На правах рукописи

МИХАЛКИН

АЛЕКСАНДР АЛЕКСАНДРОВИЧ

РАЗВИТИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ У ЗРИТЕЛЬНОГО ПРОВОДЯЩЕГО КАНАЛА В ОНТОГЕНЕЗЕ

1.5.5 – Физиология человека и животных 1.5.22 – Клеточная биология

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Санкт-Петербург-2023

Работа выполнена в лаборатории нейроморфологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:	Меркульева Наталья Сергеевна,
	кандидат биологических наук
ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:	Рожкова Галина Ивановна,
	доктор биологических наук, профессор, главный
	научный сотрудник лаборатории №11 «Зрительные
	системы», ФГБУН Институт проблем передачи
	информации им. А.А. Харкевича РАН
	Ткаченко Любовь Александровна,
	кандидат биологических наук, доцент, старший
	научный сотрудник лаборатории функциональной
	нейроморфологии, ФГБОУ ВО
	«Санкт-Петербургский Государственный
	Университет»
ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:	Федеральное государственное бюджетное
	образовательное учреждение высшего образования
	«Ярославский государственный медицинский
	университет» Министерства здравоохранения РФ

Защита диссертации состоится « »_____2023 г. в_____часов на заседании Диссертационного Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций 24.1.137.01 (Д002.020.01) при ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6) и на сайте <u>http://www.infran.ru/</u>

Автореферат разослан « »_____2023 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета доктор биологических наук

Ордян Наталья Эдуардовна

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность Зрительное восприятие большинства исследования. y млекопитающих сочетает элементы иерархической и параллельной обработки информации. Передача от сетчатки – через элементы среднего и промежуточного мозга – в зрительную кору происходит согласно иерархическому принципу, при этом разные передаются по параметры зрительного сигнала функциональным параллельно организованным проводящим каналам (Schiller, 2010). Параллельные проводящие каналы наиболее хорошо изучены у животных с высокоорганизованным зрением – хищных и приматов, у которых выделяют Y, X, W (Sherman, Spear, 1982) и Магно, Парво и Конио (Callaway, 2005; Schiller, 2010) каналы соответственно. В целом, в обработке информации о движении зрительных объектов и пространственных отношений между ними главную роль играет Магно/У проводящий канал (Kaplan, 2008; Schiller, 2010); в анализе мелких деталей изображения и цвета – Парво/Х проводящий канал; Конио/W проводящему каналуотводят роль в зрительно-глазодвигательной интеграции и циркадной ритмике (Меркульева, 2021).

Проводящие каналы обладают разной резистентностью к повреждающимфакторам, наименьшую демонстрирует Магно канал, отклонения в функционированиикоторого выявлены у взрослых в ряде неврологических патологий: болезни Альцгеймера (Gilmore, Whitehouse, 1995), Паркинсона (Silva et al., 2005), мигрени (Benedek et al., 2002), некоторых видах шизофрении (Skottun, Skoyles, 2007; Шошина et al., 2013). И у детей – при синдроме Вильямса (Atkinson et al., 2003), церебральном параличе (Gunn et al., 2002), аутизме (Spencer et al., 2000), развивающейся дислексии (Stein, 2019). Низкая резистентность позволяет использовать оценку состояния Магно канала как маркер раннего протекания ряда заболеваний ЦНС: глаукомы (Prim, 2018), рассеянного склероза (Муравьева и др., 2013), что привело к разработке неинвазивных диагностических методик(Yoonessi, Yoonessi, 2011; Муравьева и др., 2008).

Магно/У проводящий канал также значительно уязвим при действии широкого диапазона альтернирующих факторов во время развития зрительной системы (Atkinson, Braddick, 2020; Braddick et al., 2003; Chapman, 2000), в том числе повреждается у недоношенных детей (Imafuku et al., 2017; Taylor et al., 2009). Поскольку развитие зрительных проводящих каналов отражает развитие ЦНС в целом, очевидна важность исследований, направленных на изучение формирования Магно/У канала во время онтогенеза. Постнатальное развитие зрительной системы состоит из двух этапов: независимого и зависимого от зрительного окружения (Feller, Scanziani, 2005). У приматов, включая человека, первый этап протекает во время пренатального периода, второй, характеризующийся высоким уровнем нейрональной пластичности и именуемый

3

«критическим», начинается вскоре после рождения и длится до возраста 5-7 лет (Harwerth et al., 1986; Kiorpes, 2015; Harwerth et al., 2005). У хищных первый этап охватываетпоздний пренатальный и ранний постнатальный период, второй этап – период с 1 по 3-4 месяцы жизни (Olson, Freeman, 1980; Tanaka et al., 2020).

Примечательно, что за длительную историю изучения пластических перестроек в зрительной системе основное внимание уделяли первичной зрительной коре (см. обзоры Hensch, Quinlan, 2018; Trachtenberg, 2015). При этом, в свете данных о важности таламокорковых взаимодействий для функции (Sherman, Guillery, 2011) и развития зрительной системы (Bourne, Morrone, 2017; Kloc, Maffei, 2014), необходимо знание о механизмах постнатального формирования зрительного таламуса, одним из ключевых компонентов которого является наружное коленчатое тело – комплекс ядер, каждое из которых, имеет собственную внутреннюю структурно-функциональную, в том числе, зрительнотопическую организацию, и являющееся основным источником информации для зрительной коры (Payne, Peters, 2002).

