

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2023-27(2)-04

УДК: 612.82:611.817:618.2

МОРФОГЕНЕЗ КІНЦЕВОГО МОЗКУ ТА МОЗОЧКА ЛЮДИНИ В РАННЬОМУ ПРЕНАТАЛЬНОМУ ПЕРІОДІ

Власенко О. В., Гунас І. В., Семененко А. І., Довгань О. В., Бобрук В. П.

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Відповідальний за листування:
e-mail: dovgan@vnmnu.edu.ua

Статтю отримано 10 квітня 2023 р.; прийнято до друку 04 травня 2023 р.

Анотація. Нейрогенез - це складний процес утворення нейронів, що має важливе значення під час розвитку хребетних, для утворення більшості нейронів мозку людини. Метою пропонованого дослідження було встановити та порівняти параметри мозочка та кінцевого мозку людини 8-9 тижнів внутрішньоутробного розвитку, а також особливостей цитоархітекτονіки, яка притаманна для досліджуваного терміну гестації. Було досліджено 10 плодів 8-9 тижнів та застосовано імуногістохімічні, анатомо-гістологічні та морфометричні методи. Морфометричне дослідження проведене за допомогою світлового мікроскопа МБС-10 та SIGETA. Дослідження виконували зі збільшенням $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$ та $\times 100$. З отриманих гістологічних зрізів виконували фотофіксацію та морфометрію за допомогою камери ETREK Ustos та комп'ютерної програми TourViem (комп'ютерна гістометрія). Застосовано статистичну обробку цифрових даних з використанням програмного пакета "Statistica 6.0" компанії Statsoft (ліцензійний №BXRX901E246122FA). Під час дослідження було встановлено, що загальна товщина досліджуваної ділянки варіювала залежно від частки кінцевого мозку. У півкулях кінцевого мозку плодів 8-9 тижнів спостерігали наявність таких шарів: вентрикулярний, субвентрикулярний, проміжний та кірковий, тоді як при дослідженні мозочка ми виявили наявність вентрикулярної зони, проміжної, молекулярної та зовнішньої зернистої зони. Експресія проліферованих нейральних стовбурових клітин в шарах кінцевого мозку була найбільш інтенсивна у вентрикулярній зоні порівняно з іншими. У вентрикулярній і зовнішній зернистій зонах в мозочку відбувається міграція нейральних стовбурових клітин у двох напрямках - тангенціальному й радіальному. У мозочку спостерігається слабка експресія синаптофізину. У кінцевому мозку експресія синаптофізину була сильною в проміжній та кірковій зонах. Волокна радіальної глії плода 8-9 тижнів пронизують усі зони кінцевого мозку та мозочка. На горизонтальному гістологічному зрізі кінцевого мозку плодів людини візуалізувалися порожнини шлуночків та спостерігався розвиток судинних сплетень у бічних шлуночках головного мозку. Отже, у результаті дослідження ми провели порівняння особливостей цитоархітекτονіки, морфометричних параметрів структур кінцевого мозку та мозочка плодів людини 8-9 тижнів внутрішньоутробного розвитку.

Ключові слова: головний мозок, мозочок, центральна нервова система, радіальна глія, нейральні стовбурові клітини, пренатальний період, імуногістохімія, нейрон.

Вступ

Ембріональний розвиток ЦНС є швидкоплинним і коротким. Проте досліджуючи цитоархітекτονіку структур ЦНС у цьому періоді, спостерігався значний поділ нейральних стовбурових клітин (НСК), що призвело до здійснення переміщення (міграції) клітин, які утворювали відділи головного мозку. Врахувавши міграцію НСК та її дослідження, встановлено, що вона більш актуальна в галузі нейрохірургії [9, 18].

Ембріональний розвиток - складний процес, який потребує більш детального та поетапного дослідження ЦНС [14, 12].

