

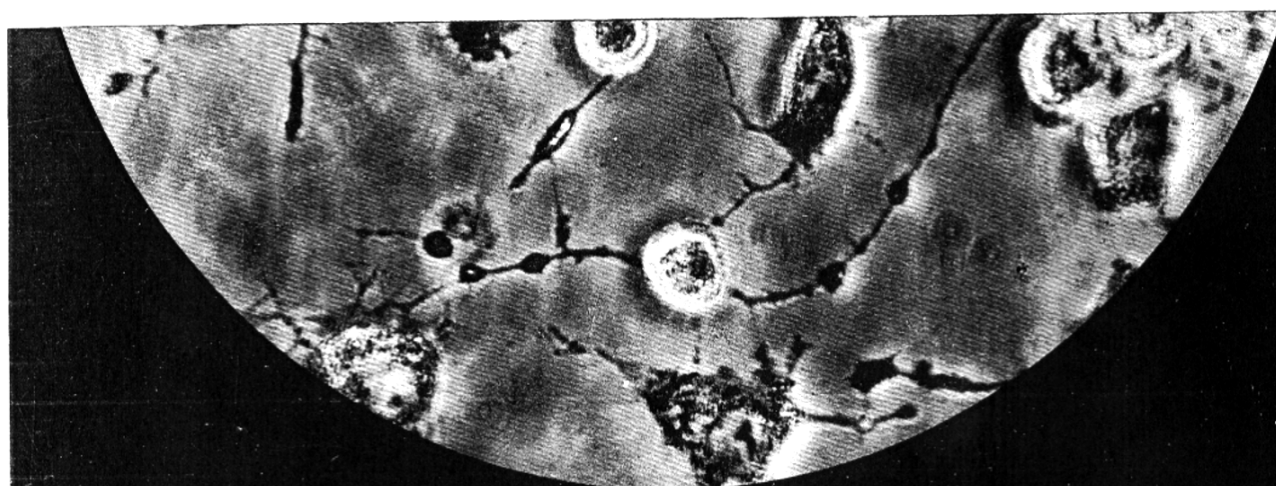
Научно-теоретический
медицинский
журнал

ISSN 0004-1947



МОРФОЛОГИЯ

MORPHOLOGY



6
2003

П. А. Зыкин

СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПОЛЯ 4 МОЗГА КОШКИ В НОРМЕ И ПОСЛЕ ОДНОСТОРОННЕЙ ЭНУКЛЕАЦИИ ГЛАЗА*

Лаборатория физиологии сенсомоторных систем (зав. — проф. Г.А.Куликов) Научно-исследовательского института физиологии им. А.А. Ухтомского, Санкт-Петербург

Приведены сравнительные данные структурно-метаболической организации поля 4 мозга кошки в норме и после односторонней энуклеации. Исследование выполнено методом гистохимического выявления фермента цитохромоксидазы. Для обработки полученных данных компьютеризированными методами использована оригинальная установка захвата видеоизображения. В результате исследования получены данные о неравномерном распределении фермента вдоль подслоя IIIb поля 4 у животных с односторонней энуклеацией. Основываясь на литературных данных, высказано предположение, что чередование таких высоко- и низкорепреактивных областей, свидетельствует об упорядоченности ретикулярного представительства правого и левого глаза в сенсомоторной коре. (*Морфология*, 2003, т. 124, вып. 6, с. 22–25)

Ключевые слова: *сенсомоторная кора, поле 4, структурно-метаболическая организация, односторонняя энуклеация глаза, цитохромоксидаза.*

