

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ, БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

УДК 611.81.013:611.811.013

*Н. А. Костин, П. А. Зыкин, А. В. Баскаков, Е. И. Краснощекова***ПОСТНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫСЫ***

Изучали развитие сенсомоторной коры мозга крысы в первые три недели постнатального онтогенеза. Морфометрически, измеряя профильные поля клеток, установили корреляцию стратификации коры с глубиной залегания нейронов определенного размерного класса. К пятому дню жизни в корковой пластинке формируется единый комплекс слоев II–III, слои V и VI; к 15-му дню слои II и III дифференцируются; шестислойное строение с выделением соответствующих размерных классов клеток отмечено только к 20-му дню. Антитела к белку микротрубочек MAP2 — маркер дифференцирующихся нейронов. MAP2-позитивные пирамидные нейроны у 5-дневных крыс обнаружены в слоях V и VI, начиная с 10-го дня такие клетки появляются в слоях II и III. Иммуногистохимически показано опережающее созревание нейронов нижнего этажа коры, образующих кортикофугальные тракты, позднее — верхнего этажа, инициирующих ассоциативные корково-корковые связи. Антитела к белку нейрофиламентов N200 — маркер функционально специализированных кортикофугальных нейронов. N200-позитивные пирамидные клетки появляются в слое V сенсомоторной коры, начиная с 10-го постнатального дня, в других слоях не отмечены вплоть до конца срока наблюдений. Библиогр. 18 назв. Ил. 3.

Ключевые слова: головной мозг крысы, неокортекс, ранний онтогенез, пирамидные нейроны, иммуногистохимия, кортико-кортикальные и кортикофугальные связи.

POSTNATAL DEVELOPMENT OF FUNCTIONALLY SPECIALIZED PYRAMIDAL NEURONS OF RAT'S SENSORIMOTOR CORTEX*N. A. Kostin, P. A. Zykin, A. V. Baskakov, E. I. Krasnoshchekova*

St. Petersburg State University, 7/9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation; drkzs88@mail.ru, pavel.zykin@spbu.ru, krasnelena@bio.pu.ru, krasnelena@gmail.com

Early stages of rat's postnatal sensorimotor cortex development were studied. Morphometric analysis of the cortex stratification by distance from pial surface and cell size at the age of 10 postnatal days (PD) revealed complex of neurons from layers II–III, layer V and VI. Adult six-layers stratification was seen only after 20th PD. Immunohistochemistry against neuron specific protein MAP2 showed following development dynamic: at 5th PD positive neurons were seen only in layers V and VI; from 10th PD positive neurons start to appear in layers II and III. Immunohistochemistry against neurofilament protein N200, deemed as marker of corticofugal neurons, showed different dynamic: starting from 10th

Н. А. Костин (drkzs88@mail.ru), П. А. Зыкин (pavel.zykin@spbu.ru), А. В. Баскаков, Е. И. Краснощекова (krasnelena@bio.pu.ru, krasnelena@gmail.com): Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9.

* Работа выполнена с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

PD positive neurons are found only in the layer V. Our results lead to a conclusion that corticofugal neurons differentiating ahead of cortico-cortical neurons of upper cortex layers. Refs 18. Figs 3.

Keywords: rat's brain, neocortex, early ontogenesis, pyramidal neurons, immunohistochemistry, cortico-cortical and corticofugal tracts.

Введение

Хорошо известно, что эфферентные нейроны неокортекса млекопитающих, хотя и относятся к одному типу пирамидных, представляют собой гетерогенную популяцию, различающуюся не только по структурным особенностям, физиологическим параметрам, включенности в определенные нейронные цепи, но и по экспрессии генов [1–3]. С помощью иммуногистохимических маркеров удалось создать более точную классификацию нейронов коры и разделить их на субпопуляции по особенностям синтеза белков в процессе миграции [4]. Так, в коре мозга мыши нейробласты, иммунопозитивные к Lmo4, в процессе развития превращаются в пирамидные клетки, которые инициируют кортико-кортикальные связи, а к *Clim1* — кортикофугальные [5]. Известно, что корковая пластинка формируется за счет последовательных миграций нейробластов по принципу изнутри—наружу, что определяет хронологию специализации кортикофугальных и кортико-кортикальных нейронов [6, 7]. У высших млекопитающих такие клетки, как правило, залегают в определенном слое коры, однако у грызунов нейроны, которые образуют кортико-кортикальные связи, не имеют строгой приуроченности к верхнему этажу коры, а присутствуют и в нижележащих слоях, образуя смешанную с кортикофугальными нейронами популяцию [8].

Цитоскелет принимает непосредственное участие во всех внутриклеточных процессах, поэтому некоторые из его белков могут быть использованы как маркеры ключевых этапов нейрогенеза и функциональной специализации клеток. Стабилизация формы тела и отростков нейрона происходит с активным участием нейрофиламентов и микротрубочек. Синтез белка микротрубочек MAP2 приходится на стадию развития дендритной системы нейронов и включения их в межнейронные сети [9]. Таким образом, MAP2 является маркером того этапа онтогенеза, который сопряжен с активным синаптогенезом и повышенной уязвимостью клеток. Один из белков нейрофиламентов N200 избирательно синтезируется только в тех нейронах, которые образуют кортикофугальные, но не кортико-кортикальные связи, и таким образом маркирует функциональную специализацию пирамидных клеток [10].

