

© Коллектив авторов, 2016
УДК 611.822:633.8

*Н.С.Меркульева^{1,3}, А.А.Вещицкий¹, П.Ю.Шкорбатова¹, Б.С.Шенкман⁵,
П.Е.Мусиенко^{2,3,4}, Ф.Н.Макаров¹*

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДОРСАЛЬНЫХ ЯДЕР КЛАРКА В РОСТРАЛЬНЫХ СЕГМЕНТАХ ПОЯСНИЧНОГО ОТДЕЛА СПИННОГО МОЗГА КОШКИ

¹ Лаборатория нейроморфологии (зав. — проф. Ф.Н.Макаров); ² лаборатория физиологии движения (зав. — проф. Ю.П.Герасименко), ФГБУН Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург; ³ лаборатория нейропротезов (зав. — проф. П.Е.Мусиенко), Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет; ⁴ лаборатория нейрофизиологии и экспериментальной нейро-реабилитации (зав. — проф. П.Е.Мусиенко), Клиника детской хирургии и ортопедии, отделение внелёгочного туберкулёза, Научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург; ⁵ лаборатория миологии (зав. — проф. Б.С.Шенкман), ФГБУН Институт медико-биологических проблем, Москва

Исследование морфометрических особенностей и распределение ядер Кларка в сером веществе спинного мозга кошки исследовали с использованием методов гистохимического выявления ацетилхолинэстеразы, иммуногистохимического маркера нефосфорилированных доменов тяжёлых цепей нейрофиламентов (SMI-32) и методики Клювера—Барреры для выявления миелиновых волокон. В результате работы получены усредненные по данным у 5 кошек метрические карты сегментов L_I–L_{IV} спинного мозга с нанесёнными на них пространственными координатами границ ядер Кларка. Проведенные исследования обеспечивают необходимую информацию для более точного стереотаксического доступа к ядрам Кларка при его изучении в дальнейших фундаментальных и прикладных работах.

Ключевые слова: спинной мозг, поясничные сегменты, ядра Кларка, кошка

Дорсальные ядра Кларка (nucl.dorsalis) — симметричные относительно центрального канала образования, расположенные на уровне нижних грудных и верхних поясничных сегментов; являются важным элементом дорсального спинно-мозжечкового тракта [4, 11, 13, 4]. В ядра Кларка поступают сенсорные афферентные волокна Ia и II типа от мышечных веретён и Ib типа — от сухожилия, кожные афферентные волокна [10–12]. Эти ядра обеспечивают интеграцию сенсорного и нисходящего кортико-спинального путей [5, 9].

Ядро Кларка было описано более 150 лет назад [7], почти через 100 лет В.Рехед [14] создал атлас спинного мозга кошки, в котором указал положение этого ядра, и до сих пор для стереотаксического доступа к ядру Кларка используется именно этот атлас. Не снижающийся интерес к спинно-мозжечковым взаимодействиям при контроле локомоции и поддержании позы [9, 10], а также использование ядер Кларка в качестве модели для изучения ретроградной дегенерации при поражении спинного мозга [17, 18] дикту-

ют необходимость уточнения морфометрических характеристик этих ядер, что и стало целью данной работы.

Материал и методы. Исследование проведено в соответствии с требованиями Директивы Совета Европейского Парламента по защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (2010/63EU) и с одобрения комиссии по этике Института физиологии им. И.П.Павлова РАН. В работе использованы образцы спинного мозга 6 взрослых кошек обоего пола. Под глубоким общим наркозом (изофлуран 5% в смеси с кислородом) животные были транкардиально перфузированы последовательно 0,9% раствором натрия хлорида и 4% параформальдегидом на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4). Затем спинной мозг извлекали из позвоночного канала и разделяли на сегменты на основании локализации зон входа дорсальных корешков (части сегментов, содержащие корешки, являются их корешковыми зонами). Бескорешковые участки сегментов, расположенные между соседними корешковыми участками, мы относили к более каудальному сегменту.

