

Н.С. Меркульева, А.А. Михалкин, Н.И. Никитина, Д.А. Нефёдов и Ф.Н. Макаров

ИЗМЕНЕНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ γ -НЕЙРОНОВ ЗРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КОШКИ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ БИНОКУЛЯРНОЙ РИТМИЧЕСКОЙ СВЕТОВОЙ СТИМУЛЯЦИИ

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

С целью изучения влияния искусственной бинокулярной ритмической световой стимуляции на развитие структурно-функциональной организации γ -нейронов зрительной системы кошки в онтогенезе исследовали распределение в наружном колленчатом теле (НКТ) и заднемедиальном поле латеральной супрасильвиевой борозды (PMLS) нейронов, иммунопозитивных к антителам SMI-32. Анализировали послойное распределение SMI-32-позитивных нейронов и площадь сечения их тел у интактных животных ($n=4$) и у котят ($n=4$), росших в условиях ритмической световой стимуляции с частотой 15 Гц в течение 4 мес. У стимулированных животных выявлено изменение в послойном распределении иммунопозитивных нейронов как в НКТ (снижение доли иммунопозитивных клеток в слое C_M), так и в PMLS (снижение доли иммунопозитивных клеток в слое V). Морфометрический анализ показал, что у стимулированных котят происходит значимое снижение площади сечения тел иммунопозитивных нейронов только в слоях III и V области PMLS. Полученные данные позволяют предположить наличие у стимулированных животных функциональных нарушений γ -проводящего канала, обусловленных выявленными структурно-метаболическими изменениями γ -нейронов.

Ключевые слова: зрительная система, γ -нейроны, ритмическая световая стимуляция, антитела SMI-32

Зрительная система — доминирующий сенсорный анализатор у многих млекопитающих, включая человека. Известно, что развитие высших зрительных функций происходит после рождения; при этом особо выделяют так называемый критический период развития — этап формирования зрительных областей мозга, характеризующийся высоким уровнем структурно-функциональной пластичности [8]. Зрительная система кошки и приматов состоит из нескольких проводящих каналов, различающихся по строению входящих в их состав нейронов, связям и особенностям ответов — это X-, γ - и W-каналы [25]. Эти каналы закладываются и развиваются во время онтогенеза гетерохронно [9, 26], и уровень их чувствительности к модификации зрительного окружения также различен: имеются многочисленные свидетельства о большей уязвимости γ -клеток в условиях зрительной депривации [5, 12]. Известно, что γ -канал ответствен за обработку информации о движении зрительных стимулов и пространственных отношениях между объектами [10].

Во время клеточного морфогенеза важную роль в процессах стабилизации межнейронных связей играют тяжёлые субъединицы нейрофи-

ламентов — триплетных протеинов цитоскелета [6, 16]. В начале 80-х годов L.Sternberger и N.Sternberger [24] синтезировали моноклональные антитела SMI-32 к этим субъединицам, метящие перикарион и дендриты определённой популяции пирамидных нейронов. Эти нейроны характеризуются большими размерами и многочисленными радиально расходящимися дендритами — признаками, свойственными нейронам I типа по классификации R.Guillery [13] и, иначе, относящимся к системе γ -клеток [4, 6, 14]. Таким образом, антитела SMI-32 являются маркером этих клеток.

Цель настоящей работы — изучение воздействия синхронной активации двух глаз — посредством длительной ритмической световой стимуляции с частотой 15 Гц — на формирование γ -клеток в наружном колленчатом теле (НКТ) и зрительной коре.

Материал и методы. Исследование проведено на 8 нормально пигментированных котят в возрасте 4 мес, взятых из 4 помётов. Четыре животных росли в обычных виварных условиях, другие четыре — в течение 4 мес в условиях ритмической световой бинокулярной стимуляции в режиме 12 ч стимуляция, 12 ч — полная темнота.

