

© Н. С. Меркульева, А. А. Михалкин, Ф. Н. Макаров, 2014
УДК 611.813.13.018:612.014.44:636.8

Н. С. Меркульева, А. А. Михалкин и Ф. Н. Макаров

РАЗВИТИЕ КЛЕТОК МЕЙНЕРТА В ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЕ МОЗГА КОШКИ В УСЛОВИЯХ СТИМУЛЯЦИИ МЕЛЬКАЮЩИМ СВЕТОМ

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

С целью изучения влияния ритмической световой стимуляции на постнатальное развитие зрительной системы исследовали формирование нейронов Мейнерта в поле 17 и заднемедиальной области латеральной супрасильвиевой борозды (PMLS) у котят, выросших в условиях стимуляции мелькающим светом (частота 15 Гц). Анализировали площадь сечения тел нейронов и уровень активности цитохромоксидазы (ЦО) на фронтальных срезах зрительной коры у контрольных ($n=6$) и стимулированных животных ($n=6$). Выявлено увеличение уровня активности ЦО клеток Мейнерта в поле 17 и в области PMLS, примерно, на 37%. Также показано снижение площади сечения тел нейронов Мейнерта, локализованных в PMLS, на 20% по сравнению с нормой. Обсуждаются наличие у стимулированных животных функциональных нарушений Y-проводящего канала и возможность подавления бинокулярного зрения.

Ключевые слова: зрительная кора, клетки Мейнерта, ритмическая световая стимуляция

Нейрональная пластичность — одно из ключевых понятий в физиологии зрения. За более чем 50 лет изучения её механизмов было, в частности, сформулировано понятие «критического периода» — этапа раннего постнатального онтогенеза, характеризующегося наибольшим уровнем чувствительности к изменению зрительного окружения, а значит — максимальной пластичностью [5]. Среди способов экспериментальной модификации зрительной среды особняком стоит мало изученная стимуляция мелькающим светом (ритмическая световая стимуляция, РСС). Исследуя последствия длительной стимуляции молодых кошек мелькающим светом с частотой 15 Гц, мы обнаружили нарушения в системе корково-корковых связей между полем 17 и заднемедиальной областью латеральной супрасильвиевой борозды — PMLS [2]. Вследствие этого, цель настоящей работы — детальное изучение клеточного состава первичной зрительной коры и области PMLS после стимуляции, в частности анализ клеток Мейнерта — одиночных крупных пирамидных нейронов V слоя, которые организуют нисходящие связи зрительной коры в системе Y-проводящего канала — одного из основных зрительных проводящих каналов, отвечающих за обработку информации о движении и пространственных отношениях объектов [7, 9, 10].

Материал и методы. Работа проведена на 12 нормально пигментированных кошках в возрасте 3 мес, взятых из 5 пометов 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. Шесть животных составили группу контроля, шесть в течение 3 мес (со дня открытия глаз) росли в условиях РСС с частотой 15 Гц в режиме 12:12 (12 ч — стимуляция, 12 ч — полная темнота). Источником мелькающего света являлись две расположенные на противоположных стенах панели светодиодов (по 35 светодиодов каждая), мерцающих с частотой 15 Гц (длительность вспышки 40 мс, яркость панели 40 кд/м²). В возрасте 3 мес животных под общим наркозом (золетил внутримышечно, 1 мл/кг) транскраниально перфузировали 0,9% раствором NaCl и 4% раствором параформальдегида. По окончании перфузии мозг извлекали и помещали в 30% раствор сахарозы до погружения (1–2 сут), после чего изготавливали серию фронтальных срезов толщиной 50 мкм. Визуализацию клеток Мейнерта проводили с помощью гистохимического метода выявления активности фермента цитохромоксидазы (ЦО), содержание которого коррелирует с уровнем функциональной активности нейрона и отдельных нейронов [12, 13]. Морфометрический анализ нейронов слоя V проводили на компьютерной установке, оснащенной световым микроскопом Jenaval (Carl Zeiss, Германия), камерой Baumer Optronix (Baumer GmbH, Германия) и программным комплексом VideoTest Master 4.0 (VideoTest, Россия). Измеряли площадь сечения тел нейронов и отношение оптической плотности ($ОП_{отн}$) клеток Мейнерта ($ОП_{кл}$) к оптической плотности окружающего нейрона, служащего фоном ($ОП_{ф}$), посчитанное по формуле контраста Майкельсона [$ОП_{отн} = (ОП_{кл} - ОП_{ф}) / (ОП_{кл} + ОП_{ф})$]. Выборку составили клетки Мейнерта, локализованные на