Ядро Кларка исследовали на уровне сегментов L_I–L_{IV}. Эти сегменты спинного мозга последовательно пропитывали растворами 20 и 30% сахарозы для приготовления срезов толщиной 50 мкм с помощью замораживающего микротомы

Сведения об авторах:

Меркульева Наталья Сергеевна (e-mail: mer-natalia@yandex.ru), Вещицкий Александр Александрович (e-mail: veschickiyalex@mail.ru), Шкорбатова Полина Юрьевна (e-mail: polinavet@yandex.ru), Макаров Феликс Николаевич (e-mail: felixmakarov@mail.ru), лаборатория нейроморфологии, Мусиенко Павел Евгеньевич (e-mail: pol-spb@mail.ru), лаборатория физиологии движения, Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

Шенкман Борис Станиславович (e-mail: bshenkman@mail.ru), лаборатория миологии, ФГБУН Институт медико-биологических проблем, 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76 А

Leica CM-3050S (Leica, Германия) или растворами этанола восходящей концентрации и петролейным эфиром, после чего заливали в парафин и на микротоме МПС-2 (SM-2010R, Германия) делали срезы толщиной 10 мкм. Локализацию ядер Кларка определяли, используя комплекс методик: 1) гистохимическое выявление ацетилхолинэстеразы (АХЭ), при котором ядра имеют вид локусов с низким уровнем активности фермента [16]; 2) иммуногистохимическое выявление нефосфорилированных доменов тяжёлых цепей нейрофиламентов (антитела SMI-32) — маркера крупных нейронов и, в частности, клеток ядра Кларка [8]; 3) выявление миелиновых волокон [3, 6]. Первые 2 методики выполняли на замороженных срезах, последнюю — на парафиновых.

На поперечных замороженных срезах выявляли АХЭ с помощью модифицированной гистохимической методики Карновского—Рута [15] и нефосфорилированные тяжёлые домены нейрофиламентов антителами SMI-32 с помощью непрямого иммуногистохимического метода. Подробно обе методики описаны ранее [1, 2]. Парафиновые срезы обрабатывали методом Клювера—Барреры, позволяющим комбинировать окраску миелиновых волокон (краситель люксоль синий прочный) с окраской нейронов по методу Ниссля (краситель крезиловый фиолетовый) на одном и том же срезе [3, 6]. После депарафинирования стекла со срезами помещали в 1% спиртовой раствор люксоль синего прочного (Chroma-Gesellschaft Schmidt and Co., Германия) в плотно закрытой посуде в термостат (56 °C) на 12 ч. Затем промывали последовательно в этаноле и воде и дифференцировали в 0,05% растворе карбоната лития (Sigma-Aldrich, США) до отчетливой визуализации миелиновых волокон, контролируя процесс под микроскопом. После этого срезы промывали в воде, докрашивали подогретым (40 °C) подкисленным 4,1% раствором крезилового фиолетового (Sigma-Aldrich, США), дифференцировали в этаноле возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали под покровные стекла, используя синтетическую среду BioMount (BioOptica, Италия).

Оцифровку срезов и морфометрический анализ проводили с помощью установки, оснащенной световым микроскопом Olympus CX41 (Olympus Corporation, Япония) и камерой Canon (Canon Inc, Япония). Начальная обработка изображений включала: контрастирование и обводку контуров. В случае срезов, обработанных по методу Клювера—Барреры, чтобы лучше были видны нейроны на полутоновых изображениях, использовали негативные изображения (инвертированные по яркости).