Сведения об авторах:

Меркульева Наталья Сергеевна (e-mail: mer-natalia@yandex.ru), Михалкин Александр Александрович (e-mail: michalkin@mail.ru), Никитина Нина Ивановна, Нефёдов Денис Александрович (e-mail: den-nefedov86@rambler.ru), Макаров Феликс Николаевич (e-mail: felixmakarov@mail.ru), лаборатория нейроморфологии, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

Стимуляцию проводили в том же помещении, в котором росли животные; для этого оно было полностью изолировано от посторонних источников света, а на его стенах были закреплены 2 светодиодные панели (по 40 светодиодов на каждой стенке, сила света светодиода 1 кд, угол рассеяния 50 °), мерцающие с частотой 15 Гц.

По окончании периода стимуляции (в возрасте 3–4 мес) под общим наркозом (золетил 150 мг/кг, внутримышечно) проводили транскраниальную перфузию животных, последовательно, 1 л 0,9% раствора натрия хлорида и 0,5 л 4% параформальдегида на 0,1 М фосфатном буфере. Содержание животных и все экспериментальные манипуляции проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Извлеченный мозг помещали в 30% раствор сахарозы на 1 сут, на замораживающем микротоме (Reichert, Германия) изготавливали серию фронтальных срезов зрительной коры и НКТ толщиной 50 мкм.

Выявление SMI-32 с помощью непрямого иммуногистохимического метода. Свободно плавающие срезы мозга помещали на 30 мин в 1% NaBH_4 для демаскировки, далее блокировали эндогенную пероксидазную активность погружением в 0,3% H_2O_2 на 15 мин. Подавление неспецифической реакции проводили с помощью 1-часовой инкубации срезов в 2,5% растворе нормальной сыворотки козы (NGS, Vector Labs, Великобритания). Инкубацию с первичными антителами SMI-32 (Sternberger Monoclonals, США) в разведении 1:5000 проводили в течение 70 ч. Инкубацию с вторичными биотинилированными антителами (anti-mouse IgG, Vector Labs, Великобритания) в разведении 1:600 проводили в течение 1 сут. Далее срезы помещали в раствор, содержащий комплекс авидина, биотина и пероксидазы хрена (Vectastain Elite ABC kit, Vector Labs, Великобритания) согласно стандартному протоколу производителя. Образовавшийся продукт реакции при использовании хромоген-содержащего набора (Vectastain DAB kit, Vector Labs, Великобритания) выглядел как сине-серый преципитат. Все растворы готовили на 0,01 М фосфатно-солевом буфере (PBS), в растворы антител добавляли 0,1% NaN_3 . Между всеми процедурами срезы промывали в 0,01 М PBS. Инкубации в растворах антител проводили при температуре 4 °С, остальные инкубации — при комнатной температуре. По окончании процедур выявления SMI-32 срезы монтировали на желатинизированные предметные стёкла, высушивали на воздухе, обезжировали, просветляли в ксилоле и заключали в канадский бальзам.

Для проверки специфичности антител несколько срезов проводили по стандартной методике, но исключали этапы с добавлением раствора первичных или вторичных антител. В этих случаях срезы не содержали иммунопозитивных клеток.

Распределение иммунопозитивных нейронов исследовали в НКТ и в заднемедиальном поле латеральной супрасильвиевой борозды (PMLS) — основной объём афферентных волокон в которое посылают Y-нейроны [3, 10].

Оцифровку срезов и морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной установки, оснащенной световым микроскопом Jenaval (Carl Zeiss, Германия), камерой Baumer Optronix и программным комплексом VideoTest Master 4.0 (VideoTest, Россия). Анализировали относительное содержание иммунопозитивных нейронов и площадь сечения их тел, используя по 5 срезов мозга на уровне А3.0 у каждого из 8 животных. При проведении морфометрического анализа нейронов НКТ данные по слоям А и А1 объединяли, поскольку различия в размерных характеристиках нейронов этих слоёв отсутствуют как в норме, так и у стимулированных живот-

ных. Известно также, что слои А и А1 содержат примерно равное количество SMI-32-позитивных нейронов [20]. Для оценки значимости различий использовали критерий χ^2 .

Исследования проведены с использованием оборудования Ресурсного центра СПбГУ.

