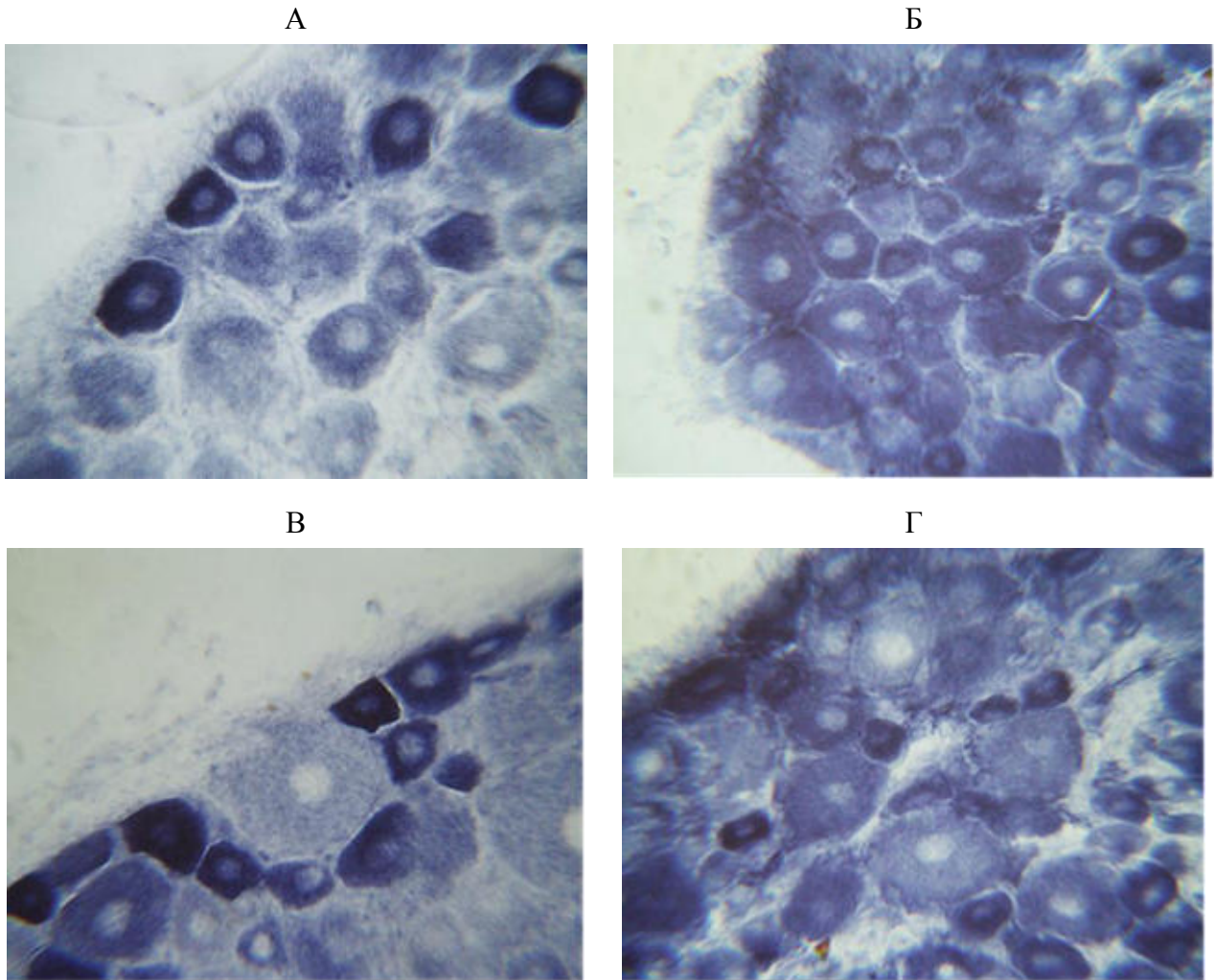


Рисунок 5.3. НАДФН-диафораза в нейронах шейных С4 (А, Б) и крестцовых S2 (В, Г) спинномозговых узлов в 90-дневном возрасте крысы.

Об. 40. ок. 10.

А, В: Метод Р. Лилли (1969).

Б, Г: Метод V.T. Hope, S.R. Vincent (1989).

Анализ размерных классов определяемых популяций нейронов в чувствительном узле грудного спинномозгового нерва представлен в *Таблице 5.2.*

Таблица 5.2.

Относительное содержание нейронов различных размерных классов ($X \pm S_x$, %) во втором грудном спинномозговом узле в 90-дневном возрасте крысы

Популяция, содержащая	До 300 мкм ²	301-600 мкм ²	601-900 мкм ²	901-1200 мкм ²	Более 1201 мкм ²
TRPV1	36,4±0,9	63,6±0,9	–	–	–
Вещество Р	64,2±0,5	35,8±0,5	–	–	–
Кальцитонин-ген-родственный пептид	16,5±0,7	57,8±1,2	8,2±1,0	15,3±0,7	2,2±0,5
Белок нейрофиламентов 200 кДа	–	2,8±0,7	12,0±1,4	34,1±0,5	51,1±0,3
Кальбиндин 28 кДа	18,8±0,8	64,7±0,6	8,5±0,7	4,4±0,2	3,6±0,2
NOS (NO-синтаза)	29,1±0,3	58,2±0,5	12,7±0,2	–	–
НАДФН-диафороза (Р. Лилли)	46,3±0,8	43,9±0,8	9,8±0,4	–	–
НАДФН-диафороза (V.T. Hope, S.R. Vincent)	28,7±0,4	29,2±0,4	14,8±0,6	14,3±0,4	13,0±0,2

Популяции нейронов, содержащих ***TRPV1*** и ***вещество Р***, имеющие в большинстве своём средние малые размеры, определяемые по их площади, в действительности принадлежат двум размерным классам – очень малые и малые клетки, но разброс по классам различается. Так, в группе TRPV1-нейронов большую часть (более 60 %) составляют нейроны малых размеров, тогда как в группе вещество Р-нейронов – нейроны очень малых размеров (более 60%). Иммунореактивные нейроны спинномозгового узла к TRPV1 и веществу Р демонстрируются на *Рисунке 5.4.*

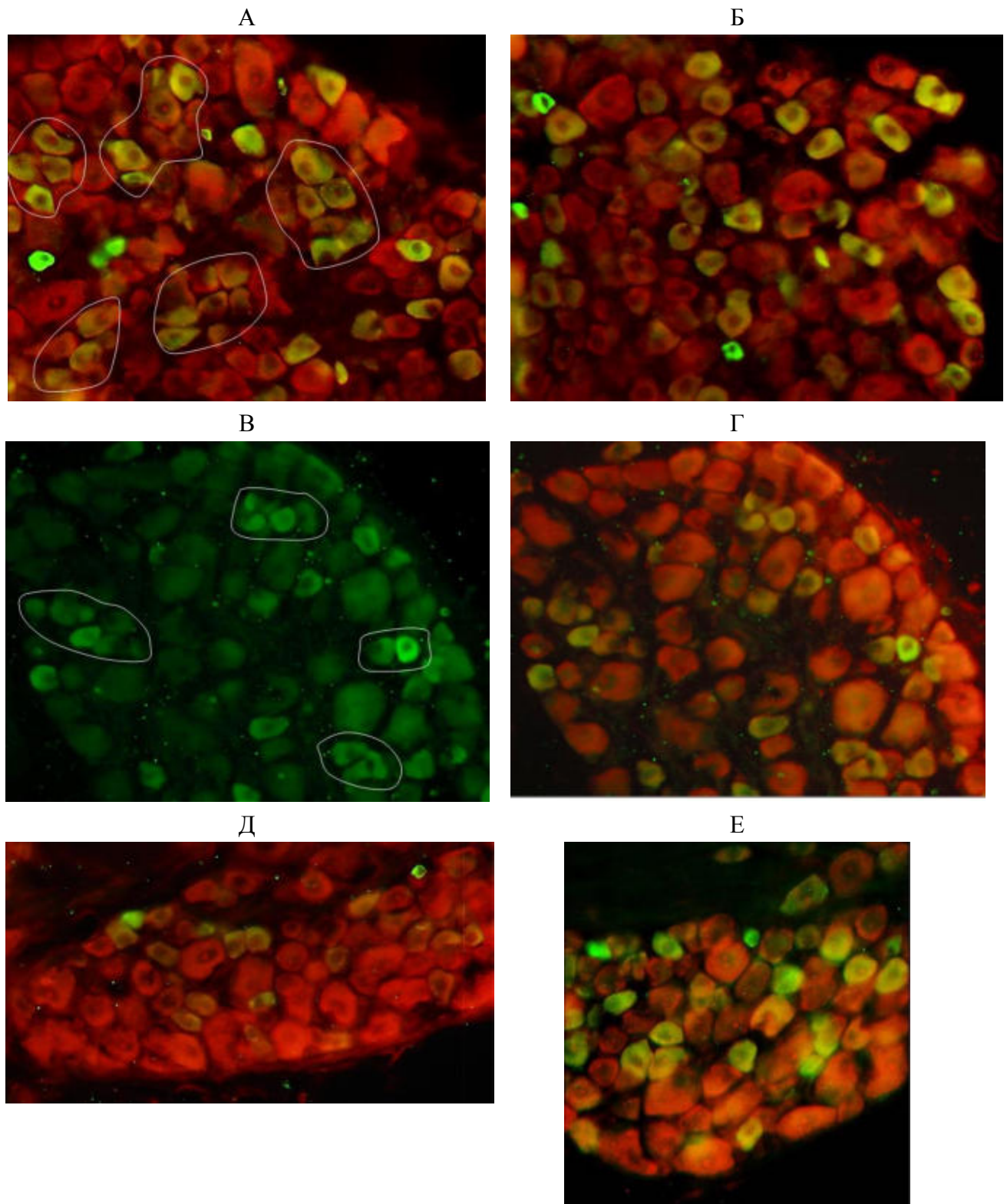


Рисунок 5.4. TRPV1- и вещество P- иммунореактивные нейроны второго грудного спинномозгового узла в 90-дневном возрасте крысы. Об.20. ок. 10.

А, Б, Е: TRPV1-нейроны (желтого и зеленого цвета).

В, Г, Д: Вещество P-нейроны (желтого и зеленого цвета).

Флюоресцентный Ниссль (нейроны красного цвета).

А, В. Выделены нейрональные кластеры.

Популяция нейронов, содержащих кальцитонин-ген-родственный пептид является разнородной и содержит нервные клетки всех размерных классов с преобладанием группы клеток малых размеров (более 55 %). Присутствуют единичные нейроны очень крупных размеров. Количество как крупных, так и очень малых нейронов является равнозначным (около 15%), нейроны средних размеров не превышают 8%.

Нейроны с кальцитонин-ген-родственным пептидом по распределению продукта реакции в цитоплазме, можно разделить на две популяции клеток: меньшую, представленную нейронами малых размеров с диффузной интенсивной флюоресценцией; большую, состоящую из нейронов, в цитоплазме которых флюоресценцией обладали гранулы в виде зернистых включений.

На *Рисунке 5.5.* представлена популяция нейронов, иммунореактивных к кальцитонин-ген-родственному пептиду, имеющих различные размеры. Нейроплазма нейронов имеет зеленое свечение, ядро иммунонегативно, отростки нейронов не визуализируются, отчетливо выявляются флюоресцирующие волокна.

На срезе спинномозгового узла иммунореактивные нейроны располагаются как одиночными клетками, так и образуют скопления, формирующие кластеры от 2-3 до 8-10 клеток различных размеров (*Рис. 5.5. А* – некоторые нейрональные кластеры обозначены прямоугольниками).

Групповые скопления формируют и чувствительные нейроны, содержащие как вещество P, так и TRPV1-рецепторы. На срезе спинномозгового узла иммунореактивные нейроны располагаются, как правило, клеточными группами от 2-3 до 8-10 клеток, одиночные клетки присутствуют, но являются редкими (*рис. 5.4. А, В* – некоторые группы клеток выделены прямоугольниками).

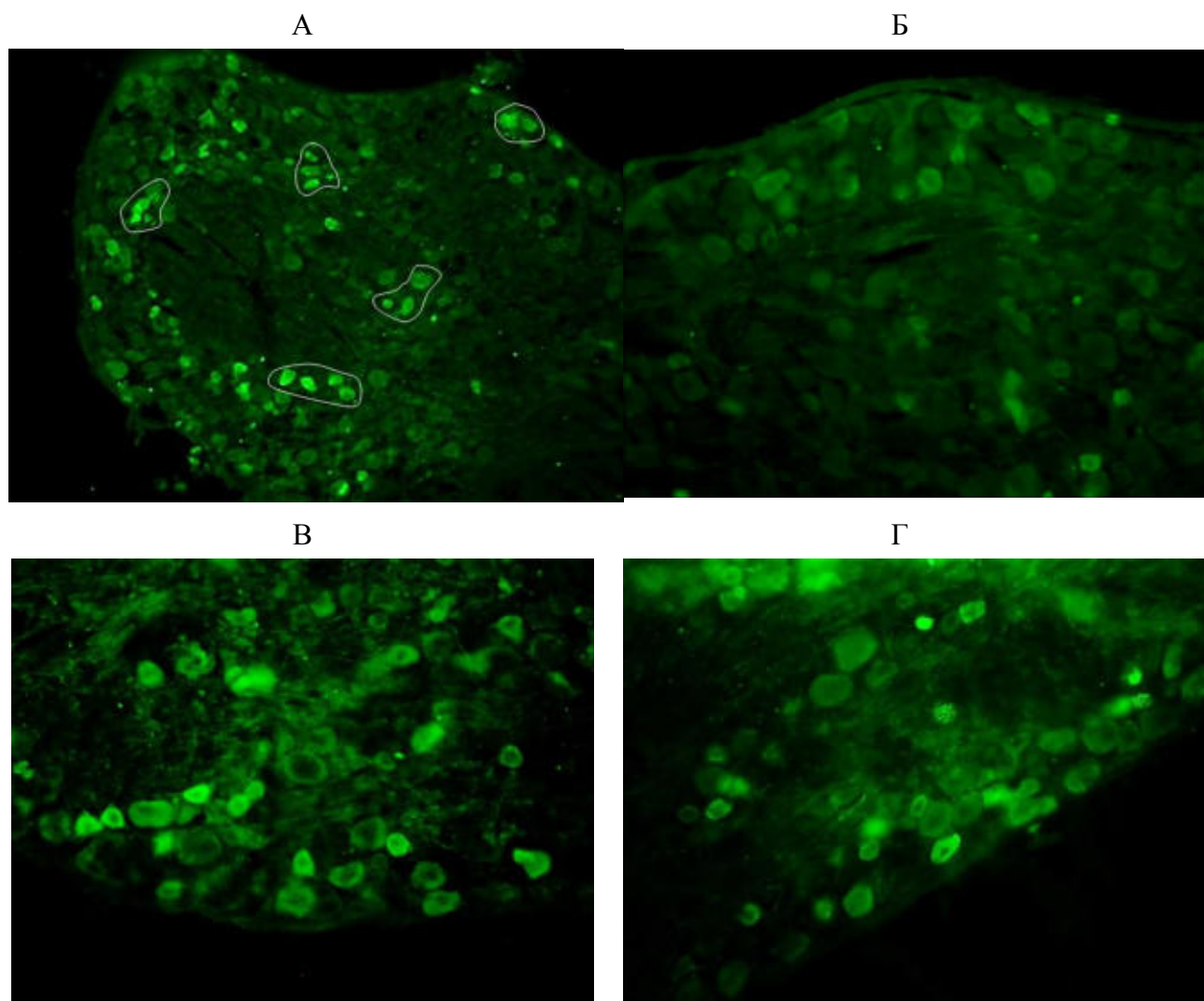


Рисунок 5.5. Нейроны, содержащие кальцитонин-ген-родственный пептид во втором грудном спинномозговом узле в 90 дневном возрасте крысы.

А: Об. 4. ок. 10. Б-Г: Об. 10, ок. 10.

А. Выделены нейрональные кластеры.

В популяции нейронов, содержащих белок нейрофиламентов 200 кДа, большая часть нервных клеток имеет очень крупные размеры (более 50 %). Также, значительная часть популяции является нейронами крупных размеров (34%), меньшую часть составляют нейроны средних размеров (12%). Выявляется минимальное количество нейронов малых размеров, доля которых не превышает 3%, и отсутствует класс нейронов, имеющих очень малые размеры.

На *Рисунке 5.6.* представлены нейроны, иммунореактивные к белку нейрофиламентов. На срезе спинномозгового узла иммунореактивные нейроны располагаются или одиночными клетками, или образуют скопления, формирующие группы клеток различных размеров 2-3 до 8-10 клеток (Рис. 5.6. А, Б – групповые скопления клеток выделены прямоугольниками).

Как видно на *Рисунке*, популяция нейронов имеет яркую красную флюоресценцию. Исследуемый структурный белок выявляется в цитоплазме нейронов, маркируя в своём большинстве нейроны очень крупных и крупных размеров, но интенсивность свечения является одинаковой для нейронов различных размерных классов. Свечением обладают отростки нейронов (Рис. 5.6. Г-Е, обозначены стрелками), которые являются относительно толстыми (крупными), ядро остаётся интактным.

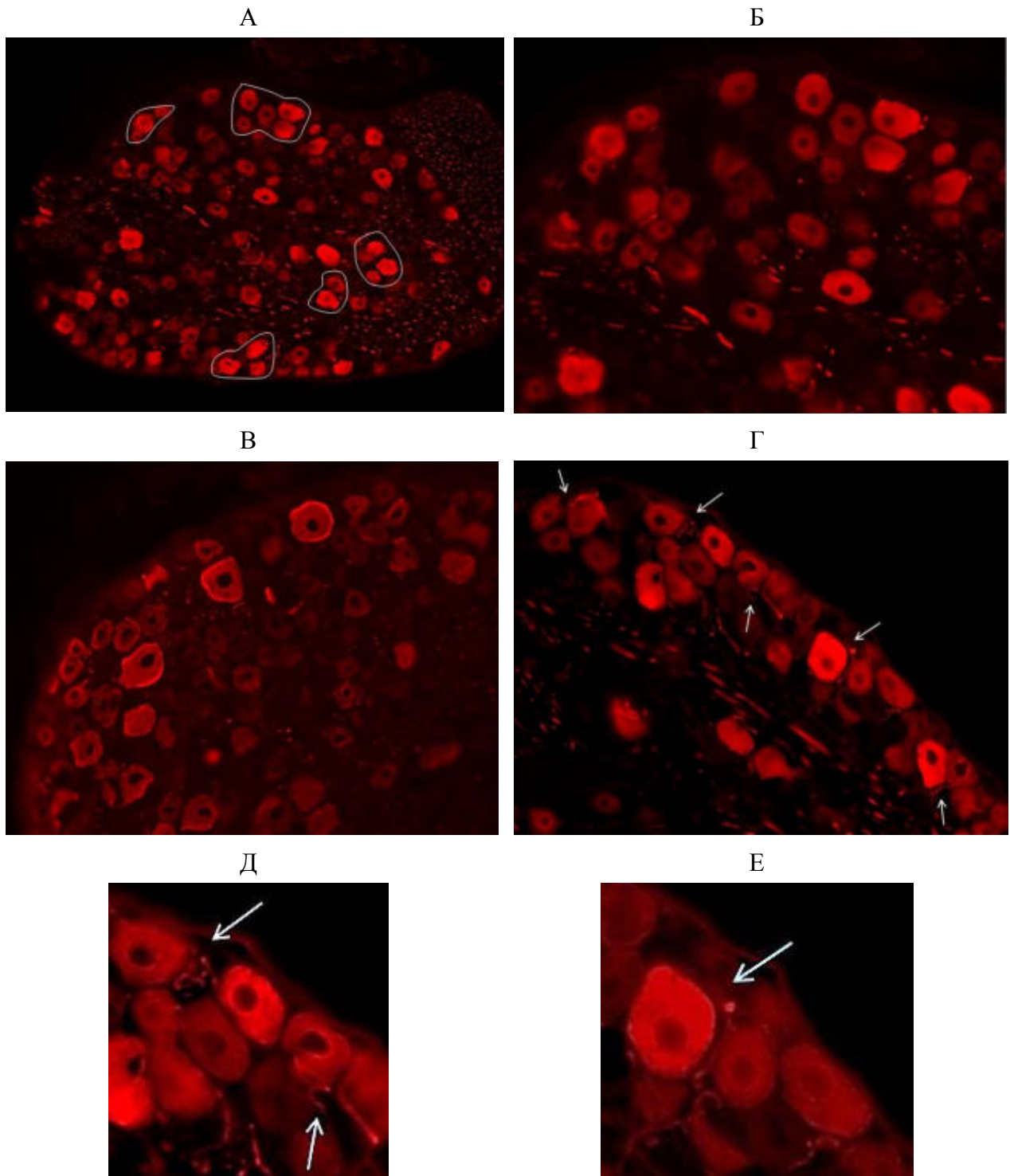


Рисунок 5.6. Нейроны, содержащие белок нейрофиламентов 200 кДа во втором грудном спинномозговом узле в 90-дневном возрасте крысы.

А: Об. 10. ок. 10. Б-Г: Об. 20, ок. 10. Д, Е: фрагменты рисунка Г.

А. Выделены нейрональные кластеры.

Стрелками обозначены отростки иммунореактивных нейронов.

Популяция кальбиндин-иммунореактивных нейронов содержит клетки всех размерных классов – от очень мелких до очень крупных. Преобладающими являются нейроны малых размеров (около 65%). Около 19% нейронов имеют очень малые размеры. Меньшая часть популяции в равных количествах относится к нейронам средних и крупных размеры (по 8%).

На *Рисунке 5.7.* представлена популяция нейронов, иммунореактивных к кальбиндину, имеющих различные размеры. На срезе спинномозгового узла иммунореактивные нейроны располагаются как одиночными клетками, так и образуют скопления, формирующие кластеры от 2-3 до 8-10 клеток различных размеров (*Рис. 5.7. А, Б* – некоторые нейрональные кластеры обозначены прямоугольниками). Вся популяция кальбиндин-иммунореактивных нейронов имеет яркую зеленую флюоресценцию. Кальбиндин распределяется в цитоплазме диффузно, в части клеток определяется в ядрах – на *Рисунке 5.7. (Д)* данные клетки обозначены стрелками. Нервные волокна являются иммунореактивными.

По распределению продукта реакции, всю популяцию иммунореактивных нейронов можно разделить на три субпопуляции: первую – представленную нейронами малых и очень малых размеров с более интенсивной флюоресценцией в ядре по сравнению с цитоплазмой; вторую – нейронами крупных размеров с более интенсивной флюоресценцией в цитоплазме по сравнению с ядром; третью – нейронами различных размеров с одинаково слабой флюоресценцией в ядре и в цитоплазме. При этом, если иммунопозитивность ядер наблюдается только в мелких нейронах, то во всех крупных и средних нейронах и только в небольшой части малых нейронов ядро остаётся негативным, ядрышко сохраняется и чётко визуализируется – на *Рисунке 5.7. (Д)* данные клетки выделены квадратом.

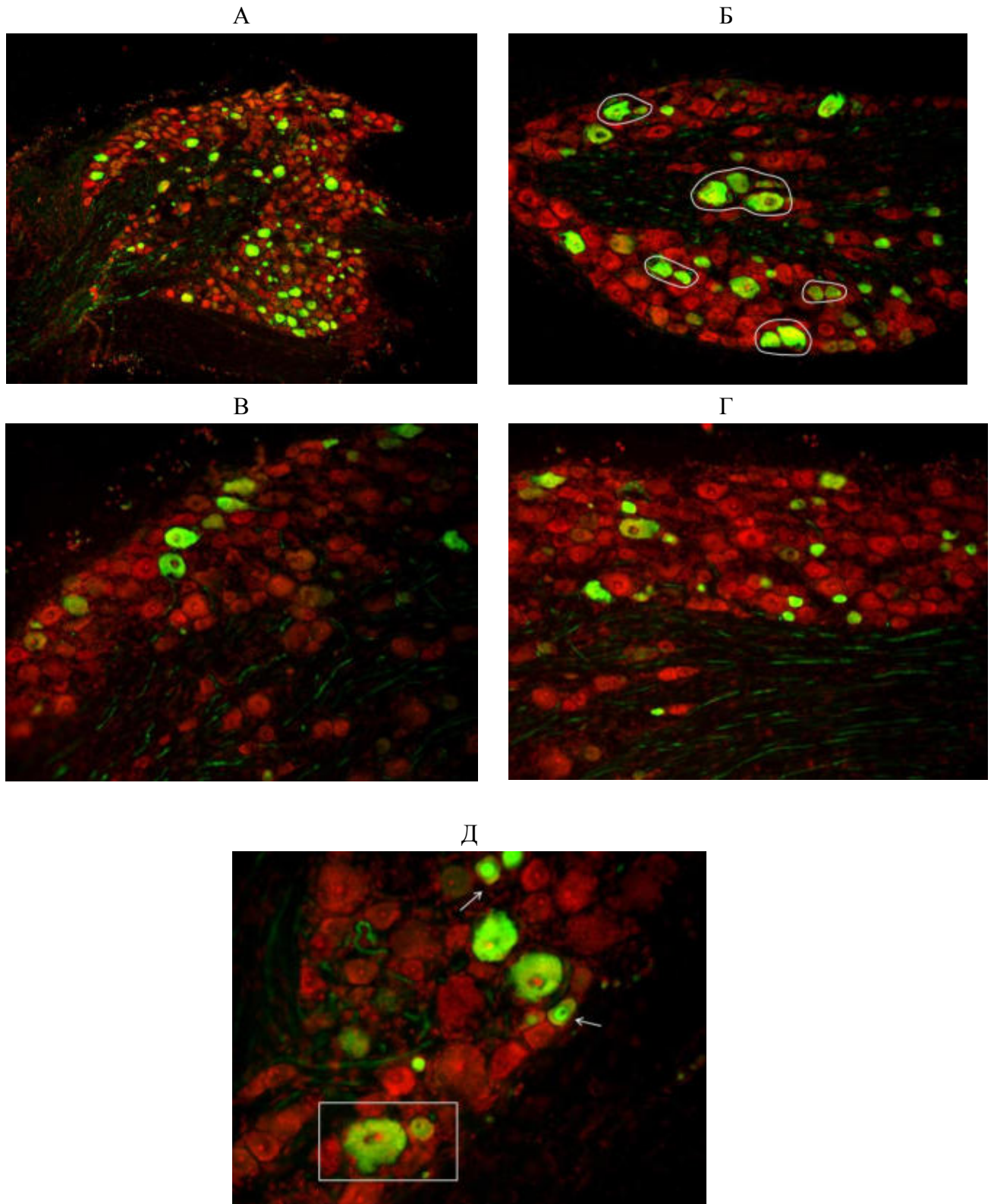


Рисунок 5.7. Нейроны, содержащие кальбиндин 28 кДа во втором грудном спинномозговом узле в 90-дневном возрасте крысы.

А: Об. 4, ок. 10. Б-Г: Об. 10, ок. 10. Д: Об. 20, ок. 10.

Б. Выделены нейрональные кластеры.

Г. Стрелками обозначены мелкие нейроны с иммунопозитивной кариоплазмой.

В популяции nNOS-иммунореактивных нейронов отсутствуют клетки крупных размеров, большая часть нервных клеток имеет малые размеры (58%). Значительная часть популяции является нейронами очень малых размеров (около 30%), меньшую часть составляют нейроны средних размеров (12%).

На *Рисунке 5.8.* представлены нейроны, иммунореактивные к нейрональной NOS. Нейроны имеют яркую зеленую флюоресценцию, которая при наложении на флюоресцентный Ниссль дает желто-зеленую окраску нейронов с nNOS. Иммунореактивные нейроны располагаются равномерно на всём срезе чувствительного узла (*Рис. 5.8. В, Г*). nNOS выявляется в цитоплазме нейронов, распределяясь диффузно. Свечением обладают волокна (*Рис. 5.8. А, В*), ядро является иммунонегативным.

На срезе спинномозгового узла иммунореактивные нейроны располагаются или одиночными клетками, или образуют скопления, формирующие группы клеток различных размеров 2-3 до 8-10 клеток (*Рис. 5.8. А, Б* – групповые скопления клеток выделены прямоугольниками).

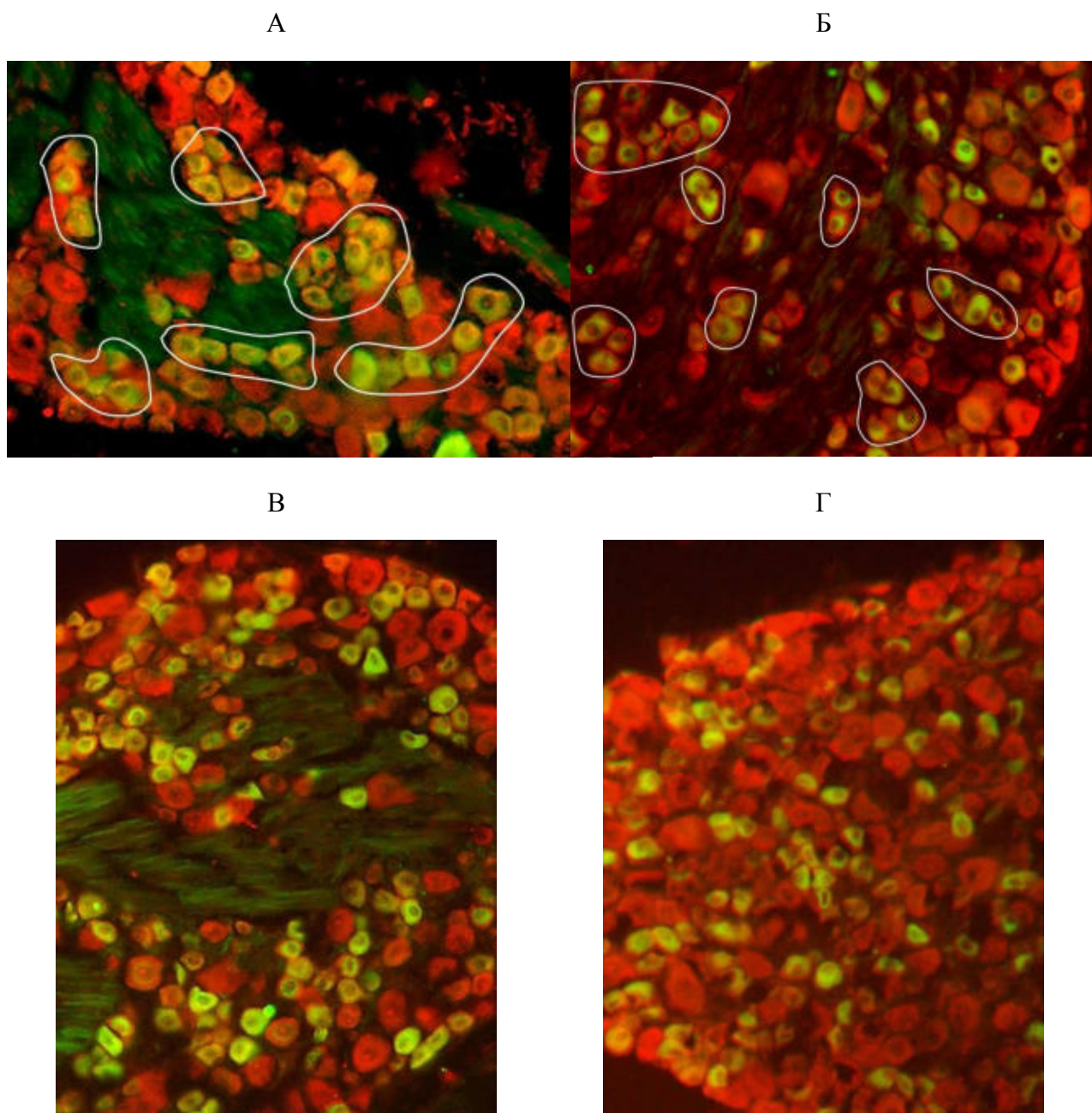


Рисунок 5.8. pNOS-иммунореактивные нейроны во втором грудном спинномозговом узле в 90-дневном возрасте крысы.

А: Об. 10. ок. 10. Б-Г: Об. 20, ок. 10.

А, Б: Выделены нейрональные кластеры.

Популяция НАДФН-диафораза-позитивных нейронов (определяемая методом Р. Лилли, 1969) формируется клетками малых размеров и в большинстве своём принадлежит двум размерным классам – очень малых и малых клеток (46,3% и 43,9% соответственно). Меньшая часть популяции содержит нейроны средних размеров (около 10%). В нейронах крупных и очень крупных размеров НАДФН-диафораза не выявляется.

НАДФН-диафораза-позитивные нейроны, выявляемые методом V.T. Норе, S.R. Vincent (1989), образуют популяцию клеток различных размеров, где около 30% приходится на клетки как очень малых, так и малых размеров, и в равных количествах на средние, крупные и очень крупные нейроны (по 13-14%). При данном методе все клеточные структуры проявляют ферментативную активность НАДФН-диафразы.

Как видно, размерные классы популяции нейронов, содержащих НАДФН-диафразу, определяемую гистохимическими методами разнятся. НАДФН-диафораза-позитивные нейроны представлены ранее на *Рисунке 5.2*.

Таким образом, применение тетразолиевого метода, описанного Р. Лилли (1969) позволяет выявлять нейроны с НАДФН-диафразой, выраженность которой можно достоверно верифицировать доступными цитофотометрическими методами, проводить определение не только структурных характеристик нейронов, но и производить подсчет количества диафораза-позитивных клеток. Результаты исследования свидетельствуют, что активность НАДФН-диафразы характеризует не все клеточные структуры. При этом, на срезе узла НАДФН-диафораза-позитивные нейроны также преимущественно образуют групповые скопления от 2-3 до 4-5 клеток различных размеров (*Рис. 5.9*. – кластеры обозначены прямоугольниками), и также располагаются в виде одиночных позитивных нейронов, последние являются не многочисленными в сравнении с определяющимися кластерами.

