

© Коллектив авторов, 2016
УДК 611.814.7:599.323.4

Е.Ю.Кириченко¹, А.Э.Мационис², П.Е.Повилайтите², М.А.Акименко¹, А.К.Логвинов^{1,3}

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЗАДНЕМЕДИАЛЬНОГО, ЗАДНЕЛАТЕРАЛЬНОГО ВЕНТРАЛЬНЫХ И РЕТИКУЛЯРНОГО ЯДЕР ТАЛАМУСА КРЫС (ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

¹ Лаборатория функциональной нейроморфологии и электронной микроскопии (зав. — канд. биол. наук Е.Ю.Кириченко), Академия биологии и биотехнологии им. И.Д.Ивановского Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону; ² отдел экспериментальной патоморфологии и электронной микроскопии (зав. — канд. биол. наук П.Е.Повилайтите), Ростовское областное патологоанатомическое бюро; ³ отдел молекулярно-биологических и оптических методов исследования Центральной научно-исследовательской лаборатории (зав. — канд. биол. наук А.К.Логвинов), Ростовский государственный медицинский университет

Целью работы явилось иммуногистохимическое исследование экспрессии нейрональных и глиальных протеинов, а также белков щелевых контактов (коннексина 36, коннексина 43) в заднемедиальном (VPMN), заднелатеральном (VPLN) и ретикулярном (RTN) ядрах таламуса крысы. Было выявлено, что для VPMN и VPLN таламуса характерно гомогенное распределение синаптофизина, сгруппированное расположение астроцитов, горизонтальная ориентация соматостатин-содержащих, миелиновых и безмиелиновых нервных волокон, собирающихся в тяжи и проходящих через септу баррелоидов, экспрессия коннексина 36 и 43, а также парвальбумина, выявляющая баррелоиды на срезах толщиной 4 мкм. В RTN содержание основного белка миелина, нейрофиламентов, парвальбумина, соматостатина было повышенным, имелось умеренное количество глиального фибриллярного кислого белка и коннексина 43, а синаптофизин и коннексин 36 отсутствовали.

Ключевые слова: таламус, заднемедиальное, заднелатеральное, ретикулярное ядра, баррелоиды

Ранее нами была показана неоднородность распределения нейрональных и глиальных элементов на уровне IV слоя колонок соматической коры мозга крысы, где расположены баррели — третье корковое представительство вибрисс [1]. Между тем, таламус и его проекции на кору имеют определяющее значение для формирования зоны вибрисс в мозгу млекопитающих и играют ключевую роль в процессах обработки сенсорной, в том числе, тактильной информации и формировании поведенческих реакций [9]. Заднемедиальное вентральное ядро (VPMN) таламуса, подобно IV слою неокортекса, характеризуется наличием цитоархитектонических групп нейронов — «баррелоидов». Эти структуры являются подкорковым (2-м) уровнем представительства вибрисс и центром передачи информации от главного сенсорного ядра тройничного нерва в соматосенсорную кору [2]. В то время, как специфические ядра заднелатеральное (VPLN) и VPMN

связаны с проведением соматосенсорной информации, коллатерали нейронов неспецифического ретикулярного ядра таламуса (RTN) являются единственным внешним источником торможения для всех ядер таламуса, в том числе для VPMN и VPLN [8]. Морфологические особенности этих ядер, в том числе зоны баррелоидов, малоизучены, кроме того, сравнительное морфологическое исследование коркового и таламического представительства вибрисс не проводилось. Цель данной работы — исследование экспрессии нейрональных и глиальных белков, а также белков щелевых контактов в VPMN, VPLN и RTN.

Материал и методы. Исследование проведено на 7 крысах обоего пола массой 150–200 г. Содержание животных и экспериментальные исследования осуществляли в соответствии с протоколом, утвержденным Комиссией по биоэтике Южного федерального университета 18 апреля 2012 г. Животным вводили нембутал в дозе 60 мг/кг и проводили транскраниальную перфузию 10% забуференным формалином через систему Perfusion Two (Leica, Германия).