Результаты исследования. SMI-32-позитивные нейроны в НКТ. Как у интактных, так и у стимулированных кошек иммунопозитивные нейроны встречаются в НКТ в слоях А, А1, крупноклеточной части слоя С (C_M) (рис. 1) и медиальном интерламнарном ядре и отсутствуют в мелкоклеточной части слоя С. В обоих случаях выявляющиеся нейроны характеризуются большими размерами и имеют многочисленные радиально расходящиеся дендриты.

Морфометрический анализ нейронов НКТ проводили для выборки из 600 нейронов у интактных животных и 750 нейронов при стимуляции. Площадь тела SMI-32-позитивных нейронов у интактных животных составила 342 ± 15 мкм² в слоях А/А1 и 353 ± 14 мкм² — в слое C_M . У стимулированных животных во всех слоях наблюдается незначимое снижение площади тел нейронов (до 313 ± 10 и 335 ± 21 мкм² соответственно, $P > 0,05$).

У интактных животных доля меченых нейронов в слоях А/А1 варьирует от 28 до 62% от общего числа меченых нейронов в НКТ, в слое C_M — от 37 до 72% соответственно (в среднем — 45 и 54%); таким образом относительное содержание нейронов в этих слоях сопоставимо (рис. 2, а). В НКТ у стимулированных животных происходит изменение соотношения меченых нейронов в слоях А/А1 и C_M : увеличение их доли в слоях А/А1 до 79% и снижение — в слое C_M до 21% (см. рис. 2, б).

SMI-32-позитивные нейроны в PMLS. В области PMLS проанализировано около 400 нейронов у интактных животных и 350 нейронов у стимулированных кошек. У животных обеих групп большинство SMI-32-нейронов отмечено в слоях III (в глубокой части слоя) и V, остальные (до 5%) — в слое IV (рис. 3, а, б). В слое III иммунопозитивные нейроны в основном располагаются цепочкой, без видимых скоплений, в слое V иногда встречаются скопления нейронов среднего размера, причем очень крупные и наиболее интенсивно меченные нейроны часто образуют группы по 2–3. Выявлено межгрупповое различие в относительном содержании иммунопозитивных нейронов: в норме большинство нейронов локализуется в слое V (на 12% больше, чем в слое III), в то время как у стимулированных котят, наоборот, в слое III коры их на 22% больше, чем в слое V.

Площадь сечения тел иммунопозитивных нейронов в коре мозга у стимулированных животных значимо меньше, чем у интактных (302 ± 16 и

