

ОСОБЛИВОСТІ ГІСТОГЕНЕЗУ НЕЙРОЕПІТЕЛІЙНОГО ШАРУ СПИННОГО МОЗКУ ЕМБРІОНІВ ТА ПЛОДІВ ЛЮДИНИ

В.С. Школьніков

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова
Кафедра анатомії людини (зав. - проф. Ю.Й. Гумінський)

Реферат

Мета. Вивчити гістогенез нейроепітеліального шару спинного мозку людини у пренатальному періоді онтогенезу.

Матеріал і методи. Проведено анатомо-гістологічне дослідження спинного мозку 12 ембріонів людини віком 5-7 тижнів внутрішньоутробного розвитку та 173 плодів гестаційним терміном від 8 до 40 тижнів пренатального періоду онтогенезу.

Результати й обговорення. У ембріонів 5-7 тижнів товщина нейроепітеліального шару поступово збільшується у дорзальному напрямку та спостерігається посилена проліферація нейральних стовбурових клітин (НСК) у дорзальній частині нейроепітеліального шару. Середня площа НСК становить $47,9 \pm 2,1$ мкм², площа ядра - $24,6 \pm 1,5$ мкм². Волокна радіальної глії, які експресують білок віментин, проходять від базальної мембрани нейроепітеліального шару радіально крізь мантійний шар та проникають у крайовий шар. Нами також встановлено, що крім віментину, волокна радіальної глії експресують білок CDX-2. У плодів 9-10 тиж. товщина нейроепітеліального шару фактично однакова по усьому периметру центрального каналу, проте, інтенсивність проліферації НСК починає збільшуватися у вентральній частині. На 12-му тижні товщина нейроепітеліального шару вже більша у вентральній частині, де також спостерігається її збільшення інтенсивності проліферації НСК. В мантійному шарі волокна радіальної глії виражені відносно слабо. У 22-23 тижні висока експресія віментину спостерігається у волокнах радіальної глії, які концентруються по обидва боки від передньої та задньої серединних перегородок сегментів спинного мозку і вогнищева посередня експресія віментину у волокнах радіальної глії біля кровоносних судин у мантійному шарі спинного мозку. У плодів 35-36 тижнів середня площа НСК, які формують нейроепітеліальний шар дорівнює $30,5 \pm 1,3$ мкм², а площа ядра НСК - $17,7 \pm 0,8$ мкм². Потрібно зазначити, що проліферація клітин НСК нейроепітеліального шару носить вогнищевий характер.

Висновки. Протягом пренатального періоду онтогенезу змінюється площа та товщина нейроепітеліального шару спинного мозку, а також площа НСК і їх ядер.

Ключові слова: спинний мозок, нейроепітеліальний шар, радіальна глія, нервові стовбурові клітини

Abstract

FEATURES HISTOGENESIS NEUROEPITHELIAL LAYER OF THE SPINAL CORD OF HUMAN EMBRYOS AND FETUSES

V.S. SHKOLNIKOV

The M.I. Pyrogov National Medical University in Vinnytsia

Aim. To investigate the histogenesis of the neuroepithelial layer of the human spinal cord in the prenatal period of ontogenesis.

Materials and Methods. An anatomical and histological study of 12 spinal cords of human embryos aged 5-7 weeks of fetal development and 173 fetuses within gestational period of 8 to 40 weeks prenatal period of ontogenesis.