Нейроны Магно/У канала рассматривают как единую функциональную популяцию; при этом множество данных указывают на гетерогенность его клеточных популяций в пределах НКТ, среди которых выделяют пространственно-частотные каналы (Глезер, Гаузельман, 2001), популяции, реагирующие на включение (ON) или выключение (OFF) света (Kuffler, 1953), популяции клеток с разной задержкой ответа на предъявляемые стимулы (Saul, 2008). Синхронно или гетерохронно развиваются эти субпопуляции – вопрос открытый. Всестороннее изучение механизмов развития различных субпопуляций в составе проводящих каналов имеет не только фундаментальный (Kaplan, 2013), но и возможный клинический интерес (Yoonessi, Yoonessi, 2011).

Цели и задачи исследования. Цель исследования - изучение структурнофункциональной организации и механизмов развития У проводящего канала.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1. Выявить динамику постнатального развития У проводящего канала кошки во время ключевых этапов формирования зрительной системы.
- Определить особенности возрастной динамики Y нейронов наружного коленчатого тела в разных зонах ретинотопического представительства.
- 3. Выявить сроки созревания функциональных популяций Y проводящего канала на уровне зрительного таламуса.
- 4. Выявить сроки созревания функциональных популяций Y проводящего канала на уровне первичной зрительной коры.

4

Научная новизна работы. Проведено подробное картирование популяции нейронов У проводящего канала в зрительном таламусе и первичной зрительной коре. Получены новые факты о развитии структурно-функциональной организации дорзального ядра наружного коленчатого тела (НКТд) у кошки в онтогенезе: (1) выявлен комплекс отличий между слоями А и А1, ранее полагавшихся функционально гомологичными, (2) показано более раннее созревание функциональной субпопуляции У нейронов OFF типа. В совокупности эти факты указывают на гетерохронное развитие разных субпопуляций Ү нейронов зрительного таламуса. Выявлен неравномерный рост НКТд относительно представительства вертикального и горизонтального меридианов поля зрения, что, возможно, согласуется с фактором магнификации разных меридианов и развитием бинокулярного зрения. Впервые обнаружено транзиторное приращение плотности У клеток в зрительных структурах: перигеникулятном ядре (ПГЯ), НКТд и VI слое первичной зрительной коры, что раскрывает механизмы формирования таламо-корковых отношений во время двух этапов развития зрительной системы: прекритического и критического. Полагаем, что этап развития, характеризующийся временной «избыточностью» числа У нейронов, обозначает границы периода формирования таламо-корковой интеграции с участием У проводящего канала. Сравнительный анализ формирования двух областей первичной зрительной коры (поля 17 и 18) показал опережающее формирование поля 18, отвечающего за обработку зрительной информации о движении. Это согласуется с данными об опережающем развитии корковой системы распознавания движения у приматов, включая человека.

Основные положения, выносимые на защиту.

- 1. Плотность залегания Y нейронов в зрительном таламусе максимальна во время прекритического и критического этапов развития, при этом каждое таламическое ядро развивается гетерохронно.
- В области представительства центра поля зрения дорзального ядра наружного коленчатого тела созревание Y нейронов происходит быстрее, чем в области представительства периферии.
- 3. Функциональная популяция Y-OFF нейронов дорзального ядра наружного коленчатого тела созревает раньше популяции Y-ON нейронов.
- Функциональные популяции поля 18 первичной зрительной коры, отвечающего за восприятие движений, созревают раньше популяций поля 17, в большей степени связанного с восприятием формы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведено изучение тонкой структурно-функциональной организации и онтогенетического развития элементов Ү

проводящего канала, ответственного за восприятие движения и пространственных отношений между объектами, на уровнях зрительного таламуса и первичной зрительной коры. Получены новые данные о гетерогенности субпопуляций Y нейронов и гетерохронности их постнатального развития, что само по себе имеет и фундаментальное, и прикладное значение. В частности, полученные результаты раскрывают механизмы нейрональной пластичности зрительной системы и ЦНС в целом. Более того, данные о развитии зрительного таламуса и зрительной коры способствуют более полному пониманию механизмов таламо-корковой интеграции. Полученные знания о тонкой организации зрительного таламуса и её связи со зрительно-топическими картами важны в математическом моделировании, разработке систем машинного зрения и робототехнике. Знание о строении и развитии Y проводящего канала, аналогичного Магно каналу учеловека, могут быть применены в клинике при разработке новых методов диагностики функции зрения и технологий нейрореабилитации при повреждении зрения в ходе травмы или неврологической патологии. Отдельный момент использования полученных данных –создание полной картины постнатального формирования зрительных проводящих каналов,что может быть использовано в перинатальной медицине.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертации были представлены на 2-х российских (Санкт-Петербургский научный форум в честь 100-летия Физиологического общества им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 2017; «Обработка и интеграция в сенсорных системах: от внешнего сигнала к сложному образу», посвящённой 90-летию со дня рождения академика И.А. Шевелёва, Москва, 2022), 6-ти российских конференциях с международным участием («Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем», Санкт-Петербург – Колтуши, 2015; «Современные проблемы нейробиологии. Структура и функции нервной системы в норме и патологии», Ярославль, 2016; «Современные аспекты интегративной физиологии», Санкт-Петербург, 2018; Конференции посвященной 170-летию со дня рождения И.П. Павлова «Интегративная физиология», Санкт-Петербург, 2019; «XVI совещание по эволюционной физиологии им. акад. Л.А. Орбели», Санкт-Петербург, 2020; Конференции посвященной 95-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН «Интегративная физиология», Санкт-Петербург, 2020) и 6-ти международных конференциях (Neuronus 2015 IBRO & IRUN Neuroscience Forum; Poland. Krakow, 2015; XIX медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина», Санкт-Петербург, 2016; FENS Regional Meeting, Hungary, Pécs, 2017; The IEEE Conference 'Video and Audio Signal Processing in the Context of Neurotechnologies' SPCN-2018, St. Petersburg, 2018; The IEEE Conference "Video and AudioSignal Processing in the Context of Neurotechnologies" SPCN-2019, St. Petersburg, 2019; 6th IEEE Conference "Video and Audio Signal Processing in the Context of Neurotechnologies" SPCN-2021, St. Petersburg, 2021).

