

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СИСТЕМЫ ПАРВАЛЬБУМИН-ИММУНОПОЗИТИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В СПИННОМ МОЗГЕ НОВОРОЖДЁННЫХ КОШЕК

© 2024 г. А. А. Вещицкий, А. В. Беляев, Н. С. Меркульева*

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

**e-mail: merkulyevan@infran.ru*

Поступила в редакцию 26.02.2024 г.

После доработки 17.04.2024 г.

Принята к публикации 18.04.2024 г.

Проведено исследование особенностей экспрессии кальций-связывающего белка парвальбумина в пояснично-крестцовом отделе спинного мозга новорождённых и взрослых кошек. В отличие от взрослых животных, у новорожденных иммуномечен к парвальбумину выявлено главным образом в афферентных волокнах, расположенных в дорзальных рогах и медиальной части промежуточного серого вещества. Локализация этих волокон частично повторяет положение ядер Кларка, но не ограничена их классическими границами, охватывая всю протяжённость поясничного отдела и переходя в предполагаемое ядро Штиллинга, расположенное в крестцовом отделе. Таким образом, парвальбумин-иммунопозитивные проприоцептивные волокна у новорожденных, в отличие от взрослых, представляют собой единую систему. Полагаем, что с возрастом в связи с созреванием и разрастанием элементов поясничного утолщения, связанных, в первую очередь, с локомоторной функцией, происходит перестройка этой непрерывной системы волокон с выделением локальных элементов, таких как ядра Кларка и Штиллинга. Единственными спинальными нейронами, маркированными парвальбумином у новорожденных, являются премоторные интернейроны, расположенные вдоль криватуры пластины IX. Для этих клеток характерно полное или частичное отсутствие экспрессии нейронального белка NeuN, что свидетельствует об особенностях нейробиохимического статуса таких нейронов.

Ключевые слова: кальций-связывающий белок, парвальбумин, спинной мозг, спинно-мозжечковые тракты, ядро Кларка, ядро Штиллинга

DOI: 10.31857/S0044452924030082, EDN: YWXRTY

ВВЕДЕНИЕ

Проприоцепция — неосознанное чувство положения частей тела в пространстве, необходимое для координированной моторики [1]. Проприоцепцию связывают с работой таких рецепторов, как мышечные веретена, сухожильные органы Гольджи и суставные рецепторы [2]. Информации от этих рецепторов поступает в спинной мозг и оттуда напрямую, через пучки Голля и Бурдаха — в продолговатый мозг [3] или через серию переключений в мозжечок в составе дорзального и вентрального спинно-мозжечковых трактов [2, 4–6]. В каудальной части спинного мозга основными источниками спинно-мозжечковых трактов являются 3 области серого вещества: ядра Кларка, расположенные у хищных, грызунов и приматов на уровне нижне-грудных и верхне-поясничных сегментов [7–11]; ядро Штиллинга, расположенное у грызунов в крестцовых и копчиковых сегментах [12, 13], у приматов — со среднепоясничного по крестцовый отдел [14].

Для хищных существование этого ядра окончательно не определено [15, 16]. Третий тип — пограничные клетки, залегающие вдоль вентро-латеральной границы серого и белого вещества [6, 17, 18]. У хищных и грызунов пограничные клетки выявлены в нижне-грудных и поясничных сегментах [16, 19, 20], у приматов — в нижнепоясничном отделе [21, 22].

Селективным маркером проприоцептивных нейронов спинальных ганглиев принято считать кальций-связывающий белок парвальбумин [23–29]. В белом веществе спинного мозга мыши иммунопозитивные аксоны этих клеток заметны в составе восходящих пучков дорзального канатика [3]. В пределах серого вещества крысы и кошки иммуномечен к парвальбумину главным образом выявлено в пределах ядер Кларка [30–33]. При этом у кошки парвальбумин-иммунопозитивные нейроны также выявлены вне границ этого ядра: в более каудальных поясничных сегментах, где они распо-

жены разрозненно или формируют кластеры [33]. В целом эти области совпадают с локализацией нейронов, принадлежащих дорзальному спинно-мозжечковому тракту, расположенных у кошки за пределами исторических границ ядра Кларка [4, 5, 18, 34, 35]. Более того, скопление иммунопозитивного нейропиля и нейронов наблюдается и в крестцовых сегментах мыши и кошки [32, 36]; у мыши это соответствует положению ядра Штиллинга [36]. Мы предположили, что перечисленные парвальбумин-экспрессирующие элементы могут быть частью единой системы, организующей проекции к мозжечку в составе дорзального спинно-мозжечкового тракта. Поскольку развитие системы парвальбумин-позитивных нейронов спинного мозга происходит очень рано — главным образом во время пренатального и раннего постнатального периода, мы провели сравнительное картирование парвальбумин-иммунопозитивных элементов пояснично-крестцового отдела спинного мозга у новорождённых животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы образцы поясничного отдела спинного мозга от 3 нормально пигментированных взрослых кошек (весом 2.5–3.5 кг) и от 3 новорождённых котят в возрасте 0–4 дней. Образцы головного мозга всех животных также были использованы в иных исследованиях [37–39]. Картирование парвальбумин-иммунопозитивных элементов у взрослых было проведено ранее [32, 33], поэтому в данной работе мы не останавливаемся на нём подробно, но только в сравнительном аспекте.