Сведения об авторах:

Кириченко Евгения Юрьевна (e-mail: kiriche.evgeniya@yandex.ru), *Акименко Марина Анатольевна* (e-mail: akimenkoma@yandex.ru), лаборатория функциональной нейроморфологии и электронной микроскопии, Академия биологии и биотехнологии им. И.Д.Ивановского Южного федерального университета, 344090, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, ауд. 410

Мационис Александр Эдуардович (e-mail: matsionis@yandex.ru), *Повилайтите Патриция Эдмундовна* (e-mail: povpe@yandex.ru), отдел экспериментальной патоморфологии и электронной микроскопии, Ростовское областное патологоанатомическое бюро, 344015, г. Ростов-на-Дону, ул. Благодатная, 170А

Логвинов Александр Константинович (e-mail: a.k.logvinov@yandex.ru), отдел молекулярно-биологических и оптических методов исследования Центральной научно-исследовательской лаборатории, Ростовский государственный медицинский университет, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

После дополнительной фиксации головного мозга фомалином в течение 24 ч из него выделяли участок по координатам: первый разрез — 0,2 мм рострально от брегмы, второй разрез — 6,04 мм каудально от брегмы, при этом латерально мозг не рассекали. Иссеченный фрагмент прикрепляли кау-

дальной стороной среза вниз, на вибраторе VT 1000E (Leica, Германия) на холоду изготавливали фронтальные срезы толщиной 100 мкм до тех пор, пока под стереотаксической лупой не обнаруживали на них исследуемые ядра таламуса (рис. 1, а).

