

© Школьніков В.С.

УДК: 612.83-053.13:616-006

Школьніков В.С.

Вінницький національний медичний університет імені М.І.Пирогова, кафедра анатомії людини (вул.Пирогова, 56, м.Вінниця, 21018, Україна)

МАКРО- ТА МІКРОСТРУКТУРА СПИННОГО МОЗКУ ПЛОДІВ ЛЮДИНИ ІЗ ТЕРАТОМАМИ**Резюме.** В результаті анатомо-гістологічних та імуногістохімічних методів були встановлені макроскопічні, морфометричні і цитоархитектонічні особливості структур сегментів спинного мозку, а також тератом плодів людини терміном гестації 17-18 тижнів.**Ключові слова:** пренатальний період, спинний мозок, тератома.**Вступ**

Функціональна система оцінюється як одиниця анатомо-фізіологічної інтеграції, що об'єднує у кожному конкретному випадку різні нервові системи та динаміку нервових процесів в одну пристосувальну реакцію. Зокрема, для плода характерне прискорення та виборчий розвиток тих структур центральної нервової системи і тих функцій, які необхідні будуть новонародженому для здійснення основних видів життєдіяльності [Фонарев, 1968].

У світі вищевказаного важко переоцінити роль дослідження спинного мозку ембріона та плода людини не тільки в нормі, а й при вадах розвитку. За останні роки дослідники розвитку спинного мозку зіштовхнулися з проблемами в інтерпретації отриманих даних про його структуру. Обширні відомості про мікроархітектоніку мозку не дозволяють авторам достатньо повно пояснити особливості його функціонування як цілісної системи [Кузин и др., 2004]. Завдяки досягненням імунології, біохімії, молекулярної біології, були суттєво розширені можливості гістологічних методів дослідження, які при використанні сучасних імуноцитохімічних підходів дозволяють вивчати організацію елементів тканин *in situ* нервової системи [Коржевский и др., 2011].

Імуногістохімічним дослідженням розвитку спинного мозку присвячена доволі велика кількість робіт, як вітчизняних так і закордонних науковців [Лісяний, Любич, 2004; Marclund et al., 2014]. Нейральні стовбурові клітини, як і інші види стовбурових клітин, мають специфічні маркери - протеїни, наявність яких визначає специфіку клітинного фенотипу [Цимбалюк, 2011].

Встановлено, що віментин визначається в ембріогенезі у клітинах радіальної глії (нейральні стовбурові клітини), які є попередниками нейро- та гліобластів, а також експресується під час диференціювання нейробластів [Кирик, Коржевский, 2012; Ostrem et al., 2014]. Дослідженнями нейроанатомів також доведено, що маркером гліобластів і астроцитів є S-100 (Ca²⁺-зв'язуючий нейрогліальний білок) [Barami et al., 2000]. Глікопротеїн синаптофізин присутній в мембрані нейронів у пресинаптичних міхурцях мозку [Tarr, Edwards, 2008].

Проте, до теперішнього часу не існує маркерів, які були б специфічними для нейральних стовбурових клітин та їх похідних. Тому, наукові повідомлення, які

стосуються досліджень розвитку утворів ЦНС на гістологічному рівні носять невпорядкований та протиречивий характер [Гиляров, 2007].

Науковцями також доволі широко представлені результати досліджень герміногенних пухлин [Мацко, Іванцов, 2006; Takamatsu et al., 2012]. Але, результатів досліджень, які б стосувались вивчення розвитку спинного мозку у плодів людини з вродженими аномаліями нами у доступній літературі не знайдено.

Таким чином, метою нашого дослідження є встановлення анатомо-гістологічних особливостей структурної організації спинного мозку плодів людини з тератомами.

Матеріали та методи

Проведено анатомо-гістологічне дослідження спинного мозку 2 плодів людини віком 17-18 тижнів внутрішньоутробного розвитку. Обидва плоди були жіночої статі, тім'яно-куприкова довжина котрих склала 165,0±2,3 мм, а вага становила 385,8±9,4 г (рис. 1).

Матеріал для досліджень був отриманий в результаті пізніх абортів у ОПБ м.Вінниця, після чого його фіксували у 10% нейтральному розчині нейтрального формаліну. У наступному готувались целоїдинові та парафінові блоки із проведенням серійних зрізів спинного мозку та тератом товщиною 10-15 мкм. Оглядові препарати забарвлювали гематоксилін-еозином, толуїдиновим синім та забарвлення за Ван-Гізона, а також проводили імпрегнацію сріблом по Більшовському. Під час імуногістохімічного дослідження були використані діагностичні моноклональні антитіла фірми "DacoCytomation": віментин, S-100 (гліальний фібрлярний кислий білок), Cdx-2, Cd-68, Ki-67 та синаптофізин.