Личный вклад автора. Материалы, вошедшие в данную работу, обсуждались и публиковались автором совместно с научным руководителем. Автор совместно с научным руководителем разрабатывал и ставил эксперимент по выявлению элементов Y проводящего канала в наружном коленчатом теле и первичной зрительной коре кошки в онтогенезе. Осуществлял пробоподготовку, иммуногистохимическое исследование и морфометрический анализ средствами световой микроскопии, разрабатывал цифровые методы обработки и анализа морфометрических данных.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из Введения, четырёх глав (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение), Выводов и Списка литературы. Работа изложена на 212 страницах печатного текста, содержит 15 таблиц и иллюстрирована 45 рисунками. В списке литературы приведено 453 источника.

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 25 публикациях, из них 9 – научные статьи в рецензируемых журналах и 2 главы в монографиях.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Нейроны У проводящего канала детектировали с помощью функционального нейрохимического метода – при использовании структурно-функционального маркёра – антител SMI-32 (Bickford et al., 1998; Duffy et al., 2012); это позволило исследовать Y канал на сроках, недоступных для его электрофизиологической идентификации (Daniels et al., 1978; Friedlander, 1982), а также оценить степень его развития, поскольку накопление антител SMI-32, нефосфорилированных антигена доменов тяжёлых цепей нейрофиламентов (тНФ), коррелирует с функциональной зрелостью нейронов (Bourne et al., 2005). Исследовали зрительные таламические ядра и первичную зрительную кору(поля 17 и 18) у кошки – классического объекта для изучения зрительной системы (Mitchell, Duffy, 2014), на возрастных этапах, соответствующих ключевым этапам развития зрительной системы: (1) рождение, 0Д; (2) начальное формирование зрительной системы при отсутствии зрительного опыта (глаза закрыты), 4Д; (3) раннее формирование зрительной системы при появлении зрительного опыта (глаза открыты), 10Д и 14Д; (4) начало критического периода развития зрительной системы, 21Д; (5) пик критического периода, 28Д и 34Д; (6) угасание критического периода, 62Д и 123Д; (7) взрослые (Взр) – животные старше 1 года – полное созревание зрительных функций. Общее число

исследованных животных - 31. Анализировали функционально значимые параметры Y нейронов (SMI-32-иммунопозитивных, SMI-32(+)): округлость сомы, ориентацию и площадь сомы, плотность залегания нейронов в пределах основных зрительных таламических ядер: НКТд, медиального интраламинарного ядра (МИЯ) и ПГЯ. Учитывая многообразие функциональных популяций Y нейронов в НКТд, проводили сравнительное исследование: (1) разных слоев ядра: A, A1 и Cм; (2) верхнего, среднего и нижнегоподслоёв A и A1; (3) представительств центра (Ц), верхней (ВП) и нижней (НП) периферии поля зрения – на сагиттальных срезах, и бинокулярной (БП) и монокулярной (МП) периферии – на фронтальных срезах (рис. 1А). В первичной зрительной коре оценивали плотность Y нейронов и долю общего нейрохимического мечения в слоях II-III,V и VI полей 17 и 18. В поле 17 отдельно анализировали представительства центра и периферии поля зрения: 17ц, 17п (рис. 1Б).



Рис. 1. Области анализа НКТд кошки. А – на сагиттальных (сверху) и фронтальных (снизу) срезах таламуса; Б – на фронтальных срезах первичной зрительной коры (поля 17и 18). Области анализа в коре обведены серым. Указаны градусы ретинотопического представительства.

После введения летальной дозы наркоза (Xylazine, 2 мг/кг, Zoletil100, 20 мг/кг), проводили транскардиальную перфузию: 0,9% NaCl (0,2-0,5 л, 5 мин) и 4% параформальдегидом (0,5-1,5 л, 10-20 мин). После криопротекции в 20% и 30% сахарозе, на замораживающем микротоме (Reichert, Германия) изготавливали срезы толщиной 50 мкм. Иммуногистохимическую реакцию проводили с помощью непрямого метода с выявлением конечного комплекса «антиген-антитело» посредством реакции пероксидазы хрена с перекисью водорода (0,03%) в присутствии никеля и диаминобензидина (ДАБ).

Смежные срезы окрашивали по Нисслю для подсчёта общей нейрональной популяции. Препараты обезвоживали, просветляли и заключали в среду BioMount (Bio-Optica, Италия). Оцифровку препаратов проводили с помощью микроскопа Olympus CX-31 x10 (Япония) и камеры Nikon D3400 (Япония). Полученные изображения обрабатывали в ImageJ Fiji (Schindelin et al., 2012) и разработанной в ходе выполнения диссертации программе CAS: Cell annotation software (Nurzynska et al., 2017). Статистический анализ проводили с помощью Nested ANOVA (Aarts et al., 2014), где N – количество животных, n

– количество срезов, и последующим post-hoc тест Tukey. Статистически достоверными считали различия при уровне значимости p<0,05. На графиках указаны средние значения \pm стандартное отклонение; * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; **** – p<0,0001.