Сведения об авторах:

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

40 фронтальных срезах мозга у контрольных животных и на 50 срезах у стимулированных котят, на уровне А4.0—А5.0 по Хорсли—Кларку. Известно, что обычно размер тела нейронов Мейнерта превышает 20×20 мкм [3, 6], в нашем случае параметры нейронов, вошедших в выборку, были такими же. В группе РСС проанализировано 770 нейронов, в группе контроля — 250 нейронов. Для оценки значимости различий ненормальных распределений использовали критерий χ^2 . Исследования проведены с использованием оборудования Ресурсного центра развития молекулярных и клеточных технологий СПбГУ.

Результаты исследования. На фронтальных срезах поля 17 и области PMLS животных обеих групп выявляются одиночные или расположенные группами по 2–3 крупные тёмные пирамидные нейроны со светлым ядром; уровень активности ЦО в цитоплазме этих клеток намного выше, чем в окружающем нейропиле (рис. 1, а, б). Расстояние между нейронами варьирует в широких пределах: от 10 до 2000 мкм. В среднем, в группах контроля и стимуляции эти величины не различаются и составляют, соответственно, 470 ± 87 и 392 ± 3 мкм.

В норме площадь сечения тел нейронов Мейнерта в поле 17 значимо меньше, чем в PMLS (520 ± 25 и 840 ± 60 мкм² соответственно, $\chi^2=63,55$, $P<0,001$). Это различие определяется более широкими разбросами значений в PMLS, где, в отличие от поля 17, около 33% нейронов имели площадь сечения тела свыше 1000 мкм² (рис. 2, а). У стимулированных животных в поле 17 различий площади сечения тел нейронов не выявлено; в области PMLS площадь сечения клеток Мейнерта несколько уменьшается: с 840 ± 60 до 666 ± 20 мкм² ($\chi^2=27,8$, $p=0,05$) (см. рис. 2, б). Следует отметить, что и у контрольных, и у стимулированных животных в области PMLS встречаются особо крупные нейроны площадью сечения свыше 1500 мкм², их доля составляет 2,9 и 2,4% от общего числа нейронов Мейнерта соответственно.

Показателем функциональной активности нейронов Мейнерта в нашем случае является величина ОП_{отн}, отражающая соотношение между уровнями активности ЦО нейрона и окружающего нейропиля. У контрольных животных мы не выявили значимых различий между уровнями ОП_{отн} для клеток поля 17 и области PMLS, величины ОП_{отн} для них идентичны и составляют в обоих случаях $0,10 \pm 0,003$. У стимулированных животных выявлено увеличение уровня ОП_{отн} в обеих зрительных областях (до $0,140 \pm 0,005$ — в поле 17 и до $0,150 \pm 0,005$ — в области PMLS, $P<0,001$, см. рис. 2, в).

Различия между популяциями клеток Мейнерта в области PMLS у контрольных и стимулированных животных наиболее отчетли-