Морфометрический анализ срезов, обработанных для выявления АХЭ, проводили используя программу ImageJ на 14–26 срезах от каждого животного. Изображения срезов выравнивали вдоль медиолатеральной и дорсовентральной осей, после чего определяли пространственные координаты ядер Кларка. Для этого к четырём сторонам ядра проводили касательные, параллельные дорсовентральной и медиолатеральной осям спинного мозга. Затем ядро делили в дорсовентральной плоскости на 3 части; точки пересечения разделяющих линий и перпендикулярных им касательных являлись точками интереса: дорсомедиальной (ДМ), дорсолатеральной (ДЛ), вентромедиальной (ВМ) и вентролатеральной (ВЛ) соответственно (рис. 1, а, б). Началом отсчёта для оси X была середина центрального канала, а для оси Y — дорсальная граница белого вещества. Результаты определения пространственных координат точек ДМ, ДЛ, ВМ и ВЛ для разных половин спинного мозга усредняли. На основании этих данных строили масштабную линейку, позволяющую

создать метрические карты сегментов. Контурные сегментов на этих картах, равно как и границы ядер Кларка, получали, усредняя контуры и границы всех срезов данного сегмента у 5 животных.

Исследования проведены с использованием оборудования Ресурсного центра молекулярных и клеточных технологий Санкт-Петербургского государственного университета.

Результаты исследования. На поперечных срезах при гистохимическом выявлении АХЭ ядро Кларка выглядит как светлая область, лишённая продукта реакции (см. рис. 1, в; 2, б–е). На срезах, меченных антителами SMI-32, ядро Кларка содержит интенсивно окрашенные крупные нейроны, большинство которых локализуется в ВМ его части, а границы ядра четкие благодаря замкнутому кольцу неокрашенных волокон (см. рис. 2, г). На срезах, окрашенных по методу Клювера—Барреры, видно, что это кольцо состоит из безмиелиновых или слабо миелиновых волокон (см. рис. 1, д). Внутри этого кольца находятся пучки поперечно срезанных волокон с толстой миелиновой оболочкой, особенно плотно расположенные в ДЛ части ядра. Большинство нейронов, докрашенных крезиловым фиолетовым, на этих срезах так же, как и при выявлении SMI-32 клетки, были обнаружены в ВМ-части ядра (см. рис. 1, е). Таким образом, приступая к составлению метрических карт серого вещества спинного мозга и ядер Кларка, мы были уверены в точности их локализации.

Поскольку наиболее чётко ядро Кларка выявляется с помощью реакции на АХЭ, метрические карты мы строили на базе срезов, обработанных именно по этой методике. Первое, что бросается в глаза при сопоставлении срезов разных сегментов спинного мозга, это изменение положения ядра в пространстве серого вещества. В сегментах L_1 – L_{III} ядра Кларка правой и левой сторон спинного мозга расположены почти прямо на срединной границе, от которой они отделены узкой полоской волокон (см. рис. 1, в; 2, б–г) (это подтверждается при использовании метода Клювера—Барреры, см. рис. 1, г). Между ядрами и дорсальным краем серого вещества в области срединной линии на большинстве срезов видны слой волокон и тонкая полоска серого вещества. На более каудальных уровнях мозга ядра смещаются в латеральном направлении (см. рис. 2, д, е). Поскольку в rostroкаудальном направлении происходит расширение спинного мозга (см. рис. 2, а), это приводит к изменению формы ядер: от шаровидной — на уровне L_1 – L_{II} до эллиптической (или даже линзовидной) — на уровне L_{IV} . Наибольшие изменения формы имеются именно в этом сегменте (см. рис. 2, д, е). Вместе с трансформацией контура серого вещества меняется и ориентация

