

# Rozwój hipokampa w życiu płodowym bydła

IZABELA KRAKOWSKA

Katedra Anatomii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Krakowska I.

## Hippocampus development in the fetal life of cattle

### Summary

The study was conducted on cattle embryos aged from the 8th week up to delivery time. The material was taken from embryo brains and histological preparations were stained according to Nissel, Klier-Barrera«s method, Landau«s method and Landau«s method as modified by Morando. Material for microscopic evaluation was also collected. Ultra-thin scrapes were contrasted according to Reynold's method. The examination using an image analyzer was performed on preparations from the hippocampus of the examined embryos aged 14 weeks on until the animals' birth.

The study revealed that the most intense development of hippocampus is observed in the brains of the embryos from the first half of cow's pregnancy. The stage of the full morphological picture was achieved in the last period of pregnancy. In the consecutive periods of hippocampus development, the decrease of the number of pyramidal cells per surface unit is noted as well as the increase of these cells with the advancement of embryos' age.

**Keywords:** hippocampus, development, cattle

Według wielu autorów (1, 3, 4) główne struktury występujące u zwierząt pod nazwą tworów lub formacji hipokampa to: hipokamp często nazywany rogiem Ammona (*hippocampus s. cornu Ammonis*), zakręt zębaty (*gyrus dentatus*), podpora (*subiculum*) oraz kora śródwęchowa (*cortex enterhinalis*). Hipokamp filogenetycznie należy do kory starej (archicortex) i jest częścią kresomózgowia zajmującą miejsce na dołkowej powierzchni półkuli mózgowej. Komórki piramidowe tworzą główną warstwę w hipokampie. Podział hipokampa na pola CA1-CA4 według Lorento de No (7), związany jest z morfologią, liczbą i ułożeniem tych komórek.

Pierwsze wzmianki na temat funkcji hipokampa datują się na rok 1880. W tym roku Sommer jako pierwszy łączył hipokamp z systemem motorycznym, uszkodzenie hipokampa uważał za przyczynę występowania padaczki skroniowej. Badania przeprowadzone na małpach (8) potwierdzają wcześniejsze teorie na temat wpływu hipokampa na pamięć. Dowiedzono, że uszkodzenie hipokampa powoduje zaburzenia pamięci.

Z klinicznego punktu widzenia wiadomo obecnie, że wiele schorzeń wywołuje lub towarzyszy uszkodzeniom hipokampa, np. w ischemii większość neuronów w polu CA1 hipokampa jest uszkodzona (9). W innych przypadkach neuropatologii np. w chorobie Alzheimera również występują uszkodzenia neuronalne w hipokampie. Z wielu schorzeń znanych w neuropatologii choroba Alzheimera jest prawdopodobnie jedną z najbardziej uszkadzających całą formację hipokampa (11, 14). Bardzo wyraźne zmiany w hipokampie stwierdzono również w przypadku schizofrenii.

Uważa się, że w przypadku tej choroby hipokamp ma zmniejszoną objętość, stwierdzono też spadek ilości komórek piramidowych w polach hipokampa (12, 17). Patologiczne zmiany w opisywanej strukturze występują również w przypadku innych schorzeń neurologicznych zwierząt, np. w BSE. Jak podaje Figiel (17) bardzo ważne z punktu widzenia klinicystów jest poznanie rozwoju hipokampa w okresie prenatalnym, ponieważ dzisiejsza medycyna wykorzystuje tego rodzaju dane do badań nad rozpoznaniem etiologii chorób, którym towarzyszą zmiany w hipokampie.

Celem badań było prześledzenie procesu powstawania hipokampa u płodów bydła, określenie jego kształtu w poszczególnych okresach rozwojowych oraz prześledzenie procesu dojrzewania neuroblastów.

### Materiał i metody

Badania nad rozwojem osobniczym hipokampa u bydła przeprowadzono na mózgowiach płodów, z różnych okresów ciąży krów. Płody uzyskiwano z zakładów mięsnych i ubojni od krów rasy czarno-białej, w wieku około 3-6 lat. Wiek płodów określano na podstawie tabeli Baraldiego. W celu przeprowadzenia badań zgromadzono płody o następujących okresach przeżycia: 8 tyg., 12 tyg., 14 tyg., 16 tyg., 18 tyg., 20 tyg., 23 tyg., 29 tyg. i mózgowie noworodka.

Obserwacje dotyczące rozwoju hipokampa u płodów przeprowadzono w mikroskopie świetlnym, w mikroskopie elektronowym oraz przy użyciu komputerowego analizatora obrazu.