Results and Discussion. In embryos of 5-7 weeks the thickness of the neuroepithelial layer gradually increases in dorsal direction and an increased proliferation of neural stem cells (NSC) in the dorsal part of the neuroepithelial layer is observed. The average area of the NSC is $47,9 \pm 2,1$ mkm², core area - $24,6 \pm 1,5$ mkm². Radial glial fibers expressing the protein vimentin pass from the basement membrane of the neuroepithelium radially through the mantle layer and penetrate into the edge layer. We also found that in addition to vimentin, radial glial fibers were expressing the protein CDX-2. In fetuses of 9-10 weeks the thickness of the neuroepithelial layer is actually the same throughout the perimeter of the center channel; however, the intensity of NSC proliferation begins to increase in the ventral part. After 12 weeks the thickness of the neuroepithelial layer is higher in the ventral part, where there is also an increase in the intensity and NSC proliferation. In the mantle layer the fibers of the radial glia were relatively poorly expressed. At 22-23 weeks of high expression of vimentin is observed in radial glial fibers, which are concentrated on both sides of the front and rear walls of the medial segments of the spinal cord, and focal expression of vimentin in radial glial fibers around blood vessels in the mantle layer of the spinal cord is seen. In fetuses of 35-36 weeks the average size of NSC, which form the neuroepithelium is equal to $30,5 \pm 1,3$ mkm², and the core area of NSC - $17,7 \pm 0,8$ mkm². It should be noted that the cell proliferation of NSC neuroepithelial layer is of a focal character.

Conclusions. During the prenatal period of ontogenesis, the area and thickness of the neuroepithelial layer of the spinal cord undergoes changes, as well as the area of the NSC and their nuclei.

Keywords: spinal cord, neuroepithelial layer, the radial glia, neural stem cells

Вступ

Дослідження розвитку головного та спинного мозку людини лежить не тільки в основі розуміння клітинних і молекулярних механізмів взаємозв'язку протягом життя, а й у виникненні вроджених вад розвитку та патологічних процесів

центральної нервової системи. Пріоритетним ланцюгом таких механізмів є утворення нейральних стовбурових клітин (НСК), що походять з вентрикулярної зони неокортекса або нейроепітелію центрального каналу спинного мозку [1]. За останні роки вивчення науковцями гістогенезу НСК значно зросло [2]. Відомо, що поліпотентні НСК мігрують вздовж радіальних гліальних волокон до місць своєї постійної локалізації [3]. Проте, предметом дискусії є роль радіальної глії у процесах диференціювання нейронів і клітин нейроглії, а також відсутнє системне описання гістогенезу нейроепітеліального шару спинного мозку.

Таким чином, метою дослідження є вивчення гістогенезу нейроепітеліального шару спинного мозку людини у пренатальному періоді онтогенезу.

Матеріал і методи

Проведено анатомо-гістологічне дослідження спинного мозку 12 ембріонів людини віком 5 - 7 тижнів внутрішньоутробного розвитку та 173 плодів гестаційним терміном від 8 до 40 тижнів пренатального періоду онтогенезу.

Матеріал для досліджень був отриманий в Обласному патологоанатомічному бюро та у пологових будинках м. Вінниці, після чого фіксувався 10% нейтральним розчином формаліну. У наступному готувались целоїдинові та парафінові блоки із проведенням серійних зрізів спинного мозку товщиною 8-10 мкм. Оглядові препарати забарвлювали гематоксиліном та еозиним, толуїдиновим синім, за Ван-Гізон, а також проводили імпрегнацію сріблом по Більшовському.

Підчас імуногістохімічного дослідження були використані діагностичні моноклональні антитіла фірми "DacoCytomation": віментин, S-100, CDX-2, 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 була застосована програма Photo M 1.21 (комп'ютерна гістометрія).

Статистичний аналіз цифрових значень здійснювався за допомогою стандартного програмного пакета "Statistica 8.0" фірми Statsoft з використанням непараметричних методів. Оціню-

валась вірогідність відмінностей дослідження двох незалежних вибірок та середні значення ($\pm\delta$) по кожному признаку.

Матеріали дослідження не заперечують основним біоетичним нормам Гельсінської декларації прийнятої 59-ою Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації у 2008 році (витяг з протоколу засідання Комітету біоетики ВНМУ ім. М. І. Пирогова № 9 від 04.09.2014 р.).

Результати й обговорення

Для внутрішньої структури сегментів усіх відділів спинного мозку, яка притаманна для ембріонів 5-7-го тижня внутрішньоутробного періоду, характерний чіткий поділ на нейроепітеліний, мантійний та крайовий шари (рис. 1). При цьому, нейроепітеліний та мантійний шари складають сіру речовину, а крайовий - білу речовину сегмента. Площа сірої речовини значно переважає площу білої речовини на всьому протязі спинного мозку. Товщина епендимного шару нервової трубки при горизонтальному перетині поступово збільшується у дорзальному напрямку та спостерігається посилена проліферація НСК у дорзальній частині центрального каналу (рис. 1).