Целью настоящей работы являлось изучение особенностей раннего постнатального развития кортикофугальных и кортико-кортикальных пирамидных нейронов соматосенсорной области коры мозга крысы с применением цитоархитектонического, морфометрического и иммуногистохимического подходов.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужили фронтальные срезы мозга крыс линии Вистар, возрастом 5, 10, 15 и 20 дней, по 4 среза на каждый срок. Мозг фиксировали погружением в 4%-ный раствор параформальдегида на 0,1М фосфатном буфере с рН 7,4 и заливали в парафин по общепринятой методике. Для исследования

была выбрана фронто-париетальная область соматосенсорной коры. Для идентификации области исследования использовали атлас мозга крысы [11].

Срезы толщиной 15 мкм монтировали на предметных стеклах, депарафинировали и через один окрашивали либо крезильным фиолетовым, либо иммуногистохимически. Окраска крезильным фиолетовым проводилась по методу Ниссля согласно общепринятому протоколу. Для выявления MAP2- и N200-позитивных нейронов применяли непрямой метод иммуногистохимического окрашивания. Для этого использовали первичные моноклональные антитела кролика против белка MAP2 и моноклональные антитела мыши против белка N200, а также вторичные антитела козы против иммуноглобулинов кролика (Alexa 568) и против иммуноглобулинов мыши (Alexa 488), конъюгированные с флуорохромами. Препараты, обработанные иммуногистохимически, заключали в 80%-ный глицерин с добавлением DAPI для окраски клеточных ядер. Этот способ окрашивания дает возможность различать слои по плотности клеточных ядер. DAPI и вторичные антитела к белкам MAP2 и N200 обладают разными спектрами испускания и поглощения света, поэтому использование лазеров с разной длиной излучаемой волны позволило отдельно регистрировать синюю окраску ядер DAPI, красные MAP2-позитивные и зеленые N200-позитивные нейроны.

Микроскопирование препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM6000 B и конфокального микроскопа Leica TCS SP5 в ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Для морфометрического исследования применяли программу анализа изображений ImageJ. Так как форма клеток нервной ткани крайне разнообразна, в качестве универсальной меры их величины была выбрана площадь профильного поля. Для этого каждый из нейронов исследуемого участка коры обводили по периметру, при этом автоматически регистрировали две его характеристики — площадь профильного поля и глубину залегания от пиальной поверхности полушария, по которой в дальнейшем судили о принадлежности нейрона к определенному слою. По полученным с помощью программы Microsoft Excel данным строили точечные графики и диаграммы распределения нейронов по размеру и глубине залегания. При установлении достоверности размерных классов использовали метод ANOVA, $p < 0,05$.

Результаты исследования

Исследование цитоархитектоники на препаратах, окрашенных методом Ниссля, показало, что кора мозга пятидневной крысы стратифицирована неполно. Ширина поперечника коры составляет 1090 мкм. Маргинальная зона (слой I), шириной 80 мкм, выделяется на препаратах как наиболее редкоклеточная и светлоокрашенная, ее граница с подлежащим слоем II четкая. Кортикальная пластинка шириной 910 мкм при визуальном анализе показывает слабое разделение на слои. Субпластинку удается дифференцировать по характерной вытянутой горизонтально форме клеток и большей плотности их расположения. Ввиду нечеткости границ между слоями, распределение размерных классов нейронов определяли по глубине их залегания от пиальной поверхности коры. Точечные графики позволяют выделить клеточные кластеры, образованные нейронами определенного размерного диапазона (рис. 1, А). Первый из них расположен на глубине 80–400 мкм от поверхности коры

и образован клетками размером от 30 до 90 мкм², при среднем размере — 55 мкм². Этот клеточный кластер соответствует недифференцированному комплексу слоев II–III. Следующий кластер клеток залегает на глубине 400–650 мкм от пиальной поверхности. Составляющие его нейроны с глубиной сначала увеличиваются, а затем уменьшаются в размере: площадь их профильного поля на границе с первым кластером составляет 50–120 мкм², на границе с третьим — 40–100 мкм², размер наиболее крупных клеток на глубине 500 мкм достигает 190 мкм². Средний размер клеток составляет 85 мкм². Этот кластер клеток соответствует слою V. На глубине от 650 до 990 мкм залегают мелкие и средние нейроны с площадью профильного поля от 30 до 105 мкм², при среднем размере 60 мкм², эти клетки образуют слой VI. Четвертый кластер, соответствующий субпластинке, выделен на глубине 990–1090 мкм и представлен нейронами размером от 50 до 140 мкм² со средним размером 80 мкм². Таким образом, несмотря на слабую визуализацию слоев, морфометрический анализ по двум показателям — профильному полю и глубине залегания нейронов позволяет выделять кластеры, соответствующие цитоархитектоническим слоям.