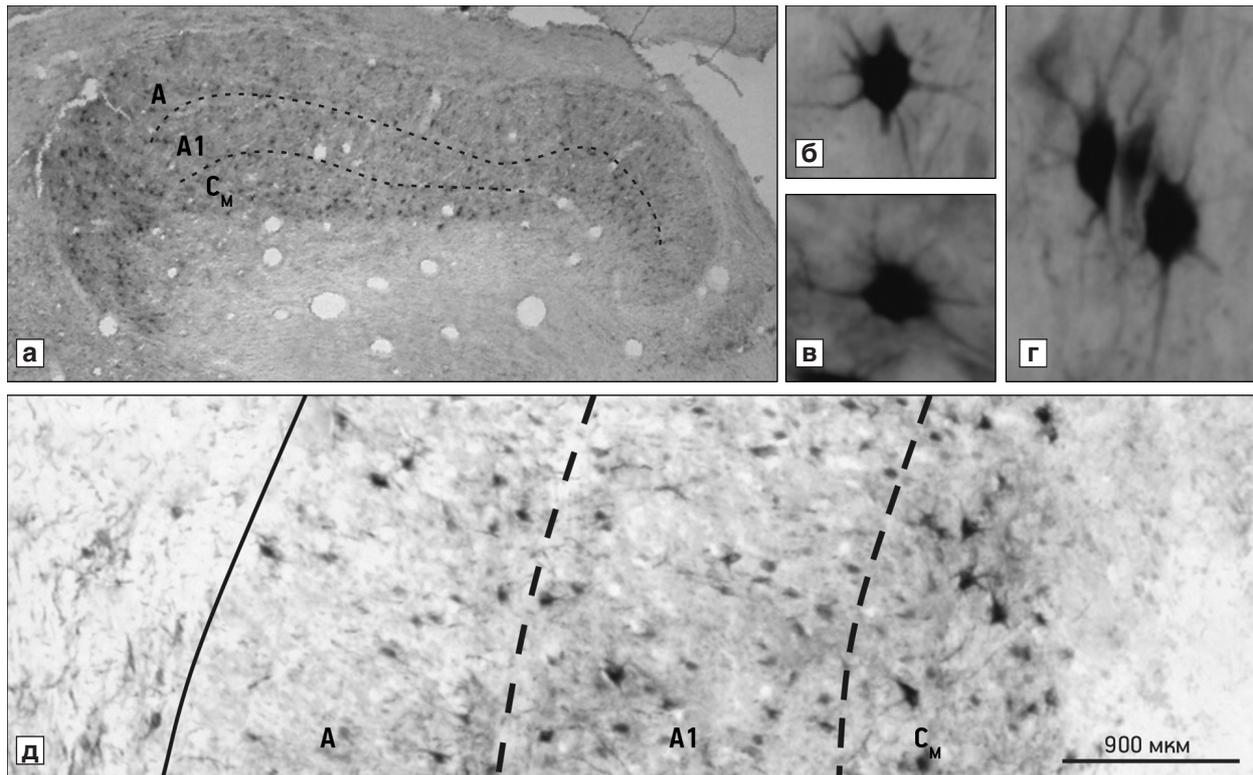


Рис. 1. SMI-32-иммунопозитивные нейроны в наружном колечном теле (НКТ) у кошки.

а — локализация SMI-32-нейронов в НКТ; б-г — отдельные нейроны в слоях А, А1 и С_М соответственно; д — локализация SMI-32-нейронов в НКТ. А, А1 и С_М — слои НКТ. Иммуногистохимическая реакция на SMI-32. а — об.10, ок.10; б-г — об. 100, ок.10

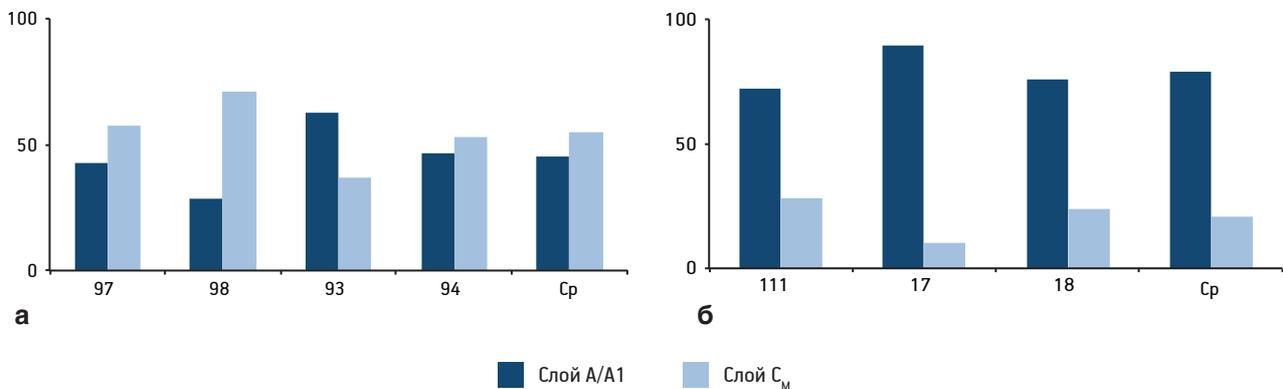


Рис. 2. Относительное содержание SMI-32-иммунопозитивных нейронов в наружном колечном теле (НКТ) у intactных кошек (а) и у животных, выросших в условиях ритмической световой стимуляции (б).