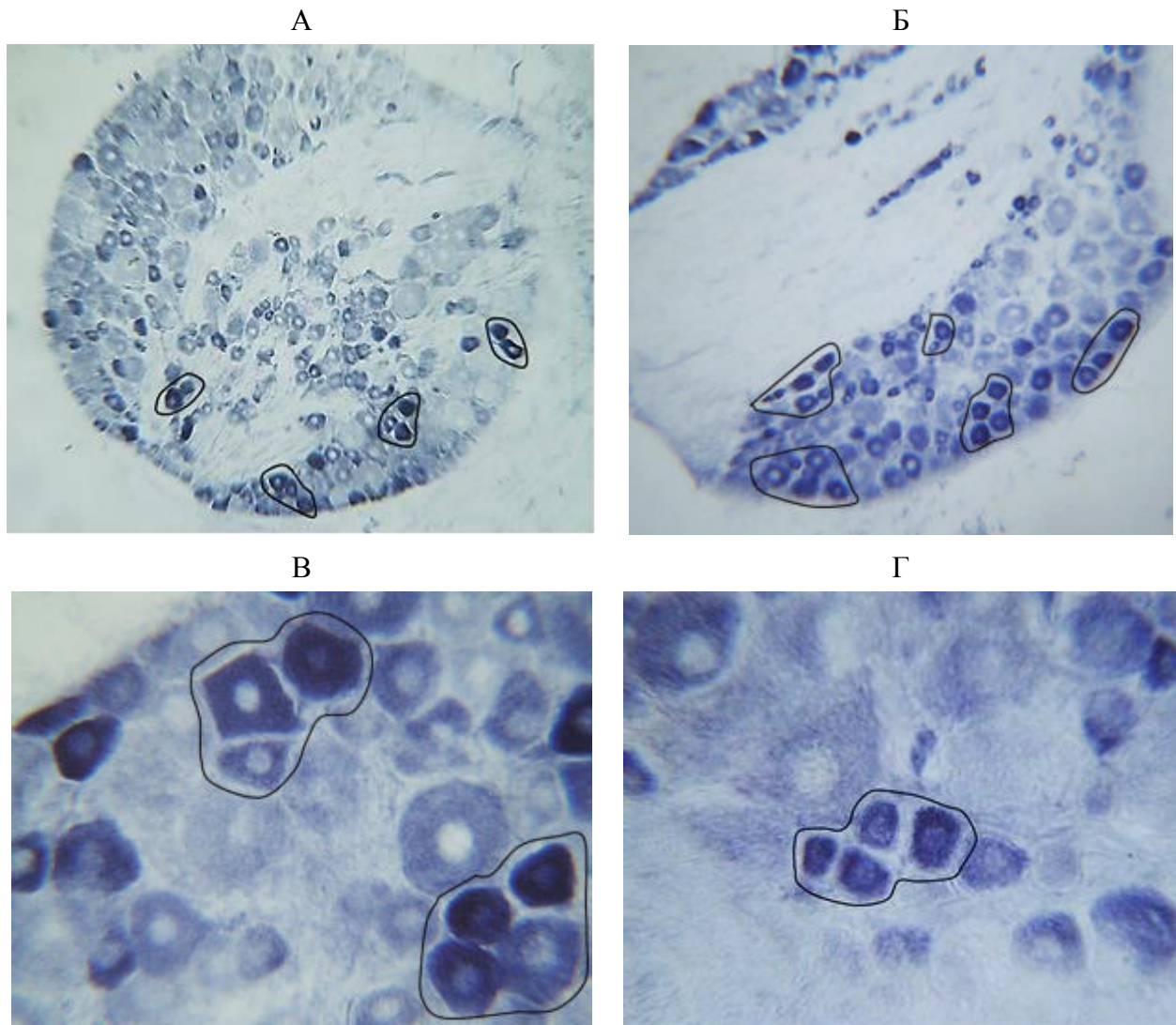


Рисунок 5.9. НАДФН-диафораза-позитивные нейроны во втором грудном спинномозговом узле в 90-дневном возрасте крысы. Метод Р. Лилли (1969).

А: Об. 4, ок. 10. Б: Об. 10, ок. 10. В, Г: Об. 40, ок. 10.

А-Г: Выделены нейрональные кластеры.

Анализ нейрoхимических особенностей популяций нейронов позволил подтвердить гипотезу о гетерогенности чувствительных узлов, а анализ их топографических особенностей позволил подтвердить гипотезу о кластерном типе организации нейронов чувствительных узлов (Золотарев, Ноздрачев, 2001; Holzer, 1991; Maslyukov et al., 2010). Результаты проведенного исследования показали, что лишь небольшая часть (6,5%) нейронов грудного чувствительного узла у крыс содержит вещество P, что соответствует данным других исследований, полученных на взрослых животных (Helke, Niederer, 1990).

Значительная часть нейронов узла (чуть менее 50%) содержит TRPV1, что также соответствует данным, полученным на взрослых крысах (Золотарев, Ноздрачев, 2001; Ma, 2002). TRPV1- и вещество Р-иммунореактивные нейроны в чувствительных узлах отличаются по своим морфометрическим характеристикам и представлены нейронами очень малых и малых размеров. Небольшая часть нейронов чувствительного узла грудного нерва (26,3%) содержит кальцитонин-ген-родственный пептид. Эти цифры близки к исследованиям, полученным на взрослых животных (Poynier et al., 2002; Aoki et al., 2005). Но, в части работ показана их большая выявляемость – до 40-50% (Ruan et al., 2004). Популяция нейронов иммунореактивных к кальцитонин-ген-родственному пептиду является гетерогенной по размерным характеристикам и содержит у взрослых крыс клетки всех размерных классов (от очень малых до очень крупных), однако большая часть этой популяции (более 50%) приходится на клетки малых размеров (Poynier et al., 2002; Xu et al., 2005). Также, до 30% нейронов чувствительного узла образуют популяцию, содержащую кальбиндин 28 кДа, что совпадает с данными других исследований (Antal et al., 1990; Li et al., 2007). Данная популяция представлена нейронами всех размерных классов, от очень мелких до очень крупных, но более 50% этих нейронов имеют малые размеры. Размеры кальбиндин-иммунореактивных нейронов спинномозговых узлов связывают с выполняемой ими ноцицептивной функцией (Holzer, 1988; Szallasi, Blumberg, 1999), о чем свидетельствует присутствие кальбиндина в мелких пептидергических нейронах (Yoshida et al., 1990), а также в мелких нейронах, содержащих TRPV1, где кальбиндин участвует в хемосенсорных функциях (Ichikawa, Sugimoto, 2002). Треть всех нейронов (29%) спинномозгового узла содержит белок нейрофиламентов 200 кДа, в популяции которых преобладающими являются очень крупные размеры нейронов (более 50% популяции), что согласуется с другими исследованиями (Рагинов, Челышев, 2003; Ferri et al., 1990; Russo et al., 2010). nNOS выявляется в большей части нейронов узла (более 50%), что превышает количественный состав данной популяции в сравнении с другими работами (Fiallos-Estrada et al., 1993; Thippeswamy et al.,

2005). Возможно, это связано с особенностями протокола метода, анализом позитивности структур, уровневыми отличиями. Описаны различия в размерах нейронов грудных и поясничных узлов (Vizzard et al., 1995). Предполагается участие nNOS в активации ионных каналов и, таким образом, в механизмах формирования сенситизации (Yoshimura et al., 2001; Kim et al., 2011). В тоже время, nNOS-иммунореактивные нейроны являются непептидергическими, поскольку только 1% нейронов этой популяции экспрессирует кальцитонин-ген-родственный пептид, а более 90% нейронов популяции с nNOS содержат одновременно изолектин Б4 у взрослой крысы (Masliukov et al., 2014). В части работ экспрессию nNOS ассоциируют с определением активности НАДФН-диафразы (Hore et al., 1991; Zhou et al., 1998), при этом только в нейронах с высокой активностью фермента обнаруживается экспрессия NOS (Коржевский, Отеллин, 1996; Охотин, Шуклин, 2006; Шуклин, Швалев, 2006; Ma et al., 1997). Результаты показали, что популяция НАДФН-диафараза-позитивных нейронов является малочисленный и чуть превышает 10% от всех нейронов чувствительного узла, в отличие от популяции nNOS-иммунореактивных нейронов, которая образована половиной нейронов узла. НАДФН-диафараза-позитивные нейроны большей частью были представлены клетками очень малых и малых размеров, что согласуется с другими результатами (Rybarova et al., 2000), в некоторых работах у взрослых крыс НАДФН-диафараза выявляется в нейронах различных размеров – от мелких до крупных (Miyata et al., 1997).

5.2.2. Особенности нейронального состава спинномозгового узла в постнатальном онтогенезе крысы

Морфометрические особенности нейронов изучали в чувствительном узле второго грудного спинномозгового нерва у крыс 3-, 10-, 20-, 30-, 60- и 90-дневных возрастов. Средняя площадь нейронов спинномозгового узла за весь период наблюдения увеличивается с $250,1 \pm 13,01$ мкм² до $1175,2 \pm 74,22$ мкм², что составляет 4,7 раза. При этом прогрессивное увеличение показателя отмечается в первый месяц жизни крысы – в 5,6 раза, с последующим несущественным снижением в 90-дневном возрасте.

При анализе размерных классов нейронов выявляется неоднородность клеточного состава узлов в различном возрасте крысы. Так, в возрасте 3 и 10 дней жизни в узле присутствуют нейроны соответственно возрастам: очень малых – 53,7% и 38%; малых – 43,6% и 57%; средних – 2,7% и 5% размеров. В 20-дневном возрасте клеточный состав включает нейроны пяти размерных классов: малые – 64% (среди них 21,4% нейронов очень малых размеров), средние – 20,2%, крупные – 9,8% и очень крупные – 6,0%. В 30-дневном возрасте нейронов крупных и очень крупных размеров становится больше – 18% и 12% соответственно классам, доля малых нейронов уменьшается до 32%, а доля очень малых и средних нейронов значимо не отличается от 20-дневного возраста.

Уменьшение доли нейронов малых размеров продолжается до 60-дневного возраста крысы (21,6%) и 90-дневного возраста (19,6%), при этом процент очень малых и средних нейронов не меняется. Отмечается увеличение доли нейронов очень крупных – в 60-дневном возрасте до 20% и в 90-дневном возрасте до 24,6%, и уменьшение доли нейронов крупных размеров – в 90-дневном возрасте до 11,4% ($p < 0,05$).

Таким образом, возрастные особенности заключаются: в наличии в трехдневном и 10-дневном возрасте в спинномозговом узле только нейронов малого и среднего размеров; в увеличении средней площади сечения нейронов до 30-дневного возраста, следствием чего является гетерогенный состав клеточной

популяции узла, и достоверное снижение к 90-дневному возрасту доли нейронов крупных и малых размеров и увеличении доли очень крупных размеров.

TRPV1-иммунореактивные нейроны выявляются во все исследуемые возраста крысы. Популяция этих нейронов является однородной по составу и представлена нейронами малых размеров (Рис. 5.10). Подсчет нейронов показал, что относительное содержание TRPV1-иммунореактивных клеток с возрастом животного увеличивается в 1,4 раза, при этом максимальное повышение доли позитивных нейронов отмечается с 10-дневного возраста ($30,0 \pm 1,8\%$) до 20-дневного возраста ($42,3 \pm 2,7\%$) ($p < 0,05$). В 90-дневном возрасте показатель значимо не отличается от такового в 20-дневном возрасте.

Анализ средней площади сечения нейронов узла выявил, что в 20-дневном возрасте средняя площадь сечения TRPV1-иммунореактивных нейронов больше в 1,3 раза по отношению к 10-дневному возрасту, и до 30-дневного возраста это соотношение не меняется. В 60-дневном возрасте средняя площадь увеличивается в 2,1 раза по отношению к 10-дневному возрасту и не меняется до 90-дневного возраста крысы.

Анализ клеточного состава TRPV1-иммунореактивных нейронов показал, что до 30-дневного возраста крысы более 50% клеток имеют очень малые размеры. В возрасте 60 и 90 дней жизни более 50% клеток принадлежат к классу клеток с площадью от 301 до 600 мкм² и имеют малые размеры. При это, в течение всего периода наблюдения популяция нейронов с TRPV1 была представлена только двумя размерными классами: очень малые – площадью до 300 мкм²; малые – от 301 до 600 мкм².

С трехдневного возраста крысенка иммунореактивные нейроны в узлах так же, как и у взрослой крысы, располагаются или одиночно, что является не таким частым, или в большинстве своём нейроны формируют групповые скопления. Нейрональных кластеры объединяют позитивные нейроны различных размеров, в состав которых входит от 2-3 до 8-10 клеток (Рис. 5.10. А, Б).

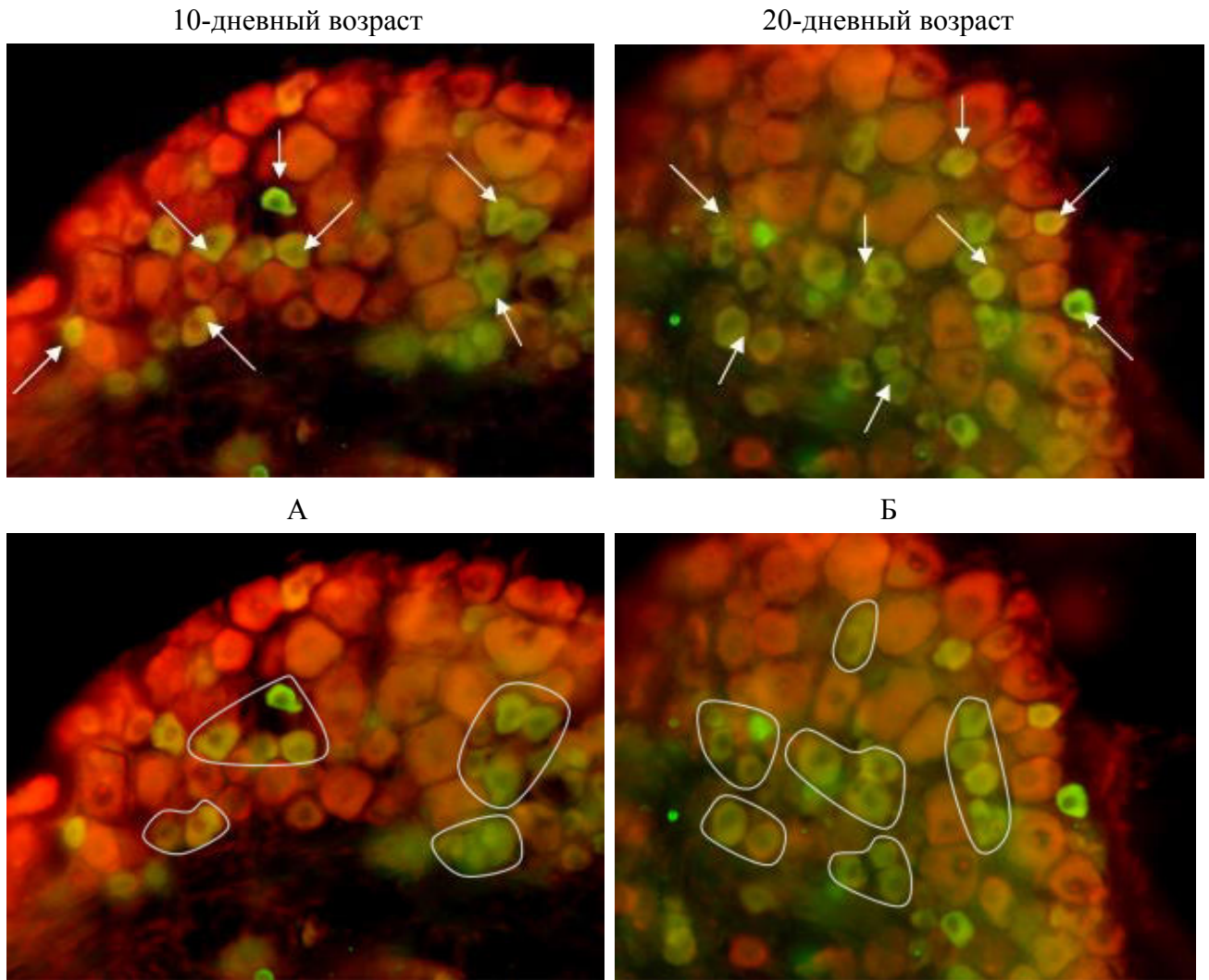


Рисунок 5.10. TRPV1-иммунореактивные нейроны второго грудного спинномозгового узла. Об. 20, ок. 10.

Стрелками обозначены TRPV1-иммунореактивные нейроны.

А, Б: Выделены нейрональные кластеры.

Таким образом, в процессе развития крысы доля TRPV1-иммунореактивных нейронов увеличивается к 20-дневному возрасту (Рис. 5.10.) и не меняется до конца наблюдения - 41-42%, что соответствует данным, полученным на взрослой 90-дневной крысе. Нарастание средней площади сечения нейронов происходит к 60-дневному возрасту крысы. Увеличение размеров нейронов изменяет только процентное соотношение клеток выявленных размерных классов.

Вещество Р-иммунореактивные нейроны выявляются во все исследуемые возраста крысы. С возрастом животного количество нейронов, содержащих вещество Р уменьшается: в 10-дневном возрасте снижение составляет 1,5 раза, после чего процент позитивных нейронов не меняется до 90-дневного возраста крысы (Рис. 5.11.). Максимальное количество иммунореактивных нейронов отмечается в 3-дневном возрасте – $9,5 \pm 0,8\%$. Средняя площадь сечения нейронов, содержащих вещество Р, за весь период наблюдения увеличивается в 1,3 раза, достигая максимальных значений в 60-дневном возрасте крысы с последующим незначительным снижением в 90-дневном возрасте ($p < 0,05$).

Анализ клеточного состава иммунореактивных нейронов показал, что во всех исследуемых возрастах крысы нейроны принадлежат только двум размерным классам: очень малые и малые клетки. При этом до 10 дневного возраста и с 20-дневного до 30-дневного возраста в популяции иммунореактивных нейронов к веществу Р преобладают клетки очень малых размеров - более 80% и более 70% соответственно. В 60-дневном возрасте количество клеток очень малых размеров понижается – до 52,4%, и в 90-дневном возрасте вновь повышается и становится более 60%. Таким образом, совсем небольшая часть (менее 10%) нейронов грудного чувствительного узла у крыс разного возраста содержит вещество Р. Иммунореактивные нейроны в чувствительных узлах отличаются по своим морфометрическим характеристикам, относятся к двум размерным классам, имеют очень малые и малые размеры.

С трехдневного возраста крысенка иммунореактивные нейроны в узлах так же, как и у взрослой крысы, формируют групповые скопления. В возрасте 3 и 10 дней жизни нейроны располагаются преимущественно одиночно или в виде нейрональных кластеров по 2-3 клетки, объединяющие позитивные нейроны малых и очень малых размеров (Рис. 5.11. А, Б). С 20-дневного возраста крысы и в последующие возраста группы нейронов включают от 2-3 до 8-10 клеток.

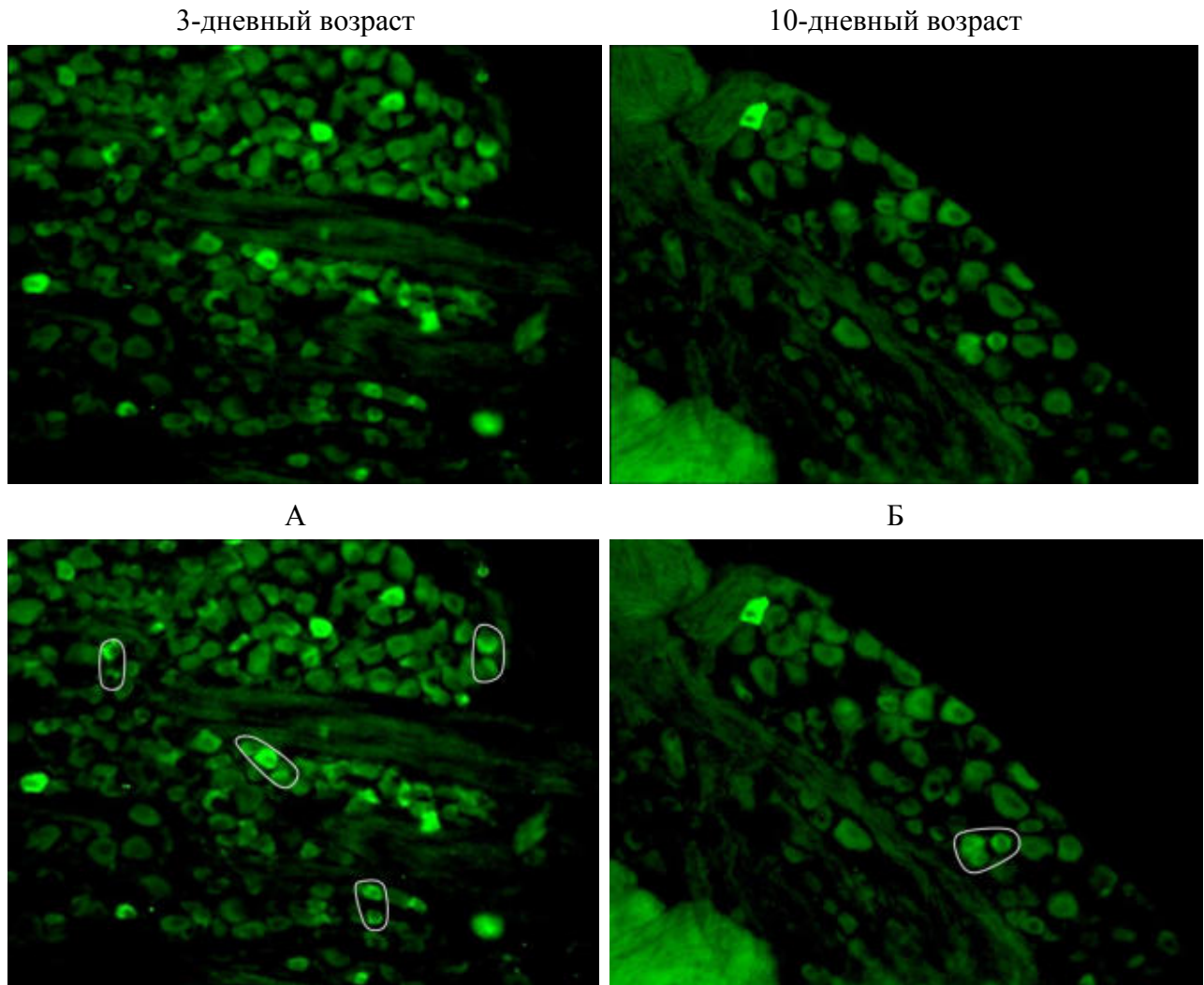


Рисунок. 5.11. Вещество Р-иммунопозитивные нейроны второго грудного спинномозгового узла. Об. 20, ок. 10.

Иммунореактивные нейроны ярко-зеленого цвета.

А, Б: Выделены нейрональные кластеры.

С возрастом крысы средняя площадь сечения вещества Р-иммунореактивных нейронов увеличивается, однако количество нейронов малых размеров остаётся достаточно высоким (более 50%) в течение всего постнатального отрезка. Очевидно, часть ноцицептивной системы, включающая вещество Р-иммунореактивные структуры, у крыс к моменту рождения функционирует, но окончательное становление приходится на 10-дневный возраст крысы.

Нейроны с кальцитонин-ген-родственным пептидом в трехдневном возрасте крысы составляют только небольшую часть ($12,8 \pm 0,6\%$) нейронов грудного узла. Относительное содержание иммунореактивных нейронов к 10-дневному возрасту увеличивается в 2,1 раза ($29,2\%$) (рис. 5.12), затем незначительно снижается к 20-дневному возрасту ($27,3\%$) и остаётся таким же до 90-дневного возраста крысы.

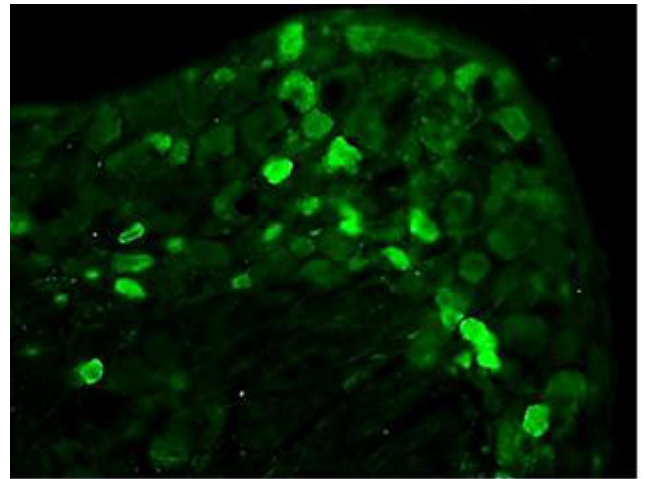
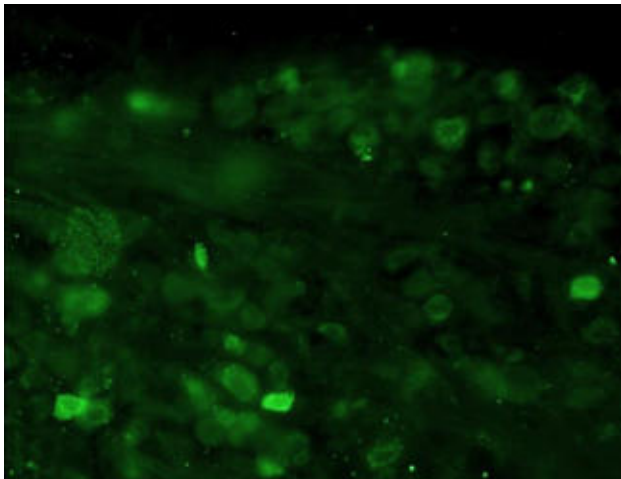
В трехдневном возрасте нейроны, содержащие кальцитонин-ген-родственный пептид, имеют очень малые и малые размеры. До 30-дневного возраста популяция состоит из клеток очень малых, малых и средних размеров, но малые нейроны составляют более 50% только с 20-дневного возраста, что сохраняется до 90-дневного возраста крысы. Процент нейронов средних размеров нарастает с возрастом крысы – от 1,4% в 10-дневном возрасте до 9,3% в 60-дневном возрасте. В 60-дневном возрасте добавляется класс крупных нейронов ($5,3 \pm 0,7\%$), которых в 90-дневном возрасте становится значимо больше ($15,3 \pm 0,7\%$). В этом же возрасте появляются единичные нейроны очень крупных размеров.

Средняя площадь сечения иммунореактивных нейронов с возрастом крысы увеличивается в 1,4 раза, но в 10-дневном возрасте показатель площади снижается и достигает своих минимальных значений, после чего прогрессивно повышается до максимальных значений в 90-дневном возрасте крысы.

Таким образом, количественный состав популяции нейронов иммунореактивных к кальцитонин-ген-родственному пептиду становится стабильным с 20-дневного возраста и сохраняется до 90-дневного возраста крысы. Прогрессивное увеличение средней площади сечения иммунореактивных нейронов связано с появлением в этой популяции нейронов всех пяти размерных классов. Однако большую часть иммунореактивной популяции во всех возрастных группах составляют нейроны малых размеров.

3-дневный возраст

10-дневный возраст



А

Б

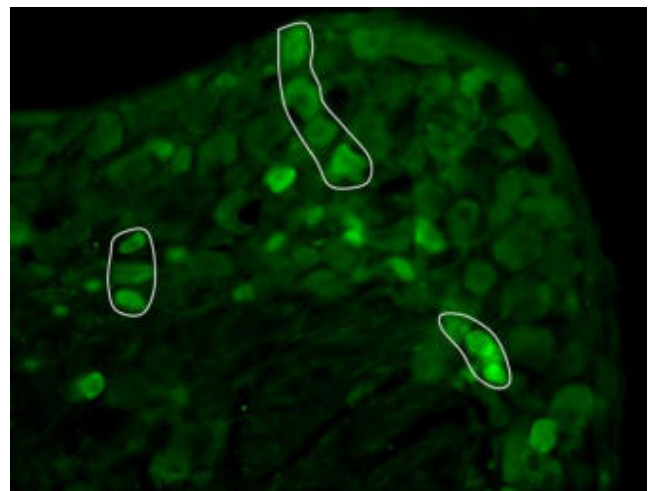
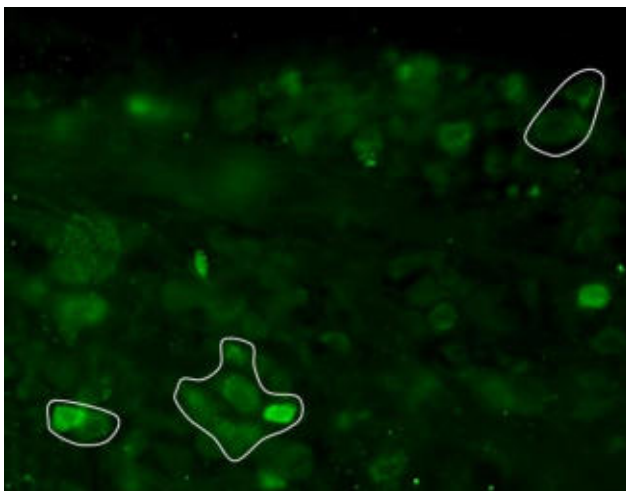


Рисунок 5.12. Нейроны с кальцитонин-ген-родственным пептидом во втором грудном спинномозговом узле. Об. 20, ок. 10.

Иммунореактивные нейроны ярко-зеленого цвета.

А, Б: Выделены нейрональные кластеры.

Вся популяция нейронов, содержащих кальцитонин-ген-родственный пептид имеет флюоресценцию, интенсивность которой меняется с возрастом животного. Так, до 10-дневного возраста крысы нейроплазма иммунореактивных нейронов обладает ярким изумрудным свечением, в последующих возрастах интенсивность люминесценции уменьшается до зеленого цвета (Рис. 5.12.). Во все возраста крысы на срезе узлов выявляются слабо флюоресцирующие волокна.

С трехдневного возраста крысенка иммунореактивные нейроны в узлах так же, как и у взрослой крысы, располагаются или одиночно, или формируют групповые скопления в виде нейрональных кластеров, объединяющих позитивные нейроны различных размеров от 2-3 до 8-10 клеток (Рис. 5.12. А, Б).

Результаты проведенного исследования показали, что лишь небольшая часть нейронов чувствительного узла грудного нерва (12,8-29,2%) содержит кальцитонин-ген-родственный пептид. С 20-дневного возраста количественный состав популяции иммунореактивных нейронов не меняется вплоть до 90-дневного возраста крысы. При этом иммунопозитивностью обладает не только нейроплазма, но и волокна нейронов, что совпадает с данными других исследований (Xu et al., 2005; Price et al., 2007).

Нейроны с белком нейрофиламентов 200 кДа выявляются во все исследуемые возраста крысы, интенсивность флюоресценции в нейронах с возрастом животного не меняется. Свечением обладают нервные волокна, отростки и нейроплазма иммунореактивных нейронов (Рис. 5.13). Подсчет нейронов показал, что в 10-дневном возрасте относительное содержание иммунореактивных нейронов уменьшается в 1,5 раза по сравнению с трехдневным возрастом и становится минимальным.

В 30-дневном возрасте доля иммунореактивных нейронов увеличивается в 1,5 раза, по отношению к трехдневному возрасту и становится максимальной, оставаясь на этих значениях до 90-дневного возраста. Средняя площадь сечения нейронов иммунореактивных к белку нейрофиламентов с возрастом крысы увеличивается в 2,7 раза, с характерным постепенным возрастным увеличением среднего показателя до 60-дневного возраста, последующей его стабильностью до 90-дневного возраста.

До 10 дневного возраста нейроны, содержащие белок нейрофиламентов относятся к трем размерным классам – очень малые, малые и средние размеры, на долю очень малых нейронов приходится более 50 % всех нейронов узла на срезе в трехдневном возрасте и более 50% нейронов малых размеров в 10-дневном возрасте (Рис. 5.13.). В 20-дневном возрасте в узле присутствуют

иммунореактивные нейроны всех размерных классов, преобладающими становится класс средних размеров (более 50%). С 30-дневного возраста и в последующие возраста отсутствуют нейроны очень малых размеров, происходит возрастное укрупнение нейронов, которое проявляется увеличением доли нейронов крупных и очень крупных размеров. Во все возраста крысы иммунореактивные нейроны образуют клеточные группы (Рис. 5.13. А, Б).