В организации поведенческих реакций на сенсорные раздражения особое место отводят таламфронтальной ассоциативной системе, в состав которой у хищных входит сенсомоторная кора (СМК), включающая поле 4 [2]. Одной из проблем сенсомоторного взаимодействия на уровне СМК является организация зрительно контролируемых движений. В разработке вопроса реализации таких движений ключевыми представляются исследования структуры зрительных входов в СМК [4, 7, 8]. Обнаружить зрительные входы в СМК мозга традиционными нейроморфологическими методами прослеживания связей чрезвычайно трудно, так как существуют ряд корковых и таламических центров, которые могут опосредовать поступление зрительной информации в данную область коры, и в то же время большинство из этих структур являются полисенсорными, т. е. могут передавать информацию от нескольких сенсорных систем [1, 9, 10]. Исходя из очевидности взаимосвязи функциональных и метаболических потребностей нервной ткани, эта задача может быть решена путем изучения динамики метаболизма после сенсорной депривации. Данные о метаболическом и иммунохимическом маркировании мозга, суммированные в обзоре С.Н.Топоровой [5], свидетельствуют о том, что цитохромоксидаза (ЦО), являясь эндогенным маркером функциональной активности нейрона, позволяет наблюдать пространственно упорядоченное представительство рецепторной поверхности на разных уровнях мозга как у интактных животных (баррелы, баррелоиды в соматосенсорной системе грызунов), так и после её разрушения или стимуляции. В частности, после односторонней энуклеации глаза или одностороннего сшивания век у обезьяны и кошки происходят морфофункциональные перестройки, выявляемые ЦО-методом, во всех структурах, которые являются мишенями входов от опери-

рованного глаза [5, 6, 15]. Однако сенсорные входы, как это следует из данных физиологических исследований, характерны и для СМК, где их роль сводится к сенсорному обеспечению движений [2, 4, 7].

Исходя из того, что уровни активности фермента легко меняются экспериментальным воздействием и не зависят от числа переключений между рецепторной поверхностью и исследуемой структурой, задачей настоящего исследования явилось изучение гистохимическим методом реакции ЦО-активности поля 4 СМК мозга кошки на одностороннюю энуклеацию глаза. В литературе отсутствуют данные о ЦО-активности СМК в подобных экспериментах. Предположительно одностороннее удаление глаза должно изменять сенсорный афферентный приток к СМК и поэтому возможно вычленение пулов ЦО-гетерогенной активности, которые отражают рецепторное представительство.

Материал и методы. Работа проведена на пяти половозрелых самцах кошки: трех—односторонне энуклеированных и двух—интактных. Операции по энуклеации проведены в совместных экспериментах лаборатории нейрогистологии ФИН им. И.П.Павлова РАН и лаборатории физиологии сенсомоторных систем НИИ физиологии им. А.А.Ухтомского СПбГУ. Методика операции описана в статье С.Н.Топоровой и соавт. [6]. Под глубоким нембуталовым наркозом мозг животных прижизненно перфузировали изотоническим раствором хлорида натрия, затем фиксирующей смесью, содержащей 0,4% параформальдегида, 1,25% глутаральдегида на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4). После этого мозг извлекали из черепа, вырезали блок, включающий кору передней и задней сигмовидных извилин, пропитывали его раствором сахарозы на фосфатном буфере возрастающей концентрации от 10% до 30% и изготавливали фронтальные или сагитальные криостатные срезы толщиной 30 мкм. Каждый 3-й срез обрабатывали в инкубационной среде для выявления активности ЦО по методу Вонг-Райли [6, 15]. Компьютерное изображение препаратов по-

*Работа выполнена при финансовой поддержке фонда «Университеты России» — грант № 11-01-05.

