

© Н. С. Меркульева, А. А. Михалкин, А. А. Вещицкий, 2015
УДК 611.814.7:636.8

Н. С. Меркульева, А. А. Михалкин, А. А. Вещицкий

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ЗАДНЕЛАТЕРАЛЬНОМ ЯДРЕ ТАЛАМУСА КОШКИ

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

С помощью техники гистохимического выявления фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) у 2-недельных котят ($n=4$) в отличие от котят в возрасте 14 нед ($n=4$) показано существование локусов с высокой активностью фермента в латеральном ядре заднелатерального комплекса таламуса. Выявленные локусы располагаются напротив подобных локусов в медиальном ядре заднелатерального комплекса. Обсуждается возможная связь между выявленными АХЭ-локусами и организацией таламокорковых и корково-таламических проекций.

Ключевые слова: заднелатеральный комплекс таламуса, ацетилхолинэстераза, ранний постнатальный онтогенез, кошка

Передача информации из сетчатки глаза в кору мозга осуществляется, главным образом, через таламические ядра, у кошки — через комплекс заднелатеральных ядер (ЗЛЯ) и ядер подушки. Комплекс ЗЛЯ состоит из двух ядер: латерального (ЗЛЯл) и медиального (ЗЛЯм), это деление основано на доминировании определённых проекций на эти структуры: из передних холмиков крыши среднего мозга — в ЗЛЯм и из первичной зрительной коры — в ЗЛЯл. Таким образом, ЗЛЯл, в отличие от других ядер в комплексе ЗЛЯ — подушка, получает больший объём афферентных волокон из зрительной коры [5]. Известно, что нейроны, связывающие это ядро со зрительной корой, распределены в нём не равномерно, но группируются в кластеры [2]. Зачастую кластеры инициальных нейронов являются основой модульной организации структуры, как это показано для коры, однако в ЗЛЯл до сих пор не обнаружена модульная организация, и это ядро рассматривали, скорее, как однородное по свойствам и химизму. Поскольку таламокорковые отношения закладываются в позднем пренатальном — раннем постнатальном онтогенезе, мы предположили, что основу упорядоченной организации инициальных нейронов ЗЛЯл следует искать у незрелых животных. В этом поиске мы обратили внимание на ацетилхолинэстеразу (АХЭ) — фермент, катализирующий гидролиз ацетилхолина. Ацетилхолин является не только нейромедиатором, но и нейромодулятором и контролирует процесс построения межнейронных связей [7], во время раннего раз-

вития в некоторых зрительных структурах обнаруживается временное неравномерное распределение продукта гистохимической АХЭ-реакции, которое у взрослых животных исчезает [8]. Цель нашего исследования — изучение распределения АХЭ в ЗЛЯл у котят.

Материал и методы. Протоколы экспериментов были одобрены комиссией по этике Института физиологии им. И. П. Павлова РАН 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. Исследование проведено на 8 нормально пигментированных котятах в возрасте 2 ($n=4$) и 14 ($n=4$) нед, росших в обычных виварных условиях. Под общим наркозом (золетил внутримышечно, 150 мг/кг) проводили транскардиальную перфузию животных, последовательно 0,9% раствором хлорида натрия и 4% параформальдегидом на 0,1 М фосфатном буфере. Извлеченный мозг помещали в 30% раствор сахарозы на 2 сут, на замораживающем микротоме OMS-69 (Reichert, Германия) изготавливали серию фронтальных срезов таламуса толщиной 50 мкм.

АХЭ выявляли с помощью гистохимического модифицированного метода Карновского—Рута [9]. После промывки срезов в 0,1 М малеатном буфере (pH 6,3) срезы преинкубировали в растворе, содержащем 3,15 мМ хлорида кобальта, 5 мМ цитрата натрия и 2,5 мМ ферроцианида калия в 0,1 М малеатном буфере (pH 6,3). После 30-минутной преинкубации срезы переносили во вторую порцию раствора, содержащего также смесь 160 мМ ацетилхолинйодида и 40 мМ ацетилтиохолинйодида. Длительность инкубации составляла 24 ч при 4° С. По окончании инкубации срезы промывали в малеатном буфере, монтировали на желатинизированные предметные стёкла, высушивали на воздухе, обезвоживали,

Сведения об авторах:

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

просветляли в ксилоле и заключали в канадский бальзам. Продукт реакции представлял собой преципитат изумрудно-зелёного цвета.

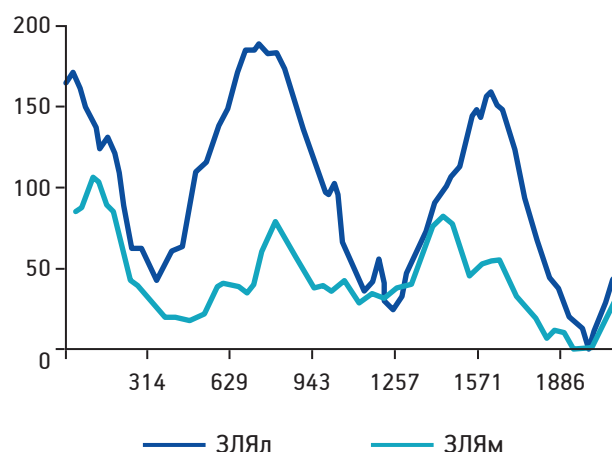
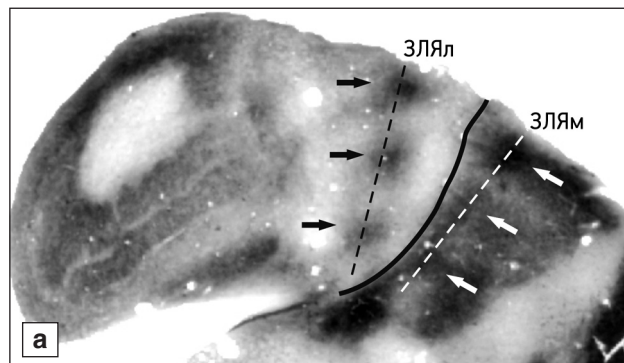
Оцифровку срезов и морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной установки, оснащенной световым микроскопом Jenaval (Carl Zeiss, Германия), камерой Optronix (Baumer Optronix GmbH, Германия). Морфометрический анализ проводили в свободной программе ImageJ. Распределения АХЭ в ЗЛЯл у каждого животного исследовали на 10 срезах. Исследования проведены с использованием оборудования «Ресурсного центра молекулярных и клеточных технологий» Санкт-Петербургского государственного университета (РЦ РМиКТ СПбГУ).

Результаты исследования. У всех котят наибольший уровень активности АХЭ наблюдался в ЗЛЯм и наружном коленчатом теле, а ЗЛЯл в целом было окрашено слабо. При этом у 2-недельных животных в ЗЛЯл выявлялись шаровидные локусы с более интенсивно окрашенным нейропилем (рисунки, а, в). Эти локусы лучше выражены на срезах стереотаксического уровня $A_{3,0}$ – $A_{4,5}$. Размер выявленных локусов с высоким содержанием АХЭ в ЗЛЯл составил 200–350 мкм — вдоль длинной оси и 250–350 мкм — вдоль короткой оси; расстояние между центрами локусов составило 500–825 мкм. Важно отметить, что на всех срезах каудального уровня $A_{3,0}$ – $A_{4,5}$ у всех животных всегда выявляется равное количество локусов с высоким содержанием АХЭ [3, 4]. На роstralных уровнях таламуса эти локусы меняют свою форму: некоторые сливаются друг с другом, другие разделяются на более мелкие; при этом теряется их строгая упорядоченность.

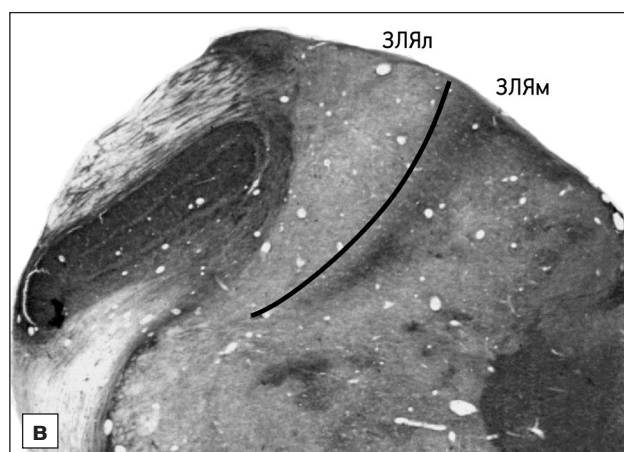
Контрастирование изображений позволяет увидеть, что в ЗЛЯм также присутствуют локусы с более интенсивно окрашенным нейропилем; они расположены напротив соответствующих локусов в ЗЛЯл. Локусы с высоким содержанием АХЭ в ЗЛЯл и ЗЛЯм расположены напротив друг друга (см. рисунок, б).

У животных в возрасте 14 нед ядро ЗЛЯл имеет однородную слабую окраску и не содержит локусов с отличающимся от среднего по ядру уровнем активности АХЭ (см. рисунок, в).

Обсуждение полученных данных. В данной работе мы обнаружили в ЗЛЯл систему упорядоченно расположенных локусов с высоким содержанием АХЭ. До этого подобное неравномерное распределение АХЭ было выявлено в других зрительных структурах: ЗЛЯм таламуса и передних холмиках крыши среднего мозга [5]. Однако эти структуры сами по себе характеризуются высоким содержанием АХЭ; тогда как содержание АХЭ в ЗЛЯл у взрослых кошек [3] и подростков (как мы показали в этой работе) низкое. У 2-недельных котят локусы с высоким



б



Распределение продукта гистохимической реакции выявления ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в заднелатеральных ядрах (ЗЛЯ) таламуса у котят в возрасте 2 (а, б) и 14 нед (в).

а — экспрессия АХЭ в медиальном и латеральном (ЗЛЯм и ЗЛЯл) ядрах на фронтальном срезе мозга котёнка 2 нед. Видны овальные локусы с более интенсивным мечением, чем в окружающей ткани (стрелки); чёрная линия — граница ядер; б — изменения значений яркости вдоль прямых, проходящих через локусы интенсивного мечения (чёрная кривая — вдоль чёрной пунктирной прямой в ЗЛЯл, светлосерая кривая — вдоль белой пунктирной прямой в ЗЛЯм на рис. а); по оси абсцисс — расстояние вдоль пунктирных прямых на рис. а, в пикселах; по оси ординат — яркость, отн.ед. г — распределение АХЭ в ЗЛЯм и ЗЛЯл на фронтальном срезе мозга котёнка 14 нед; черная линия — граница ядер

содержанием АХЭ расположены в ЗЛЯм и ЗЛЯл напротив друг друга. Принимая во внимание тот факт, что ЗЛЯм получает основные проекции от передних холмиков [5], можно предположить, что АХЭ-локусы в ЗЛЯл также маркируют зоны, получающие проекции от передних холмиков. Это предположение подкрепляется данными исследований, в которых в наиболее латеральной части ЗЛЯл на границе с подушкой были выявлены меченые нейроны после введения антероградного трейсера в передние холмики крыши среднего мозга [1].

Нейроны ЗЛЯл, посылающие афферентные волокна в зрительную кору, организованы кластерным образом [2]; более того, подобная кластеризация показана также и для нейронов, получающих ретинальные, стволовые и корковые проекции [1, 4, 6]. Таким образом, как следует из сказанного выше, во-первых, ЗЛЯл можно считать модульной структурой, во-вторых, вероятным кандидатом на роль молекулярной основы этой модульности могут быть локусы с высоким содержанием АХЭ.

Работа поддержана грантом ОФФМ.

Коллектив авторов выражает признательность проф. R. Veh (Institut für Anatomie der Charité, Humboldt-Universität Berlin, Germany) за помощь при постановке гистохимической реакции выявления ацетилхолинэстеразы. Авторы благодарят Н.И. Никитину, Н.И. Соколову и О.П. Казину за помощь в обработке гистологического материала и работе с животными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abramson B.P., Chalupa L.M. Multiple pathways from the superior colliculus to the extrageniculate visual thalamus of the cat // J. Comp. Neurol. 1988. Vol. 271. P. 397–418.
2. Berson D.M., Graybiel A.M. Organization of the striate-recipient zone of the cat's lateralis posterior-pulvinar — complex and its relation with the geniculostriate system // Neuroscience. 1983. Vol. 9. P. 337–372.
3. Berson D.M., Graybiel A.M. Tectorecipient zone of cat lateral posterior nucleus: evidence that collicular afferents contain

acetylcholinesterase // Exp. Brain Res. 1991. Vol. 84. P. 478–486.

4. Boire D., Matteau I., Casanova C., Ptito M. Retinal projections to the lateral posterior-pulvinar complex in intact and early visual cortex lesioned cats // Exp. Brain Res. 2004. Vol. 159. P. 185–196.
5. Graybiel A.M., Berson D.M. Histochemical identification and afferent connections of subdivisions in the lateralis posterior-pulvinar complex and related thalamic nuclei in the cat // Neuroscience. 1980. Vol. 5. P. 1175–1238.
6. Pospichal M.W., Stepniewska I., Wimborne B.M., Kaas J.H. Lateral division of the lateral posterior region: Connections with area 18 in cats // Vis. Neurosci. 1996. Vol. 13. P. 1167–1172.
7. Rasmusson D.D. The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity // Behav. Brain Res. 2000. Vol. 115. P. 205–218.
8. Robertson R.T., Poon H.K., Mirrafati S.J., Yu J. Transient patterns of acetylcholinesterase activity in developing thalamus: a comparative study in rodents // Dev. Brain Res. 1989. Vol. 48. P. 309–315.
9. Schatz C.R., Geula C., Morecraft R.J., Mesulam M.M. A one-step cobalt-ferrocyanide method for histochemical demonstration of acetylcholinesterase activity in central nervous system tissue // Histochem. Cytochem. 1992. Vol. 40. P. 431–434.

Поступила в редакцию 25.12.2014

PECULIARITIES OF THE DISTRIBUTION OF ACETYLCHOLINESTERASE IN THE LATERAL POSTERIOR NUCLEUS OF THE THALAMUS OF THE CAT

N.S. Merkulyeva, A.A. Mikhalkin, A.A. Veshchitskiy

Using the technique of histochemical detection of enzyme acetylcholinesterase (AChE), the existence of the loci with high enzyme activity in the lateral nucleus of the lateral posterior thalamic complex was demonstrated in 2-week-old kittens (n=4) in contrast to the kittens aged 14 weeks (n=4). These loci were located opposite similar loci in the medial nucleus of the lateral posterior thalamic complex. Possible link between identified AChE-positive loci and the organization of thalamo-cortical and cortico-thalamic projections is discussed.

Key words: *lateral posterior thalamic complex, acetylcholinesterase, early postnatal ontogenesis, cat*

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