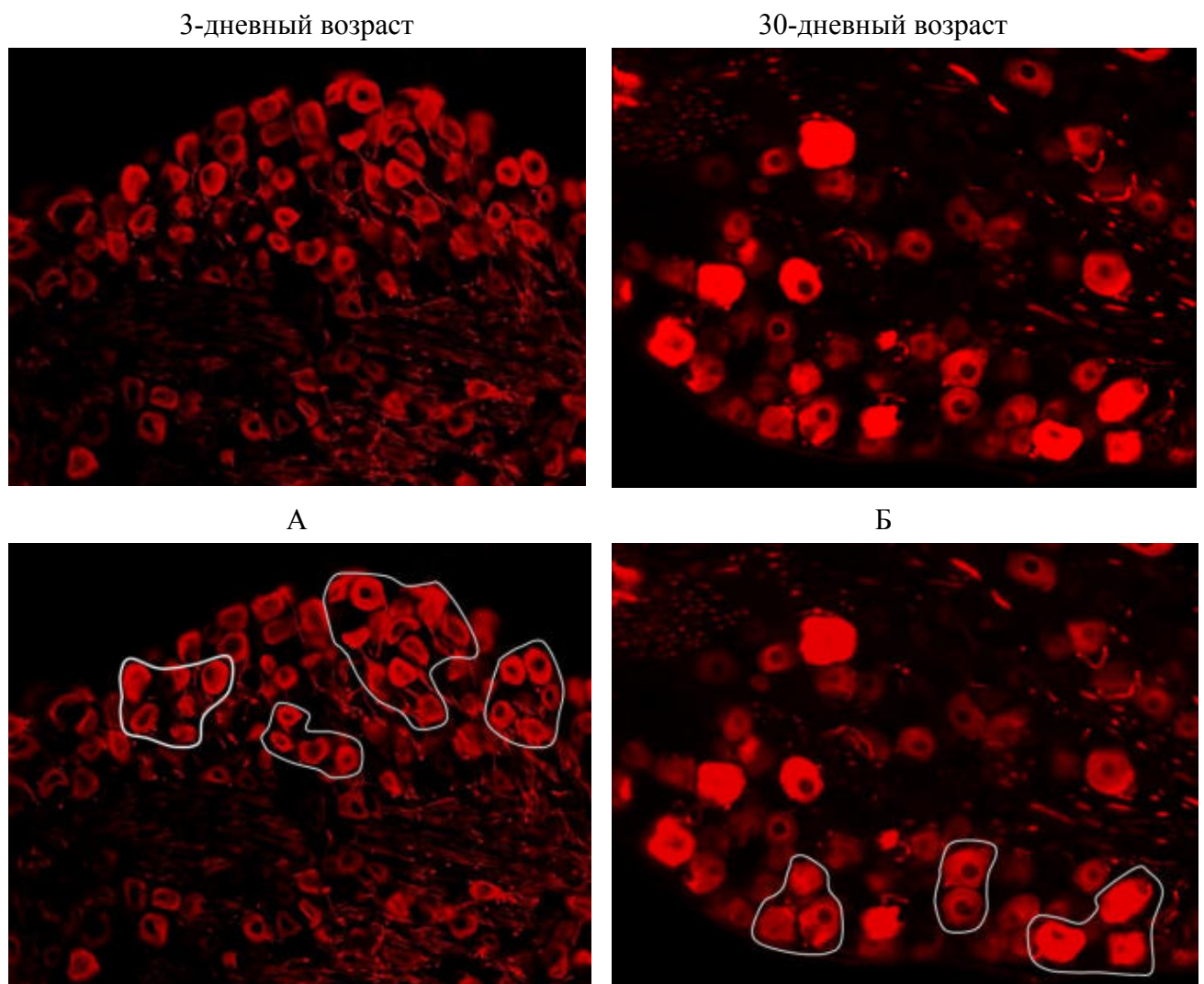


Рисунок 5.13. Нейроны с белком нейрофиламентов 200 кДа во втором грудном спинномозговом узле. Об. 20, ок. 10.

Иммунореактивные нейроны ярко-красного цвета.

А, Б: Выделены нейрональные кластеры.

Кальбиндин-иммунореактивные нейроны выявляются во все исследуемые возраста крысы (Рис. 5.14). В постнатальном развитии животного количество нейронов, содержащих кальбиндин, уменьшается в сравнении с предыдущим возрастом крысы: в 10-дневном возрасте снижение составляет 8,8%, в 20-дневном возрасте – 9,7%, в 30-дневном возрасте – 8,4%, в 60-дневном возрасте – 6,7%, после чего процент позитивных нейронов не меняется до 90-дневного возраста крысы. Максимальное количество иммунореактивных нейронов отмечается в трехдневном возрасте – $37,4 \pm 0,5\%$. Средняя площадь сечения нейронов, содержащих кальбиндин, за весь период наблюдения увеличивается в 1,3 раза, достигая максимальных значений к 90-дневному возрасту ($p < 0,05$).

Анализ клеточного состава кальбиндин-иммунореактивных нейронов показал, что в 3-, 10- и 20- дневном возрасте нейроны принадлежат только трем размерным классам: очень малые, малые и средние клетки. При этом в 3- и 10-дневном возрасте преобладают клетки очень малых размеров (более 40%), а в 20-дневном возрасте – малых размеров (также более 40%). В 30-дневном возрасте появляются немногочисленные нейроны крупных размеров (2,1%), а в 60-дневном возрасте – очень крупных размеров (3,0%).

Таким образом, с возрастом крысы наблюдается укрупнение нейронов, которое сопровождается уменьшением доли нейронов очень малых и средних размеров, увеличением доли нейронов малых размеров (более 60%), с немногочисленными нейронами классов крупных и очень крупных размеров (до 5%).

С трехдневного возраста крысенка и в последующие возраста иммунореактивные нейроны в узлах так же, как и у взрослой крысы, формируют групповые скопления от 2-3 до 8-10 клеток, которые включают нейроны различных размеров (Рис. 5.14. Б).

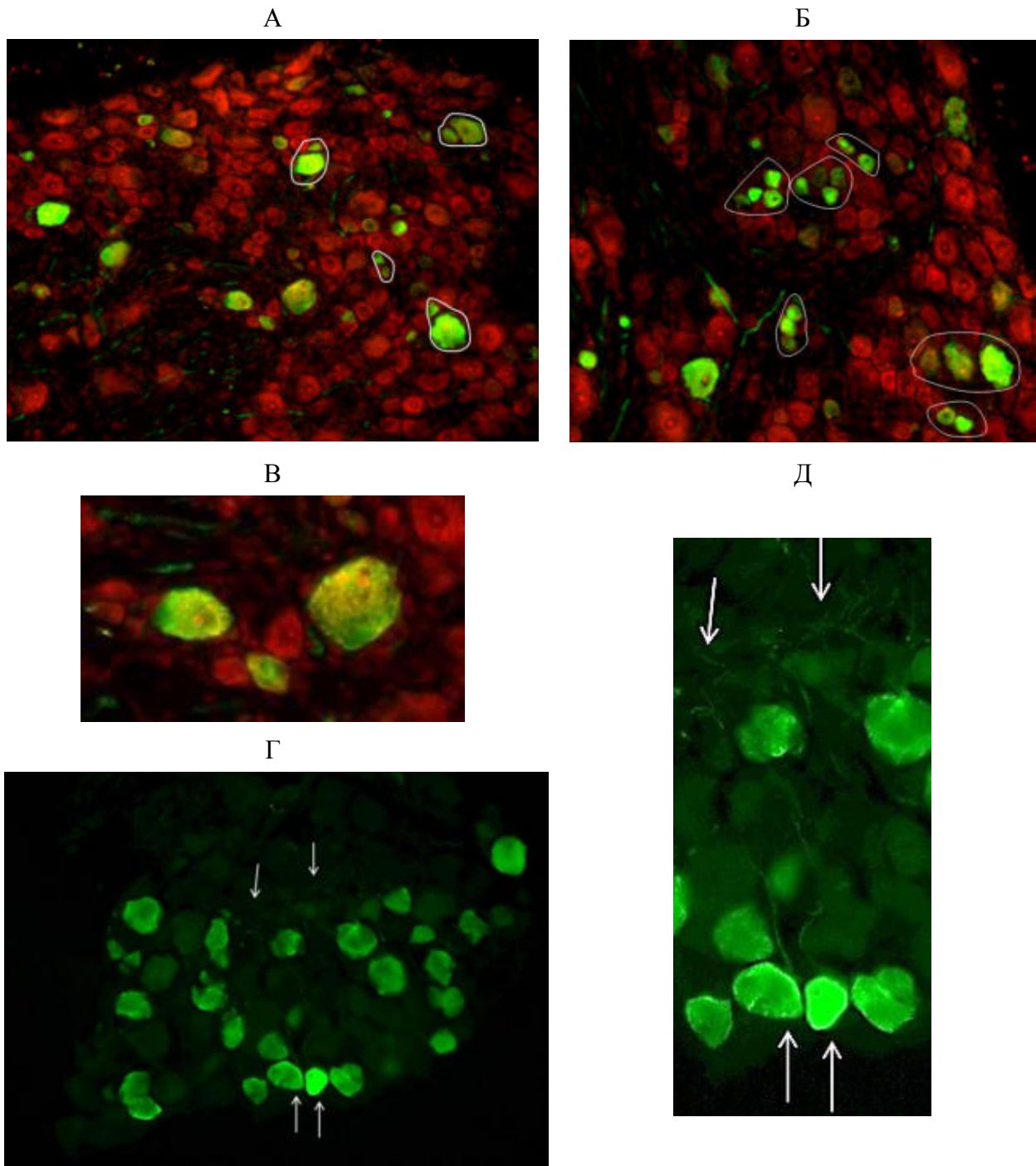


Рисунок 5.14. Кальбиндин-иммунореактивные нейроны второго грудного спинномозгового узла. Об. 20, ок. 10.

Иммунореактивные нейроны зеленого и желто-зеленого цвета.

А: 10-дневный возраст.

Б, Г: 20-дневный возраст.

А, Б: Выделены нейрональные кластеры.

В: фрагмент рисунка А.

Д: фрагмент рисунка Г.

При изучении экспрессии кальбиндина в нейронах узлов у взрослой 90-дневной крысы мы отмечали иммунореактивность нервных волокон, которая также наблюдается и в постнатальном онтогенезе. Но, мы не наблюдали позитивности нервных отростков. В 10-дневном возрасте в популяции нейронов относительно крупных нейронов (что соответствует в данном возрасте размерному классу средних нейронов) отмечается позитивность нервных отростков (Рис. 5.14. Г, Д – отростки указаны стрелками).

По распределению белка кальбиндина, всю популяцию иммунореактивных нейронов можно разделить в 3-, 10- и 20-дневном возрасте крысы на две субпопуляции с высокой интенсивностью флюоресценции: первую – представленную нейронами малых и очень малых размеров с более интенсивной флюоресценцией в ядре по сравнению с цитоплазмой; вторую – нейронами средних и крупных размеров с интенсивной флюоресценцией как в цитоплазме, так и в ядре. При этом, иммунопозитивность ядер наблюдается практически во всех иммунореактивных нейронах, но ядрышко всегда остается интактным и чётко визуализируется (Рис. 5.14. В).

nNOS-иммунореактивные нейроны выявляются на срезах спинномозговых узлов во все возраста крысы. В трехдневном возрасте крысы популяция иммунореактивных нейронов составляет чуть меньше половины всех нейронов узла ($41,3 \pm 3,6\%$). Относительное содержание иммунореактивных к nNOS нейронов первоначально увеличивается в 10-дневном возрасте так, что формирует большую популяцию нейронов узла ($57,6 \pm 2,6\%$). Постепенное увеличение доли иммунореактивных нейронов продолжается вплоть до 30-дневного возраста ($63,8 \pm 1,8\%$), в 60-дневном возрасте процент нейронов уменьшается и не меняется до 90-дневного возраста крысы ($52,7\%$). Средняя площадь сечения нейронов иммунореактивных к nNOS к 90-дневному возрасту крысы увеличивается в 2 раза, с значимым увеличением показателя к 60-дневному возрасту.

Анализ клеточного состава nNOS-иммунореактивных нейронов показал, что в 3-, 10-, 20- и 30-дневном возрасте крысы более 50% клеток имеют очень малые

размеры. В 60 и 90 дневных возрастах более 50% клеток принадлежат к классу клеток с площадью от 301 до 600 мкм² и имеют малые размеры, в этих же возрастах в популяции появляются клетки средних размеров, доля которых не превышает 10%. Во всех возрастах крысы иммунореактивные нейроны образуют клеточные группировки (Рис. 5.15. А, Б).

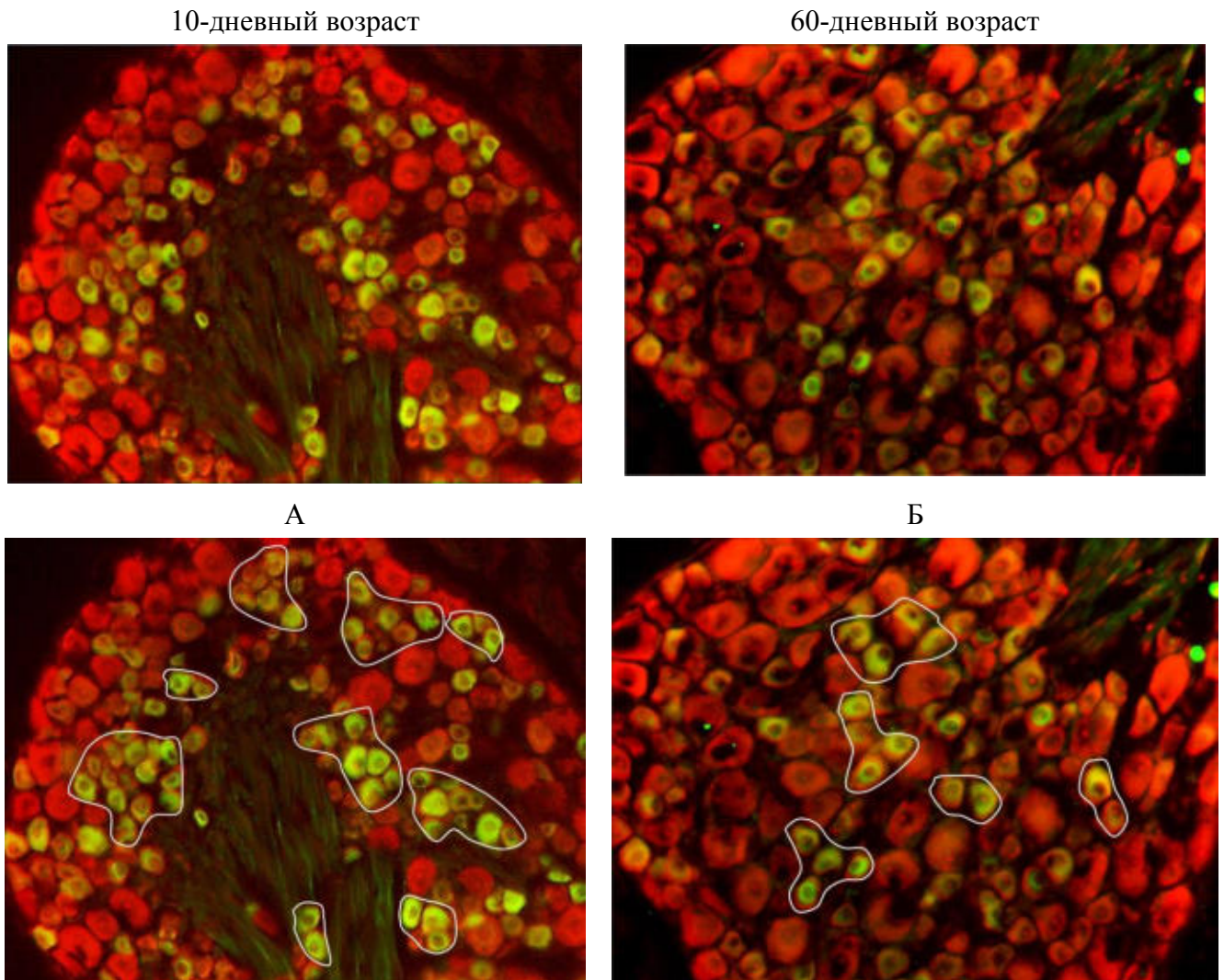


Рисунок 5.15. nNOS-иммунореактивные нейроны второго грудного спинномозгового узла. Об. 20, ок. 10.

Нейроны с nNOS имеют желто-зеленый цвет нейроплазмы.

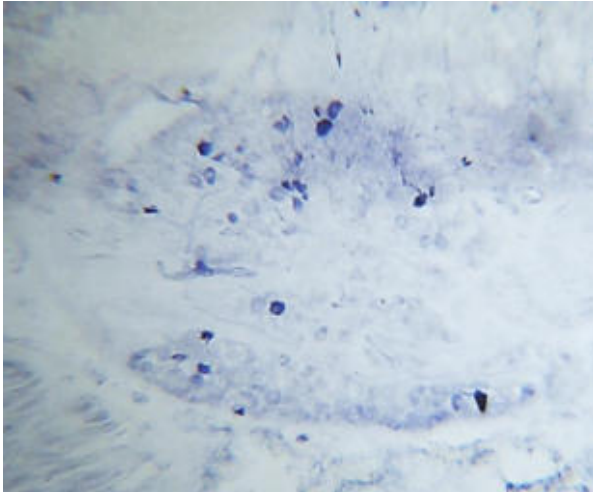
А, Б: Выделены нейрональные кластеры.

НАДФН-диафораза выявляется в нейронах спинномозгового узла с трехдневного возраста крысы, доля которых составляет $9,8 \pm 0,4\%$ от всех нейронов чувствительного грудного узла. Относительное содержание иммунореактивных нейронов к 10-дневному возрасту увеличивается на 48,9%, к 20 дневному возрасту на 165% по сравнению с трехдневным крысенком (Рис. 5.16), затем не меняется до 60-дневного возраста крысы, после чего снижается к 90-дневному возрасту до $12,6 \pm 1,7\%$.

Анализ средней площади сечения НАДФН-диафораза-позитивных нейронов показал, что в трехдневном возрасте крысы нейроны имеют минимальную площадь, которая к 10-дневному возрасту прогрессивно увеличивается - в 1,6 раза ($p < 0,05$), после чего не меняется до 90-дневного возраста. Таким образом, диафораза-позитивные нейроны грудного узла увеличились в размерах уже в 10-дневном возрасте и сохранили свои максимальные средние размеры до 90-дневного возраста крысы.

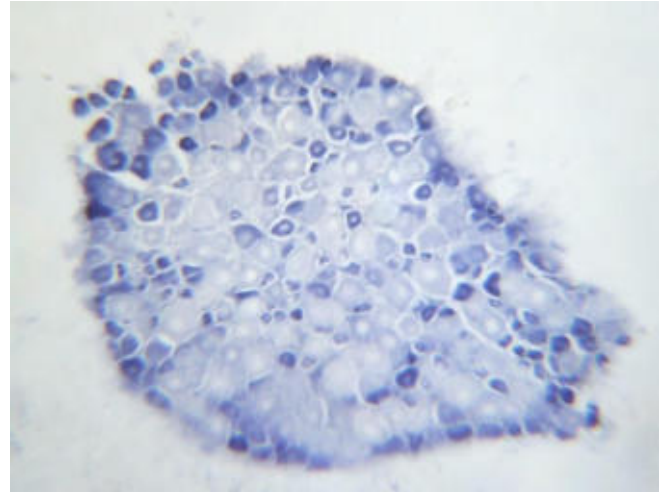
При анализе размерных классов НАДФН-диафораза-позитивных нейронов выявляется неоднородность клеточного состава узлов в различном возрасте крысы. В трехдневном возрасте нейроны с НАДФ-диафоразой были представлены двумя классам: клетки очень малых и малых размеров. В возрасте 10 и 20 дней жизни крысы появляются клетки средних размеров (37,5 и 27% соответственно), а процент нейронов очень малых размеров уменьшается. В 30-дневном возрасте клеточный состав содержит нейроны всех размерных классов: малые – 57,9% (среди них 42% нейронов очень малых размеров), средние – 15,8%, крупные – 15,8% и 10,5% – очень крупные нейроны. В возрасте 60 и 90 дней жизни крысы большая часть диафоразо-позитивных клеток грудного узла имеет очень малые размеры – 42,5 и 46,3% соответственно. При этом в 90-дневном возрасте преобладающими также являются нейроны малых размеров (43,9%), а в 60-дневном возрасте – нейроны средних размеров (37,5%).

3-дневный возраст



А

10-дневный возраст



Б

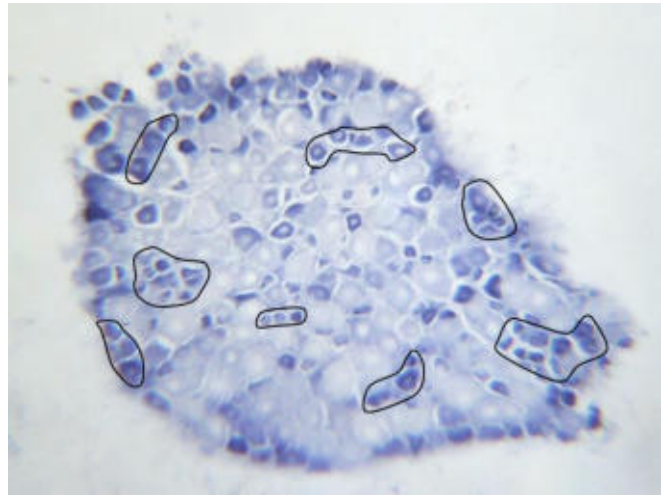
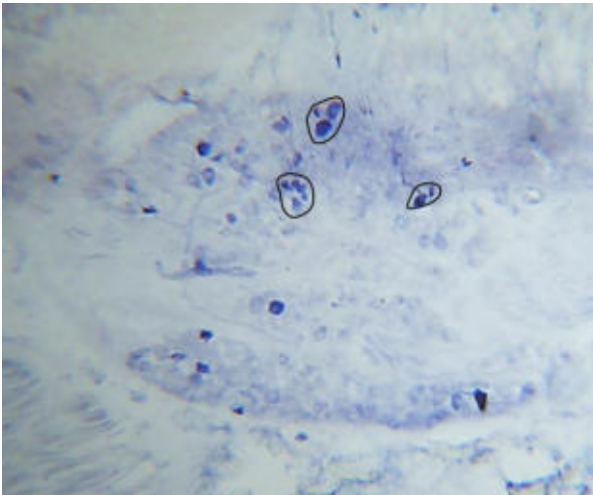


Рисунок 5.16. Нейроны, содержащие НАДФН-диафорузу во втором грудном спинномозговом узле. Об. 10, ок. 10.

Нейроны с НАДФН-диафорузой имеют сине-фиолетовый цвет нейроплазмы.

А, Б: Выделены нейрональные кластеры.

С трехдневного возраста крысенка и в последующие возраста нейроны с НАДФН-диафорузой формируют нейрональные кластеры, содержащие от 2-3 до 8-10 клеток различных размеров (Рис. 5.16. А, Б). Таким образом, уже с раннего периода постнатального развития крысы нейроны спинномозгового узла проявляют НАДФН-диафорузную активность и независимо от возраста большей частью представлены клетками очень малых и малых размеров.

Таким образом, в трехдневном возрасте крысы самыми многочисленными популяциями нейронов узла являются: содержащая nNOS (40,9%); чуть меньше её – содержащая кальбиндин 28 кДа (37,4%) (Табл. 5.3.). Наименьшее число нейронов образуют популяции нейронов, содержащих или вещество Р (9,5%), или НАДФН-диафорузу (9,8%). Чуть больше последних популяций – 12,8% нейронов содержит кальцитонин-ген-родственный пептид. Популяции нейронов, содержащих TRPV1 и белок нейрофиламентов 200 кДа занимают промежуточное положение, доля которых чуть превышает 20% (22,6 и 20,6% соответственно).

К 90-дневному возрасту крыс соотношение некоторых популяций меняется. Но, самой многочисленной остаётся популяция нейронов содержащая NOS (52,7%), а самой малочисленной – популяция нейронов, содержащая вещество Р (6,5%). Популяция нейронов с НАДФН-диафоразой к 90 дневному возрасту увеличивается незначительно (12,5%). Напротив, отмечается значительное увеличение популяций нейронов: содержащих кальцитонин-ген-родственный пептид, доля которых к 90 дневному возрасту крысы составляет 26,3%; содержащих TRPV1 – 41,3%; содержащих белок нейрофиламентов – 29,0%. Обособленно изменяется доля нейронов популяции, содержащих кальбиндин, которая к 90 дневному возрасту крысы характеризуется уменьшением долевого содержания до 26,0%.

В Таблице 5.3. дефинитивные сроки выделены цветом.

В трехдневном возрасте крысы самые малые средние размеры имеют популяции нейронов, содержащих TRPV1, вещество Р, nNOS и НАДФН-диафорузу (Табл. 5.4.). Наибольшие средние размеры имеют нейроны иммунореактивные к белку нейрофиламентов, промежуточные размеры – популяции нейронов с кальбиндином и кальцитонин-ген-родственным пептидом.

Относительное содержание популяций нейронов во втором грудном спинномозговом узле
в постнатальном онтогенезе крысы ($X \pm Sx$, %)

Популяция, содержащая	Возраст крысы (дни жизни)					
	3	10	20	30	60	90
TRPV1	22,6±0,8	30,0±1,8***	42,3±2,7***	47,1±2,6*	44,0±1,8*	41,3±2,7*
Вещество Р	9,5±0,8	6,4±0,4***	6,1±0,4*	5,1±0,2*	6,7±0,4*	6,5±0,4*
Кальцитонин-ген-родственный пептид	12,8±0,6	29,2±1,5***	27,3±1,8*	27,9±1,6*	27,6±1,4*	26,3±1,5*
Белок нейрофиламентов 200 кДа	20,6±1,4	13,5±1,0***	16,6±1,2	30,4±1,7***	27,6±1,5*	29,0±1,8*
Кальбиндин 28 кДа	37,4±1,1	34,1±1,4	30,8±1,9*	28,2±1,7*	26,3±2,6*	26,0±3,1*
NOS (NO-синтаза)	40,9±3,4	57,6±2,6***	61,2±2,2*	63,8±1,8*	52,9±2,4***	52,7±2,2*
НАДФН-диафораза (Р. Лилли)	9,8±0,4	14,6±1,6***	26,0±3,8***	30,2±3,6*	25,5±2,8*	12,6±1,7***

* $p < 0.05$, различия достоверны по сравнению с 3-дневным крысенком

** $p < 0.05$, различия достоверны по сравнению с предыдущим возрастом

Площадь сечения популяций нейронов второго грудного спинномозгового узла
в постнатальном онтогенезе крысы ($X \pm Sx$, $\mu\text{м}^2$)

Популяция, содержащая	Возраст крысы (дни жизни)					
	3	10	20	30	60	90
TRPV1	207,8±11,5	211,1±13,0	276,9±47,6	281,8±83,8	453,5±78,8***	416,2±74,2*
Вещество Р	217,0±7,2	218,1±8,8	225,4±9,2	255,5±9,4*	304,4±8,9***	280,7±8,5***
Кальцитонин-ген-родственный пептид	321,6±12,7	303,8±9,4	356,4±12,3***	373,8±18,7*	401,2±14,1*	462,7±23,1***
Белок нейрофиламентов 200 кДа	425,5±13,1	712,3±19,3***	870,0±19,3***	1017,7±31,2***	1245,3±32,3***	1148,9±36,8*
Кальбиндин 28 кДа	370,4±12,8	393,7±11,3	422,2±13,5***	442,3±19,2*	460,8±12,5*	439,2±26,9*
NOS (NO-синтаза)	235,8±14,2	365,4±10,3***	381,2±14,1*	405,3±13,4*	469,2±10,0***	478,3±12,7*
НАДФН-диафораза (Р. Лилли)	225,4±18,6	353,9±9,4***	403,7±22,8*	460,6±19,4*	462,5±13,7*	367,0±18,0***

* $p < 0.05$, различия достоверны по сравнению с 3-дневным крысенком

** $p < 0.05$, различия достоверны по сравнению с предыдущим возрастом

К 90-дневному возрасту крыс соотношение средних размерных показателей некоторых популяций меняется. По-прежнему очень малые средние размеры имеет популяция нейронов, содержащих вещество Р, их размер не превышает 300 мкм². А самые большие средние размеры имеет популяция нейронов иммунореактивных к белку нейрофиламентов 200 кДа, их площадь аналогична размерам крупных нейронов. Большая часть популяций представляет группу нейронов, имеющих малые размеры (до 600 мкм²), в которую входят нейроны с TRPV1, кальцитонин-ген-родственным пептидом, кальбиндином, nNOS и НАДФН-диафоразой.

О стабилизации популяций нейронов по параметру их средней площади довольно затруднительно. В анализируемом отрезке постнатального онтогенеза, как правило, отмечается изменение показателя во всех изучаемых популяциях и о достоверной его стабилизации нельзя полагать, не зная дальнейшей динамики постнатального развития. Более того, обзор показывает, что дефинитивных характеристик нейроны симпатических узлов достигают к 180-дневному возрасту, чувствительных узлов к 220-дневному возрасту (Румянцева, 2000) или к годовалому возрасту крысы (Masliukov et al., 2014).

Но, анализируя клеточный состав популяций по присутствию нейронов различных размерных классов, прослеживается общая закономерность для всех исследуемых популяций нейронов. При различном наборе размерных классов стабилизация количественного представительства в них нейронов отмечается с 60-дневного возраста. что заключается в присутствии в узле популяций нейронов, содержащих:

- TRPV1 или вещество Р – двух размерных классов: очень малые (более 50% для вещества Р) и малые (более 50% для TRPV1) размеры нейронов;
- nNOS или НАДФН-диафорузу – трех размерных классов: очень малые (более 40% для НАДФН-диафоразы), малые (более 50% для NOS) и средние размеры нейронов;
- кальбиндини или кальцитонин-ген-родственный пептид – всех размерных классов, где 60% нейронов имеют малые размеры;

- белок нейрофиламентов 200 кДа – четырех размерных классов, где 50% нейронов имеют очень крупные размеры, но отсутствует класс нейронов очень малых размеров.

5.2.3. Сегментарные особенности нейронального состава спинномозговых узлов в постнатальном онтогенезе

Морфологическое разнообразие нейронов в узлах периферической нервной системы обычно устанавливается по неравнозначности нервных клеток по размерам, их диаметру, числу отростков, характеру базофильной субстанции, по содержанию различных белков, липидов, ферментов, медиаторов (Ichikawa, Sugimoto, 2002; Xu et al., 2005). С момента выхода монографии А.В. Берсенева (1980), обобщающей исследования нейронного состава чувствительных узлов шейных спинномозговых нервов, накоплены новые факты, касающиеся топографии и химической характеристики нейронов чувствительных узлов. Однако анализ представляемых исследователями результатов работ затрудняется различиями в использованных методах исследования и животных, а также несопоставимостью по виду, полу и возрасту. Обобщенная характеристика нейронов конкретных чувствительных узлов спинномозговых нервов в различные возрастные периоды жизни белой крысы может оказаться полезной для понимания динамики развития центров чувствительной иннервации, уточнения структурно-функциональной характеристики их нейронов, выявления изменений нейронов чувствительных узлов под влиянием антропогенных факторов.

Сегментарные особенности сенсорных нейронов изучали на различных уровнях: четвертый шейный узел – С4; второй грудной узел – Т2; четвертый поясничный узел – L4; второй крестцовый узел – S2. Вся совокупность нейронов узлов исследуемых уровней нами была поделена также на пять групп по их показателям площади: очень малых (до 300 мкм²), малых (301-600 мкм²), средних (601-900 мкм²), крупных (901-1200 мкм²) и очень крупных (1201-1500 мкм²) размеров. Эта градация позволяет сравнивать результаты исследования чувствительных узлов не только различных сегментарных уровней, но и у

животных различного возраста. Её использовали также в гистохимических и в иммуногистохимических исследованиях. В результате установлены общие черты строения спинальных узлов, которые независимо от возраста и сегментарного уровня характеризовались выраженным структурным и нейрхимическим разнообразием. Наши исследования отражены в публикациях: В.В. Порсейвой (2009, 2011, 2012, 2013; 2019); В.В. Порсейвой, В.В. Шилкина (2011); В.В. Порсейвой и др. (2012); В.В. Порсейвой, П.М. Маслюкова (2013); П.М. Маслюкова и др. (2013); В.В. Шилкина и др. (2014).

Морфометрическая характеристика

Общим для клеточного состава изученных узлов является то, что до 10-дневного возраста преобладают клетки малого и очень малого размеров, в 20-дневном возрасте – малого и среднего размеров, с 30-дневного возраста увеличивается процент нейронов крупного и очень крупного размеров. К общим признакам строения спинномозговых узлов следует отнести различную аффинность нервных клеток к красителю, при невосприимчивости которого нейронами, на срезе узла формируются очаги их «выпадения».

Сегментарные различия спинномозговых узлов выявляются с 30-дневного возраста крысы в виде большего представительства очень крупных клеток и меньшего представительства средних и крупных клеток в L4, тогда как в T2 и в S4 преобладают средние, мелкие и очень мелкие нейроны. К сегментарным особенностям чувствительных узлов следует отнести различный прирост мерных параметров их нейронов: при фактически одинаковом ($p > 0,05$) в 10-дневном возрасте среднем диаметре нейронов (в T2 $21,6 \pm 0,46$ мкм; в L4 $22,2 \pm 0,63$ мкм) к 90-дневному возрасту диаметр их в L4 увеличивается в 4,5, тогда как в T2 – только в 3,1 раза. Учитывая, что мерная характеристика нейронов чувствительных узлов спинномозговых нервов ассоциируется с их функциональной характеристикой, представляется важным рассмотреть химическую организацию различных популяций сенсорных нейронов.

Гистохимическая характеристика

Подсчет доли НАДФН-диафороза-позитивных нейронов показал, что в трехдневном возрасте крысы наибольшее количество позитивных клеток выявляется С4 (23%), наименьшее – в S2 (8,4%). С возрастом крысы содержание в узлах НАДФН-диафороза-позитивных нейронов уменьшается в 3 раза в С4, в 1,5 раза в Т2 и в L4, и в 1,4 раза в S2, при этом минимальное количество позитивных нейронов в узлах отмечается к 360-дневному возрасту крысы (доля их варьирует от 6,5% до 7,5% в зависимости от узла). Темно-синюю окраску нейроплазмы имеют, как правило, очень мелкие и мелкие нейроны, содержание которых в 90-дневном возрасте было выше в Т2 и S2, среднее в L4 (48,9%) и низкое в С4 (33,1%). Обращает на себя внимание обратная зависимость выраженности НАДФН-диафорозы от размера нейрона во всех спинномозговых узлах: чем крупнее нейрон, тем менее выражена в нем активность фермента.

Иммуногистохимическая характеристика

Нейрональная NO-синтаза (NOS). В спинномозговых узлах содержание nNOS-иммунореактивных нейронов зависит от возраста белой крысы. По сравнению с трехдневными крысятами у 10-дневных обнаруживается увеличение доли nNOS-иммунореактивных нейронов в Т2 с 40,9% до 57,6%, а в L4 с 41,2% до 54,6%. В последующих возрастах число иммунореактивных нейронов колеблется незначительно. Достоверные различия количественного содержания nNOS-иммунореактивных нейронов между узлами изученных уровней не выявлены. Средняя площадь сечения nNOS-позитивных и негативных нейронов возрастала в исследованных узлах до 60-дневного возраста крысы. Но, начиная с 10-дневного возраста жизни, средняя площадь сечения nNOS-иммунопозитивных нейронов достоверно ($p < 0,05$) уменьшалась по сравнению с nNOS-иммунонегативными нейронами.

