

А.Г. Сухов¹, Е.Ю. Кириченко², Л.А. Беличенко²

СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПАРВАЛЬБУМИН-СОДЕРЖАЩИХ НЕЙРОНОВ СОМАТОСЕНСОРНОЙ ЗОНЫ SI КОРЫ МОЗГА У КРЫС

¹ Лаборатория экспериментальной нейробиологии (зав. — д-р биол. наук А.Г. Сухов), ² лаборатория функциональной нейроморфологии и электронной микроскопии (зав. — канд. биол. наук Е.Ю. Кириченко), Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного Федерального университета, г. Ростов-на-Дону

Целью настоящей работы являлось послойное морфометрическое и иммуногистохимическое изучение парвальбумин-позитивных (РА⁺) нейронов в соматосенсорной зоне (SI) коры мозга у белых беспородных крыс (n=10). При исследовании фронтальных и тангенциальных срезов толщиной 60 и 4 мкм выявлено значительное разнообразие по форме, размеру тел и ветвлению отростков РА⁺-нейронов во всех слоях коры. Наибольшее количество РА⁺-нейронов (47,1%) располагаются в IV слое коры, в зоне формирования баррелей. При исследовании тангенциальных срезов показано, что наибольшее количество РА⁺-нейронов локализованы в септах баррелей (43%). Наиболее плотно в IV слое они расположены в стенках барреля, благодаря чему можно отчетливо выявить его контуры. Количественное преобладание РА⁺-нейронов в септах может быть связано с направлением хода их дендритов во внутреннюю часть барреля и формированием дендро-дендритных щелевых контактов, что, в свою очередь, может являться морфологической основой индивидуального локального пейсмейкерного ритмогенеза и регуляции функционального состояния корковых колонок.

Ключевые слова: кора большого мозга, баррели, нейроны, парвальбумин, иммуногистохимия

Тормозная система коры большого мозга играет доминирующую роль в регуляции функционального состояния как отдельных корковых колонок, так и мозга в целом [5]. В настоящее время выделяют до 21 типа тормозных нейронов, имеющих различные морфологические особенности, происхождение, спайковую активность, а также разнообразные добавочные нейропептиды [4]. Парвальбумин (РА) является кальций-связывающим внутриклеточным протеином, характерным почти для 40% всех ГАМК-ергических интернейронов ЦНС, основными функциями которого являются участие в высвобождении нейромедиатора, а также стабилизация содержания внутриклеточного кальция после реполяризации клетки. Интернейроны неокортекса, содержащие РА, являются быстроспайковыми и происходят из временной структуры, присутствующей на эмбриональной стадии развития и являющейся зачатком базальных ганглиев — ганглионарного бугорка [2]. Интерес к исследованию этой группы тормозных интернейронов возрос за последние несколько лет: от единичных работ в 1986–1987 гг. до полутора тысяч публикаций,

индексируемых в PubMed только в 2014 г. [8]. По современным данным РА-содержащие нейроны в коре большого мозга способны формировать несколько нейронных сетей, соединенных как химическими, так и электрическими синапсами, при этом, функциональное назначение этих сетей, а также их связь с колончатой организацией неокортекса требует дальнейшего выяснения [1, 7]. Исследование структурно-функциональной организации и морфологическая характеристика РА-содержащих, предположительно, ГАМК-ергических быстроспайковых нейронов корковых колонок может способствовать пониманию их роли в процессах торможения, синхронизации и регуляции ритмогенеза как коры, так и подкорковых структур. Цель настоящей работы — послойное морфометрическое исследование нейронов, содержащих РА сомато-сенсорной зоны SI неокортекса у крыс.

