

А. А. Михалкин, Н. С. Меркульева

МЕТОДИКА АНАЛИЗА ПОПУЛЯЦИЙ Y-НЕЙРОНОВ В ЛАТЕРАЛЬНОМ КОЛЕНЧАТОМ ТЕЛЕ У КОШКИ

Лаборатория нейроморфологии (зав. — проф. Ф. Н. Макаров), Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

В работе приведён способ анализа клеточных популяций, сочетающий использование нормированных пространственных координат нейронов с морфометрическими критериями их оценки. Данные алгоритмы применили для проверки неоднородности популяции нейронов Y-проводящего канала у кошки на уровне наружного латерального коленчатого тела (ЛКТ). В качестве специфичного маркера Y-нейронов применили антитела SMI-32. Оценивали динамику распределения количества клеток и ориентации их сомы в пределах отдельного слоя и вдоль медиолатеральной протяжённости дорсального ядра коленчатого тела (ДЯЛКТ). Среди SMI-32-позитивных нейронов обнаружено существование, как минимум, двух популяций, различающихся по численности, ориентации сомы и распределению в разных слоях ДЯЛКТ. Выявленная неоднородность популяции Y-нейронов ДЯЛКТ согласуется с полученными ранее электрофизиологическими данными. Полагаем, что описанный в работе алгоритм анализа нейронов может быть успешно применён для исследования не только ЛКТ, но и иных протяжённых, в том числе ламинарно-организованных структур мозга.

Ключевые слова: зрительная система кошки, латеральное коленчатое тело, Y-проводящий канал, антитела SMI-32

Анализ гистологических препаратов мозга всегда связан с проблемой отделения индивидуальных особенностей животных от закономерностей, присущих виду в целом, что особенно актуально для крупных нелинейных млекопитающих (отряды: хищные и приматы). Эта задача зачастую может быть решена при определённых способах нормирования данных. Попытка такого нормирования сделана на модели дорсального ядра латерального коленчатого тела (ДЯЛКТ) кошки, которое является основным посредником между сетчаткой глаза и зрительной корой. Согласно общепринятой теории, зрительная система обрабатывает информацию в ряде параллельных каналов, образуемых клетками разных типов (X-, W- и Y-клетками). Имеется информация о наличии нескольких субпопуляций Y-нейронов [11, 17], которые составляют параллельный канал, отвечающий за анализ движущихся зрительных объектов, что ставит вопрос о возможности их разделения по морфометрическим критериям. Мы предположили, что сочетание нормированных координат нейронов в пространстве таламического ядра с их морфометрическими параметрами (ориентация сомы клетки) позволит выявить гетерогенность популяции Y-клеток ДЯЛКТ, которая была недоступна в предшествующих нейроанатомических работах, использующих стандартные методы оценки клеточных популяций ДЯЛКТ.

В качестве специфического маркера Y-нейронов использовали антитела SMI-32 [3, 6], связывающиеся с тяжёлыми нефосфорилированными субъединицами нейрофиламентов (тНФ).

Экспериментальные животные. Иммуногистохимическая обработка ткани. Исследование проведено на 4 нормально пигментированных кошках в возрасте 60 сут, выросших в обычных виварных условиях. Протоколы экспериментов были одобрены комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН (заключение № 1 от 09.10.2015 г.) и выполнялись в соответствии с требованиями Директивы Совета Европейского Парламента по защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (2010/63EU) об использовании животных для экспериментальных исследований. Процедуры перфузии, обработки ткани и иммуногистохимический протокол выявления SMI-32 на свободноплавающих фронтальных срезах (толщина 50 мкм) были подробно описаны нами ранее [2]. Выявление тНФ проводили согласно авидин-биотин-пероксидазному протоколу с использованием первичных антител SMI-32 (anti-mouse, Sternberger Monoclonals, США, концентрация 1:5000) и вторичных биотинилированных антител (anti-mouse IgG, Vector Labs, Великобритания,

Сведения об авторах:

Михалкин Александр Александрович (e-mail: michalkin@mail.ru), Меркульева Наталья Сергеевна (e-mail: mer-natalia@yandex.ru), лаборатория нейроморфологии, Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

концентрация 1:600). В обоих полушариях мозга анализировали срезы, сделанные на уровне AP 5,0–6,0 по координатам Хорсли—Кларка (по 4 среза от животного), содержащие ретинопическое представительство центра поля зрения (0–5 °) по вертикальному меридиану и позволяющие визуализировать все линии азимута: от 0 ° (медиальная часть ДЯЛКТ) до 90 ° (латеральная часть ДЯЛКТ).