Товщина нейроепітеліального шару у вентральній частині становить $66,7\pm 3,3$ мкм, у дорзальній частині - $161,0\pm 6,4$ мкм. У зв'язку з цим, в межах майбутніх задніх рогів кількісна щільність НСК відносно більша. Наші спостереження підтверджуються й імуногістохімічними дослідженнями G. Clowry [2005] [4]. Загалом площа нейроепітеліального шару дорівнює $0,20\pm 0,05$ мм².

Клітини, які складають нейроепітеліний шар по усьому периметру центрального каналу мають видовжену еліпсоподібну форму та ядро, що розташоване ближче до базальної мембрани. Середня площа НСК відносно однакова уздовж усіх сегментів спинного мозку та становить $47,9\pm 2,1$ мкм², площа ядра НСК - $24,6\pm 1,5$ мкм². У подальшому ці клітини мігрують уздовж волокон радіальної глії в мантійний шар, де здійснюється їх наступна проліферація та диференціювання. З НСК розвиваються перші популяції нейронів та клітини глії.

Волокна радіальної глії, які експресують білок віментин, проходять від базальної мембрани нейроепітеліального шару радіально крізь мантійний шар та проникають у крайовий шар (рис.

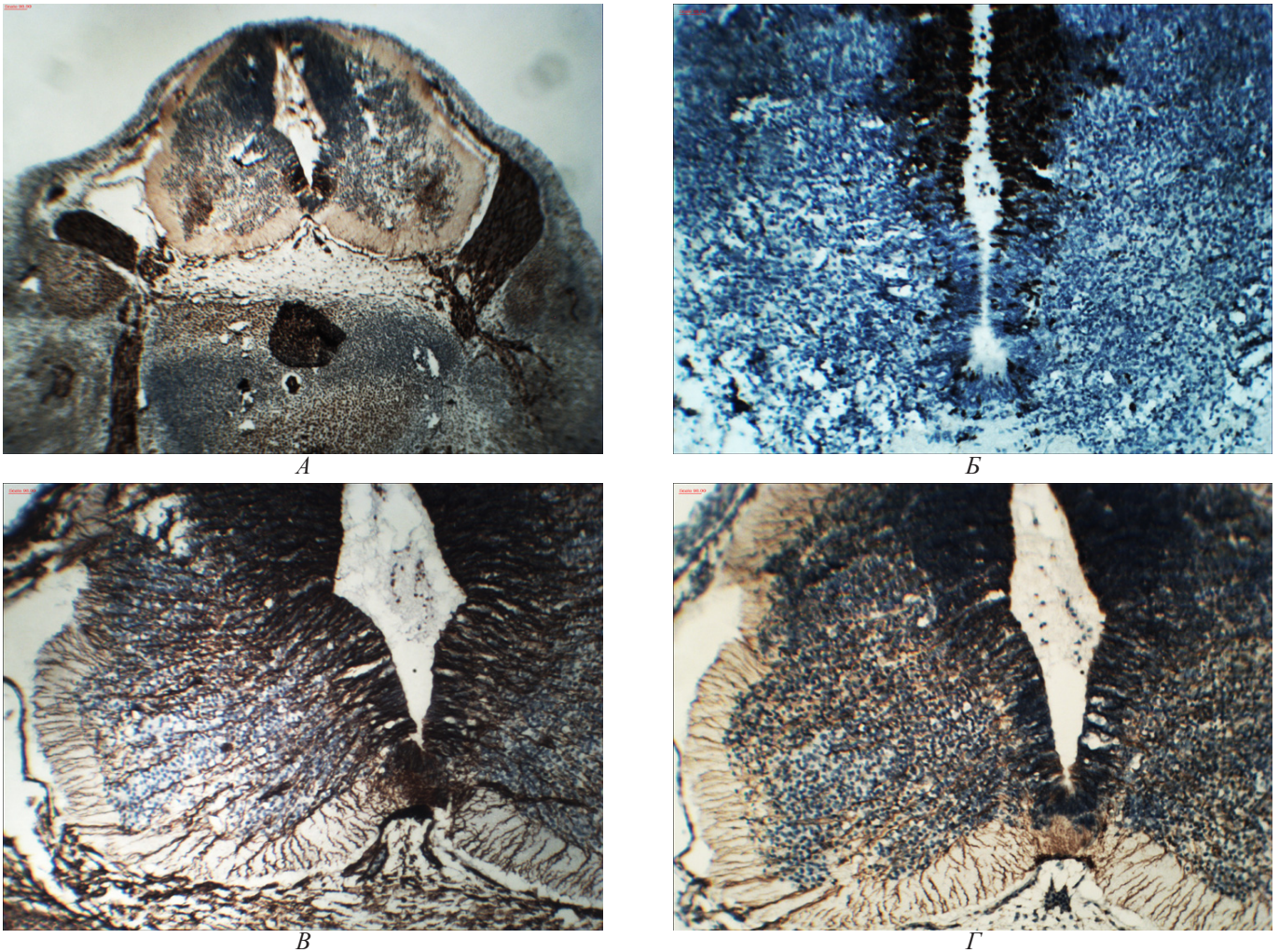


Рис. 1

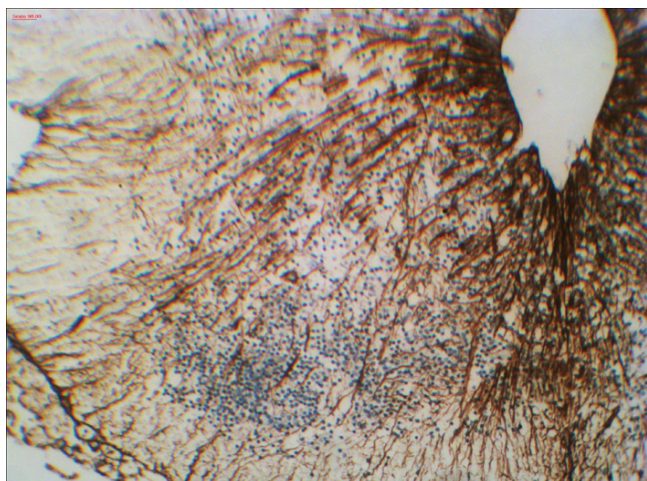
Горизонтальні зрізи сегментів спинного мозку ембріонів людини гестаційним терміном 5-7 тиж. А-зріз спинного мозку на рівні попереково-крижового стовщення. Зб.×4. Фарб. S-100. Б-ependимний шар центрального каналу (шийні сегменти). Інтенсивна експресія Ki-67 спостерігається у дорзальній половині епендимного шару. Зб.×10. В-волокна радіальної глії епендимного шару (грудні сегменти). Зб.×10. Фарб. віментин. Г-процес формування передніх коріньців за участю радіальної глії (крижові сегменти). Зб.×10. Фарб. CDX-2

1). Ми також встановили, що крім віментину, волокна радіальної глії експресують білок CDX-2 (рис. 1). Роль віментину в міграції клітин доведена у дослідженнях Черноиваненко И. [2013], що має важливе значення у подальшому, це - правильне розташування нейронних комплексів та становлення цитоархітекτονіки [5]. Також, D. Barry [2014] вказує, що радіальна глія не тільки забезпечує архітектурну основу для міграції нейронів, а й відіграє більш динамічну та комплексну роль у розвитку головного та спинного мозку [6].