Всі отримані препарати оцінювали візуально за допомогою мікроскопа "Micromed XS 5520", відеозахват здійснювали камерою "ScienceLab DCM 520". Під час морфометричного дослідження серій зрізів сегментів спинного мозку та тератом була застосована програма "Photo M 1.21" (комп'ютерна гістометрія).

Матеріали дослідження не суперечать основним біоетичним нормам Гельсінської декларації прийнятої 59 Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації у 2008 році.

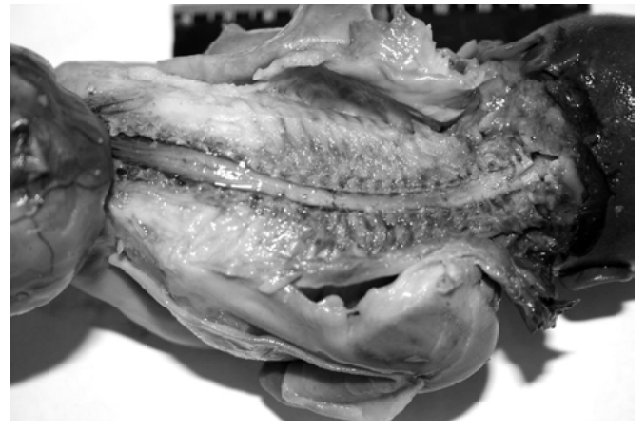


Рис. 1. Плоди людини з крижово-куприковою тератомою 17-18 тиж. гестації. А - вигляд збоку. Б - спинний мозок разом з оболонками у хребтовому каналі.

Результати. Обговорення

У середньому загальна довжина спинного мозку плодів людини із тератомою 17-18 тиж. склала $71,0 \pm 1,5$ мм, вага - $1,2 \pm 0,2$ г (рис. 2).

Діаметр в місці переходу довгастого мозку у спинний мозок становив 4,0 мм. Довжина шийного стовщення дорівнює $19,0 \pm 0,5$ мм, а діаметр шийного стовщення - $4,0 \pm 0,2$ мм. Діаметр грудної частини спинного мозку (у найтоншому місці) склав $2,0 \pm 0,2$ мм. Довжина попереково-крижового стовщення дорівнює $22,0 \pm 0,5$ мм, а діаметр попереково-крижового стовщення - $4,0 \pm 0,2$ мм. Довжина кінцевої нитки становила $14,0 \pm 1,2$ мм. В одному випадку нижній край спинного мозку доходить до рівня LV, в іншому - до SI.

Під час морфометричного дослідження сегментів спинного мозку нами були отримані наступні результати.

Поперечний розмір шийних сегментів на рівні шийного стовщення (у найширшому місці) дорівнює $3,6 \pm 0,1$ мм, передньо-задній розмір становив $2,4 \pm 0,1$ мм. Поперечний розмір грудних сегментів (у найвужчому місці) складає $1,8 \pm 0,1$ мм, передньо-задній розмір - $1,7 \pm 0,1$ мм. Поперечний розмір поперекових сегментів на рівні попереково-крижового стовщення (у найширшому місці) становить $3,6 \pm 0,1$ мм, передньо-задній розмір дорівнює $2,6 \pm 0,1$ мм. Поперечний розмір крижових сегментів складає $1,8 \pm 0,1$ мм, передньо-задній розмір - $1,6 \pm 0,1$ мм.

На горизонтальних зрізах спинний мозок складається з трьох шарів: епендимного (матричного), мантійного та крайового. Епендимний і мантійний шари формують сіру речовину, крайовий шар - білу речовину (рис. 3). Сіра речовина всіх сегментів, крім крижових, чітко

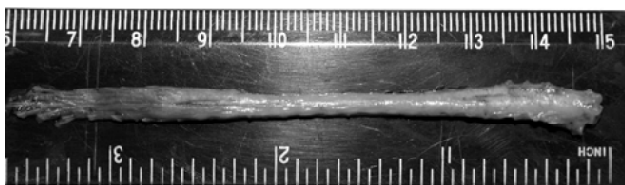


Рис. 2. А - загальний вигляд спинного мозку плоду людини 17-18 тиж. із тератомою.

диференційована на передні та задні роги. У верхніх грудних сегментах окреслюються бічні роги. Площа сірої речовини на рівні шийного стовщення дорівнює $3,3 \pm 0,1$ мм², площа білої речовини - $3,4 \pm 0,1$ мм². Площа сірої речовини на рівні грудних сегментів (у найтоншому місці) становить $1,3 \pm 0,1$ мм², площа білої речовини - $1,3 \pm 0,1$ мм². Аналогічні параметри на рівні поперекових сегментів склали відповідно $4,3 \pm 0,1$ мм² та $3,3 \pm 0,1$ мм². Площа сірої речовини на рівні крижових сегментів дорівнює $1,4 \pm 0,1$ мм² та площа білої речовини - $1,2 \pm 0,1$ мм².