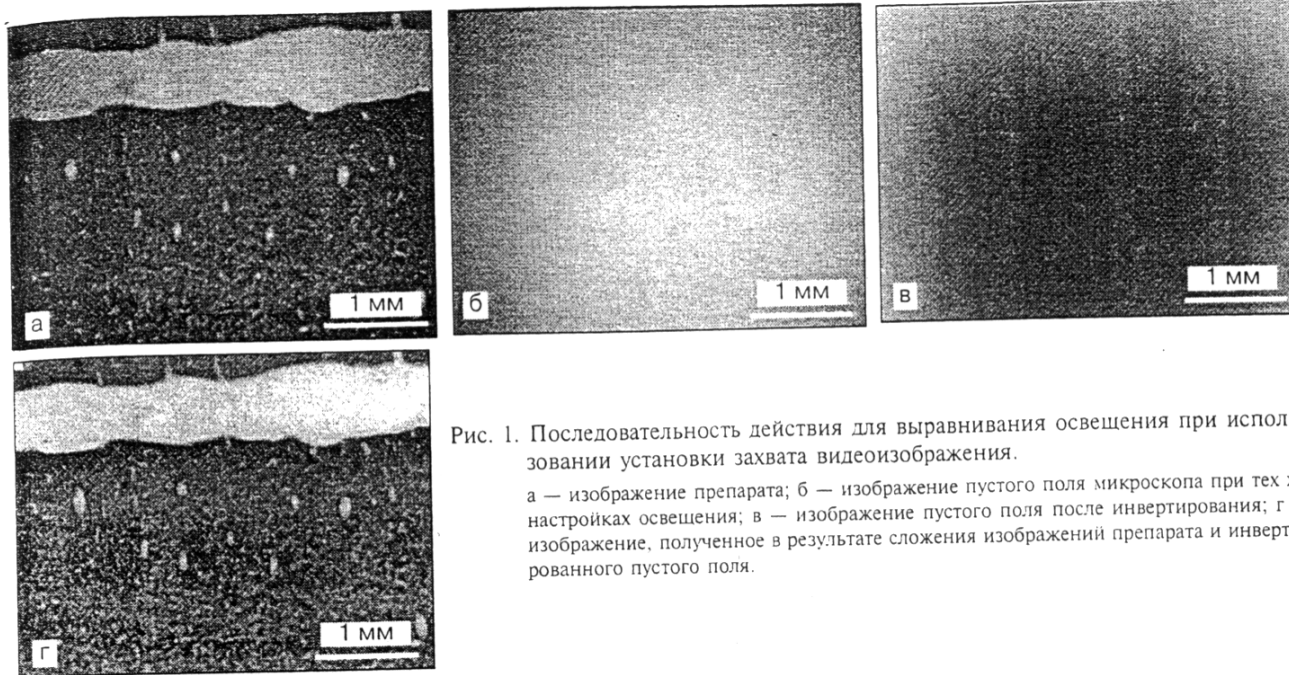


Рис. 1. Последовательность действия для выравнивания освещения при использовании установки захвата видеоизображения.

а — изображение препарата; б — изображение пустого поля микроскопа при тех же настройках освещения; в — изображение пустого поля после инвертирования; г — изображение, полученное в результате сложения изображений препарата и инвертированного пустого поля.

лучали на установке, состоящей из микроскопа Биолам-И, камеры Mustek 300W и персонального компьютера. Камера, входившая в установку, имела разрешение получаемого изображения 640×480 точек и позволяла передавать информацию о цвете каждой точки с разрешением 6 бит на цвет.

Проанализированы по 25 срезов каждого полушария мозга интактных и экспериментальных животных.

В работе применяли адаптированные методы обработки изображения гистологических препаратов и использовали пакет программ обработки изображения «GIMP» [http://www.gimp.org]. Для изменения доли частот в изображении совместно с этим пакетом использовали дополнение «Fourier» [http://www.geocities.com/SiliconValley/Way/1484].

В связи с тем, что исследование и съемку препаратов проводили при малых увеличениях микроскопа (об. 2,5), а изучаемые области имели сравнительно большие размеры и при этом малые различия в интенсивности окраски, трудностью являлась равномерность освещения поля зрения. Метод Кёлера не позволил добиться абсолютно равномерного освещения и поэтому был использован следующий способ его выравнивания. Перед съемкой определяли оптическую плотность наиболее темного и светлого участков препарата. При этом яркость освещения подбирала такую, чтобы его самая темная прозрачная точка (например, наиболее ярко окрашенная клетка) была приблизительно на 15% светлее абсолютно непрозрачной (например, осадка красителя), для чего использовали возможность программы определять оптическую плотность интересующего участка изображения. После этого проводили съемку препарата (рис. 1, а), а затем пустого поля микроскопа (без препарата) при тех же настройках освещения (см. рис. 1, б), изображение которого затем инвертировали (см. рис. 1, в). Оба изображения поточечно складывали путем создания в программе обработки двух слоев: верхнего — изображения препарата, нижнего — инвертированного изображения пустого поля. Таким образом, получили снимок, максимально приближенный к таковому при идеально ровном освещении (см. рис. 1, г).