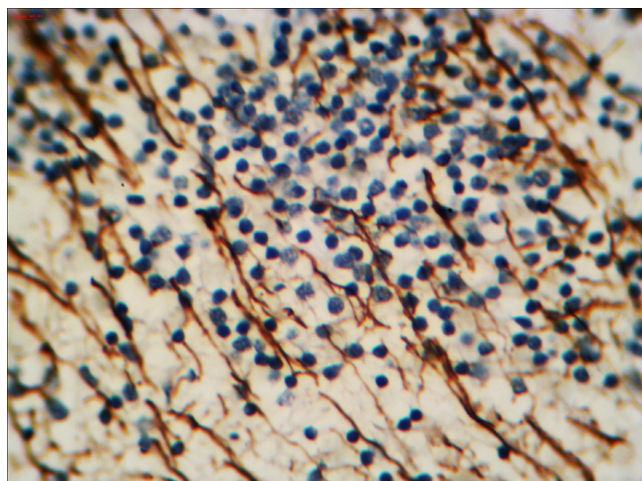
У плодів 9-10 тиж. внутрішньоутробного розвитку починається процес диференціювання сірої речовини на передні та задні роги. Товщина матричного шару фактично однакова по усьому периметру центрального каналу, проте, інтенсивність проліферації НСК починає збільшува-

тися у вентральній частині центрального каналу. При цьому, більша кількісна щільність клітин (нейробластів та гліобластів) ще зберігається в межах задніх рогів (рис. 2).

Площа матричного шару складає $0,10 \pm 0,05$ мм². Клітини нейроепітеліального шару розташовуються на базальній мембрані та утворюють псевдобагатошаровий епітелій. Нами встановлено, що уздовж спинного мозку НСК не відрізняються за морфологічними ознакам. Середня площа НСК дорівнює $46,2 \pm 2,2$ мкм², а площа ядра такої клітини становить $23,8 \pm 1,7$ мкм². Після міграції НСК вздовж волокон радіальної глії у мантийному шарі спостерігається диференціювання нейронів та проліферація гліобластів (рис. 2). Відомо, що у мантийному шарі відбувається проліферація гліобластів, а нейро-



А



Б

Рис. 2

Горизонтальні зрізи сегментів спинного мозку ембріонів людини гестаційним терміном 9-10 тиж. А-зріз спинного мозку на рівні грудних сегментів. Ділянка майбутніх задніх рогів. Зб.×10. Фарб. віментин. Б-фрагмент рис. А. Міграція НСК вздовж волокон радіальної глії. Зб.×40. Фарб. віментин

бласти тільки диференціюються [7].

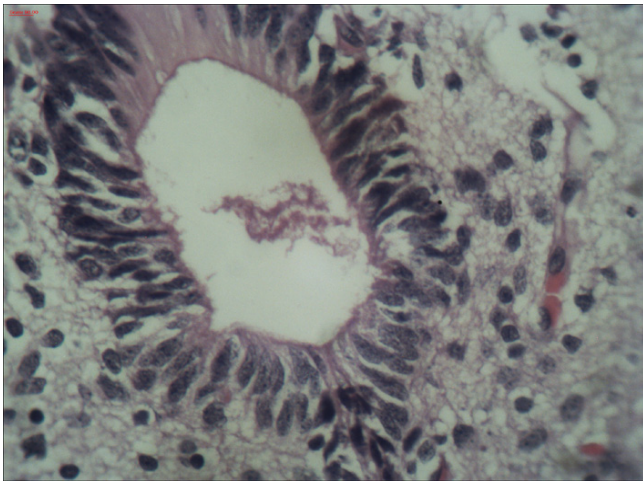
На 12-му тиж. внутрішньоутробного розвитку товщина нейроепітелію шару вже зростає на відміну від попередніх вікових груп у зворотному напрямку, і збільшення інтенсивності проліферації НСК спостерігається у вентральній частині центрального каналу, ближче до *septum medianum anterius* (рис. 3).

Товщина нейроепітелію у вентральній частині становить $61,1 \pm 4,4$ мкм, в дорзальній - $33,9 \pm 3,0$ мкм. Ми припускаємо, що таке явище можна пояснити тим, що спочатку розвивається чутливість - збільшення кількісної щільності клітин в межах задніх рогів - ранній пренатальний період, а потім встановлюється рухова активність плода - збільшення кількісної щільності клітин в межах передніх рогів. Такої ж думки у своїх дослідженнях притримується і А. Pytel [2011] [8]. Загальна площа нероепітелію у даному періоді розвитку становить $0,050 \pm 0,005$ мм². НСК нейроепітелію шару мають видовжену еліпсоподібну форму із середньою площею $42,1 \pm 1,7$ мкм², середня площа ядра такої клітини - $22,6 \pm 1,5$ мкм². Серед клітин НСК, які розташовані вздовж базальної мембрани, зустрічаються клітини, що мають круглу форму. Товщина базальної мембрани коливається від 2,5 мкм до 3,2 мкм. Після мітозу у субependимному шарі НСК вишикуються вздовж волокон радіальної глії, які чітко простежуються тільки на деякій відстані по периметру від центрального каналу. В мантийному шарі волокна радіальної глії виражені вже віднос-