Материал и методы. Исследование проведено на беспородных лабораторных белых крысах (n=10) обоего пола массой 150–200 г. Содержание животных и экспериментальные исследования осуществлялись в соответствии с протоколом, утвержденным Комиссией по биоэтике Южного

Сведения об авторах:

Сухов Александр Георгиевич (e-mail: w701@krinc.ru), Кириченко Евгения Юрьевна (e-mail: kiriche.evgeniya@yandex.ru), Беличенко Лилия Александровна (e-mail: labelichenko@gmail.com), лаборатория экспериментальной нейробиологии, лаборатория функциональной нейроморфологии и электронной микроскопии, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного Федерального университета, 344090, г. Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1

федерального университета 18.04.2012 г. Объектом исследования являлась соматосенсорная зона коры (SI). Под глубоким эфирным наркозом, после внутривенной инъекции гепарина животным проводили транскардиальную перфузию фосфатным буфером, затем раствором 4% параформальдегида с 0,05% глутаральдегидом на фосфатном буфере. Через 2 ч после окончания перфузии головной мозг извлекали и оставляли для дофиксации в холодильнике при температуре 4 °C в фиксирующем растворе на всю ночь. Тангенциальные и фронтальные срезы толщиной 60 мкм изготавливали на вибраторе VT 1000E (Leica, Германия). После криопротекции в 30% сахарозе на фосфатном буфере срезы мгновенно замораживали над парами жидкого азота, затем размораживали в фосфатном буфере и инкубировали 4 сут при температуре 10 °C с первичными моноклональными антителами к PA (Sigma, Швеция) в разведении 1:100, 1:1000. После промывки в фосфатном буфере срезы инкубировали во вторичных антителах RTU Envision Flex/HRP (Dako, Германия) всю ночь. Для проведения иммуногистохимической реакции на тонких срезах мозг заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 4 мкм, которые помещали на стекла с полилизинным покрытием и далее инкубировали с первичными моноклональными антителами к PA (Sigma, Швеция) в разведении 1:100. Как для тонких срезов, так и для срезов толщиной 60 мкм, выявление иммунных комплексов проводили с использованием системы визуализации Dako EnVision System+Peroxidase (DAB) (Dako, Германия). Срезы толщиной 60 мкм после дополнительной фиксации 1% четырехокисью осмия и обезвоживания заливали плоскопараллельным методом в эпоксидную смолу. Полученные срезы (тонкие 4 мкм и толстые 60 мкм) изучали под светоптическим микроскопом Leica 2500 (Leica, Германия) со встроенной цифровой камерой Leica DFC 495. Подсчет количества нейронов и их отростков проводили только на срезах толщиной 60 мкм, поскольку это позволяло идентифицировать большее количество клеток, чем на тонких срезах толщиной 4 мкм. Морфометрию проводили при помощи модуля интерактивных измерений (LAS Interactive Measurement) лицензионной программы Leica Application Suite 4.3 (Leica, Германия). Подсчет PA-позитивных (PA⁺) нейронов проводили на 4 фронтальных срезах толщиной 60 мкм на площади 10 000 мкм² в каждом слое коры. Всего во всех слоях было подсчитано 360 иммунопозитивных клеток. Было также оценено количественное распределение PA⁺-нейронов в зоне формирования баррелей коры (IV слой), поскольку этот слой, как было нами обнаружено, содержит наибольшее количество исследуемых клеток. После идентификации баррельной коры PA⁺-нейроны были подсчитаны между баррелями (в септах), в стенках и во внутренней части каждого барреля. Всего было подсчитано 748 иммунопозитивных клеток в 10 баррелях на площади 519 710,3 мкм².

Результаты исследования. При светоптическом исследовании как на толстых, так и на тонких фронтальных срезах после иммуногистохимической реакции практически во всех слоях соматосенсорной зоны коры SI обнаруживаются множество интенсивно окрашенных клеток с разнонаправленными отростками, экспрессирующими исследуемый антиген PA (PA⁺-нейроны). Проведенное исследование выявило локализацию продуктов реакции в цитоплазме, в ядре, а также

в аксонах и дендритах исследуемых нейронов. IV слой коры определяется в виде зоны с более плотным содержанием PA, что лучше видно на толстых срезах (рисунк, а, в). При больших увеличениях отмечено, что этот эффект обеспечивается скоплением в области формирования баррелей тел PA⁺-нейронов, а в нейропиле — многочисленных пересечений отростков этих клеток (см. рисунок, г). Вокруг PA-негативных клеток наблюдается образование темного ободка — вероятно в результате формирования дендро-соматических и аксо-соматических синаптических контактов между отростками PA⁺-нейронов и телами других нейронов.