У десятидневных крыс толщина коры увеличивается до 1740 мкм. Ширина слоя I составляет 100 мкм, он содержит небольшое количество мелких клеток. В корковой пластинке отчетливо визуализируются слои V и VI, однако ее верхний уровень стратифицирован слабо. По результатам морфометрического анализа в ней, выделены кластеры клеток определенного размерного диапазона, соответствующие цитоархитектоническим слоям (рис. 1, Б). Первый такой кластер, на глубине от 100 до 600 мкм, представлен клетками размером от 45 до 185 мкм² при среднем размере 110 мкм² и соответствует слоям II–III. Второй кластер, гомологичный слою V, расположен на глубине от 600 до 1100 мкм, образован клетками размером от 80 до 300 мкм² на границе с III слоем, от 85 до 250 мкм² на границе со слоем VI, и от 85 до 430 мкм² на глубине 820 мкм. Средний размер клеток слоя V составляет 180 мкм². При этом в слое V начинают выделяться два размерных субкластера, соответствующие более и менее крупноклеточным частям слоя. Третий кластер, расположенный на глубине от 1100 до 1620 мкм, представлен клетками с площадью профильного поля от 60 до 195 мкм² и соответствует слою VI. Самый глубокий клеточный кластер, на глубине 1620–1720 мкм, соответствует субпластинке. Профильное поле составляющих его нейронов находится в диапазоне от 60 до 220 мкм², средний размер которых — 150 мкм².

У пятнадцатидневных крыс наблюдается дальнейшее усложнение стратификации коры, что хорошо подтверждается морфометрическим анализом. К этому возрасту у крыс в коре удастся четко дифференцировать семь слоев: слой I, или маргинальную зону, слои II–V и VI и субпластинку. Толщина коры к этому сроку составляет 1900 мкм. Слой I светло окрашен, беден клеточными элементами, его ширина 115 мкм. Точечные графики распределения размерных классов нейронов по глубине демонстрируют появление дополнительных кластеров, соответствующих слоям II и IV (рис. 1, В). Первый кластер соответствует слою II и залегает на глубине от 115 до 320 мкм. Он представлен клетками размером от 75 до 165 мкм², средний размер клеток составляет 110 мкм². Кластер, соответствующий слою III, образован клетками с площадью профильного поля 90–220 мкм² и залегает на глубине 320–600 мкм, средний размер клеток этого слоя — 140 мкм². Следующий кластер аналогичен слою IV, он залегает на глубине 600–700 мкм и состоит из клеток с площадью

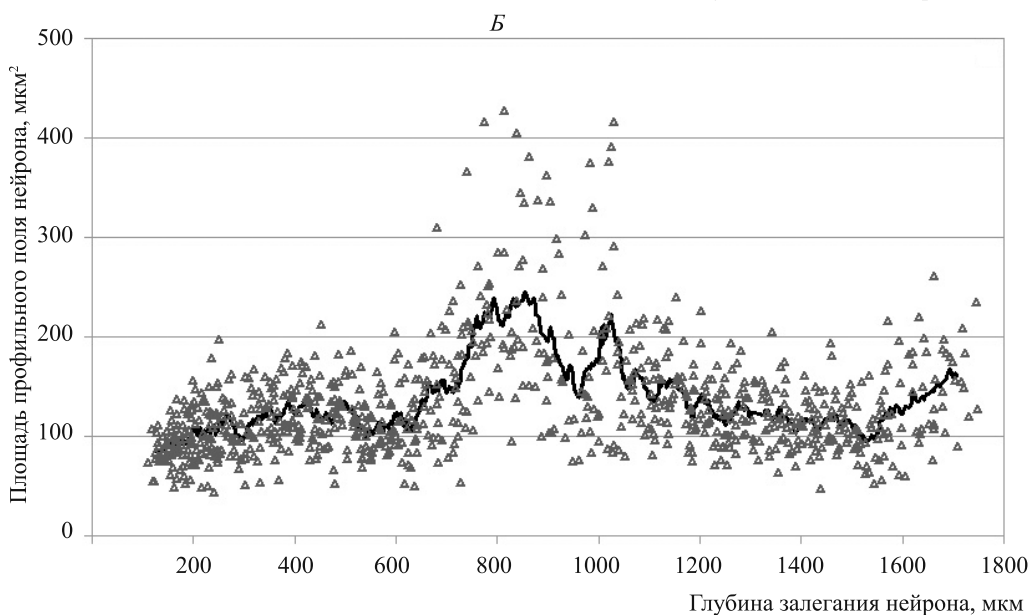
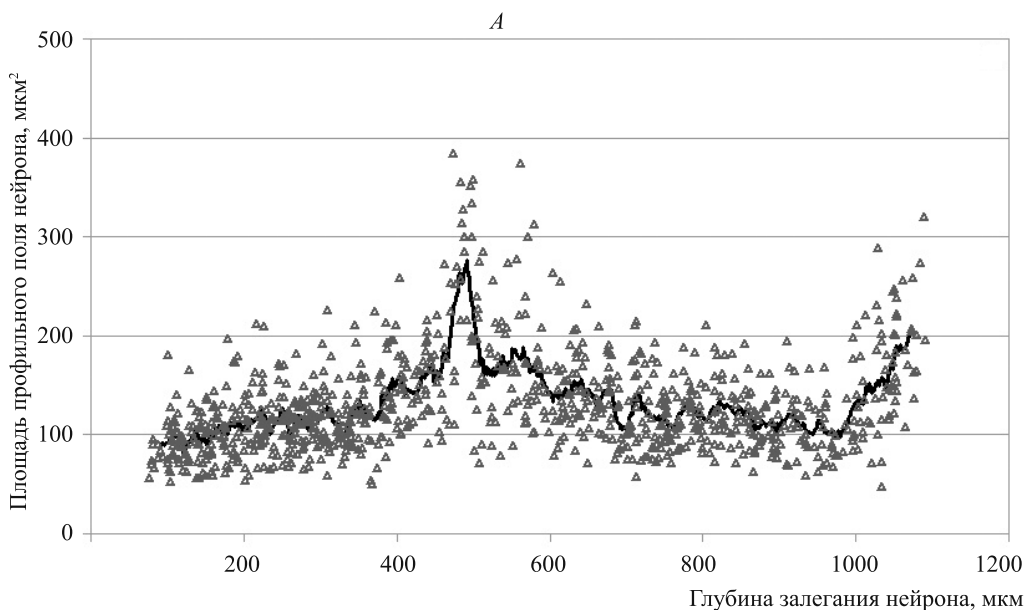