Белок нейрофиламентов 200 кДа. С увеличением возраста крысы количество нейронов, содержащих высокомолекулярный компонент белка нейрофиламентов в спинномозговых узлах изменяется неоднозначно. В T2 доля иммунореактивных нейронов в 10-дневном возрасте уменьшается в 1,5 раза и становится минимальной (13,5%), затем к 30-дневному возрасту увеличивается в 1,5 раза и становится максимальной (30,4%), оставаясь на этом уровне до 90-дневного возраста крысы. В дальнейшем доля иммунореактивных нейронов уменьшается к 360-дневному возрасту крысы, и не отличается от доли трехдневного возраста (20,6%). В L4 доля иммунореактивных нейронов в 10-дневном возрасте также уменьшается в 1,4 раза (16,6%) и продолжает уменьшаться до 20-дневного возраста (14,8%). Затем количество иммунореактивных нейронов к 30-дневному возрасту увеличивается (28,2%) и достигает максимальных значений в 60-дневном возрасте (30,5%), превышая показатель трехдневного возраста (23,6%) в 1,3 раза. Приблизительно такая же доля иммунореактивных нейронов остаётся до 90-дневного возраста (29,1%). В последующие возраста крысы доля иммунореактивных нейронов уменьшается и в 360-дневном возрасте становится соразмерной с долей трехдневной крысы (22,0% и 23,6%, соответственно).

Средняя площадь сечения нейронов иммунореактивных к белку нейрофиламентов 200 кДа к 360-дневному возрасту крысы увеличивается в 3,1 раза в T2 и в 3,4 раза в L4. Для этих уровней является характерным постепенное возрастное увеличение среднего показателя до 60-дневного возраста, последующая относительная его стабильность до 180-дневного возраста и вновь повышение до максимальных значений к 360-дневному возрасту. Но динамика прироста средней площади сечения различается в зависимости от уровня. Так, максимальный суточный прирост её наблюдается в T2 с 3- по 10-дневный возраст крысы, составляет $40,9 \text{ мкм}^2$, в L4 – с 10 по 20 день и составляет $33,3 \text{ мкм}^2$, а минимальный прирост площади наблюдается с 30- по 60-дневный возраст крысы и составляет $7,6 \text{ мкм}^2$ в T2 и $11,1 \text{ мкм}^2$ в L4.

Популяция иммунореактивных нейронов в чувствительных узлах имеет в основном средние, крупные и очень крупные размеры. Только в трехдневном возрасте мелкие нейроны проявляют иммунореактивность к белку нейрофиламентов. Очевидно, именно эта группа в дальнейшем трансформируется в средние и крупные нейроны. В Т2 очень крупные иммунореактивные нейроны выявляются уже с 20-дневного возраста крысы (1,8%), в L4 – с 20-дневного возраста (11,1%), причём доля их к 360-дневному возрасту крысы прогрессивно увеличивается до 61,1% в Т2 и до 72,3% в L4. В очень мелких нейронах белок нейрофиламентов 200 кДа не выявляется с 30-дневного возраста в Т2 и L4, иммунореактивность к этому белку проявляют лишь немногочисленные нейроны малых размеров (от 1,1 до 4%).

5.2.4. Заключительные замечания

В трехдневном возрасте количество нейронов различных популяций составляет в зависимости от маркера по возрастающей: вещество Р ~ НАДФН-диафораза ~ кальцитонин-ген-родственный пептид ~ белок нейрофиламентов 200 кДа ~ TRPV1 ~ кальбиндин 28 кДа ~ nNO-синтаза (9,5% – 9,8% – 12,8% – 20,6% – 22,6% – 37,4% – 40,9%). В дальнейшем изменения количества являются гетерохронными: увеличение доли нейронов имеет место быть к 10-дневному возрасту при определении кальцитонин-ген-родственного пептида; к 30-дневному возрасту при определении TRPV1, nNOS, НАДФН-диафоразы и белка нейрофиламентов. Тогда как, число клеток, экспрессирующих вещество Р уменьшается к 10-дневному возрасту, а кальбиндина к 60-дневному возрасту постнатальной жизни крысы. При этом, количество нейронов с белком нейрофиламентов к 10-дневному возрасту уменьшается, а с 20-дневного возраста увеличивается.

В трехдневном возрасте иммунореактивность к кальбиндину и белку нейрофиламентов выявляется в гетерогенных по размерам популяциях нейронов (до 900 мкм²), в которых, однако, преобладают малые и очень малые нейроны.

Экспрессию вещества P, кальцитонин-ген-родственного пептида, TRPV1, nNOS и ферментативную активность НАДФН-диафоразы проявляют популяции только малых и очень малых нейроны (до 600 мкм²).

По количественному содержанию популяции достигают значений, характерных для взрослого животного в различные возраста постнатального онтогенеза. Наиболее раннее становление отмечается в популяции нейронов, содержащих вещество P (10-дневный возраст). Позднее стабилизируется количественный состав популяций нейронов: в 20-дневном возрасте – содержащих кальцитонин-ген-родственный-пептид и TRPV1; в 30-дневном возрасте – содержащих белок нейрофиламентов 200 кДа; в 60-дневном возрасте – содержащих nNOS и кальбиндин.

Стабилизации количественных характеристик популяций нейронов, содержащих НАДФН-диафорузу, не наблюдается в течение всего анализируемого постнатального отрезка онтогенеза, в частности, волнообразность динамических изменений не позволяет с достоверностью констатировать факт становления ферментативной активности в течение 90 дней постнатального онтогенеза крысы. По-видимому, это связано с функциональным действием данного фермента. Известно, что НАДФН-диафоруза является восстановителем, отдающим электроны, участвует в переносе электронов в мембранах митохондрий, тем самым обеспечивает реализацию окислительно-восстановительных процессов и регуляцию активности внутриклеточных белков клетки. В тоже время, активация НАДФН-диафоразы в нервных клетках ассоциируется, как с апоптозом клеток, так и с развитием нейродегенеративных заболеваний, что обусловлено её мощным прооксидантным действием, индуцирующим образование свободных радикалов (Tammariello et al., 2000).

В тоже время, все типы NOS, в том числе и нейрональная, используют в качестве кофактора НАДФН-диафорузу (Förstermann, Sessa, 2012). Но, не представляется возможным проводить аналогию между ферментативной активностью НАДФН-диафоразы и иммунореактивностью к nNOS в сенсорных нейронах. Как видно, количественные параметры данных популяций разительны.

Не случайно, наверно, топография NO-ергических нейронов, выявленных гистохимическим методом определения НАДФН-диафоразы и иммуногистохимическим методом определения экспрессии nNOS, не совпадают ни в спинном мозге, ни в чувствительных узлах спинномозговых нервов. Различия в нейронах, содержащих НАДФН-диафорузу и nNOS, могут свидетельствовать о наличии функционально различных популяций нейронов. В любом случае, однако, признается нейропротекторное действие оксида азота и его участие в регуляции внутриклеточного кальциевого обмена.

Более того, активация экспрессии nNOS наблюдается при высоком содержании комплекса кальций/кальмодулин (Michel, Feron, 1997). Возможно, стабилизация количественного содержания nNOS происходит параллельно с экспрессией кальбиндина 28 кДа в сенсорных нейронах, который и является регулятором содержания катионов кальция в нейроплазме нейрона.

Более ранняя стабилизация количественных характеристик нейронов иммунореактивных к веществу P, TRPV1 и кальцитонин-ген-родственному пептиду, возможно, обусловлена их физиологической функцией, которая окончательно устанавливается постнатально и связана с возрастным развитием C-волокон. При этом, данные обзора разнятся – в течение первой недели жизни (Hall et al., 1997), двух недель жизни (Woodbury, Koerber, 2003). Что, в принципе, не противоречит нашим данным. В первые 10 дней жизни отмечается стабилизация популяции нейронов с веществом P, в последующие 10 дней - популяций нейронов с TRPV1 и кальцитонин-ген-родственным пептидом. Это не исключает ни одно недельного, ни двух недельного периода жизни крысы, так как в нашей работе анализировались возрастные сроки в 10 дней и 20 дней жизни.

Более позднее становление количественного содержания популяции нейронов иммунореактивных к белку нейрофиламентов 200 кДа, которое регистрируется к 30-дневному возрасту крысы объяснить сложно, так как считается, что сенсорные нейроны с A-волоконками являются функционирующими уже к моменту рождения (Ririe et al., 2008). Возможно, это связано с более поздним становлением экспрессии кальбиндина, который выявляется в клетках

различного размера - от мелких до крупных (Zhang et al., 1990). Показана ко-экспрессия белков нейрофиламентов и кальций-связывающих белков в сенсорных нейронах (Medici, Shortlan, 2015).

Еще более позднее становление количественных характеристик популяций нейронов иммунореактивных к nNOS и кальбиндину (60-дневный возраст), возможно, обусловлено более высоким содержанием митохондриального фермента глутаминазы, обеспечивающего синтез глутамата, в нейронах не только малого, но и среднего размеров (Hoffman et al., 2010), доля которых этому возрасту у крысы нарастает. Известно, что все первичные афференты экспрессируют глутамат, а непосредственно экспрессия nNOS обусловлена входом ионов кальция в клетку, опосредованного глутаматом (Kim et al., 2011).

Установлено, что у 90-дневных взрослых белых крыс во втором грудном спинномозговом узле в зависимости от исследованных популяций, положительную реакцию проявляют от 6,5% до 52,7% нейронов. Если считать, что один нейрон обладает средством к одному нейротрансмиттеру, то тогда вся популяция первичных сенсорных нейронов узла была бы иммунореактивна хотя бы к одному из изученных трасмиттеров. Но с учетом данных литературы о солокализации нескольких нейротрансмиттеров в нейроне (Piper, Docherty, 2000; Vucelli et al., 2008) приходится констатировать, что только часть нейронов узла являются функционально специфичными. О возможной солокализации нескольких исследуемых маркеров свидетельствует, очевидно, суммарное число выявленных нами иммунореактивных нейронов, которое превышает 100%.

Полученные данные позволяют отнести к ноцицептивным, нейроны различных размерных классов – от очень мелких (до 300 мкм²) до очень крупных (от 1201 мкм²). При этом, крупные клетки есть среди популяций нейронов с кальцитонин-ген-родственным пептидом и особенно среди нейронов с белком нейрофиламентов 200 кДа. Это является косвенным свидетельством того, что к ноцицептивным относятся не только очень малые и малые нейроны, в которых выявлены TRPV1, вещество P и кальцитонин-ген-родственный пептид, но и крупные нейроны, включая белок нейрофиламентов, образующие средние и

крупные миелиновые волокна. Об этом же свидетельствует солокализация TRPV1 с белком нейрофиламентов 200 кДа, обнаруженная в части нейронов (Yoshimura et al., 1998; Suzuki et al., 2003). Совмещение TRPV1 с кальбиндином свидетельствует об участии мелких нейронов в хемосенсорных функциях (Ichikawa, Sugimoto, 2002). Средние и крупные нейроны, иммунореактивные к белку нейрофиламентов, образуют свободные древовидные окончания, представляющие механорецепторы, ноцицепторы, возбуждающиеся высокоинтенсивными механическими и термическими стимулами. Эти же клетки содержат кальбиндин, оксид азота, кальцитонин-ген-родственный пептид. Очевидно, неизученное до настоящего времени совмещение в одной клетке различных веществ, обуславливает их полимодальную рецептивность.

Исследование узлов при окраске тионином, гистохимическими и иммуногистохимическими методами позволяет заключить, что независимо от метода выявления нейронов чувствительных узлов, проявляется четкая их группировка на ограниченной территории среза узла, свидетельствующая о кластерной организации не только нейронов симпатических и интрамуральных узлов (Чусовитина, Вараксин, 2003; Пушина и др., 2007; Porseva, Shilkin, 2012), но и нейронов спинномозговых узлов. Существенным является общность нейронной организации узлов периферической нервной системы, которая проявляется в кластерном характере их топографии. Кластерный принцип топографии нейронов в узлах отмечался и ранее. Так, отмечена кластерная локализация нейронов в шейно-грудном узле различных животных, включая человека (Ноздрачев, Фатеев, 2002; Порсева, Шилкин, 2011; Anderson et al., 2001), исследования по солокализации нейропептидов в паравертебральных, превертебральных и чувствительных узлах также свидетельствуют о кластерном характере топографии нейронов (Miyata et al., 1997; Zhou et al., 1998). На сопоставимой площади среза в каждой исследуемой популяции можно насчитать от 2-3 до 8-10 нервных клеток. К сожалению, методы установления солокализации указанных веществ, определяемых гистохимическими и иммуногистохимическими методами до настоящего времени отсутствуют.

Вместе с тем, выраженность НАДФН-диафоразы в нейронах спинномозговых узлов является обратно пропорциональной их размерам – чем больше площадь сечения нейрона, тем меньшая в нем выявляется активность фермента вплоть от отсутствия, и наоборот. Эта закономерность не отмечается в гистохимическом исследовании НАДФН-диафоразы методом, описанным V.T. Hore, S.R. Vincent (1989), пригодным для определения выявляемости диафоразо-позитивных нейронов, а не для оценки в них выраженности ферментативной активности при сравнительных исследованиях. Последнее возможно при использовании тетразолиевого метода Р. Лилли (1969).

Присутствие в узле хроматофильных нейронов, как правило, или крупных и малых размеров, выражает функциональное состояние нейронов. Действительно, пикноморфные клеточные элементы не всегда легко отличить от дистрофически измененных нейронов (Н.Е. Ярыгин, В.Н. Ярыгин, 1973). Но, наличие пикноморфных, хроматофильных нейронов показано в норме, как в центральной, так и в периферической нервной системе (Войно-Ясенецкий, Жаботинский, 1970). В пользу физиологических изменений нейронов говорит тот факт, что: во-первых – хроматофильные клетки в узле располагаются в виде отдельных, одиночных клеточных элементов, в то время как процесс сморщивания в целом распространяется на значительную часть нейронов; во-вторых – в узле присутствуют хроматофильные нейроны различных размеров, как мелких, так и крупных, а процесс сморщивания сопровождается изменением и, прежде всего, уменьшением размеров клеточных тел; в-третьих – все нейроны узла имеют, как правило, округлую форму клеточного тела и ядра, процесс сморщивания приводит к изменению форм, как тел нейронов, так и их ядер. Действительно, в части нейронов узла ядро было базофильным, что, возможно, обусловлено обилием гранулярного аппарата, а не наличием конденсированного хроматина (Калимуллина, 2002).

Данные по нейронному составу спинномозговых узлов в постнатальном онтогенезе ограничены: обычно исследования касаются только взрослых особей или зародышей; практически не изучены особенности нейронов чувствительных

узлов различного сегментарного уровня. Исследование структурно-функциональных характеристик нейронов чувствительных узлов спинномозговых нервов на различных сегментарных уровнях в различных возрастах показывает как общие закономерности химической организации нейронов, так и возрастные особенности динамики становления экспрессии изученных маркеров, но выраженные сегментарные особенности при этом отсутствуют.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований определены основные морфометрические параметры областей серого вещества второго грудного сегмента спинного мозга в постнатальном онтогенезе крысы. Возрастные изменения формы и соотношений частей серого вещества спинного мозга обусловлены периодами интенсивного увеличения площади – максимальными (наибольшими) приростами показателя и соответственно увеличением доли соответствующей части серого вещества: дорсального рога в возрасте 7 и 10 дней жизни, промежуточной зоны – в 10-дневном возрасте, вентрального рога – в возрасте 10 и 15 дней жизни. Диаметралью противоположно от этих частей изменяются как показатели площади поля X, так и непосредственно доленое участие поля X в формировании серого вещества во втором грудном сегменте спинного мозга крысы. У крысы площадь серого вещества более интенсивно увеличивается в первые 20 дней жизни, что объясняет преобладание серого вещества над белым в раннем периоде постнатального онтогенеза млекопитающих (Писалева, 2012; Фасакутдинова и др., 2015). С 20-дневного возраста площадь серого вещества увеличивается менее интенсивно, достигая максимальных значений в 180-дневном возрасте крысы, после чего показатель значимо не меняется. При этом, имеющая возрастная перестройка процентного участия областей (рогов) серого вещества в его формировании обусловлена преимущественным увеличением доли вентрального рога в раннем постнатальном онтогенезе, а именно, в возрасте 10 и 15 дней жизни, и уменьшением доли поля X. Следующая перестройка частей серого вещества наблюдается в 180-дневном возрасте крысы вследствие увеличения доли только дорсального рога и уменьшения долей других частей серого вещества, что сохраняется до 360-дневного возраста крысы. В целом, если анализировать средние значения площадей каждой части серого вещества по отдельности, то наблюдается тенденция к уменьшению их размеров с 240-дневного возраста крысы. Возможно,

такая перестройка обусловлена возрастным удлинением именно грудных сегментов спинного мозга, что показано у грызунов (Козельская, 1974).

Относительно стабильное превалирование размеров дорсального рога над вентральным рогом и промежуточной зоной спинного мозга прослеживается в течение всего изученного периода постнатального онтогенеза крысы. Тем не менее, постнатальный период роста серого вещества сопровождается выраженной гетерохронностью развития областей серого вещества (рогов). В целом, конфигурация серого вещества, форма и размеры его отдельных областей, меняются в течение всего исследуемого временного отрезка постнатального онтогенеза. Но, пластинчатая и ядерная организация серого вещества у крыс является уже определяемой в трехдневном возрасте крысы. Для всех ядер отношение их площадей ко всему серому веществу устанавливается стабильным с 10-дневного возраста и не меняется до 360-дневного возраста крысы. При этом, установление окончательного расположения ядер в сером веществе спинного мозга соответственно топографии взрослой 90-дневной крысы обусловлено их смещением в дорсовентральном направлении, таким образом, что у взрослой 90-дневной крысы ядра принадлежат различным частям и пластинкам серого вещества: дорсальное ядро дорсальному рогу (пластинка V) и промежуточной зоне (пластинка VII); промежуточно-медиальное ядро – промежуточной зоне (пластинка VII) и полю X; симпатические преганглионарные нейроны – промежуточной зоне (латеральный рог, пластинка VII) и полю X.

По нейрональному составу общим для пластинок и ядер является то, что на поперечном срезе в сером веществе спинного мозга определяется четыре типа нейронов на основании их форм клеточных тел: овальные, веретеновидные, треугольные и многоугольные. Обнаруживается определенное сходство в относительном содержании клеточных форм вставочного и промежуточно-медиального ядер, возможно, это обусловлено расположением обеих ядер в промежуточной зоне спинного мозга, их «вставочностью» в висцеросенсорных связях (Calka et al., 2008), и участием в симпатическом модуле спинного мозга (Пивченко, 1993).

Литературные данные свидетельствуют о том, что в каждой пластинке спинного мозга определяется до трети нейронов, которые являются не дифференцируемыми и не подходят ни под один из описываемых типов (Ribeiro-da-Silva, 2004; Lu et al., 2005, 2015; Todd, 2010). Если учитывать именно форму сечения клеточного тела на поперечном срезе серого вещества, то это устраняется, и может применяться как один из вариантов морфологического анализа всех нейронов спинного мозга.

Исследование количественного состава пластинок дорсального рога спинного мозга позволило установить неоднозначность изменений абсолютного количества нейронов в пластинках и плотности расположения в них клеток в постнатальном онтогенезе крысы. Так, в первые 10 дней жизни при увеличении абсолютного количества нейронов в пластинках I и II, стабильности количества в пластинках III и IV, и уменьшении количества в пластинке V, плотность расположения клеток на стандартной площади среза уменьшается наиболее интенсивно во всех пластинках дорсального рога. В последующие возраста отмечается менее интенсивное уменьшение клеточной плотности в пластинках дорсального рога, показатель стабилизируется в 90-дневном возрасте. Максимальная плотность расположения клеток в дорсальном роге наблюдается в пластинке II в течение всего периода онтогенеза. Как видно, определение плотности расположения клеток в пластинках не отражает возрастной динамики изменения абсолютного количества в пластинках дорсального рога. Уменьшение клеточной плотности в пластинках дорсального рога находит подтверждение в увеличении площадей соответствующих пластинок. Увеличение абсолютного количества нейронов в пластинках поверхностной области дорсального рога, возможно связано с повышенной их восприимчивости к основному красителю (окраска тионином) на данном этапе развития. Нами было показано, что во всех пластинках в первые 10 дней жизни преобладают овальные формы клеток. Возрастное изменение распределения клеточных форм в пластинках меняется также разнонаправленно. В пластинках II и III динамика отсутствует, в

пластинках I, IV и V отмечается увеличение процента треугольных и многоугольных форм с возрастом крысы.

В пластинках промежуточной зоны, вентрального рога и ядрах спинного мозга, как абсолютное количество клеток, так и плотность расположения клеток уменьшаются, максимально в 10-дневном возрасте. Но, уменьшение мотонейронов в вентральном роге является более ранним и наблюдается в 7-дневном возрасте крысы. Уменьшение количества клеток в более поздние сроки онтогенеза – в 180-дневном возрасте в пластинке VII промежуточной зоны спинного мозга, возможно, обусловлено увеличением размеров дорсального рога. На фоне прироста площади только дорсального рога в 180-дневном возрасте крысы не отмечается изменений в количественном составе пластинок дорсального рога, но регистрируется значимое уменьшение, как абсолютного количества, так и плотности расположения клеток в пластинке VII промежуточной зоны спинного мозга. По-видимому, происходит перераспределение нейронов, именно за счет увеличения размеров дорсального рога, что и приводит к резкому уменьшению нейронального состава пластинки VII. В постнатальном онтогенезе в пластинке VII промежуточной зоны спинного мозга преобладающими являются треугольные формы, в пластинках вентрального рога – овальные формы, в ядрах серого вещества – различные формы: треугольные и многоугольные (симпатические ядра), овальные (промежуточно-медиальное и дорсальное ядра).

В спинномозговом поле X наблюдается возрастное уменьшение его площади и нейрональной численности. Однонаправленность уменьшения размерных и количественных характеристик в целом поля X не совпадает с динамикой изменений его конкретных, выделяемых нами областей. В первые 10 дней жизни крысы отмечается уменьшение плотности нейронов при увеличении площади дорсальной серой спайки, с 20-дневного возраста изменения имеют обратную зависимость. Уменьшение площади вентральной серой спайки до 15-дневного возраста не сопровождается изменением клеточной плотности, с 20-дневного возраста отмечается уменьшение плотности расположения нейронов при увеличении ее площади до 180-дневного возраста крысы. Таким образом,

увеличение количества нейронов в области дорсальной серой спайки, возможно, обусловлено возрастным уменьшением её площади, что и приводит к росту показателя, рассчитанному на единицу площади.

Распределение различных форм интернейронов в поле X также было различным в его частях до 30-дневного возраста крысы. В трехдневном возрасте во всех частях поля X большая часть клеток имеет овальную форму. С возрастом в дорсальной серой спайке увеличивается процент треугольных и многоугольных форм клеток, в вентральной серой спайке и в центральных частях поля X процент овальных форм не меняется, а увеличение многоугольных и треугольных форм происходит за счет уменьшения процента веретеновидных нейронов. К 30-дневному возрасту крысы нейрональный состав поля X является сформированным и соответствует взрослой крысе 90-дневного возраста.

Исследуя размерные характеристик нейронов спинного мозга по их площади сечения, мы пришли к неоднозначным заключениям. Во всех пластинках спинного мозга отмечается возрастное увеличение размерных характеристик с максимальным приростом показателя в 10-дневном возрасте крысы. Однако, сроки становления параметров площади существенно различаются в пластинках спинного мозга и ядрах серого вещества: в пластинках размеры нейронов увеличиваются постепенно до 90-дневного возраста; в ядрах спинного мозга стабилизация размеров нейронов наступает раньше – уже в 30-дневном возрасте крысы.

В морфологическом разнообразии нейронов серого вещества спинного мозга, часть авторов, не обнаруживает корреляций между структурой и функцией клеток, указывая на широкое присутствие идентичных морфологических типов нейронов в различных пластинках спинного мозга (Light, Willcockson, 1999; Grudt, Perl, 2004). По нашему мнению это многообразие спинальных интернейронов фактически сводится к выделению основных четырех структурных типов нейронов, идентифицируемых по форме их клеточных тел и является характерным для всех пластинок серого вещества спинного мозга, включая ядерные структуры (Глава 3). Определение принадлежности спинальных

нейронов к популяциям интернейронов или к проекционным нейронам имеет определенные трудности, так как отдельные нейроны проецируются к более, чем одной мишени, что связано с различными анатомическими и нейрхимическими особенностями клеток (Spike et al., 2003; Almarestani et al., 2007). Классификация нейронов по форме клеточного тела, проксимальным частям их отростков, основанная на использовании метода Ниссля позволяет персонифицировать нейроны серого вещества, но, к сожалению, не отражает внутреннюю сущность развивающихся в нейронах процессов. Попытки установить принадлежность нейронов, опираясь на форму и ориентацию отростков, становятся результативными при использовании гистохимических и иммуногистохимических методов исследований.

Результаты проведенных гистохимических и иммуногистохимических исследований доказывают гетерогенность спинальных нейронов, о чем свидетельствует форма и количество нервных отростков, их длина, распространенность, площадь сечения, число, топография нейронов, содержащих холинацетилтрансферазу, TRPV1, вещество P, кальцитонин-ген-родственный пептид, белок нейрофиламентов 200 кДа, кальбиндин 28 кДа, нейрональную NO-синтазу, НАДФН-диафорузу.

Нейроны каждой конкретной области (пластинка, ядро) формируют популяции, имеющие определенные размеры, топографию и преимущественную форму клеточных тел. Так, в течение всего постнатального развития самые малые размеры имеют популяции нейронов, содержащих кальбиндин, крупнее нейроны с НАДФН-диафоразой, еще крупнее с nNOS, затем с ХАТ и самыми крупными являются нейроны с белком нейрофиламентов. Более того, в каждой популяции нейронов, экспрессирующих какое-либо вещество, вне зависимости от их топографической (пластинчатой, ядерной) принадлежности, прослеживается структурное сходство. Отличия касаются лишь областей представительства этих популяций в сером веществе спинного мозга, которые ограничены для:

- ХАТ и белка нейрофиламентов 200 кДа – глубокой областью дорсального рога, промежуточной зоной, вентральным рогом и полем X;

- кальбиндина, nNOS, НАДФН-диафоразы – дорсальным рогом, промежуточной зоной и полем X.

Избирательность (специфичность) экспрессии характеризует популяции:

- клеток Реншоу, содержащих кальбиндин;
- мотонейронов – содержащих ХАТ и белок нейрофиламентов;
- дорсального ядра – содержащих белок нейрофиламентов;
- пластинок I и II – содержащих кальбиндин, nNOS и НАДФН-диафразу.

Исключением из этих закономерностей является глубокая область дорсального рога, промежуточная зона и спинномозговое поле X, в нейронах которого мы обнаружили экспрессию всех изучаемых веществ.

В целом, прослеживается закономерность: нейроны, локализованные, как правило, в пределах одной пластинки или ядра серого вещества имеют различные структурные признаки и являются нейрохимически гетерогенными, и наоборот, нейроны, экспрессирующие тот или иной белок локализуются в функционально различных пластинках или ядрах серого вещества, но имеют сходные структурные признаки. Структурное сходство обусловлено их размерами, нейрохимией, ориентацией и направленностью отростков, общностью выполняемых функций.

Сопоставление морфологических, гистохимических и иммуногистохимических исследований, иллюстрированных собственными наблюдениями, позволяет считать, что в сером веществе спинного мозга функционирует сложный кластер нейронов, включающий обоснованное структурно-функциональное разнообразие нейронов.

Группировки нейронов включают от 27 до 52 иммунореактивных клеток на каждом срезе серого вещества во втором грудном сегменте спинного мозга взрослой крысы. Клеточные группировки являются топографически обособленными и хорошо определяются уже в 3 дневном возрасте крысы. Гистотопография нейрональных клеточных групп с возрастом крысы не меняется, то есть они являются приуроченными к конкретным определяемым областям серого вещества (пластинка, ядро). Соответственно этому, возрастное

вентральное смещение ядер, увеличение площади рогов серого вещества и уменьшение площади поля X приводит к аналогичным перестройкам кластеров, которые не меняют своей первоначальной топографической приуроченности. Выделение этих групп нейронов в пластинках не подразумевает их «скученность», клетки локализуются или диффузно или образуют группы до 2-3 клеток, расположенных в сером веществе, то есть они всегда разделены нейропилем. Это отсутствует при выделении кластеров в области расположения ядер, где иммунореактивные нейроны образуют локальные групповые скопления клеток, экспрессирующих или ХАТ, или кальбиндин, или nNOS, или НАДФН-диафорузу в промежуточно-латеральном ядре и белок нейрофиламентов в дорсальном ядре.

Анализ структурных характеристик этих кластеров позволил определить особенности их нейрональной организации. В состав кластеров входят нейроны, имеющие определенные размеры, отростчатую и нейрохимическую архитектуру, устойчивую пластинчатую и ядерную топографию. Таким образом, что нейроны одного конкретного кластера формируют между собой связи, которые микроскопически отчетливо демонстрируются в группе нейронов, экспрессирующих какое-либо вещество.

Нами было показано, что белок нейрофиламентов 200 кДа определяется не только в нейроплазме, но и в отростках клеток. Большинство нейрофиламентных белков синтезируются в теле клетки и должны перемещаться на большие расстояния вдоль аксонов, чтобы достичь своих участков функционирования (Yuan et al., 2012). Таким образом, по данным микроскопии на срезе спинного мозга в сером веществе выявляется структура, аналогичная «нейронной сети» между клеточными элементами, содержащими белок нейрофиламентов, локализованными в пластинках III, IV, V, в области медиального края дорсального рога, в дорсальном ядре, в дорсальной серой спайке поля X, в пластинках VII, VIII, IX, имеющих самые крупные размеры из всех нейронов спинного мозга. Форма этих нейронов овальная, веретеновидная или многоугольная. При этом, ориентация иммунореактивных отростков имеет как

дорсовентральное, так и медиолатеральное направление, и формирует проекции к аналогичным иммунореактивным нейронам, располагающимся в рядом расположенных областях или вентральнее, или дорсальнее, пересекая границы указанных областей серого вещества. Для окончательного решения взаимосвязанности клеточных элементов требуется применение электрофизиологических методов.

Аналогично этому выделяется группа нейронов, содержащих ХАТ, локализованных в пластинках III, IV, V, в области медиального края дорсального рога, в поле X, в области симпатических ядер, в пластинках VII, VIII, IX. При этом, группа ХАТ-иммунореактивных нейронов образован клетками различных форм, определенных размеров, и также имеющих сходную цитологическую и отростчатую архитектуру. В более ранних сроках постнатально онтогенеза (до 20 дневного возраста) микроскопически определяются ХАТ-иммунореактивные структуры подобные синаптическим на мембранах и дендритах мотонейронов, которые, по-видимому, образованы ХАТ-иммунореактивными интернейронами. Часть иммунореактивных нейронов дает отростки медиолатерально, что является характерным для области локализации «разделительных нейронов», симпатических ядер, пластинок V и VII. Часть нейронов формирует отростки, ориентированные вентродорсально.

Группы нейронов, содержащих кальбиндин, определяются во всех пластинках дорсального рога, в области медиального края дорсального рога, в поле X, в области симпатических ядер, в пластинках VII, VIII, IX. Размеры иммунореактивных нейронов являются самыми малыми среди всех нейронов спинного мозга. Особенностью данной группы нейронов является иммунореактивность клеток Реншоу. Нейроны с кальбиндином, выявляемые в различных пластинках спинного мозга в целом структурно сходны, имеют короткие отростки, которые ветвятся локально, и большей частью представлены овальными и веретеновидными формами. Многоугольность клеточных тел присуща промежуточно-латеральному ядру и пластинке V. Кальбиндин экспрессируется в группе «разделительных нейронов», которые также являются

иммунореактивными к ХАТ.

Группы нейронов, содержащих nNOS-синтазу и НАДФН-диафорузу, локализованы в идентичных областях спинного мозга – во всех пластинках дорсального рога, в области медального края дорсального рога, в области симпатических ядер, в пластинке VII и в поле X. Обе группы нейронов имеют структурное сходство, преимущественно сформированы нейронами овальных и веретенных форм и отсутствуют в вентральном роге спинного мозга. Отличием являются размерные характеристики – нейроны, иммунореактивные к NOS крупнее нейронов, содержащих НАДФН-диафорузу, это сохраняется во всех топографических областях серого вещества.

Нами была показана специфичность выявляемости НАДФН-диафоразы как в структурах серого вещества спинного мозга, так и в нейронах чувствительного узла спинномозгового нерва, определяемая различными гистохимическими методами. В работе доказана правомерность применения тетразолиевого метода, описанного Р. Лилли (1969), что позволило достоверно верифицировать нейроны с НАДФН-диафоразой, проводить определение не только структурных характеристик нейронов, но и производить подсчет количества НАДФН-диафороза-позитивных клеток.

Постнатальная топографическая стабильность нейрохимических кластеров в сером веществе предполагает клеточное развитие, связанное с путями миграции и окончательным расположением спинальных нейронов. Генетическая теория рассматривает формирование межнейронных соединений как производное паттернов экспрессии генов, управляемых конкретными комбинациями транскрипционных факторов, которые направляют клеточное развитие, связанное не только с расположением (установкой) нейрона, но и типом проекции его аксона и фенотипом нейротрансмиттера (Friesse et al., 2009; Alvarez et al., 2013; Francius et al., 2013; Floyd et al., 2018). Постнатальное формирование межнейронных соединений лишь временно изменяет экспрессию уже имеющихся нейротрансмиттеров (увеличивает, уменьшает, расширяет зоны проекций), без изменения топографической и структурной основы этих

взаимодействий – клеточных элементов, формирующих нейронные группировки в спинном мозге. Что также нашло отражение в проведенном исследовании. Нами определена в раннем периоде постнатального онтогенеза (до 10-дневного возраста) временная экспрессия кальцитонин-ген-родственного пептида в мотонейронах пластинки IX, что также было обнаружено у мышей (Kim et al., 2016). До 20-дневного возраста наблюдается расширение зон проекций первичных афферентов с веществом P и кальцитонин-ген-родственным пептидом в поверхностной области дорсального рога. В эмбриональном периоде отмечается временная активность НАДФН-диафоразы в мотонейронах пластинки IX, которая нивелируется к моменту рождения (Wetts et al., 1995; Foster, Phelps, 2000).