**Mikroskop świetlny.** Do badań wykorzystano mózgowia płodów w wyżej wymienionych okresach przeżycia. Wykonane skrawki histologiczne barwiono: błękitem metylenowym lub fioletem kryzylowym wg zmodyfikowanej

metody Nissla, fioletem krezylowym i luxolem wg metody Klüvera i Barrery, azotanem srebra wg metody Landau w modyfikacji Morando.

**Mikroskop elektronowy.** Materiał do badań pobierano z mózgowia płodów w wieku: 16 tyg., 18 tyg., 20 tyg., 23 tyg. i 29 tyg. Natychmiast po pobraniu utrwalono, wykonano makroskrawki, które zabarwiono w 1% roztworze błękitu metylenowego z 1% azurem II w 1% boraksie i przeglądano w mikroskopie świetlnym. Ultracienki skrawki kontrastowano w 8% octanie uranylu w 0,5% kwasie octanowym przez 45 minut oraz w cytrynianie ołowiu wg metody Reynoldsa przez 15 minut. Ultracienki skrawki przeglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym firmy Tesla BS-500.

**Analizator obrazu.** Do badań wykorzystano preparaty wykonane z hipokampa płodów krowy w wieku 14 tyg., 18 tyg., 20 tyg. i 23 tyg. oraz noworodka krowy. Wykonano pomiary neuroblastów i dojrzałych komórek piramidowych hipokampa. W testowanych polach określono liczbę neuronów na  $\text{mm}^2$ , sumę pól powierzchni neuronów w  $\mu\text{m}^2$  i średnie pole powierzchni neuronu w  $\mu\text{m}^2$ . Na podstawie obliczeń wg wyżej wymienionych danych wykonano wykresy przedstawiające zależność pomiędzy wielkością średniego pola powierzchni neuronów od danego okresu rozwojowego.

### Wyniki i omówienie

Badania w mikroskopie świetlnym wykazały, że w 8 tyg. życia płodu bydła pojawiają się zaczątki tworów hipokampa w ścianie kresomózgowia. W 12 tygodniu w wyniku rozwoju półkul mózgowych i komór mózgu hipokamp staje się widoczny w postaci zagięcia kory do komór bocznych mózgu. U płodów o długości 55 mm, tzn. w wieku 8 tyg. życia płodowego komórki nerwowe występują w postaci młodocianej jako neuroblasty. Warstwy komórkowe hipokampa jeszcze nie zaznaczają się. W wieku 12 tyg. życia płodowego hipokamp utworzony jest przez ciekłą warstwę małych neuroblastów, których jądra komórkowe mają średnicę ok. 3  $\mu\text{m}$ , oraz poprzez większe neuroblasty, których jądra przypominają jądra neurocytów (ryc. 1). Płody w wieku 14 tyg. posiadają hipokamp utworzony z neuroblastów o wyraźnym jądrze z jąderką oraz intensywnie wybarwioną błoną jądrową. Średnica jąder wynosi 4-6  $\mu\text{m}$ . W wieku 16 tyg. życia płodowego w obrębie hipokampa obserwuje się już formujące się komórki piramidowe. W następnym okresie tzn. w wieku 18 tyg., można wyraźnie rozróżnić pole CA2 hipokampa. Komórki piramidowe w tym polu są największe i najlepiej wykształcone, ich średnica wynosi 9  $\mu\text{m}$ . U płodów w wieku 20 tyg. nad szczeliną hipokampa pojawia się warstwa zwojowa hipokampa. Warstwa komórek wielokształtnych zawiera komórki nerwowe o kształcie trójkątnym i wielokątnym. Warstwa komórek piramidowych

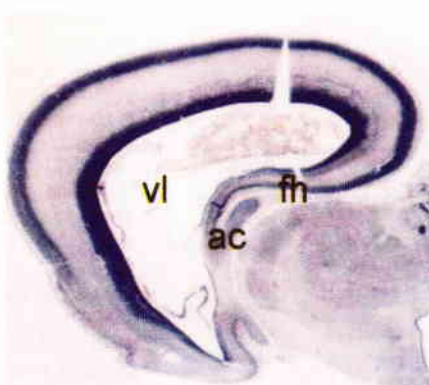
hipokampa zbudowana jest z neuronów o średnicy do 20  $\mu\text{m}$ .