После такой предварительной обработки определяли средние значения оптической плотности препарата, и по полученным результатам строили графики.

Результаты исследования. Цитоархитектонические слои 4 на фронтальных и сагитальных срезах мозга интактных животных различаются по интенсивности окраски нейропиля и тел составляющих их нейронов. Тела клеток выявляются отчетливо только в

слое V, слои I, II, III и VI различаются по степени ЦО-активности нейропиля, и поэтому имеют разную оптическую плотность (рис. 2, а). Слой I характеризуется низким уровнем ЦО-активности, высоко активной узкая часть слоя непосредственно под пинальной поверхностью. Окраска вдоль всего слоя равномерная. Слой II характеризуется высоко ЦО-активным нейропилем. Вдоль всего слоя окраска равномерная. Слой III по интенсивности окраски может быть разделен на 2 подслоя: верхний, более тонкий умеренно ЦО-активный, соответствует подслою IIIa, нижний, более толстый, высокоактивный, соответствует подслою IIIb. Окраска вдоль обоих слоев равномерная. Слой V имеет низкую ЦО-активность нейропиля и его можно разделить на 2 подслоя: подслоя Va, в котором хорошо дифференцируется небольшое количество средних и больших интенсивно окрашенных пирамидных нейронов, и подслоя Vb, образованный группами высоко ЦО-активных крупных пирамидных нейронов. Нейроны этого слоя хорошо выделяются на более светлом фоне. Слой VI имеет равномерно низкую ЦО-активность нейропиля. Подлежащее белое вещество характеризуется очень низкой оптической плотностью.

У энуклеированных животных в поле 4 ипси- и контралатерального полушарий можно наблюдать такое же распределение активности фермента по слоям, как и у интактных. Однако, в отличие от последних, у энуклеированных животных слой III характеризуется неравномерной окраской: интенсивно окрашенные участки разделяются слабоокрашенными. Такие закономерно повторяющиеся пятна более или менее высокой ЦО-активности отчетливей всего выражены в подполе 4у задней сигмовидной извилины контралатерального полушария (см. рис. 2, в). Однако расплывчатые границы пятен с плавным переходом от интенсивной окраски к слабой затрудняют их измерение. Поэтому на компьютерных изображениях препаратов подполя 4у мозга интактных и энуклеированных животных сначала определяли средние значения оптической плотности вдоль каждого из слоев и по поперечнику коры, затем строили графики этих значений (см. рис. 2, б, г). Такая обработка под-