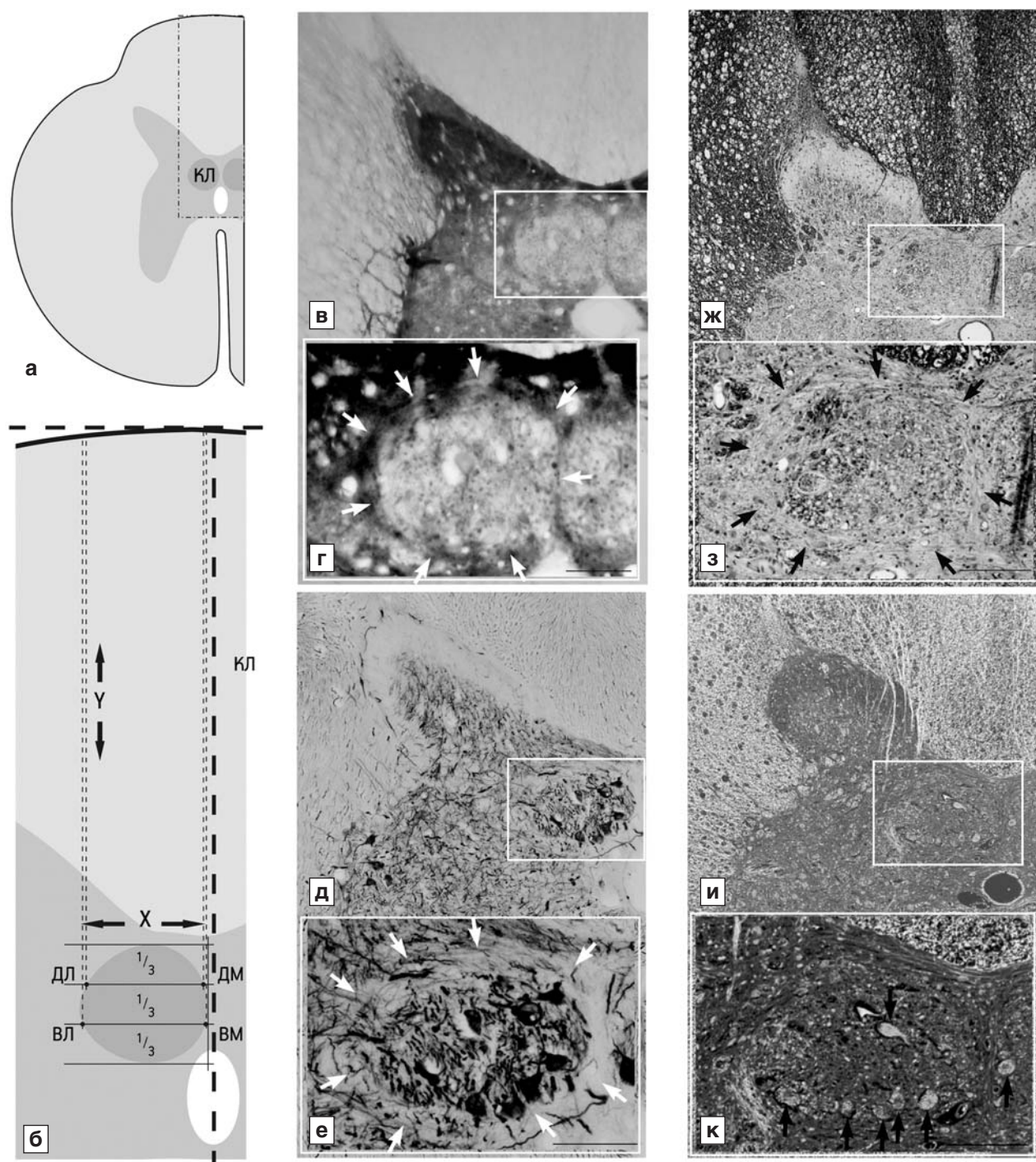


Рис. 1. Ядра Кларка в сером веществе сегмента L_{II} спинного мозга кошки.

а, б — схема определения ядра Кларка; а — пунктирной линией выделен участок, представленный на рис. б, где толстые штриховые линии — центр спинного мозга и касательная к белому веществу; тонкие штриховые линии — перпендикуляры, опущенные из точек дорсомедиальной (ДМ), дорсолатеральной (ДЛ), вентромедиальной (ВМ) и вентролатеральной (ВЛ) к белому веществу; в, д, ж, и — ядра Кларка (очерчены линиями); г, е, з, к — увеличенные участки, содержащие ядра Кларка (на рис. в, д, ж, и, очерченные линиями, маркированы границы ядра). Стрелки: на рис. г, е, з — границы ядер Кларка, на рис. к — отдельные нейроны. в, г — реакция на ацетилхолинэстеразу; д, е — на антитела SMI-32; ж-к — Клювера—Барреры (ж, з — обычное изображение; и, к — инвертированное по яркости изображение)

длинной оси ядер Кларка: они становятся направленными под всё более острым углом к срединной линии. Вместе взятые, эти факторы значительно затрудняют картирование ядер Кларка в электрофизиологическом эксперименте.