Под глубоким наркозом (5% изофлюран) проводили транскардиальную перфузию. Для предупреждения свертываемости крови и образования тромбов за 10 мин до начала перфузии внутримышечно вводили гепарин (0.5 мл/кг). Промывку сосудов от форменных элементов крови осуществляли физиологическим раствором (0.9% натрия хлорид, 700–800 мл/кг, рН 7.4), фиксацию тканей — 4% раствором параформальдегида на 0.01 М фосфатном буфере (рН 7.4, 600–700 мл/кг). После перфузии спинной мозг извлекали из позвоночника и последовательно выдерживали в 20% и 30% растворах сахарозы до погружения. Деление спинного мозга на сегменты (L1-S3) проводили, ориентируясь на дорзальные корешки. На замораживающем микротоме (Reichert, Германия) изготавливали поперечные и горизонтальные срезы толщиной 50 мкм.

Выявление антигенов проводили с помощью непрямого иммуногистохимического метода на свободно плавающих срезах. В начале выполнения протокола и между всеми процедурами срезы промывали в 0.01 М фосфатно-солевом буфере (Биолот, Россия) 3 раза по 10 мин. Демаскировку антигенов проводили в 1% NaBH_4 в течение 15 мин.

Активность эндогенной пероксидазы блокировали путем получасовой инкубации в 0.3% H_2O_2 . Неспецифическую реакцию антител подавляли 1.5% нормальной сывороткой козы (NGS, Vector Labs, Великобритания) (90 минут). Затем, не промывая, срезы инкубировали в течение 72 ч при +4°C в растворе первичных поликлональных антител кролика к парвальбумину (Abcam, Великобритания, Cat.# ab11427, RRID: AB_298032, разведение 1:10000) и первичных моноклональных антител мыши к NeuN (Millipore, США, Cat.# MAB377, RRID: AB_2298772; разведение 1:5000) с добавлением, 0.05% тритона X-100, 1.5% NGS и консерванта 0.1% NaN_3 . Затем срезы инкубировали в растворах вторичных конъюгированных с флуорохромом антител коза анти-кролик (Alexa Fluor568, Abcam, Великобритания, Cat.# ab150113, RRID: AB_2576207, разведение 1:500) и коза анти-мышь (Alexa Fluor488, Abcam, Великобритания, Cat.# ab175471, RRID: AB_2576208, разведение 1:500). К раствору вторичных антител добавляли 1% NGS и 0.1% тритон X-100. Инкубацию проводили в термостате при температуре +37°C в течение 2 ч. После промывки в дистиллированной воде срезы монтировали на желатинизированные предметные стекла, высушивали и заключали в 80% глицерин.

Срезы с выявленным антигеном оцифровывали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Leica DMI6000 (Leica Microsystems, Германия) в Ресурсном центре молекулярных и клеточных технологий Санкт-Петербургского государственного университета (РЦ РМиКТ СПбГУ). Корректировку контраста и яркости проводили в свободном программном комплексе Fiji [40]. Для точного определения локализации нейронов в пределах пластин, использовали NeuN-иммуномечение. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Статистического анализа не проводили.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во всех анализируемых сегментах у новорождённых и взрослых животных парвальбумин-иммунопозитивная (ПВ+) метка выявлена как в соме нейронов, так и в нейропиле. Особенности распределения ПВ+ нейронов в сером веществе спинного мозга новорождённых и взрослых животных были получены при анализе поперечных срезов и представлены в таблице 1.

Вне зависимости от сегмента, у взрослых кошек областью максимальной локализации ПВ+ нейронов и ПВ+ нейропиля является медиальная часть пластин V–VII и область вокруг мотонейронных пулов. В верхнепоясничном отделе первая область соответствует локализации ядер Кларка. В нижнепоясничных сегментах также выявлены скопления

ПВ+ нейронов: в тех же областях серого вещества, что и в вышележащих сегментах. значительно число ПВ+ нейронов у животных обоих возрастов выявлено в области вокруг мотонейронных пулов. Редкие ПВ+ нейроны также выявляются в пластине II–III, но только у взрослых животных. Таким образом, единственными ПВ+ нейронами у новорождённых являются нейроны пластин VII–IX вокруг мотонейронных пулов (площадь сомы нейронов: 317 ± 106 мкм²).

Для новорожденных котят, в отличие от взрослых, характерно наличие пучков ПВ+ волокон в медиальной половине дорзальных рогов; эти волокна следуют от дорзального канатика белого вещества к локусам с высокой плотностью ПВ+ нейропилы в симметричных относительно центрального канала областях медиальной части пластин V–VI и пластины VII (рис. 1). Если у взрослых подобный нейропил выявлен главным образом на уровне сегментов L1–L5 и S1–S3, то у новорождённых он наблюдается в пределах каждого из исследованных сегментов, и снижение интенсивности иммуномечения выявлено только для самого каудального уровня: границы сегментов S3 и Co1 (рис. 1, S3). Таким образом, у новорождённых, в отличие от взрослых, слабо выражено иммуномечение сомы, но доминирует иммуномечение нейропиля. В целом у новорождённых ПВ+ элементы медиальной части пластин V–VII представляют собой единую систему, проходящую через весь пояснично-крестцовый отдел спинного мозга.

Для получения полной картины ростокаудального распределения ПВ+ волокон у новорожденных, исследовали горизонтальные срезы, проходящие через пояснично-крестцовый отдел спинного мозга. В этой плоскости очень хорошо видна регулярная упорядоченность во входах проприоцептивных волокон в спинной мозг в виде пучков (рис. 2).