Рухові нейрони шийних сегментів формують чотири групи нейронних комплексів: передньо-присередні, передньо-бічні, задньо-присередні та задньо-бічні. Середня площа рухового нейрона складає $836,3 \pm 29,3$ мкм² (рис. 4). Середня площа ядра рухового нейрона дорівнює $172,9 \pm 5,8$ мкм². У нижніх шийних сегментах виокремлюється група зазадньо-бічних мілких нейронів. Середня площа таких нейронів становить $46,6 \pm 1,4$ мкм², при площі ядра у $11,6 \pm 0,4$ мкм².

Передньо-присередню групу нейронних комплексів грудних сегментів формує малочисельна кількість рухових нейронів (4-5) різного ступеня диференційованості. Середня площа такого нейрона дорівнює $777,3 \pm 26,4$ мкм², із середньої площею ядра у $170,2 \pm 4,9$ мкм². У верхніх грудних сегментах в межах бічних рогів нами встановлена група мілких вегетативних нейронів із середньою площею у $142,3 \pm 5,3$ мкм². Середня площа ядра нейрона складає $32,6 \pm 1,4$ мкм². В нижніх грудних сегментах в основі майбутніх задніх рогів, ближче до центрального каналу розташовується нейронний комплекс, який формує грудне ядро. Середня площа такого нейрона становить $288,5 \pm 5,3$ мкм², а площа ядра - $77,2 \pm 3,2$ мкм² (див. рис. 4).

Серед нейронних комплексів рухових нейронів в межах майбутніх передніх рогів поперекових сегментів можна виділити багаточисельну бічну групу, яка поділяється на передньо-, середньо- та задньо-бічну групи. Середня площа рухового нейрона дорівнює $840,5 \pm 21,6$ мкм², із площею ядра у $213,2 \pm 6,0$ мкм².