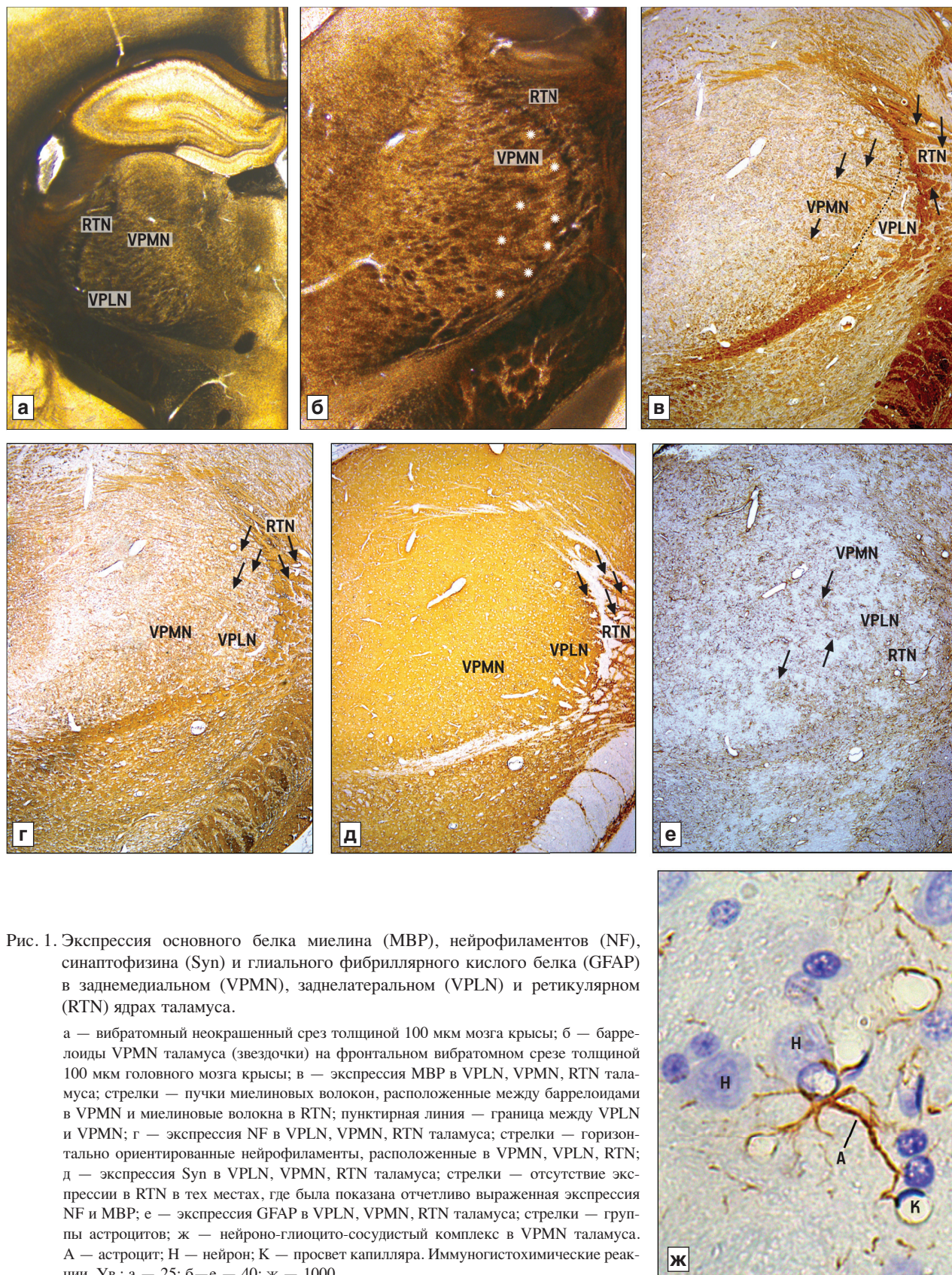
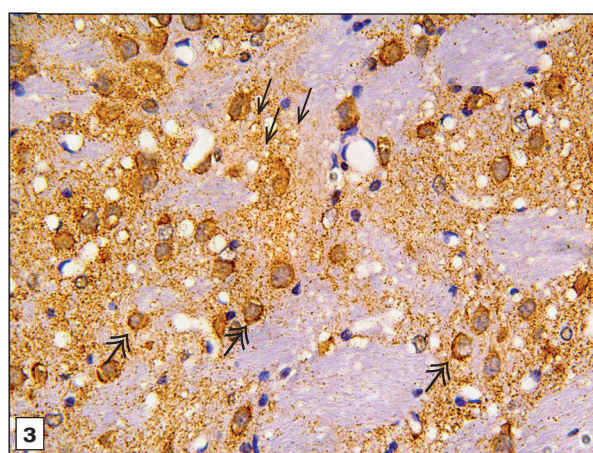
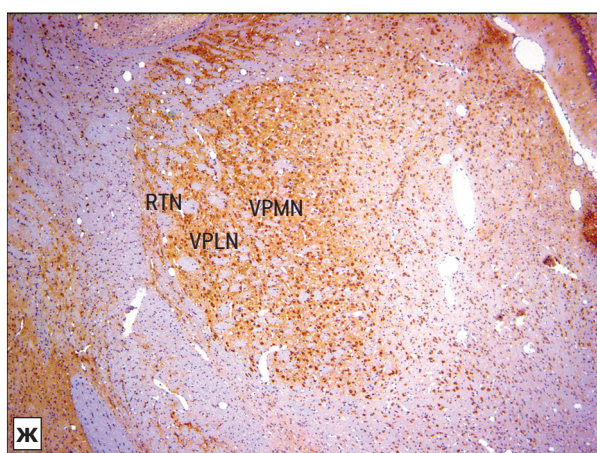
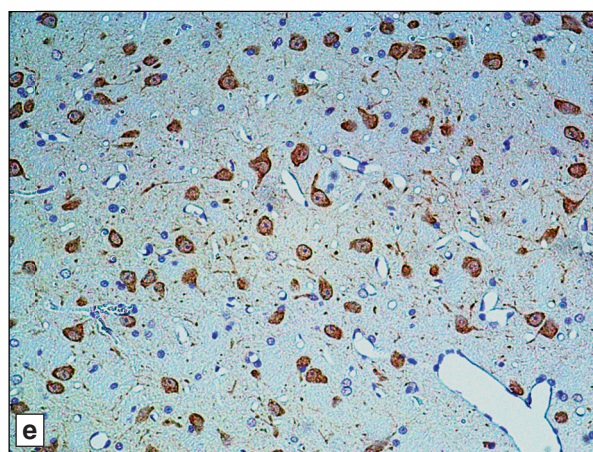
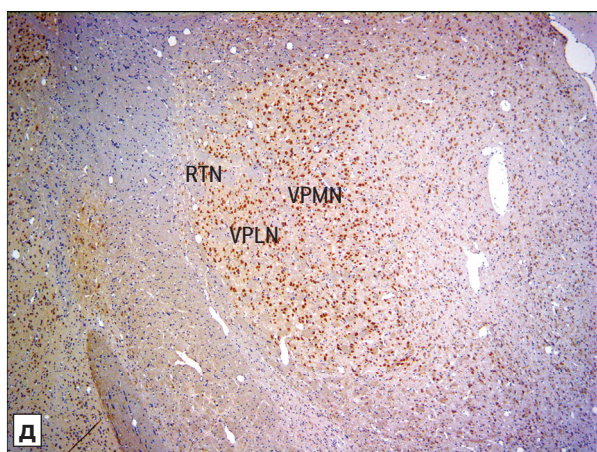
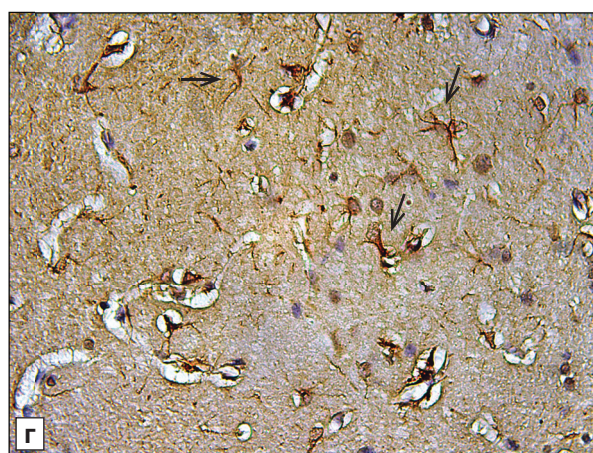
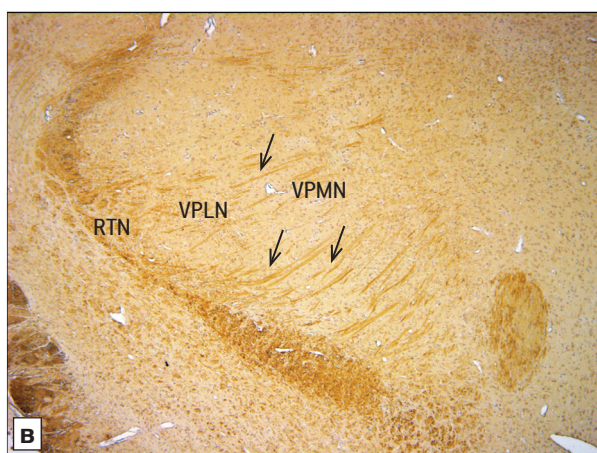
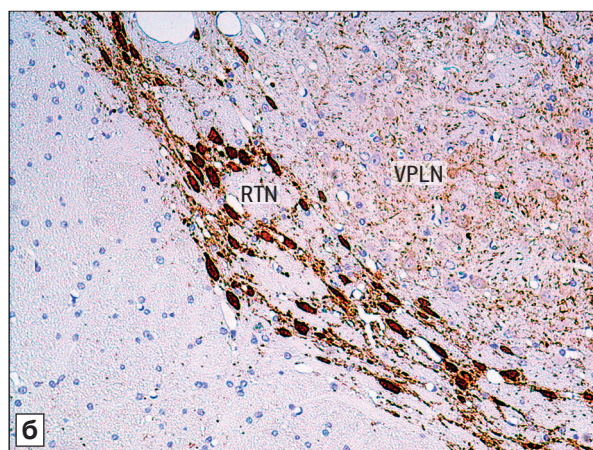
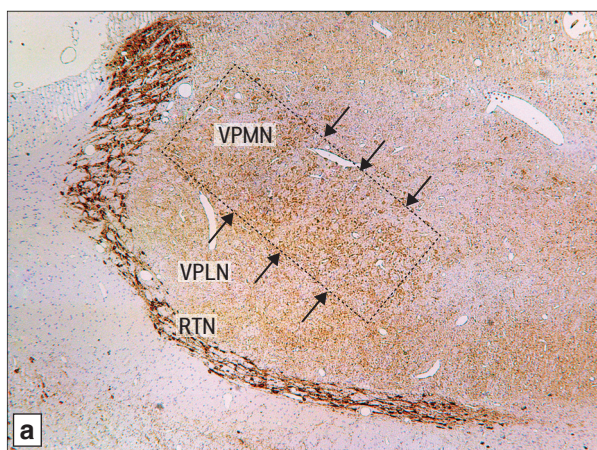