При изучении как тонких, так и толстых срезов отмечено морфологическое различие тел PA⁺-нейронов, а также характера ветвления их отростков (см. рисунок, б, д–з). По форме тел PA⁺-нейроны в различных слоях коры могут быть разделены на звездчатые, вытянутые, округлые и треугольные, а по характеру их отростков на униполярные, биполярные и мультиполярные с ветвящимися дендритами (см. рисунок, б). Для I слоя коры в основном характерны нейроны, площадь сечения тел которых не превышает 60 мкм². II слой коры содержит PA⁺-нейроны с более широким разбросом площадей тел, чем слой I, но доминируют клетки с диапазоном площади тел 60–90 мкм². Как в III, так и в IV слое коры представлены различные по строению PA⁺-нейроны с площадью тел от 60 до 180 мкм². В V и VI слоях находятся нейроны с наибольшим разбросом площадей их тел: половина PA⁺-нейронов в этих слоях имеют крупные тела — 150–360 мкм², другая часть клеток имеют меньшие размеры — 30–120 мкм². В целом, исследование площади тел PA⁺-нейронов в разных слоях коры демонстрирует тенденцию увеличения размеров клеток по направлению к ее глубоким слоям.

При послойном подсчете PA⁺-нейронов на фронтальных срезах толщиной 60 мкм на площади 10 000 мкм² в каждом слое коры было обнаружено, что из всех подсчитанных 360 иммунопозитивных клеток, 47,1% располагались в IV слое, во II слое — 8,3%, в III слое — 10,9%, в V слое — 17,1%, в VI слое — 14%. Наименьшее количество PA⁺-нейронов находилось в I молекулярном слое коры — 2,6% от всех учтенных PA⁺-нейронов.

На тангенциальных срезах толщиной 60 мкм на площади 519 710,3 мкм² среди всех подсчитанных в баррельной зоне PA⁺-нейронов (748 клеток) наибольшее их содержание было обнаружено между баррелями — в септах — 43%, в стенках баррелей 26%, во внутренней части барреля — 31% (см. рисунок, и). При этом, PA⁺-нейроны

плотнее расположены в стенке барреля (12 ± 8 клеток на $10\,000\text{ мкм}^2$), чем в его внутренней части ($5,0 \pm 2,2$ клетки) и в септах ($4,2 \pm 1,7$ клетки).

Обсуждение полученных данных. Существуют несколько классификаций ГАМК-ергических интернейронов ЦНС. Они могут быть дифференцированы на основании функциональных электрофизиологических характеристик, по типу формирования синаптических контактов с телами и отростками других клеток, по времени и месту происхождения из ганглионарного бугорка, по типу прорастания аксона интернейрона и др. [4]. Наиболее общепринятыми являются классификации тормозных интернейронов по экспрессии молекулярных маркеров, таких как соматостатин, холицистокинин, нейропептид Y и по экспрессии Ca^{2+} -связывающих протеинов, среди которых кальбиндин, кальретинин, PA [5, 13]. Нейроны, содержащие PA, по существующим данным, представлены двумя основными морфологическими группами: аксо-аксональные или «канделяброподобные» (axo-axonal, chandelier cells), осуществляющие пресинаптическое торможение на начальном сегменте аксонов пирамидных нейронов, и мультиполярные корзинчатые (basket cells), формирующие синаптические контакты на проксимальной части дендрита [6]. Однако проведенное иммуногистохимическое исследование с использованием антитела к PA показало большее разнообразие форм тел PA^+ -нейронов и характера ветвления их отростков, что может быть основанием для выделения дополнительных подтипов в зависимости от морфологических характеристик этих нейронов. Результаты проведенного нами морфометрического исследования показали, что по площади тел PA^+ -нейроны можно разделить на мелкие (до 60 мкм^2), средние (до 150 мкм^2) и крупные (до 360 мкм^2).