Рис. 1. Точечные диаграммы распределения клеток по поперечнику сенсорной коры мозга крысы и графики размерных кластеров нейронов:

А — 5-дневная крыса; Б — 10-дневная крыса; В — 15-дневная крыса; Г — 20-дневная крыса.

профильного поля от 70 до 145 мкм² при среднем значении 120 мкм². Четвертый кластер занимает уровень от 700 до 1400 мкм и соответствует слою V, образованному крупными пирамидными нейронами, средний размер которых составляет 195 мкм², при разбросе площади профильного поля от 80 до 450 мкм². Кластер этого слоя разделяется на два субкластера — верхний, более крупноклеточный, и мелкоклеточный

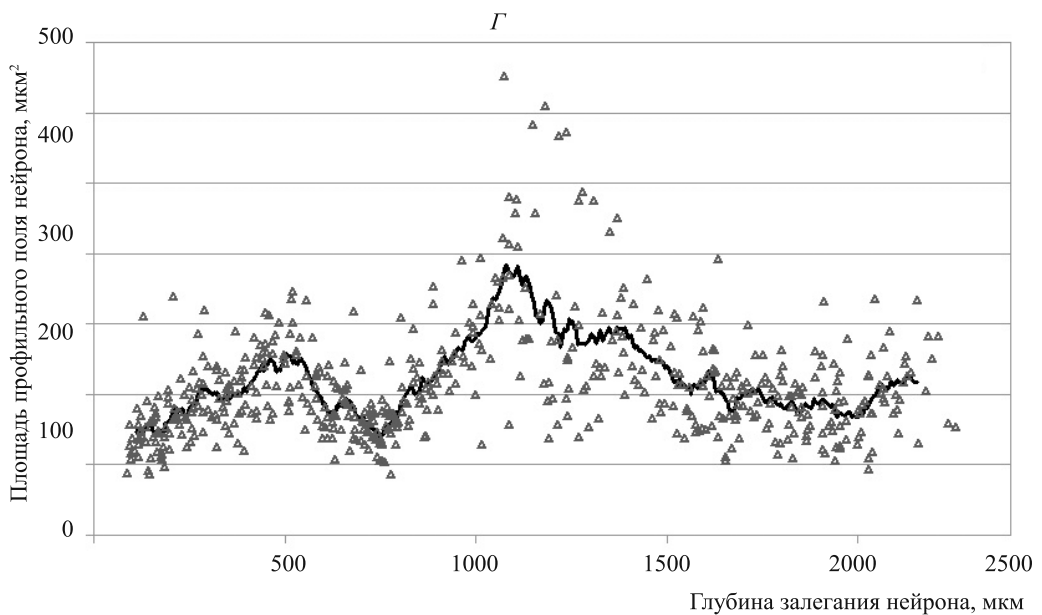
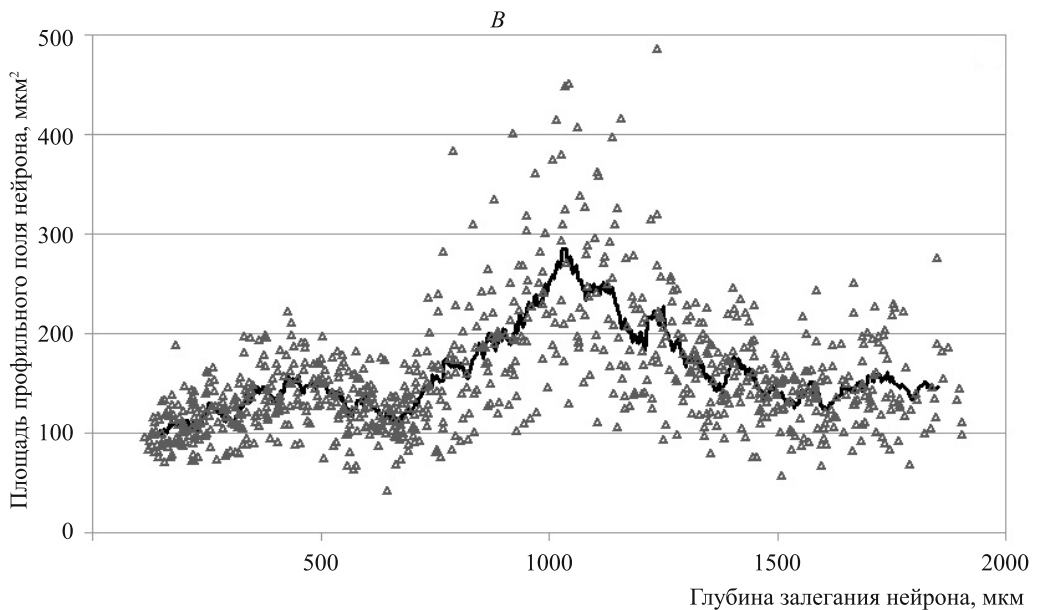