По оси абсцисс — номера животных; Ср — средние значения в группах intactных и стимулированных животных; по оси ординат — доля иммунопозитивных нейронов (%)

394±15 мкм² в слое III и 326±26 и 420±18 мкм² в слое V соответственно, P<0,001). Как видно на рис. 3, в, г, несмотря на значимость различий, выборка нейронов слоя V у экспериментальных животных имеет большие разбросы, чем выборка слоя III. Причиной этого являются очень крупные клетки слоя V (см. рис. 3, б) (с площадью тела свыше 825 мкм²), которые в обеих группах встречаются редко. Исключение этих нейронов из сравниваемых выборок привело к снижению

разбросов значений площади тел нейронов у стимулированных животных, не повлияв при этом на значимость различий между группами (P<0,001).

Обсуждение полученных данных. Проведённая работа является частью комплексного исследования развития зрительной системы в условиях ритмической световой стимуляции. Ранее было показано нарушение развития корково-корковых связей, следующих из первичной зрительной коры к области PMLS [1]; как

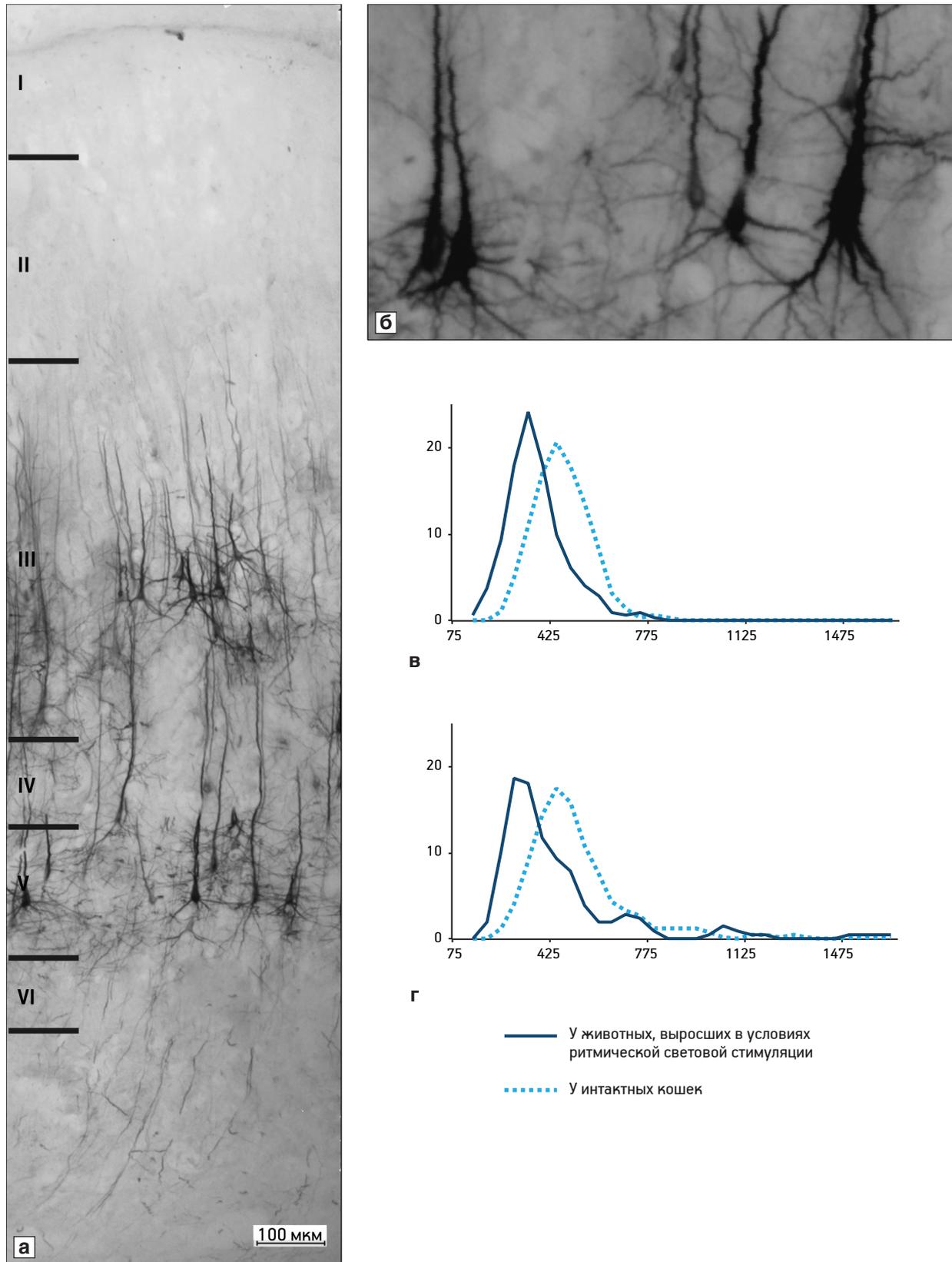


Рис. 3. SMI-32-иммунопозитивные нейроны и их размерные характеристики в заднемедиальной супрасильвиевой борозде коры (PMLS) мозга у кошки.

а — локализация SMI-32-нейронов в коре; I-VI — слои коры; б — два типа нейронов в слое V: крупный нейрон (справа) и группа клеток среднего размера (слева); в, г — гистограммы распределения SMI-32-нейронов, имеющих разную площадь сечения тел в слое III (в) и слое V (г). По оси абсцисс — площадь сечения тел нейронов (мкм); по оси ординат — доля SMI-32-нейронов, имеющих разные значения площади сечения тел (%). а, б — иммуногистохимическая реакция на SMI-32. б — об. 12,5, ок. 10

известно, основное количество волокон, поступающих в эту область, формируют Y-клетки [3, 10]. Данные литературы о нарушении формирования дирекционально селективных нейронов у кошек, росших в условиях стробоскопического освещения [7, 15], также позволяли предположить нарушения в системе именно Y-клеток. Поэтому проведённое исследование было посвящено изучению развития корковых и геникулятных нейронов Y-типа у животных, зрительный опыт которых ограничивался ритмической световой стимуляцией с частотой 15 Гц.