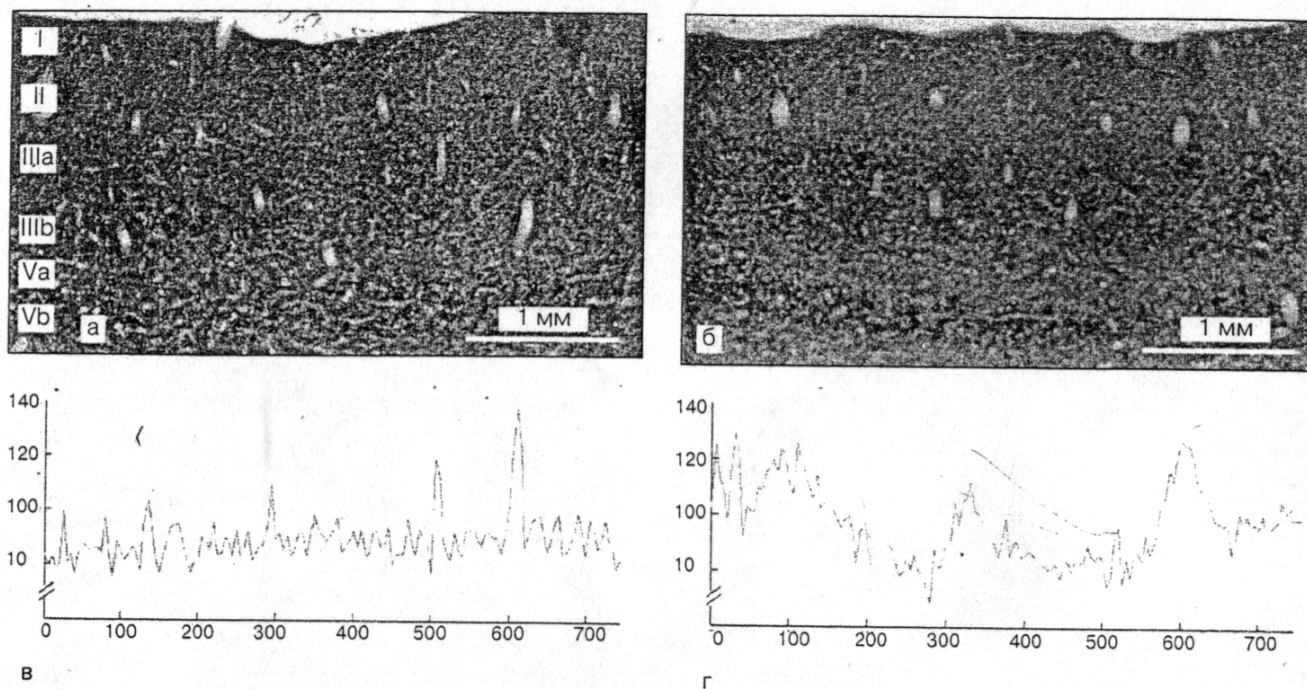


Рис. 2. Распределение цитохромоксидазы (а, б) по слоям и графики оптической плотности (в, г) подслоя IIIa подполя 4γ мозга интактной (а, в) и односторонне энуклеированной (б, г) кошек.

I–V — слои и подслои коры; в, г — по осям абсцисс — точки на компьютерном изображении препарата; по осям ординат — средняя оптическая плотность (усл. ед.).

твердила визуальные наблюдения различной ЦО-активности слоев коры подполя 4γ и равномерности распределения фермента вдоль слоев у интактного животного (см. рис. 2, б). Графики оптической плотности слоя III поля 4 экспериментальных животных свидетельствуют о закономерном чередовании областей высокой и низкой ЦО-активности в подслое IIIb, которые лучше всего выражены в подполе 4γ (см. рис. 2, г). Измерение областей неодинаковой ЦО-активности, выполненное по этим графикам, позволило установить размер областей с различной ЦО-активностью, составивший от 800 до 1200 мкм. Изучение графиков оптической плотности поперечника коры показало, что основные изменения ЦО-активности происходят в подслое IIIb.

Наглядно продемонстрировать неоднородность слоя III стало возможным после изменения доли определенных частот в изображении. Такая обработка позволила наиболее эффективно визуализировать повторяющиеся структуры с неоднаковой ЦО-актив-

ностью в подслое IIIb поля 4γ односторонне энуклеированных животных (рис. 3, а, б).

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного гистохимического исследования ЦО-активности с последующей компьютерной обработкой видеоизображения препаратов позволили сделать вывод о том, что в поле 4 сенсомоторной коры кошки после односторонней энуклеации глаза происходит, по сравнению с интактным материалом, изменение метаболической активности, проявляющееся в появлении чередующихся пятен повышенной и пониженной активности фермента, локализованных в подслое IIIb. Чередование таких высоко- и низкорективных областей, вероятно, свидетельствует о том, что упорядоченность ретинального представительства правого и левого глаза характерна не только для сенсорно-специфичных центров мозга [5, 14], но и для СМК.