Рис. 1. Окончание

нижний. Самый глубокий кластер расположен на глубине от 1400 до 1800 мкм и состоит из клеток с площадью профильного поля 60–245 мкм² (в среднем 150 мкм²), соответствует слою VI и субпластинке. Ширина субпластинки составляет 100 мкм, ее клетки вытянутые, полиморфные, чем резко отличаются от пирамидных нейронов вышележащего слоя VI, кроме того, их отличает большая плотность расположения.

При анализе препаратов мозга 20-дневной крысы, окрашенных по методу Ниссля, установлено, что кора к этому возрасту имеет типичное для зрелых животных

шестислойное строение. Толщина коры составляет 2200 мкм. Маргинальная зона (слой I) шириной 110 мкм четко отделена от подлежащих слоев и бедна клетками. Нейроны корковой пластинки, по результатам морфометрического анализа, на этом сроке группируются в 5 кластеров, которые соответствуют цитоархитектоническим слоям (рис. 1, Г). Первый кластер в районе слоя II расположен на глубине 110–340 мкм и состоит из клеток размером от 85 до 240 мкм² (средний размер — 170 мкм²). Следующий кластер, соответствующий слою III, представлен клетками от 165 до 345 мкм², со средним размером 215 мкм² и залегает на глубине 340–640 мкм. Третий кластер на глубине от 640 до 810 мкм соответствует слою IV и представлен мелкими клетками от 100 до 180 мкм² при их среднем размере 165 мкм². Четвертый кластер, соответствующий слою V, формируется на глубине 810–1600 мкм и представлен крупными клетками со средним размером 270 мкм² в диапазоне от 130 до 610 мкм². Слой V разделяется на два подкластера — верхний, более крупноклеточный, и нижний, из клеток меньшего размера. Последний кластер, соответствующий слою VI, располагается на глубине 1600–2100 мкм и состоит из клеток от 110 до 330 мкм², средний размер которых — 190 мкм². Ширина субпластинки составляет 105 мкм, формирующие ее полиморфные клетки имеют вытянутую горизонтально форму, плотность их залегания выше, чем у слоя VI, что позволяет четко отграничить ее от вышележащего слоя.

Иммуногистохимическое исследование коры пятидневных крыс показало, что MAP2-позитивные нейроны к этому дню развития залегают на разной глубине, образуя скопления в нескольких слоях. Для того чтобы точно определить эти уровни, соотнести их с цитоархитектоническими слоями, на изображения препаратов накладывали диаграммы размерных классов клеток. У пятидневных животных MAP2-позитивные нейроны обнаружены в нижней части комплекса слоев II–III, слоях V и VI. В последних обнаружена наибольшая интенсивность окрашивания нейронов. На этом сроке MAP2 присутствует преимущественно в телах нейронов и в проксимальных участках апикальных дендритов. У отдельных клеток слоя V окрашен апикальный дендрит на всем его протяжении вплоть до слоя I. N200-позитивные нейроны в кортикальной пластинке на данном сроке не обнаружены. Клетки субпластинки иммунопозитивны к белкам MAP2 и N200, метки колокализированы. Маргинальная зона коры у пятидневных крыс имеет диффузную MAP2-позитивную окраску, иммунопозитивные клетки не выявлены, вероятно, такая окраска обусловлена густыми ветвлениями тонких апикальных дендритов нижележащих слоев.

Как показывает иммуногистохимическое исследование мозга десятидневных крыс, на данном сроке в кортикальной пластинке содержатся как MAP2-, так и N200-позитивные нейроны. MAP2-позитивные клетки встречаются во всех клеточных слоях коры. В комплексе слоев II–III антителами к MAP2 маркируются только тела клеток и проксимальные участки дендритов. У крупных пирамидных нейронов слоя V окрашены как тела, так и тонкие апикальные дендриты, прослеживающиеся до слоя I. Кроме того, в слое V к десятому дню появляются N200-позитивные нейроны, данный белок распределен по периметру сомы и отсутствует в дистальных отделах дендритов. N200-позитивные клетки также окрашены и на белок MAP2 (рис. 2). Ориентируясь по плотности распределения ядер, окрашенных DAPI, можно определить, что на этом сроке начинает выделяться плотноклеточный,