Рис. 1. Экспрессия основного белка миеллина (MBP), нейрофиламентов (NF), синаптофизина (Syn) и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в заднемедиальном (VPMN), заднелатеральном (VPLN) и ретикулярном (RTN) ядрах таламуса.

а — вибраторный неокрашенный срез толщиной 100 мкм мозга крысы; б — баррелоиды VPMN таламуса (звездочки) на фронтальном вибраторном срезе толщиной 100 мкм головного мозга крысы; в — экспрессия MBP в VPLN, VPMN, RTN таламуса; стрелки — пучки миелиновых волокон, расположенные между баррелоидами в VPMN и миелиновые волокна в RTN; пунктирная линия — граница между VPLN и VPMN; г — экспрессия NF в VPLN, VPMN, RTN таламуса; стрелки — горизонтально ориентированные нейрофиламенты, расположенные в VPMN, VPLN, RTN; д — экспрессия Syn в VPLN, VPMN, RTN таламуса; стрелки — отсутствие экспрессии в RTN в тех местах, где была показана отчетливо выраженная экспрессия NF и MBP; е — экспрессия GFAP в VPLN, VPMN, RTN таламуса; стрелки — группы астроцитов; ж — нейрно-глиоцит-сосудистый комплекс в VPMN таламуса. А — астроцит; Н — нейрон; К — просвет капилляра. Иммуногистохимические реакции. Ув.: а — 25; б-е — 40; ж — 1000



