© С.Н.Топорова, П.Ю.Шкорбатова, С.В.Алексеенко, 2015 УДК 611.813.1.018:636.8

С.Н.Топорова, П.Ю.Шкорбатова, С.В.Алексеенко

## ПОСЛОЙНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ НЕЙРОНОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ МЕЖПОЛУШАРНЫЕ СВЯЗИ, В ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЕ КОШКИ ПРИ НАРУШЕНИИ БИНОКУЛЯРНОГО ЗРЕНИЯ

Лаборатория нейроморфологии (зав. — проф. Ф.Н.Макаров) и лаборатория физиологии зрения (зав. — проф. Ю.Е.Шелепин), Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург

Изучено распределение каллозальных нейронов в слоях коры у интактных (n=7) и подопытных кошек с экспериментально вызванным косоглазием (n=10) и монокулярной депривацией (n=5) после микроионофоретического введения пероксидазы хрена в глазодоминантные колонки полей 17, 18 и переходной зоны 17/18. Обнаружено, что у кошек с нарушениями бинокулярного зрения каллозальные нейроны расположены в слое II/III глубже, а в слое IV выше, чем у интактных кошек. Кроме того, у кошек с нарушениями бинокулярного зрения доля каллозальных нейронов в слое IV возрастает, а в слое II/III — уменьшается по сравнению с таковой у интактных кошек. Эти изменения наиболее выражены при монокулярной депривации. Полученные данные указывают на важную роль сенсорной информации в формировании послойного распределения каллозальных нейронов.

Ключевые слова: зрительная кора, межполушарные связи, косоглазие, монокулярная депривация, кошка

В ранний постнатальный период развития нарушение бинокулярного зрения при анизометропии, косоглазии, катаракте вызывает значительные и, как правило, необратимые изменения зрительных функций: утрачивается способность к фузии и стереопсису, возникает амблиопия глаза — некорректируемое линзами снижение остроты зрения. В экспериментальных исследованиях на животных с искусственно вызванным косоглазием, монокулярной депривацией (модель врожденной катаракты) было показано, что в зрительной области коры уменьшается количество нейронов, активируемых из отклоненного или депривированного глаза, а также из обоих глаз, т.е. бинокулярных клеток [7]. При несогласовании информации, поступающей из разных глаз, нарушение зрительных функций более выражено в центральной части поля зрения [9]. Известно, что в первичной зрительной коре в зоне проекции центрального вертикального меридиана поля зрения расположены нейроны, обеспечивающие межполушарные связи через мозолистое тело (corpus callosum) — каллозальные нейроны (КН). При помощи таких связей происходит объединение правого и левого полуполей зрения глаз, представленных в разных полушариях. КН в основном находятся в поверхностных слоях коры, и их размер в среднем больше, чем клеток, обеспечивающих внутриполушарные связи [10].

У животных, выросших в условиях рассогласования сенсорной информации, поступающей от двух глаз, расширяется зона, в которой расположены КН [5]. При исследовании межполушарных связей нейронов отдельных глазодоминантных (ГД) колонок первичных зрительных полей коры у кошек с косоглазием и монокулярно депривированных кошек нами было показано, что размер зон увеличивается только у колонок нейронов, которые получают иннервацию из интактного глаза [2]. У таких животных КН в среднем крупнее, чем у интактных, тогда как размер клеток, обеспечивающих внутриполушарные связи, не меняется [1, 2]. В этих исследованиях было замечено, что у животных с нарушением бинокулярного зрения КН располагаются в коре глубже, чем у интактных животных.

Цель данной работы — проведение более детального изучения послойной локализации КН у кошек с ранними нарушениями бинокулярного зрения.