W 23 tyg. życia płodowego stwierdzono wyraźne zróżnicowanie komórek piramidowych w poszczególnych polach hipokampa. W polu CA1 komórki mają średnicę ok. 8  $\mu\text{m}$ , ułożone są gęsto obok siebie i tworzą regularną warstwę. Komórki pola CA2 mają największą średnicę 15-20  $\mu\text{m}$ , wyraźne długie wypustki. W polu CA3 komórki piramidowe mają średnicę 10  $\mu\text{m}$  i zaokrąglony kształt. Komórki piramidowe pola CA4 mają wielkość 10-12  $\mu\text{m}$ , są ułożone luźno obok siebie tworząc owalne pole. U płodów w trzecim trymestrze ciąży hipokamp jest już dobrze wykształcony. W warstwie komórek piramidowych zauważa się bardzo wyraźną różnicę w gęstości neuronalnej w porównaniu z poprzednim trymestrem.

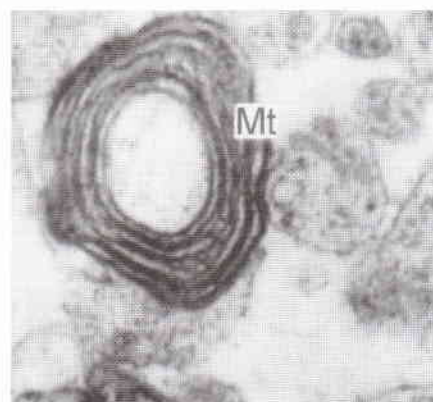
Na podstawie badań przeprowadzonych w mikroskopie elektronowym stwierdzono, że w 16 tyg. życia płodowego nie występują jeszcze połączenia synaptyczne, nie obserwuje się również osłonek mieliniowych. W 18 tyg. życia płodowego obserwuje się pierwsze komórki nerwowe z tigroidem, w cytoplazmie występują liczne wolne rybosomy. Występują liczne mitochondria co wskazuje na dużą aktywność procesów metabolicznych. W tym okresie wykształcają się stożki aksonalne. Pojawiają się figury mielinopodobne (ryc. 2), są to pierwsze blaszki mielinowe, które nie przylegają do siebie. W tym okresie występują pierwsze, wyraźne połączenia synaptyczne.

W 23 tygodniu życia płodowego w neuropilu obserwuje się obecność wielu synaps z wyraźną szczeliną synaptyczną i szeroką częścią postsynaptyczną. Występują włókna aksonalne z dobrze zaznaczoną kilkuwarstwową osłonką mielinową. U płodów w wieku 29 tyg. życia struktura tkanki nerwowej przypomina obraz u osobników dorosłych. Większość włókien osiowych posiada blaszkowate osłonki mielinowe. Wyraźna jest struktura synaps, komórek glejowych i ich wypustek oraz naczyń krwionośnych.

Za pomocą analizy morfometrycznej określono w kolejnych okresach rozwojowych liczbę komórek z pola testowego na  $\text{mm}^2$ , pole powierzchni komórek,



Ryc. 1. Przekrój poprzeczny mózgowia płodu bydła o dl. 14 cm (12 tyg.) Ac – początek starej kory, fh – szczelina hipokampa, vl – komora boczna



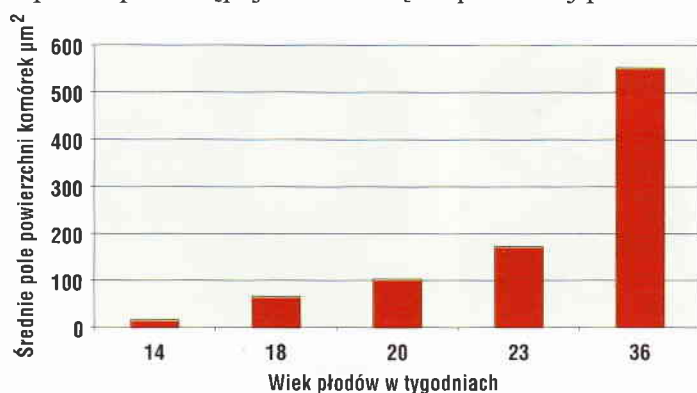
Ryc. 2. Przekrój wypustki komórki nerwowej z hipokampa. Mt – mielino-podobny twór

średnie pole powierzchni komórek, wykonano wykres zależności średniego pola neuronów od kolejnych okresów rozwojowych. Wykres wykonany na podstawie wyników uzyskanych w poszczególnych okresach rozwoju wskazuje na wyraźny wzrost średniego pola powierzchni komórek piramidowych w zależności od wieku płodów. Otrzymane wyniki udowadniają duży spadek liczby neuronów, która przypada na jednostkę powierzchni (w tym przypadku na mm<sup>2</sup>) w następujących po sobie okresach rozwojowych (ryc. 3).