Результаты и Обсуждение

У нейроны выявлены как в таламических (НКТд, МИЯ и ПГЯ), так и корковых областях интереса; существование специфического маркёра У нейронов в тормозном таламическом ядре ПГЯ показано впервые.

Организация функциональных ретинотопических карт НКТ. SMI-32 антитела визуализируют овальную сому и проксимальные участки дендритов Ү нейронов. Поскольку ориентация сомы совпадает с таковой для дендритного древа нейрона и связана с параметрами его рецептивного поля, исследовали наклон сомы нейронов относительно межслойных границ. Показано, что с возрастом наклон У нейронов в А-слоях НКТд на фронтальных срезах не изменяется (-18-(-7)°(0Д) vs -11-(-9)° (Взр), p>0,05), а на сагиттальных срезах становится более ростральным (-22-(-21)°(0Д) vs -47-(-45)° (Взр), p<0,01) (рис. 2). Кроме того, у молодых животных (4-21Д) под углом к межслойным границам обнаружены многочисленные параллельно ориентированные иммунопозитивные отростки: их наибольшее число показано в слое А, наименьшее – в слое См – полагаем, они представляют собой внутренние аксоны нейронов НКТд (Ferster, Levy, 1978) (рис. 3). В слоях А и А1 НКТд ориентация этих отростков положительно коррелирует с ориентацией сомы Y нейронов, как на фронтальных (r=0,984, p<0,0001; n=32 среза), так и на сагиттальных срезах (r=0,980, p<0,0001; n=36 срезов). Важно, что у взрослых животных ориентация этих элементов совпадает с ориентацией функциональных проекционных колонок – узких областей, обрабатывающих информациюот определенного локуса поля зрения (Bishop et al., 1962; Sanderson, 1971). Таким образов, в работе впервые зафиксировано смещение ретинотопических проекционных колонок в пределах НКТд с возрастом, что в свою очередь может быть объяснено значительным постнатальным поворотом НКТд в сагиттальной плоскости (Elgeti et al., 1976) (рис. 2).

При этом в слое См НКТд и ядре МИЯ ориентация сомы Y нейронов параллельна изолиниям элевации (Sanderson, 1971), что указывает на сходную организацию рецептивных полей этих нейронов и организующим к ним входы клеток верхних холмиков четверохолмия (Hughes, 1971; McIlwain, 1975).



Рис. 2. Возрастная динамика ориентации сомы SMI-32(+) нейронов в А-слоях НКТд кошки. A – ориентация сомы на сагиттальных (серый) и фронтальных (чёрный) срезах; Б – пример ориентации сомы относительно межслойной границы; В – постнатальное вращение НКТд по (Kalil, 1978). Обозначен угол наклона сомы в разных структурах (штриховка). Здесь и далее: 0-123 – возраст в днях.

Динамика площади сомы Y нейронов и размер их рецептивных полей. Размер сомы нейрона связан с общим объёмом арборизации его дендритов и аксона (Coleman, Friedlander, 2002; Ho et al., 1989; Humphrey et al., 1985; Ling et al., 2012), что коррелирует с размером его рецептивного поля. В постнатальный период наблюдают 3-кратный рост площади сомы Y нейронов МИЯ (102 мкм² vs 325 мкм² y 0Д и взрослых, p<0,0001). В ПГЯ сома нейронов растёт только до 21Д (137-157 мкм² vs 260-282 мкм² y 0Д и 21Д, p<0,01). В НКТд происходит 2,6-кратный рост сомы (131-157 мкм² vs 319-448 мкм² y 0Д и взрослых; p<0,0001); наиболее сильное нарастание происходит в первые две недели. Площадь сомы нейронов во фронтальной плоскости меньше, чем в сагиттальной (28Д, 34Д, 62Д, Взр: p<0,05), что объясняется ориентацией нейронов.



Рис. 3. Примеры SMI-32(+) мечения в НКТд и ПГЯ кошки. 0-123Д - постнатальные дни, Взр - взрослые животные. А, А1, См – слои НКТд. Калибровочный маркер – 200 мкм.

В большинстве возрастных групп (за исключением 21Д) площадь сомы максимальна в слое См и минимальна в слое А, т.е. очевиден восходящий дорзовентральный градиент размера рецептивных полей (Фронт: 4Д, 34Д, 62Д, Взр, р<0,05; 123Д, р<0,001; Сагит: 0Д, 10Д, 123Д, р<0,05; 28Д, р<0,01; 4Д, 34Д, 62Д, Взр, р<0,001). Градиент подтверждается и при рассмотрении А-подслоёв (Фронт: Взр, р<0,05; 62-123Д, р<0,01; Сагит: 0-4Д, 10-14Д, 21-34Д, р<0,05; Взр, р<0,01; 62-123Д, р<0,001). С возрастом градиент более заметно усиливается во фронтальной плоскости (рис. 4). Данные соответствуют известным отличиям между рецептивными полями нейронов разных слоёв НКТд (Yeh et al., 2003).

Отмечен нисходящий центро-периферический градиент площади сомы Y нейронов: она максимальна в представительстве центра поля зрения, минимальна – в монокулярной периферии (Ц vs МП, А: Взр, p<0,05, 62-123Д, p<0,01; 10-14Д, p<0,001; 0-4Д, 21-34Д, p<0,001; 62-123Д, p<0,001; 0-4Д, p<0001), что отражает функциональные отличия между рецептивными полями Y нейронов в представительствах центра и периферии поля зрения с поправкой на фактор магнификации – сжатие ретинотопического представительства в периферической области (Schneider et al., 2004).