Выявляемость нейрохимических кластеров в обозначенных областях (пластинки, ядра) серого вещества является функционально обоснованной. Учитывая функциональную специализацию пластинок и ядер, можно приурочить «нейрохимические кластеры» к выполнению конкретных функций. Спинальные интернейроны, образующие контакты с мотонейронами, являются основными в нейронных сетях, обеспечивающих локомоторную активность, к которым можно отнести группы нейронов, экспрессирующие белок нейрофиламентов, ХАТ и кальбиндин, локализованные в пластинках глубокой области и области медиального края дорсального рога, пластинке VII, вентральном роге и поле X, а также группы нейронов, содержащие nNOS и НАДФН-диафорузу и локализованные в пластинках глубокой области и области медиального края дорсального рога, пластинке VII и поле X. Группы нейронов, содержащие ХАТ, кальбиндин, nNOS и НАДФН-диафорузу, локализованные в пластинках глубокой области дорсального рога, в пластинке VII, в области симпатических ядер и в поле X, реализуют сомато-висцеральную функцию. Группы нейронов поверхностной области дорсального рога, содержащие кальбиндин, nNOS и НАДФН-диафорузу являются трансмиссивным звеном, осуществляющим передачу информации кластерам, реализующим или моторную или висцеральную функции.

Перекрытие нейрохимических кластеров, к которым принадлежат нейроны идентичных топографических областей, означает, что нейроны одного и того же кластера могут участвовать в реализации различных функций (Костюк, Преображенский, 1975), что обеспечивается различной структурной организацией кластеров. Нами была показана выявляемость в одном мотонейроне ХАТ и белка нейрофиламентов. В области локализации симпатических ядер также выявляются нейроны, в которых предполагается коэкспрессия различных веществ. Так, при окраске тионином на срезе в области ядер у взрослой крысы выявляется до 19 клеток, при иммуногистохимическом анализе большинство нейронов содержат ХАТ (92%), но также часть нейронов содержат кальбиндин (21,5%), nNOS (37%) и НАДФН-диафорузу (42,5%).

Реализация функций спинного мозга невозможна без участия периферических структур – чувствительного узла спинномозгового нерва. С целью комплексного анализа структурно-функциональных характеристик мы исследовали экспрессию аналогичных веществ, как в структурах серого вещества спинного мозга, так и в спинномозговом узле. Результаты проведенного исследования показали, что у взрослых крыс чувствительные нейроны разнообразны по нейрохимическим и морфометрическим характеристикам, что подтверждает данные о гетерогенности чувствительных узлов (Берснев, 1980; McCarthy, Lawson, 1990; Aoki et al, 2005).

Функциональное и структурное разнообразие нейронов укладывается в полученные данные о химической неоднородности нейронов. Так, у взрослой белой крысы:

- мелкие и очень мелкие нейроны спинномозговых узлов проявляют иммунореактивность к TRPV1, веществу Р, кальцитонин-ген-родственному пептиду, кальбиндину, NOS, содержат НАДФН-диафорузу;
- средние нейроны проявляют иммунореактивность к кальцитонин-ген-родственному пептиду, кальбиндину, NOS, белку нейрофиламентов 200 кДа, содержат НАДФН-диафорузу;
- крупные и очень крупные нейроны проявляют иммунореактивность к

кальцитонин-ген-родственному пептиду, кальбиндину, белку нейрофиламентов 200 кДа.

Исследование спинномозговых узлов при окраске тионином, гистохимическими и иммуногистохимическими методами позволило заключить, что независимо от метода выявления, в узлах определяется кластерная локализация нейронов. На сопоставимой площади среза кластер формируют от 2-3 до 8-10 нервных клеток. Проведенное исследование свидетельствует, что кластеры формируются по принципу разнородности: в составе кластера находятся нервные клетки разные по аффинности к тионину, по нейрохимической организации, по размеру – от очень мелких до очень крупных нейронов. Это, очевидно, и определяет структурно-функциональное разнообразие клеточных объединений, именуемых как кластеры, колонки, модули, нейронные ансамбли, локальные цепи, макро- и микронейронные сети, в целом характерные для организации ЦНС (Обухов и др., 2019). Реальное существование модулей, их конфигурация, специфичность локальных межнейронных связей зависят от импульсации, поступающей с первичных афферентов, в результате которой активируются то одни, то другие модули, что повышает надежность входного и выходного сигналов (Калиниченко, Матвеева, 2010).

Еще в XX веке было сформулировано представление о том, что группировки нейронов следует рассматривать как "элементарные нейронные ансамбли", свойственные всем уровням ЦНС (Коган, 1979), которые обеспечивают пластичность мозга и являются зависимыми от функциональных характеристик нейронов (Анохин, 1968). Группы нейронов "вероятностных" нейронных ансамблей разнообразны по структурно-функциональным характеристикам, что обеспечивает мозаичность нейрональной активности в силу динамичности и избыточности нейрональных связей (Коган, 1979). Об универсальности организации крупных образований в нервной системе, свидетельствует наличие "локальных цепей нейронов", которые образуют структурно-функциональные объединения, варьирующие по особенностям морфологической организации и способу обработки информации (Краснощекова,

2007; Mountcastle, 1997).

Синонимом термина «локальная нервная сеть» любой структуры центральной нервной системы является термин модуль (Комиссаров, 2005; Калиниченко, Матвеева, 2010; Sher et al., 2010). Термин модуль (колонки, кластеры) чаще употребляется в нейрофизиологической литературе, а нейронная сеть – в биофизической и технической литературе (Карп и др., 1996; Куссуль, 2005; Nazimov, Pavlov, 2012; Raissi et al., 2019).

Следует отметить, что до настоящего времени нет общепринятой точки зрения на обоснование модулей, составляющих модульный уровень организации серого вещества спинного мозга.

Столбы ядер серого вещества спинного мозга сравнивают с модулями коры полушарий большого мозга, опираясь на объединение в пучки дендритов мотонейронов и вставочных клеток ипси- и контралатеральной стороны спинного мозга (Бабминдра, Брагина, 1982). С.Н. Оленев (1987) в каждой пластинке серого вещества спинного мозга выделяет продольно ориентированные столбики модулей, имеющих вид "монетных дисков", в нейропиле которых ветвятся как дендриты «местных» клеток, так и приходящие волокна. П.Г. Пивченко (1993) выделяет модульный "концентрированный" тип нейронной организации для мотонейронов, симпатических и парасимпатических преганглионарных нейронов и нейронов грудного ядра спинного мозга, которые имеют постоянное топографически обозначенное расположение в сером веществе и являются морфологически и функционально однотипными нейронами, обеспечивающими выполнение чётко локализованных функций. М.М. Одинак и др. (2009) указывают на специфичность модуля спинного мозга и связывают особенности его строения с моносинаптическими контактами первичных афферентов только в пластинках I–III серого вещества, не выделяя участия в модуле нейронов других пластин спинного мозга, тем самым определяя "модуль первичного рефлекторного анализа".

Существует гипотеза о функциональном "макромодуле" спинного мозга, которая предполагает интеграцию двух функциональных "микромодулей" в

одном, объединяющем информацию от кожи и проприоцепторов (пластины I-IV) с информацией от внутренних органов (пластина V, VI) (Карп и др., 1996). Для структур ЦНС, организованных по ядерному принципу, в частности для спинного мозга показана "миниколончатая" упорядоченность нейронных объединений, которая может служить структурной основой функционально пластичных модулей (Краснощёкова, 2007). Такие модули объединяют нейроны со сходными морфологическими и функционально-метаболическими характеристиками. На основании линейных параметров клеток и плотности их распределения в модули объединяют функциональные группы мотонейронов спинного мозга (Яценко, Лютикова, 2012).

Как видно, в данный момент нет общепринятой точки зрения на обоснование и использование тождественных характеристик, входящих в формирование понятия модульной организации серого вещества спинного мозга. Но, тем не менее, накоплены доказательства того, что моторная система спинного мозга участвует в некоторых аспектах осуществления движений, тождественных функциям обычно приписываемых "высшим" областям мозга (Bizzi et al., 2002). Часть авторов активно используют термин "модуль" в локомоторной системе спинного мозга, что означает функциональное устройство, которое генерирует специфический двигательный ответ на специфический паттерн активации мышцы (Bizzi et al., 2002; Schouenborg, 2002).

Наличие функциональных модулей в спинном мозге показано в исследованиях, проведенных на спинальных животных: лягушках (Giszter et al., 1993; Bizzi et al., 2002); крысах (Tresch, Bizzi, 1999); кошках (Мусяенко и др., 2013; Mushahwar et al., 2002; Alstermark et al., 2007); обезьянах (Alstermark et al., 2007). Термин "модуль" означает функциональное устройство в спинном мозге, которое генерирует специфический двигательный ответ на определённую мышечную активацию. Двигательная система спинного мозга ("spinal motor systems") представлена небольшим числом отдельных "модулей", где используется гибкое сочетание дискретных элементов для производства широкого спектра движений (Bizzi et al., 2002).

Выполнение и управление сложными двигательными функциями, как правило, связывают с центральными структурами мозга, такими как кора, базальные ядра, мозжечок. В традиционных нейрональных схемах спинной мозг выполняет подчиненную функцию в производстве движений, играя пассивную роль ретранслятора команд, диктуемых супраспинальными структурами. К настоящему времени накоплены доказательства того, что моторная система спинного мозга является активным участником в некоторых аспектах осуществления движений, тождественных функциям обычно приписываемых "высшим" областям головного мозга (Bizzi et al., 2002). Так, стимулирование нейронов через имплантированные интраспинально электроды приводит к естественным движениям в отличие от результатов, полученных от электрической стимуляции отдельных мышц (Mushahwar et al., 2002, Sher et al., 2010). Определенное сходство пространственного отношения паттернов немиелинизированных и миелиновых афферентов в пластинках II, III и IV указывает на соматотопическую организацию дорсального рога, сходную с колонками ("column-like fashion"), где каждая пластинка выполняет сенсомоторные преобразования (Schouenborg, 2002).

Таким образом, накопление обширного фактического материала обосновывает необходимость интеграции морфологических и функциональных данных, а объединение различных популяций интернейронов общей функцией в различные местные пространственные (топографические) межнейрональные взаимодействия может явиться основой для выделения модульной организации спинного мозга.

ВЫВОДЫ

1. Детальный анализ архитектоники серого вещества второго грудного сегмента спинного мозга крысы уточняет расположение пластинок и выявляет участие пластинки IV дорсального рога в формировании дорсальной серой спайки спинномозгового поля X. В составе спинномозгового поля X выделены центральные части. Большая часть пластинок (I, II, III, IV) дорсального рога формирует его головку.
2. Пластинчатая организация серого вещества спинного мозга выявляется в постнатальном онтогенезе в трехдневном возрасте, но окончательного взрослого топографического соответствия достигает в возрасте 30 дней. С возрастом крысы площадь серого вещества увеличивается, достигая максимальных значений в возрасте 180 дней. Из всех частей серого вещества более половины его площади приходится на дорсальный рог во все возраста постнатального онтогенеза. Обособлено, вне связи со столбами серого вещества, происходит постнатальное формирование спинномозгового поля X, что проявляется уменьшением его площади с 20 дня жизни и перестройкой его частей в 20-дневном возрасте.
3. Ядра спинного мозга принадлежат не только к различным пластинкам, но и к различным частям (столбам) серого вещества: дорсальное ядро – дорсальному рогу (пластинка V) и промежуточной зоне (пластинка VII); промежуточно-медиальное ядро – промежуточной зоне (пластинка VII) и спинномозговому полю X; симпатические ядра – поперечная протяженность в промежуточной зоне (пластинка VII) от латерального рога.
4. В постнатальном онтогенезе ядерная организация серого вещества спинного мозга выявляется в трехдневном возрасте крысы, но достигает взрослого топографического соответствия гетерохронно: в 20-дневном возрасте – дорсальное ядро, в 30-дневном возрасте – симпатические ядра, в 60-дневном возрасте – промежуточно-медиальное ядро. Окончательное расположение ядер

во втором грудном сегменте спинного мозга крысы обусловлено их вентральным смещением.

5. На поперечном срезе в сером веществе спинного мозга определяются четыре структурных типа нейронов на основании их форм клеточных тел: овальные, веретеновидные, треугольные и многоугольные. Гистотопография клеточных форм различается соответственно пластинчатой и ядерной организации спинного мозга, что обусловлено разнотипностью выполняемых функций. На поперечном срезе в сером веществе спинного мозга форма клеточных тел и направленность проксимальных частей отростков меняются от преимущественно дорсовентральной ориентации овальных и веретеновидных клеток в пластинках I, II, III, IV до различных клеточных форм и ориентаций отростков в пластинках, располагающихся вентральнее, включая спинномозговое поле X и ядра серого вещества.
6. В постнатальном развитии в пластинках и ядрах серого вещества абсолютное количество и плотность расположения клеток уменьшаются, максимально в возрасте 10 дней. Исключением является разнонаправленность количественных изменений в пластинках поверхностной области дорсального рога: при возрастном уменьшении клеточной плотности наблюдается увеличение абсолютного количества нейронов в пластинке I – до 20-дневного возраста и в пластинке II – до 10-дневного возраста. Максимальное абсолютное количество нейронов и наибольшая плотность их расположения определяются в спинномозговом поле X в течение всего постнатального развития. Постнатальное уменьшение клеточной плотности в поле X не совпадает с динамикой её изменений в дорсальной серой спайке. Стабильность показателей клеточной плотности и площади нейронов в пластинках и ядрах серого вещества достигается в различные временные периоды постнатального развития крысы.
7. В течение всего постнатального развития в сером веществе спинного мозга самые малые размеры имеют популяции нейронов, содержащие кальбиндин 28 кДа, крупнее нейроны с НАДФН-диафоразой, еще крупнее с nNOS, затем с

ХАТ и самыми крупными являются нейроны с белком нейрофиламентов 200 кДа. Увеличение размеров популяций нейронов в постнатальном развитии крысы характеризуется гетерохронностью: наиболее быстро растут и достигают размерных характеристик взрослых нейронов популяции, экспрессирующие: белок нейрофиламентов 200 кДа и кальбиндин 28 кДа (к 10-дневному возрасту); ХАТ, nNOS и НАДФН-диафору (к 20-дневному возрасту); и более длительно мотонейроны, содержащие ХАТ, белок нейрофиламентов 200 кДа (к 30-дневному возрасту) и кальбиндин-иммунореактивные интернейроны пластинки VIII (к 90-дневному возрасту).

8. По количественному содержанию нейрхимические популяции серого вещества достигают значений, характерных для взрослого животного уже в трехдневном возрасте. Исключением являются группы нейронов пластинок I и II, содержащие кальбиндин 28кДа, nNOS и НАДФН-диафору, процентное содержание которых максимально в первые 10 дней жизни, затем уменьшается и к 20-дневному возрасту соответствует показателям взрослой крысы.
9. Нейроны, локализованные в пределах одной пластинки или ядра серого вещества спинного мозга имеют различные структурные признаки и являются нейрхимически гетерогенными, и наоборот, нейроны, экспрессирующие тот или иной белок локализуются в функционально различных пластинках или ядрах серого вещества, но имеют сходные структурные признаки. С трехдневного возраста крысы нейрональные кластеры, определяемые по их нейрхимическим характеристикам, сохраняют свою топографию и структурную организацию. Сходство обусловлено их размерами, формами клеточных тел, ориентацией и направленностью отростков.
10. В спинномозговом узле нейрональные кластеры формируются по принципу разнородности: в составе кластера определяется от 2-3 до 8-10 нервных клеток, различных по аффинности к тионину, по нейрхимической организации, по размеру – от очень мелких до очень крупных нейронов. Структурное и функциональное разнообразие нейронов спинномозгового узла подтверждается их химической неоднородностью: мелкие и очень мелкие нейроны содержат

TRPV1, вещество P, кальцитонин-ген-родственный пептид, кальбиндин 28 кДа, nNOS и НАДФН-диафору; средние нейроны – кальцитонин-ген-родственный пептид, кальбиндин 28 кДа, nNOS, белок нейрофиламентов 200 кДа и НАДФН-диафору; крупные и очень крупные нейроны – кальцитонин-ген-родственный пептид, кальбиндин 28 кДа, белок нейрофиламентов 200 кДа. По количественному содержанию популяции достигают значений, характерных для взрослого животного гетерохронно, при отсутствии стабилизации их размеров до 90-дневного возраста крысы.

11. Нейрональные кластеры, обеспечивающие локомоторную функцию экспрессируют белок нейрофиламентов 200 кДа, ХАТ, кальбиндин 28 кДа nNOS и НАДФН-диафору и локализуются в пластинках глубокой области и медиального края дорсального рога, в пластинке VII и поле X, а также содержат белок нейрофиламентов 200 кДа, ХАТ и кальбиндин 28 кДа и локализуются в пластинках вентрального рога. Группы нейронов, содержащие ХАТ, кальбиндин 28 кДа, nNOS и НАДФ-диафору локализуются в пластинках глубокой области дорсального рога, в пластинке VII, в области симпатических ядер и в поле X, реализуют сомато-висцеральную функцию. Группы нейронов поверхностной области дорсального рога, содержащие кальбиндин 28 кДа, nNOS и НАДФН-диафору являются трансмиссерным звеном, осуществляющим обработку и передачу сенсорной информации кластерам, реализующим моторную или висцеральную функции. Таким образом, топография нейрональных нейрохимических кластеров в сером веществе определяется их участием в реализации различных функций.
12. Основные компоненты рефлекторной дуги, включая сенсорные нейроны спинномозгового узла, спинальные интернейроны, симпатические преганглионарные нейроны и мотонейроны определяются в трехдневном возрасте. Тем не менее, окончательное созревание сенсорных нейронов, определяемых по их нейрохимическим признакам, происходит позднее по сравнению с мотонейронами. Интернейроны пластинок дорсального рога, реализующие переработку сенсорной информации, имеют сходную динамику

развития по нейрохимическим характеристикам с преганглионарными симпатическими нейронами. Окончательное формирование соматических мотонейронов происходит позднее преганглионарных симпатических нейронов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аданина В.О., Рио Ж.-П., Аданина А.С, Реперан Ж., Веселкин Н.П. Иммунореактивность синапсов на первичных афферентных аксонах и сенсорных нейронах спинного мозга речной миноги *Lampetra fluviatilis* // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 11. – С. 947-952.
2. Аданина В.О., Веселкин Н.П. Эфферентные проекции дорсальнокорешковых афферентов спинного мозга миноги *Lampetra Fluviatilis* // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2017. – Т. 53, № 5. – С. 376-379.
3. Анохин П.К. Биология и нейрофизиология условного рефлекса. – М.: Медицина, 1968. – 546 с.
4. Бабминдра В.П., Брагина Т.А. Структурные основы межнейронной интеграции. – Л.: Наука, 1982. – 164 с.
5. Бажанова Е.Д., Козлова Ю.О., Анисимов В.Н., Суханов Д.С., Теплый Д.Л. Фармакологическая коррекция уровня апоптоза нейронов коры у трансгенных мышей *HER2/NEU* при старении // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2016. – Т. 52, № 1. – С. 58-66.
6. Банин В.В., Быков В.Л. *Terminologia Histologica*. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2009. – 272 с.
7. Белокоскова С.Г., Цикунов С.Г. Вазопрессин в механизмах реализации реакций на стресс и модуляции эмоций // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2018. – Т. 16, № 3. – С. 5-12.
8. Берсенев В.А. Нейронный состав шейных спинномозговых узлов. В кн.: «Шейные спинномозговые узлы». – М.: Медицина, 1980. – С. 34-73.
9. Бурдей Г.Д. Спинной мозг. – Изд-во Саратов. ун-та, 1984. – 236 с.
10. Васильева О.А., Корзина М.Б., Порсева В.В., Маслюков П.М., Филиппов И.В. Морфологические особенности афферентных нейронов, содержащих каннабидиновые рецепторы в постнатальном онтогенезе // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. – 2011. – Т. 18, № 2. – С. 39-40.

11. Веселкин Н.П., Наточин Ю.В. Принципы организации и эволюции систем регуляции функций // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2010. – Т. 46, № 6. – С. 495-503.
12. Войно-Ясенецкий М.В., Жаботинский Ю.М. Источники ошибок при морфологических исследованиях. – Л.: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1970. – 319 с.
13. Гейз Р. Образование нервных связей. Специфичность, модуляция и близкие к ним явления. – М.: Мир, 1972. – 301 с.
14. Гилерович Е.Г., Мошонкина Т.Р., Федорова Е.А., Шишко Т.Т., Павлова Н.В., Герасименко Ю.П., Отеллин В.А. Морфофункциональная характеристика поясничного утолщения спинного мозга крысы // Морфология. – 2007. – Т. 132, вып.. 5. – С. 33-37.
15. Гилерович Е.Г., Мошонкина Т.Р., Павлова Н.В., Отеллин В.А., Герасименко Ю.П. Морфофункциональное исследование поврежденного спинного мозга крыс после активации рецепторов серотонина и двигательных нагрузок // Доклады Академии наук. – 2009. – Т. 428, № 3. – С. 413-416.
16. Голуб Д.М., Брновицкая Г.М., Дойлидо А.И., Лойко Р.М., Леонтьук А.С., Осипович Ж.С., Ярошевич В.Г. Развитие сплетений спинномозговых нервов. Атлас. – Минск: Наука и техника, 1982. – 120 с.
17. Григорьев П.Н., Зефирова А.Л. Миозин усеоряет рециклирование синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях // Доклады Академии наук. – 2016. – Т. 470, № 5. – С. 607-609.
18. Григорьев, П.Н., Зефирова А.Л. Синхронной и асинхронной секреции медиатора принимают участие одни и те же синаптические везикулы // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2015. – Т. 7, № 3 (26). – С. 90-98.
19. Дробленков А.В., Буткевич И.П., Михайленко В.А., Шимараева Т.Н. Дегенеративные и компенсаторно-приспособительные изменения нейронов большого серотонинергического ядра после экспериментального стресса в новорожденном периоде и терапии бупироном // Вестник Новгородского

- государственного университета им. Ярослава Мудрого. – 2016. – № 1 (92). – С. 113-116.
20. Дюйзен И.В., Деридович И.И., Курбацкий Р.А., Шорин В.В. NO-ергические нейроны ядер шва мозга крысы в норме и при введении опиатов // Морфология. – 2003. – Т.123, вып. 2. – С.24-29.
21. Жукова Г.П., Брагина Т.А. Морфология центральных образований вегетативной нервной системы // В кн.: Физиология вегетативной нервной системы. – Л. : Медкнига, 1981. – С. 66-104.
22. Зеленецкий Н.В. Международная ветеринарная анатомическая номенклатура на латинском и русском языках. 5-я редакция: Справочник. – СПб.: Издательство «Лань», 2013. – 400 с.
23. Зернов Д., Дешина Л. Руководство описательной анатомии человека. Ч. 3: Анатомия нервной системы и органов чувств. – М., 1926. – С. 79-85.
24. Золотарев В.А., Ноздрачев А.Д. Капсаицин-чувствительные афференты блуждающего нерва // Росс. Физиол. Журнал. – 2001. – Т.87, № 2. – С. 182-204.
25. Иванов Г.Ф. Основы нормальной анатомии человека. – М.: Медгиз, 1949. – Т. 2, Ч. 1. – С. 4-22.
26. Исламов Р.Р., Тяпкина О.В., Никольский Е.Е., Козловская И.Б., Григорьев А.И. Роль мотонейронов спинного мозга в механизмах развития гипогравитационного двигательного синдрома // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 3. – С. 281-293.
27. Калимуллина Л.Б. К вопросу о "темных" и "светлых" клетках // Морфология. – 2002. – Т. 122, вып. 4. – С. 75-80.
28. Калиниченко С.Г., Матвеева Н.Ю. Самоорганизация нейронных систем и модульная архитектоника головного мозга // Тихоокеанский мед. журнал. – 2010. – № 4. – С. 9-11.
29. Карп В.П., Родштат И.В., Чернавский Д.С. Нейрохимия спинальной регуляции и нейрокомпьютинг // Вестник новых медицинских технологий. – 1996. – Т. 3, № 4. – С. 67-74.

30. Кнорре А.Г. Эмбриональный гистогенез. – Издательство «Медицина», Ленинградское отделение, 1971. – 431 с.
31. Ковригина Т.Р., Филимонов В.И. Характеристика нейроцитов крестцовых спинномозговых ганглиев белой крысы после неонатальной химической деафферентации // Современные проблемы естествознания: Сб. науч. ст. – Ярославль, ЯрГУ, 1998. – С. 77-78.
32. Коган А.Б. Функциональная организация нейронных механизмов мозга. – Л.: Медицина, 1979. – 224 с.
33. Козельская Л.А. Топографические особенности сегментов спинного мозга и корешков спинномозговых нервов у лабораторных животных // Науч.конф. молод, учен. Чита, Читинский мед. ин-т, 1974. – С.191-193.
34. Колесников Л.Л. Международная анатомическая терминология. – М.: Медицина, 2003. – 424 с.
35. Колос Е.А., Коржевский Д.Э. Распределение холинергических и нитроксидергических нейронов в спинном мозгу у новорожденных и взрослых крыс // Морфология. – 2015. – Т. 147, вып. 2. – С. 32-37.
36. Колос Е.А., Коржевский Д.Э. Неоднородность реакции на холинацетилтрансферазу в холинергических нейронах // Нейрохимия. - 2016. – Т. 33, № 1. – С. 56-62.
37. Комиссаров В.И. Концепция функциональной организации нейронных сетей мозга // Экспериментальная биология и медицина. – 2005. – № 2. – С. 30-38.
38. Коржевский Д.Э., Отеллин В.А. Распределение синтетазы окиси азота в клетках коры большого мозга крысы // Морфология. – 1996. – Т. 110, вып. 6. – С. 37-41.
39. Коржевский Д.Э., Отеллин В.А., Григорьев И.П. Иммуноцитохимическое выявление нейрональной NO-синтазы в клетках головного мозга крысы // Морфология. – 2007. – Т. 132, вып. 4. – С. 77-80.
40. Коржевский Д.Э., Петрова Е.С., Кирик О.В., Безнин Г.В., Сухорукова Е.Г. Нейрональные маркеры, используемые при изучении дифференцировки

- стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. –2010. – Т. 5, № 3. – С. 57-63.
41. Корнева Е.А. Нейроиммунофизиология вчера и сегодня // Клиническая патофизиология. – 2016. – Т. 22, № 1. – С. 7-19.
42. Костюк П.Г., Преображенский Н.Н. Механизм интеграции висцеральных и соматических афферентных систем. – Л.: Наука, 1975. – 222 с.
43. Коцюба А.Е., Коцюба Е.П., Черток В.М. Нитроксидагические нервные волокна внутримозговых сосудов // Морфология. – 2009. – Т.135, вып. №2. – С. 27-32.
44. Краснощекова Е.И. Модульная организация нервных центров. – СПб.: Изд-во СпбГУ, 2007. – 130 с.
45. Крыжановский Г.Н. Общая патофизиология нервной системы. Руководство. – М.: Медицина, 1997. – 352 с.
46. Куссуль М.Э. Графы модульных нейронных сетей // Математические машины и системы. – 2005. - № 1. – С. 26-38.
47. Леонтьук А.С. Закономерности морфогенеза грудного отдела спинного мозга. В кн.: Эмбриогенез и регенерация. – Минск, 1971. – С. 32-48.
48. Леонтьук А.С. Динамика морфогенеза грудного отдела спинного мозга человека и животных // Тез. и реф. докл. 6-го науч. совещ. и симпоз. по эволюц. физиол. – Л., 1972. – С. 127-128.
49. Лилли Р. Ферменты. В кн.: Патогистологическая техника и практическая гистохимия // Под ред. чл.-корр. АМН В.В. Португалова; пер. с англ. – М.: МИР, 1969. – С. 349-354.
50. Лобко П.И., Ромбальская А.Р. Имеют ли место строго сегментарные связи периферических нервов и внутренних органов с центральной нервной системой? // Здравоохранение. – 2011. – №5. – С. 46-51.
51. Маслюков П.М. Преганглионарные входы в звездчатый узел кошки в постнатальном онтогенезе // Морфология. – 2004. – Т. 125, вып. 3. – С. 49-51.

52. Маслюков П.М., Моисеев К.Ю., Смирнова В.П. Возрастные изменения афферентных нейронов, содержащих NO-синтазу // Морфология. – 2014. – Т. 145, вып. 3. – С. 125-126.
53. Матвеева Н.Ю., Калиниченко С.Г., Пуцин И.И., Мотавкин П.А. Роль оксида азота в апоптозе нейронов сетчатки глаза плодов человека // Морфология. – 2006. – Т. 129, вып. 1. – С. 42-48.
54. Махинько В.И., Никитин В.Н. Константы роста и функциональные периоды развития в постнатальной жизни белых крыс // В кн.: Молекулярные и физиологические механизмы возрастного развития. – Киев: Наукова думка, 1975. – С. 308-326.
55. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. – Гос. изд-во мед. лит-ры, Медгиз, Лен. отд., 1961. – 340 с.
56. Меркулова О.С., Даринский Ю.А. Реакция нейронов на длительную стимуляцию. Морфофизиологическое исследование. – Л.: Наука, 1982. – 172 с.
57. Меркульева Н.С., Вещицкий А.А., Шкорбатова П.Ю., Шенкман Б.С., Мусиенко П.Е., Макаров Ф.Н. Морфометрические особенности дорсальных ядер Кларка в ростральных сегментах поясничного отдела спинного мозга кошки // Морфология. – 2016. – Т. 150, вып. 5. – С. 18-23.
58. Мотавкин П.А., Андреева Н.А., Шуматова Т.А. Нитрооксидергические нейроны органов дыхания // Морфология. – 2000. – Т. 117, вып. 1. – С. 10-13.
59. Мотавкин П.А., Охотин В.Е. Гистохимия холинацетилтрансферазы в спинном мозге и спинномозговых узлах кошки // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1983. – Т. 75. № 9. – С. 52-56.
60. Мотавкин П.А., Черток В.М. Иннервация мозга // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 11-23.
61. Моторина М.В. О структуре моторных ядер спинного мозга крысы в постнатальном онтогенезе // Архив анат., гист. и эмбриол. – 1987. – Т. 78, вып. 3. – С. 33-42.
62. Мусиенко П.Е., Богачева И.Н., Савохин А.А., Килимник В.А., Горский О.В., Никитин О.А., Герасименко Ю.П. Инициация локомоторной активности у

децеребрированных и спинальных кошек при неинвазивной чрескожной стимуляции спинного мозга // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 8. – С. 917-927.

63. Мухин В.Н., Козлов А.П., Абдурасулова И.Н., Павлов К.И., Сизов В.В., Мацулеевич А.В., Клименко В.М. Стрессоры в раннем постнатальном периоде препятствуют развитию предпочтения алкоголя у взрослых самок крыс (потенциальная роль к-опиодных рецепторов) // Медицинский академический журнал. – 2017. – Т. 17, № 3. – С. 62-67.

64. Назимов А.И., Павлов А.Н. Применение вейлет-анализа и искусственных нейронных сетей к решению задачи распознавания формы импульсных сигналов при наличии помех // Радиотехника и электроника. – 2012. – Т. 57, № 11.

65. Немечек С., Лодин З., Вольф И.Р., Выскочил Ф., Байгар. И. Введение в нейробиологию. – Прага: Avicenum - Изд-во мед. литературы, 1978. – 416 с.

66. Николлс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу // Пер. с англ. Изд. 2-е. – М.: Издательство ЛКИ, 2008. – 627 с.

67. Ноздрачев А.Д., Маслюков П.М. Нормальная физиология : учебник . – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. – 1088 с.

68. Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. Анатомия крысы. – СПб.: Издательство «Лань», 2001. – 464 с.

69. Ноздрачев А.Д., Фатеев М.М. Морфология звездчатого ганглия. Нейронная организация звездчатого ганглия. В кн.: Звездчатый ганглий. Структура и функция. – СПб.: Наука, 2002. – С. 12-73.

70. Обухов Д.К., Пушина Е.В., Вараксин А.А. Газообразные медиаторы в ЦНС позвоночных животных // Успехи современного естествознания. – 2011. – № 12. – С. 49-51.

71. Обухов Д.К., Цехмистренко Т.А., Пушина Е.В. Современные представления об эволюционном развитии и строении новой коры млекопитающих // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2019. – Т. 8. № 3. – С. 96-107.

72. Одинак М.М., Живолупов С.А., Самарцев И.Н. Болевые синдромы в неврологической практике // Журнал неврологии и психиатрии. – 2009. – Т. 109, № 9. – С. 80-89.
73. Одинцова И.А., Слуцкая Д.Р. Морфологическая характеристика нейронов спинного мозга кур в эмбриональном периоде развития // Морфология. – 2009. – Т. 136, вып. 5. – С. 32-35
74. Оленев В.Н. Конструкция мозга. – Л. : Медицина, 1987. – 208 с.
75. Охотин В.Е., Шуклин А.В. Значение нейрональной, эндотелиальной и индуцибельной изоформ NO-синтаз в гистофизиологии сердечной мышцы // Морфология. – 2006. – Т. 129, вып. 1. – С. 7-15.
76. Петрова Е.С., Исаева Е.Н., Коржевский Д.Э. Развитие диссоциированных клеток различных закладок ЦНС в условиях пересадки в поврежденный нерв // Морфология. – 2013. – Т. 143, вып. 2. – С. 30-34.
77. Петрова Е.С., Павлова Н.В., Коржевский Д.Э. Современные морфологические подходы к изучению регенерации периферических нервных проводников // Медицинский академический журнал. – 2012. – Т. 12, № 3. – С. 15-29.
78. Петрова Е.С., Отеллин В.А. НАДФ-диафаразапозитивные нервные клетки в гетеротопических трансплантатах спинного мозга // Онтогенез. – 2004. – Т. 35, № 2. – С. 118-123.
79. Пивченко П.Г. Структурная организация серого вещества спинного мозга человека и млекопитающих: автореф. дис. ... д.м.н. / Пивченко Петр Григорьевич. – Харьков, 1993. – 38 с.
80. Пирс Э. Диафоразы и дегидрогеназы. В кн.: Гистохимия / Под ред. чл.-корр. АМН В.В. Португалова; пер. с англ. – М: Изд. иностр. лит-ры, 1962. – С. 503-531.
81. Писалева С.Г. Возрастные изменения морфологии серого и белого вещества спинного мозга собаки // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 3(23). – С. 90-94.