В отличие от баррелей коры мозга выявление баррелоидов на вибраторных срезах должно происходить с учетом необходимости подбора оптимального угла изготовления срезов. В проведенных ранее исследованиях мозга взрослых крыс было показано, что для наилучшего выявления баррелоидов необходимо устанавливать наклонные по отношению к горизонтальной поверхности углы резки [7]. Существуют несколько вариантов изготовления срезов: под углом 40° против часовой стрелки — для обнаружения отдельных дуг баррелоидов, под углом 30° по часовой стрелке — для выявления отдельных рядов баррелоидов [5]. В настоящей работе четкое баррелоидное поле VPMN таламуса на вибраторных срезах нам удалось выявить при отклонении режущего лезвия от горизонтальной плоскости на 45° во время резки.

После обнаружения баррелоидов головной мозг заливали в парафин по стандартной методике. Иммуногистохимическое исследование ядер таламуса проводили на парафиновых срезах толщиной 4 мкм. Использовали систему визуализации Dako EnVision System+Peroxidase (DAB) (Dako, Дания) и первичные мышинные моно- и кроличьи поликлональные антитела: 1) Neurofilament, клон F11, 1:100, мышинные (Dako, Дания) для выявления элементов цитоскелета нейронов — белков нейрофиламентов (NF); 2) Polyclonal Myelin Basic Protein, кроличьи (Dako, Дания) для выявления основного белка миелина (MBP); 3) для выявления астроцитов — глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), клон 6F2, 2:100, мышинные (Dako, Дания); 4) Synaptophysin (Syn), клон SY38, 5:100, мышинные (Dako, Дания) для выявления белка синаптических везикул синаптофизина; 5) Anti-Parvalbumin, клон PARV-19, 1:2000, мышинные (Sigma-Aldrich, США) для выявления кальций-связывающего белка тормозных нейронов — парвальбумина (PA); 6) Polyclonal Anti-Somatostatin Receptor Type2, 1:200, кроличьи (Sigma-Aldrich, США) для выявления гормон-подавляющего нейропептида; 7) Polyclonal Anti-Connexin 36, 1:50, кроличьи (Invitrogen, США) для выявления белка щелевых контактов нейронов; 8) Polyclonal Anti-Connexin 43, 1:100, кроличьи (Spring Bioscience, США) для выявления щелевых контактов астроцитов. В каждом случае проводили отрицательный контроль — вместо первичных антител на срезы наносили промывочный буфер — En Vision Flex Wash Buffer (Dako, Дания). После проведения иммуногистохимической реакции ядра нейронов докрашивали гематоксилином. Светооптическое исследование проводили при помощи микроскопа DM 2500 (Leica, Германия) со встроенной камерой DFC 495 (Leica, Германия).

Результаты исследования. На фронтальных неокрашенных вибраторных срезах толщиной 100 мкм, изготовленных под углом 45°, баррелоиды выявляются на уровне VPMN в виде компактных ячеистых структур, расположенных в несколько рядов (см. рис. 1, а). Стенки (септы) баррелоидов — темнее по сравнению с оптически светлой центральной частью за счет более высокой плотности расположения нейронов и их

отростков именно в стенках баррелоидов. В этой связи ячеистая структура баррелоидного поля выявляется за счет толщины вибраторных срезов и, как правило, не определяется на тонких срезах толщиной 4 мкм при стандартных морфологических окрасках.