Нейрогенез - це складний процес утворення нейронів, що має важливе значення під час розвитку хребетних, для утворення більшості нейронів мозку людини. Однак враховуючи нейрогенез, який триває протягом усього життя в різних відділах мозку людини, НСК є джерелом як ембріонального, так і дорослого нейрогенезу, але їх активність і подальша міграція жорстко регулюються їхнім місцевим середовищем [5, 17, 20].

Нейрогенез охоплює багато високорегульованих процесів, зокрема й проліферацію, диференціацію та дозрівання. Однак транскрипційні ландшафти, що лежать в основі розвитку мозку, охарактеризовані погано [1, 11].

Врахувавши сучасні методи дослідження, науковці найбільшу увагу зосередили на НСК, які спрямовані на нормальний клітинний розвиток та формування утворів ЦНС, так і протилежне значення, можливий розвиток патологічних клітин [2].

Мікроскопічна анатомія ЦНС набуває все активнішого розвитку для детальнішого вивчення цитоархітекτονіки відділів ЦНС з використанням більш новітніх методів [15].

Цілковите розуміння та попередження розвитку аномалій ЦНС у плода людини можливе лише за умови обізнаності та ґрунтовних наукових досліджень щодо його нормального розвитку [7].

Дев'ять місяців внутрішньоутробного розвитку та перші три роки післяпологового життя є надзвичайно критичними для встановлення зв'язків між нейронами, нейрональними та гліальними клітинами, які сформують життєвий досвід [6, 16, 21].

Отже, вивчаючи розвиток кінцевого мозку та порівнюючи з мозочком в тому ж віковому періоді, виявлено певні закономірності перебудови їхніх структур.

Метою дослідження було встановити та порівняти параметри мозочка та кінцевого мозку людини 8-9

тижнів внутрішньоутробного розвитку, а також особливостей структур цитоархітекτονіки, яка притаманна для досліджуваного терміну гестації.

Матеріали та методи

Виконано дослідження 10 плодів людини 8-9 тижнів з використанням імуногістохімічних, анатомо-гістологічних та морфометричних методів. Тім'яно-куприкова довжина становила $35,3 \pm 1,3$ мм, маса - $4,8 \pm 0,9$ г. Досліджувані матеріали отримані в результаті абортів в обласному патологоанатомічному бюро м. Вінниці.

У результаті проведеної експертизи встановлено, що використання матеріалів дослідження не порушує основні біотичні норми Гельсінської декларації, ухваленої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації, Конвенцію Ради Європи про права людини та біомедицину (1977 р.), відповідні положення ВООЗ, Міжнародної ради медичних наукових товариств, Міжнародний кодекс медичної етики (1983 р.), Конвенцію ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших наукових цілях від 18.03.1986 р., Директиву ЄЕС № 609 від 24.11.1986 р. і наказ МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р., тому пропонується дослідження може бути представлено до публікації наукових результатів.

Протягом дослідження виготовляли серійні зрізи препаратів кінцевого мозку та мозочку товщиною 8-10 мкм, які проходили фарбування гематоксиліном та еозином, а також толуїдиновим синім.

Імуногістохімічні методи: Ki-67, синаптофізин та віментин. Віментин застосовували для вивчення морфології радіальної глії (РГ), Ki-67 був використаний для того, щоб оцінити проліферативну активність НСК, а синаптофізин застосовували для визначення мієлінізації волокон провідних шляхів та встановлення їхніх зв'язків.

Морфометричне дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопа МБС-10 та SIGETA. Дослідження виконували зі збільшенням $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$ та $\times 100$. З отриманих гістологічних зрізів виконували фотофіксацію та морфометрію за допомогою камери ETREK Ucmos та комп'ютерної програми TourViem (комп'ютерна гістометрія).

Статистична обробка цифрових даних проведена з використанням програмного пакета "Statistica 6.0" фірми Statsoft (ліцензійний №BXXR901E246122FA).