Расстояние между отдельными пучками составило 101 ± 29 мкм.

В процессе идентификации нейронов спинного мозга мы провели двойное иммуномечение, используя общий нейрональный маркер – белок NeuN [41]. Как видно из рис. 3, ПВ+ нейроны в области вокруг мотонейронных пулов или являются иммуно-негативными к NeuN, или имеют очень слабое иммуномечение.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У взрослых и новорождённых животных наибольшая выраженность парвальбумин-иммунопозитивной реакции выявлена в медиальной части пластин V–VII. При этом у новорожденных кошек, в отличие от взрослых, она охватывает не только верхнепоясничные и нижнекрестцовые сегменты, что соответствует локализации ядер Кларка и Штиллинга [32, 33, 42, 43], но полностью все сегменты пояснично-крестцового отдела. При этом анализ локализации парвальбумин-иммунопозитивных нейронов у взрослых позволяет увидеть, что их скопления в той же области пластин V–VII соответствует областям, в которых у новорожденных выявлено интенсивное иммуномечение нейропиля. Полученные данные частично сходны с таковыми, что были получены на взрослых мышцах в [36]. При использовании комбинации ретроградного трейсирования и иммуномечения, показано, что спинальные нейроны, инициирующие проекции к мозжечку и иммунопозитивные к кальций-связывающим белкам, в большей степени, парвальбумину, расположены вдоль всего протяжения спинного мозга, а не только в ядрах Кларка и Штиллинга. Полагаем, что с возрастом, в результате значительно снижения иммунопозитивной метки нейропиля,

Таблица 1. Распределение парвальбумин-иммунопозитивных нейронов в сером веществе спинного мозга новорождённых и взрослых кошек

	Новорождённые	Взрослые
Пластина I	—	Мелкие биполярные нейроны
Пластины II–III	—	Мелкие веретеновидные нейроны
Пластины V–VII, медиальная область	—*	Мелкие овальные или мелкие и крупные мультиполярные нейроны
Пластины VII, вентромедиальная область	—	Мелкие и крупные мультиполярные нейроны
Пластины VII–IX	Мультиполярные нейроны	Мелкие и крупные мультиполярные нейроны