При иммуногистохимическом исследовании на парафиновых срезах экспрессии MBP и NF обнаружено, что миелиновые и безмиелиновые волокна в VPMN и VPLN имеют горизонтально ориентированное параллельное расположение и формируют крупные пучки, которые в VPMN расположены между баррелоидами. Наибольшая интенсивность экспрессии MBP и NF обнаружена в RTN. Чередование пучков миелиновых и безмиелиновых нервных волокон обеспечивает этой структуре характерное сетчатое строение (см. рис. 1, в, г). Таким образом, экспрессия MBP позволяет определить границы VPMN, VPLN и RTN на тонких срезах толщиной 4 мкм. В исследуемых ядрах таламуса отмечена умеренная равномерная экспрессия синаптофизина (Syn) в нейронах и нейропиле с усилением ее интенсивности в зоне VPLN на границе с RTN. Сетчатая структура баррелоидов в VPMN при этом не выявлялась. Зона RTN таламуса при отмеченной ранее позитивной реакции на NF и MBP была Syn-отрицательной (см. рис. 1, д). Иммуногистохимическое исследование распределения GFAP в области VPLN и VPMN выявило наличие групп астроцитов в зонах проекции вибрисс (см. рис. 1, е). При большем увеличении отчетливо выявлялись нейроно-глиоцито-сосудистые комплексы — окрашенные периваскулярные муфты из сосудистых ножек астроцитов вокруг капилляров, а также контакты нейронов с астроцитами, являющиеся морфологической основой гематоэнцефалического барьера (см. рис. 1, ж).

Для анализа распределения тормозных нейронов в изучаемых ядрах проведено иммуногистохимическое исследование с антителами к кальций-связывающему белку PA и гормон-подавляющему нейропептиду соматостатину (SS). Наиболее выраженная экспрессия PA и SS наблюдалась в RTN и в области VPMN. Благодаря этому повышенному уровню экспрессии PA на срезе RTN четко отличалась от всех остальных структур (рис. 2, а).

Рис. 2. Экспрессия парвальбумина (PA), соматостатина (SS), белка щелевых контактов нейронов (Cx36) и щелевых контактов астроцитов (Cx43) в заднемедиальном (VPMN), заднелатеральном (VPLN) и ретикулярном (RTN) ядрах таламуса.

а — при экспрессии PA границы RTN и контуры баррелоидов VPMN четкие; пунктирной линией очерчено баррелоидное поле; стрелки — отсутствие экспрессии между баррелоидами; б — PA-позитивные нейроны RTN и умеренная PA-позитивная реакция нейропила в VPLN; в — горизонтально направленные коллатерали (стрелки), содержащие SS, направленные от RTN через зоны VPMN и VPLN; г — SS-позитивные нейроны (стрелки) зоны VPLN/VPMN; д — экспрессия Cx36 в VPMN, VPLN, отсутствие экспрессии в RTN; е — цитоплазматическая экспрессия Cx43 нейронов в VPMN; ж — экспрессия Cx43 в VPMN, VPLN, RTN; з — точечная экспрессия Cx43 в нейропиле (тонкие стрелки) и мембранная (двойные стрелки) на телах нейронов в VPMN. Иммуногистохимические реакции. Ув.: а, в, д, ж — 40; б, е — 200; г, з — 400

При большем увеличении в зоне RTN продукты реакции были локализованы в цитоплазме, ядре, а также в аксонах и дендритах РА-содержащих ГАМК-ергических нейронов, формирующих цепочки и группы (см. рис. 2, б). В зоне VPLN реакция на РА существенно ослабевала, однако, при большем увеличении в нейропиле наблюдалось обилие РА-позитивных отростков, срезанных вдоль и поперек между неокрашенных тел нейронов. Очевидно, что эта зона характеризуется присутствием исключительно РА-позитивных проекций и отсутствием самих РА-позитивных нейронов. По сравнению с VPLN в VPMN была отмечена отчетливая положительная реакция не только в отростках, но и в телах клеток. При этом расположение РА-позитивных структур позволило выявить в этой зоне баррелоиды таламуса на тонких толщиной 4 мкм срезах (см. рис. 2, а). При реакции на SS отдельные клеточные элементы при малом увеличении не визуализировались в отличие от таковых при реакции на РА. Были отмечены горизонтально ориентированные SS-позитивные коллатерали, направленные от RTN через зоны VPMN и VPLN (см. рис. 2, в). Однако при больших увеличениях выявлялись небольшие отдельные тела и отростки тормозных SS-позитивных интернейронов (см. рис. 2, г).

Экспрессия коннексинов 36 (Cx36) и 43 (Cx43) на телах нейронов и в нейропиле в VPMN, VPLN, RTN более выражена, чем в других основных структурах мозга, располагающихся в плоскости среза — коре, гиппокампе, гипоталамусе и других ядрах таламуса. При этом экспрессия коннексинов в VPMN/VPLN наблюдалась в тех же местах, что и экспрессия РА. Исследование белков нейрональных щелевых контактов (Cx36) выявило цепочки и группы позитивных нейронов в VPMN и VPLN и каких-либо различий в этих зонах не наблюдалось (см. рис. 2, д). При большем увеличении была отмечена яркая, преимущественно цитоплазматическая экспрессия Cx36 на телах нейронов, а также позитивная реакция срезанных вдоль и поперек немногочисленных их отростков (см. рис. 2, е). Исследование белков щелевых контактов астроцитов (Cx43) выявило в большей степени «точечное» окрашивание нейропила в VPLN, VPMN и RTN, помимо иммунопозитивной мембранной реакции на тела некоторых клеток (только в VPLN, VPMN) (см. рис. 2, ж, з). Также отмечена локализация гранул хромогена вокруг крупных капилляров, что соответствует представлениям о наличии щелевых контактов астроцитов, расположенных вокруг сосудов.