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

Определение нормированных пространственных координат нейронов. Оцифровку срезов проводили с помощью микроскопа Olympus CX31 (Olympus, Япония) и камеры Canon D3200 (Canon, Япония). Координаты каждого нейрона определяли, используя программу ImageJ [15], после горизонтального выравнивания границ слоёв ДЯЛКТ на изображениях. Таким образом, X- и Y-оси соответствовали медиолатеральной и дорсовентральной осям соответственно. Так как размеры ДЯЛКТ в медиолатеральном направлении у животных варьируют, их нормировали относительно слоя A1, границы которого наименее вариабельны и наиболее чётко видны на срезах. Медиальный полюс слоя A1 был принят за 0% длины (D_0), латеральный полюс — за 100% длины (D_{100}). Поскольку ДЯЛКТ организовано ретинопически, учитывали особенности изменения морфометрических параметров с эксцентриситетом. Ввиду того, что бинокулярная часть поля зрения (0–45 °) расположена в пределах слоя A1 [14], почти вся она находилась в пределах D_0 – D_{100} . За пределами этого диапазона оказались: небольшой медиальный сегмент слоя A и латерально расположенные монокулярные сегменты слоёв A и крупноклеточного слоя C (C_M) (рисунк, а, слева). Для нормированного соотношения пространственных координат нейрона с ретинопической картой ДЯЛКТ использовали формулу:

$$D_n = (X_n - X_0) \cdot 100 / (X_{100} - X_0),$$

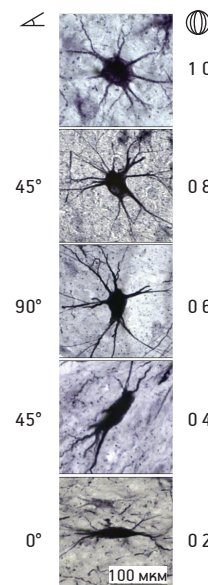
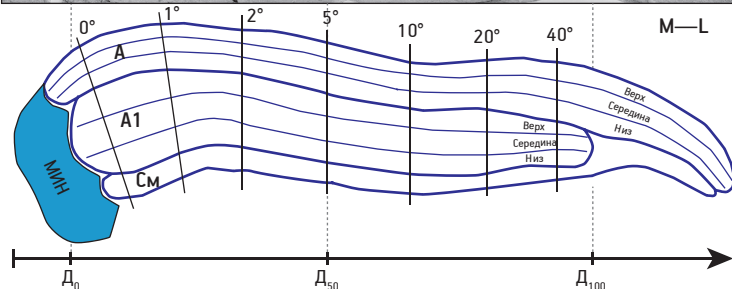
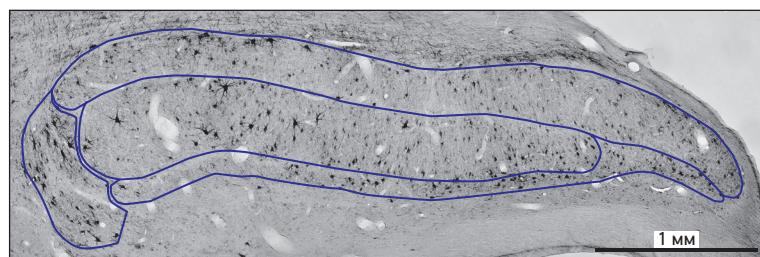
где D_n — нормированная координата клетки, X_n — X-координата клетки, X_0 — координата начала слоя A1, X_{100} — координата конца слоя A1 (см. рисунок, а, слева).