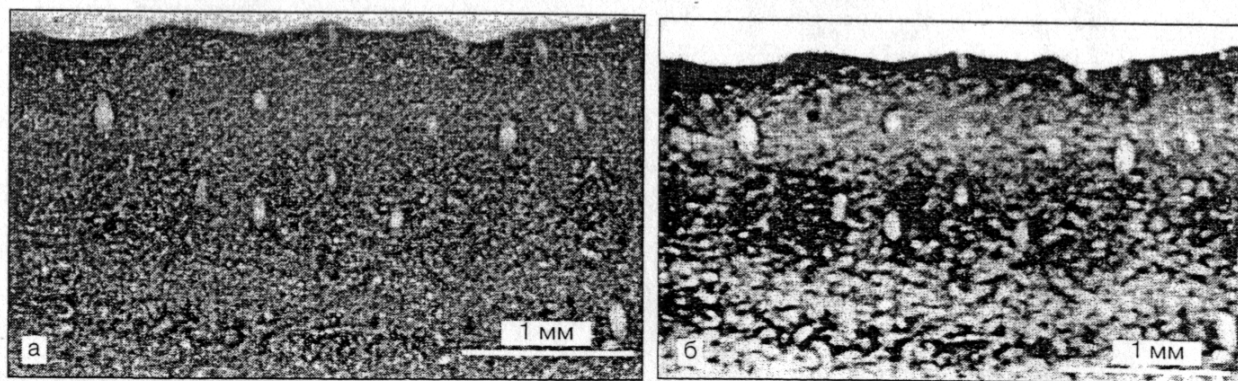


Рис. 3. Неоднородность активности цитохромоксидазы на фронтальном срезе подполя 4γ до (а) и после (б) изменения частотных составляющих на изображении.

Анализируя литературные данные об организации афферентных связей поля 4, можно заключить, что зрительная информация к данному полю может поступать по таламическим, корково-корковым внутрислоушарным и каллозальным проекционным волокнам. Так, по корково-корковым связям зрительная информация может поступать от ассоциативных полей коры 7, 5a, 5b [14].

СМК принимает мио- и соматотопически упорядоченные входы от нескольких ядер латерального таламуса [1, 3, 9, 10, 13]. Все ядра вентробазального комплекса проецируются на поле 4 у кошки умеренно слабо. Пограничная зона [VL-VPL(bz)]* характеризуется перекрытием спиноталамических и мозжечково-таламических окончаний и сильно проецируется на поле 4. Вентромедиальное ядро и таламическая переходная зона (VA-VL), афферентные волокна, в которые поступают из заднего интерпозитного ядра мозжечка и черной субстанции, умеренно слабо проецируются на это поле. Кроме того, поле 4 получает входы от ассоциативного медиодорсального ядра [1, 2].

Самый мощный вход поле 4 получает от VL, что подтверждено многочисленными исследованиями [1, 3, 9, 10, 13]. Таламический вход от ядра VL латерального таламуса опосредует входы от зубчатого и интерпозитного ядер мозжечка. Особенностью окончания проекций этого ядра в поле 4 является их строгая приуроченность к подслою IIIb, в то время как проекции от остальных таламических ядер более диффузно рассеяны по слоям III, V и VI [11, 12]. Окончания корково-корковых связей приурочены к подслою IIIa и слою II [1].

Таким образом, максимум изменений ЦО-активности у энуклеированных животных в подслое IIIb, согласно графикам оптической плотности, может служить косвенным признаком того, что зрительные входы в поле 4 опосредуются таламическим ядром VL, что подтверждает ранее высказанные предположения [7]. Свидетельством в пользу данного предположения является также и размер областей с неодинаковой ЦО-активностью, которые соответствуют диаметру ветвления одиночного таламокортикального волокна, идущего от VL — 800–1000 мкм [10].

Подводя итог полученным результатам и анализу литературных данных, можно заключить, что изменение метаболической активности определенных нейронных пулов поля 4 СМК у кошки после односторонней энуклеации глаза происходит вследствие нарушения сенсорного афферентного притока. Этот факт, вероятно, является структурным доказательством поступления зрительной информации в СМК и объясняет возможность реализации программ зрительно контролируемых движений нейронами этой области коры.