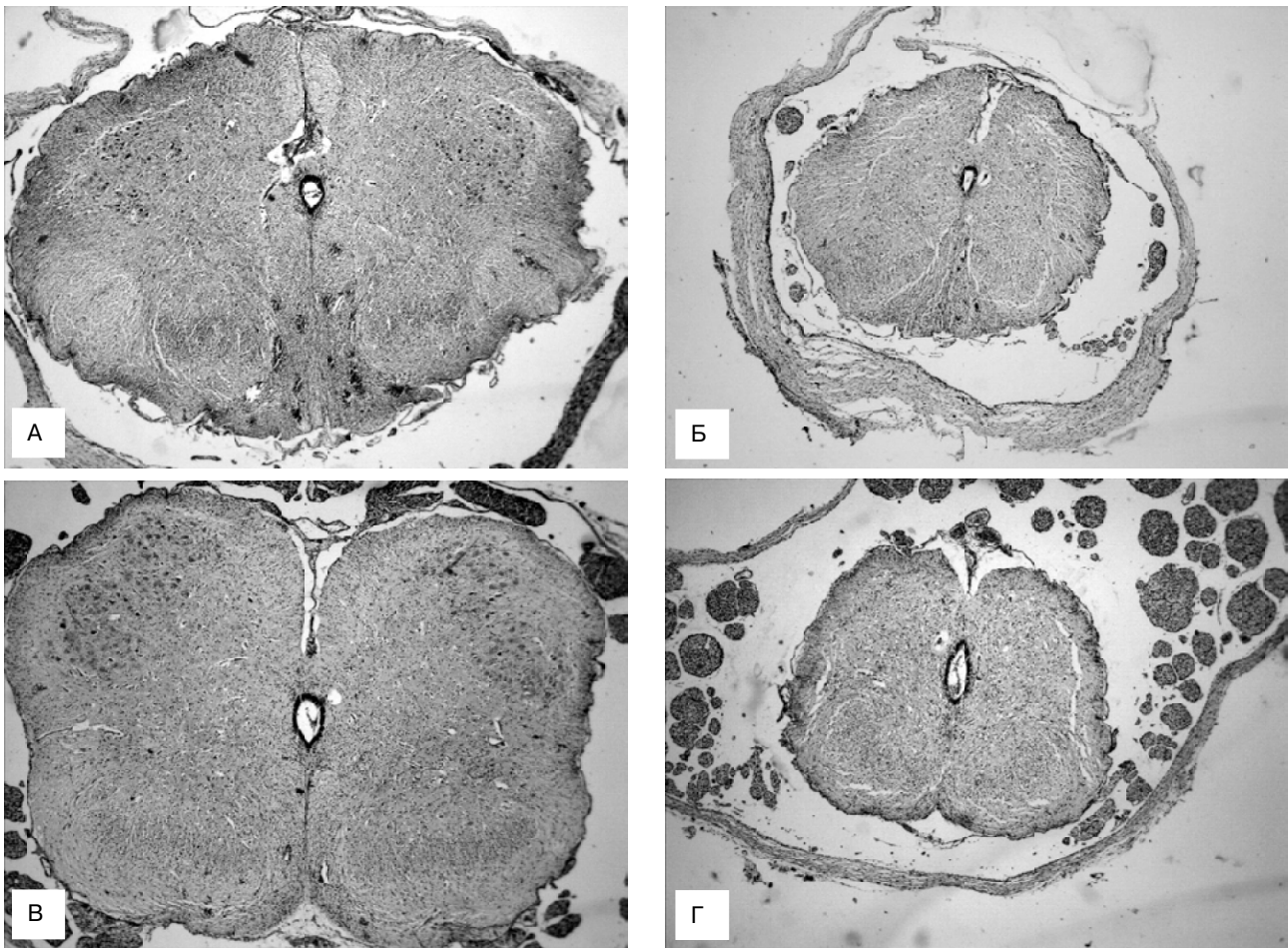


Рис. 3. Горизонтальні зрізи спинного мозку плодів людини із тератомами 17-18 тиж. А - шийні сегменти на рівні шийного стовщення. х2. Гематоксилін-еозин. Б - грудні сегменти. х2. Гематоксилін-еозин. В - поперекові сегменти на рівні попереково-крижового стовщення. х2. Гематоксилін-еозин. Г - крижові сегменти. х2. Гематоксилін-еозин.

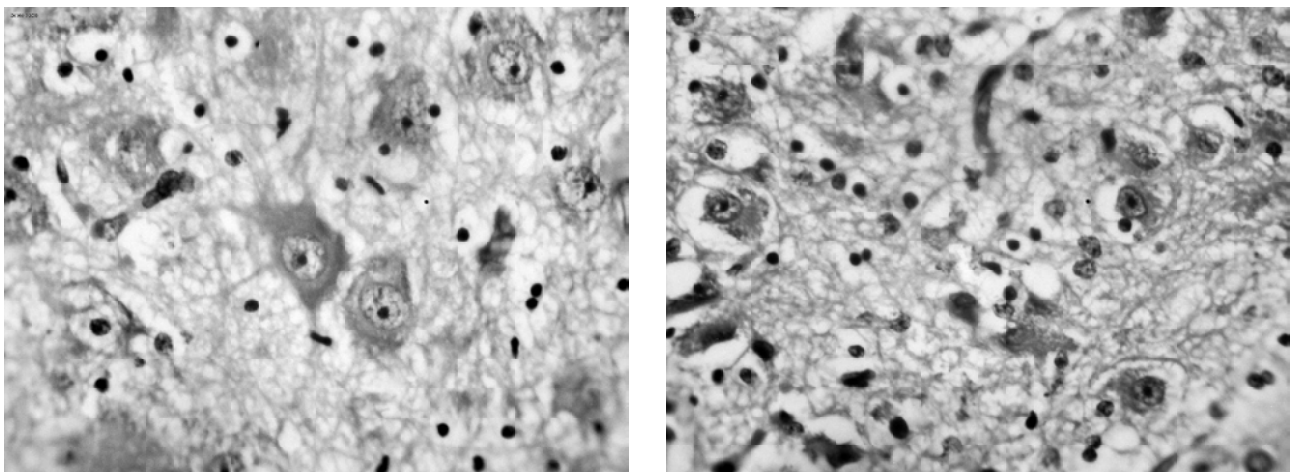


Рис. 4. А - рухові нейрони шийних сегментів. х40. Гематоксилін-еозин. Б - чутливі нейрони грудного ядра. х40. Гематоксилін-еозин.

Площа епендимного (матричного) шару шийних сегментів на рівні шийного стовщення складає $0,021 \pm 0,005 \text{ мм}^2$. Товщина епендимного шару найбільша у вентральній частині і дорівнює $56,8 \pm 1,9 \text{ мкм}$,

найменша товщина в бічних частинах - $22,3 \pm 1,1 \text{ мкм}$, у дорзальній частині товщина знову збільшується та сягає $38,2 \pm 1,6 \text{ мкм}$. Товщина базальної мембрани не рівномірна по усьому периметру центрального каналу і