82. Покровский В.И., Виноградов А.В., Журавлева И.А., Виноградов Н.А. Монооксид азота и нейроэндокринная система при вирусных и токсическом гепатитах, циррозе печени и острых кишечных инфекциях. - Федеральное бюджетное учреждение науки / Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора. Изд. 2-е. – 2011. – 193 с.
83. Попов В.А., Семенов В.А., Амахин Д.В., Веселкин Н.П. Взаимовлияние рецепторов глутамата и ГАМК-нейронов в центральной нервной системе // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.– 2016. – Т. 102, № 5. – С. 529-539.
84. Попова-Лопаткина Н.В. Развитие спинного мозга человека. В кн.: Вопросы морфологии нервной системы. – М., 1966. – С. 65-74.
85. Порсева В.В. Чувствительность нейронов афферентных узлов спинномозгового нерва, содержащих нейрофиламент к капсаицину // Морфологически ведомости. – 2011. – №4. – С. 43-46.
86. Порсева В.В. Кальбиндин иммунореактивные интернейроны промежуточной области и вентрального рога серого вещества спинного мозга белой крысы. Морфология. – 2014. – Т. 146, вып. 6. –С. 21-26.
87. Порсева В.В. Топография и морфометрическая характеристика НФ200+-нейронов серого вещества спинного мозга при деафферентации капсаицином // Морфология. – 2013. – Т. 144, вып. 6. – С. 20-25.
88. 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.
89. Порсева В.В., Шилкин В.В., Стрелков А.А., Краснов И.Б., Маслюков П.М. Морфофункциональная характеристика премоторных нейронов спинного мозга мышей C57/BL6 после 30-суточного полета на биоспутнике Бион-М1 // Авиакосм. и экол. медицина. – 2016. – Т. 50, № 5. – С. 182-183.
90. Пущина Е.В., Вараксин А.А., Калинина Г.Г. Цитоархитектоника и особенности нитроксидаергической организации спинного мозга костистых рыб // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 6. – С. 460-469.

91. Рагинов И.С., Челышев Ю.А. Посттравматическое выживание чувствительных нейронов различных субпопуляций // Морфология. – 2003. –Т. 124, вып. 4. – С. 47-50.
92. Раевский В.В. Неонатальное повреждение катехоламиергической системы препятствует формированию холинергической иннервации неокортекса крыс // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2011. –Т. 97, № 11. – С. 1196-1203.
93. Ромейс Б. Микроскопическая техника. - М.: Изд-во иностранной литературы, 1954.- 719 с.
94. Румянцева Т.А. Клеточный состав спинномозгового узла белой крысы после неонатального введения капсаицина // Морфология. – 2000. – Т. 118, вып. 5. – С. 22-25.
95. Сепетлиев Д.А. Статистические методы в научных медицинских исследования. – Издательство «Медицина», Москва, 1968. – 420 с.
96. Сепп Е.К. История развития нервной системы позвоночных. – М.: Медгиз. – 1959. – 428 с.
97. Ситникова Е.Ю., Егорова Т.Н., Раевский В.В. Уменьшение плотности нейронов в компактной части черной субстанции коррелирует с низкой пик-волновой активностью у крыс линии WAG/Rij // Журнал высшей нервной деятельности. – 2012. – Т. 62, № 5. – С. 619–628.
98. Сокульский И.Н. Морфологическая характеристика спинного мозга позвоночных животных // Ученые записки УО «Витебская ордена». - 2014. – Т. 50, вып. 2, ч. 1. – С. 53-56.
99. Сокульский И.Н., Горальский Л.П., Колесник Н.Л., Демус Н.В. Сравнительная характеристика ядер серого вещества различных сегментов спинного мозга домашней собаки // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. – 2014. – V. 16, № 3-2. – С. 290-295.
100. Сотников О.С. Статика и структурная кинтеика живых асинаптических дендритов. – СПб.: Наука, 2008. – 397 с.

101. Сотников О.С. Синцитиальная и цитоплазматическая связь и слияние нейронов. – СПб.: Наука, 2013. – 202 с.
102. Спиридонов В.К., Толочко З.С. Капсаицин-чувствительные нервы и окислительный стресс // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2010. – Т. 30, № 4. – С. 76-81.
103. Сухарева Б. С., Дарий Е.Л., Христофоров Р.Р. Глутаматдекарбоксилаза: структура и каталитические свойства // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 131-162.
104. Сысов А.В. Количественная морфологическая характеристика поясничных спинномозговых ганглиев в постнатальном периоде развития. Морфология. – 1996. – Т.109, вып. 2. – С.94-102.
105. Сысов А.В., Лобко П.И., Ковальчук И.Е. Строение нейронов спинномозговых узлов плодов белой крысы при химической десимпатизации беременной самки // Влияние химических и медикаментозных препаратов на структурно-функциональные системы организма: Сб. науч. тр. – Минск. Мед. ин-т, 1992. – С. 35-41.
106. Телешева И.Б. Возрастная динамика клеточного состава различных отделов спинного мозга человека // Морфологические ведомости. – 2005. – № 3-4. – С. 100-102.
107. Телешева И.Б. Возрастные изменения СДГ и НАД-диафоразной активности в спинном мозге человека // Морфологические ведомости. – 2006. – № 1-2. – С. 61-62.
108. Тилло П. О спинном мозге и его оболочках // Руководство к топографической анатомии в применении к хирургии. Санкт-Петербург: Издание К.Л. Риккера, 1883. – Ч. 2, отд. 2, гл. 3. – С. 371-386.
109. Тяпкина О.В., Резвяков П.Н., Нуруллин Л.Ф., Петров К.А., Никольский Е.Е., Исламов Р.Р. Иммуногистохимическое исследование реакции мотонейронов поясничного отдела спинного мозга мышей, находившихся в 30-суточном полете на биоспутнике БИОН-М1, на недельную реадаптацию к условиям земной гравитации // Гены и Клетки. – 2016. – Т. 11, № 3. – С. 80-83.

110. Фасахутдинова А.Н., Симанова Н.Г., Хохлова С.Н. Морфогенез спинного мозга кролика // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2015. – Т. 222, № 2. – С. 229-234.
111. Франк Г.А., Малькова П.Г. Иммуногистохимические методы: Руководство // Пер. с англ. George L. Kumar, Lars Rudbeck.: ДАКО. – М., 2011. – 224 с.
112. Франк Л., Раупаха К. Руководство к анатомии домашних животных, главным образом лошади. – Нейрология. Ч. 2. VII отдел: Учение о нервах, 1890. – С. 541-552.
113. Худоевков Р.М. Методы компьютерной морфометрии в нейроморфологии: учебное пособие (базовый курс). – М.: ФГБУ «НЦН» РАМН, 2014 г. – 53 с.
114. Цехмистренко Т.А., Черных Н.А. Возрастные особенности микроструктуры слоя V коры лобной доли большого мозга человека // Морфология. – 2012. – Т. 142, вып. 4. – С. 14-18.
115. Цыган Н.В. Мозговая дисфункция после операций коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения // Военно-медицинский журнал. – 2013. – Т. 334. № 11. – С. 30-34.
116. Черток В.М., Коцюба А.Е. Распределение NADPH-диафоразы и нейрональной NO-синтазы в ядрах продолговатого мозга // Морфология. – 2013. – Т. 144, вып. 6. – С. 9-14.
117. Чумасов Е.И., Пигаревский П.В., Коржевский Д.Э., Петрова Е.С., Яковлева О.Г., Мальцева С.В., Снегова В.А. Иммуноморфологическое исследование нейрососудистых взаимоотношений в стенке аорты человека в зоне формирования нестабильных атеросклеротических поражений // Цитокины и воспаление. – 2018. – Т. 17, № 1-4. – С. 49-55.
118. Чусовитина С.В., Вараксин А.А. Нитроксидагическая иннервация пищеварительного тракта японского анчоуса // Морфология. – 2003. – Т. 123, вып. 3. – С. 50-53.
119. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Бычков Е.Р. Влияние внутриутробного действия этанола на созревание моноаминергических систем в развивающемся

- мозге крыс // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2012. – Т. 98, № 2. – С. 202-211.
120. Шишелова А.Ю., Раевский В.В. Влияние пре- и постнатальных факторов на формирование ранних поведенческих реакций // Доклады Академии наук. – 2018. – Т. 479, № 3. – С. 351-353.
121. Школьников В.С., Гуминский Ю.Й. Особенности структуры и морфометрические параметры сегментов спинного мозга плодов человека и сиамских близнецов в сравнительном аспекте // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 13-19.
122. Шуклин А.В., Швалев В.Н. NO-синтаза во внутрисердечных ганглиях человека в норме и при ишемии миокарда // Морфология. – 2006. – Т. 129, вып. 3. – С. 34-36.
123. Экклс Д. Антидромный тормозной путь . В кн.: Физиология нервных клеток. – М.: Издательство иностранной литературы, 1959. – С. 82-191.
124. Ярыгин Н.Е., Ярыгин В.Н. Патологические и приспособительные изменения нейронов. – М.: Медицина, 1973. – 191 с.
125. Яценко А.Д., Лютикова Т. М. Анализ морфо-цитохимических показателей мотонейронов латеральных ядер спинного мозга мышей и крыс // Морфологические ведомости. – 2012. – № 4. – С. 64-68.
126. Acs G., Blumberg P.M. Comparison of resiniferatoxin binding to spinal cord and dorsal root ganglia of newborn and adult rats // Life Sci. – 1994. – Vol. 54. – P. 1875-1882.
127. Ahn S.N., Guu J.J., Tobin A.J. , Edgerton V.R.; Tillakaratne N.J.K. Use of c-fos to identify activity-dependent spinal neurons after stepping in intact adult rats // Spinal Cord. – 2006. – Vol.44. – P. 547–559.
128. Aimi Y., Fujimura M., Vincent S.R., Kimura H. Localization of NADPH-diaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat // J. Comp. Neurol. – 1991. – Vol. 306. № 3. – P. 382-392.
129. Alaynick W.A., Jessell T.M., Pfaff S.L. SnapShot: spinal cord development // Cell. – 2011. – Vol. 146. – P. 178-178.

130. Allain A.E., Meyrand P., Branchereau P. Ontogenic changes of the spinal GABAergic cell population are controlled by the serotonin (5-HT) system: implication of 5-HT1 receptor family // *Neurosci.* – 2005. – Vol. 25. – P. 8714-8724.
131. Almarestani L., Waters S.M., Krause J.E., Bennett G.J., Ribeiro-da-Silva A. Morphological characterization of spinal cord dorsal horn lamina I neurons projecting to the parabrachial nucleus in the rat // *J. Comp. Neurol.* – 2007. – Vol. 504. – P. 287-297.
132. Alstermark B1, Isa T, Pettersson LG, Sasaki S. The C3-C4 propriospinal system in the cat and monkey: a spinal pre-motoneuronal centre for voluntary motor control // *Acta Physiol (Oxf)*. – 2007. – Vol. 189, № 2. – P. 123-140.
133. Alvarez F.J., Benito-Gonzalez A., Siembab V. C. Principles of interneuron development learned from Renshaw cells and the motoneuron recurrent inhibitory circuit // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2013. Vol. 1279. P. 22-31.
134. Alvarez F.G., Fyffe R.E.W. The continuing case for the Renshaw cell // *J. Physiol.* – 2007. – Vol. 584. – P. 31-45.
135. Alvarez F.J., Jonas P.C., Sapir T., Hartley R., Berrocal M.C., Geiman E.J., Todd A.J., Goulding M. Postnatal phenotype and localization of spinal cord V1 derived interneurons // *J. Comp. Neurol.* – 2005. – Vol. 493, № 2. – P. 177-192.
136. Ambrus, A., Kraftsik, R., Barakat-Walter I. Ontogeny of calretinin expression in rat dorsal root ganglia // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 1998. – Vol. 106. – P. 101-108.
137. Anderson H.K. The nature of the lesions which hinder the development of nerve-cells and their processes // *J. Physiol.* – 1902. – Vol. 28. – P. 499-513.
138. Anderson R., Morris J., Gibbins I. Neurochemical differentiation of functionally distinct population of autonomic neurons // *J. Comp. Neurol.* – 2001. – Vol. 429. – P. 419-435.
139. Andres K.H. Untersuchungen über den Feinbau von Spinalganglien // *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie.* – 1961. – Vol. 55, № 1. – P. 1-48.
140. Andrew D. Sensitization of lamina I spinoparabrachial neurons parallels heat hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain // *J. Physiol.* – 2009. – Vol. 587. – P. 2005-2017.

141. 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. Neurocytology*. – 2005. – Vol. 34, № 6. – P. 369-385.
142. Antal M., Freund T.F., 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 // *J. Comp. Neurol.* – 1990. – Vol. 295, № 3. – P. 467-484.
143. Aoki Y., Ohtori S., Takahashi K., Ino H., Douya H., Ozawa T., Saito T., Moriya H. Expression and co-expression of VR1, CGRP, and IB4-binding glycoprotein in dorsal root ganglion neurons in rats: differences between the disc afferents and the cutaneous afferents // *Spine*. – 2005. – Vol. 30. – P. 1496-1500.
144. Aoki Y., Takahashi Y., Ohtori S., Moriya H., Takahashi K. Distribution and immunocytochemical characterization of dorsal root ganglion neurons innervating the lumbar intervertebral disc in rats: a review // *Life Sci.* – 2004. – Vol. 74, № 21. – P. 2627-2642.
145. Aquilonius S.M., Eckernas S.A., Gillberg P.G. Topographical localization of choline acetyltransferase within the human spinal cord and a comparison with some other species // *Brain Res.* – 1981. – Vol. 211. – P. 329-330.
146. Arai Y., Momose-Sato Y., Sato K., Kamino K. Optical mapping of neural network activity in chick spinal cord at an intermediate stage of embryonic development // *J. Neurophysiol.* – 1999. – Vol. 81, № 4. – P. 1889-1902.
147. Arvidsson U., Ulfhake B., Cullheim S., Ramírez V., Shupliakov O., Hökfelt T. Distribution of calbindin D28k-like immunoreactivity (LI) in the monkey ventral horn: do Renshaw cells contain calbindin D28k-LI // *J. Neurosci.* – 1992. – Vol. 12, № 3. – P. 718-728.
148. Avraham O., Hadas Y., Vald L., Zisman S., Schejter A., Visel A., Klar A. Transcriptional control of axonal guidance and sorting in dorsal interneurons by the Lim-HD proteins Lhx9 and Lhx1 // *Neural. Dev.* – 2009. – 4:21.
149. Babes A., Lorzon D., Reid G. Two population of neurons in rat dorsal root ganglia and their modulation // *Neurosci.* – 2004. – Vol.20. -№ 9. – P. 2276-2282.

150. Baccei M.L., Bardoni R., Fitzgerald M. Development of nociceptive synaptic inputs to the neonatal rat dorsal horn: Glutamate release by capsaicin and menthol // *J. Physiol.* – 2003. – Vol. 549. – P. 231-242.
151. Banik N.L., Matzelle D.C., Gantt-Wilford G., Osborne A., Hogan E.L. Increased calpain content and progressive degradation of neurofilament protein in spinal cord injury // *Brain Res.* – 1997. – Vol. 752. – P. 301-306.
152. Barber R.P., Vaughn J.E., Roberts E. The cytoarchitecture of GABAergic neurons in rat spinal cord // *Brain Res.* – 1982. – V. 238, № 2. – P. 305-328.
153. Barber R.P., Phelps P.E., Houser C.R., Crawford G.D., Salvaterra P.M., Vaughn J.E. The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study // *J. Comp. Neurol.* – 1984. – Vol. 229. – P. 329-346.
154. Bardoni R., Magherini P.C., MacDermott A.B. NMDA EPSCs at glutamatergic synapses in the spinal cord dorsal horn of the postnatal rat // *Neurosci.* – 1998. – Vol. 18, № 16. – P. 6558-6567.
155. Beal J.A. Cooper M.H. The neurons in the gelatinous complex (laminae II and III) of the monkey (*Macaca mulatta*): a Golgi study // *J. Comp. Neurol.* – 1978. – Vol. 179. – P. 89-122.
156. Beliez L., Barrière G., Bertrand S.S., Cazalets J.R. Origin of thoracic spinal network activity during locomotor-like activity in the neonatal rat // *J. Neurosci.* – 2015. – Vol. 35. – P. 6117-6130.
157. Bellido T., Huening M., Raval-Pandya M., Manolagas S.C., Christakos S. Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, № 34. – P. 26328-26332.
158. Berta T., Qadri Y., Tan P.H., Ji R.R. Targeting dorsal root ganglia and primary sensory neurons for the treatment of chronic pain // *Expert. Opin. Ther. Targets.* – 2017. – Vol. 21, № 7. – P. 695-703.

159. Bett K., Sandkuhle J. Map of spinal neurons activated by chemical stimulation in the nucleus raphe magnus of the unanaesthetized rat // *Neurosci.* – 1995. – Vol. 67, № 2. – P. 497-504.
160. Bhardwaj R., Nagar M., Prakash R. Histomorphometry of nucleus proprius in rat lumbar dorsal spinal horn // *Anat. Soc.* – 2001. – Vol. 50. – P. 140-144.
161. Bhimaidevi N., Narasingarao B., Sunitha V., Pramila Padmini Histogenesis of nucleus proprius of lumbar spinal cord of fullterm human foetus // *J. Biol. Med. Res.* – 2012. – Vol. 3(2). – P. 506-1508.
162. Bishop B. Pain: Its Physiology and Rationale for anagement Part I. Neuroanatomical Substrate of Pain // *Phys. Their.* – 1980. – Vol. 60. – P. 13-20.
163. Bizzi E., D'Avella A., Saltiel P., Tresch M. Modular organization of spinal motor systems // *Neuroscientist.* – 2002. – Vol. 8, № 5. – P. 437-442.
164. Blanchard S.R., Al-Marsoum S., Carr P.A. Renshaw cell loss in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis // *FASEB J.* – 2009. – Vol. 23. – P. 831.
165. Boehme C.C. The neural structure of Clarke's nucleus of the spinal cord // *J. Comp. Neurol.* – 1968. – Vol. 132(3). – P. 445-461.
166. Bolekova A., Kluchova D., Spakovska T., Dorko F., Lovasova K. Postnatal development of nitreergic and cholinergic structures in rat spinal cord // *Arch. Ital. Biol.* – 2011. Vol. 149, № 3. – P. 293-302.
167. Bombardi C., Grandis A., Nenzi A., Giurisato M., Cozzi B. Immunohistochemical localization of substance P and cholecystokinin in the dorsal root ganglia and spinal cord of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) // *Anat. Rec. (Hoboken).* – 2010. – Vol. 293, № 3. – P. 477-84.
168. Bombardi C., Grandis A., Gardini A., Cozzi B. Nitreergic neurons in the spinal cord of the bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) // *Anat. Rec. (Hoboken).* – 2013. – Vol. 296. – P. 1603-1614.
169. Bossowska A., Crayton R., Radziszewski P., Kmiec Z., Majewski M.J. Distribution and neurochemical characterization of sensory dorsal root ganglia neurons supplying porcine urinary bladder // *Physiol. Pharmacol.* – 2009. – Suppl. 4. – P. 77-81.

170. Borowska J., Jones C.T., Zhang H. Functional Subpopulations of V3 Interneurons in the Mature Mouse Spinal Cord // *J. Neurosci.* – 2013. – Vol. 33. – P. 18553-18565.
171. Branchereau P., Chapron J., Meyrand P. Descending 5-hydroxytryptamine raphe inputs repress the expression of serotonergic neurons and slow the maturation of inhibitory systems in mouse embryonic spinal cord // *J. Neurosci.* – 2002. – Vol. 22. – P. 2598 -2606.
172. Breedlove S.M., Arnold A.P. Hormone accumulation in a sexually dimorphic motor nucleus of the rat spinal cord // *Science.* – 1980. – Vol. 210. – P. 564-566.
173. Brown A.G., Fyffe R.E.W. Form and function of dorsal horn neurons with axons ascending the dorsal columns in cat // *J. Physiol.* – 1981. – Vol. 321. – P. 31-47.
174. Brown J.L., Liu H., Maggio J.E., Vigna S.R., Mantyh P.W., Basbaum A.I. Morphological characterization of substance P receptor-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and trigeminal nucleus caudalis // *J. Comp. Neurol.* – 1995. – Vol. 356. – P. 327-344.
175. Brumovsky P. The neuropeptide tyrosine Y1R is expressed in interneurons and projection neurons in the dorsal horn and area X of the rat spinal cord // *Neurosci.* – 2006. – Vol. 138. – P. 1361-1376.
176. Bucelli R.C., Gonsiorek E.A., Kim W.Y., Bruun D., Rabin R.A., Higgins D., Lein P.J. Statins decrease expression of the proinflammatory neuropeptides calcitonin gene-related peptide and substance P in sensory neurons // *Pharmacol. Exp. Ther.* – 2008. – Vol. 324. – P. 1172-1180.
177. Burke R.E. Sir Charles Sherrington's. The integrative action of the nervous system: a centenary appreciation // *Brain.* – 2007. – Vol. 130, № 4. – P. 887-894.
178. Buss R.R., Sun W., Oppenheim R.W. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2006. – Vol. 29. – P. 1-35.
179. Buxton D.F., Goodman D.C.J. Motor function and corticospinal tracts in the dog and raccoon // *J. Comp. Neurol.* – 1967. – Vol. 129. – P. 341-360.

180. Cabot J.B., Alessi V., Carroll J., Ligorio M. Spinal cord lamina V and lamina VII interneuronal projections to sympathetic preganglionic neurons // *J. Compar. Neurol.* – 1994. – Vol. 347, I.4. – P. 515-530.
181. Cadieux A., Springall D.R., Mulderry P.K., Rodrigo J., Ghatei M.A., Terenghi G., Bloom S.R., Polak J.M. Occurrence, distribution and ontogeny of CGRP immunoreactivity in the rat lower respiratory tract: effect of capsaicin treatment and surgical denervations // *Neurosci.* – 1986. – Vol. 19. – P. 605-627.
182. Caillard O., Moreno H., Schwaller B., Llano I., Celio M.R., Marty A. Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2000. – Vol. 97. – P. 13372-13377.
183. Calkal J., Zalecki M., Wasowicz K., Bartłomiej Arciszewski M., Lakomy M. A comparison of the distribution and morphology of ChAT-, VAcHT-immunoreactive and AChE-positive neurons in the thoracolumbar and sacral spinal cord of the pig // *Veterinarni Medicina.* – 2008. – Vol. 53. – P. 434-444.
184. Camp A.J., Wijesinghe R. Calretinin: modulator of neuronal excitability // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 41. – P. 2118-2121.
185. Carr P.A., Alvarez F.J., Leman E.A., Fyffe R.E. Calbindin D28k expression in immunohistochemically identified Renshaw cells // *Neuro. Report.* – 1998. – Vol. 9, № 11. – P. 2657-2661.
186. Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway // *Nature.* – 1997. – Vol. 389. – P. 816-824.
187. Cavanaugh D.J., Chesler A.T., Jackson A.C., Sigal Y.M., Yamanaka H., Grant R., O'Donnell D., Nicoll R.A., Shah N.M., Julius D., Basbaum A.I. TRPV1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells // *J. Neurosci.* – 2011. – Vol. 31. – P. 5067-5077.
188. Cervero F.J., Tattersall E.H. Somatic and visceral inputs to the thoracic spinal cords of the cat: marginal zone (laminar I) of the dorsal horn // *J. Physiol.* – 1987. – Vol. 383. – P. 383-395.

189. Cheron G, Servais L, Dan B. Cerebellar network plasticity: from genes to fast oscillation // *Neurosci.* – 2008. – Vol. 153, № 1. – P. 1-19.
190. Chung K., Coggeshall R.E. The postnatal development of the tract of Lissauer in the rat // *J. Comp. Neurol.* – 1984. – V. 229, №4. – P. 471-475.
191. Clapham D.E. TRP channels as cellular sensors // *Nature.* – 2003. – Vol. 426. – P. 517-524.
192. Clarke H.A., Dekaban G.A., Weaver L.C. Identification of lamina V and VII interneurons presynaptic to adrenal sympathetic preganglionic neurons in rats using a recombinant herpes simplex virus type 1 // *J. Neurosci.* – 1998. – Vol. 85, № 3. – P. 863-872.
193. Coggeshall R.E., Willis W.D. Structure of the dorsal horn // *Sensory mechanisms of the spinal cord.* – New York: Plenum Press. 2nd Ed, 1991. – P. 79-151.
194. Coulon P., Coggeshall R.E., Willis W.D. Characterization of last-order premotor interneurons by transneuronal tracing with rabies virus in the neonatal mouse spinal cord // *J. Comp. Neurol.* – 2011. – Vol. 519. – P. 3470-3487.
195. 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.
196. Cummings J.P., Stelzner D.J. Prenatal and postnatal development of lamina IX neurons in the rat thoracic spinal cord // *Exp. Neurol.* – 1984. – V. 83, №1. –P. 155-166.
197. Curfs M.H.J.M., Gribnau A.A.M., Dideren P.J.W.C. Postnatal maturation of the dendritic fields of motoneuron pools supplying flexor and extensor muscles of the distal forelimb in the rat // *Development.* – 1993. – V. 117. – P. 535-541.
198. Davidoff M.S., Galabov P.G., Bergmann M. The vegetative network in the thoracolumbar spinal cord of the guinea pig: A comparison of the distribution of AChE-enzyme activity and choline acetyltransferase-like immunoreactivity // *J. fur Hirnforschung.* – 1989. – Vol. 30. – P. 707-717.
199. De Moraes E.R., Kushmerick C., Naves L.A. Morphological and functional diversity of first-order somatosensory neurons // *Biophys. Rev.* – 2017. – Vol. 9, № 5. – P. 847-856.

200. Descarries L., Mechawar N. Structural organization of monoamine and acetylcholine neuron systems in the rat CNS // *Neurotransmitter Systems*. 3rd edition. – New York: Springer Science & Business Media, 2008. – P. 1-20.
201. Deuchars S.A., Milligan C.J., Stornetta R.L., Deuchars J.J. GABAergic neurons in the central region of the spinal cord: a novel substrate for sympathetic inhibition // *Neurosci.* – 2005. – Vol. 25, № 5. – P. 1063-1070.
202. Ding Y.Q., Yin J., Kania A., Zhao Z.-Q., Johnson R.L., Chen Z.-F. Lmx1b controls the differentiation and migration of the superficial dorsal horn neurons of the spinal cord // *Development*. – 2004. – № 131. – P. 3693-3703.
203. Djouhri L., Lawson S.N. A β -fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals // *Brain Res. Brain Res. Rev.* – 2004. – Vol. 46, № 2. – P. 131-145.
204. Doly S., Fischer J., Conrath M. The vanilloid receptor-1 (TRPV1) is expressed in some rat dorsal horn NK1 cells // *Brain Research*. – 2004. – Vol. 1004. – P. 203-207.
205. Dougherty K.J., Sawchuk M.A., Hochman S. Phenotypic diversity and expression of GABAergic inhibitory interneurons during postnatal development in lumbar spinal cord of glutamic acid decarboxylase 67-green fluorescent protein mice // *Neurosci.* – 2009. – Vol. 163, № 3. – P. 909-919.
206. Dum R.P., Strick P.L. Spinal cord terminations of the medial wall motor areas in macaque monkeys // *Neurosci.* – 1996. – Vol. 16. – P. 6513-6525.
207. Dux M., Santha P., Jancso G. The role of chemosensitive afferent nerves and TRP ion channels in the pathomechanism of headaches // *Pflugers. Arch.* – 2012. – Vol. 464. – P. 239-248.
208. Dyck J., Guillermo M., Gosgnach L., Gosgnach S. Functional characterization of dI6 interneurons in the neonatal mouse spinal cord // *J. Neurophysiol.* Published online. – 2012. – Vol. 107. – P. 3256-3266.
209. Edgley S.A. Organisation of inputs to spinal interneurone populations // *J. Physiol.* – 2001. – Vol. 533, № 1. P. 51-56.

210. Emanuilov A.I., Shilkin V.V., Nozdrachev A.D., Masliukov P.M. Afferent innervation of the trachea during postnatal development // *Autonomic Neurosciense: Basic and Clinical*. – 2005. – Vol. 120. – P. 68-72.
211. Enderlin S., Norman A.W., Celio M.R. Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system // *Anat. Embryol. (Berl)*. – 1987. – Vol. 177, № 1. – P. 15-28.
212. Ernsberger U. Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia // *Cell Tissue Res*. – 2009. – Vol. 336. – P. 349–384
213. Esteves F., Lima D., Coimbra A. Structural types of spinal cord marginal (lamina I) neurons projecting to the nucleus of the tractus solitarius in the rat // *Somatosens Mot. Res*. – 1993. – Vol. 10. – P. 203-216.
214. Eustachiewicz R., Flieger S., Boratyński Z., Sławomirski J. Structure and topography of nucleus dorsalis in the spinal cord of horses // *Pol. Arch. Weter*. – 1980. – Vol. 21, № 4. – P. 499-506.
215. Fahandejsaadi A., Leung E., Rahaii R., Bu J., Geula Ch. Calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in primate lower motor neurons // *Neuroreport*. – 2004. – Vol. 15, № 3. – P. 443-448.
216. Fasani F., Bocquet A.P., Robert A., Eyer J. The amount of neurofilaments aggregated in the cell body is controlled by their increased sensitivity to trypsin-like proteases // *J. Cell Science*. – 2004. – Vol. 117. – P. 861-869.
217. Feigin A.M., Aronov E., Bryant B.P., Teeter J., Van den Brand J. G. H. Capsaicin and its analogs induce ion channels in planar lipid bilayers // *Neuroreport*. – 1995. – Vol. 6. – P. 2134-2136.
218. Fenselau H., Heinke B., Sandkühler J. Heterosynaptic long-term potentiation at GABAergic synapses of spinal lamina I neurons // *Neurosci*. – 2011. – Vol. 31. – P. 17383-17391.
219. Fernandes E.C., Santos I.C., Kokai E., Luz L.L., Szucs P., Safronov B.V. Low- and high-threshold primary afferent inputs to spinal lamina III antenna-type neurons // *Pain*. – 2018. – Vol. 159, № 11. – P. 2214-2222.

220. Ferri G. , Sabani A., Abelli L. Polak J.M., Dahl D., Portier M.M. Neuronal intermediate filaments in rat dorsal root ganglia: differential distribution of peripherin and neurofilament protein immunoreactivity and effect of capsaicin // *Brain Research*. – 1990. – Vol. 515, № 1-2. – P. 331-335.
221. Ferrini F., Salio C., Lossi L., Gambino G., Merighi A. Modulation of inhibitory neurotransmission by the vanilloid receptor type 1 (TRPV1) in organotypically cultured mouse substantia gelatinosa neurons // *Pain*. – 2010. – Vol. 150, № 1. – P. 128-140.
222. Fiallos-Estrada C.E., Kummer W., Mayer B., Bravo R., Zimmermann M., Herdegen T. Long-lasting increase of nitric oxide synthase immunoreactivity, NADPH-diaphorase reaction and c-JUN coexpression in rat dorsal root ganglion neurons following sciatic nerve transection // *Neurosci. Lett*. – 1993. – Vol. 150. – P. 169-173.
223. Finazzo C. Neuronal populations in the spinal cord during ageing // *Ital. J. Anat. Embryol*. – 1994. – Vol. 99, № 4. – P. 243-262.
224. FIPAT (2017) Terminologia Neuroanatomica. FIPAT.library.dal.ca. Federative International Programme for Anatomical Terminology.
225. Fitzgerald M., Butcher T., Shortland P. Developmental changes in the laminar termination of A fibre cutaneous sensory afferents in the rat spinal cord dorsal horn // *J. Comp. Neurol*. – 1994. – Vol. 348. – P. 225-233.
226. Fitzgerald M., Jennings E. The postnatal development of spinal sensory processing // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 1999. – V. 96, №14. – P. 7719-7722.
227. Fiumelli H., Woodin M.A. Role of activity-dependent regulation of neuronal chloride homeostasis in development // *Curr. Opin. Neurobiol*. – 2007. – Vol. 17. – P. 81-86.
228. Floyd T.L., Dai Y., Ladle D.R.. Characterization of calbindin D28k expressing interneurons in the ventral horn of the mouse spinal cord // *Dev. Dyn*. – 2018. – Vol. 247, № 1. – P. 185-193.
229. Foster J.A., Phelps P.E. Neurons expressing NADPH-diaphorase in the developing human spinal cord // *J. Comp.Neurol*. – 2000. – Vol. 427, № 3. – P. 417-427.

230. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function // *Eur. Heart. J.* – 2012. – Vol. 33, № 7. – P. 829-837.
231. Francius C., Clotman F. Dynamic expression of the Onecut transcription factors HNF-6, OC-2 and OC-3 during spinal motor neuron development // *Neurosci.* – 2010. – Vol. 165. – P. 116-129.
232. Francius C., Harris A., Rucchin V. Identification of multiple subsets of ventral interneurons and differential distribution along the rostrocaudal axis of the developing spinal cord // *PLoS ONE.* – 2013. – 8:e70325.
233. Franco-Cereceda A., Henke H., Lundberg J.M., Petermann, J.B., Hökfelt T., Fischer J.A. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in capsaicin-sensitive substance P-immunoreactive sensory neurons in animals and man: distribution and release by capsaicin // *Peptides.* – 1987. – Vol. 8. – P. 399-410.
234. Freire M.A., Tourinho S.C., Guimarães J.S., Oliveira J.L., Picanço-Diniz C.W., Gomes-Leal W., Pereira A. Histochemical characterization, distribution and morphometric analysis of NADPH diaphorase neurons in the spinal cord of the agouti // *Front. Neuroanat.* – 2008. – Vol. 2. – P. 2-9.
235. Freire M.A., Guimarães J.S., Gomes-Leal W., Pereira Jr.A. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord // *Front. Neurosci.* – 2009. – Vol. 3. – P. 175-181.
236. Friese A., Kaltschmidt J.A., Ladle D.R., Sigrist M., Jessell T.M., Arber S. Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcriptionfactor *Err3* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106. P. 13588-13593.
237. Fuchs A., Lirk P., Stucky C., Abram S., Hogan Q. Painful nerve injuri decreased resting cytosolic calcium concentrations in sensory neurons of rats // *Anesthesiology.* – 2005. – Vol. 102, № 6. – P. 1217-1225.
238. Fujita Y. Dendritic spikes in normal spinal motoneurons of cats // *Neurosci. Res.* – 1989. – Vol. 6(4). – P. 299-308.
239. Gazelius B., Edwards B., Olgart L., Lundberg J.M. Vasodilatory effects and coexistence of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P in sensory nerves of cat dental pulp // *Acta Physiol. Scand.* – 1987. – Vol. 130, № 1. – P. 33-40.

240. Gauriau C., Bernard J.F. A comparative reappraisal of projections from the superficial laminae of the dorsal horn in the rat: the forebrain // *J. Comp. Neurol.* – 2004. – Vol. 468. – P. 24-56.
241. Gavva N.R. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1 // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2008. – Vol. 29. – P. 550-557.
242. Geiman E.J., Knox M.C., Alvarez F.J. Postnatal maturation of gephyrin/glycine receptor clusters on developing Renshaw cells // *J. Comp. Neurol.* – 2000. – Vol. 426. – P. 130-142.
243. Ghamdi A.L., Polgar K.S., Todd A.J. Soma size distinguishes projection neurons from neurokinin receptor-expressing interneurons in lamina I of the rat lumbar spinal dorsal horn // *Neurosci.* – 2009. – Vol. 164. – P. 1794-1804.
244. Ghorbani M.L., Nyborg N.C., Fjalland B., Sheykhzade M. Calcium activity of upper thoracic dorsal root ganglion neurons in zucker diabetic Fatty rats // *Int. J. Endocrinol.* – 2013:532850.
245. Gibbons S.J., Brorson J.R., Bleakman D., Chard P.S., Miller R.J. Calcium influx and neurodegeneration // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 1993. – Vol. 679. – P. 22-33.
246. Giszter S.F., Mussa-Ivaldi F.A., Bizzi E. Convergent force fields organized in the frog's spinal cord // *J. Neuroscientist.* – 1993. – Vol. 13. – P. 467-491.
247. Gobel S. Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis) // *Journal of Comparative Neurology.* – 1978. – Vol. 180. – P. 395-413.
248. Goda Y., Davis G.W. Mechanisms of synapse assembly and disassembly // *Neuron.* – 2003. – V.40, №2. – P. 243-264.
249. Goetz C., Pivetta C., Arber S. Distinct limb and trunk premotor circuits establish laterality in the spinal cord // *Neuron.* – 2015. – Vol. 85, № 1. – P. 131-144.
250. González Deniselle M.C., GarayL., López-Costa J.J., González S., Mougel A., Guennoun R., Schumacher M., De Nicola A. F. Progesterone treatment reduces NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in Wobbler mouse motoneuron disease // *Brain Res.* – 2004. – Vol. 1014, № 1-2. – P. 71-79.

251. Goodman E.C., Iversen L.L. Calcitonin gene-related peptide: novel neuropeptide // *Life Sci.* – 1986. – Vol. 38, № 4. – P. 2169-2178.
252. Gookin J.L., Rhoads J.M., Argenzio R.A. Inducible nitric oxide synthase mediates early epithelial repair of porcine ileum // *Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2002. – Vol. 283, № 1. – P. 157-168.
253. González-Hernández A., Marichal-Cancino B.A., Lozano-Cuenca J., López-Canales J.S., Muñoz-Islas E., Ramírez-Rosas M.B., Villalón C.M. Heteroreceptors modulating CGRP release at neurovascular junction: Potential therapeutic implications on some vascular-related diseases // *Biomed Res Int.* – 2016:2056786.
254. Goulding M. Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2009. – Vol. 10, № 7. – P. 507–518.
255. Grant G., Koerber H.R. Spinal cord Cytoarchitecture. In: Paxinos G. (Eds) // *The Rat Nervous System.* – Elsevier Academic Press, San Diego, 2004. – P. 121-128.
256. Grgurevic M., Malobabic S., Pavlovic S., Nedeljkovic V. Large multipolar neurons in the substantia gelatinosa (Rolandi) of the cat spinal cord // *Folia Anatomica.* – 1999. – Vol. 27. – P. 51-55.
257. Gross M.K., Dottori M., Goulding M. Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord // *Neuron.* – 2002. – Vol. 34. – P. 535-549.
258. Grudt T.J., Perl E.R. Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn // *J. Physiol.* – 2002. – Vol. 540. – P. 189-207.
259. Hall A.K., Ai X., Hickman G.E., MacPhedran S.E., Nduaguba C.O., Robertson C.P. The generation of neuronal heterogeneity in a rat sensory ganglion // *J. Neurosci.* – 1997. – Vol. 17, № 8. – P. 2775-2784.
260. Hantman A.W., Jessell T.M. Clarke's column neurons as the focus of a corticospinal collateral circuit // *Nature Neurosci.* – 2010. – Vol. 13. – P. 1233-1239.
261. Heise C., Kayalioglu G. Cytoarchitecture of the spinal cord // *The spinal cord. A Christopher and Dana Reeve foundation text and atlas.* – San Diego: Elsevier Academic Press. – 2009. – 64-80 p.

262. Henk van Dijken, Dijk J., Morn P., Holstege J.C. Localization of dopamine D2 receptor in rat spinal cord identified with immunocytochemistry and In situ hybridization // *European Journal of Neuroscience*. – 1996. – Vol. 8. – P. 621-628.
263. Hiura A, Sakamoto Y. Quantitative estimation of the effects of capsaicin on the mouse primary sensory neurons // *Neurosci. Lett.* – 1987. – Vol. 76, № 1. –P. 101-106.
264. Hoffman E.M., Schechter R., Miller K.E. Fixative composition alters distributions of immunoreactivity for glutaminase and two markers of nociceptive neurons, Nav1.8 and TRPV1, in the rat dorsal root ganglion // *J. Histochem. Cytochem.* – 2010. – Vol. 58. – P. 329-344.
265. Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachikinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides // *Neurosci.* – 1988. – Vol. 24, № 3. – P. 739-768.
266. Holzer P. Peptidergic sensory neurons on the control of vascular functions mechanisms and significance of the cutaneous and splanchnic vascular beds. *Rev. Physiol.* // *Biochem. Pharmacol.* – 1992. – Vol. 121. – P. 49-146.
267. Holzer P. The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nocisensor // *British J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 155. – P. 1145–1162.
268. Holzer P., Maggi C.A. Dissociation of dorsal root ganglion neurons into afferent and efferent-like neurons // *Neurosci.* – 1998. – Vol. 86. – P. 389-398.
269. Honda C.N. Differential distribution of calbindin-D28k and parvalbumin in somatic and visceral sensory neurons // *Neurosci.* – 1995. – Vol. 68, № 3. – P. 883-892.
270. Hope B.T., Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase // *J. Histochem. Cytochem.* – 1989. – Vol. 37, № 5. – P. 653-661.
271. Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M., Vincent S.R. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase // *Neurobiology.* – 1991. – Vol.88. – P.2811-2814.
272. Hori K., Hoshino M. GABAergic Neuron Specification in the Spinal Cord, the Cerebellum, and the Cochlear Nucleus // *Neural. Plasticity.* – 2012: 921732.
273. Huang J., Feng F., Tamamaki N., Yanagawa Y., Obata K., Li Y.-Q., Wu S.-X. Prenatal and Postnatal Development of GABAergic Neurons in the Spinal Cord

Revealed by Green Fluorescence Protein Expression in the GAD67-GFP Knock-In Mouse // *Neuroembryol. Aging.* – 2006. – Vol. 4. – P. 147-154.

274. Hwang S.J., Burette A., Valtschanoff J.G. VR1-positive primary afferents contact NK1-positive spinoparabrachial neurons // *J. Comp. Neurol.* – 2003. – Vol. 460. – P. 255-265.

275. Hwang S.J., Burette A., Rustioni A., Valtschanoff J.G. Vanilloid receptor VR1-positive primary afferents are glutamatergic and contact spinal neurons that co-express neurokinin receptor NK1 and glutamate receptors // *J. Neurocytol.* – 2004. – Vol. 33. – P. 321-329.

276. Ichikawa H., Rabchevsky A., Helke C.J. Presence and coexistence of putative neurotransmitters in carotid sinus baro- and chemoreceptor afferent neurons // *Brain Res.* – 1993. – Vol. 611. – P. 67-74.

277. Ichikawa H., Sugimoto T. Co-expression of VRL-1 and calbindin D-28k in the rat sensory ganglia // *Brain Res.* – 2002. – Vol. 924, № 1. – P. 109-112.

278. Ivanusic J.J. Size, Neurochemistry, and segmental distribution of sensory neurons innervating the rat tibia // *J. Comp. Neurol.* – 2009. – Vol. 517. – P. 276-283.

279. Jankowska E., Bannatyne B.A., Stecina K., Hammar I., Cabaj A., Maxwell D.J. Commissural interneurons with input from group I and II muscle afferents in feline lumbar segments: neurotransmitters, projections and target cells // *J. Physiol.* – 2009. – V. 587, № 2. – P. 401-418.

280. Jankowska E., Edgley S.A. Functional subdivision of feline spinal interneurons in reflex pathways from group Ib and II muscle afferents; an update // *Eur. J. Neurosci.* – 2010. – Vol. 32, № 6. – P. 881-893.

281. Jankowska E., Lindström S. Procion yellow staining of functionally identified interneurons in the spinal cord of the cat. In: Kater S.B., Nicholson C. (eds) // *Intracellular Staining in Neurobiology.* Springer, Berlin, Heidelberg. – 1973. – P. 199-209.

282. Jordt SE, McKemy DD, Julius D (2003) Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation. *Curr Opin Neurobiol* 13: 487–492

283. Josephson A., Widenfalk J., Trifunovski A., Widmer H.R., Olson L., Spenger C. GDNF and NGF family members and receptors in human fetal and adult spinal cord and dorsal root ganglia // *J. Comp. Neurol.* – 2001. – Vol. 440. № 2. – P. 204-217.
284. Julien J.P., Kriz J. Transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1762. – P. 1013-1024.
285. Kalb R.G. Regulation of motor neuron dendrite growth by NMDA receptor activation // *Development.* – 1994. – V. 120. – P. 3063-3071.
286. Kanning K.C., Kaplan A., Henderson C.E. Motor neuron diversity in development and disease // *Annual Review of Neuroscience.* – 2010. – Vol. 33. – P. 409-440.
287. Kato G., Kawasaki Y., Koga K., Uta D., Kosugi M., Yasaka T., Yoshimura M., Ji R.R., Strassman A.M. Organization of intralaminar and translaminar neuronal connectivity in the superficial spinal dorsal horn // *J. Neurosci.* – 2009. – Vol. 16. – P. 5088-5099.
288. Katter J.T., Burstein R., Giesler G.J.Jr. The cells of origin of the spinothalamic tract in cats // *J. Comp. Neurol.* – 1991. – Vol. 303, № 1. – P. 101-112.
289. Kaur C., Singh J., Moochhala S. Induction of NADPH diaphorase/nitric oxide synthase in the spinal cord motor neurons of rats following a single and multiple non-penetrative blasts // *Histol. Histopathol.* – 1999. – Vol. 14. – P. 417-425.
290. Kiehn O. Development and functional organization of spinal locomotor circuits // *Current Opinion in Neurobiology.* – 2011. – Vol. 21. – P. 100-109.
291. Kim H.J., Sun W. Adult neurogenesis in the central and peripheral nervous systems // *Int. Neurorol. J.* – 2012. – Vol. 16, № 2. – P. 57-61.
292. Kim J.J., Chang I.Y., Chung Y.Y., Yoon S.P., Moon J.S., Yoon H.J. 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 // *J. Phys. Anthropol.* – 2002. – Vol. 15, № 4. – P. 305-329.

293. Kim J.S., Kim J.M., Son J.A., Han S.Y., Kim C.T., Lee N.S., Jeong Y.G. Decreased calbindin-immunoreactive Renshaw cells (RCs) in the lumbar spinal cord of the ataxic pogo mice // *J. Anat.* – 2008. – Vol. 41, № 4. – P. 255-263.
294. Kim K.H., Kim J.I., Han J.A., Choe M.A., Ahn J.H. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in the periphery promotes pain hypersensitivity after peripheral nerve injury // *Neurosci.* – 2011. – Vol. 190. – P. 367-378.
295. Kim J., Sunagawa M., Kobayashi S., Shin T., Takayama C. Developmental localization of calcitonin gene-related peptide in dorsal sensory axons and ventral motor neurons of mouse cervical spinal cord // *Neurosci. Res.* – 2016. – Vol. 105. – P. 42-48.
296. Kimura H., McGeer P.L., Peng J.H., McGeer E.G. The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat // *J. Comp. Neurol.* – 1981. – Vol. 200. – P. 151-201.
297. Kishi M., Tanabe J., Schmelzer J.D., Low P.A. Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy // *Diabetes.* – 2002. – Vol. 51, № 3. – P. 819-24.
298. Kluchova D., Rybarova S., Miklosova M., Lovasova K., Schmidtova K., Dorko F. Comparative analysis of NADPH-diaphorase positive neurons in the rat, rabbit and pheasant thoracic spinal cord. A histochemical study // *J. Histochem.* – 2001. – Vol. 45. – P. 239-248.
299. Kobayashi S., Mwaka E.S., Baba H., Kokubo Y., Yayama T., Kubota M., Nakajima H., Meir A. Microvascular system of the lumbar dorsal root ganglia in rats. Part II: neurogenic control of intraganglionic blood flow // *J. Neurosurg. Spine.* – 2010. – Vol. 12, № 2. – P. 203-209.
300. Koelle G.B. A new general concept of the neurohumoral functions of acetylcholine and acetylcholinesterase // *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* – 1962. – Vol. 14. – P. 65-90.
301. Kojima M., Takeuchi Y., Goto M., Sano Y. Immunohistochemical study on the distribution of serotonin fibers in the spinal cord of the dog // *Cell and Tissue Research.* – 1982. – Vol. 226, I.3. – P. 477-491.

302. Kolb B., Morshead C., Gonzalez C., Kim M., Gregg C., Shingo T., Weiss S. Growth factor-stimulated generation of new cortical tissue and functional recovery after stroke damage to the motor cortex of rats // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* – 2007. – V. 27, №5. – P. 983-997.
303. Kondo T., Oshima T., Obata K., Sakurai J., Knowles C.H., Matsumoto T., Noguchi K., Miwa H. Role of transient receptor potential A1 in gastric nociception // *Digestion.* – 2010. – Vol. 82, № 3. – P. 150-155.
304. Kong J., Tung V.W., Aghajanian J., Xu Z. Antagonistic roles of neurofilament subunits NF-H and NF-M against NF-L in shaping dendritic arborization in spinal motor neurons // *J. Cell Biol.* – 1998. – Vol. 140, № 5. – P. 1167-1176.
305. Konstantinidou A.D., Silos-Santiago I., Flaris N., Snider W.D. Development of the primary afferent projection in human spinal cord // *J. Comp. Neurol.* – 1995. – Vol. 354. – P. 11-22.
306. Krause J.E., MacDonald M.R., Takeda Y. The polyprotein nature of substance P precursors // *Bioessays.* – 1989. – Vol. 10. – P. 62-69.
307. Kumazawa T., Perl R., Burgess P., Whitehorn D. Ascending projections from marginal zone (Lamina I) neurons of the spinal dorsal horn // *J. Comp. Neurol.* – 2004. – Vol. 162, №. 1. – P. 1-11.
308. Kuncová J., Slavíková J. Vasoactive intestinal polypeptide and calcitonin gene-related peptide in the developing rat heart atria // *Auton. Neurosci.* – 2000. – Vol. 83. – P. 58-65.
309. Ladd A.A., Ladd F.V., da Silva A.A., Oliveira M.F., de Souza R.R., Coppi A.A. SCG postnatal remodelling--hypertrophy and neuron number stability--in Spix's yellow-toothed caviar (*Galea spixii*) // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2012. – Vol. 30, № 2. – P. 129-37.
310. Laing I., Todd A.J., Heizmann C.W., Schmidt H.H. Subpopulations of GABAergic neurons in laminae I-III of rat spinal dorsal horn defined by coexistence with classical transmitters, peptides, nitric oxide synthase or parvalbumin // *Neurosci.* – 1994. – Vol. 61, № 1. – P.123-132.

311. Lanuza G.M., Gosgnach S., Pierani A., Jessell T.M., Goulding M. Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements // *Neuron*. – 2004. – Vol. 42. – P. 375-386.
312. Lawson S.N., Crepps B.A., Perl E.R. Relationship of substance P to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurones in the guinea-pig // *J. Physiol.* – 1997. – Vol. 505. – P. 177-191.
313. Lawson S.N., Waddell P.J. Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fiber conduction velocity in rat primary sensory neurons // *Physiol.* – 2001. – Vol. 435. – P. 41-63.
314. Leah J., Menétrey D., De Pommery J. Neuropeptides in long ascending spinal tract cells in the rat: evidence for parallel processing of ascending information // *Neurosci.* – 1988. – Vol. 24, № 1. – P. 195-207.
315. Lee C.J., Bardoni R., Tong C.K., Engelman H.S., Joseph D.J., Mac Dermott A.B. Functional expression of AMPA receptors on central terminals of rat dorsal root ganglion neurons and presynaptic inhibition of glutamate release // *Neuron*. – 2002. – Vol. 35. – P. 135-146.
316. Lee D., Obukhov A.G., Shen Q., Liu Y., Dhawan P., Nowycky M.C., Christakos S. Calbindin-D28k decreases L-type calcium channel activity and modulates intracellular calcium homeostasis in response to K⁺ depolarization in a rat beta cell line RINr1046-38 // *Cell Calcium*. – 2006. – Vol. 39. – P. 475-485.
317. Lee J.C., Hwangb I.K., Cho J.H., Moond S.M., Kang T.C., Kima W.K., Won M.H. Expression and changes of calbindin D-28k immunoreactivity in the ventral horn after transient spinal cord ischemia in rabbits // *Neurosci. Lett.* – 2004. – Vol. 369, № 2. – P. 145-149.
318. Lee K.J., Dietrich P., Jessell T.M. Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification // *Nature*. – 2000. – Vol. 403. – P. 734-740.
319. LeGreves P., Nyberg F., Terenius L., Hokfelt T. Calcitonin gene-related peptide is a potent inhibitor of substance P degradation // *Eur. J. Pharmacol.* – 1985. – Vol. 115, № 3. – P. 309-311.

320. Le Pichon C.E., Chesler A.T.. The functional and anatomical dissection of somatosensory subpopulations using mouse genetics // *Front. Neuroanat.* –2014. – Vol. 8:21.
321. Levine A.J., Hinckley C.A., Hilde K.L., Driscoll S.P., Poon T.H., Montgomery J.M., Pfaff S.L. Identification of a cellular node for motor control pathways // *Neurosci.* – 2014. – Vol. 17, №. 4. – P. 586-593.
322. Lewis K.E. How do genes regulate simple behaviours? Understanding how different neurons in the vertebrate spinal cord are genetically specified // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2006. – Vol. 361. – P. 45-66.
323. Li H.Y., Say E.H., Zhou X.F. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia // *Stem Cells.* – 2007. – Vol. 25. – P. 2053-2065.
324. Li M., Pevny L., Lovell-Badge R., Smith A. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection // *Curr. Biol.* – 1998. – V. 8, №17. – P. 971-974.
325. Li Y.N., Sakamoto H., Kawate T., Cheng C.X., Li Y.C., Shimada O., Atsumi S. 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 // *Arch. Histol. Cytol.* – 2005. – Vol. 68, №.1. – P. 57-70.
326. Light A.R, Kavookjian A.M. Morphology and ultrastructure of physiologically identified substantia gelatinosa (lamina II) neurons with axons that terminate in deeper dorsal horn laminae (III–V) // *J. Comp. Neurology.* – 1988. – Vol. 267. – P. 172-189.
327. Light A.R., Willcockson H.H. Spinal laminae I–II neurons in rat recorded in vivo in whole cell, tight seal configuration: Properties and opioid responses // *J. Neurophysiol.* – 1999. – Vol. 82. – P. 3316-3326.
328. Ling S., Zhou J., Rudd J.A., Zhiying H.U., Fangl M. The Expression of neuronal Nitric Oxide Synthase in the brain of the mouse during embryogenesis // *Anat. Record.* – 2012. – V. 295. – P. 504-514.

329. Lima D., Coimbra A. The neuronal population of the marginal zone (Lamina I) of the rat spinal cord. A study based on reconstructions of serially sectioned cells // *Anat. Embryol.* – 1983. – Vol. 167. – P. 273-288.
330. Liu Z., Gao W., Wang Y., Zhang W., Liu H., Li Z. Neuregulin-1 β regulates outgrowth of neurites and migration of neurofilament 200 neurons from dorsal root ganglial explants in vitro // *Peptides.* – 2011. – Vol. 32, № 6. – P. 1244-1248.
331. Liu Q., Xie F., Alvarado-Diaz A., Smith M.A., Moreira P.I., Zhu X., Perry G. Neurofilamentopathy in neurodegenerative diseases // *Open Neurol. J.* – 2011. – Vol. 5. – P. 58-62.
332. Liu T.T., Bannatyne B.A., Maxwell D.J. Organization and neurochemical properties of intersegmental interneurons in the lumbar enlargement of the adult rat // *Neurosci.* – 2010. – Vol. 171. – P. 461-484.
333. Liu Y, Ma Q. Generation of somatic sensory neuron diversity and implications on sensory coding // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2011. – Vol. 21, № 1. – P. 52-60.
334. Llewellyn-Smith I.J., Martin C.L., Minson J.B. Glutamate and GABA content of calbindin-immunoreactive nerve terminals in the rat intermediolateral cell column // *Auton. Neurosci.* – 2002. – Vol. 98. – P. 7-11.
335. Lloyd A.C. The regulation of cell size // *Cell.* – 2013. – Vol. 154, № 6. – P. 1194-205.
336. Lopez-Picon F.R., Uusi-Oukari M., Holopainen I.E. Differential expression and localization of the phosphorylated and nonphosphorylated neurofilaments during the early postnatal development of the rat hippocampus // *Hippocampus.* – 2003. – Vol. 13. – P. 767-779.
337. Lorenzo L.E., Ramien M., St. Louis M., De Koninck Y., Ribeiro-da-Silva A. Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat // *J. Comp. Neurol.* – 2008. – Vol. 508, № 4. – P. 592-604.
338. Lossi L., Merighi A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS // *Prog. Neurobiol.* – 2003. – Vol. 69, № 5. – P. 287-312.

339. Lu D.C., Niu T., Alaynick W.A. Molecular and cellular development of spinal cord locomotor circuitry // *Front. Mol. Neurosci.* – 2015. – Vol. 8: 25.
340. Lu Y. Synaptic Wiring in the Deep Dorsal Horn. Focus on “Local Circuit Connections Between Hamster Laminae III and IV Dorsal Horn Neurons” // *J. Neurophysiol.* – 2008. – Vol. 99, N. 3. – P. 1051-1052.
341. Lu Y., Perl E.R. Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II) // *J. Neuroscience.* – 2005. – Vol. 25. – P. 3900-3907.
342. Lu Y., Perl E.R. Selective action of noradrenaline and serotonin on neurones of the spinal superficial dorsal horn in the rat // *J. Physiol.* – 2007. – Vol. 582. – P. 127-136.
343. Luger T.A. Neuromediators - a crucial component of the skin immune system // *J. Dermatol. Sci.* – 2002. – Vol. 30, № 2. – P. 87-93.
344. Ma C., LaMotte R.H. Enhanced excitability of dissociated primary sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion in the rat // *Pain.* – 2005. – Vol. 113, № 1-2. – P. 106-112.
345. Ma Q.P. Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats // *Neurosci.Lett.* – 2002. – Vol. 319. – P. 87-90.
346. Magoul R., Onteniente B., Geffard M., Calas A. Anatomical distribution and ultrastructural organization of the gabaergic system in the rat spinal cord. An immunocytochemical study using anti-GABA antibodies // *Neurosci.* – 1987. – Vol. 20. – P. 1001-1009.
347. Malínská J. Volume changes in the human spinal cord during ontogenetic development // *Folia Morphol (Praha).* – 1972. – Vol. 20. – P. 188-191.
348. Mann M.D. Clarke's column and the dorsal spinocerebellar tract: a review // *Brain Behav. Evol.* – 1973. – Vol. 7, № 1. – P. 34-83.
349. Mantyh P.W., Rogers S.D., Honore P., Allen B.J., Ghilardi J.R., Li J., Daughters R.S., Lappi D.A., Wiley R.G., Simone D.A. Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor // *Science.* – 1997. – Vol. 278. – P. 275-279.

350. Marder E., Rehm K.J. Development of central pattern generating circuits // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2005. – Vol. 15. – P. 86-93.
351. Marmigère F, Ernfors P. Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2007. – Vol. 8, № 2. – P. 114-127.
352. Marsala J., Marsala M., Lukacova N., T. Ishikawa, D. Cizkova Localization and distribution patterns of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase exhibiting axons in the white matter of the spinal cord of the rabbit // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2003. – Vol. 23. – P. 57-92.
353. Marsala J., Cizkova D., Kafka J., Lukacova N., Lukac M., Marsala M. Densitometric patterns of NADPH diaphorase staining in the spinal cord of dog // *Biologia.* – 2001. – Vol. 56, № 6. – P. 685-693.
354. Marsala J., Vanický I., Marsala M., Jalc P., Orendacova J., Tairac Y. NADPH diaphorase in the spinal cord of dogs // *Neurosci.* – 1998. – Vol. 85. – P. 847-862.
355. Marti E., Gibson S.J., Polak J.M., Facer P., Springall D.R., Van Aswegen G., Aitchison M., Koltzenburg M. Ontogeny of peptide- and amine-containing neurons in motor, sensory, and autonomic regions of rat and human spinal cord, dorsal root ganglia, and rat skin // *J. Comp. Neurol.* – 1987. – Vol. 266. – P. 332-359.
356. Martin L.J., Chen K., Lin Z. Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation // *J. Neurosci.* – 1997. – Vol. 76, № 3. – P. 659-663.
357. Masliukov P.M., Madalieva L.V., Moiseev K.Y., Bulibin A.V., Korzina M.B., Korobkin A.A., Smirnova V.P., Emanuilov A.I., Porseva V.V. Development of nNos-positive neurons in the rat sensory and sympathetic ganglia // *Neurosci.* – 2014. – Vol. 256. – P. 271-281.
358. Masliukov P.M., Moiseev K.Y., Korzina M.B., Porseva V.V. Development of nNOS-positive neurons in the rat sensory ganglia after capsaicin treatment // *Brain Res.* – 2015. – Vol. 1618. – P. 212-221.
359. Maxwell D.J., Belle M.D., Cheunsuang O., Stewart A., Morris R. Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn // *J. Physiol.* – 2007. – Vol. 584. – P. 521-533.

360. Maya S.K., Chungath J.J., Harshan K.R., Ashok N. Lamination of Spinal Cord Gray Matter in Goat Foetii // *Indian Journal of Veterinary Anatomy*. – 2014. Vol. 26, № 2. – P. 72-75.
361. McCarthy P.W., Lawson S.N. Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity // *Neurosci.* – 1990. – Vol. 34. – P. 623-632.
362. Medici T., Shortland P.J. Effects of peripheral nerve injury on parvalbumin expression in adult rat dorsal root ganglion neurons // *BMC Neurosci.* – 2015. –16: 93.
363. Megias M., Alvarez-Otero R., Pombal M.A. Calbindin and calretinin immunoreactivities identify different types of neurons in the adult lamprey spinal cord // *J. Comp. Neurol.* – 2003. – Vol. 455, № 1. – P. 72-85.
364. Mendonca D.M.F., Chimelli L., Martinez A.M.B. Quantitative evidence for neurofilament heavy subunit aggregation in motor neurons of spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2005. – Vol. 38(6). – P. 925-933.
365. Merkulyeva N., Veshchitskii A., Makarov F., Musienko P., Gerasimenko Y. Distribution of 28 kDa calbindin-immunopositive neurons in the cat spinal cord // *Front. Neuroanat.* – 2016. – Vol. 9: 166.
366. Michel T., Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 100. – P. 2146-2152.
367. Miesegaes G.R., Klisch T.J., Thaller C., Ahmad K.A., Atkinson R.C., Zoghbi H.Y. Identification and subclassification of new Atoh1 derived cell populations during mouse spinal cord development // *Dev. Biol.* – 2009. – Vol. 327, № 2. – P. 339-351.
368. Miles G.B., Hartley R., Todd A.J., Brownstone R.M. Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2007. – Vol. 104. – P. 2448-2453.
369. Miyata H., Jozaki A., Tokuriki M., Kawai Y. Metabolic properties of the sensory neurons in the rat dorsal root ganglion // *Arch. Ital. Biol.* – 1997. – Vol. 135, № 3. – P. 263-71.

370. Moiseev K.Y., Romanova I.V., Masliukov A.P., Masliukov P.M. Development of nNOS-positive preganglionic sympathetic neurons in the rat thoracic spinal cord // *Cell Tissue Res.* – 2019. – Vol. 375, № 2. – P. 345-357.
371. Molander C., Grant G. Laminar distribution and somatotopic organization of primary afferent fibers from hindlimb nerves in the dorsal horn. A study by transganglionic transport of horseradish peroxidase in the rat // *Neuroscience.* – 1986. – Vol. 19. – P. 297-312.
372. Molander C., Xu Q., Grant G. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord // *J. Comp. Neurol.* – 1984. – Vol. 230. – P. 133-141.
373. 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. – P. 375-385.
374. Molliver D.C., Snider W.D. Nerve growth factor receptor TrkA is down-regulated during postnatal development by a subset of dorsal root ganglion neurons // *J. Comp. Neurol.* – 1997. – Vol. 381. – P. 428–438.
375. Momose-Sato Y., Sato K. Large-scale synchronized activity in the embryonic brainstem and spinal cord // *Front. Cell Neurosci.* – 2013. – Vol. 5. – P. 7-36.
376. Moreno-González G., Zarain-Herzberg A. Papel de los receptores de glutamato durante la diferenciación neuronal // *Salud Mental.* – 2006. – Vol. 29, № 5. – P. 38-48.
377. Morona R., Lopez J.M., Gonzalez A. Calbindin-D28k and calretinin immunoreactivity in the spinal cord of the lizard *Gekko gecko*: Colocalization with choline acetyltransferase and nitric oxide synthase // *Brain Res. Bull.* – 2006. – Vol. 69, № 5. – P. 519-534.
378. Morona R., Lopez J.M., Dominguez L., 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. – Vol. 70, № 2. – P. 101-118.
379. Motavkin P.A., Dovbysh T.V. Cholinergic nervous apparatus of pia mater and brain blood vessels // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 1970. – Vol. 70, № 7. – P. 113-116.

380. Mountcastle V.B. The columnar organization of the neocortex // *Brain*. – 1997. – Vol. 120. – P. 701-722.
381. Muller T., Brohmann H., Pierani A., Heppenstall P. A., Lewin G. R., Jessell T.M., Birchmeier C. The homeodomain factor *lhx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord // *Neuron*. – 2002. – Vol. 34. – P. 551-562.
382. Mushahwar V.K., Gillard D.M., Gauthier M.J., Prochazka A. Intraspinal micro stimulation generates locomotor-like and feedback-controlled movements // *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*. – 2002. – Vol.10. – P.68-81.
383. Nagy J.I., Yamamoto T., Jordan L.M. Evidence for the cholinergic nature of C-terminals associated with subsurface cisterns in alpha-motoneurons of rat // *Synapse*. – 1993. – Vol. 15. – P. 17-32.
384. Nazimov A.I., Pavlov A.N. Application of wavelet analysis and artificial neural networks in solving the problem concerning shape recognition of noisy pulsed signals // *Journal of Communications Technology and Electronics*. – 2012. – Vol. 57. № 7. – P. 702-711.
385. Nazli M. Immunohistochemical distribution of neuropeptide Y and neuropeptide Y Y1 receptor in the rat lumbar spinal cord // *Acta Veterinaria (Beograd)*. – 2005. – Vol. 55, № 5-6. – P. 395-401.
386. Nazli M., Morris R. Evidence that the Neurokinin 1 Receptor is Expressed in spinal Neurons Which Do Not Synthesize Nitric Oxide in the Rat // *J. Vet. Anim. Sci*. – 2000. – Vol. 24. – P. 453-458.
387. Necker R. Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) and NADPH diaphorase in the spinal cord of the pigeon // *Anat. Embryol*. – 2004. – Vol. 208. – P. 169-181.
388. Necker R. Specializations in the lumbosacral vertebral canal and spinal cord of birds: evidence of a function as a sense organ which is involved in the control of walking // *J. Comp. Physiol*. – 2006. – Vol. 192. – P. 439-448.
389. Neher E. Details of Ca²⁺ dynamics matter // *Physiol*. – 2008. – Vol. 586:2031.