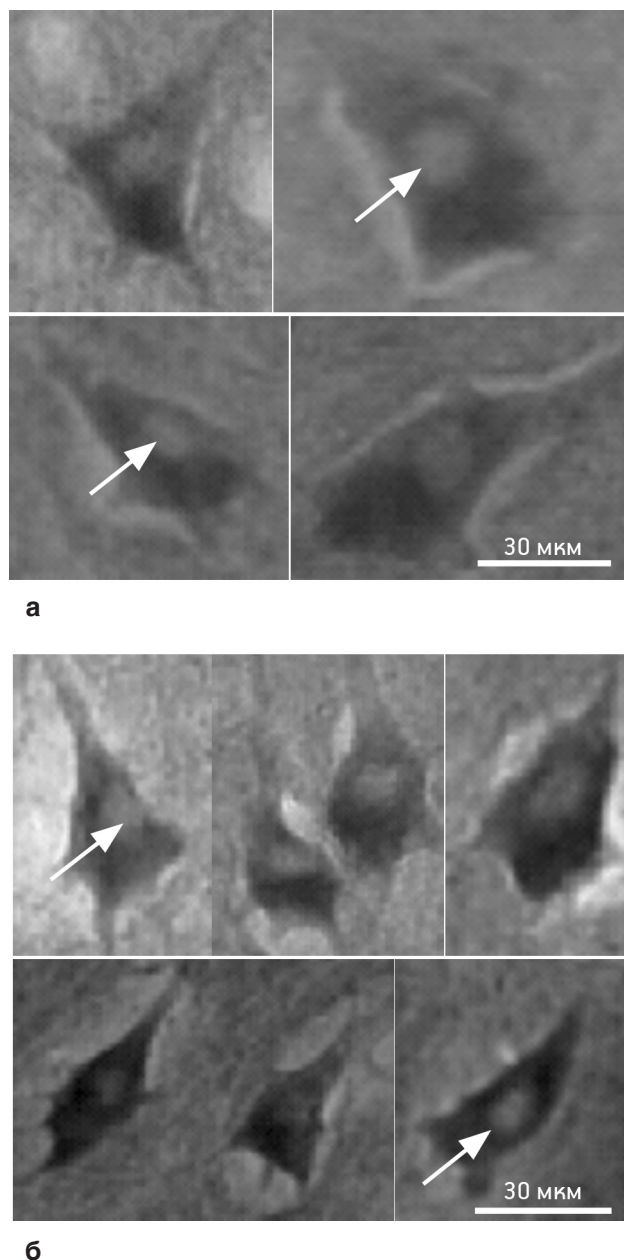


Рис. 1. Клетки Мейнерта в заднемедиальной области латеральной супрасильвиевой борозды у контрольных животных (а) и животных, выросших в условиях ритмической световой стимуляции (б).

Белые стрелки — светлые ядра. Гистохимическая реакция на цитохромоксидазу

вы при сравнении зависимостей между площадью сечения тел этих нейронов и их ОП_{отн} (см. рис. 2, г). В норме эта зависимость представляет собой единое облако распределения значений и иллюстрирует существование линейной зависимости между сравниваемыми параметрами (коэффициент корреляции=0,4, $n=250$, $P<0,0001$). У стимулированных котят зависимость между площадью сечения тел нейронов и их оптической плотностью сохраняется на высоком уровне значимости (коэффициент корреляции=0,13, $n=770$,