Для уточнения локализации ядер мы исследовали динамику изменения пространственных координат точек ДМ, ДЛ, ВМ и ВЛ в разных сегментах спинного мозга. Значение координаты X отражает расстояние между этими четырьмя точ-

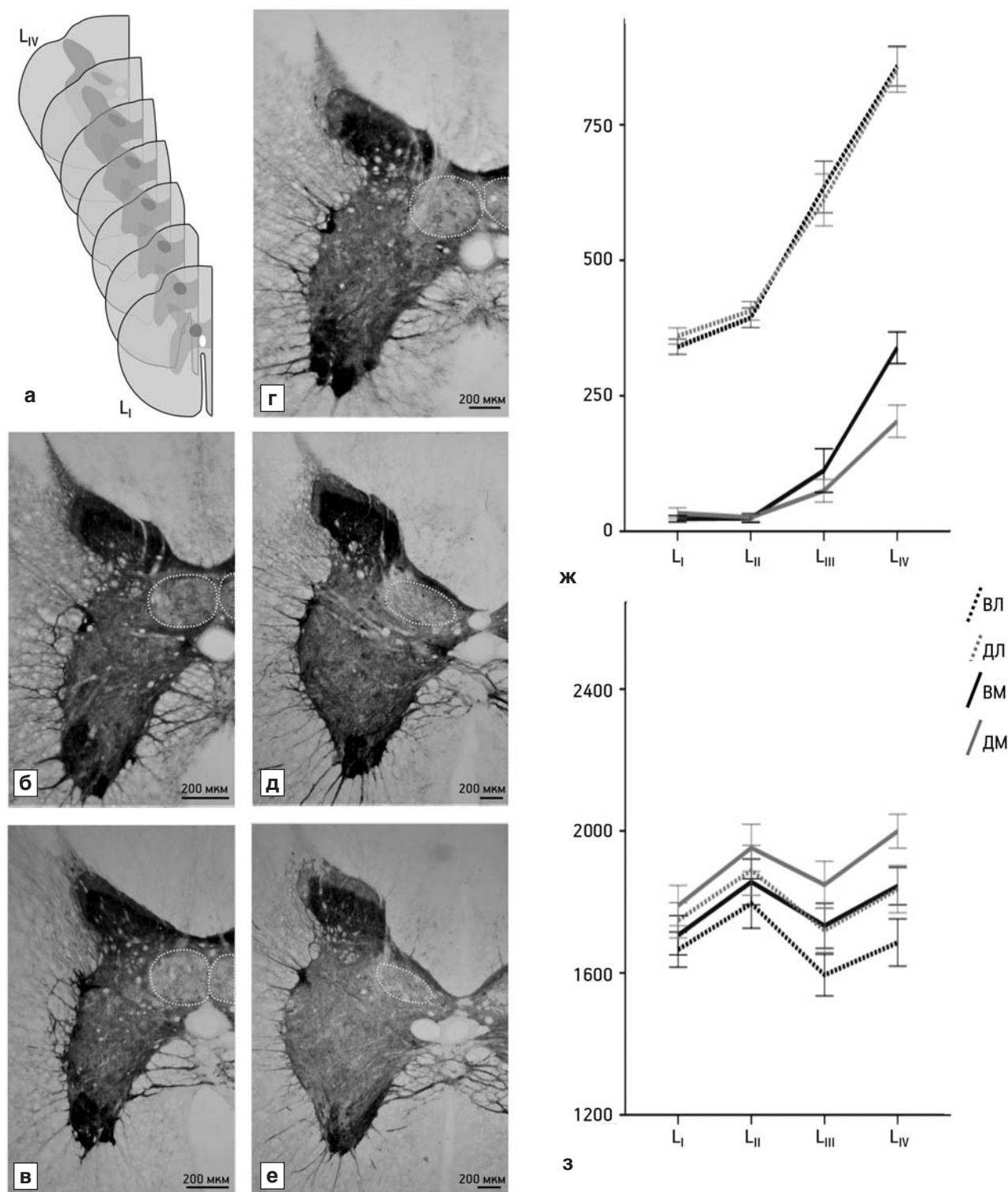


Рис. 2. Пространственные координаты ядер Кларка в разных поясничных сегментах спинного мозга кошки.