* невозможно определить из-за маскирующего мечения нейропиля

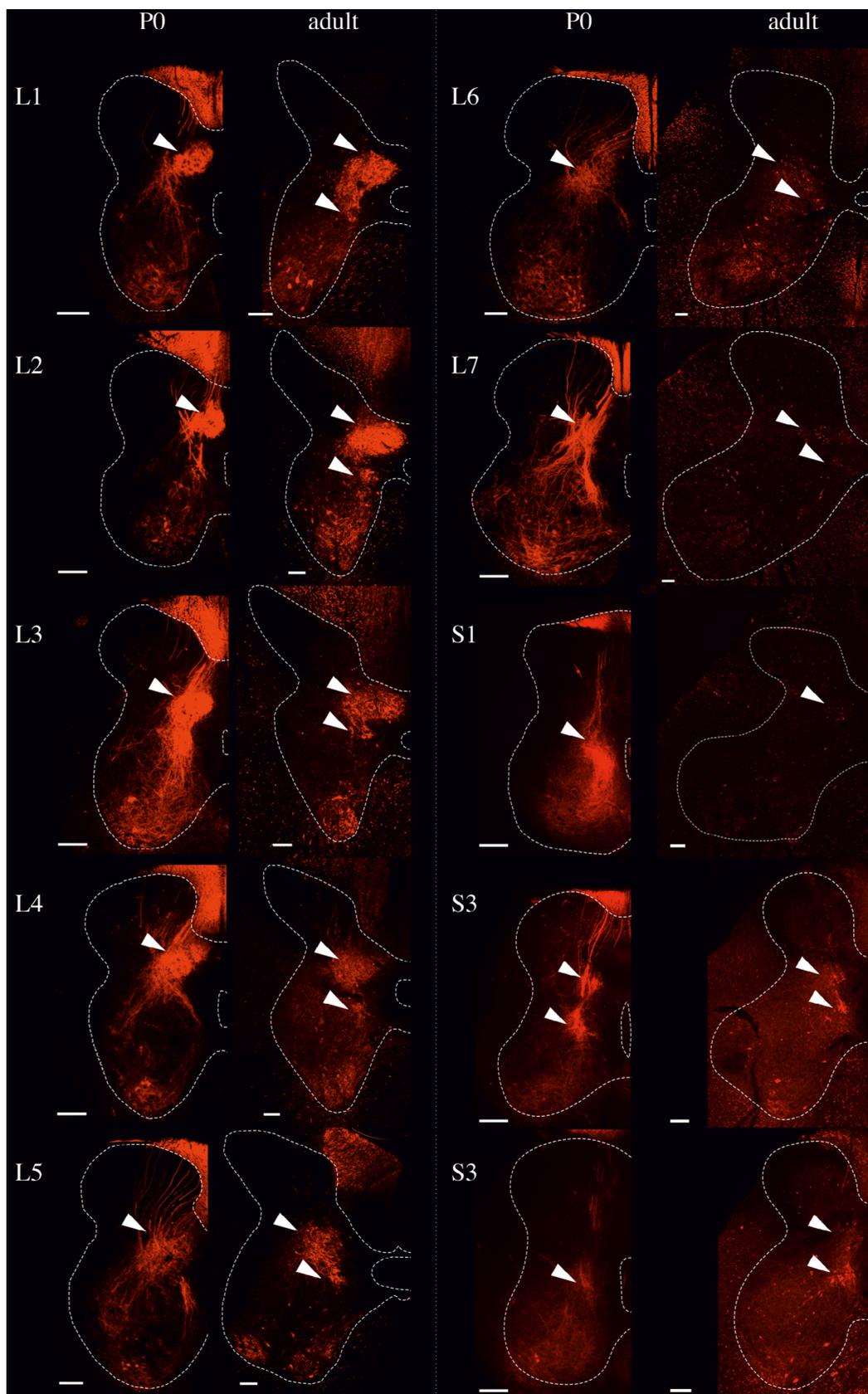


Рис. 1. Распределение парвальбумин-иммунопозитивных элементов на поперечных срезах спинного мозга новорожденных и взрослых кошек. L1–L7 — поясничные сегменты, S1–S3 — крестцовые сегменты. Белые контурные линии маркируют границы серого вещества.

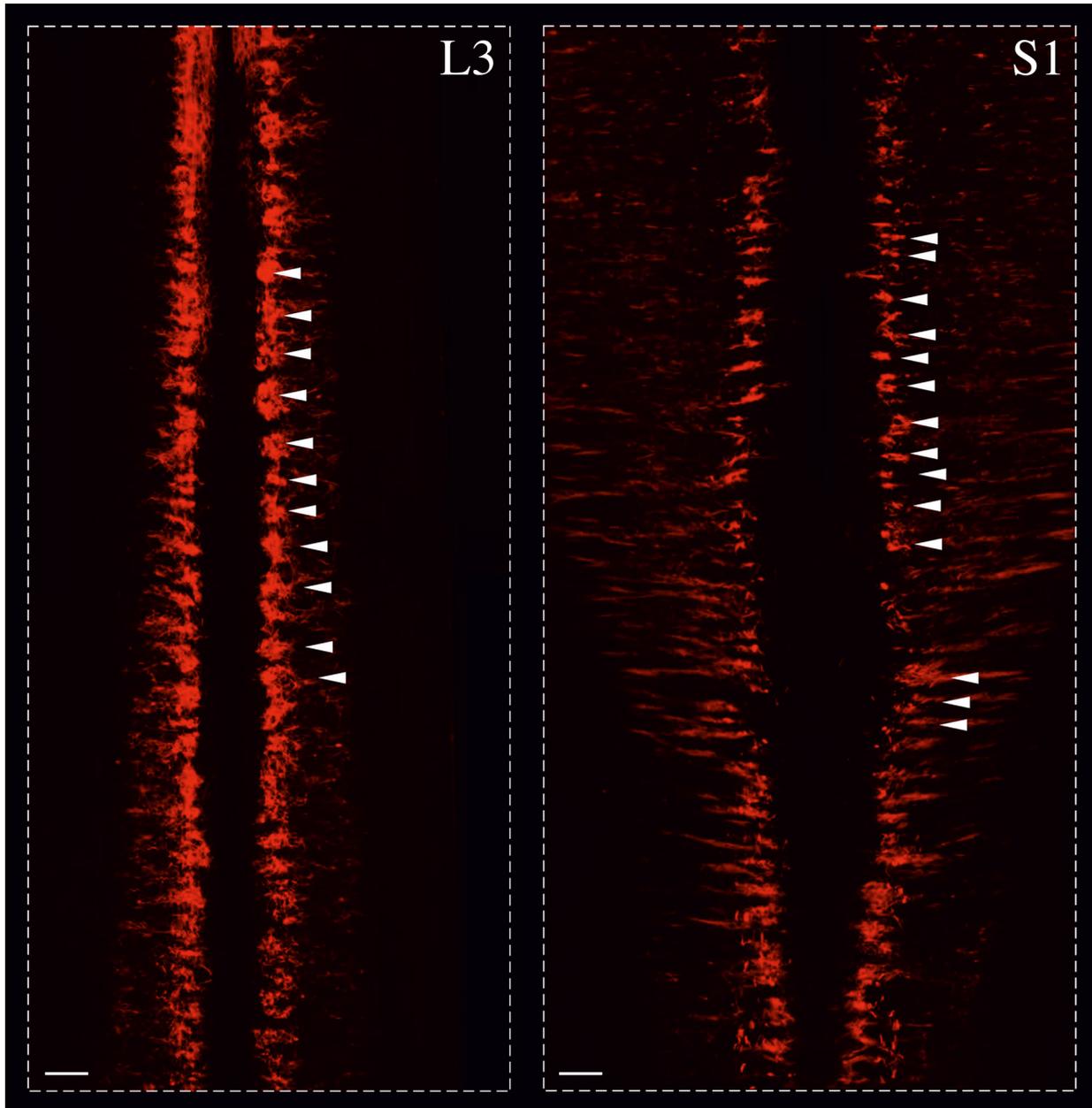


Рис. 2. Распределение парвальбумин-иммунопозитивных элементов на горизонтальных срезах спинного мозга новорожденных кошек. L3, S1 — поясничный и крестцовый сегменты. Белыми стрелками обозначены отдельные пучки волокон.

данная единая система парвальбумин-позитивных элементов начинает казаться не непрерывной.

Данные о развитии спинальных элементов, синтезирующих парвальбумин, практически отсутствуют; есть лишь единичные работы. Например, на иллюстрациях работы [44] видны парвальбумин-иммунопозитивные волокна, входящие в дорзальные рога и следующие к мотонейронам, а также парвальбумин-иммунопозитивные нейроны в пластинах VIII и III у котят в возрасте 3 недели.