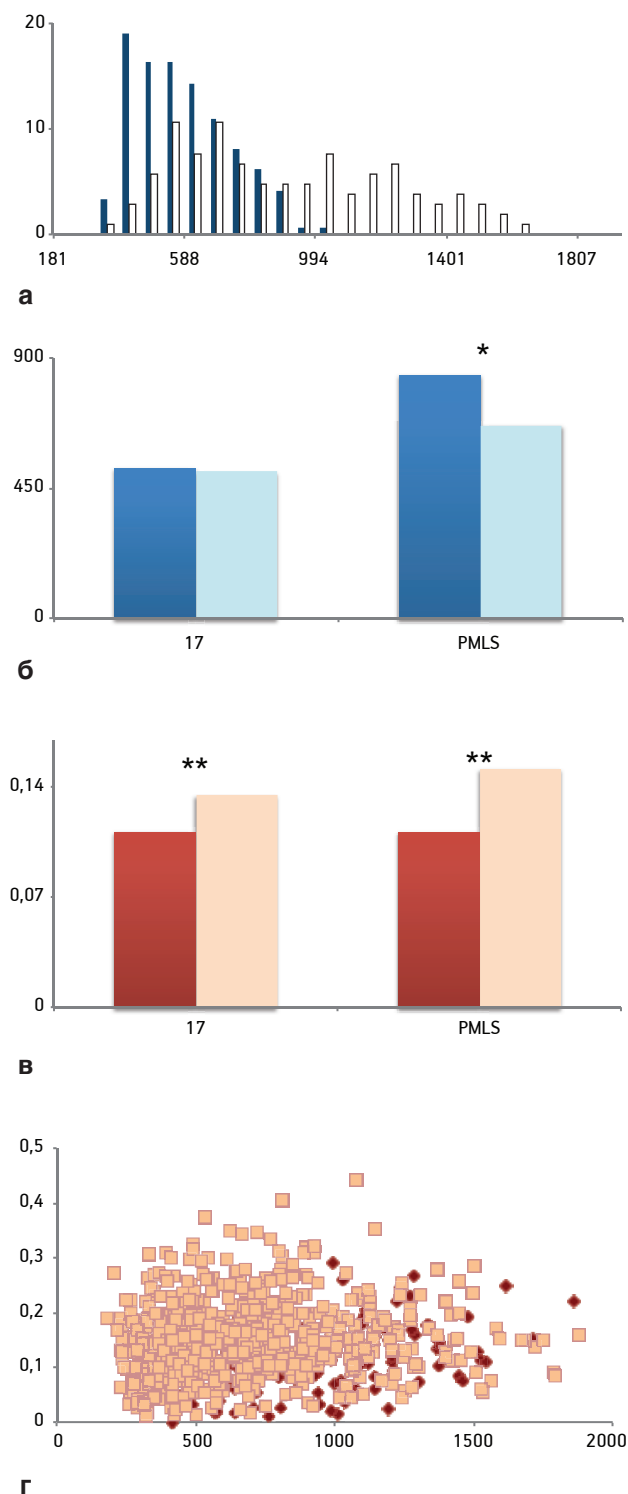


Рис. 2. Параметры клеток Мейнерта в поле 17 и заднемедиальной области латеральной супрасильвиевой борозды (PMLS) у контрольных котят и животных, выросших в условиях ритмической световой стимуляции.

а — гистограмма распределения клеток, имеющих разные значения площади сечения тел, в поле 17 (тёмные столбики) и области PMLS (светлые столбики) у контрольных животных. По оси абсцисс — значения площади сечения тел клеток (μm^2); по оси ординат — доля нейронов, имеющих разные значения площади сечения тел (%); б, в — площадь сечения тел (б) и относительная оптическая плотность нейронов (в) у контрольных котят (тёмные столбики) и при ритмической световой стимуляции (светлые столбики). По оси абсцисс — области мозга; по оси ординат — исследованный показатель: б — μm^2 ; в — усл. ед. Одна звездочка и две звездочки — уровни значимости 99,0 и 99,9% соответственно; г — диаграмма зависимости между показателями площади сечения тел нейронов и их относительной оптической плотности в области PMLS у контрольных животных (чёрные маркеры) и при ритмической световой стимуляции. По оси абсцисс — площадь сечения тела нейрона (μm^2); по оси ординат — относительная оптическая плотность (усл. ед.)

$P < 0,001$), однако диаграмма зависимости имеет уже 2 облака распределения значений: одно из них совпадает с облаком в норме, второе, отсутствующее в норме, соответствует группе нейронов, имеющих меньшую площадь сечения тел и более высокий уровень $\text{ОП}_{\text{отн}}$ (см. рис. 2, г).

Обсуждение полученных данных. Основным результатом данной работы является выявление у стимулированных котят двуомодального распределения клеток Мейнерта по признакам размера их тел и уровня активности ЦО. Одно из облаков распределения совпадает по исследуемым параметрам с таковым в норме, а второе, отсутствующее в норме, содержит нейроны с более высоким уровнем активности ЦО и меньшим размером. Мы затрудняемся дать исчерпывающее объяснение возникновению этого второго распределения. С одной стороны, в работе D.A. Winfield было отмечено, что зрительная кора мозга 2–3-недельных котят, в отличие от коры у котят старшего возраста, содержит в слое V много мелких плотно расположенных клеток, затрудняющих дифференцировку клеток Мейнерта [11]. Если развитие нейронов Мейнерта в условиях стимуляции было затруднено, то причиной наличия у них второй популяции клеток можно считать сохранение этих мелких незрелых нейронов.

С другой стороны — было показано значительное увеличение функциональной активности нейропиля в системе нейронных ансамблей в первичной зрительной коре с высоким уровнем активности ЦО (ЦО-блобов) у кошек, стимулированных мелькающим светом [1], а также сужение блобов, что в свете данных о локализации последних в центрах колонок глазодоминантности [8] позволяет предположить, что усиление активности ЦО имеет место в сегментах колонок глазодоминантности, содержащих исключительно монокулярные нейроны. В исследованиях, проведенных на кошке и приматах, было показано, что терминалы аксонов клеток Мейнерта охватывают соседние колонки глазодоминантности, получающие нервные волокна как от правого, так и от левого глаза, таким образом, была предпо-

ложена их роль в бинокулярном взаимодействии в глубоких слоях зрительной коры [4, 6]. Таким образом, недоразвитие клеток Мейнерта, возможно, отражает нарушение бинокулярного зрения у стимулированных котят.