Проведение замеров клеток в ДЯЛКТ обычно осуществляют двумя способами. Первый предполагает анализ клеточных популяций без учёта эксцентриситета. Тогда вычисляют средние параметры клеток по всему слою ДЯЛКТ [3, 6] или по его большей части [8]. Как будет показано ниже, следует с осторожностью относиться к его использованию для описания клеточных популя-

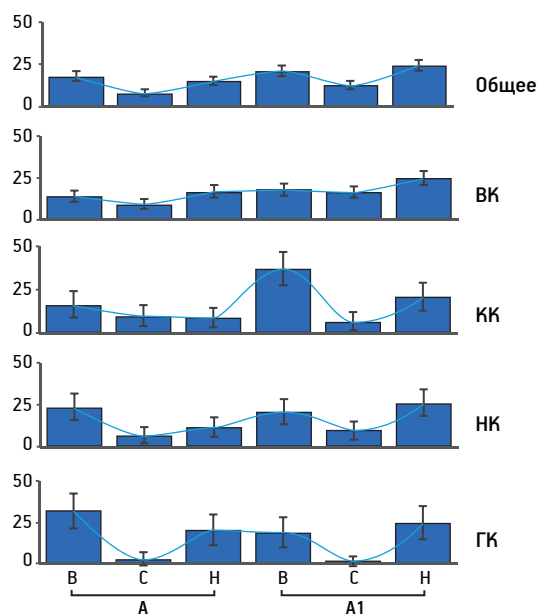
ций, так как при таком подходе в анализируемые данные можно внести значительные вариации, связанные с их изменениями относительно эксцентриситета. Второй способ предполагает учёт эксцентриситета. Параметры вычисляют по 2–3 отдельным участкам ДЯЛКТ, представляющим ту или иную ретинопическую зону [12]. В этом случае существует возможность упустить изменения характеристик нейронов между выбранными участками. В нашей работе предложено определение точного положения каждой клетки в исследуемой структуре и более полное описание изменения морфометрических показателей в пределах таламического ядра. Одновременное использование реперных точек и нормирования данных позволило нам объединить информацию, полученную с нескольких срезов ДЯЛКТ.

В дополнение к этому при анализе SMI-32-позитивных (SMI-32⁺) нейронов оценивали их отношение к границам слоёв A и A1. Для этого определяли число клеток в трёх частях этих слоёв: в двух пограничных областях (верхней и нижней) и в центральной зоне (см. рисунок, а, слева). Данный способ деления слоёв ДЯЛКТ ранее успешно применили в работе, описывающей ветвление аксонов клеток зрительной коры в ДЯЛКТ кошки [13]. Причиной такого деления является то, что большинство Y-клеток ДЯЛКТ локализованы на границах слоёв A и A1 [4].

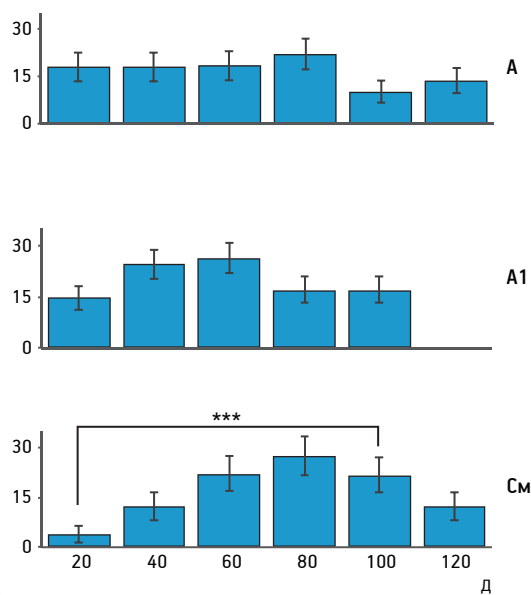
Определение формы и ориентации сомы нейрона. Кроме площади сечения клеток, оценивали степень их округлости и ориентацию сомы относительно границы соседних слоёв, основываясь на автоматических параметрах программы ImageJ. Параметр округлость отражает приближенность сомы клетки к кругу и варьирует от 0 — крайне узкая, вытянутая клетка до 1 — круглая клетка [1]. Параметр угол отражает угол между длинной осью сомы клетки и осью абсцисс. Так как ось абсцисс параллельна границам слоёв ДЯЛКТ, этот параметр использован как показатель ориентации сомы нейрона относительно границ слоёв. Всё множество вариантов нейронов с различной ориентацией сомы были разделены на 3 группы: с расположением сомы под углом 0–30 ° — горизонтальные клетки (ГК), под углом 30–60 ° — наклонные клетки (НК) и под углом 60–90 ° — вертикальные клетки (ВК) (см. рисунок, а, справа). Анализ зависимости между округлостью клетки и её ориентацией показал, что ВК являются более узкими, чем НК и ГК (0,58, 0,64 и 0,64 усл. ед. соответственно) (ВК при сравнении с НК, $P < 0,0001$; ВК при сравнении с ГК, $P < 0,0001$, критерий Манна—Уитни).