Робота є фрагментом планової наукової роботи кафедри анатомії людини Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова "Встановлення морфологічних змін утворів центральної нервової системи людини протягом пренатального періоду онтогенезу (макроскопічне, гістологічне, морфометричне, імуногістохімічне дослідження)", державна реєстрація № 0118U001043.

Результати. Обговорення

Людський мозок не дозріває однаково, існує думка, що регіональні відмінності відображають щось важливе



Рис. 1. Зріз головного мозку 8-9 тижнів на рівні середньої лобової звивини. Забарвлення гематоксилін-еозин; збільшення $\times 6$.

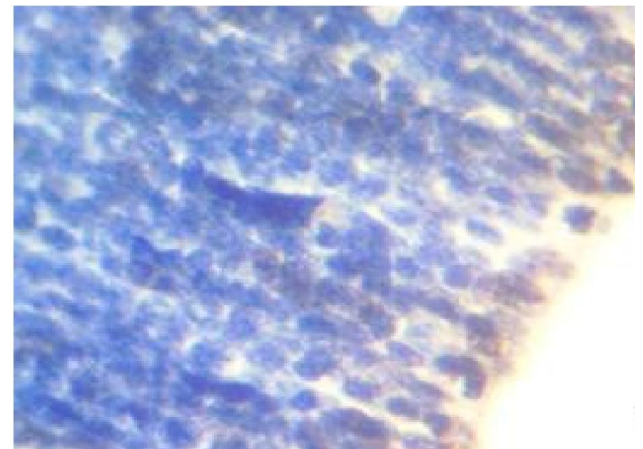


Рис. 2. Проліферація клітин у вентрикулярній зоні головного мозку людини 8-9 тижнів. Забарвлення Ki-67; збільшення $\times 400$.

у дозріванні мислення та поведінки. Велика увага зосереджена на префронтальній корі, що розвивається пізно, а останнім часом - також на нерівномірному розвитку різних шляхів білої речовини [8].

Досліджуючи гістологічні зрізи ми зауважили, що біла речовина та сіра речовина півкуль ГМ мали своєрідне розташування клітин у п'яти шарах. Загальна товщина варіювала залежно від частки ГМ. У ділянці лівої півкулі лобової частки (ЛЧ) становить $256,2 \pm 11,3$ мкм, а у правій - $241,2 \pm 11,0$ мкм. У ділянці лівої півкулі тім'яної частки (ТЧ) зафіксовано найбільшу товщину, яка склала $611,1 \pm 22,9$ мкм, а правої - $645,2 \pm 23,7$ мкм.