Таким образом, интенсивно меченые волокна, которые мы видим у новорожденных, сохраняются как минимум до 3-недельного возраста. Сходное интенсивное иммуномечение афферентных волокон и сходный паттерн их входа в спинной мозг в виде пучков волокон (*fasciculi*) были ранее показаны у грызунов [30] и приматов [45].

Мы отметили значительно меньшее число парвальбумин-иммунопозитивных нейронов у новорожденных животных и их преимущественную

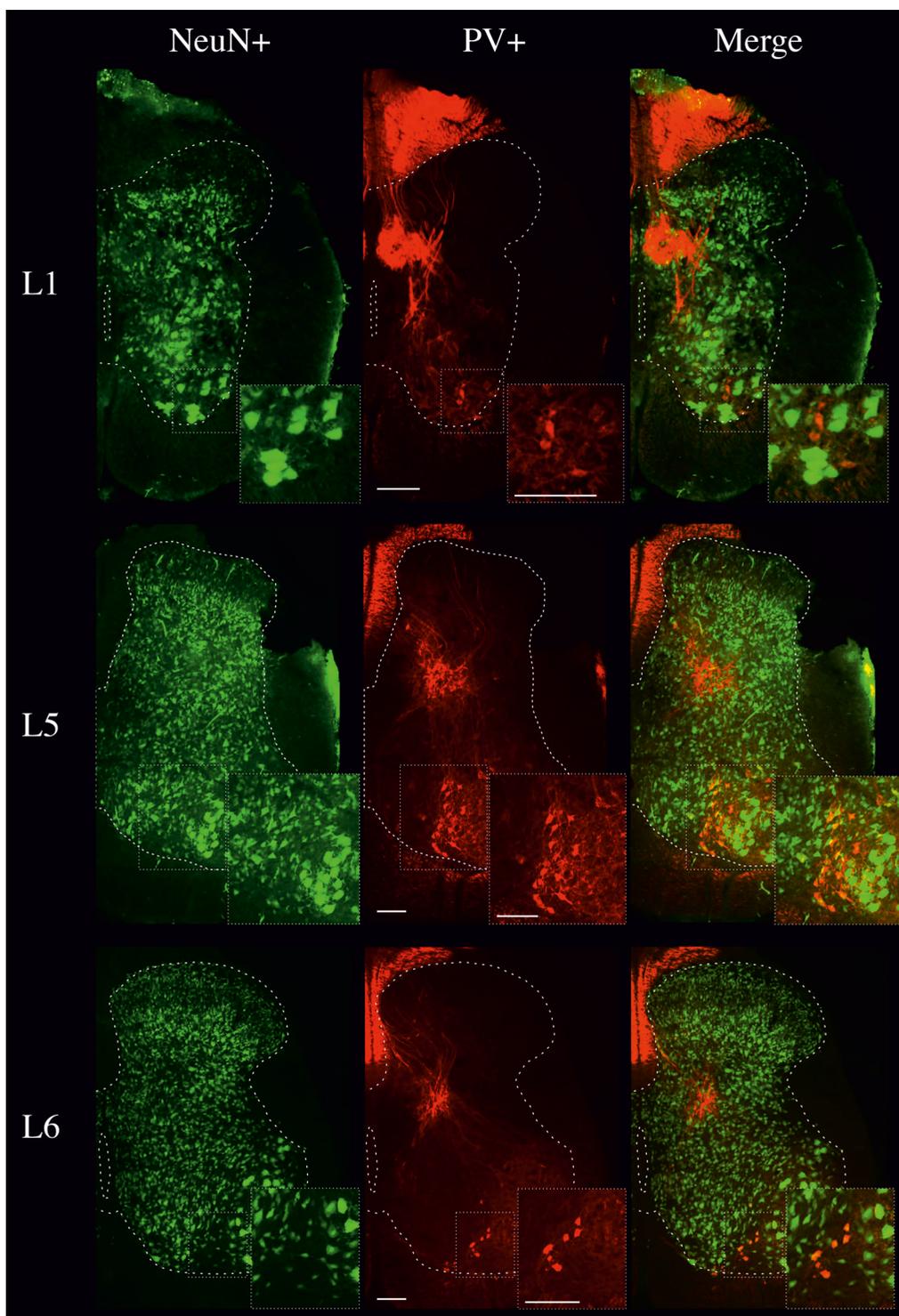


Рис. 3. Распределение парвальбумин- и NeuN-иммунопозитивных элементов на поперечных срезах спинного мозга новорожденных кошек. L1, L5, L6 – поясничные сегменты. Белые контурные линии маркируют границы серого вещества.

локализацию в области вокруг мотонейронных пулов. Данный факт связан с отсроченным развитием иммуномечения сомы нейронов по сравнению с иммуномечением волокон, что было показано

на модели грызунов [46, 47]. Согласно [46], первыми начинают синтезировать парвальбумин нейроны, расположенные вокруг мотонейронных пулов. Нейроны мелкого размера, экспрессирующие пар-

вальбумин, появляются в дорзальных рогах возрасте у крыс в возрасте P14–P21 [30, 31]. Вероятно, по этой причине мы не смогли визуализировать парвальбумин-иммунопозитивные нейроны в дорзальных рогах новорождённых кошек.