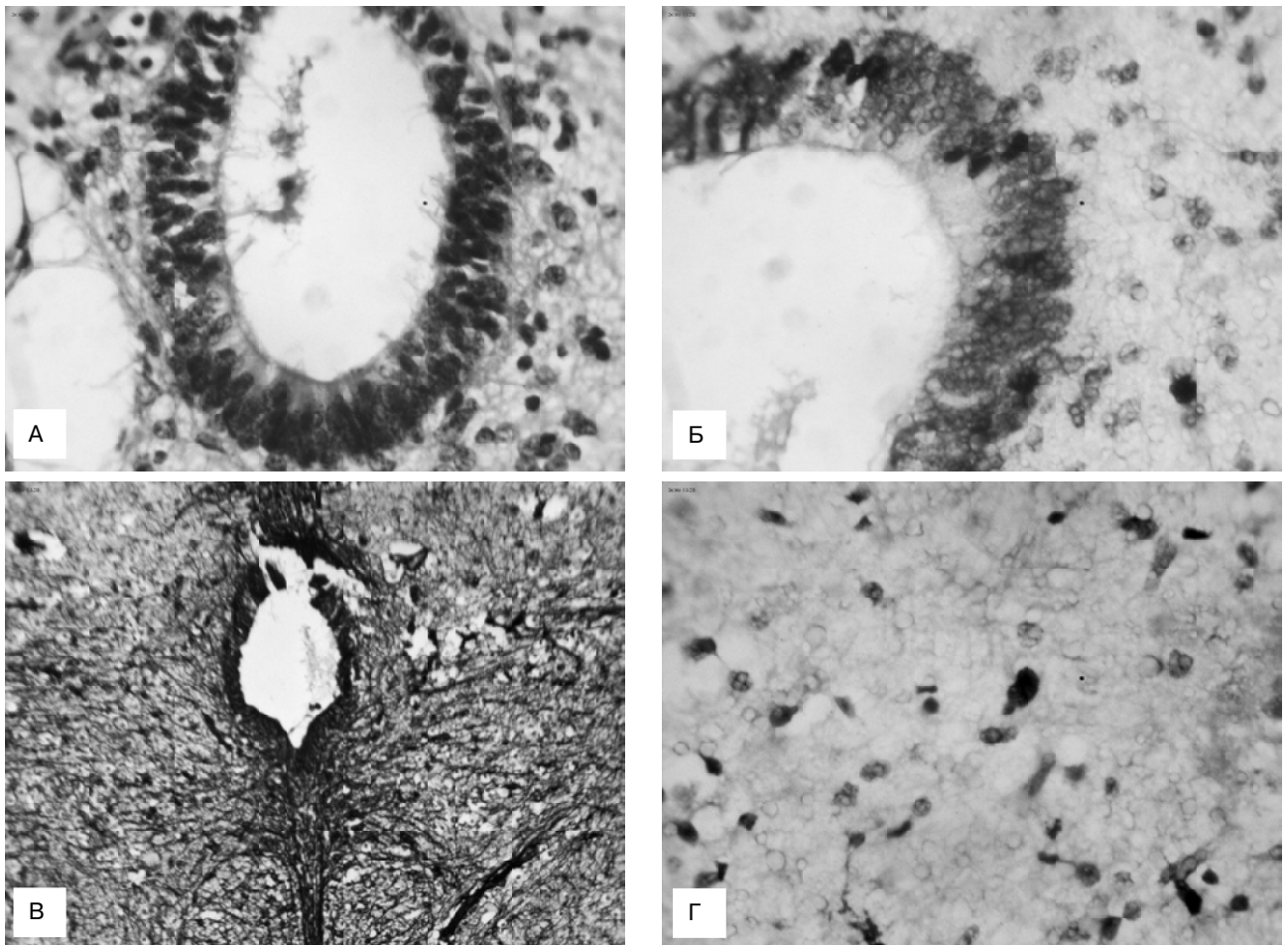


Рис. 5. А - епендимний (матричний) шар на рівні грудних сегментів. x40. Гематоксилін-еозин. Б - мітози НСК у матричному шарі (коричневий колір). x40. Ki-67. В - волокна радіальної глії на рівні поперекових сегментів. x10. Віментин. Г - проліферація гліобластів у мантийному шарі (коричневий колір). x40. Ki-67.

коливається від 3,0 до 3,7 мкм.

Площа епендимного шару грудних сегментів складає $0,018 \pm 0,005 \text{ мм}^2$. Товщина епендимного шару також найбільша у вентральній частині і дорівнює $43,6 \pm 1,3 \text{ мкм}$, найменша - в бічних частинах - $21,6 \pm 1,0 \text{ мкм}$, у дорзальній частині товщина збільшується до $35,1 \pm 1,3 \text{ мкм}$. Товщина базальної мембрани коливається від 3,2 до 3,7 мкм.

Площа епендимного шару на рівні поперекових сегментів відносно не значно перевищує площу епендимного шару грудних сегментів та дорівнює $0,019 \pm 0,005 \text{ мм}^2$. Тенденція збільшення товщини матричного шару також аналогічна, як і у попередніх випадках, але величини її наступні: у вентральній частині - $47,3 \pm 2,0 \text{ мкм}$, у бічних частинах - $21,6 \pm 1,4 \text{ мкм}$ та у дорзальній частині - $33,8 \pm 1,7 \text{ мкм}$. Товщина базальної мембрани у середньому становить $3,4 \pm 0,3 \text{ мкм}$.

Відносно найменша площа епендимного шару нами виявлена на рівні крижових сегментів, яка склала $0,016 \pm 0,005 \text{ мм}^2$. Товщина епендимного шару також найбільша у вентральній частині та дорівнює $43,2 \pm 1,4 \text{ мкм}$, найменша - в бічних частинах - $14,9 \pm 1,3 \text{ мкм}$, у дорзальній частині товщина збільшується до $21,3 \pm 1,5 \text{ мкм}$. Товщина

базальної мембрани коливається від 2,9 до 3,3 мкм.