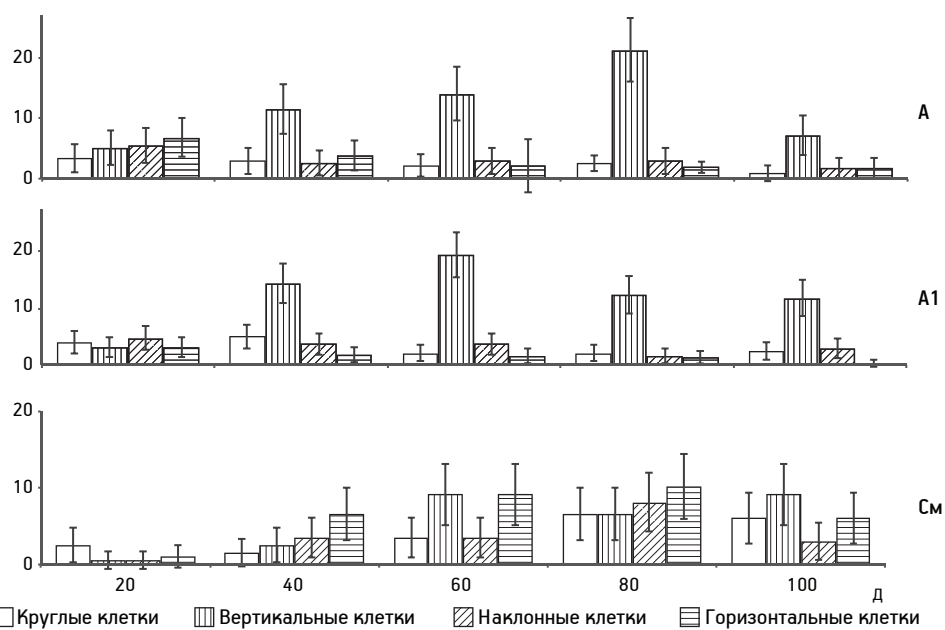
а



б



в



г

По этим параметрам анализировали только клетки в бинокулярной части ДЯЛКТ, так как монокулярная часть имеет изгиб, не позволяющий корректно оценить ориентацию клеток на срезах. Чтобы исключить случайные попадания в выделенные группы округлых клеток, нейроны с показателем округлости более 0,8 объединили в отдельную группу — круглые клетки (КК) (см. рисунок, а, справа). Эти клетки имели равномерное распределение по вариантам ориентации сомы ($P=0,18$, χ^2). При понижении порога округлости до 0,75 распределение становилось неравномерным ($P=0,04$, χ^2).

Использование ориентации сомы нейрона в качестве критерия оценки клеточных популяций. Стандартная практика исследования строения нейронов обычно включает в себя оценку дендритов клетки, дающую важную информацию о возможной функциональной роли нейрона [7, 16]. Однако в случае с Y-нейронами ДЯЛКТ такой подход встречался с рядом методических трудностей. Используемые специфические маркёры Y-нейронов (антитела SMI-32 и Cat-301) позволяют визуализировать только начальные сегменты дендритного дерева. Полное прямое выявление дендритов Y-нейронов возможно при сочетании электрофизиологического метода определения их активности с последующим методом внутриклеточного мечения [16], косвенное — при использовании методик ретроградного мечения [7], когда инъекция маркёра производится в области коры, получающие афферентные волокна от Y-клеток [10]. В обоих способах существуют особенности, не позволяющие оценивать всю популяцию Y-нейронов ДЯЛКТ. Таким образом, важно получить способ косвенной оценки дендритов Y-нейронов при использовании существующих специфических маркёров. Мы предположили, что об общей ориентации дендритов Y-нейронов можно судить по ориентации их сомы. Ранее было показано совпадение ориентации сомы и вытянутости дендритов нейронов в ДЯЛКТ кошки [16].