На горизонтальному гістологічному зрізі кінцевого

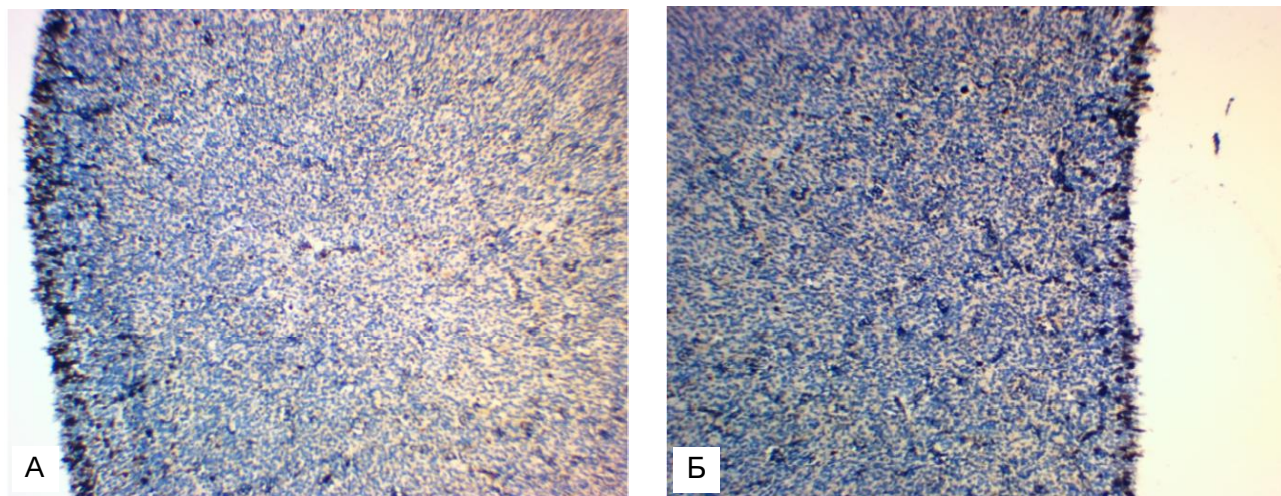


Рис. 3. Мозочок 8-9 тижнів. А - проліферація в зовнішній зернистій зоні (чорним). Забарвлення Ki-67; збільшення x100. Б - проліферація у вентрикулярній зоні (чорним). Забарвлення Ki-67; збільшення x100.

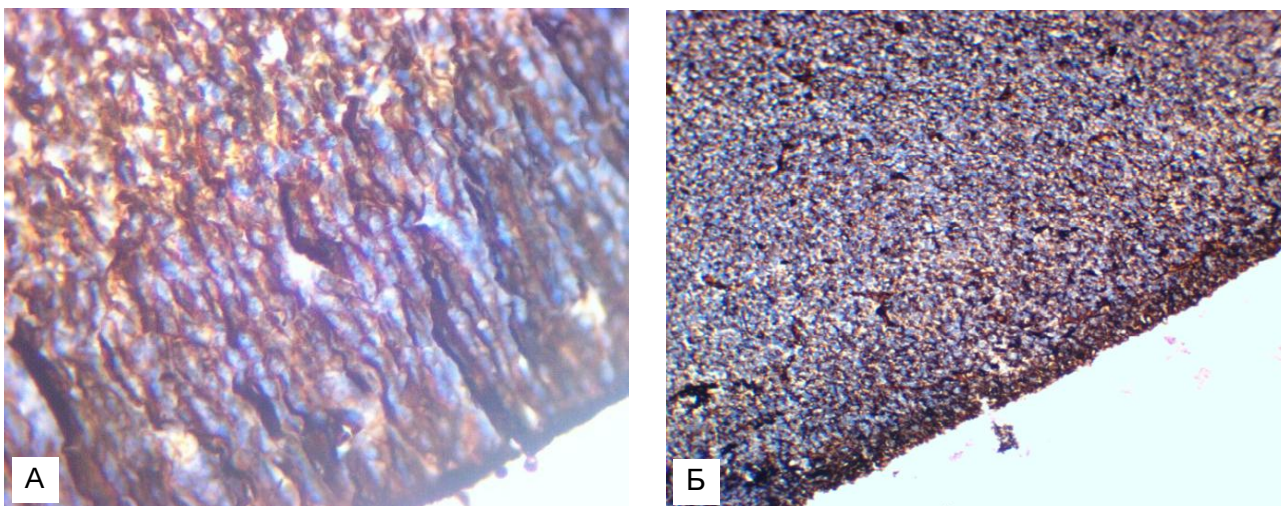


Рис. 4. Характер напрямку волокон радіальної глії. А - лобова частка, вентрикулярна зона. Забарвлення Віментин; збільшення x400. Б - горизонтальний зріз мозочка. Забарвлення Віментин; збільшення x100.

мозку плодів людини візуалізувалися порожнини шлуночків та спостерігався розвиток судинних сплетень у бічних шлуночках головного мозку (рис. 1).

Вивчаючи головний мозок за допомогою ультразвукового дослідження, D. Boitor-Borza et al. (2015) констатував наявність судинного сплетення в бічних шлуночках у цьому віковому періоді [3].