Обсуждение полученных данных. Иммуногистохимическое исследование ядер тала-

муса показало, что на уровне VPMN/VPLN располагаются горизонтально направленные миелиновые и безмиелиновые нервные волокна, в том числе содержащие SS, которые проходят в септах отдельных баррелоидов. Схожая картина была ранее нами описана в баррельной коре: в слое IV наблюдалась группировка пучков NF в тяжи, проходящие преимущественно через септу и стенку баррелей [1]. Также аналогично полученной нами ранее реакции на GFAP в баррелях коры, в VPMN таламуса наблюдается скопление астроцитов в центральной части каждого баррелоида. Схожее расположение астроцитов на 2-м (баррелоиды таламуса) и 3-м (баррели коры) уровнях организации тактильного анализатора может свидетельствовать об особом значении астроцитов для их модульной структуры. Это предположение не лишено оснований, поскольку в литературе встречается достаточное количество данных о регуляции нейрональной активности посредством щелевых контактов астроцитов, расположенных вокруг аксошипиковых химических синапсов через реакцию абсорбции внеклеточных ионов [4].

Согласно имеющимся морфологическим данным, основными клетками VPMN являются нейроны с длинным аксоном и слабо развитыми дендритами (так называемые релейные клетки). При этом в литературе отсутствуют сведения о наличии в баррелоидах таламуса мелких короткоаксонных интернейронов, выполняющих, предположительно, тормозную функцию. Между тем, проведенное нами исследование вентральных ядер таламуса выявило в таких клетках экспрессию кальций-связывающего белка РА и гормон-подавляющего нейропептида SS, являющихся специфическими маркерами тормозных интернейронов. Кроме того, экспрессия РА позволяет идентифицировать баррелоидное поле в VPMN. По литературным данным, выявленные в зоне VPMN клетки, экспрессирующие РА, являются «центрами» таламокортикальных проекций исключительно на средние слои коры [6]. В то же время, нами была отмечена корреляция экспрессии РА и белков щелевых контактов коннексинов (Cx36 и Cx43) в зоне ядер VPLN/VPMN таламуса. Известно, что наибольшее количество нейрональных щелевых контактов, или электрических синапсов, имеют избирательный характер формирования и соединяют тормозные ГАМК-ергические РА-содержащие интернейроны [3]. Существование такой сети тормозных интернейронов, объединенных электрическими синапсами, может являться морфологической основой индивидуального локального пейсмекерного ритмоге-

неза как в баррелях и колонках коры SI, так и в баррелоидах VPMN таламуса.

Неспецифическое RTN, также как и VPMN, имеет топическую организацию и зону представительства вибрисс [10]. По данным нашего исследования, в RTN наблюдается повышенная по сравнению с другими ядрами таламуса экспрессия MBP, NF, PA и SS, а также умеренная экспрессия GFAP и Cx43. Следовательно, в RTN представлены тормозные PA- и SS-содержащие нейроны, миелиновые и безмиелиновые волокна, что является морфологической основой тормозной функции этого подкоркового образования. Также, как и в VPMN таламуса, экспрессия Cx43 наравне с экспрессией GFAP может свидетельствовать о формировании сети щелевых контактов между распределенными в RTN астроцитами. При этом, в RTN таламуса отсутствует реакция на Syn и Cx36.

Таким образом, было выявлено, что миелиновые и безмиелиновые волокна в VPMN и VPLN таламуса имеют горизонтально ориентированное параллельное направление, их наибольшее количество располагается в RTN. Судя по экспрессии нейроглиальных антигенов, баррелоиды таламуса имеют схожее с баррелями строение: между отдельными баррелоидами расположены крупные пучки нервных волокон, дающие реакцию на нейрофиламенты, также в таламических зонах проекции вибрисс имеются скопления астроцитов. Наличие в VPMN и VPLN кальций-связывающего белка PA и гормон-подавляющего нейропептида SS свидетельствует о присутствии специфических тормозных связей в этих ядрах, являющихся «центрами» таламокортикальной передачи в IV слой коры мозга. В исследованных VPMN, VPLN и RTN выявлена более интенсивная экспрессия Cx36 и Cx43, чем в корковых структурах мозга. При этом, в VPMN/VPLN экспрессия коннексинов наблюдается в тех же участках, что и PA. Полученные результаты свидетельствуют о формировании плотной сети глиоцитарных и нейрональных щелевых контактов в исследованных ядрах, способствующих обработке сенсорных сигналов между корой и подкорковыми структурами.