Экспрессия SMI-32 в НКТ. Имеющиеся данные литературы свидетельствуют о количественном и качественном снижении экспрессии нейрофиламентов, метящихся антителами SMI-32, в НКТ монокулярно депривированных животных только в слоях A/A1 (в зависимости от полушария), и сохранении как числа нейронов, так и площади сечения их тел в слое C_M [4]. Выявленные различия авторы объясняют доминированием различного вида «конкуренций» в НКТ: бинокулярной конкуренцией — во всех слоях и «классовой конкуренцией» — между различными классами нейронов (X и Y). Снижение экспрессии нейрофиламентов, метящихся антителами SMI-32, в слоях A/A1 авторы интерпретируют как результат не столько бинокулярной конкуренции, сколько конкуренцией между X- и Y-клетками, а отсутствие изменения в слое C_M тем, что в этом слое соревнования между нейронами Y- и X-типов нет. В нашей работе показано снижение числа иммунопозитивных клеток именно в слое C_M . Можно предположить, что выявленные нами изменения происходят благодаря не бинокулярной, но межклассовой конкуренции в слое C_M . Хотя M. Bickford и соавт. [4] писали об отсутствии межклассовых взаимодействий в слое C_M , нельзя забывать о том, что в этот слой приходят афферентные волокна не только от Y-нейронов, но и от W-клеток [2, 27]; таким образом, выявленные различия между слоями могут отражать межклассовое соревнование между Y- и W-нейронами.

Экспрессия SMI-32 в зрительной области PMLS. Основным результатом этой части исследования явилось обнаружение значительного снижения площади тел SMI-32-иммунопозитивных нейронов в области PMLS. Ранее были выявлены нарушения в системе корково-корковых связей у стимулированных животных [1]. Было предположено, что это нарушение может быть связано с трофическими изменениями в системе инициальных нейронов и/или с нарушением развития системы цитоскелета и структуры аксонов. Данные настоящего исследования подтвержда-

ют это предположение, поскольку взаимосвязь между уровнем экспрессии нейрофиламентов и развитием структуры, а также функции аксонов показана неоднократно [17, 21].

Однако остаётся непонятным отсутствие изменений площади сечения тел нейронов НКТ. С одной стороны, известно, что корковый уровень зрительной системы более пластичен, чем таламический, в силу филогенетической «молодости». Поэтому различия в воздействии ритмической световой стимуляции на SMI-32-нейроны в нашей работе можно было бы объяснить этим фактором. Однако в работах по изучению монокулярной депривации изменения в системе SMI-32-клеток отчетливо выявляют на обоих уровнях [4, 11].