Дослідивши шари звивин лобової частки лівої та правої півкулі кінцевого мозку, ми встановили наявність вентрикулярної зони, субвентрикулярної, проміжної та кіркової зон, тоді як при дослідженні мозочка виявили наявність вентрикулярної зони, проміжної, молекулярної та зовнішньої зернистої зони. Порівняння шарів кінцевого мозку з мозочком засвідчує, що спільною була тільки вентрикулярна зона.

Ми також виявили наявність неоднорідної щільності клітин в різних шарах півкуль ГМ та мозочку. Більшу щільність НСК у півкулях ГМ спостерігали у вентрикулярній

зоні, яка становила в лобовій частці $215,2 \pm 7,4$ клітин на $0,01 \text{ мм}^2$.

Щільність у субвентрикулярній зоні НСК була в лобовій частці $151,5 \pm 6,1$ клітин на $0,01 \text{ мм}^2$.

Щільність у проміжній зоні НСК була найменшою і становила в лобовій частці $59,8 \pm 5,7$ клітин на $0,01 \text{ мм}^2$. Щільність у кірковій зоні в лобовій частці - 150 ± 4 клітин на $0,01 \text{ мм}^2$.

Експресія Ki-67 визначалася у нейробластах вентрикулярної зони краще, ніж в інших зонах ГМ, які приймали участь у формуванні майбутніх нейральних клітин, а також клітин радіальної глії (рис. 2). Експресія Ki-67 в інших шарах спостерігалась слабо.

Водночас у мозочку визначалася краще експресія Ki-67 також у вентрикулярній зоні та в зовнішній зернистій зоні. Цей факт можна пояснити тим, що відбувалася міграція клітин у двох напрямках (рис. 3).

Отримані нами дані дослідження щодо розташуван-

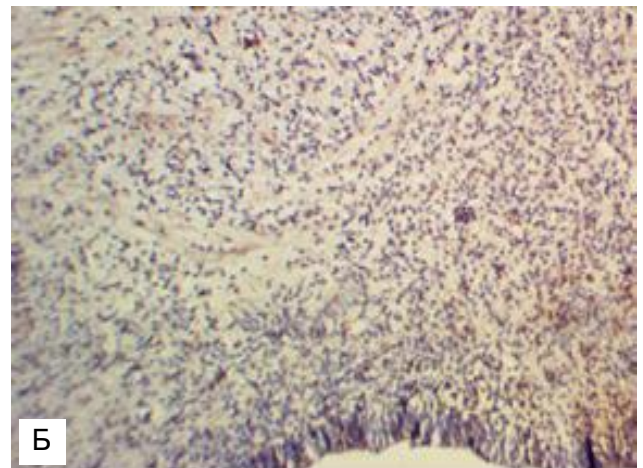
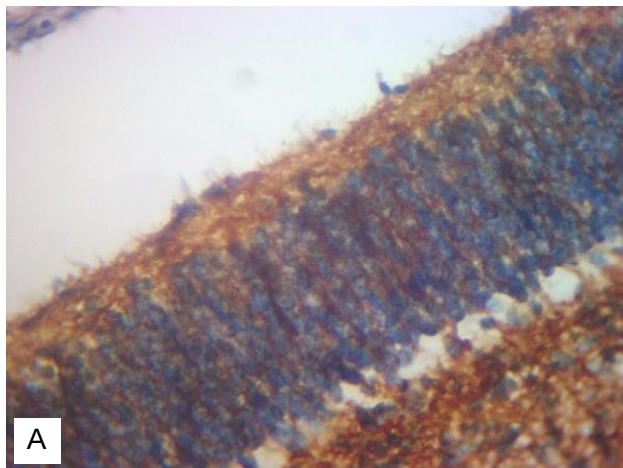


Рис. 5. Експресія синаптофізину у плода людини 8-9 тижнів. А - лобова частка кінцевого мозку, вентрикулярна зона. Забарвлення синаптофізін; збільшення x100. Б - горизонтальний зріз півкуль мозочка. Забарвлення синаптофізін; збільшення x100.