Статистическая обработка данных. Для определения значимости различий между сравниваемыми группами, в зависимости от типа распределения данных и от числа сравниваемых групп, применяли t-критерий (t-крит.) (нормальное распределение) или χ^2 , критерий Колмогорова—Смирнова (К—С), критерий Краскала—Уоллиса (К—У) (ненормальное распределение). Все расчёты проводили с помощью программы для обработки статистических данных SPSS (версия 22).

Применение разработанных алгоритмов. В ДЯЛКТ были проанализированы, во-первых, особенности внутрислойного распределения нейронов разных типов, во-вторых, зависимость их распределения от эксцентриситета. Всего были изучены 922 клетки (в слое А — 309, в слое А1 — 387 и в слое См — 226). В слоях А и А1 большинство нейронов (57,3–60,5%) относились к типу ВК, в слое См все типы нейронов встречались примерно в равных пропорциях.

Распределение SMI-32⁺-клеток в подслоях ДЯЛКТ. Большинство SMI-32⁺-нейронов локализуется в верхней и нижней третях слоёв А/А1 (см. рисунок, б). Результаты общего распределения клеток хорошо согласуются с ранее полученными данными о том, что Y-нейроны расположены у границ слоёв А и А1 [4] и по наблюдениям других исследователей о том, что большинство SMI-32⁺-клеток локализуется вблизи границ слоёв А/А1 и А1/См [3, 6].

Соотношение числа клеток в центральной части слоя и на его границах, полученное для клеток с различной ориентацией сомы, показало, что наибольшая величина соотношения — у ГК ($23,6 \pm 6,3\%$), минимальная — у ВК ($5,4 \pm 2,6\%$), КК и НК — 13 ± 8 и $12 \pm 6\%$ соответственно. При попарном сравнении отличие группы ГК от остальных групп было значимое (при $P < 0,05$, t-крит.). Ранее на основании морфометрических показателей Y-нейронов разные зависимости их распределения показаны не были.

Распределение SMI-32⁺-клеток ДЯЛКТ в медиолатеральном направлении. В слоях А и

Схема проведения морфометрического исследования латерального коленчатого тела (ЛКТ) (а), особенности общего распределения SMI-32-иммунопозитивных нейронов (б, в) и распределение нейронов разных типов (б, г) в разных слоях (в, г) и подслоях дорсального ядра ЛКТ (ДЯЛКТ) (б).

а — слева сверху — изображение фронтального среза ЛКТ с обозначением границ слоёв ДЯЛКТ; слева снизу — схема ЛКТ, на которой указаны: слои ДЯЛКТ, деление слоёв А и А1 на 3 равные части (верх, середина, низ), наложенная ретинотопическая карта ДЯЛКТ [14], нормированные медиолатеральные координаты Д, МИН — медиальное интерламинарное ядро ЛКТ; справа — примеры клеток с различной ориентацией сомы ($\angle$, значения слева) и округлостью ($\odot$, значения справа); б — относительное содержание всех иммунопозитивных нейронов (общее) и клеток с разной ориентацией сомы (ВК — вертикальные; КК — круглые; НК — наклонные; ГК — горизонтальные клетки) в частях слоёв ДЯЛКТ. По оси абсцисс — А и А1 — слои, В — верх, С — середина, Н — низ слоя; по оси ординат — доля клеток (%) от всех клеток в группе; в, г — распределение всех иммунопозитивных клеток (в) и клеток с разной ориентацией сомы (г) в медиолатеральном направлении в разных слоях ДЯЛКТ; А, А1, См — слои ДЯЛКТ; по осям абсцисс — значения нормированной длины ДЯЛКТ (Д); по осям ординат — доля клеток (%) в — *** различия значимы при $P < 0,001$. Вертикальные отрезки — 95% доверительный интервал