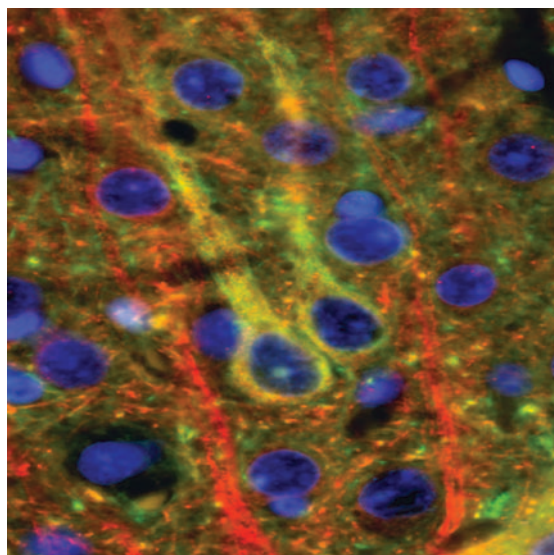


Рис. 2. Двойное иммуногистохимическое окрашивание нейронов слоя V сенсомоторной коры мозга 10-дневной крысы.

Зеленый — N200; красный — MAP2; синий — DAPI. Шкала: 50 мкм.

по сравнению с выше- и нижележащими слоями, слой IV. В субпластинке иммуногистохимическое окрашивание на MAP2 сохраняется, а интенсивность окрашивания на N200 ослабевает по сравнению с пятидневными животными. Маргинальная зона демонстрирует выраженную MAP2-позитивность при диффузном равномерном окрашивании.

На сроке 15 дней MAP2 присутствует во всех клеточных слоях. В слое V коры на белок MAP2 окрашены преимущественно апикальные дендриты пирамидных нейронов, которые начинают объединяться в восходящие пучки, достигающие слоя I, где они обильно ветвятся. В нейронах слоя III MAP2 присутствует в телах и проксимальных участках дендритов, кроме того, появляются отдельные нейроны, у которых иммунопозитивны не только тела, но и апикальные дендриты. Иммунореактивность тел нейронов на этом сроке ниже, чем на предыдущих, за исключением нейронов слоя II, где MAP2 присутствует только в телах и отсутствует в отростках. N200-позитивные нейроны залегают в слое V, метка распределена по периметру тела клетки и в проксимальном участке апикального дендрита. При совмещении диаграммы размерных классов клеток и изображения коры, расположение N200-позитивных нейронов соответствует верхней части слоя V. Окрашивание на белок N200 демонстрирует его колокализацию с белком MAP2. Нейроны субпластинки окрашены на белок MAP2, но иммунореактивность к N200 отсутствует. В маргинальной зоне к этому сроку дифференцируются ветвления апикальных дендритов, иммунопозитивных к белку MAP2.

На препаратах коры 20-дневных крыс, обработанных антителами к белкам MAP2 и N200, установлено, что слой II имеет MAP2-иммунопозитивную активность только в телах нейронов. MAP2-иммунопозитивные клетки слоя III обладают

апикальным дендритом, восходящим до слоя I. У нейронов, располагающихся в слое V, окрашены преимущественно апикальные дендриты, образующие толстые восходящие пучки, окраска тел клеток слабая. В маргинальной зоне четко выделяются густые ветвления MAP2-позитивных апикальных дендритов. N200-позитивные нейроны в большом количестве присутствуют в слое V, преимущественно занимая его верхнюю часть, что подтверждается при наложении диаграммы размерных классов клеток на препарат. N200 распределен по периметру тел клеток, в основаниях базальных дендритов, а также в проксимальных отделах апикальных дендритов. Одиночные N200-позитивные нейроны встречаются в слоях II и III. Все нейроны, окрашенные на N200, также являются MAP2-позитивными. Распределение ядер клеток на DAPI соответствует полностью дифференцированной коре и позволяет выделить все citoархитектонические слои — II, III, IV, V и VI. Нейроны субплатинки окрашены на белок MAP2, но не содержат N200. Совмещение диаграмм

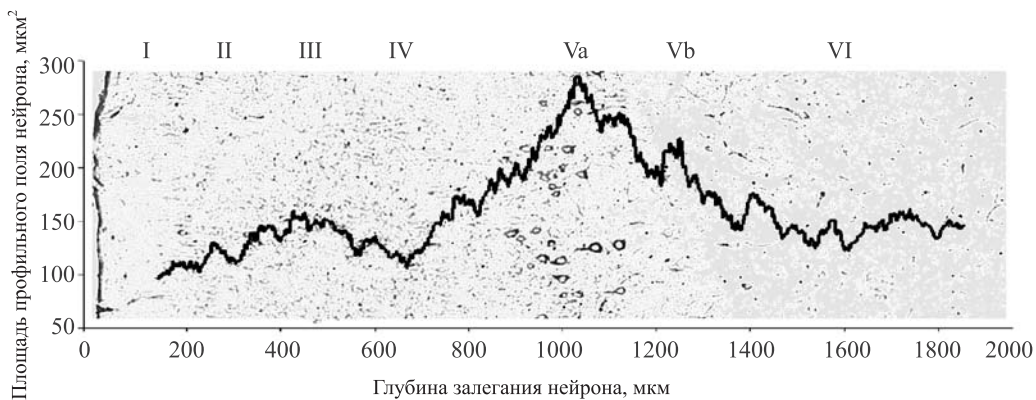


Рис. 3. Локализация N200-позитивных нейронов в сенсомоторной коре мозга 20-дневной крысы

Изображение микропрепарата совмещено с графиком размерных кластеров нейронов. I, II, III, IV, Va, Vb, VI — слои коры. Шкала: 200 мкм.