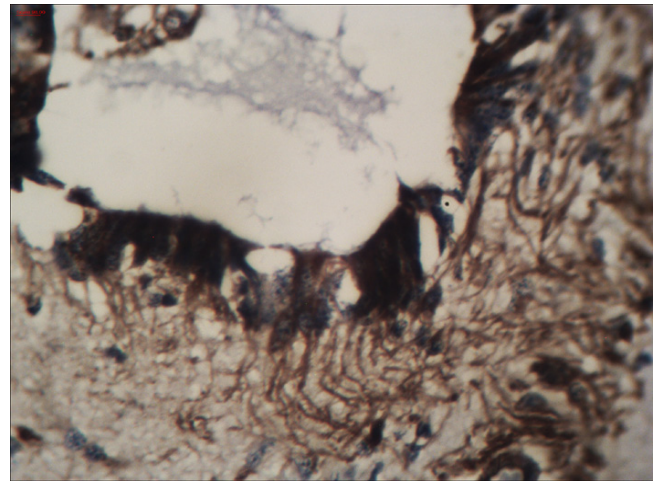
но слабо у порівнянні з попередніми віковими періодами.

У 22-23 тиж. внутрішньоутробного розвитку висока експресія віментину спостерігається у волокнах радіальної глії, які концентруються по обидва боки від передньої та задньої серединних перегородок сегментів спинного мозку і вогнищева посередня експресія віментину у волокнах радіальної глії біля кровоносних судин у мантийному шарі спинного мозку (рис. 3). Сама площа нейроепітелію шару дорівнює $0,010 \pm 0,002$ мм². Структурно нейроепітелію шар складається з відносно мілких клітин еліпсоподібної форми, між якими розташовані малочисельні клітини круглої форми. Посилення проліферації клітин нейроепітелію відбувається у вентральній частині (рис. 3). Середня площа НСК становить $36,7 \pm 2,3$ мкм², при площі ядра у $19,2 \pm 1,1$ мкм². Товщина нейроепітелію шару більша у вентральній частині - $34,5 \pm 2,9$ мкм та поступово зменшується у дорзальному напрямку - $20,9 \pm 1,6$ мкм. Товщина базальної мембрани коливається від 2,9 мкм до 3,4 мкм по усьому периметру центрального каналу.

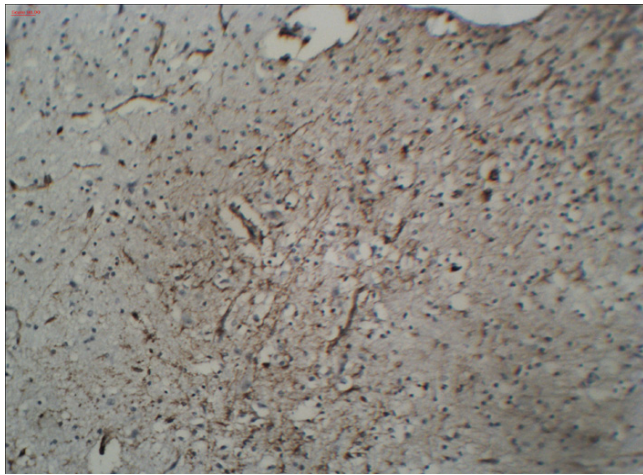
Товщина нейроепітелію шару сегментів спинного мозку плодів людини 35-36-ти тиж. зберігається більшою також у вентральній частині - $37,2 \pm 2,0$ мкм, менша - у дорзальній частині - $25,9 \pm 1,2$ мкм. Площа самого нейроепітелію шару у даному віковому періоді дорівнює $0,010 \pm 0,003$ мм². Середня площа НСК, які складають нейроепітелію дорівнює $30,5 \pm 1,3$ мкм², а