Отметим также, что в данной работе мы выявили слабое иммуномечение к общему нейрональному белку NeuN (или даже его отсутствие) у парвальбумин-иммунопозитивных нейронов вентральных рогов спинного мозга. Ранее NeuN-иммунонегативность была показана для ряда нейрональных популяций головного мозга (см. обзор [48]) и гамма-мотонейронов спинного мозга [49]. Поскольку гамма-мотонейроны иннервируют интрафузальные мышечные веретена [50], полагаем, что выявленная особенность нейрохимического статуса может быть характерной для ряда нейронов спинного мозга, вовлеченных в контроль проприоцепции. Отметим также, что ранее мы выявили NeuN-иммунонегативность нейронов среднемозгового ядра тройничного нерва, также являющегося элементом проприоцептивной системы [51].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, основными результатами данной работы является:

1. Выявление единой сети, тянущейся вдоль всего пояснично-крестцового отдела, парвальбумин-иммунопозитивных элементов спинного мозга. Наиболее явно эта сеть визуализируется у новорождённых животных, у которых локомоторные способности ещё незрелы и соответствующие нейронные сети спинного мозга, расположенные в поясничном утолщении, не развиты. Полученные данные позволяют предположить общность механизмов формирования проприоцептивной системы и связанных с ней спинальных сетей в широком ряду млекопитающих.

2. Иммунонегативность парвальбумин-позитивных нейронов вентральных рогов спинного мозга к общему нейрональному белку NeuN, что указывает на специфичность нейрохимии этих нейронных популяций.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Исследование проведено в соответствии с требованиями Директивы Совета Европейского Парламента по защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (2010/63EU). Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской де-

кларации и рекомендациям этического комитета Института физиологии РАН (протокол #30/01/2020).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1021062411653-4-3.1.8).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Планирование эксперимента: Н.С.М.; подготовка гистологического материала: А.А.В., А.Б.; сбор и обработка данных: Н.С.М., А.А.В.; написание и редактирование манускрипта: Н.С.М., А.А.В.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sherrington CS, Laslett EE* (1903) Observations on some spinal reflexes and the interconnection of spinal segments. *J Physiol* 29:58–96. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1903.sp000946>
2. *Bosco G, Poppele RE* (2001) Proprioception from a spinocerebellar perspective. *Physiol Rev* 81:539–568. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.539>
3. *Niu J, Ding L, Li JJ, Kim H, Liu J, Li H, Moberly A, Badea TC, Duncan ID, Son Y-J, Scherer SS, Luo W* (2013) Modality-based organization of ascending somatosensory axons in the direct dorsal column pathway. *J Neurosci* 33:17691–17709. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3429-13.2013>
4. *Matsushita M, Yaginuma H* (1989) Spinocerebellar projections from spinal border cells in the cat as studied by anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 288:19–38. <https://doi.org/10.1002/cne.902880103>
5. *Stecina K, Fedirchuk B, Hultborn H* (2013) Information to cerebellum on spinal motor networks mediated by the dorsal spinocerebellar tract. *J Physiol* 591:5433–5443. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.249110>
6. *Shrestha SS, Bannatyne BA, Jankowska E, Hammar I, Nilsson E, Maxwell DJ* (2012) Excitatory inputs to four types of spinocerebellar tract neurons in the cat and the rat thoraco-lumbar spinal cord. *J Physiol* 590:1737–1755. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.226852>
7. *Clarke JAL* (1997) Further researches on the grey substance of the spinal cord. *Philos Trans R Soc Lond* 149:437–467. <https://doi.org/10.1098/rstl.1859.0022>
8. *Hogg ID* (1944) The development of the nucleus dorsalis (Clarke's column). *J Comp Neurol* 81:69–95. <https://doi.org/10.1002/cne.900810105>
9. *Matsushita M, Hosoya Y* (1979) Cells of origin of the spinocerebellar tract in the rat, studied with the method of retrograde transport of horseradish peroxidase. *Brain Res* 173:185–200. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90620-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90620-6)