а — схема поперечных срезов на уровне сегментов L_I – L_{IV} ; **б–е** — изображения срезов, окрашенных методом выявления ацетилхолинэстеразы, в сегментах L_I (**б**), L_{II} (**в**), L_{III} (**г**) и L_{IV} (**д** — срез рострального уровня; **е** — срез каудального уровня); **ж** и **з** — зависимость значений координат X (**ж**) и Y (**з**) четырёх пограничных точек ядра Кларка — дорсомедиальной (ДМ), дорсолатеральной (ДЛ), вентромедиальной (ВМ) и вентролатеральной (ВЛ) от сегмента спинного мозга. По оси абсцисс: сегменты спинного мозга; по осям ординат: **ж** — координата X (мкм); **з** — координата Y (мкм). Вертикальные отрезки — 95% доверительный интервал

ками и центральным каналом; значение координаты Y — расстояние между точками и дорсальной границей белого вещества. Расстояние между центральным каналом и точками ДЛ/ВЛ нараста-

ет почти линейно, а точками ДМ/ВМ — по экспоненте (см. рис. 2, **ж**). Расстояние между точками ДМ, ДЛ, ВМ и ВЛ и дорсальной границей белого вещества меняется слабо; увеличение расстояния

выявлено только для точки ДМ (см. рис. 2, з). Эти данные подтверждают факт поворота длинной оси ядра Кларка и его смещения в ДЛ-направлении в сегменте L_{IV} . Получены итоговые метрические карты сегментов L_I – L_{IV} спинного мозга, построенные на базе усреднённых контуров срезов разных сегментов спинного мозга и усреднённых (рис. 3) пространственных координат четырех реперных точек у 5 кошек.

Обсуждение полученных данных. В результате проведенной работы составлены метрические карты поперечных срезов спинного мозга на уровнях первых четырех поясничных сегментов с нанесёнными на них границами ядер Кларка. Эти карты отличаются от известных карт В. Rexed [14] по двум пунктам. Во-первых, мы показали, что на наиболее ростральном уровне поясничного отдела (сегменты L_I – L_{II}) ядра Кларка двух половин спинного мозга разделены лишь волокнами; от дорсального края серого вещества они отделены узкой полоской серого вещества. При этом на схеме В. Rexed [14] между медиальными границами соседних ядер расположена пластина Х, а между ядрами и дорсальным краем серого вещества — довольно широкая (составляющая $1/3$ – $1/2$ от высоты ядра Кларка) пластина V. Во-вторых, в отличие от В. Rexed [14], показавшего уменьшение медиолатеральной протяжённости ядер Кларка в сегментах L_{III} и L_{IV} , мы выявили её приращение, а также уплощение ядер и их смещение в ДЛ-направлении. Эти отличительные особенности очевидны при использовании методик выявления АХЭ, миелина и нейрофиламентов. В работе М. Аоуама и соавт. [4] нейроны, посылающие волокна в мозжечок, были показаны за пределами «классических» границ ядра Кларка: в частности, в сером веществе дорсальнее центрального канала (т. е. в пластине V по В. Rexed [14]).

Полагаем, что это является ещё одним свидетельством в пользу того, что дорсальная граница ядер Кларка на схеме В. Rexed [14] была смещена в вентральном направлении. Рассчитываем, что представленная схема будет способствовать более точному стереотаксическому доступу к ядрам Кларка и поможет при их изучении в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Работа проведена при поддержке гранта РФФИ (РФФИ грант № 16-04-01791-А) и Российского Научного Фонда (РНФ грант № 14-15-00788, анализ материалов, полученных с использованием иммуногистохимического маркера нефосфорилированных доменов тяжёлых цепей нейрофиламентов, проводимый Вещицким А. А.).