Как ЦО-блобы, так и клетки Мейнерта относятся к одному и тому же проводящему зрительному каналу — так называемой Y-системе (магно-система у приматов). Полагают, что ее основными функциями являются обработка информации о движении зрительных объектов и анализ взаимоположений стимулов [7, 10]. Выявленные ранее [2] в данной работе и теперь модификации развития элементов этой системы можно рассматривать как одну из причин изменения паттерна корково-корковых связей между полем 17 и областью PMLS у стимулируемых животных.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-31644.

ЛИТЕРАТУРА

1. Меркульева Н. С. и Макаров Ф. Н. Влияние кратковременной и длительной стимуляции мелькающим светом на систему цитохромоксидазных модулей слоя IV первичной зрительной коры котят. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова, 2008, т. 94, № 5, с. 557–565.
2. 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.
3. Chan-Palay V., Palay S. L. and Billings-Gagliardi S. M. Meynert cells in the primate visual cortex. J. Neurocytol., 1974, v. 3, № 5, p. 631–658.
4. Gabbott P. L., Martin K. A. and Whitteridge D. Connections between pyramidal neurons in layer 5 of cat visual cortex (area 17). J. Comp. Neurol., 1987, v. 259, № 3, p. 364–381.
5. Levitt C. N. and Hübener M. Critical-period plasticity in the visual cortex. Annu. Rev. Neurosci., 2012, v. 35, p. 309–330.
6. Li H., Fukuda M., Tanifuji M. and Rockland K. S. Intrinsic collaterals of layer 6 Meynert cells and functional columns in primate V1. Neuroscience, 2003, v. 120, № 4, p. 1061–1069.
7. Maunsell J. H. R. Functional visual streams. Curr. Opin. Neurobiol., 1992, v. 2, № 4, p. 506–510.
8. Nakagama H. and Tanaka S. Self-organization model of cytochrome oxidase blobs and ocular dominance columns in the primary visual cortex. Cereb. Cortex, 2004, v. 14, № 4, p. 376–386.
9. Payne B. R. and Peters A. Cytochrome oxidase patches and Meynert cells in monkey visual cortex. Neuroscience, 1989, v. 28, № 2, p. 353–363.
10. Roksztin A., Márkus Z., Braunitzer G. et al. Visual pathways serving motion detection in the mammalian brain. Sensors (Basel), 2010, v. 10, № 4, p. 3218–3242.
11. Winfield D. A. The effect of visual deprivation upon the Meynert cell in the striate cortex of the cat. Brain Res., 1982, v. 281, № 1, p. 53–57.
12. Wong-Riley M. T. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrated with cytochrome oxidase histochemistry. Brain Res., 1979, v. 171, № 1, p. 11–28.
13. Wong-Riley M. T. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. Trends Neurosci., 1989, v. 12, № 3, p. 94–101.

Поступила в редакцию 31.01.2014

Получена после доработки 01.03.2014

DEVELOPMENT OF MEYNERT CELLS IN CAT VISUAL CORTEX UNDER THE CONDITIONS OF FLICKERING LIGHT STIMULATION

N.S. Merkuliyeva, A.A. Mikhalkin and F.N. Makarov

To examine the effect of rhythmical light stimulation on postnatal development of the visual system, the formation of Meynert cells was studied in area 17 and posteromedial suprasylvian area (PMLS) of kittens reared under the conditions of flickering light stimulation (15 Hz frequency). Profile area of neuronal cell bodies and cytochrome oxidase (CO) activity level were measured in frontal sections of the visual cortex in control (n=6) and stimulated (n=6) kittens. Meynert cells located in area 17 and PMLS demonstrated an approximately 37% increase in CO activity in the stimulated animals. At the same time, the profile area of Meynert cell bodies in PMLS was decreased by 20% as compared to that in normal animals. The presence of functional disturbances of Y-conducting visual channel and the possibility of binocular vision suppression in the stimulated animals are discussed.

Key words: *visual cortex, Meynert cells, rhythmical light stimulation*

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