Материал и методы. В работе были использованы 7 интактных кошек, 4 кошки с унилатеральным конвергентным косоглазием, 6 кошек с билатеральным конвергентным косоглазием и 5 монокулярно-депривированных кошек. Нарушения бинокулярного зрения вызывали на 8–10-е сутки постнатального развития путем сшивания век одного глаза (монокулярная депривация — МД) или удалением наружной прямой мышцы одного глаза (унилатеральное конвергентное

Сведения об авторах:

Топорова София Николаевна (e-mail: sntoporova@mail.ru), Шкорбатова Полина Юрьевна (e-mail: polinavet@yandex.ru), Алексеенко Светлана Валентиновна (e-mail: binocularity@yandex.ru), лаборатория нейроморфологии и лаборатория физиологии зрения, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, б

Группы кошек	Слои коры					
	II/III			IV		
	Количество КН	Относительная глубина расположения КН, %	Площадь сомы КН, мкм <sup>2</sup>	Количество КН	Относительная глубина расположения КН, %	Площадь сомы КН, мкм <sup>2</sup>
Интактные	77	68±4 (26,66–100,0)	147±16 (59,52–363,0)	4	40±18 (25,0–68,0)	107±32 (76,94–137,15)
При монокулярной депривации	49	75±7 (5,7–100,0)	176±22 (59,03–334,48)	22	26±6 (4,0-60,0)	70±23 (75,29–313,65)
При унилатеральном конвергентном косоглазии	37	83±4 (48,57–100,0)	173±23 (55,25–330,78)	10	29±16 (5,71–71,43)	174±38 (118,3–303,82)
При билатеральном конвергентном косоглазим	69	75±5 (6,66–100,0)	174±16 (59,0–391,0)	11	17±10 (2,86–60,0)	143±33 (68,23–248,82)

Характеристика меченых каллозальных нейронов (КН) в различных слоях коры мозга кошки

Примечание. Представлены средние значения и 95% доверительные интервалы; в скобках — минимальные и максимальные значения.

косоглазие — УКК), или обоих глаз (билатеральное конвергентное косоглазие — БКК). Котята росли в нормальной зрительной среде до 4–6-месячного возраста, затем в кору зрительных полей 17, 18 и переходной зоны между ними микроионофоретически вводили ретроградно транспортируемый маркер — пероксидазу хрена (ПХ). Методика введения и выявления ПХ на срезах мозга подробно описана ранее [3]. Стереотаксические координаты введения ПХ находились в диапазоне Р5—А6. Диаметр зоны введения ПХ в коре (менее 250 мкм) не превышал размеров одной ГД-колонки коры [7]. Исследование проведено с соблюдением основных биоэтических правил обращения с экспериментальными животными.

Границы слоев коры определяли по цитоархитектоническим признакам на срезах, окрашенных сафранином, а также при гистохимическом выявлении активности цитохромоксидазы на соседних срезах [11].

Глазодоминантность инъецированной колонки определяли по соотношению количества меченых нейронов в глазоспецифичных слоях дорсального ядра наружного коленчатого тела (НКТд), т.е. слоях, которые имеют афферентные связи с разными глазами. Доминантный глаз определяли по различию активности фермента цитохромоксидазы в этих же слоях. Локализацию инъецированной колонки в проекции поля зрения определяли с помощью зрительно-топических карт этих полей [15] и расположению меченых нейронов в НКТд [12].

Измерение глубины расположения меченых КН в слоях коры проводили окулярным микрометром (об. 10, ок. 12,5). Поскольку толщина слоев в разных участках коры не одинакова, оценивали относительную глубину расположения клеток в слое, принимая толщину каждого из них за 100%. Учитывая, что слои II и III в поле 17 нечетко разграничены, измеряли их общую толщину и обозначали как слой II/III, как в поле 17, так и в поле 18. При этом глубину локализации клетки измеряли от верхней границы слоя, в котором она расположена.

Размеры меченых КН определяли при общем ув.1500 на цифровых изображениях, которые получали с помощью компьютерной установки, включающей в себя микроскоп Jenaval (Zeiss/Jena, Голландия) и видеокамеру СХ05с (Baumer Optronic, Германия). Площадь сомы клетки измеряли с помощью программы Видео TecT 4.00 Мастер Морфология. На всех срезах у кошек каждой группы подсчитывали количество КН. У кошек контрольной группы при введении ПХ в отдельную ГД-колонку полей 17, 18 меченые нейроны в противоположном полушарии мозга обычно располагались в переходной зоне между этими полями, ширина которой составляет 1 мм; при введении ПХ в ГД-колонку переходной зоны такие нейроны выявлялись на территории полей 17 и 18 на участке шириной 1 мм вблизи переходной зоны. У кошек с нарушенным бинокулярным зрением зона расположения КН была увеличена — меченые нейроны обнаруживались также в более удаленных участках полей 17 и 18 по сравнению с нормой (эктопические клетки) [2]. У таких животных было подсчитано количество КН в основной зоне их расположения, наблюдаемой в норме, и в дополнительной зоне.