Если принять точку зрения о различном воздействии условий стимуляции на системы X-, Y- и W-нейронов, то отсутствие изменений в НКТ тем более странно, так как эта структура содержит все 3 типа клеток. Вероятным объяснением этого факта может быть влияние различного окружения Y-нейронов и включение их в разные цепи межнейронных взаимодействий в пределах НКТ и PMLS. Известно, что большинство нейронов области PMLS, в отличие от клеток НКТ, бинокулярны [19, 23], поэтому возможно, что нарушения в PMLS могут отражать снижение бинокулярности. Также могут быть важны пространственно-временные настройки нейронов этих двух уровней, поскольку на поле PMLS, в отличие от НКТ, оказывают значительное влияние претектальные области и заднелатеральный комплекс таламуса [18, 22].

Таким образом, мы полагаем, что выявленные изменения в экспрессии нейрофиламентов в системе зрительных Y-нейронов могут лежать в основе нарушения передачи и обработки стимулов этим классом клеток.

Авторы благодарят Н.И. Соколову, О.П. Казину, Ю.П. Митрофанову и Е.И. Данилову за помощь при работе с гистологическим материалом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Меркульева Н.С., Михалкин А.А., Никитина Н.И. и Макаров Ф.Н. Развитие связей первичной зрительной коры с центром анализа движений: роль зрительного окружения. Морфология, 2011, т. 140, вып. 6, с. 24–31.
2. Anderson J.C., Da Costa N.M. and Martin K.A.C. The W cell pathway to cat primary visual cortex. J. Comp. Neurol., 2009, v. 516, p. 20–35.
3. Berson D.M. Cat lateral suprasylvian cortex: Y-cell inputs and corticotectal projection. J. Neurophysiol., 1985, v. 53, p. 544–556.
4. Bickford M.E., Guido W. and Godwin D.W. Neurofilament proteins in Y-cells of the cat lateral geniculate nucleus: normal expression and alteration with visual deprivation. J. Neurosci., 1998, v. 18, p. 6549–6557.