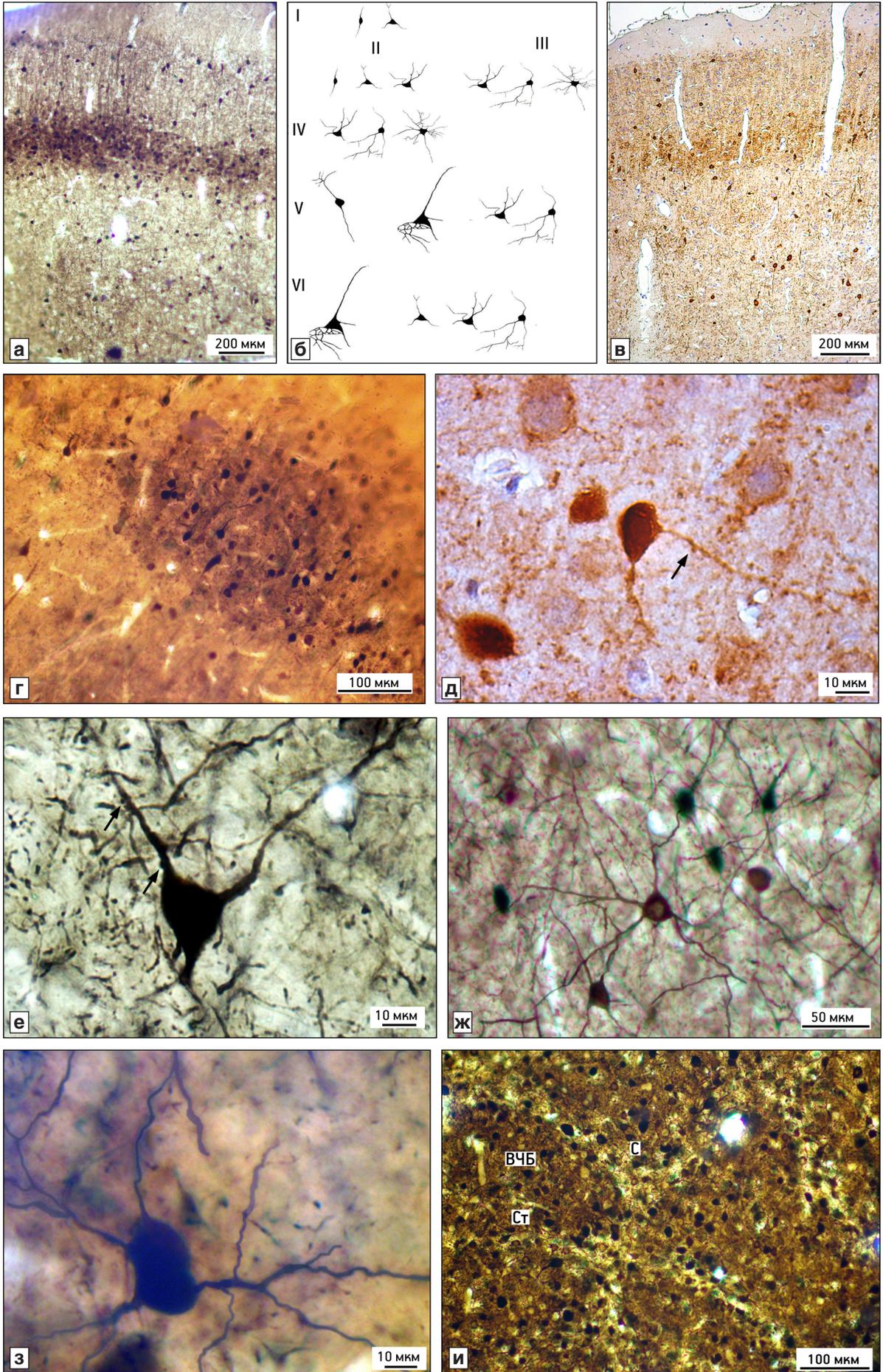
Неоднородность выявленных морфологических признаков может быть связана с различным функциональным назначением PA^+ -интернейронов, а также с дифференциальной экспрессией генов между дорсальной и медиальной частями ганглионарного бугорка, из которых в

процессе онтогенеза развиваются различные субпопуляции исследуемых нейронов [15].