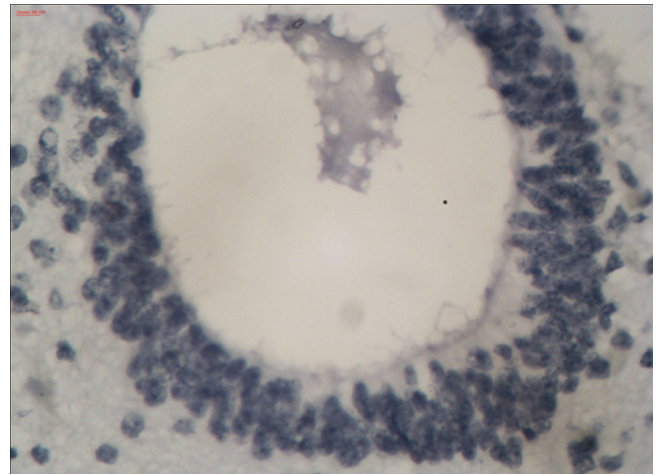
А



Б



В



Г

Рис. 3

А-горизонтальний зріз спинного мозку на рівні шийних сегментів плоду людини 12-ти тиж. Збільшення товщини матричного шару у вентральній частині центрального каналу. Зб.×40. Фарб. гемат.-еозин. Б-горизонтальний зріз спинного мозку на рівні поперекових сегментів плоду людини 22-23-х тиж. Зб.×40. Фарб. віментин. В-вогнищева посередня експресія віментину біля кровонесних судин плоду людини 22-23-х тиж. Зб.×10. Фарб. віментин. Г-проліферація НСК нейроепітеліального шару. Зб.×40. Фарб. Кі-67

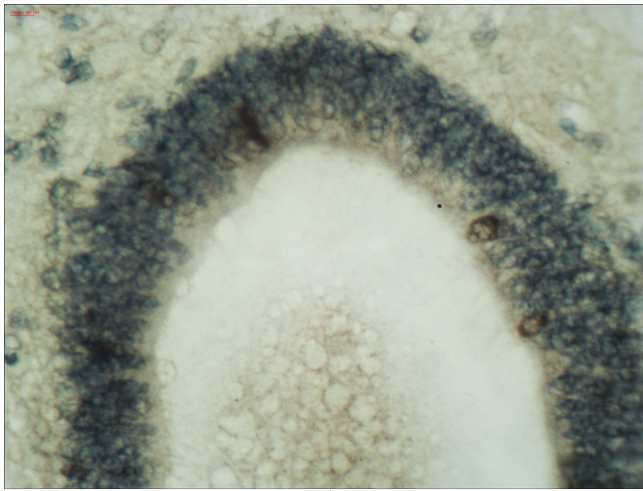
площа ядра НСК - $17,7 \pm 0,8$ мкм². НСК мають еліпсоподібну або круглу форму, які структурують псевдобагатощаровий епітелій. Потрібно зазначити, що проліферація клітин НСК нейроепітеліального шару носить вогнищевий характер (рис. 4). Відносно висока експресія білку віментину спостерігається у волокнах радіальної глії в межах матричного шару (рис. 4). Відносно низька експресія віментину є у залишках радіальної глії мантийного шару.

Перспективою наших подальших досліджень розвитку спинного мозку людини із використанням імуногістохімічних маркерів є встановлення закономірностей міграції НСК та їх подальша диференціація і гістотопографія у мантийному шарі. Аналогічні дослідження планується провести і у плодів людини з аномаліями роз-