Рост НКТд. В представительстве вертикали поля зрения площадь НКТд увеличивается в 4,8 раза (1,91±0,37 мм² и 9,1±1,02 мм², 0Д *vs* Взр, p<0,0001), в представительстве горизонтали – в 3,1 раза (1,42±0,35 мм² и 4,47±0,26 мм², 0Д *vs* Взр, p<0,0001) (рис. 5). Это отражает опережающее развитие сетчатки по горизонтали поля зрения (Rapaport, Stone, 1982; Stone et al., 1981), и, возможно, факт двойного представительства поля зрения от 0° до 50°, занимающего наибольшую площадь НКТд (Sanderson, 1971; Schneider et al., 2004) (рис. 5).



Рис. 4. Динамика относительной площади сомы SMI-32(+) нейронов в слоях и подслоях (верх, середина, низ) НКТд кошки.



Рис. 5. Динамика роста ядра НКТд (А) и его общей нейрональной популяции (Б) у кошки. А – чёрный, серый – фронтальные и сагиттальные срезы; Б – чёрный, тёмно-серый, светло-серый, пунктир – слои А, А1, См и ПГЯ соответственно.

Динамика общей нейрональной плотности таламических ядер. Плотность общей нейрональной популяции НКТд и ПГЯ значительно сокращается с возрастом (6092-7967 кл/мм² и 872-1139 кл/мм², 0Д vs Взр, p<0,01 – в НКТд; 1200 кл/мм² и 314 кл/мм², 0Д vs Взр, p<0,001 – в ПГЯ). Наиболее сильное падение плотности происходит в

первые две недели, что согласуется с результатами других работ (Elgeti et al., 1976; Satorre et al., 1986).

Динамика плотности SMI-32(+) нейронов таламических ядер. Достоверных отличий между динамикой плотности Y нейронов на фронтальных и сагиттальных срезах не показано – данные обобщены (рис. 6). В слоях A и A1 НКТд происходит нарастание плотности SMI-32(+) нейронов в период от 0Д до 10Д (55-62 кл/мм² vs 126-161 кл/мм², p<0,05; 117-121 кл/мм2 vs 147-233 кл/мм², p<0,05), затем, после «плато», охватывающего период 10-28Д, происходит снижение плотности нейронов, с достижением минимальных значений у взрослых (33-36 кл/мм², p<0,001 и 34-38 кл/мм², p<0,05). В слое См НКТд наблюдается достоверное падение плотности в период между 0-10Д и взрослыми (207-338 кл/мм² vs 58-65 кл/мм², p<0,001). В ПГЯ плотность SMI-32(+) нейронов многократно нарастает после рождения, достигая максимума в возрасте 3-х недель (32-59 кл/мм² vs 200-214 кл/мм², p<0,01), после чего происходит многократное падение плотности, с достижением минимальных значений у взрослых (8-9 кл/мм², p<0,001).



Рис. 6. Динамика плотности SMI-32(+) клеток в НКТд и ПГЯ. Слои А (А), А1 (Б) и См (В) НКТд и ПГЯ (Г) на фронтальных (чёрный) и сагиттальных (серый) срезах таламуса кошки.

В итоге, начиная с 4-й недели, плотность SMI-32(+) нейронов НКТд сокращается в 3-4 раза, ПГЯ – в 18-23 раза, тогда как плотность общей нейрональной популяции ядер сокращается лишь в 1,4-1,5 раза. Таким образом, динамика плотности У нейронов не совпадает с динамикой плотности общей популяции таламических нейронов и отражает транзиторную экспрессию ими тНФ во время первого месяца развития (впрекритический и критический периоды). Основные функции тНФ - стабилизация аксона во время его активного роста (Boumil et al., 2018; Jia, Li, 2021; Sánchez et al., 2000); тНФ ассоциируют с нейронами, организующими дальние проекции (Fuentes-Santamaria et al., 2006). У взрослых животных У нейроны НКТд формируют связи с полями 17 и 18 первичной зрительной коры, поэтому увеличение экспрессии тНФ может отражать реорганизацию ветвления геникулокортикальных аксонов в этих полях в ходе постнатального онтогенеза (Antonini, Stryker, 1993; Friedlander, Martin, 1989). Кроме того, транзиторное мечение в НКТд может отражать временные взаимодействия таламуса с корковым полем ПМЛС (Bruce, Stein, 1988), относящимся к У проводящему каналу и обрабатывающим информацию о движении зрительных объектов (Vajdal et al., 2004). Транзиторное мечение в ПГЯ возможно свидетельствует о существовании временных интегративных взаимодействий между этим ядром и первичной зрительной корой (Murphy, Sillito, 1996) и/или стволовыми ядрами (Ahlsén, Lo, 1982). Кроме того, тНФ принимаютучастие в формировании дендритного древа (Boumil et al., 2015; Kong et al., 1998). Известно, что дендритное древо нейронов НКТд (Coleman, Friedlander, 1992; Mason, 1983) и ПГЯ (FitzGibbon, 2006) реорганизуется в течение первых постнатальных недель. В частности, выявленный в нашей работе транзиторный пик экспрессии тНФ совпадает с транзиторнымпиком плотности дендритных филоподий (Coleman, Friedlander, 2002; FitzGibbon, 2006), связанных с активными процессами синаптогенеза в этот период.