Слід зазначити, що найбільшу площу епендимний шар займає в межах кінцевого шлуночку і величина його складає $0,060 \pm 0,005 \text{ мм}^2$. Середня товщина епендимного шару становила $24,3 \pm 1,2 \text{ мкм}$.

Протягом спинного мозку епендимний шар складається з псевдобагатошарового епітелію (рис. 5). НСК різних сегментів спинного мозку мають відносно однакову площу та розміри. Середня площа НСК шийних сегментів дорівнює $60,6 \pm 3,1 \text{ мкм}^2$, розмірами - $5,1 \pm 0,2 \times 9,0 \pm 0,4 \text{ мкм}$. Аналогічні морфологічні параметри НСК грудних сегментів в середньому склали відповідно $52,8 \pm 2,5 \text{ мкм}^2$ та $4,8 \pm 0,2 \times 9,4 \pm 0,3 \text{ мкм}$. Середня площа НСК на рівні поперекових сегментів становить $56,6 \pm 1,9 \text{ мкм}^2$, розмірами - $5,3 \pm 0,1 \times 8,9 \pm 0,5 \text{ мкм}$. На рівні крижових сегментів площа НСК дорівнює $55,4 \pm 2,2 \text{ мкм}^2$, а розміри склали $5,4 \pm 0,3 \times 8,8 \pm 0,4 \text{ мкм}$. Серед нейральних стовбурових клітин видовженої форми, які формують сам матричний шар, зустрічаються мало чисельні НСК сферичної форми. Середні розміри таких клітин становлять $8,4 \pm 0,2 \times 8,6 \pm 0,1 \text{ мкм}$, а площа - $64,3 \pm 2,4 \text{ мкм}^2$. Нами також встановлено, що на рівні