Значимость различий сравниваемых величин определяли по непараметрическому критерию Манна—Уитни.

Результаты исследования. Для анализа местоположения КН в слоях коры были использованы данные введения ПХ в 8 ГД-колонок у интактных кошек, 7 ГД-колонок у МД-кошек, 6 ГД-колонок у кошек с УКК и в 8 ГД-колонок у кошек с БКК. У кошек с нарушением бинокулярного зрения исследовали только колонки, иннервируемые из доминантного глаза.

У интактных кошек большинство (95%) меченых КН были выявлены в слое II/III (*табли*иа). На гистограмме распределения нейронов (*рис. 1, а*) видно, что наибольшее количество КН слоя II/III находились в его средней трети, и лишь отдельные клетки встречались в верхней половине. В слое IV были выявлены только 4 меченых КН (от трех инъецированных ГД-колонок), которые были расположены в средней части этого слоя (см. рис. 1, б).

У кошек с нарушением бинокулярного зрения КН в слое II/III были расположены глубже, чем у интактных кошек, большинство клеток локализовались в нижней части слоя III. Глубина локализации этих клеток у животных всех экспериментальных групп значимо отличалась от нормы (P<0,05). В слое IV КН находились в верхней его



Рис. 1. Гистограммы распределения меченых каллозальных нейронов (КН) в слое II/III (а) и в слое IV (б) коры мозга у кошек в норме и при нарушении бинокулярного зрения.

I — интактные кошки; II — после монокулярной депривации; III — при одностороннем конвергентном косоглазии; IV — при двустороннем конвергентном косоглазии. По оси абсцисс — относительная глубина расположения КН от поверхности слоя, выраженная в процентах от толщины этого слоя; по оси ординат — общее количество меченых КН в каждой группе кошек

части (см. таблицу; рис. 1, а) Доля КН в слое IV от общего их количества увеличилась у животных всех экспериментальных групп по сравнению с таковой у интактных кошек и составляла у МД-кошек 31%, у кошек с УКК — 21%, у кошек с БКК — 13%.

При оценке доли клеток слоя IV было обнаружено, что у МД-кошек в основной зоне расположения КН составляли 34,5% от общего количества меченых нейронов этой зоны, в дополнительной зоне — 21,4%, у кошек с УКК — 22,0 и 16,7% соответственно, а у кошек с БКК — 16,1 и 8,7% (*puc. 2*). Таким образом, количество КН в дополнительной зоне этого слоя не является определяющим фактором расширения каллозальной зоны.

У интактных кошек площадь сечения сомы меченых КН слоя II/III в среднем больше, чем у нескольких выявленных нейронов слоя IV (P<0,05). У кошек с нарушениями бинокулярного

зрения средние значения площади сечения сомы меченых нейронов в слое II/III были больше, чем у интактных животных (P<0,005). Размер меченых клеток в слое IV у кошек с нарушениями бинокулярного зрения значимо отличался от такового в норме только у МД-кошек (P<0,01).

Таким образом, ранние нарушения бинокулярного зрения приводят к изменениям глубины локализации КН в зрительной коре, а также к изменениям их размеров.

Обсуждение полученных данных. Проведенное исследование показало, что при ранних нарушениях бинокулярного зрения в дополнение к известному расширению зон КН вдоль направления, тангенциального поверхности зрительной коры [2, 5], наблюдается изменение радиального положения зоны межполушарных связей (послойной локализации КН).