10. *Molander C, Xu Q, Grant G* (1984) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J Comp Neurol* 230:133–141. [https://doi.org/ 10.1002/cne.902300112](https://doi.org/10.1002/cne.902300112)
11. *Akopian A, Runyan SA, Phelps PE* (2003) Expression of L1 decreases during postnatal development of rat spinal cord. *J Comp Neurol* 467:375–388. [https://doi.org/ 10.1002/cne.10956](https://doi.org/10.1002/cne.10956)
12. *Edgley SA, Grant GM* (1991) Inputs to spinocerebellar tract neurones located in Stilling's nucleus in the sacral segments of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 305:130–138. [https://doi.org/ 10.1002/cne.903050112](https://doi.org/10.1002/cne.903050112)
13. *Sengul G, Watson C, Tanaka I, Paxinos G* (2012) Atlas of the spinal cord: mouse, rat, rhesus, marmoset, and human. Elsevier Science
14. *Mott F* (1888) Microscopical examination of Clarke's column in man, the monkey, and the dog. *J Anat Physiol* 22:479–495
15. *Snyder RL, Faull RL, Mehler WR* (1978) A comparative study of the neurons of origin of the spinocerebellar afferents in the rat, cat and squirrel monkey based on the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 181:833–852. [https://doi.org/ 10.1002/cne.901810409](https://doi.org/10.1002/cne.901810409)
16. *Matsushita M, Hosoya Y, Ikeda M* (1979) Anatomical organization of the spinocerebellar system in the cat, as studied by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 184:81–106. [https://doi.org/ 10.1002/cne.901840106](https://doi.org/10.1002/cne.901840106)
17. *Ha H, Liu CN* (1968) Cell origin of the ventral spinocerebellar tract. *J Comp Neurol* 133:185–206. [https://doi.org/ 10.1002/cne.901330204](https://doi.org/10.1002/cne.901330204)
18. *Xu Q, Grant G* (1988) Collateral projections of neurons from the lower part of the spinal cord to anterior and posterior cerebellar termination areas. A retrograde fluorescent double labeling study in the cat. *Exp Brain Res* 72:562–576. [https://doi.org/ 10.1007/BF00250601](https://doi.org/10.1007/BF00250601)
19. *Petrus JM, Cummings JF* (1977) The origin of spinocerebellar pathways. II. The nucleus centrobasis of the cervical enlargement and the nucleus dorsalis of the thoracolumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 173:693–716. [https://doi.org/ 10.1002/cne.901730405](https://doi.org/10.1002/cne.901730405)
20. *Zhang Y, Luo Y, Sasamura K, Sugihara I* (2021) Single axonal morphology reveals high heterogeneity in spinocerebellar axons originating from the lumbar spinal cord in the mouse. *J Comp Neurol* 529:3893–3921. [https://doi.org/ 10.1002/cne.25223](https://doi.org/10.1002/cne.25223)
21. *Cooper S, Sherrington CS* (1940) Gower's tract and spinal border cells. *Brain* 63:123–134. [https://doi.org/ 10.1093/brain/63.2.123](https://doi.org/10.1093/brain/63.2.123)
22. *Sprague JM* (1953) Spinal border cells and their role in postural mechanism (Schiff-Sherrington phenomenon). *J Neurophysiol* 16:464–474. [https://doi.org/ 10.1152/jn.1953.16.5.464](https://doi.org/10.1152/jn.1953.16.5.464)
23. *Celio MR* (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375–475. [https://doi.org/ 10.1016/0306-4522\(90\)90091-h](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90091-h)
24. *Ren K, Ruda MA* (1994) A comparative study of the calcium-binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord. *Brain Res Rev* 19:163–179. [https://doi.org/ 10.1016/0165-0173\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)90010-8)
25. *Clowry GJ, Arnott GA, Clement-Jones M, Fallah Z, Gould S, Wright C* (2000) Changing pattern of expression of parvalbumin immunoreactivity during human fetal spinal cord development. *J Comp Neurol* 423:727–735
26. *Hantman AW, Jessell TM* (2010) Clarke's column neurons as the focus of a corticospinal collateral circuit. *Nat Neurosci* 13:1233–1239. [https://doi.org/ 10.1038/nn.2637](https://doi.org/10.1038/nn.2637)
27. *John A, Brylka H, Wiegrefe C, Simon R, Liu P, Jüttner R, Crenshaw EB, Luyten FP, Jenkins NA, Copeland NG, Birchmeier C, Britsch S* (2012) Bcl11a is required for neuronal morphogenesis and sensory circuit formation in dorsal spinal cord development. *Dev Camb Engl* 139:1831–1841. [https://doi.org/ 10.1242/dev.072850](https://doi.org/10.1242/dev.072850)
28. *Dallman MA, Ladle DR* (2013) Quantitative analysis of locomotor defects in neonatal mice lacking proprioceptive feedback. *Physiol Behav* 120:97–105. [https://doi.org/ 10.1016/j.physbeh.2013.07.005](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.07.005)
29. *Ni Y, Nawabi H, Liu X, Yang L, Miyamichi K, Tedeschi A, Xu B, Wall NR, Callaway EM, He Z* (2014) Characterization of long descending premotor propriospinal neurons in the spinal cord. *J Neurosci* 34:9404–9417. [https://doi.org/ 10.1523/JNEUROSCI.1771-14.2014](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1771-14.2014)
30. *Zhang JH, Morita Y, Hironaka T, Emson PC, Tohyama M* (1990) Ontological study of calbindin-D28k-like and parvalbumin-like immunoreactivities in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 302:715–728. [https://doi.org/ 10.1002/cne.903020404](https://doi.org/10.1002/cne.903020404)
31. *Clowry GJ, Fallah Z, Arnott G* (1997) Developmental expression of parvalbumin by rat lower cervical spinal cord neurones and the effect of early lesions to the motor cortex. *Dev Brain Res* 102:197–208. [https://doi.org/ 10.1016/s0165-3806\(97\)00098-9](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(97)00098-9)
32. *Veshchitskii A, Shkorbatova P, Merkulyeva N* (2022) Neurochemical atlas of the cat spinal cord. *Front Neuroanat* 16:1034395. [https://doi.org/ 10.3389/fnana.2022.1034395](https://doi.org/10.3389/fnana.2022.1034395)
33. *Veshchitskii A, Musienko P, Merkulyeva N* (2023) Distribution of parvalbumin-expressing neuronal populations in the cat cervical and lumbar spinal cord gray matter. *J Evol Biochem Physiol* 59(4): 1100–1111.
34. *Aoyama M, Hongo T, Kudo N* (1988) Sensory input to cells of origin of uncrossed spinocerebellar tract located below Clarke's column in the cat. *J Physiol* 398:233–257. [https://doi.org/ 10.1113/jphysiol.1988.sp017040](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017040)
35. *Matsushita M* (1988) Spinocerebellar projections from the lowest lumbar and sacral-caudal segments in the cat, as studied by anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 274:239–254. [https://doi.org/ 10.1002/cne.902740208](https://doi.org/10.1002/cne.902740208)
36. *Fu Y, Sengul G, Paxinos G, Watson C* (2012) The spinal pre-cerebellar nuclei: calcium binding proteins and gene expression profile in the mouse. *Neurosci Lett* 518:161–166. [https://doi.org/ 10.1016/j.neulet.2012.05.002](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.05.002)
37. *Merkulyeva N, Mikhalkin A, Zykin P* (2018) Early postnatal development of the lamination in the lateral geniculate nucleus A-layers in cats. *Cell Mol Neurobiol* 38:1137–1143. [https://doi.org/ 10.1007/s10571-018-0585-6](https://doi.org/10.1007/s10571-018-0585-6)