При морфометрическом исследовании PA^+ -нейронов в различных слоях соматосенсорной зоны коры SI было обнаружено, что в I слое их доля была наименьшей, в литературе сведения о наличии или отсутствии PA^+ -нейронов в этом слое довольно противоречивы [3, 10]. По нашим данным, PA^+ -нейроны I молекулярного слоя по своим размерам сопоставимы с PA^+ -нейронами наружного зернистого (II) слоя и при подсчете могут быть отнесены к нему ошибочно. Количество PA^+ -нейронов, по нашим данным, имеет слабо выраженную тенденцию к увеличению от супрагранулярных — II–III к инфрагранулярным — V–VI слоям. Наибольшее количество PA^+ -нейронов локализовано в IV слое коры, в зоне формирования модульных группировок баррелей. При исследовании тангенциальных срезов нами было показано, что наибольшее количество PA^+ -нейронов располагаются в септах баррелей (43%), при этом наиболее плотно они расположены в стенках барреля, благодаря чему можно видеть четкие контуры баррелей IV слоя. Преобладание количества PA^+ -нейронов в септальной области может быть связано с направлением хода дендритов PA^+ -нейронов во внутренней части барреля и формированием дендро-дендритных щелевых контактов, что, предположительно, может являться морфологической основой индивидуального локального пейсмейкерного ритмогенеза в баррелях и колонках зоны коры SI [8]. Имеются данные, что возрастание гиперполяризации приводит к активации на мембранах тел и аксонов PA^+ -нейронов потенциалзависимых калиевых H-каналов, продуцирующих волны эндогенной пейсмейкерной активности и демонстрирующих высокую пороговую активацию и дезактивацию [9, 11, 12, 14]. Щелевые контакты, объединяющие сети тормозных PA^+ -нейронов, способствуют облегчению синхронизации осцилляторной активности пейсмейкерных калиевых каналов и проведению сигнала с минимальной синаптической задержкой [1].

Послойное распределение и морфологические характеристики парвальбумин-содержащих (PA^+) нейронов соматосенсорной зоны SI коры мозга крыс.

а — распределение PA^+ -нейронов на фронтальном эпоновом срезе толщиной 60 мкм — IV слой коры выглядит темным; б — различные морфологические формы PA^+ -нейронов (зарисовка с оригинальных фотографий); в — распределение PA^+ -нейронов на фронтальном срезе толщиной 4 мкм ; г — локализация PA^+ -нейронов внутри одного барреля размером 300 мкм^2 в IV слое на фронтальном срезе толщиной 60 мкм ; д — биполярный нейрон с экспрессией PA на срезе толщиной 4 мкм ; сформированный шипик дендрита (стрелка); е — PA^+ -нейрон с телом треугольной формы в V слое; сформированные шипики дендритов (стрелки); ж — «классический» звездчатый PA^+ -нейрон в IV слое коры; з — два контактирующих крупных PA^+ -нейрона с округлыми телами и с ветвящимися отростками; и — распределение PA^+ -нейронов в баррельной коре на тангенциальном срезе толщиной 60 мкм . С — септа барреля; Ст — стенка барреля; ВЧБ — внутренняя часть барреля; I–IV — слои коры. Иммуногистохимическая реакция



Таким образом, в результате настоящей работы установлены закономерности количественного послойного распределения PA⁺-нейронов, что может определять их функциональную роль в организации внутрикolumnчатой ритмической активности коры мозга. Обнаружено морфологическое разнообразие формы и размеров тел PA⁺-нейронов и характера ветвления их отростков в каждом слое, а также в колонках зоны SI, что способствует пониманию роли нейронов разного размера в структурно-функциональной организации колонок каждого слоя зоны SI. PA⁺-нейроны выявлены во внутренней части, стенках и септах барреля с существенным преобладанием их в септах. Разнообразие интернейронов может являться структурной основой для выполнения PA⁺-нейронами таких функций, как регуляция нормальной активности нейронов, генерация осцилляторной активности нейронных сетей, буферизация кальция, регуляция синаптической пластичности, обеспечение нейропротекторной функции, а также баланса между возбуждением и торможением в соматической коре. Однако, несмотря на то, что по морфологическим характеристикам PA⁺-нейроны разделяются довольно четко, дальнейшее исследование дифференциальной экспрессии генов в них, по нашему мнению, будет способствовать созданию геномного классификатора, существенно дополняющего и уточняющего морфофункциональную классификацию интернейронов.

Работа выполнена при поддержке внутреннего гранта Южного федерального университета № 213.01-07-2014/05 ПЧВГ.