Коллектив авторов благодарит проф. R. Veh (Institut für Anatomie der Charité, Humboldt-Universität Berlin, Germany) за помощь при постановке гистохимического метода выявления ацетилхолинэстеразы. Авторы также благодарят Е. Ю. Баженову и Н. В. Павлову за помощь в обработке гистологического материала, а также М. А. Кутуеву за помощь при работе с животными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Меркульева Н. С., Михалкин А. А., Вещицкий А. А. Особенности распределения ацетилхолинэстеразы в заднелатеральном ядре таламуса кошки // Морфология. 2015. Т. 148, вып. 4. С. 46–48.
2. Меркульева Н. С., Михалкин А. А., Никитина Н. И. и др. Формирование Y нейронов зрительной системы кошки во время раннего постнатального онтогенеза под влиянием бинокулярной ритмической световой стимуляции // Морфология. 2014. Т. 145, вып. 1. С. 13–18.
3. Сухорукова Е. Г., Григорьев И. П., Кирик О. В., Коржевский Д. Э. Дополнительные гистологические и иммуногистохимические методы, используемые при изучении нейродегенерации // Молекулярная нейроморфология. Нейродегенерация и оценка реакции нервных клеток на повреждение. СПб.: СпецЛит, 2015. С. 87–105.

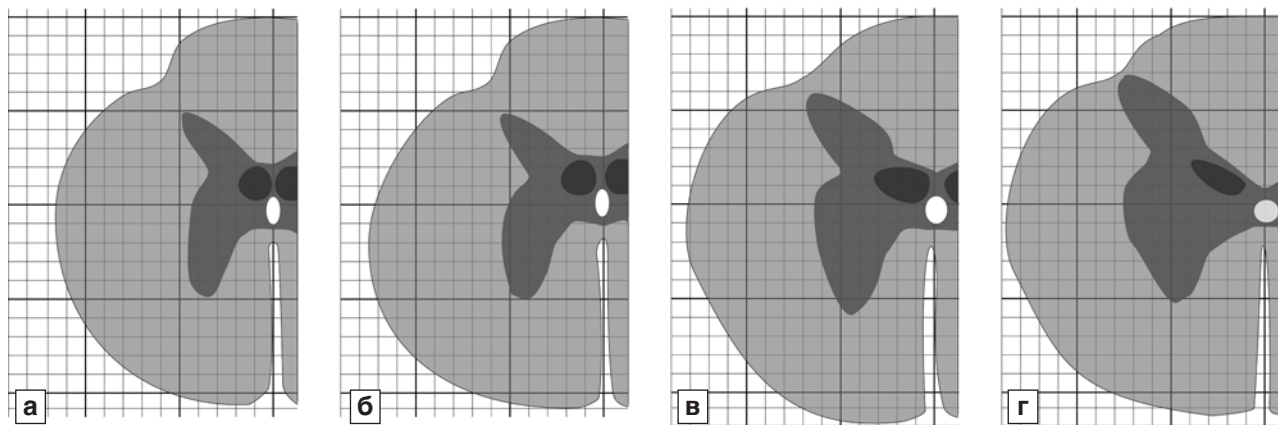


Рис. 3. Метрические карты сегментов спинного мозга с нанесёнными на них границами ядер Кларка.

а — сегмент L_I ; б — сегмент L_{II} ; в — сегмент L_{III} ; г — сегмент L_{IV} . Расстояние между толстыми линиями на изображениях — 1000 мкм, расстояние между тонкими линиями — 200 мкм