A1 с разным ретинотопическим представительством нами показано в целом равномерное распределение числа клеток (см. рисунок, в). В слое См больше всего клеток располагается в бинокулярной периферии (Д 60–100, см. рисунок, в). Ранее число Y-клеток оценивали по отношению к другой популяции нейронов ДЯЛКТ — X-клеткам, в этом случае показано увеличение относительно числа Y-клеток в представительстве периферии поля зрения [9, 12]. Таким образом, исходя из этих данных, сложно судить об изменении количества собственно Y-клеток и, следовательно, сравнивать их с результатами, полученными в нашей работе. Следует отметить, что сравнение профилей распределения клеток показало значимые различия между слоями A/A1 и слоем См ($P < 0,0001$, К–У, в обоих случаях сравнения), что может отражать различия в характере связей [5] и функционирования [17] Y-клеток этих слоёв.

При рассмотрении распределения клеток с различной ориентацией сомы в медиолатеральном направлении видно, что в слоях A/A1 минимальное количество ВК отмечено на медиальном полюсе ДЯЛКТ, у остальных групп клеток (КК, НК и ГК) такой закономерности не наблюдается (см. рисунок, г). Распределение ВК значительно отличается от такового в клетках остальных групп в слоях А и А1 ($P < 0,0001$, К–С, во всех вариантах сравнения внутри слоёв А и А1). В то же время, в слое См распределения клеток разных групп не отличаются друг от друга ($P = 0,157$, К–У) (см. рисунок, г): клетки максимально представлены в бинокулярной периферии ДЯЛКТ.

Таким образом, нормирование морфометрических данных и их сочетание с точным определением положения клеток в ядре таламуса позволили выявить сложный характер распределения Y-клеток в ДЯЛКТ. Разделение популяции SM1-32⁺-нейронов ДЯЛКТ на 4 группы по признаку ориентации сомы привело к обнаружению разных зависимостей их численности от локализации в слоях ДЯЛКТ и эксцентриситета. Это позволяет предположить, что выявленные группы отражают гетерогенность популяции Y-нейронов ДЯЛКТ (существуют, как минимум, 2 морфофункциональных типа Y-нейронов: ВК и клетки с иной ориентацией сомы). Ранее неоднородность популяции Y-нейронов ДЯЛКТ была выявлена только в электрофизиологическом эксперименте [17].

Продemonстрированные закономерности свидетельствуют о том, что описанные методические приёмы могут быть успешно применены при анализе клеточных популяций ДЯЛКТ у кошки, а также для исследования иных протяжённых, в том числе ламинарно-организованных структур мозга.