5. Burnat K., Vandenbussche E. and Zernicki B. Global motion detection is impaired in cats deprived early of patterned vision. *Behav. Brain Res.*, 2002, v. 134, p. 59–65.
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. Letters*, 2000, v. 295, p. 5–8.
7. Cynader H., Berman N. and Hein A. Cats reared in stroboscopic illumination: effects on receptive fields in visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, v. 70, p. 1353–1354.
8. Daw N.W. *Visual development*. New York, Springer, 2006.
9. DeAngelis G.C., Ohzawa I. and Freeman R.D. Spatiotemporal organization of simple-cell receptive fields in the cat's striate cortex. I. General characteristics and postnatal development. *J. Neurophysiol.*, 1993, v. 69, p. 1091–1117.
10. Dreher B., Wang C., Turlejski K.J. et al. Areas PMLS and 21a of cat visual cortex: two functionally distinct areas. *Cerebral Cortex*, 1996, v. 6, p. 585–599.
11. Duffy K.R. and Livingstone M.S. Loss of neurofilament labeling in the primary visual cortex of monocularly deprived monkeys. *Cerebral Cortex*, 2005, v. 15, p. 1146–1154.
12. Garraghty P.E., Roe A. and Sur M. Specification of retinogeniculate X and Y axon arbors in cat: fundamental differences in developmental programs. *Dev. Brain Res.*, 1998, v. 107, p. 227–231.
13. Guillery R.W. A study of Golgi preparations from the dorsal lateral geniculate nucleus of the adult cat. *J. Comp. Neurol.*, 1966, v. 128, p. 21–50.
14. Kawasaki H., Crowley J.C., Livesey F.J. and Katz L.C. Molecular organization of the ferret visual thalamus. *J. Neurosci.*, 2004, v. 24, p. 9962–9970.
15. Kennedy H. and Orban G.A. Response properties of visual cortical neurons in cats reared in stroboscopic illumination. *J. Neurophysiol.*, 1983, v. 49, p. 686–704.
16. Kogan C.S., Zangenehpour S. and Chaudhuri A. Developmental profiles of SMI-32 immunoreactivity in monkey striate cortex. *Dev. Brain Res.*, 2000, v. 119, p. 85–95.
17. Kumar S., Yin X., Trapp B.D. et al. Relating interactions between neurofilaments to the structure of axonal neurofilament distributions through polymer brush models. *Biophys. J.*, 2002, v. 82, p. 2360–2372.
18. Lomber S.G., MacNeil M.A. and Payne B.R. Amplification of thalamic projections to middle suprasylvian cortex following ablation of immature primary visual cortex in the cat. *Cerebr. Cortex*, 1995, v. 2, p. 166–191.
19. McCall M.A., Tong L. and Spear P.D. Development of neuronal responses in cat posteromedial lateral suprasylvian visual cortex. *Brain Res.*, 1988, v. 447, p. 67–78.
20. O'Leary T.P., Kutcher M.R., Mitchell D.E. and Duffy K.R. Recovery of neurofilament following early monocular deprivation. *Front. Neurosci.*, 2012, v. 6, p. 1–11.
21. Pasol J., Feuer W., Yang C. et al. Phosphorylated neurofilament heavy chain correlations to visual function, optical coherence tomography, and treatment. *Multiple Sclerosis Int. J.*, 2010, v. 2010, p. 1–15.
22. Rosenquist A.C. Connections of visual cortical areas in the cat. In: *Cerebral Cortex*. New York, London, Plenum Press, 1985, p. 81–117.
23. Sireteanu R. and Best J. Squint-induced modification of visual receptive fields in the lateral suprasylvian cortex of the cat: binocular interaction, vertical effect and anomalous correspondence. *Eur. J. Neurosci.*, 1992, v. 4, p. 235–242.
24. Sternberger L.A. and Sternberger N.H. Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments *in situ*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, v. 80, p. 6126–6130.
25. Stone J. *Parallel processing in the visual system*. New York, London, Plenum Press, 1983.
26. Sur M. Development and plasticity of retinal X and Y axon terminations in the cat's lateral geniculate nucleus. *Brain Behav. Evol.*, 1988, v. 31, p. 243–251.
27. Wilson P.D., Rowe M.H. and Stone J. Properties of relay cells in cat's lateral geniculate nucleus: a comparison of W-cells with X- and Y-cells. *J. Neurophysiol.*, 1976, v. 39, p. 1193–1209.

Поступила в редакцию 11.10.2013

CHANGES OF Y NEURON FORMATION IN CAT VISUAL SYSTEM DURING EARLY POSTNATAL ONTOGENESIS UNDER THE INFLUENCE OF BINOCULAR RHYTHMIC LIGHT STIMULATION

N.S.Merkuliyeva, A.A.Mikhalkin, N.I.Nikitina, D.A.Nefyodov and F.N.Makarov

To examine the effect of an artificial rhythmic light stimulation on the development of structural and functional organization of Y neurons of cat visual system in the ontogenesis, the distribution of the neurons immunopositive to SMI-32 antibodies was studied in lateral geniculate nucleus (LGN) and posteromedial suprasylvian area (PMLS). Laminar distribution of SMI-32-positive neurons and neuronal body profile area were analyzed in intact animals (n=4) and in kittens (n=4) grown under conditions of rhythmic light stimulation with 15 Hz frequency for 4 months. In light-stimulated animals, changes in laminar distribution of immunopositive neurons were detected in both LGN (decline in the percentage of the immunopositive cells in C_M layer) and in PMLS area (decrease in cell count in layer V). Morphometric analysis has shown the significant reduction of cell body profile area in immunopositive neurons in light-stimulated kittens only in layers III and V of PMLS area. The data obtained suggest that Y channel functional disturbances in light-stimulated animals are caused by the structural and metabolic changes detected in Y neurons.

Key words: *Y neurons, visual system, rhythmic light stimulation, SMI-32 antibodies*

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