ня клітин у ГМ, що активно проліферувалися, співпадають з даними М. R. Del Bigio (2011), який у своєму дослідженні акцентує увагу на розміщенні проліферації уздовж всієї вентрикулярної зони головного мозку в плоді 15 тижнів [4].

Проліферовані НСК у вентрикулярній зоні починають мігрувати уздовж волокон РГ. Відомо, що функція волокон РГ полягає в утворенні шляху, щоб відбулась міграція нервових клітин у кіркову зону ГМ. Маркером волокон РГ є білок - віментин [10]. Під час оцінювання експресії віментину у волокнах РГ кінцевого мозку ми виявляли сильну експресію у всіх зонах. Результати наших досліджень підтверджуються науковими даними у роботі L. Vinci (2016), який описував доцільність застосування віментину для вивчення розвитку ЦНС [19].

Самі волокна РГ починалися від базальної мембрани вентрикулярної зони, пронизували субвентрикулярну зону в радіальному напрямку та доходили до крайової зони (рис. 4).

Водночас у мозочку було виявлено також волокна РГ, які пронизували всі зони в радіальному напрямку (див. рис. 4).

Експресія синаптофізину була повністю відсутня вздовж усієї вентрикулярної зони півкуль головного мозку, проте водночас сильно виявлялась у проміжній та кірковій зонах (рис. 5). Порівнявши наші дані з Н. В. Sarnat, & D. E. Born (1999) ми виявили розбіжність, оскільки автори зафіксували наявність синаптофізину в корі лобової частки ГМ лише з 12 тижня [13].

Водночас у мозочку експресія синаптофізину незначна у всіх зонах (див. рис. 5).

Отже, у результаті дослідження ми провели порівняння особливостей цитоархітекτονіки, морфометричних параметрів структур кінцевого мозку та мозочка плодів людини 8-9 тижнів внутрішньоутробного розвитку.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. У півкулях кінцевого мозку плодів 8-9 тижня визначено такі шари: вентрикулярна зона, субвентрикулярна, проміжна та кіркова зони, тоді як при дослідженні мозочка встановлена наявність вентрикулярної, проміжної, молекулярної та зовнішньої зернистої зон.

2. Найбільш інтенсивна експресія проліферованих нейральних стовбурових клітин у шарах кінцевого мозку визначалась у вентрикулярній зоні порівняно з іншими. Експресія проліферованих нейральних стовбурових клітин у шарах мозочка найбільше спостерігалась у зовнішній зернистій і вентрикулярній зонах. У мозочку у вентрикулярній та зовнішній зернистій зонах відбувається міграція нейральних стовбурових клітин у двох напрямках - тангенціальному і радіальному.

3. У мозочку спостерігається слабка експресія синаптофізину. У кінцевому мозку експресія синаптофізину була сильною у проміжній та кірковій зонах.

4. Волокна радіальної глії плода 8-9 тижнів пронизують усі зони кінцевого мозку та мозочка.

Результати проведеного дослідження засвідчують необхідність подальшого вивчення цитоархітекτονіки кінцевого мозку та мозочка плодів людини у пізньому пренатальному періоді.

Список посилань - References

- [1] Agirman, G., Broix, L., & Nguyen, L. (2017). Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Lett.*, 591(24), 3978-3992. doi: 10.1002/1873-3468.12924
- [2] Belska, L. M. (2015). Стовбурові клітини пухлин головного мозку: фенотипічна характеристика та методи направленої терапевтичної впливу [Stem cells of brain tumors: phenotypic characteristics and methods of directed therapeutic influence]. *Клітинна та органна трансплантологія - Cellular and organ transplantology*, 3(2), 170-176.
- [3] Boitor-Borza, D., Kovacs, T. & Stamatian, F. (2015). Transvaginal three-dimensional sonographic assessment of the embryonic brain: a pilot study. *Clujul Med.*, 88(2), 152-158. doi: 10.15386/