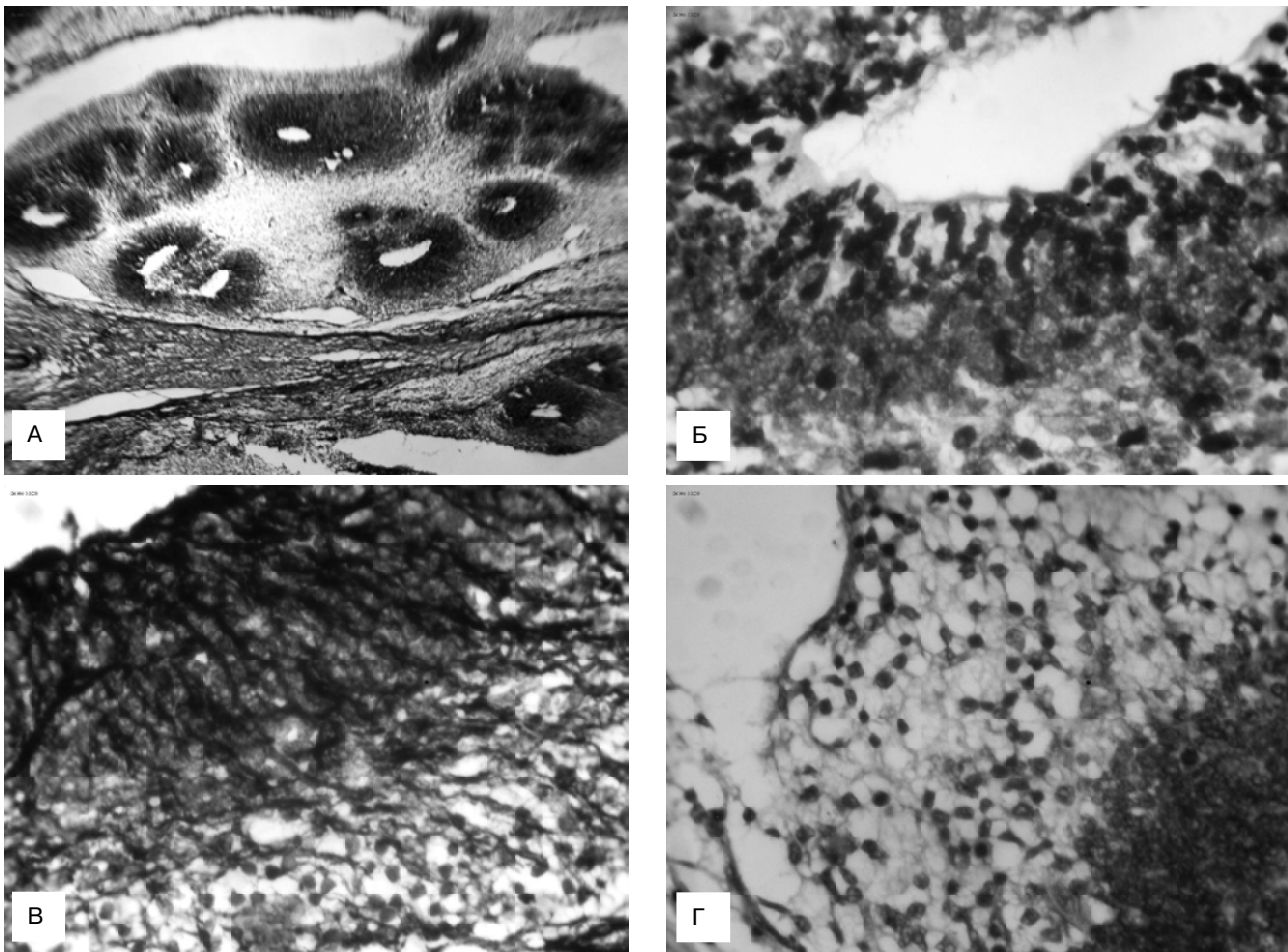


Рис. 6. А - нейральні гермінативні центри у тератомі. х40. Віментин. Б - інтенсивна проліферація НСК у матричному шарі НГЦ тератоми (коричневий колір). х40. Кі-67. В - волокна радіальної глії НГЦ тератоми (коричневий колір). х40. Віментин. Г - відносно слабка експресія синаптофізину у НГЦ тератоми. х40. Синаптофізин.

кінцевого шлуночка (при найбільшій площі епендимного шару) НСК мають найменші морфометричні параметри середньої площі та розмірів: $39,1 \pm 1,7 \text{ мкм}^2$ і $3,8 \pm 0,2 \times 7,2 \pm 0,3 \text{ мкм}$.

Після мітозів у матричному шарі НСК вздовж волокон радіальної глії мігрують у мантийний шар (див. рис. 5). Відносно посилена експресія білка-віментину волокнами радіальної глії спостерігається навколо центрального каналу та вздовж задньої серединної перегородки спинного мозку, доволі посередня експресія - навколо крупних судин (див. рис. 5). Також, ми прийшли до висновку, що експресія волокон радіальної глії здійснюється й білком-Cdx2. У мантийному шарі відбувається проліферація тільки гліобластів (див. рис. 5).

Кількість нейральних гермінативних центрів (НГЦ) у кожній тератомі налічується від 12 до 16. Takamatsu M. зі співавторами називає такі центри - примітивним нейроепітелієм [2012]. При цьому, наявні центри можна розділити на дві групи: мають центральний канал та ті, де таке утворення відсутнє (рис. 6). Цитоархітектоніка НГЦ має схожість із матричним шаром спинного мозку. НГЦ із центральним каналом відносно більшої площі.

Так, середня площа матричного шару НГЦ, які мають центральний канал дорівнює $0,081 \pm 0,022 \text{ мм}^2$. Товщина матричного шару варіює від 83,7 мкм до 173,0 мкм. Середня площа центрального каналу складає $0,007 \pm 0,001 \text{ мм}^2$.

Середня площа матричного шару без центрального каналу становила $0,008 \pm 0,001 \text{ мм}^2$, середні розміри - $86,6 \pm 5,3 \times 102,2 \pm 9,7 \text{ мкм}$.

Матричний шар НГЦ тератоми на відміну від матричного шару спинного мозку відрізняється інтенсивною проліферацією НСК (див. рис. 6). Після проліферації НСК мігрують вздовж волокон радіальної глії та "розселяються" серед мезенхімальної тканини тератоми (див. рис. 6). Також, слід зазначити, що проліферація НСК відбувається за межами матричного шару. Середня довжина волокна радіальної глії коливається від 75,5 мкм до 162,0 мкм.

НСК тератоми, як і НСК спинного мозку мають еліпсоподібну та сферичну форму, але відрізняються ступенем проліферації і диференціювання, а також розмірами. Середня площа НСК еліпсоподібної форми складає $28,9 \pm 2,4 \text{ мкм}^2$ та розміри - $4,5 \pm 0,3 \times 6,1 \pm 0,2 \text{ мкм}$.

Середня площа НСК сферичної форми становить $40,5 \pm 3,1$ мкм² та розміри - $6,8 \pm 0,2$ x $7,0 \pm 0,1$ мкм.

За морфологічними ознаками нам не вдалось встановити наявність нейробластів у тератомі, оскільки експресія гліальним фібрілярним кислим білком (S-100) - маркер гліобластів - здійснювалась у всіх клітинах НГЦ. Проте, серед волокон радіальної глії та НСК сферичної форми спостерігалась відносно слабка експресія синаптофізину (див. рис. 6).

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Найбільші морфометричні параметри (передньо-задній та поперечні розміри) мають шийні та поперекові сегменти спинного мозку. Найменші - грудні та крижові сегменти.

2. Площа сірої та білої речовини має однакові величини на рівні шийних і грудних сегментів. На рівні поперекових і крижових сегментів площа сірої речовини дещо переважає площу білої речовини.

3. Площа епендимного (матричного) шару на рівні кінцевого шлуночка значно переважає площу епендимного шару в шийних та поперекових сегментах. Най-

меншу площу мають грудні та крижові сегменти. Товщина матричного шару найбільша у вентральній частині, найменша - у бічних частинах.