4. Aoyama M., Hongo T., Kudo N. Sensory input to cells of origin of uncrossed spinocerebellar tract located below Clarke's column in the cat // *J. Physiol.* 1988. Vol. 398. P. 233–257.
5. Arber S. Motor circuits in action: specification, connectivity, and function // *Neuron.* 2012. Vol. 74. P. 975–989.
6. Bancroft J.D., Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques.* Amsterdam: Elsevier Health Sciences, 2008.
7. Clarke J.L. Further researches on the gray substance of the spinal cord // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1859. Vol. 149. P. 437–467.
8. Clowry G.J., Moss J.A., Clough R.L. An immunohistochemical study of the development of sensorimotor components of the early fetal human spinal cord // *J. Anat.* 2005. Vol. 207. P. 313–324.
9. Hantman A.W., Jessell T.M. Clarke's column neurons as the focus of a corticospinal collaterally circuit // *Nature Neurosci.* 2010. Vol. 13. P. 1233–1240.
10. Jankowska E. Spinal interneuronal networks in the cat: elementary components // *Brain Res. Rev.* 2008. Vol. 57. P. 46–55.
11. Mann M.D. Clarke's column and the dorsal spinocerebellar tract: a review // *Brain Behav. Evol.* 1973. Vol. 7. P. 34–83.
12. Maxwell D.J., Christie W.M., Ottersen O.P. et al. Terminals of group Ia primary afferent fibres in Clarke's column are enriched with L-glutamate-like immunoreactivity // *Brain Res.* 1990. Vol. 510. P. 346–350.
13. Petras J.M., Cummings J.F. The Origin of spinocerebellar pathways. I. The nucleus centrobasis of the cervical enlargement and the nucleus dorsalis of the thoracolumbar spinal cord // *J. Comp. Neurol.* 1977. Vol. 173. P. 693–716.
14. Rexed B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat // *J. Comp. Neurol.* 1954. Vol. 100. P. 297–379.
15. Schatz C.R., Geula C., Morecraft R.J. et al. A one-step cobalt-ferrocyanide method for histochemical demonstration of acetylcholinesterase activity in central nervous system tissue // *Histochem. Cytochem.* 1992. Vol. 40. P. 431–434.
16. Silver A., Wolstencroft J.H. The distribution of cholinesterases in relation to the structure of the spinal cord in the cat // *Brain Res.* 1971. Vol. 34. P. 205–227.
17. Takahashi K., Schwarz E., Ljubetic C. et al. DNA plasmid that codes for human bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adult rats // *J. Comp. Neurol.* 1999. Vol. 404. P. 159–171.
18. Yick L.W., Cheung P.-T., So K.-F. et al. Axonal regeneration of Clarke's neurons beyond the spinal cord injury scar after treatment with chondroitinase ABC // *Exp. Neurol.* 2003. Vol. 182. P. 160–168.

Поступила в редакцию 15.11.2015
Получена после доработки 05.05.2016

MORPHOMETRIC PROPERTIES OF DORSAL CLARKE'S NUCLEI IN ROSTRAL SEGMENTS OF LUMBAR PORTION OF SPINAL CORD IN CAT

*N.S. Merkuliyeva^{1,3}, A.A. Veshchitskiy¹,
P.Yu. Shkorbatova¹, B.S. Shenkman⁵, P.Ye. Musiyenko^{2,3,4},
F.N. Makarov¹*

Morphometric properties of Clarke's nuclei and their distribution in gray matter of the cat's spinal cord were investigated using the methods of histochemical acetylcholinesterase demonstration, immunolabelling of non-phosphorylated domains of heavy neurofilament chains (SMI-32) and Klüber-Barrera technique for myelinated fiber demonstration. As a result of this research, averaged metric maps for L_I–L_{IV} lumbar segments of the spinal cord with Clarke's nuclei boundaries were constructed based on the data received on 5 cats. The work provides information essential for precise stereotaxic access to Clarke's nuclei in future fundamental and applied studies.

Key words: *spinal cord, lumbar segments, Clarke's nuclei, cat*

¹ Laboratory of Neuromorphology; ² Laboratory of Physiology of Motion, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg; ³ Laboratory of Neuroprosthesis, Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University; ⁴ Laboratory of Neurophysiology and Experimental Neurorehabilitation, Clinic of Pediatric Surgery and Orthopedics, Department of Extrapulmonary Tuberculosis, Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg; ⁵ Laboratory of Myology, Institute of Biomedical Problems, Moscow