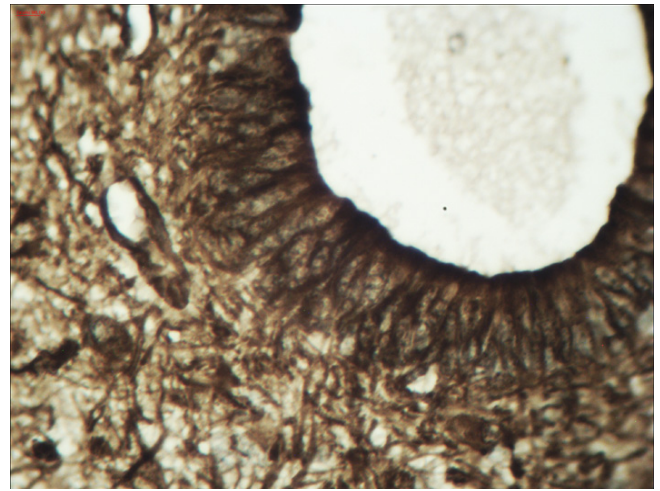
витку, порівнюючи отримані результати в процесі дослідження.

Висновки

1. У пізньому ембріональному та ранньому пренатальному періоді онтогенезу товщина нейроепітеліального шару збільшується у дорзальному напрямку. Починаючи з 12-го тиж. процес збільшення товщини матричного шару відбувається у зворотному напрямку та триває до народження.
2. Найбільша площа нейроепітеліального шару спинного мозку та середня площа НСК і їх ядер встановлена у ембріонів людини 5-7 тиж., їх параметри відповідно дорівнюють $0,20 \pm 0,05$ мм², $47,9 \pm 2,1$ мкм² та $24,6 \pm 1,5$ мкм² ($p < 0,01$). Найменша площа нейроепітеліального шару спинного мозку та середня площа НСК і їх ядер встановлена у



А



Б

Рис. 4

А-вогнищева проліферація НСК у матричному шарі сегментів спинного мозку плоду людини 35-36-и тиж. Зб.×40. Фарб. Кі-67. Б-висока експресія віментину у волокнах радіальної глії в межах матричного шару спинного мозку плоду людини 35-36-и тиж. Зб.×40. Фарб. віментин

плодів людини 35-36 тиж., їх параметри відповідно дорівнюють $0,010 \pm 0,003 \text{ мм}^2$, $30,5 \pm 1,3 \text{ мкм}^2$ та $17,7 \pm 0,8 \text{ мкм}^2$ ($p < 0,01$).

3. Відносно висока експресія віментину і CDX-2 у волокнах радіальної глії відбувається протягом раннього пренатального періоду, де волокна пронизують і крайовий шар. У пізньому пренатальному періоді висока експресія віментину та CDX-2 спостерігається в межах нейроепітеліального шару, і посередня - у залишках радіальної глії поряд із кровоносними судинами мантийного шару. Висока експресія Кі-67 відбувається у нейроепітелії спинного мозку плодів 6 - 10 тиж. та вогнищева експресія Кі-67 - у плодів пізнього пренатального періоду.

Література

1. Hutchins B, Klenke U, Wray S: Calcium release-dependent actin flow in the leading process mediates axophilic migration. *J Neurosci* 2013, 33, 11361-11371.
2. Barry D, Pakan J, O'Keeffe G, McDermott K: The spatial and temporal arrangement of the radial glial scaffold suggests a role in axon tract formation in the developing spinal cord. *J Anat* 2013, 222, 203-213.
3. McDermott K, Barry D, McMahon S: Role of radial glia in cytodifferentiation, patterning and boundary formation in the developing spinal cord. *J Anat* 2005, 207, 241-250.
4. Clowry G, Moss J, Clough R: An immunohistochemical study of the development of sensorimotor components of the early fetal human spinal cord. *J Anat* 2005, 207, 313-324.
5. Chernouvanenko I. S., Minin A. A., Minin A. A. The role of vimentin in cell migration. *Ontogenes* 2013; 3: 186-202. Russia: (Черноиваненко И. С., Минин А. А., Минин А. А. Роль виментина в миграции клеток. *Онтогенез* 2013; 3: 186 - 202).
6. Barry D, Pakan J, McDermott K: Radial glial cells: key organizers in CNS development. *Int J Biochem Cell Biol* 2014, 46, 76-79.
7. Campbell K, Gotz M: Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 2002, 25, 235-238.
8. Pytel A, Brusca M, Wozniak W: Differentiation of the nuclear groups in the posterior horn of the human embryonic spinal cord. *Folia Morphol* 2011, 70, 245-251.