Авторы благодарят Н.И.Никитину за выращивание экспериментальных животных и лабораторию физиологии движения Института физиологии им. И.П.Павлова РАН (зав. — Ю.П.Герасименко) за предоставление технических средств оцифровки данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Конюхов А.Л. Руководство к использованию программного комплекса ImageJ для обработки изображений: Учебное методическое пособие. Томск: ТУСУР, 2012.
2. Меркульева Н.С., Михалкин А.А., Никитина Н.И. и др. Изменение формирования Y-нейронов зрительной системы кошки в раннем постнатальном онтогенезе под влиянием бинокулярной ритмической световой стимуляции // Морфология. 2014. Т. 145, вып. 1. С. 13–18.
3. Bickford M.E., Guido W., Godwin D.W. Neurofilament proteins in Y-cells of the cat lateral geniculate nucleus: normal expression and alteration with visual deprivation // J. Neurosci. 1998. Vol. 18, № 16. P. 6549–6557.
4. Bowling D.B., Wieniawa-Narkiewicz E. The distribution of on- and off-centre X- and Y-like cells in the A layers of the cat's lateral geniculate nucleus // J. Physiol. 1986. Vol. 375. P. 561–572.
5. Boyd J.D., Matsubara J.A. Laminar and columnar patterns of geniculocortical projections in the cat: relationship to cytochrome oxidase // J. Comp. Neurol. 1996. Vol. 365, № 4. P. 659–682.
6. Carden W.B., Guido W., Ziburkus J. et al. A novel means of Y cell identification in the developing lateral geniculate nucleus of the cat // Neurosci. Lett. 2000. Vol. 295, № 1–2. P. 5–8.
7. Coleman L.A., Friedlander M.J. Postnatal dendritic development of Y-like geniculocortical relay neurons // Int. J. Dev. Neurosci. 2002. Vol. 20. P. 137–159.
8. Duffy K.R., Slusar J.E. Monocular deprivation provokes alteration of the neuronal cytoskeleton in developing cat lateral geniculate nucleus // Vis. Neurosci. 2009. Vol. 6, № 3. P. 319–328.
9. Hoffman K.P., Stone J., Sherman S.M. Relay of receptive-field properties in dorsal lateral geniculate nucleus of the cat // J. Neurophysiol. 1972. Vol. 35, № 4. P. 518–531.
10. Humphrey A.L., Sur M., Uhlrich D.J., Sherman S.M. Termination patterns of individual X- and Y-cell axons in the visual cortex of the cat: projections to area 18, to the 17/18 border region, and to both areas 17 and 18 // J. Comp. Neurol. 1985. Vol. 233. P. 190–212.
11. Kaplan E. The M, P, and K pathways of the primate visual system revisited // The New Visual Neurosciences. London: MIT Press, 2014. P. 215–227.
12. LeVay S., Ferster D. Relay cell classes in the lateral geniculate nucleus of the cat and the effects of visual deprivation // J. Comp. Neurol. 1977. Vol. 172, № 4. P. 563–584.
13. Murphy P.C., Duckett S.G., Sillito A.M. Comparison of the laminar distribution of input from areas 17 and 18 of the visual cortex to the lateral geniculate nucleus of the cat // J. Neurosci. 2000. Vol. 20, № 2. P. 845–853.
14. Sanderson K.J. The projection of the visual field to the lateral geniculate and medial interlaminar nuclei in the cat // J. Comp. Neurol. 1971. Vol. 143, № 1. P. 101–108.
15. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // Nat. Methods. 2012. Vol. 9, № 7. P. 671–675.

16. Stanford L.R., Friedlander M.J., Sherman S.M. Morphological and physiological properties of geniculate W-cells of the cat: a comparison with X- and Y-cells // J. Neurophysiol. 1983. Vol. 50, № 3. P. 582–608.
17. Yeh C.I., Stoelzel C.R., Alonso J.M. Two different types of Y cells in the cat lateral geniculate nucleus // J. Neurophysiol. 2003. Vol. 90, № 3. P. 1852–1864.

Поступила в редакцию 08.10.2015

Получена после доработки 15.11.2015

A. A. Mikhalkin, N. S. Merkulyeva

THE METHOD OF ANALYSIS OF Y-NEURON POPULATIONS IN THE LATERAL GENICULATE BODY OF THE CAT

The paper presents a method of analysis of cell populations that combines the use of normalized spatial coordinates of the neurons with the morphometric criteria of their evaluation. These algorithms were applied to check the heterogeneity of a

population of neurons Y-conducting channel in cat at the level of the lateral geniculate body (LGB). As a specific marker of Y-neurons, SMI-32 antibodies were used. Evaluated The dynamics of the distribution of the number of cells and the orientation of their soma within each layer and mediolaterally along the length of LGB dorsal nucleus (LGBDN). Among the SMI-32-positive neurons, the existence of at least two populations was detected differing in number, orientation and distribution of the soma in different layers of LGBDN. The heterogeneity of Y-neuron population in LGBDN detected in this study is consistent with the earlier electrophysiological data. We believe that the described algorithm for neuronal analysis may be successfully applied to study not only LGB, but also other extensive structures of the brain, including those having laminar organization.

Key words: *cat visual system, lateral geniculate body, Y-conducting channel, SMI-32 antibodies*

Laboratory of Neuromorphology, RAS I.P.Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg