

16. Robinson J.M., Roos D.S., Davidson R.L. and Karnovsky M.J. Membrane alterations and other morphological features associated with polyethylene glycol induced cell fusion. *J. Cell Sci.*, 1979, v. 40, p. 63–75.

Поступила в редакцию 11.03.10
Получена после доработки 26.04.10

EXPERIMENTAL MODELING AND THE DISCUSSION ON THE SYNCYTIAL CONNECTIONS IN THE NERVOUS SYSTEM

*O.S. Sotnikov, N.M. Paramonova, A.A. Loktionova and
I.A. Solovyova*

To solve the problem of the possibility of syncytial connection in the nervous system, this paper for the first time presents the evidence of experimental syncytial fusion of neurons. Neurons, isolated from the ganglia of the mollusc *Lymnaea stagnalis* and freed from the surrounding glia by pronase treatment, were drawn together by centrifugation and were kept in the culture

medium for two days in the aggregated state. The neurons preserved the ability to generate normal processes. At the borders of adjacent cells, contacting mutual protrusions (feet) were formed that were separated from each other by vacuole-like enlargements of the intercellular clefts. Using the electron microscope, it was shown that at the borders of contacting feet the external cell membranes were destroyed. Only residual fragments of the destroyed membranes were detected. The cytoplasm of one adjacent cell was continuous with the cytoplasm of the other. Thus, the experiments confirm once more the correctness of the cell theory concerning the common main properties of all the cells and expand the concepts of the neuronal theory by the statement that in the nervous system, along with chemical synapses and electrical membrane contacts, the syncytial interneuronal connections are also possible.

Key words: *neurons, culture, syncytial connections*

Laboratory of Neuron Functional Morphology and Physiology, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg

© Н.С. Меркульева, Ф.Н. Макаров, 2010
УДК 612.823.5:612.65:636.8

Н.С. Меркульева и Ф.Н. Макаров

РАЗВИТИЕ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ УПОРЯДОЧЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ КОРКОВО-КОРКОВЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ЗРИТЕЛЬНЫМ ПОЛЕМ 17 И ЗАДНЕМЕДИАЛЬНОЙ СТЕНКОЙ ЛАТЕРАЛЬНОЙ СУПРАСИЛЬВИЕВОЙ БОРОЗДЫ У КОШКИ

Лаборатория нейроморфологии (зав. — проф. Ф.Н. Макаров), Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: mer-natalia@yandex.ru

Проведено исследование развития кластерной организации корково-корковых связей между зрительным полем 17 и заднемедиальной стенкой латеральной супрасильвиевой борозды (поле PMLS) у кошки. Ретроградный аксональный маркер пероксидазу хрена микроинъекцировали в область PMLS. Распределение меченых инициальных нейронов анализировали в поле 17 у котят в возрасте 5 и 12 нед. Показано значимое увеличение площади участка коры, содержащего меченые нейроны, и снижение плотности их расположения в период между 5-й и 12-й неделями. Анализ амплитудного и фазового спектров Фурье демонстрирует различия характера распределения меченых нейронов у котят разных возрастных групп и свидетельствует о незавершенности формирования у них кластерной организации связей. Обсуждаются временные морфофункциональные особенности развития межкорковых связей зоны PMLS по сравнению с другими зрительными корковыми областями.

Ключевые слова: *корково-корковые связи, поле 17, заднемедиальная стенка латеральной супрасильвиевой борозды, кошка, ранний онтогенез*

Изучение структуры межнейронных отношений неокортекса привело к созданию теории колончатой (модульной) организации [12, 13]. Модульность первичной зрительной коры (поле 17) у высших млекопитающих прослеживается на всех уровнях организации её межнейронных связей: в строении горизонтальных [5, 14], корково-корковых связей [1, 6] и проявляется упорядоченностью расположения групп (кластеров) нейронов, формирующих эти контакты. Известно, что формирование кластеров, как и других корковых

колонок, происходит во время критического периода раннего постнатального онтогенеза, который характеризуется высоким уровнем нейрональной и синаптической пластичности [8, 16].

Для указанного периода характерны не только развитие основных (простых) зрительных функций (например остроты зрения), но и формирование таких сложных актов зрительного восприятия, как способность оценивать пространственные отношения между объектами, движение в трехмерном зрительном пространстве [7,

18]. Одним из высших центров обработки такой информации является область, локализуемая в заднемедиальной стенке латеральной супрасильвиевой борозды (posterior medial lateral suprasylvian area — поле PMLS). Исследование развития корково-корковых связей между ним и полем 17 у кошки показало, что в период между 5-й и 12-й неделями происходят определенные количественные изменения структуры этих связей [2]. Цель настоящей работы — исследования корково-корковых связей между областью PMLS и полем 17 у кошки в раннем постнатальном онтогенезе.

Материал и методы. Исследование выполнено на 14 нормально пигментированных беспородных котят. Все манипуляции с животными проведены в соответствии с «Правилами содержания и использования лабораторных животных» (Вашингтон, 1996). Животным в возрасте 5 нед (n=7) или 12 нед (n=7) под наркозом (Золетил, 50 мг/кг, внутримышечно) в поле PMLS (в область представительства центра поля зрения: $0-15^\circ$ по горизонтальному меридиану и

$-10/+10^\circ$ по вертикальному меридиану) вводили ретроградно транспортируемый маркер пероксидазу хрена (0,08–0,1 мкл). Спустя 48 ч под глубоким наркозом (Золетил внутривенно, 150 мг/кг) проводили транскардиальную перфузию, последовательно, 1 л 0,9% раствора хлорида натрия и 0,7 л раствора фиксатора (1% параформальдегид и 2,5% глутаральдегид на 0,1 М фосфатном буфере) [2]. На замораживающем микротоме изготавливали серию парасагиттальных срезов толщиной 50 мкм с расстоянием между соседними срезами 100 мкм. Гистохимическую реакцию проводили по методу М.-М. Mesulam [11], меченые инициальные нейроны анализировали в поле 17. Оцифрованные изображения срезов, полученные с помощью установки для анализа изображений, снабженной видеокамерой Baumer Opttronix (Германия), обрабатывали по разработанному ранее алгоритму [3] и получали двухмерные паттерны распределения инициальных нейронов, а затем — их амплитудные и фазовые спектры Фурье.

Результаты исследования. У котят в возрасте 5 нед инициальные нейроны в поле 17 преимущественно локализируются в центре области мечения (рис. 1, а), в то время как у 12-недельных

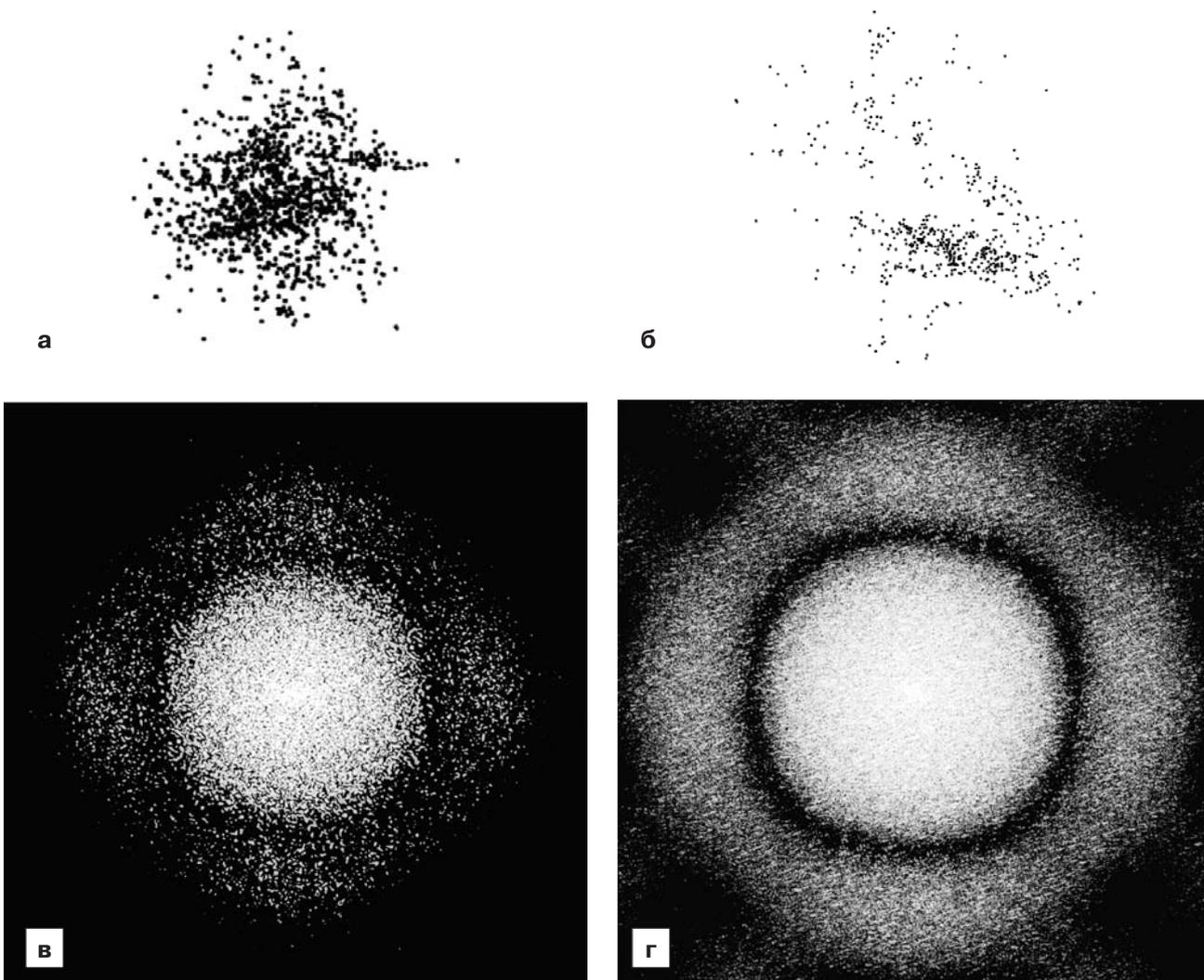


Рис. 1. Двухмерные паттерны распределения инициальных нейронов в поле 17 (а, б) и амплитудные спектры Фурье этих паттернов (в, г) у котят в возрасте 5 нед (а, в) и 12 нед (б, г).

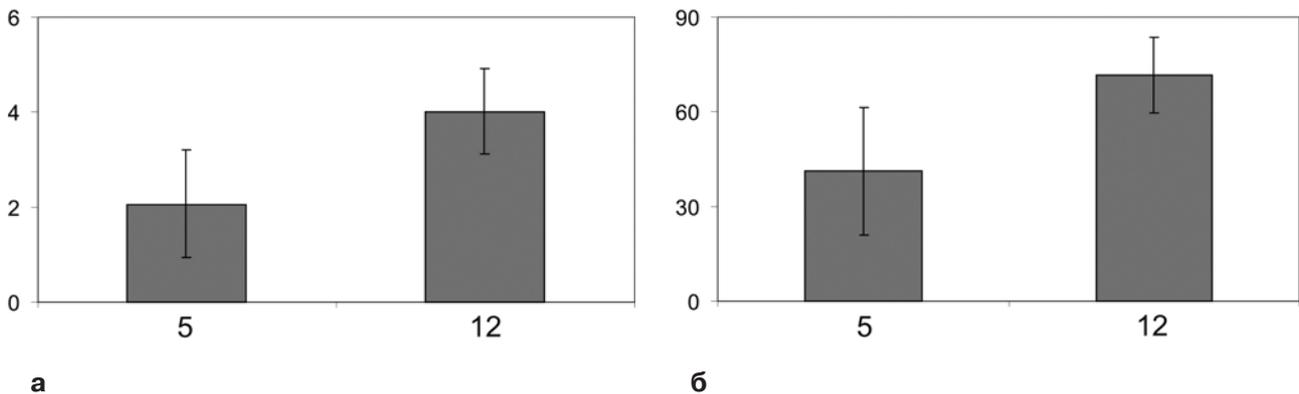


Рис. 2. Количественные характеристики амплитудных (а) и фазовых (б) спектров у котят разного возраста.

По оси абсцисс — возраст (нед); по оси ординат — яркость спектров (усл. ед.). Вертикальные отрезки — 99% доверительный интервал.

котят паттерн распределения меченых нейронов более упорядочен и содержит как отдельные нейроны, так и их скопления, распределенные по всей области мечения (см. рис. 1, б). Двухмерные паттерны котят разного возраста различаются по площади области мечения: $6,7 \pm 0,7$ и 16 ± 7 мм², у котят в возрасте 5 и 12 нед соответственно ($P < 0,001$) при незначимом различии общего числа меченых нейронов на этих площадях (277–1027 и 223–525 нейронов соответственно), что обуславливает неодинаковую плотность расположения меченых нейронов: 80 ± 40 и 28 ± 11 кл/мм² ($P = 0,05$).

Спектры Фурье паттернов распределения нейронов у животных разных возрастных групп различаются. У 5-недельных котят доминируют низкочастотные составляющие (центральное белое скопление), а высокочастотные — почти полностью отсутствуют (диффузная светлая зона вокруг центрального скопления), что отражает объединение инициальных нейронов в монолитное крупное образование. При этом в спектрах у котят в возрасте 12 нед присутствует 2-я гармоника (2-я широкая светлая полоса, отделенная от центрального скопления черным кольцом), которая свидетельствует о существовании периодичности в паттерне распределения нейронов (см. рис. 1, в, г). Количественно спектры также различаются: средняя яркость амплитудного и фазового спектров составляет соответственно: $2,1 \pm 1,1$ и 41 ± 20 усл. ед. — у котят в возрасте 5 нед и $4,0 \pm 0,9$ и 71 ± 12 усл. ед. — у котят в возрасте 12 нед ($P < 0,05$) (рис. 2).

Одним из вариантов сравнения спектров является процедура их наложения в программе Adobe Photoshop в режиме «Различие», в процессе которого из числовой матрицы одного изображения вычитается числовая матрица другого. Результирующее изображение, как и сами спектры, имеет среднюю яркость, величину

на которой тем больше, чем больше изначальные различия между изображениями. Величина средней яркости результирующих изображений при сопоставлении спектров у котят в пределах своей группы составляет для амплитудных спектров: $1,91 \pm 0,14$ усл. ед., а для фазовых спектров: 50 ± 5 усл. ед. Соответствующие показатели у котят разных возрастных групп больше: $2,8 \pm 0,4$ усл. ед., 68 ± 5 усл. ед., что отражает значимые различия между спектрами двухмерных паттернов у котят разного возраста.

Обсуждение полученных данных. Как известно, формирование корково-корковых связей между полями 17, 18, 19 и 21а происходит во время критического периода и завершается к 8-недельному возрасту [1, 9, 10]. При этом основным процессом перестройки корково-корковых связей принято считать элиминацию избыточного числа ветвлений аксонов и, как результат, усиление конвергенции связей [5]. В настоящей работе показано увеличение площади участка коры, занятого мечеными нейронами, в период между 5-й и 12-й постнатальными неделями, что также может свидетельствовать в пользу конвергенции связей. С другой стороны — появление меченых нейронов в участках поля 17, в которых они ранее отсутствовали, свидетельствует о незавершенности процесса формирования кластерной организации корково-корковых связей между полем 17 и областью PMLS.

Исследования связей между полем 17 и областью PMLS у взрослых кошек показали, что инициальные нейроны в поле 17 организованы четко упорядоченным образом, формируя хорошо видимые на реконструкциях овальные скопления [4]. Однако анализ как самих паттернов, так и их спектров Фурье показывает, что в возрасте 12 нед, несмотря на появление периодичности в распределении меченых клеток, всё ещё сохраня-

ются крупные группы нейронов, не разделенные на отдельные мелкие подгруппы. Таким образом, в нашем исследовании не обнаружено такой четкой упорядоченности связей у котят в возрасте 12 нед, что, вероятно, свидетельствует о ещё недостаточной зрелости корково-корковых связей между областями 17 и PMLS в этом возрасте. В литературе имеются данные о более длительном созревании у котят пространственно-частотных настроек нейронов в поле PMLS, чем в других зрительных областях [17, 18]. Возможно, что и межзональные связи с этой областью коры также могут развиваться дольше, чем другие длинные корково-корковые связи (между областями 17, 18 и 19). По-видимому, это может объясняться тем, что становление сложных зрительных функций требует значительно большего времени, чем развитие базовых зрительных функций [15].

Авторы благодарны Н.И. Никитиной и К.К. Паникян за помощь в выращивании животных и обработке гистологического материала.

ЛИТЕРАТУРА

- Макаров Ф.Н., Ляховецкий В.А. и Маркова Л.А. Упорядоченная структурная организация внутрислобковых связей в зрительной коре кошки. *Морфология*, 2003, т. 124, вып. 4, с. 24–28.
- Меркульева Н.С. и Макаров Ф.Н. Онтогенетические особенности организации корково-корковых связей первичной зрительной коры и латеральной супрасильвиевой области мозга кошки. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, 2010, т. 96, № 3, с. 271–279.
- Меркульева Н.С. и Никитина Н.И. Методика выявления и количественного анализа двумерных паттернов распределения меченых нейронов в коре большого мозга. *Морфология*, 2010, т. 138, вып. 5, с. 55–58.
- Boyd J.D. and Matsubara J.A. Projections from V1 to lateral suprasylvian cortex: an efferent pathway in the cat's visual cortex that originates preferentially from CO blob columns. *Vis. Neurosci.*, 1999, v. 16, p. 849–860.
- Callaway E.M. and Katz L.C. Effects of binocular deprivation on the development of clustered horizontal connections in cat striate cortex. *PNAS*, 1991, v. 88, p. 745–749.
- Conway B., Boyd J.D., Stewart T.H. and Matsubara J. The projection from V1 to extrastriate area 21a: a second patchy efferent pathway that colocalizes with CO blob columns in cat visual cortex. *Cereb. Cortex.*, 2000, v. 10, p. 149–159.
- Daw N.W. *Visual development*. New York, Springer, 2006.
- Hooks B.M. and Chen C. Distinct roles for spontaneous and visual activity in remodeling of the retinogeniculate synapse. *Neuron*, 2006, v. 52, p. 281–291.
- Innocenti G.M. and Caminiti R. Postnatal shaping of callosal connections from sensory areas. *Exp. Brain Res.*, 1980, v. 38, p. 381–394.
- Innocenti G.M. and Price D.J. Exuberance in the development of cortical networks. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2005, v. 6, p. 955–965.
- Mesulam M-M. Tetramethylbenzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem. Cytochem.*, 1978, v. 26, p. 106–117.
- Mountcastle V.B. Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J. Neurophysiol.*, 1957, v. 20, p. 408–434.
- Szentagothai J. The module-concept of cerebral cortex architecture. *Brain Res.*, 1975, v. 95, p. 475–496.
- Trachtenberg J.T. and Stryker M.P. Rapid anatomical plasticity of horizontal connections in the developing visual cortex. *J. Neurosci.*, 2001, v. 21, № 10, p. 3476–3482.
- Villablanca J.R. and Olmstead C.E. Neurological development of kittens. *Dev. Psychobiol.*, 1979, v. 12, № 2, p. 101–127.
- Wiesel T.N. and Hubel D.H. Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cat's lateral geniculate body. *J. Neurophysiol.*, 1963, v. 26, № 6, p. 978–993.
- Zumbrich T.J. and Blakemore C. Spatial and temporal selectivity in the suprasylvian visual cortex of the cat. *J. Neurosci.*, 1987, v. 7, p. 482–500.
- Zumbrich T.J., Price D.J. and Blakemore C. Development of spatial and temporal selectivity in the suprasylvian visual cortex of the cat. *J. Neurosci.*, 1988, v. 8, p. 2713–2728.

Поступила в редакцию 11.09.10

EARLY ONTOGENETIC DEVELOPMENT OF REGULAR ORGANIZATION OF CORTICO-CORTICAL CONNECTIONS BETWEEN VISUAL AREAS 17 AND POSTEROMEDIAL LATERAL SUPRASYLVIAN AREA IN THE CAT

N.S. Merkulieva and F.N. Makarov

Early ontogenetic development of cluster organization of corticocortical connections between visual areas 17 and posteromedial lateral suprasylvian area (PMLS) was studied in cat. Retrograde axonal tracer horseradish peroxidase was microinjected into the area PMLS. Labeled initial neuron distribution was analyzed in area 17 in 5- and 12-week-old kittens. A significant increase of the cortical surface area containing labeled neurons together with the decrease in their distribution density were shown between weeks 5 and 12. An analysis of amplitude and phase of Fourier spectra of labeled neuron distribution patterns demonstrated some differences between the kittens of various age groups and indicated the incompleteness of connection cluster organization formation. The temporal morpho-functional features of the development of PMLS zone corticocortical connections, as compared to the other visual cortical areas, are discussed.

Key words: *corticocortical connections, area 17, posteromedial lateral suprasylvian area, early ontogenesis, cat*

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