38. *Mikhalkin A, Nikitina N, Merkulyeva N* (2021) Heterochrony of postnatal accumulation of nonphosphorylated heavy-chain neurofilament by neurons of the cat dorsal lateral geniculate nucleus. *J Comp Neurol* 529:1430–1441. <https://doi.org/10.1002/cne.25028>
39. *Merkulyeva N, Mikhalkin A* (2024) Transient expression of heavy-chain neurofilaments in the perigeniculate nucleus of cats. *Brain Struct Funct.* <https://doi.org/10.1007/s00429-023-02752-6>
40. *Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
41. *Mullen RJ, Buck CR, Smith AM* (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Dev Camb Engl* 116:201–211. <https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201>
42. *Rexed B* (1954) A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 100:297–379. <https://doi.org/10.1002/cne.901000205>
43. *Réthelyi M, Szentágothai J* (1973) Distribution and connections of afferent fibres in the spinal cord. In: Iggo A (ed) *Somatosensory System*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 207–252
44. *Chakrabarty S, Shulman B, Martin JH* (2009) Activity-dependent codevelopment of the corticospinal system and target interneurons in the cervical spinal cord. *J Neurosci* 29:8816–8827. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0735-09.2009>
45. *Knyihár-Csillik E, Rakic P, Csillik B* (1999) Illusive transience of parvalbumin expression during embryonic development of the primate spinal cord. *Int J Dev Neurosci* 17:79–97. [https://doi.org/10.1016/s0736-5748\(98\)00090-2](https://doi.org/10.1016/s0736-5748(98)00090-2)
46. *Siembab VC, Smith CA, Zagoraiou L, Berrocal MC, Mentis GZ, Alvarez FJ* (2010) Target selection of proprioceptive and motor axon synapses on neonatal V1-derived Ia inhibitory interneurons and Renshaw cells. *J Comp Neurol* 518:4675–4701. <https://doi.org/10.1002/cne.22441>
47. *Floyd TL, Dai Y, Ladle DR* (2018) Characterization of calbindin D28k expressing interneurons in the ventral horn of the mouse spinal cord. *Dev Dyn* 247:185–193. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24601>
48. *Alekseeva OS, Gusel'nikova VV, Beznin GV, Korzhhevskii DE* (2015) Prospects for the application of the NeuN nuclear protein as a marker of the functional state of nerve cells in vertebrates. *J Evol Biochem Physiol* 51(5): 357–369.
49. *Shneider NA, Brown MN, Smith CA, Pickel J, Alvarez FJ* (2009) Gamma motor neurons express distinct genetic markers at birth and require muscle spindle-derived GDNF for postnatal survival. *Neural Develop* 4:42. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-4-42>
50. *Taylor A, Ellaway PH, Durbaba R* (1999) Why are there three types of intrafusal muscle fibers? *Prog Brain Res* 123:121–131. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)62849-6](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)62849-6)
51. *Merkulyeva N, Mikhalkin A, Nikitina N* (2020) Characteristics of the neurochemical state of neurons in the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in cats. *Neurosci Behav Physiol* 50(4): 511–515.

A COMPARATIVE DISTRIBUTION OF PARVALBUMIN-IMMUNOPOSITIVE NEURAL ELEMENTS IN THE SPINAL CORD OF NEWBORN AND ADULT CATS

A. A. Veshchitskii, A. V. Belyaev and N. S. Merkulyeva#

Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

e-mail: merkulyevan@infran.ru

We analyzed characteristic features of the parvalbumin-immunostaining within the lumbosacral spinal cord of newborn kittens. In contrast to the adults, parvalbumin-immunostaining was mainly revealed for the sensory fibers located within the dorsal horns and in the medial part of the intermediate gray matter. The location of these fibers partially resembles the location of Clarke's nuclei, but lasted throughout the total length of the lumbar spinal cord and merged with the presumptive Stilling's nuclei in the sacral region. Therefore, in newborns, in contrast to adults, the parvalbumin-immunostaining proprioceptive fibers seem like a single unit. We propose that with maturation, this system is restructured because of the spread of the neuronal and neuropil elements of the lumbar enlargement responsible for the locomotor control. As a result, two local nuclear complexes: Clarke's and Stilling's are retained. A single population of parvalbumin-immunostaining neurons in newborns are premotor interneurons located around the lamina IX. These neurons are characterized by the low or absent NeuN-immunostaining. We believe that this neurochemical feature may be inherent for these cells.

Keywords: calcium-binding proteins, parvalbumin, spinal cord, spino-cerebellar tracts, Clarke's nucleus, Stilling nucleus