размерных классов с оцифрованными изображениями препаратов показало преимущественную приуроченность N200-позитивных нейронов к подслою Va, который образован более крупными пирамидными нейронами (рис. 3).

Обсуждение результатов исследования

В ходе исследования постнатального развития неокортекса мозга крысы с применением кластерного анализа установлены следующие закономерности: начало стратификации, отмеченное у животных первых десяти дней жизни, происходит в результате того, что нейроны нескольких размерных классов залегают на разной глубине, формируя единый комплекс слоев II–III, слои V и VI; к пятнадцатому дню происходит разделение слоев II и III за счет укрупнения клеток слоя III; шестислойное строение с выделением соответствующих клеточных кластеров отмечено к двадцатому дню жизни животных. Таким образом, морфометрический анализ подтвердил известные закономерности развития неокортекса крыс [12] и позволил

установить объективные критерии усложнения цитоархитектоники, которые в дальнейшем использовались для уточнения локализации иммунопозитивных нейронов. Атрибутивность функционально специализированных нейронов определенному слою коры предопределяется рядом важных процессов, таких как миграция нейробластов, формирование избирательных афферентных и эфферентных связей, элиминация субпластинки [12–14].

В своем развитии нейроны проходят стадию экспрессии белка MAP2, причем обнаруживается он только в телах нейронов и дендритах. Начало синтеза MAP2 маркирует усложнение организации нейрона, специфическое ветвление отростков, увеличение плотности дендритного дерева, сопутствующее увеличению числа синаптических контактов. Поскольку нейробласты очень слабо экспрессируют этот белок, MAP2 является иммуноморфологическим маркером нейронов, приступивших к функциональной дифференцировке [9]. В ходе проведенного исследования было установлено, что MAP2-позитивные пирамидные нейроны у пятидневных крыс локализованы преимущественно в нижнем этаже коры, слоях V и VI, а начиная с 10-го дня, занимают весь поперечник коры, появляясь в слоях II и III. Таким образом, иммуногистохимически подтверждено гетерохронное созревание нейронов на разных уровнях коры с опережающей дифференцировкой клеток нижнего этажа (слои V и VI), которые образуют кортикофугальные тракты, и более поздней — верхнего этажа (слои II и III), которые инициируют ассоциативные внутри- и межполушарные связи.

Функциональная специализация слоев известна для коры всех млекопитающих. Особенно четко она выражена у субприматов, приматов и человека [8, 15, 16]. У грызунов приуроченность функционально специализированных эфферентных нейронов к конкретному слою не так строга [17]. При этом некоторые белки нейрофиламентов (SMI-32, FNP-7 и N200) синтезируются по преимуществу в кортикофугальных нейронах. Такой избирательный синтез наблюдается как в период раннего онтогенеза, так и у взрослого организма, а также в культуре нейронов, не имеющих контакта с кортикальными или субкортикальными мишенями [10].

Согласно полученным данным, N200-позитивные пирамидные клетки появляются в коре крысы к десятому постнатальному дню, при этом в корковой пластинке они обнаруживаются только в слое V. Уточнение их локализации с помощью графиков размерных кластеров клеток показывает, что эти нейроны занимают преимущественно верхнюю часть слоя V — подслой Va, образованный наиболее крупными пирамидными нейронами, в то время как нижняя часть слоя V — подслой Vb содержит лишь единичные N200-позитивные нейроны. Обращает на себя внимание тот факт, что клетки с колокализацией обоих белков соседствуют с нейронами, иммунопозитивными только к MAP2 (см. рис. 2). Не исключено, что последние относятся к функциональному классу кортико-кортикальных пирамидных клеток.

Идентификация нейронов, инициирующих кортикофугальные проекции, наиболее детально исследована методом anterogradного транспорта пероксидазы хрена. Согласно результатам этих работ, аксоны наиболее крупных пирамидных нейронов слоя V образуют кортикоспинальный тракт [18]. Таким образом, анализ цитоархитектоники в сочетании с морфометрическим и иммуногистохимическим исследованиями позволяет точно локализовать клетки, определить их морфотип, очередность созревания, функциональную специализацию.

Параллельно с усложнением цитоархитектоники корковой пластинки происходит снижение плотности клеток и сокращение численности N200-позитивных нейронов в субпластинке. По-видимому, эти факты косвенно указывают на процесс элиминации субпластинки, с которым сопряжена интенсивная дифференцировка слоев корковой пластинки. В целом такая корреляция подтверждает данные литературы о зависимости развития корковой пластинки от процессов апоптоза нейронов субпластинки [13].