Работа выполнена при поддержке внутреннего гранта Южного федерального университета № 213.01-07-2014/05 ПЧВГ и гранта РФФИ № 15-04-03035.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кириченко Е.Ю., Логвинов А.К., Повилайтите П.Е., Гранкина А.О. Распределение нейрональных и глиальных антигенов в колонках соматической коры мозга крысы (иммуногистохимическое исследование) // Морфология. 2014. Т. 145, вып. 2. С. 7–11.
2. Сухов А.Г. Нейронная организация тактильного анализатора крысы. Ростов н/Д: РГУ, 1992.
3. Fukuda T., Kosaka T. Ultrastructural study of gap junctions between dendrites of parvalbumin-containing GABAergic neurons in various neocortical areas of the adult rat // Neuroscience. 2003. Vol. 120, № 1. P. 5–20.
4. Genoud C., Houades V., Kraftsik R. et al. Proximity of excitatory synapses and astroglial gap junctions in layer IV of the mouse barrel cortex // Neuroscience. 2015. Vol. 291. P. 241–249.
5. Haidarliu S., Ahissar E. Size gradients of barreloids in the rat thalamus // J. Comp. Neurol. 2001. Vol. 429, № 3. P. 372–387.
6. Jones E.G. Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization // Neuroscience. 1998. Vol. 85, № 2. P. 331–345.
7. Land P.W., Simons D.J. Metabolic and structural correlates of the vibrissae representation in the thalamus of the adult rat // Neurosci. Lett. 1985. Vol. 60, № 3. P. 319–324.
8. Landisman C.E., Connors B.W. VPM and PoM nuclei of the rat somatosensory thalamus: intrinsic neuronal properties and corticothalamic feedback // Cereb. Cortex. 2007. Vol. 17, № 12. P. 2853–2865.
9. Nicolelis M.A., Fanselow E.E. Thalamocortical optimisation of tactile processing according to behavioral state // Nat. Neurosci. 2002. Vol. 5, № 6. P. 517–523.
10. Pinault D. The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept // Brain Res. Rev. 2004. Vol. 46, № 1. P. 1–31.

Поступила в редакцию 12.08.2015

Получена после доработки 15.12.2015

Ye. Yu. Kirichenko¹, A. E. Matsionis², P. E. Povilaityte², M. A. Akimenko¹, A. K. Logvinov^{1,3}

PECULIARITIES OF THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF VENTRAL POSTEROMEDIAL, VENTRAL POSTEROLATERAL, AND RETICULAR NUCLEI OF RAT THALAMUS (AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY)

The aim of this work was an immunohistochemical study of the expression of neuronal and glial proteins, and of gap junctions proteins (connexin 36, connexin 43) in ventral posteromedial (VPMN), ventral posterolateral (VPLN) and reticular (RTN) nuclei of the thalamus in rats. It was found that VPMN and VPLN of the thalamus were characterized by a homogeneous distribution of synaptophysin, grouped arrangement of astrocytes, horizontal orientation of somatostatin-containing myelinated and unmyelinated nerve fibers, forming the bundles, and running through the barreloid septum, expression of connexin 36 and 43 as well as of parvalbumin revealing barreloids in 4 µm-thick sections. In RTN the content of myelin basic protein, neurofilaments, parvalbumin, and somatostatin was increased, while the amount of glial fibrillary acidic protein and connexin 43 was moderate, and synaptophysin and connexin 36 were absent.

Key words: posteromedial, posterolateral, reticular nuclei, immunohistochemistry, barreloids

¹ Laboratory of Functional Neuromorphology and Electron Microscopy, I.D. Ivanovskiy Academy of Biology and Biotechnology, Southern Federal University, Rostov-on-Don; ² Department of Experimental Pathology and Electron Microscopy, Rostov Regional Pathologic-Anatomical Bureau; ³ Department of Molecular Biology and Optical Methods of Research, Central Research Laboratory, Rostov State Medical University