* Обозначения ядер: VL — вентролатеральное ядро; VPL — вентральное заднелатеральное ядро; bz — пограничная зона; VA — вентральное переднее ядро.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабминдра В.П. и Брагина Т.А. Структурные основы межнейронной интеграции. Л., Наука, 1982.
2. Батуев А.С. Высшие интегративные системы мозга. Л., Наука, 1981.
3. Краснощекова Е.И. Морфометрическое и гистохимическое исследование модульной организации неокортекса млекопитающих.

В кн.: Материалы Междунар. конф. «Проблемы нейрокибернетики». Ростов-н/Д, изд. ООО «ЦВВР», 2002, с. 291–293.

4. Куликов Г.А. Кортикальные механизмы сенсомоторной интеграции. Нервная система, 2001, вып. 35, «Мозг, психика и поведение», с. 123–139.
5. Топорова С.Н. Изучение центральной нервной системы с помощью гистохимического выявления цитохромоксидазы. Морфогенез и реактивная перестройка нервной системы. Труды Санкт-Петербургск. общ-ва естествоиспытат., 1996, т. 76, вып. 5, с. 157–166.
6. Топорова С.Н., Макаров Ф.Н., Краснощекова Е.И. и Цветков Е.А. Распределение цитохромоксидазы в верхних холмиках крыши среднего мозга кошки в норме и после односторонней энуклеации (гистохимическое исследование). Морфология, 1997, т. 111, вып. 2, с. 39–44.
7. Черенкова Л.В. Кортикальные механизмы сенсомоторной координации: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2001.
8. Чиженкова Р.А. Структурно-функциональная организация сенсомоторной коры (морфологический, электрофизиологический и нейромедиаторный аспекты). М., Наука, 1986.
9. Asuncion Moron M. and Reinoso-Suarez F. Topographical organization of the thalamic afferent connections to the motor cortex in the cat. J. comp. Neurol., 1988, v. 270, p. 64–85.
10. Hepp-Reymond M.-C. Functional organization of motor cortex and its participation in voluntary movements. Comp. Primate Biol., 1988, v. 4, p. 501–624.
11. Jones E.G. Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization. Neuroscience, 1998, v. 85, № 2, p. 331–345.
12. Jones E.G. The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. Trends Neurosci., 2001, v. 24, № 10, p. 595–601.
13. Percheron G., Francois C., Talbi B. et al. The Primate motor thalamus. Brain Res. Rev., 1996, v. 22, № 1 p. 93–181.
14. Purves D., Riddle D.R. and LaMantia A.-S. Iterated patterns of brain circuitry (or how the cortex gets its spots). Trends Neurosci., 1992, v. 15, № 10, p. 362–181.
15. Wong-Riley M.T.T. Cytochrome oxidase: an endogeneous metabolic marker for neuronal activity. Trends Neurosci., 1989, v. 12, № 3, p. 94–101.

Поступила в редакцию 04.12.2002 г.
Получена после доработки 11.04.2003 г.

STRUCTURAL-METABOLIC ORGANIZATION OF CAT'S BRAIN AREA 4 IN NORMAL CONDITIONS AND AFTER UNILATERAL OCULAR ENUCLEATION

P.A. Zykin

Comparative data on structural-metabolic organization of cat's brain area 4 in normal conditions and after unilateral ocular enucleation are presented. The investigation was performed using histochemical demonstration of cytochrome oxidase activity. The data obtained were processed by computer methods using original device of image analysis. The results of the investigations indicate an uneven cytochrome oxidase distribution along sublayer IIIb of area 4 in unilaterally enucleated animals. On the basis of literature data it is suggested that such an alternation of areas of high and low reactivity is the evidence of ordering of retinal representation of right and left eyes in the sensomotor cortex.

Key words: *sensomotor cortex, area 4, structural-metabolic organization, unilateral ocular enucleation, cytochrome oxidase.*

Laboratory of Physiology of Sensomotor Systems, A.A. Ukhtomskiy Scientific Research Institute of Physiology, St. Petersburg.