Выводы

1. Исследование развития сенсомоторной коры мозга крысы в первые три недели постнатального онтогенеза свидетельствует о постепенном усложнении ее стратификации, что коррелирует с обособлением клеточных кластеров, образованных нейронами узкого размерного диапазона и соответствующих по глубине залегания цитоархитектоническим слоям.

2. Иммуногистохимическое исследование сенсомоторной коры мозга крысы с помощью антител к белку MAP2 в первые три недели постнатального онтогенеза указывает на то, что дифференцировка пирамидных нейронов происходит последовательно от нижних слоев к верхним.

3. N200-позитивные нейроны идентифицируются в сенсомоторной коре мозга крысы начиная с 10-го дня постнатального онтогенеза. Сопоставление диаграмм размерных классов нейронов с локализацией N200-позитивных клеток указывает на их преимущественную приуроченность к подслою Va.

Литература

1. McCormic D. A., Prince D. A. Post-natal development of electrophysiological properties of rat cerebral cortical pyramidal neurons // J. Physiol. 1987. Vol. 393 (12). P. 743–762.
2. A transcriptomic atlas of mouse neocortical layers / Belgard T. G., Marques A. C., Oliver P. L., Abaan H. O., Sirey T. M., Hoerder-Suabedissen A., Garcia-Moreno F., Molnar Z., Margulies E. H., Ponting C. P. // *Neuron*. 2011. Vol. 71 (4). P. 605–616.
3. Larkman A., Mason A. Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. I. Establishment of cell classes // *J. Neurosci*. 1990. Vol. 10 (5). P. 1407–1414.
4. Sultan K. T., Brown K. N., Shi S. H. Production and organization of neocortical interneurons // *Front. Cell Neurosci*. 2013. Vol. 21 (7). P. 221–235.
5. Azim E., Shnyder S. J., Cederquist G. Y., Sohur U. S. Lmo4 and Clim1 progressively delineate cortical projection neuron subtypes during development // *Cereb. Cortex*. 2009. Vol. 19 (Suppl. 1). P. 62–73.
6. Cooper J. A. A mechanism for inside-out lamination in the neocortex // *Trends Neurosci*. 2008. Vol. 31 (3). P. 113–119.
7. Huang Z. Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development // *Mol. Cell. Neurosci*. 2009. Vol. 42 (1). P. 11–22.
8. Богословская Л. С., Поляков Г. И. Пути морфологического прогресса нервных центров у высших позвоночных. М., 1981. 160 с.
9. Dehmelt L., Halpain S. Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? // *J. Neurobiology*. 2004. Vol. 58. P. 18–33.
10. Selective neurofilament (SMI-32, FNP-7 and N200) expression in subpopulations of layer V pyramidal neurons *in vivo* and *in vitro* / Voelker C. C., Garin N., Taylor J. S., Gahwiler B. H., Hornung J. P., Molnar Z. // *Cereb. Cortex*. 2004. Vol. 14 (11). P. 1276–1286.
11. Paxinos G., Watson G. The rat brain in stereotaxic coordinates. 3rd edition. San Diego, 1997.
12. Role of reelin in the development and maintenance of cortical lamination / Frotscher M., Chai X., Bock H. H., Haas C. A., Forster E., Zhao S. // *J. Neural. Transm*. 2009. Vol. 116 (11). P. 1451–1455.

13. Valiente M., Marin O. Neuronal migration mechanisms in development and disease // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2010. Vol. 20 (1). P. 68–78.

14. Valverde F., Lopez-Mascaraque L., Santacana M., De Carlos J. A. Persistence of early-generated neurons in the rodent subplate: assessment of cell death in neocortex during the early postnatal period // *J. Neurosci.* 1995. Vol. 15 (7). P. 5014–5024.

15. Innocenti G. M. General organization of callosal connections in the cerebral cortex // *Sensory-motor areas and aspects of cortical connectivity* / ed. E. G. Jones, A. Peters. New York, 1986. P. 291–351. (*Cerebral Cortex*. Vol. 5.)

16. Krasnoshchekova E. I., Zykin P. A., Tkachenko L. A., Smolina T. Yu. Features of human cortical pyramidal neurons development during second gestational trimester // *Human Physiol.* 2010. Vol. 36 (4). P. 427–432.

17. Li X. G., Florence S. L., Kaas J. H. Areal distributions of cortical neurons projecting to different levels of the caudal brain stem and spinal cord in rats // *Somatosens. Mot. Res.* 1990. Vol. 7 (3). P. 315–335.

18. Батуев А. С., Бабминдра В. П. Нейронные объединения в коре больших полушарий // *Журн. ВНД*, 1977. Т. 27 (5). С. 715–722.

Статья поступила в редакцию 3 апреля 2014 г.

Сведения об авторах

Костин Николай Анатольевич — магистр биологии

Зыкин Павел Александрович — кандидат биологических наук, доцент

Баскаков Алексей Владимирович — кандидат биологических наук, доцент

Краснощечкова Елена Ивановна — доктор биологических наук, профессор

Kostin Nikolai A. — Master of Biology

Zykin Pavel A. — Ph.D., Associate Professor

Baskakov Alexey V. — Ph.D., Associate Professor

Krasnoshchekova Elena I. — Doctor of Biology, Professor