- cjmed-437
- [4] Del Bigio, M. R. (2011). Cell proliferation in human ganglionic eminence and suppression after prematurity-associated haemorrhage. *Brain*, 134(5), 1344-1361. doi: 10.1093/brain/awr052
- [5] Engler, A., Zhang, R., & Taylor, V. (2018). Notch and Neurogenesis. *Med Biol*, 1066, 223-234. doi: 10.1007/978-3-319-89512-3_11
- [6] Faa, G., Marcialis, M. A., Ravarino, A., Piras, M., Pintus, M. C., & Fanos V. (2014). Fetal programming of the human brain: is there a link with insurgence of neurodegenerative disorders in adulthood. *Curr Med Chem.*, 21(33), 3854-3876. doi: 10.2174/0929867321666140601163658
- [7] Guimaraes, C. V. A., & Dahmouh, H. M. (2022). Fetal Brain Anatomy. *Neuroimaging Clin N Am.*, 32(3), 663-681. doi: 10.1016/j.nic.2022.04.009
- [8] Hoffman, L. J., Ngo, C. T., Canada, K. L., Pasternak, O., Zhang, F., Riggins, T., & Olson, I. R. (2022). The fornix supports episodic memory during childhood. *Cerebral Cortex.*, 32(23), 5388-5403. doi: 10.1093/cercor/bhac022
- [9] Huang, Q., Cohen, M. A., Alsina, F. C., Devlin, G., Garrett, A., McKey, J., & Shen, X. (2020). Intravital imaging of mouse embryos. *Science*, 368(6487), 181-186. doi: 10.1126/science.aba0210
- [10] Ostrem, B., Lui, J., & Hertz, C. (2014). Control of outer radial glial stem cell mitosis in the human brain. *Cell Rep.*, 8(3), 656-664. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.058
- [11] Raj, B., Farrell, J. A., Liu, J., Kholtei, J. E., Carte, A. N., Acedo, J. N., & Schier, A. F. (2020). Emergence of Neuronal Diversity during Vertebrate Brain Development. *Neuron*, 108(6), 1058-1074. doi: 10.1016/j.neuron.2020.09.023
- [12] Rossant, J., & Tam, P. P. L. (2022). Early human embryonic development: Blastocyst formation to gastrulation. *Dev Cell.*, 57(2), 152-165. doi: 10.1016/j.devcel.2021.12.022
- [13] Sarnat, H. B., & Born, D. E. (1999). Synaptophysin immunocytochemistry with thermal intensification: a marker of terminal axonal maturation in the human fetal nervous system. *Brain Dev.*, 21(1), 41-50. doi: 10.1016/s0387-7604(98)00068-0
- [14] Shkolnikov, V. S., & Zalevsky, L. L. (2016). Стан вивчення морфо-, гістогенезу та топографії структур мозочка у пренатальному періоді онтогенезу людини та при вадах розвитку [The state of studying the morpho-, histogenesis, and topography of cerebellar structures in the prenatal period of human ontogenesis and developmental defects]. *Biomedical and biosocial anthropology*, 27, 199-204.
- [15] Shkolnikov, V. S., Zalevsky, L. L., & Shkolnikova, T. Yu. (2022). Morphological features of embryos' and human fetuses' cerebellum. *World of medicine and biology*, 1(79), 249-254. doi: 10.26724/2079-8334-2022-1-79-249-254
- [16] Takakuwa, T., Shiraiishi, N., Terashima, M., Yamanaka, M., Okamoto, I., Imai, H., & Kanahashi, T. (2021). Morphology and morphometry of the human early foetal brain: A three-dimensional analysis. *J Anat.*, 239(2), 498-516. doi: 10.1111/joa.13433
- [17] Terashima, M., Ishikawa, A., Manner, J., Yamada, S., & Takakuwa, T. (2021). Early development of the cortical layers in the human brain. *J Anat.*, 239(5), 1039-1049. doi: 10.1111/joa.13488
- [18] Tsimbalyuk, V. I., & Medvedev, V. V. (2011). Нейрогенні стовбурові клітини у неврології та нейрохірургії [Neurogenic stem cells in neurology and neurosurgery]. *Журн. НАМН України - Journal of the National Academy of Sciences of Ukraine*, 17(1), 76-80.
- [19] Vinci, L. (2016). Immunohistochemical Markers of Neural Progenitor Cells in the Early Embryonic Human Cerebral Cortex. *Eur J Histochem.*, 60(1), 2563. doi: 10.4081/ejh.2016.2563
- [20] Wilson, S., Pietsch, M., Cordero-Grande, L., Christiaens, D., Uus, A., Karolis, V. R., & Arichi, T. (2023). Spatiotemporal tissue maturation of thalamocortical pathways in the human fetal brain. *Elife.*, 3(12), e83727. doi: 10.7554/eLife.83727
- [21] Yamaguchi, Y., Miyazaki, R., Kamatani, M., Uwabe, C., Makishima, H., Nagai, M., & Yamada, S. (2018). Three-dimensional models of the segmented human fetal brain generated by magnetic resonance imaging. *Congenit Anom (Kyoto)*, 58(2), 48-55. doi: 10.1111/cga.12229