У интактных кошек более 90% КН находятся в супрагранулярных слоях [4]. Большинство из них — пирамидные больших или средних размеров, которые располагаются в слое II/III, а также встречаются и в верхней части слоя IV [13]. Аксоны КН также оканчиваются в основном в супрагранулярных слоях [8]. Однако известно, что у котят зона каллозальных связей расширена [8], и гораздо большее количество КН локализуются в слое IV, чем у взрослых животных; к 3-месячному возрасту их аксоны элиминируются [16]. Выявленное в нашей работе изменение зоны расположения КН в радиальном направлении, т.е. перпендикулярно поверхности коры, предполагает возможность сохранения у кошек с нарушением бинокулярного зрения ювенильной структуры этой зоны.

Вероятно, существует определенная связь между таким ювенильным распределением КН по слоям и отсутствием бинокулярных нейронов в коре. Известно, что у сиамских кошек, у которых наблюдается практически полный перекрест волокон зрительных нервов, бинокулярные клетки в первичной зрительной коре отсутствуют, при этом количество КН снижено в супрагранулярных слоях и увеличено в слое IV [4]. Полученные нами данные об изменениях послойного распределения КН и отсутствие бинокулярных клеток у кошек с нарушениями бинокулярного зрения, описанное в литературе [7], дают основание для такого предположения.

Выявленное в работе увеличение размеров сомы КН, иннервируемых из интактного глаза, возможно происходит вследствие ослабления тормозных влияний от клеток, иннервируемых из косящего или депривированного глаза, активность которых снижена при депривации и косоглазии. Считается, что размер сомы нейрона коррелирует с длиной и толщиной аксона, а также площадью ветвления дендритов. Мы предполагаем, что у клеток, иннервируемых из интактного глаза, может быть также больше величина дендритного поля, так как увеличивается размер зоны таких КН и их аксонов [2, 12].

Изменение послойной локализации КН, обнаруженное в настоящей работе, может быть связано с нарушением миграции нейронов из корковой пластинки к своему местоположению в слое коры или с нарушением процесса дифференцировки пирамидных нейронов в непирамидные. Основанием для этих предположений могут служить следующие сведения.

Известно, что миграция нейронов завершается к 21-м постнатальным суткам [14], а в нашей работе операции по формированию нарушений





По оси абсцисс: I — при одностороннем конвергентном косоглазии; II — при двустороннем конвергентном косоглазии; III — при монокулярной депривации; по оси ординат — относительное содержание клеток (%)

бинокулярного зрения были проведены на 8–10-е сутки, т.е. раньше этого срока. В связи с такими ранними нарушениями бинокулярного зрения возможны задержка миграции клеток и стабилизация их аномального положения в слоях.

Известно также, что некоторые пирамидные нейроны, аксоны которых формируют межполушарные связи в ранний постнатальный период, в процессе созревания коры теряют апикальный дендрит и становятся звездчатыми [16]; затем происходит ретракция аксона из мозолистого тела, и сохраняются только те аксонные коллатерали, которые образуют внутриполушарные связи [8]. Недавно было показано, что зрительная деафферентация вызывает нарушение дифференцировки пирамидных нейронов в звездчатые [6]. Нарушения бинокулярного зрения, исследованные в данной работе, могут иметь сходный эффект.

Для того, чтобы выявить механизмы, приводящие к нарушению послойной локализации КН, необходимы дальнейшие исследования с использованием маркеров дифференцировки или миграции клеток.

## ЛИТЕРАТУРА

 Алексеенко С.В., Шкорбатова П.Ю., Топорова С.Н. Влияние косоглазия и монокулярной депривации на размер каллозальных клеток в полях 17 и 18 коры кошки // Росс. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. 2012. Т. 98, № 4. С. 479–487.