Развитие У нейронов в слоях НКТд. Мы показали восходящий дорзовентральный градиент плотности Y нейронов в НКТд: она минимальна в слое A, и максимальна в слое Cм; градиент наиболее выражен в первые 3 недели развития. Отметим, что до 3-й недели плотность нейронов в слое A1 больше таковой в слое A, после чего значения плотностей выравниваются. Дорзовентральный градиент подтверждается при анализе подслоёв; он снижается с возрастом: отношение плотности Y нейронов в верхней части слоя A к слою Cм у групп 0-4Д, 10-14Д, 21-34Д, 62-123Д и взрослых составляет 4,3-5,2 (p<0,0001), 2,1-2,6 (p<0,0001), 1,4-1,5 (p<0,0001), 1,1-1,4 (p<0,01) и 1,5-1,8 (p<0,05) соответственно (рис. 7). Паттерн распределения Y нейронов, меченых антителами SMI-32, по подслоям НКТд у взрослых повторяет паттерн распределения Y нейронов в электрофизиологических работах (Bowling, Wieniawa-Narkiewicz, 1986), что ещё раз

подтверждает специфичность этих антител. Выявленный у новорождённых паттерн распределения Y нейронов: (1) совпадает с распределением функциональной группы Y нейронов, вовлечённых у взрослых в геникуло-кортико-колликулярные сети, в противовес Y нейронам, вовлечённым в геникуло-кортико-кортикальные сети (Colby, 1988; Erişir et al., 1998); (2) повторяет распределение Y клеток взрослых, реагирующих на выключениесвета (Y-OFF), но не Y клеток, реагирующих на включение света (Y-ON) (Bowling, Wieniawa-Narkiewicz, 1986) (рис. 8). В результате, мы можем заключить, что данные субпопуляции Y нейронов созревают раньше прочих.

Развитие Y нейронов в ретинотопических зонах НКТд. Анализировали наиболее широкие слои: А и А1. <u>В слое А</u> у животных в возрасте 0-4 дней плотность нейроноввыше в представительстве центра поля зрения (Ц *vs* БП/МП, p<0,05; Ц *vs* ВП, p<0,05; Ц *vs* НП, p<0,01). У животных старше 2 недель выявлена обратная картина. Таким образом, отмечен нисходящий центро-периферический градиент развития Y нейронов.



Рис. 7. *Развитие относительной плотности SMI-32(+) нейронов в подслоях НКТд кошки.*



Рис. 8. Сравнение распределения SMI-32(+) нейронов в А-слоях НКТд у новорождённых животных (чёрный) и Y-ON (A) и Y-OFF (Б) нейронов – у взрослых животных (серый) (по Bowling, Wieniawa-Narkiewicz, 1986); В, С, Н – верх, середина и низ слоёв A и A1.

<u>В слое A1</u> на сагиттальных срезах динамика плотности нейронов повторяет таковую для слоя A, а на фронтальных срезах плотность клеток в периферии во всех возрастныхгруппах больше, чем в центре поля зрения (0-4Д, p<0,0001; 10-14Д, p<0,05; 21-34Д, p<0,01; 62-123Д, p<0,0001) (рис. 9).



Рис. 9. Возрастная динамика относительной плотности SMI-32(+) клеток в полях зрения на фронтальных (А) и сагиттальных (Б) срезах НКТд кошки.

Развитие У проводящего канала в первичной зрительной коре.

Первые иммунопозитивные нейроны зарегистрированы в V слое коры у новорождённых животных; начиная с 10Д появляются нейроны во II-III слоях, а с 14Д – в VI слое коры. Анализ SMI-32(+) мечения позволил выявить следующие закономерности:

1) Опережающее развитие в поле 17 представительства периферии поля зрения по отношению к представительству центра поля зрения в течение первых 10 дней (17п vs 17ц: 0-4Д, p<0,001; 10Д, p<0,0001). При этом сроки доминирования представительства центра поля зрения в поле 17 и в НКТд совпадают. Сходный центро-периферический градиент развития SMI-32(+) мечения был показан для первичной зрительной коры приматов (Bourne et al., 2005).

2) Транзиторный пик плотности в поле 17 SMI-32(+) нейронов слоя VI в возрасте 5-ти постнатальных недель: плотность нарастает от 167-219 кл/мм² в 14Д до 307-308 кл/мм² в 34Д (17ц, р<0,01), после чего снижается до 118-177 кл/мм² у Взр (17ц, р<0,001) (рис. 11). Нейроны слоя VI поля 17 формируют кортико-геникулятные связи со слоями A и A1 HKTд (Murphy et al., 2000; Murphy, Sillito, 1996); в которых мы также зарегистрировали временный пик плотности Y нейронов (рис. 6). Сходно с нашей работой, ранее былпоказан транзиторный пик плотности SMI-32(+) клеток в инфрагранулярных слоях коры приматов (Burman et al., 2007; Kogan et al., 2000).

3) Опережающее созревание Y проводящего канала в поле 18 по сравнению с полем 17. Проявляется в виде изначально бо́льшей плотности SMI-32(+) нейронов поля 18 по сравнению с полем 17 в слоях II-III (10Д, p<0,0001) и VI (14Д, p<0,01), а также в исходно бо́льшей доле иммуномечения во всех слоях поля 18 по сравнению с полем 17 в соответствующих возрастах (слой V: 0-4Д, p<0,05; слой II-III: 10Д, p<0,0001; слой VI: 14Д, p<0,05). Важно, что исходный паттерн распределения Y нейронов в НКТд сходен с распределением клеток, организующих связи именно с полем 18 (Murphy et al., 2000; Geisert, 1985). Поскольку поле 18 отвечает за восприятие движений, тогда как поле 17 в большей степени связано с восприятием формы, мы можем говорить о более раннем созревании части Y проводящего канала в поле коры, в котором его функция является доминирующей. Опережающее развитие Магно/Y корковых полей ранее было показано у приматов (Bourne, Rosa, 2006).