MORPHOGENESIS OF THE HUMAN BRAIN AND CEREBELLUM IN THE EARLY PRENATAL PERIOD

Vlasenko O. V., Gunas I. V., Semenenko A. I., Dovgan A. V., Bobruk V. P.

Annotation. Neurogenesis is a complex process of neuron formation that is central to the formation of most neurons in the human brain during vertebrate development. The purpose of this study was to establish and compare the parameters of the cerebellum and the endbrain of humans at 8-9 weeks of intrauterine development, as well as the features of cytoarchitectonics, which is inherent in the studied period of gestation. In the process of scientific research, 10 fetuses of 8-9 weeks were examined and research methods were applied, such as: immunohistochemical, anatomical-histological and morphometric. The morphometric study was carried out using a light microscope MBS-10 and SIGETA. Studies were performed at magnifications of x4, x10, x20, x40, and x100. From the obtained histological sections, photofixation and morphometry were performed using the ETREK Ucmos camera and the ToupViem computer program (computer histometry). Statistical processing of digital data was applied using the software package "Statistica 6.0" from Statsoft (license number BXXR901E246122FA). During the study, we observed that the total thickness of the studied area varied depending on the part of the endbrain. In the hemispheres of the endbrain of 8-9 week fetuses, the presence of such layers as ventricular, subventricular, intermediate and cortical was noted, whereas examining the cerebellum, we witnessed the presence of the ventricular zone, intermediate, molecular and external granular zone. The expression of proliferated neural stem cells in the layers of the endbrain was the most active in the ventricular zone, compared to the others. Migration of neural stem cells in the cerebellum, in the ventricular and external granular zones occurs in two directions: tangential and radial. Weak expression of synaptophysin is observed in the cerebellum. In the endbrain, synaptophysin expression was strong in the intermediate and cortical zones. Fibers of radial glia of an 8-9 week fetus penetrate all zones of the endbrain and cerebellum. On a horizontal histological section of the terminal brain of human fetuses, the cavities of the ventricles were visualized and the development of vascular plexuses in the lateral ventricles of the brain was noted. Thus, in the course of the research, we compared the features of cytoarchitectonics, morphometric parameters of the structures of the endbrain and cerebellum of human fetuses of 8-9 weeks of intrauterine development.

Keywords: brain, cerebellum, central nervous system, radial glia, neural stem cells, prenatal period, immunohistochemistry, neuron.