- Алексеенко С.В., Шкорбатова П.Ю., Топорова С.Н., Солнушкин С.Д. Влияние косоглазия и монокулярной депривации на структуру межполушарных связей в проекционных зрительных полях коры кошки // Сенсорные системы. 2012. Т. 26. № 2. С. 106–116.
- Шкорбатова П.Ю., Топорова С.Н., Макаров Ф.Н., Алексеенко С.В. Внутрикорковые связи глазодоминантных колонок полей 17 и 18 при экспериментальном косоглазии у кошки // Сенсорные системы. 2006. Т. 20, № 4. С. 309–318.
- Berman N. E., Grant S. Topographic organization, number, and laminar distribution of callosal cells connecting visual cortical areas 17 and 18 of normally pigmented and Siamese cats // Vis. Neurosci. 1992. Vol. 9, № 1. P. 1–19.
- Bui Quoc E., Ribot J., Quenech'Du N. et al. Asymmetrical interhemispheric connections develop in cat visual cortex after early unilateral convergent strabismus: anatomy, physiology, and mechanisms // Front. Neuroanat. 2012. Vol. 5. P. 1–129.
- Callaway E. M., Borrell V. Developmental sculpting of dendritic morphology of layer 4 neurons in visual cortex: influence of retinal input // J. Neurosci. 2011. Vol. 31, № 20. P. 7456–7470.
- Hubel D.H., Wiesel T.N. Brain and visual perception: the story of a 25-year collaborathien. New York: Oxford Univ. Press, 2005.
- Innocenti G. M., Aggoun-Zouaoui D., Lehmann P. Cellular aspects of callosal connections and their development // Neuropsychologia, 1995. Vol. 33, № 8. P. 961–987.
- Kiorpes L., Kiper D.C., O'Keefe L.P. et al. Neuronal correlates of amblyopia in the visual cortex of macaque monkeys with experimental strabismus and anisometropia // J. Neurosci. 1998. Vol. 18. P. 6411–6424.
- Matsubara J.A., Chase R., Thejomaven M. Comparative morphology of three types of projection-identified pyramidal neurons in the superficial layers of cat visual cortex // J. Comp. Neurol. 1996. Vol. 366. P. 93–108.
- Payne B.R., Peters A. The Concept of Cat Primary Visual Cortex. In: The Cat Primary Visual Cortex. San Diego: Acad. Press, 2002. P. 1–29.
- Sanderson K.J. The projection of the visual field to the lateral geniculate and medial lateral nuclei in the cat // J. Comp. Neurol. 1971. Vol. 143, № 1. P. 101–117.

- Segraves M.A., Rosenquist A.C. The distribution of the cells of origin of callosal projections in cat visual cortex // J. Neurosci. 1982. Vol. 2, № 8. P. 1079–1089.
- Shatz C.J., Luskin M.B. The relationship between the geniculocortical afferents and their cortical target cells during development of the cat's primary visual cortex // J Neurosci. 1986. Vol. 6, N
  12. P. 3655–3668.
- Tusa R. J., Palmer L. A., Rosenquist A. C. Multiple cortical areas: Visual field topography in the cat. In: Cortical Sensory Organization. Vol. 2. N. Y.: Humana Press, 1981. P. 1–31.
- Vercelli A., Assal F., Innocenti G.M. Emergence of callosally projecting neurons with stellate morphology in the visual cortex of the kitten // Exp. Brain Res. 1992. Vol. 90, № 2. P. 346–358.

Поступила в редакцию 27.07.2014 Получена после доработки 19.01.2015

## LAMINAR LOCATION OF NEURONS PROVIDING INTERHEMISPHERIC CONNECTIONS IN THE VISUAL CORTEX IN CATS WITH IMPAIRMENTS OF BINOCULAR VISION

## S.N. Toporova, P.Yu. Shkorbatova, S.V. Alekseyenko

The distribution of callosal cells in the visual cortical layers of intact cats (n=7) and cats with experimentally induced strabismus (n=10) and monocular deprivation (n=5) was studied after microiontophoretic injection of horseradish peroxidase into the ocular-dominance columns in areas 17, 18 and the transition zone 17/18. It was found that in cats with impaired binocular vision, the callosal cells were located deeper in layers of II/III, and higher — in layer IV, as compared to those in intact cats. Also in cats with impaired binocular vision, the proportion of callosal cells in layer IV was increased, while in layers II/III it was reduced as compared to intact cats. The most pronounced changes were noted in monocular deprived animals. These findings suggest an important role of sensory input in the formation of the callosal neurons layer distribution.

**Key words:** visual cortex, interhemispheric connections, strabismus, monocular deprivation, cat

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