390. Nogradi A., Vrbova G. Anatomy and physiology of the spinal cord. In: Nogradi A. (Eds) // *Transplantation of Neural Tissue into the Spinal Cord*. – New York: Springer, 2006. – P. 1-23.
391. *Nomina Anatomica Veterinaria* // World Association of Veterinary Anatomists. International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. – Hanover (Germany), Ghent (Belgium), Columbia, MO (U.S.A.), Rio de Janeiro (Brazil): The Editorial Committee, 2017. – 160 p.
392. Nothias F., Tessler A., Murray M. Restoration of substance P and calcitonin gene-related peptide in dorsal root ganglia and dorsal horn after neonatal sciatic nerve lesion // *J. Comp. Neurol.* – 1993. – Vol. 334, № 3. – P. 370-384.
393. Nowak A., Mathieson H.R., Chapman R.J., Janzso G., Yanagawa Y., Obata K., Szabo G., King A.E. Kv3.1b and Kv3.3 channel subunit expression in murine spinal dorsal horn GABAergic interneurons // *J. Chem. Neuroanat.* – 2011. – Vol. 123. – P. 563-579.
394. O'Donovan M.J. The origin of spontaneous activity in developing networks of the vertebrate nervous system // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 1999. – Vol. 9. – P. 94-104.
395. Oda Y., Muroishi Y., Misawa H., Suzuki S. Comparative study of gene expression of cholinergic system-related molecules in the human spinal cord and term placenta // *Neurosci.* – 2004. – Vol. 128, № 1. – P. 39-49.
396. Oda Y., Nakanishi I. The distribution of cholinergic neurons in the human
397. Olave M.J., Maxwell D.J. Axon terminals possessing the alpha 2c-adrenergic receptor in the rat dorsal horn are predominantly excitatory // *Brain Res.* 2003. – Vol. 965, № 1-2. – P. 269-273.
398. Oshri A., Hadas Y., Vald L., Zisman S., Schejter A., Visel A., Klar A. Transcriptional control of axonal guidance and sorting in dorsal interneurons by the Lim-HD proteins Lhx9 and Lhx1 // *Neural Development.* – 2009. – Vol. 4. – P. 21.
399. Ozaki S., Snider W.D. Initial trajectories of sensory axons toward laminar targets in the developing mouse spinal cord // *J. Comp. Neurol.* – 1997. – Vol. 380. – P. 215-229.

400. Papka R.E., Hafemeister J., Puder B.A., Usip S., Storey-Workley M. Estrogen receptor- α and neural circuits to the spinal cord during pregnancy // *Journal of Neuroscience Research*. – 2002. – Vol. 70, № 6. – P. 808-816.
401. Park C.K., Lü N., Xu Z.Z., Liu T., Serhan C.N., Ji R.R. Resolving TRPV1- and TNF-alpha-mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1 // *Neurosci.* – 2011. – Vol. 31. – P. 5072-15085.
402. Pawlowski S.A., Gaillard S., Ghorayeb I., Ribeiro-da-Silva A., Schlichter R., Cordero-Erausquin M. A novel population of cholinergic neurons in the Macaque spinal dorsal horn of potential clinical relevance for pain therapy // *The Journal of Neuroscience*. – 2013. – Vol. 33. – P. 3727-3737.
403. Perrone Capano C., Pernas-Alonso R., di Porzio U. Neurofilament homeostasis and motoneurone degeneration // *Bioessays*. – 2001. – Vol. 23, № 1. – P. 24-33.
404. Perrot R., Eyer J. Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders // *Brain Res. Bull.* – 2009. – Vol. 80. – P. 282-295.
405. Perry M.J., Lawson S.N., Robertson J. Neurofilament immunoreactivity in populations of rat primary afferent neurons: a quantitative study of phosphorylated and non-phosphorylated subunits // *Neurocytol.* – 1991. – Vol. 20. – P. 746-758.
406. Peterson E.H. Motorpool Organization of Vertebrate Axial Muscles // *Amer. Zool.* – 1989. Vol. 29. – P. 123-137.
407. Petho G., Reeh P.W. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors // *Physiol. Rev.* – 2012. – Vol. 92. – P. 1699-1775.
408. Petras J.M., Cummings J.F. Autonomic neurons in the spinal cord of the rhesus monkey: A correlation of the findings of cytoarchitectonics and sympathectomy with fiber degeneration following dorsal rhizotomy // *J. Comp. Neurol.* – 1972. – Vol. 146, № 2. – P. 189-218.
409. Phelps P.E., Barber R.P., Vaughn J.E. Embryonic development of rat sympathetic preganglionic neurons: possible migratory substrates // *J. Comp. Neurol.* – 1993. – Vol. 330, № 1. – P. 1-14.

410. Phelps P.E., Barber R.P., Houser C.R., Crawford G.D., Salvaterra P.M., Vaughn J.E. Postnatal development of neurons containing choline acetyltransferase in rat spinal cord: an immunocytochemical study // *J. Comp.Neurol.* – 1984. – Vol. 229, № 3. – P. 347-361.
411. Philippe E., Droz B. Calbindin D-28k-immunoreactive neurons in chick dorsal root ganglion: ontogenesis and cytological characteristics of the immunoreactive sensory neurons // *Neurosci.* – 1988. – Vol. 26, № 1. – P. 215-224.
412. Pillai A., Mansouri A., Behringer R., Westphal H., Goulding M. Lhx1 and Lhx5 maintain the inhibitory-neurotransmitter status of interneurons in the dorsal spinal cord // *Development.* – 2007. – Vol. 134. – P. 357-366.
413. Pinto V., Szucs P., Derkach V.A., Safronov B.V. Monosynaptic convergence of C- and A δ -afferent fibres from different segmental dorsal roots on to single substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord // *J. Physiol.* – 2008. – Vol. 17. – P. 4165-4177.
414. Piper A.S., Docherty R. J. One-way cross-desensitization between P2X purinoceptors and vanilloid receptors in adult rat dorsal root ganglion neurons // *Physiol.* – 2000. – Vol. 15, № 523. – P. 685-696.
415. Polgar E. Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain // *Pain.* – 2003. – Vol. 104. – P. 229-239.
416. Polgár E., Al-Khater K.M., Shehab S., Watanabe M., Todd A.J. Large projection neurons in lamina I of the rat spinal cord that lack the neurokinin 1 receptor are densely innervated by VGLUT2-containing axons and possess GluR4-containing AMPA receptors // *J. Neurosci.* – 2008. – Vol. 28. – P. 13150-13160.
417. Polgar E., Durrieux C., Hughes D.I., Todd A.J. A Quantitative Study of Inhibitory Interneurons in Laminae I-III of the Mouse Spinal Dorsal Horn // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8, № 10.
418. Polgar E., Ghamdi A., Todd A.J. Two populations of neurokinin 1 receptor-expressing projection neurons in lamina I of the rat spinal cord that differ in AMPA

- receptor subunit composition and density of excitatory synaptic input // *Neuroscience*. – 2010. – Vol. 167. – P. 1192-1204.
419. Popken G.J., Farel P.B. Sensory neuron number in neonatal and adult rats estimated by means of stereologic and profile-based methods // *J. Comp Neurol*. – 1997. – Vol. 368, № 1. – P. 8-15.
420. Porseva V.V., Shilkin V.V. Morphometric and histochemical characteristics of the cluster organization of neurons in rat spinal nerve sensory ganglia and the cervicothoracic ganglion of the sympathetic trunk // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2012. – Vol. 42. – P. 603-606.
421. Porseva V.V., Shilkin V.V., Krasnov I.B., Masliukov P.M. Calbindin-D28k immunoreactivity in the mice thoracic spinal cord after space flight // *International Journal of Astrobiology*. – 2015. – Vol. 14, № 4. – P. 555–562.
422. Portiansky E.L., Nishida F., Barbeito C.G., Gimeno E.J., Goya R.G. Increased number of neurons in the cervical spinal cord of aged female rats // *PLoS One*. – 2011. – 6(7):e22537.
423. Poyner D.R., Sexton P.M., Marshall I., Smith D.M., Quirion R., Born W., Muff R., Fischer J.A., Foord S.M. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors // *Pharmacol. Rev.* – 2002. – Vol. 54, № 2. – P. 233-246.
424. Prasad T.A. differential, developmental pattern of spinal interneuron apoptosis during synaptogenesis: Insights from genetic analyses of the protocadherin- γ gene cluster // *Development*. – 2008. – Vol. 135. – P. 4153-4164.
425. Punnakkal P., von Schoultz C., Haenraets K., Wildner H., Zeilhofer H.U. Morphological, biophysical and synaptic properties of glutamatergic neurons of the mouse spinal dorsal horn // *Physiol.* – 2014. – Vol. 592, № 4. – P. 759-776.
426. Pytel A., Bruska M., Woźniak W. Differentiation of the nuclear groups in the posterior horn of the human embryonic spinal cord // *Folia Morphol.* – 2011. – Vol. 70, № 4. – P. 245-251.
427. Raissi M., Perdikaris P., Karniadakis G.E. Physics-informed neural networks: A deep learning framework for solving forward and inverse problems involving nonlinear

- partial differential equations // *J. Computational Physics*. – 2019. – Vol. 378. – P. 686-707.
428. Ralston H.J. The fine architecture of laminae IV, V and VI of the macaque spinal cord // *Comp. Neurol.* – 1982. – Vol. 212. – P. 125-134.
429. Randic M. Plasticity of excitatory synaptic transmission in the spinal cord dorsal horn // *Prog. Brain Res.* – 1996. – Vol. 113. – P. 463-506.
430. Rasouli B., Gholami S. Comparative histomorphometric study of the various segments of the spinal cord in the adult male and female mongoose (*Herpestes edwardsii*) // *Iranian J. Veterinary Medicine*. – 2018. – Vol. 12, № 2. – P. 175-180.
431. Ren K.A., Ruda M.A. Comparative study of the calcium-binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord // *Brain Res. Rev.* – 1994. – Vol. 19, № 2. – P. 163-179.
432. Renshaw B. Central effects of centripetal impulses in axons of spinal ventral roots // *J. Neurophysiology*. – 1946. – Vol. 9. – P. 191-204.
433. Rexed B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat // *J. Comp. Neurol.* – 1952. – Vol. 96. – P. 414-495.
434. Ribeiro-da-Silva A. Substantia Gelatinosa of the Spinal Cord. In: Paxinos G. (Eds) // *The Rat Nervous System*. – Elsevier Academic Press, San Diego, 2004. – P. 129-148.
435. Ribeiro-da-Silva A., Coimbra A. Two types of synaptic glomeruli and their distribution in laminae I–III of the rat spinal cord // *J. Comp. Neurol.* – 1982. – Vol. 209. – P. 176-186.
436. Ririe D.G., Liu B., Clayton B., Tong C., Eisenach J.C. Electrophysiologic characteristics of large neurons in dorsal root ganglia during development and after hind paw incision in the rat // *Anesthesiology*. – 2008. – Vol. 109, № 1. – P. 111-117.
437. Ristanovic D., Stefanović B.D., Milošević N.T., Grgurević M., Stanković J.B. Mathematical modeling and computational analysis of neuronal cell images: application to dendritic arborization of Golgi impregnated neurons in dorsal horns of the rat spinal cord // *Neurocomputing*. – 2006. – Vol. 69, № 4-6. – P. 403-423.

438. Ritz L.A., Greenspan J.D. Morphological Features of Lamina V Neurons Receiving Nociceptive Input in Cat Sacrocaudal Spinal Cord // *Comp. Neurology.* – 1985. – Vol. 238. – P. 440-452.
439. Roth K.A., D'Sa C. Apoptosis and brain development // *Ment. Retard Dev. Disabil. Res. Rev.* – 2001. – Vol. 7, № 4. – P. 261-266.
440. Ruan H.Z., Moules E., Burnstock G. Changes in P2X3 purinoceptors in sensory ganglia of the mouse during embryonic and postnatal development // *Histochem. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 122. – P. 539-551.
441. Ruscheweyh R., Wilder-Smith O., Drdla R., Liu X.G., Sandkühler J. Long-term potentiation in spinal nociceptive pathways as a novel target for pain therapy // *Molecular Pain March.* – 2011. – Vol. 7, № 1. – P. 1-37.
442. Russell F.A., King R., Smillie S.-J., Kodji X., Brain S.D. Calcitonin Gene-Related Peptide: Physiology and Pathophysiology // *Physiol. Rev.* – 2014. – Vol. 94, № 4. – P. 1099-1142.
443. Russo A.F. Calcitonin gene-related peptide (CGRP): a new target for migraine. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2015. – Vol. 55. – P. 533-552.
444. Russo D., Clavenzani P., Mazzoni M., Chiocchetti R., Di Guardo G., Lalatta-Costerbosa G. Immunohistochemical characterization of TH13-L2 spinal ganglia neurons in sheep // *Microsc. Res. Tech.* – 2010. – Vol. 73, № 2. – P. 128-139.
445. Rybarova S., Kluchova D., Schmidtova K., Lovasova K. Nitrergic structures in the spinal ganglia in rabbits // *Bratisl. Lek. Listy.* – 1999. – Vol. 100, № 10. – P. 537-540.
446. Rybarova S., Kluchova D., Kocisova M., Schmidtova K., Lovasova K. Detection of peptidergic and nitrergic structures in the spinal ganglia of rabbits // *Bratisl. Lek. Listy.* – 2000. – Vol. 101, № 5. – P. 280-287.
447. Saito S., Kidd G.J., Trapp B.D., Dawson T.M., Bredt D.S., Wilson D.A., Traystman R.J., Snyder S.H., Hanley D.F. Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase // *Neuroscience.* – 1994. – Vol. 59. – P. 447-456.

448. Sankaran Pk., Sivanandan Ramar, Salameh Bweir Al Dajah. Morphological study of nociceptive neurons in the trigeminal ganglion // *Int. J. Health Rehabil. Sci.* – 2016. – Vol. 5, № 1. – P. 1-10.
449. Satake H., Kawada T. Overview of the primary structure, tissue-distribution, and functions of tachykinins and their receptors // *Curr. Drug. Targets.* – 2006. – Vol. 7. – P. 963-974.
450. Scheibel M.E., Scheibel A.B. Terminal axonal patterns in cat spinal cord. II. The dorsal horn // *Brain Res.* - 1968. - Vol. 9. - P. 32–58.
451. Scheibel M.E., Scheibel A.B. A structural analysis of spinal interneurons and Renshaw cells horn. In: M.A. B. Brazier (Eds) // *The Interneuron.* - Los Angeles: University of California Press, 1969. - 159-208 p.
452. Scheibel M.E., Scheibel A.B. Organization of spinal motoneuron dendrites in bundles // *Exp. Neurol.* – 1970. – Vol. 28. – P. 106-117.
453. Schiaveto-de-Souza A., da-Silva C.A., Defino H.L., Del Bel E.A. Effect of melatonin on the functional recovery from experimental traumatic compression of the spinal cord // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2013. – Vol. 46, № 4. –P. 348-358.
454. Schoenen J., Faull R.L.M. Spinal cord: Cyto- and chemoarchitecture. In: Paxinos G., Mai J.K. (Eds) // *The human nervous system.* – Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004. – P. 190-232.
455. Schwaller B. The continuing disappearance of "pure" Ca²⁺ buffers // *Cell Mol. Life Sci.* – 2009. – Vol. 66. – P. 275-300.
456. Schwaller B. The use of transgenic mouse models to reveal the functions of Ca²⁺ buffer proteins in excitable cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1820. – P. 1294-1303.
457. Schwarz S., Spitzbarth I., Baumgärtner W., Lehmbecker A. Cryopreservation of canine primary dorsal root ganglion neurons and its impact upon susceptibility to paramyxovirus infection // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – 20(5): 1058.
458. Sengul G., Puchalski R.B., Watson C. Cytoarchitecture of the spinal cord of the postnatal (P4) mouse // *Anat Rec (Hoboken).* – 2012. – Vol. 295. – P. 837-845.

459. Sengul G., Watson C., Tanaka I., Paxinos G. Atlas of the spinal cord: Mouse, rat, rhesus, marmoset and human. - London: Academic Press. – 2013. – 360 p.
460. Serrando M., Casanovas A., Esquerda J.E. Occurrence of glutamate receptor subunit 1-containing aggresome-like structures during normal development of rat spinal cord interneurons // *J. Comp. Neurol.* – 2002. – Vol. 442. – P. 23-34.
461. Shadiack A.M., Sun Y., Zigmond R.E. Nerve growth factor antiserum induces axotomy-like changes in neuropeptide expression in intact sympathetic and sensory neurons // *Neurosci.* – 2001. – Vol. 21. – P. 363-371.
462. Sher Y., Cohen O., Zinger N., Harel R., Rubinsky B., Prut Yi. Spatiotemporal organization of neuronal activity in the cervical cord of behaving primates // *Front. Neurosci.* – 2010. – Vol. 4: 195.
463. Sherrington C.S. Flexion-reflex of the limb, crossed extension reflex, and reflex stepping and standing // *Physiol.* – 1910. – Vol. 40. – P. 28-121.
464. Shneider N.A., Mentis G.Z., Schustak J., O'Donovan M.J. Functionally Reduced Sensorimotor Connections Form with Normal Specificity Despite Abnormal Muscle Spindle Development: The Role of Spindle-Derived Neurotrophin 3 // *Journal of Neuroscience.* – 2009. – Vol. 29, № 15. – P. 4719-4735.
465. Schouenborg J. Modular organisation and spinal somatosensory imprinting // *Brain. Res. Rev.* – 2002. – Vol. 40. – P. 80–91.
466. Sendtner M., Pei G., Beck M., Schweizer U., Wiese S. Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors // *Cell Tissue Res.* – 2000. – V. 301. – P. 71-84.
467. Shaw G., Yang C., Ellis R. Anderson K., Parker M.J., Scheff S., Pike B., Anderson D.K., Howland D.R. Hyperphosphorylated neurofilaments NF-H is a serum biomarker of axonal injury // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 336. – P. 1268-1277.
468. Sidman R.L., Angevine J., Pierce E. Angevine J., Pierce E. Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord. – Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts. – 1971.
469. Skup M., Gajewska-Wozniak O., Grygielewicz P., Mankovskaya T., Czarkowska-Bauch J. Different effects of spinalization and locomotor training of spinal

- animals on cholinergic innervation of the soleus and tibialis anterior motoneurons // *Eur. J. Neuroscience*. – 2012. – Vol. 36. – P. 2679-2688.
470. Sławińska U., Miazga K., Jordan L.M. The role of serotonin in the control of locomotor movements and strategies for restoring locomotion after spinal cord injury // *Acta Neurobiol. Exp.* – 2014. – Vol. 74. – P. 172-187.
471. Snider W.D., McMahon S.B. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors // *Neuron*. – 1998. – Vol. 4. P. 629-632.
472. Spicarova D., Nerandzic V., Palecek J. Update on the role of spinal cord TRPV1 receptors in pain modulation // *J. Physiol. Res.* – 2014. – Vol. 63, № 1. – P. 225-236.
473. Spicarová D., Palecek J. The role of spinal cord vanilloid (TRPV1) receptors in pain modulation // *Physiol. Res.* – 2008. – Vol. 57. – Suppl 3: S69-77.
474. Spike R.C., Puskar Z., Andrew D., Todd A.J. A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord / R.C. Spike, Z. Puskar, D. Andrew, A. J. Todd // *Eur. J. Neuroscience*. – 2003. – Vol. 18. – P. 2433-2448.
475. Steiner T.J., Turner L.M. Cytoarchitecture of the rat spinal cord // *J. Physiol.* – 1972. – Vol. 222. – P. 123-125.
476. Stepien A.E., Tripodi M., Arber S. Monosynaptic rabies virus reveals premotor network organization and synaptic specificity of cholinergic partition cells / A.E. Stepien, M. Tripodi, S. Arber // *Neuron*. – 2010. – Vol. 68. – P. 456-472.
477. Stewart W., Maxwell D.J. Morphological evidence for selective modulation by serotonin of a subpopulation of dorsal horn cells which possess the neurokinin-1 receptor // *European Journal of Neuroscience*. – 2000. – Vol. 12. – P. 4583-4588.
478. Sugiura Y., Hosoya Y., Ito R., Kohno K. Ultrastructural features of functionally identified primary afferent neurons with C (unmyelinated) fibers of the guinea pig: classification of dorsal root ganglion cell type with reference to sensory modality // *J. Comp. Neurol.* – 1988. – Vol. 276, № 2. – P. 265-278.
479. Suzuki M., Watanabe Y., Oyama Y. Mizuno A., Kusano E., Hirao A., Ookawara S. Localization of mechanosensitive channel TRPV4 in mouse skin // *Neurosci. Lett.* 2003. Vol. 353, № 3. P. 189-192.

480. Szallasi A., Blumberg P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms // *Pharmacol. Rev.* – 1999. – Vol. 51. – P. 159-211.
481. Szallasi A. Vanilloid (capsaicin) receptors in health and disease // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2002. – Vol. 118. – P. 110-121.
482. Szolcsanyi J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology // *Neuropeptides.* – 2004. – Vol.38, № 6. – P. 377-384.
483. Szentagothai J. Neuronal and synaptic arrangement in the substantia gelatinosa, Rolandi // *Journal Of Comparative Neurology.* – 1964. – Vol. 122. – P. 219-239.
484. Tadros M.A., Harris B.M., Anderson W.B., Brichta A.M., Graham B.A., Callister R.J. Are all spinal segments equal: intrinsic membrane properties of superficial dorsal horn neurons in the developing and mature mouse spinal cord // *J. Physiol.* – 2012. – Vol. 590, № 10. – P. 2409-2425.
485. Tadros M.A., Lim R., Hughes D.I., Brichta A.M., Callister R.J. Electrical maturation of spinal neurons in the human fetus: comparison of ventral and dorsal horn// *J Neurophysiol.* – 2015. – V. 114, № 5. P. 2661–2671.
486. Tajti J., Uddman R., Moller S., Sundler F., Edvinsson L. Messenger molecules and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion // *J. Auton. Nerv. Syst.* – 1999. – Vol. 76. № 2-3. – P. 176-183.
487. Takazawa T., MacDermott A.B. Synaptic pathways and inhibitory gates in the spinal cord dorsal horn // *Acad. Sci.* – 2010. – Vol. 18. – P. 153-158.
488. Tammariello S. P., Quinn M. T., Estus S. NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. // *Neurosci.* – 2000. – Vol. 20. – P. 531–535.
489. Tandrup T. Unbiased estimates of number and size of rat dorsal root ganglion cells in studies of structure and cell survival // *J. Neurocytol.* – 2004. – Vol. 33, № 2. – P. 173-192.
490. Tang X., Neckel N.D., Schramm L.P. Locations and morphologies of sympathetically correlated neurons in the T10 spinal segment of the rat // *Brain Res.* – 2003. – Vol. 976. – P. 185-193.

491. Ten Donkelaar H.J., Broman J., Neumann P.E., Puellas L., Riva A., Tubbs R.S., Kachlik D. Towards a Terminologia Neuroanatomica // *Clinical Anatomy*. – 2017. – Vol. 20, № 2. – P. 145-155.
492. Terenghi G., Riveros-Moreno V., Hudson L.D., Ibrahim N.B., Polak J.M. Immunohistochemistry of nitric oxide synthase demonstrates immunoreactive neurons in spinal cord and dorsal root ganglia of man and rat // *J. Neurol. Sci.* – 1993. – Vol. 118, № 1. – P. 34–37
493. Thippeswamy T., McKay J.S., Quinn J., Morris R. Either nitric oxide or nerve growth factor is required for dorsal root ganglion neurons to survive during embryonic and neonatal development // *Dev. Brain Res.* – 2005. – Vol. 154. – P. 153-164.
494. Thomson L.M., Terman G.W., Zeng J., Lowe J., Chavkin C., Hermes S.M., Hegarty D.M., Aicher S.A. Decreased substance P and NK1 receptor immunoreactivity and function in the spinal cord dorsal horn of morphine-treated neonatal rats // *J. Pain*. – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 11-19.
495. Todd J. Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor // *Experimental Physiology*. – 2002. – Vol. 87, № 2. – P. 245-249.
496. Todd A.J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn // *Nature reviews*. – 2010. – Vol. 11. – P. 823-836.
497. Todd A.J. Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn // *Mol. Pain*. – 2017. – Vol. 13:1744806917693003.
498. Todd A.J., Lewis S.G. The morphology of Golgi-stained neurons in Lamina II of the rat spinal cord // *Anat.* – 1986. – Vol. 149. – P. 113-119.
499. Tonra J.R., Mendell L.M. Effects of postnatal anti-NGF on the development of CGRP-IR neurons in the dorsal root ganglion // *J. Comp. Neurol.* – 1998. – Vol. 392. – P. 489-498.
500. Torres-da-Silva K.R., Da Silva A.V., Barioni N.O., Tessarin G.W., De Oliveira J.A., Ervolino E., Horta-Junior J.A., Casatti C.A. Neurochemistry study of spinal cord in non-human primate (*Sapajus spp.*) // *Eur. J. Histochem.* – 2016. – Vol. 60:2623.

501. Tresch M.C., Bizzi E. Responses to spinal microstimulation in the chronically spinalized rat and their relationship to spinal systems activated by low threshold cutaneous stimulation // *Exp Brain Res.* – 1999. – Vol. 129. – P. 401-416.
502. Ueno T., Ohori Y., Ito J., Hoshikawa S., Yamamoto S., Nakamura K., Tanaka S., Akai M., Tobimatsu Y., Ogata T. Hyperphosphorylated neurofilaments NF-H as a biomarker of the efficacy of minocycline therapy for spinal cord injury // *Spinal cord.* – 2011. – Vol. 49. – P. 333-336.
503. Uta D. TRPA1-expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord // *Eur. J. Neurosci.* – 2010. – Vol. 31. – P. 1960-1973.
504. Valtschanoff J.G., Weinberg R.J., Rustioni A. NADPH diaphorase in the spinal cord of rats // *J. Comp. Neurol.* – 1992. – Vol. 321. – P. 209-222.
505. Vergnano A.M., Salio C., Merighi A. NK1 receptor activation leads to enhancement of inhibitory neurotransmission in spinal substantia gelatinosa neurons of mouse // *Pain.* – 2004. – Vol. 112, № 1-2. – P. 37-47.
506. Vesselkin N.P., Adanina V.O., Rio J.P., Reperant J. Ultrastructural study of glutamate- and GABA-immunoreactive terminals contacting the primary afferent fibers in frog spinal cord A double postembedding immunocytochemical study // *Brain Res.* – 2003. – Vol. 960. – P. 267-272.
507. Vincent S.R. Nitric oxide neurons and neurotransmission // *Prog. Neurobiol.* – 2010. – Vol. 90. – P. 246-255.
508. Vizzard M.A., Erdman S.L., de Groat W.C. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase (NOS) in visceral neurons after nerve injury // *Neurosci.* – 1995. – Vol. 15. – P. 4033-4045.
509. Vizzard M.A., Erdman S.L., Roppolo J.R., Forstermann U. Differential localization of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity and NADH-diaphorase activity in the cat spinal cord // *Cell. Tissue Res.* – 1994. – Vol. 278, № 2. – P. 299-309.
510. Wang H., Wu M., Zhan C., Ma E., Yang V., Yang X., Li Y. Neurofilament proteins in axonal regeneration and neurodegenerative diseases // *Neural. Regen. Res.* – 2012. – Vol. 7, № 8. – P. 620-626.

511. Wall P.D. The role of substantia gelatinosa as a gate control // Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis. – 1980. – Vol. 58. – P. 205-231.
512. Weber I., Veress G., Szűcs P., Antal M., Birinyi A. Neurotransmitter systems of commissural interneurons in the lumbar spinal cord of neonatal rats // Brain Res. – 2007. – Vol. 1178. – P. 65-72.
513. Wetts R., Phelps P.E., Vaughn J.E. Transient and continuous expression of NADPH diaphorase in different neuronal populations of developing rat spinal cord // Dev. Dyn. – 1995. – Vol. 202, № 3. – P. 215-228.
514. Wheaton B.J., Noor N.M., Dziegielewska K.M., Whish S., Saunders N.R. Arrested development of the dorsal column following neonatal spinal cord injury in the opossum, *Monodelphis domestica* // Cell Tissue Res. – 2015. – V. 359, № 3. – P. 699-713.
515. Wild J.M., Krützfeldt N.O., Altshuler D.L. Trigeminal and spinal dorsal horn (dis)continuity and avian evolution // Brain Behav Evol. – 2010. – Vol. 76, № 1. – P. 11-19.
516. Wiley R.G., Kline R.H., Vierck C.J.Jr. Anti-nociceptive effects of selectively destroying substance P receptor-expressing dorsal horn neurons using [Sar⁹,Met(O₂)¹¹]-substance P-saporin: behavioral and anatomical analyses // Neurosci. – 2007. – Vol. 146, № 3. – P.1333-1345.
517. Wilhelm J.C., Rich M.M., Wenner P. Compensatory changes in cellular excitability, not synaptic scaling, contribute to homeostatic recovery of embryonic network activity // PNAS. – 2009. – Vol. 106. – P. 6760-6765.
518. Woodbury C.J., Koerber H.R. Widespread projections from myelinated nociceptors throughout the substantia gelatinosa provide novel insights into neonatal hypersensitivity // J. Neurosci. – 2003. – Vol. 23, № 2. – P. 601-610.
519. Woolf C.J., Fitzgerald M. Somatotopic organization of cutaneous afferent terminals and dorsal horn neuronal receptive fields in the superficial and deep laminae of the rat // J. Comp. Neurol. – 1986. – Vol. 251. – P. 517-531.
520. Woźniak W., Węclewicz K. The formation of motor cell groups in the human embryonic spinal cord // Folia Morphol. – 1987. – Vol. 46. – P. 91-97.

521. Xu P., Van Slambrouck C., Berti-Mattera L., Hall A.K. Activin induces tactile allodynia and increases calcitonin gene-related peptide after peripheral inflammation // *Neurosci.* – 2005. – Vol. 25. – P. 9227-9235.
522. Yasaka T., Kato G., Furue H., Rashid H., Sonohata M., Tamae A., Murata Y., Masuko S., Yoshimura M. Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro // *J. Physiol.* – 2007. – Vol. 581. – P. 603-618.
523. Yoshida S., Senba E., Kubota Y., Hagihira S., Yoshiya I., Emson P.C., Tohyama M. Calcium-binding proteins calbindin and parvalbumin in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord // *J. Neurosci.* – 1990. – Vol. 37, № 3. – P. 839-848.
524. Yoshimura N., Erdman S.L., Snider M.W., de Groat W.C. Effects of spinal cord injury on neurofilament immunoreactivity and capsaicin sensitivity in rat dorsal root ganglion neurons innervating the urinary bladder // *Neuroscience.* – 1998. – Vol. 83(2). – P. 633-643.
525. Yoshimura N., Seki S., de Groat W.C. Nitric oxide modulates Ca(2+) channels in dorsal root ganglion neurons innervating rat urinary bladder // *J. Neurophysiol.* – 2001. – Vol. 86. – P. 304-311.
526. Youn D. Synaptic transmission and plasticity in the spinal cord substantia gelatinosa: the role of GluR2, GluR5 and GluR6 glutamate receptor subunits // *Retrospective Theses and Dissertations.* – 2002. – P. 555.
527. Yu X.H., Zhang E.T., Craig A.D., Shigemoto R., Ribeiro-da-Silva A., De Koninck Y. NK-1 receptor immunoreactivity in distinct morphological types of lamina I neurons of the primate spinal cord // *J. Neuroscience.* – 1999. – Vol. 19. – P. 3545-3555.
528. Yuan A., Rao M.V., Veeranna, Nixon R.A. Neurofilaments at a glance // *Cell Sci.* – 2012. – Vol. 125. – P. 3257–3263.
529. Zagoraïou L., Akay T., Martin J.F., Brownstone R.M., Jessell T.M., Miles G.B. A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity // *J. Neuron.* – 2009. – Vol. 64. – P. 645-662.

530. Zecevic N., Hu F., Jakovcevski I. Cortical interneurons in the developing human neocortex // *Dev. Neurobiol.* – 2011. – Vol. 71, № 1. – P. 18-33.
531. Zhang E.T., Craig A.D. Morphology and distribution of spinothalamic lamina I neurons in the monkey // *J. Neurosci.* – 1997. – Vol. 17. – P. 3274-3284.
532. Zhang J.H., Morita Y., Hironaka T., Emson P.C., Tohyama M.J Ontological study of calbindin-D28k-like and parvalbumin-like immunoreactivities in rat spinal cord and dorsal root ganglia // *J. Comp. Neurol.* – 1990. – Vol. 302, № 4. – P. 715-728.
533. Zhang Q., Dong X. Histochemical study of the pre- and postnatal development of acetylcholinesterase in the rat spinal cord // *Cell Research.* – 1993. – Vol. 3. – P. 173-185.
534. Zhang X., Giesler G. Response characteristics of spinothalamic tract neurons that project to the posterior thalamus in rats // *J. Neurophysiol.* – 2005. – Vol. 93. – P. 2552-2564.
535. Zhang X., Tong Y.G., Bao L., Hokfelt T. The neuropeptide Y Y1 receptor is a somatic receptor on dorsal root ganglion neurons and a postsynaptic receptor on somatostatin dorsal horn neurons // *Eur. J. Neurosci.* – 1999. – Vol. 11. – P. 2211-2225.
536. Zhou X.F., Cameron D., Rush R.A. Endogenous neurotrophin-3 supports the survival of a subpopulation of sensory neurons in neonatal rat // *Neurosci.* – 1998. – Vol. 86, № 4. – P. 1155-1164.
537. Zieglgänsberger W. Substance P and pain chronicity // *Cell Tissue Res.* – 2019. – Vol. 375, № 1. – P. 227-241.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АХЭ – ацетилхолинтрансфераза

ВПА – везикулярный переносчик ацетилхолина

ВПГ – везикулярный переносчик глутамата

ВС – вентральная серая спайка

ВЯ – вставочное ядро

ГАМК - γ -аминомасляная кислота

ДС – дорсальная серая спайка

ДЯ – дорсальное ядро

МАТ – Международная анатомическая терминология

МВАН – Международная ветеринарная анатомическая номенклатура

МК – область медиального края дорсального рога

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ПЛЯ – промежуточно-латеральное ядро

ПМЯ – промежуточно-медиальное ядро

ЦК – центральный канал

ЦНС – центральная нервная система

ХАТ – холинацетилтрансфераза

NAV – Ветеринарная анатомическая номенклатура

nNOS – нейрональная синтаза оксида азота

ТН – Гистологическая номенклатура

TNA – Нейроанатомическая терминология

TRPV1 – рецептор временного потенциала, ваниллоидный тип 1