Вышеперечисленные факты впервые демонстрируют сопряжение в развитии элементов Y проводящего канала на таламического и корковом уровнях (рис. 12). Ввиду схожести наблюдаемых явлений, сходное сопряжение может присутствовать не только у хищных, но и у приматов.



Рис. 10. Развитие SMI-32(+) мечения в полях 17 и 18 первичной зрительной коры кошки. I-VI – слои коры.



Рис. 11. Плотность SMI-32(+) нейронов в первичной зрительной коре (17n, 17u, 18) кошки. I-VI – слои коры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе представлена хронология созревания Y проводящего канала и его отдельных функциональных популяций на таламическом и корковом уровнях. Продемонстрировано опережающее созревание Y нейронов в представительстве центра поля зрения, обнаружено ремоделирование ретинотопической карты HKT - смещение функциональных проекционных колонок. На таламическом уровне выявлено опережающее развитие субпопуляции Y нейронов с OFF типом рецептивных полей, а также - Y нейронов HKTд, формирующих связи с полем 18. На корковом уровне продемонстрировано опережающее развитие поля 18, отвечающего за восприятие движения. Вместе взятые, полученные данные указывают на таламо-корковое сопряжениев развитии Y проводящего канала.



Рис. 12. Возрастная динамика плотности SMI-32(+) нейронов НКТ, ПГЯ и первичной зрительной коры (более тёмные оттенки – бо́льшая плотность анализируемой структуры (МИЯ, ПГЯ, слои коры и НКТд) относительно своей возрастной динамки). Насхеме слева чёрная стрелка указывает на опережающее созревание таламо-кортикальных сетей поля 18, по сравнению с таковыми для поля 17 (серая стрелка). На схеме посередине чёрная стрелка указывает на синхронный транзиторный пик плотности в А-слоях НКТд и поле 17.

выводы

1. Выявлена динамика постнатального развития Y нейронов зрительного таламуса: слоёв дорзального наружного коленчатого тела, медиального интерламинарного ядра и перигеникулятного ядра. Показано возрастное изменение плотности таламических Y нейронов: первичное нарастание - от рождения до прекритического и критического периодов развития, и последующее снижение до взрослых значений. При этом каждая таламическая структура развивается гетерохронно.

2. В дорзальном ядре наружного коленчатого тела выявлено опережающее созревание Y нейронов в области представительства центра поля зрения, и отставание формирования представительства периферии поля зрения.

3. В дорзальном ядре наружного коленчатого тела выявлено неравномерное созревание функциональных популяций Y нейронов, расположенных в разных слоях и подслоях ядра. Выявлено опережающее развитие популяции Y-OFF нейронов, активация которых происходит при выключении света.

4. В первичной зрительной коре выявлено гетерохронное созревание популяций Y нейронов, расположенных в полях 17 и 18. Выявлено более раннее развитие функциональных популяций поля 18, отвечающего за восприятие движения, по сравнению с популяциями поля 17, в большей степени связанного с восприятием формы.

5. Показаны признаки сопряжения в развитии Y проводящего канала на уровне наружного коленчатого тела и первичной зрительной коры, выражающиеся в синхронном развитии их функциональных субпопуляций.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Михалкин А. А., Меркульева Н. С. Методика анализа популяций Ү-нейронов в латеральном коленчатом теле у кошки// Морфология. – 2016. – Т. 150. – № 4. – С. 84–90.

2. Nurzynska K., Mikhalkin A., Piorkowski A. CAS: cell annotation software – research on neuronal tissue has never been so transparent// Neuroinformatics – 2017. – V. 15. – № 4. – P. 365–382.

3. Merkulyeva N., Mikhalkin A., Zykin P. Early postnatal development of the lamination in the lateral geniculate nucleus A-layers in cats// Cellular and Molecular Neurobiology – 2018. – V. 38. – N_{2} 5. – P. 1137–1143.

4. Merkulyeva N. S., Mikhalkin A. A., Bondar I. V. Influence of rhythmic light stimulation on orientation signal within visual cortex columns in the cat// Acta Neurobiology Experimentalis (Wars). -2019. - V. 79. - P. 225-231.

5. Merkulyeva N., Mikhalkin A. SMI-32 labeling in Cajal-Retzius cells of feline primary visual cortex// Neuroscience Letters – 2021. – V. 762. – P. 136165.

6. Михалкин А. А., Меркульева Н. С. Особенности возрастной динамики нейронов наружного коленчатого тела кошки при использовании фронтальных и сагиттальных срезов// Журнал эволюционной биохимии и физиологии – 2021. – Т. 57. – № 5. – С. 373–379.

7. Mikhalkin A., Nikitina N., Merkulyeva N. Heterochrony of postnatal accumulation of nonphosphorylated heavy-chain neurofilament by neurons of the cat dorsal lateral geniculate nucleus// Journal of Comparative Neurology – $2021. - V. 529. - N_{2} 7. - P. 1430-1441.$

8. Merkulyeva N., Mikhalkin A., Kostareva A., Vavilova T. Transient neurochemical features of the perigeniculate neurons during early postnatal development of the cat// Journal of Comparative Neurology -2022. - V.530 - N = 18. - P.3193-3208.

 Михалкин А. А., Меркульева Н. С. Дорзальное ядро наружного коленчатого тела: анатомия, гистология, онтогенез// Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2023. – V. 73. – № 3. – Р. 311–333.

Главы в монографиях:

1. Меркульева Н. С., Шкорбатова П. Ю., Михалкин А. А. Белки нейрофиламентов и практическое использование антител SMI-32 при выявлении нейронов// Иммуногистохимия и конфокальная микроскопия / под ред. Д. Э. Коржевский. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2018. С. 89–98.