ЛИТЕРАТУРА

- Кириченко Е.Ю., Сухов А.Г., Логвинов А.К., Повилайти-те П.Е. Анализ пространственного расположения щелевых контактов относительно химических синапсов на серийных ультратонких срезах баррельной коры крыс // *Морфология*. 2012. Т. 141, вып. 2. С. 13–17.
- Cuzon Carlson V.C., Yeh H.H. GABAA receptor subunit profiles of tangentially migrating neurons derived from the medial ganglionic eminence // *Cereb. Cortex*. 2011. Vol. 21, № 8. С. 1792–1802.
- Bezaire M.S., Soltesz I. Quantitative assessment of CA1 local circuits: Knowledge base for interneuron-pyramidal cell connectivity // *Hippocampus*. 2013. № 23. P. 751–785.
- DeFelipe J., Lopez-Cruz P.L., Benavides-Piccione R. et al. New insights into classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. Vol. 14, № 3. P. 202–216.
- Druga R. Neocortical inhibitory system // *Folia Biol.* 2009. Vol. 55. P. 201–247.
- Fish K.M., Hoffman G.D., Sheirh W. et al. Parvalbumin-containing chandelier and basket cell boutons have distinctive modes of maturation in monkey prefrontal cortex // *J. Neurosci.* 2013. Vol. 33, № 19. P. 8352–8358.
- 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.
- Fukuda T., Kosaka T., Singer W., Galuske R.A. Gap junctions among dendrites of cortical GABAergic neurons establish a dense and widespread intercolumnar network // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26, № 13. P. 3434–3443.
- Golding N.L., Spruston N. Dendritic sodium spikes are variable triggers of axonal action potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons // *Neuron*. 1998. Vol. 21. P. 1189–1200.
- Inan M., Blázquez-Llorca L., Merchán-Pérez A. et al. Dense and overlapping innervation of pyramidal neurons by chandelier cells // *J. Neurosci.* 2013. Vol. 33, № 5. P. 1907–1914.
- Martina M., Vida I., Jonas P. Distal initiation and active propagation of action potentials in interneuron dendrites // *Science*. 2000. Vol. 287. P. 295–300.
- Stuart G.J., Sakmann B. Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites // *Nature*. 1994. Vol. 367. P. 69–72.
- Suzuki N., Bekkers J.M. Inhibitory neurons in the anterior piriform cortex of the mouse: classification using molecular markers // *J. Comp. Neurol.* 2010. Vol. 518, № 10. P. 1670–1687.
- Vervaeke K., Lorincz A., Nusser Z., Silver R.A. Gap junctions compensate for sublinear dendritic integration in an inhibitory network // *Science*. 2012. Vol. 335. P. 1624–1628.
- Wonders C.P., Taylor L., Welagen J. et al. A spatial bias for the origins of interneuron subgroups within the medial ganglionic eminence // *Dev. Biol.* 2008. Vol. 314, № 1. P. 127–136.

Поступила в редакцию 30.04.2015

STRUCTURAL CHARACTERISTICS AND SPATIAL ORGANIZATION OF THE PARVALBUMIN-CONTAINING NEURONS OF THE SOMATOSENSORY AREA OF THE SI CEREBRAL CORTEX IN RATS

A.G. Sukhov¹, Ye. Yu. Kirichenko², L.A. Belichenko²

The aim of the study was laminar morphometric study of immuno-labeled parvalbumin containing (PA⁺) neurons of cortical somatosensory area SI in outbred albino rats (n=10). The study of frontal and tangential sections 60 μm and 4 μm thick demonstrated a considerable diversity in cell body shape and size as well as in branching of the processes in PA⁺neurons in all the layers of the cortex. The greatest number of PA⁺neurons (47.1%) was found in layer IV of the cortex, in the zone of barrel formation. The study of tangential sections has shown that the largest number of PA⁺neurons was localized in the barrel septa (43%). In layer IV, their greatest density was detected in the walls of the barrel, making it possible to clearly identify their outlines. Quantitative predominance of PA⁺neurons in the septa may be associated with the direction of their dendrite course into the inner part of the barrel and the formation of dendro-dendritic gap junctions that, in turn, could be a morphological basis of individual local pacemaker rhythmogenesis and regulation of the functional state of the cortical columns.

Key words: cerebral cortex, barrels, neurons, parvalbumin, immunohistochemistry

¹ Laboratory of Experimental Neurobiology, ² Laboratory of Functional Neuromorphology and Electron Microscopy, D.I. Ivanovsky Academy of Biology and Biotechnology, Southern Federal University, Rostov-on-Don