4. НСК різних сегментів спинного мозку мають відносно однакову площу та розміри. Меншими морфометричними параметрами відрізняються НСК епендимного шару кінцевого шлуночка, при найбільшій площі самого епендимного шару.

5. У тератомі налічується від 12 до 16 НГЦ, які мають гістологічну схожість із епендимним (матричним) шаром спинного мозку. Середня площа матричного шару НГЦ переважає не тільки площу матричного шару сегментів спинного мозку, а й площу матричного шару на рівні кінцевого шлуночка. НСК тератоми, як і НСК спинного мозку мають еліпсоподібну та сферичну форми, але відрізняються меншими ступенем проліферації, диференціювання, а також розмірами.

Перспективою подальших розробок є вивчення структурної організації сегментів спинного мозку плодів людини із мальформаціями, ступеню їх диференціювання, особливостей проліферації та міграції НСК, і порівняння отриманих результатів із аналогічними дослідженнями у плодів без аномалій розвитку.

Список літератури

- Ансамблевые взаимодействия в центральной нервной системе /А.В.Кузин, Ю.Г.Васильев, В.М.Чучков [и др.] - Ижевск-Берлин: АНК.- 2004.- 160с.
- Гиляров А.В. Нестин в клетках центральной нервной системы /А.В.Гиляров /Морфология.- 2007.- №1.- С.85-90.
- Кирик О.В. Виментин в клетках эпендимы и субвентрикулярной пролиферативной зоны конечного мозга / О.В.Кирик, Д.Э.Коржевский //Клеточные технологии в биологии и медицине.- 2012.- №4.- С. 210 - 214.
- Коржевский Д.Э. Современные методы иммуноцитохимии - основа для изучения структурной организации глиоцитов и оценки глиальной реакции в органах нервной системы / Д.Э.Коржевский, Е.Г.Сухорукова, О.В.Кирик //Матер. 8-й Всеросс. научн. конф.: Ретиноиды, Москва.- 2011.- С.71-76.
- Лісяний М.І. Вивчення експресії прогеніторними нейроклітинами маркерних протеїнів in vitro /М.І.Лісяний, Л.Д.Любич //Трансплантологія.- 2004.- №4.- С.307-310.
- Мацко Д.Е. Патологическая анатомия герминогенных опухолей /Д.Е.Мацко, А.О.Иванцов //Практическая онкология.- 2006.- №1.- С.6-15.
- Фонарев А.М. Внутритрубно развитие плода /А.М.Фонарев.- Москва, 1968.- 25с.
- Цимбалюк В.І. Нейрогенні стовбурові клітини у неврології та нейрохірургії /В.І.Цимбалюк //Журнал НАМН України.- 2011.- №1.- С.76-80.
- Comparison of neural precursor cell fate in second trimester human brain and spinal cord /K.Barami, J.Zhao, F.Diaz [et al.] //Neurol. Res.- 2000.- №23.- P.260-266.
- Control of outer radial glial stem cell mitosis in the human brain /B.Ostrem, J.Lui, C.Gertz [et al.] //Cell Rep.- 2014.- №8.- P.656-664.
- Detailed expression analysis of regulatory genes in the early developing human neural tube /U.Marclund, Z.Alexeenko, E.Andersson [et al.] //Stem Cells Dev.- 2014.- №23.- P.5-15.
- Tarr P. ABCG-1 and APOE4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2 / P.Tarr, P.Edwards //J. Lipid Res.- 2008.- №49.- P.169-182.
- Teratoma showing the features of retinal structure: a case of sacrococcygeal teratoma /M.Takamatsu, H.Aoki, Y.Hirose [et al.] //Oncol Lett.- 2012.- №3.- P.1023-1026.

Школьников В.С.

МАКРО- И МИКРОСТРУКТУРА СПИННОГО МОЗГА ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА С ТЕРАТОМАМИ

Резюме. В результате анатомо-гистологических и иммуногистохимических методов были установлены макроскопические, морфометрические и цитоархитектонические особенности структур сегментов спинного мозга, а также тератом плодов человека термином гестации 17-18 недель.

Ключевые слова: пренатальный период, спинной мозг, тератома.

Shkolnikov V.S.

THE MACRO- AND MICROSTRUCTURE OF HUMAN FETAL SPINAL CORD WITH TERATOMA

Summary. As a result of anatomical and histological and immunohistochemical methods were established macroscopic, morphometric and cytoarchitectonic features structures segments of the spinal cord, as well as human fetal teratomas in term of gestation 17-18 weeks.

Key words: prenatal period, spinal cord, teratoma.

Стаття надійшла до редакції 2.12.2014

Школьников Владимир Семенович - к.мед.н., доцент кафедры анатомии людини Вінницького національного медичного університету імені М.І.Пирогова; +38 097 246-34-85