2. Merkulyeva N. S., Mikhalkin A. A. SMI-32 labeling in the perigeniculate nucleus// Neural Networks and Neurothechnologies / eds. Shelepin Y., Ogorodnikova E., Solovyev N., Yakimova E. St. Petersburg: VVM, 2019. P. 75–79.

Иные издания:

1. Михалкин А. А., Меркульева Н. С. Признаки гетерогенности популяции клеток Y проводящего канала наружного коленчатого тела кошки// Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем. Материалы всероссийской конференции с международным участием, посвященная 90-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. СПб-Колтуши: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН. СПб-Колтуши: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2015. С. 237.

Mikhalkin A. A. et al. Expression of the heavy-chain neurofilament proteins in the lateral geniculate nucleus of the cat// Abstract book of International Neuronus 2015 IBRO & IRUN Neuroscience Forum. Poland. Krakow: Institute of zoology of the Jagiellonian university, 2015.
C. 116.

3. Михалкин А. А. Закономерности роста и локализации SMI-32-иммунопозитивных нейронов в наружном коленчатом теле кошки во время онтогенеза// Фундаментальная наука и клиническая медицина. Тезисы XIX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей. СПб: СПбГУ, 2016. С. 388.

4. Михалкин А. А., Меркульева Н. С. Неоднородность постнатального развития клеток Yсистемы в наружном коленчатом теле// Современные проблемы нейробиологии. Структура и функции нервной системы в норме и патологии. Материалы II Всероссийскойнаучной конференции с международным участием. Ярославль: ГБОУ ВПО ЯГМУ Минздрава России, 2016. С. 32.

5. Михалкин А. А. Формирование наружного коленчатого тела кошки до начала критического периода развития зрительной системы// Санкт-Петербургский научный форум в честь 100-летия Физиологического общества им. И.П. Павлова. Материалы конференции. СПб: Лема, 2017. С. 72–73.

6. Mikhalkin A. A., Merkulyeva N. S. The postnatal development of the lateral geniculate nucleus and the perigeniculate nucleus of the visual system of the cat: SMI-32 study// FENS Regional Meeting. Hungary. Pécs, 2017. – URL: <u>https://pcongress.hu/pdf/mikhalkin_68_549.pdf(дата обращения: 17.07.2022</u>)

7. Михалкин А. А., Меркульева Н. С. Возрастная динамика иммуномечения тяжёлых белков нейрофиламентов в наружном коленчатом теле кошки// Материалы Всероссийской молодёжной конференции с международным участием "Современные аспекты интегративной физиологии." СПб: BBM, 2018. С. 69–71.

8. Mikhalkin A. A., Merkulyeva N. S. Development of the Y cells of the cat lateral geniculate nucleus in relation to the visuotopic map// Proceedings of the IEEE International Conference 'Video and Audio Signal Processing in the Context of Neurotechnologies' SPCN-2018. St. Petersburg: VVM Publishing Ltd., 2018. C. 34–35.

9. Михалкин А. А., Меркульева Н. С. Изменение рисунка распределения парвальбуминпозитивных нейронов в зрительном таламусе кошки во время постнатального развития // Интегративная физиология: Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 170-летию со дня рождения И.П. Павлова Санкт-Петербург. Тезисы докладов. СПб: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2019. С.160–161.

10. Шкорбатова, П.Ю. Ляховецкий, В.А. Михалкин, А.А. Меркульева, Н.С. Алексеенко С. В. Анализ распределения SMI-32 позитивных нейронов в НКТ у кошек с нарушениями бинокулярного зрения// Интегративная физиология: Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 170-летию со дня рождения И.П. Павлова Санкт-Петербург. Тезисы докладов. СПб: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2019. С.273–274

11. Михалкин А. А., Меркульева Н. С. Динамика накопления тяжёлых нейрофиламентов как маркер развития зрительного таламуса кошки// Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2020. – Т. 56. – № 7. – С. 646.

12. Михалкин А. А., Меркульева Н. С. Порядок развития зрительных областей коры кошки: накопление тяжёлых нейрофиламентов// Интегративная физиология: Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 95-летию

Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Тезисы докладов. СПб: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН. – 2020. – С. 63.

13. Меркульева Н.С., Михалкин А.А., Никитина Н.И. Постнатальное развитие перигеникулятного ядра// Конференции «Обработка и интеграция информции в сенсорных системах: от внешнего сигнала к сложному образу», посвящённая 90-летию со дня рождения академика И.А. Шевелёва. Тезисы докладов. Москва: Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. – 2022. – С. 36.

14. Михалкин А.А., Меркульева Н.С., Никитина Н.И. Гетерохронность созревания нейронов, обеспечивающих анализ движения зрительных образов// Конференции «Обработка и интеграция информации в сенсорных системах: от внешнего сигнала к сложному образу», посвящённая 90-летию со дня рождения академика И.А. Шевелёва. Тезисы докладов. Москва: Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. – 2022. – С. 38.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 17ц представительство центра поля 17 первичной зрительной коры
- 17п представительство периферии поля 17 первичной зрительной коры
- I-VI слои первичной зрительной коры

См – крупноклеточный С-слой дорзального наружного коленчатого тела

МИЯ – медиальное интерламинарное ядро

НКТд – дорзальное наружное коленчатое тело

ПГЯ – перигеникулятное ядро

- тНФ тяжёлые цепи белков нейрофиламентов
- Фронт фронтальные срезы
- Сагит сагиттальные срезы

Ц, ВП, НП, БП, МП – представительство центра, верхней, нижней, бинокулярной и монокулярной периферии поля зрения