Najszybszy rozwój hipokampa u płodów bydła obserwuje się w pierwszej połowie ciąży, dotyczy to zarówno jego cytoarchitektoniki, jak i mieloarchitektoniki. Charakterystyczne jest, że rozwój samego hipokampa u płodów bydła znacznie wyprzedza rozwój zakrętu zębatego.

U człowieka określono dokładnie czas formowania się zaczątków struktur hipokampa. Hipokamp pierwotny zaczyna formować się w 32 dniu życia zarodka, w 33 dniu następuje pogrubienie warstwy przyszłego hipokampa, od 37 do 41 dnia życia zarodka następuje różnicowanie się ściany kresomózgowia na trzy przyszłe pola korowe: *archicortex*, *paleocortex* i *neocortex* (11). Badania nad neurogenezą hipokampa u człowieka (15) wykazują, że w życiu płodowym neurony pola CA2 dojrzewają najwcześniej. U człowieka w 13-14 tygodniu życia płodowego można rozpoznać pola CA1, CA2 oraz CA3 w warstwie piramidowej hipokampa. Najwcześniej u człowieka w okresie zarodkowym powstają neurony piramidowe pola CA4, następnie pola CA3 oraz CA2, a najpóźniej pola CA1 (7).

Badania przeprowadzone na zwierzętach doświadczalnych (18) potwierdzają, że przyszłe komórki piramidowe migrują z warstwy komorowej i gromadzą się najpierw w głębszej warstwie piramidowej hipokampa, a później w warstwie powierzchniowej. Najbardziej intensywny wzrost komórek, ich dojrzewanie, powstawanie aksonów, dendrytów w hipokampie płodu człowieka następuje od 18 tyg. życia (13). Porównując te wyniki do wyników obserwowanych na płodach krowy stwierdza się w tym przypadku całkowite przeciwieństwo, ponieważ najbardziej intensywny rozwój hipokampa następuje u zwierząt w pierwszej połowie



Ryc. 3. Wykres wskazujący na wyraźny wzrost średniego pola powierzchni komórek piramidowych hipokampa w zależności od wieku płodów

cięży. W hipokampie u badanych płodów była obserwuje się wyraźne różnice morfologiczne w budowie komórek piramidowych w poszczególnych polach dopiero w 23 tyg. życia płodów.

Pomiary pola CA1 u różnych gatunków zwierząt i u człowieka (16) wskazują na największy rozwój tego pola u człowieka. U noworodków ludzkich określono cytoarchitektonikę pól hipokampa oraz wykonane pomiary morfometryczne (16). Przeprowadzone obliczenia ilościowe dotyczące komórek piramidowych w hipokampie człowieka (10) dowodzą, że zmiany ilościowe w przypadku takich chorób jak np. epilepsja dotyczą szczególnie komórek piramidowych hipokampa.

Porównując rozwój prenatalny kory mózgowej krowy i człowieka, u zwierząt stwierdza się znacznie wcześniejszy rozwój. Na przykład w 16 tyg. życia płodowego kresomózgowie człowieka przypomina w swym rozwoju kresomózgowie płodu krowy w 12 tyg. życia. Do porównania rozwoju hipokampa krowy i człowieka skłania fakt, że czas trwania ciąży u obu gatunków jest taki sam.

## Piśmiennictwo

1. Amaral D. G., Insausti R., Cowan W. M.: The commissural connections of the monkey hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* 1984, 224, 307-336.
2. Bayer S. A.: Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with H-thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 1980, 190, 87-114.
3. Bentivoglio M.: The Golgi apparatus emerges from nerve cells. *Trends Neurosci.* 1998, 21/5, 195-200.
4. Davidson T. L., Jarrard L. E.: A role of hippocampus in the utilization of hunger signals. *Behav. Neural Biol.* 1993, 59, 167-171.
5. Figiel I.: Apoptoza neuronów w hodowli in vitro. *Post. Biol. Komórki* 1998, 11, 63-73.
6. Kuchna I.: Quantitative studies of human newborns hippocampal pyramidal cells after perinatal hypoxia. *Folia Neuropathol.* 1994, 32, 1-8.
7. Lorente de No R.: Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.* 1934, 46, 113-177.
8. Mortimer M.: Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature* 1978, 273, 25-32.
9. Mossakowski M. J., Gajkowska B., Tsitsishvili A.: Ultrastructure of neurons from the CA1 sector of Ammon's horn in short-term cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Neuropathol. Pol.* 1989, 27, 39-53.
10. Mouritzen Dam A.: The density of neurons in the human hippocampus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1979, 5, 249-264.
11. Müller F., O'Rahilly R.: The human brain at stage 16, including the initial evagination of the neurohypophysis. *Anat. Embryol.* 1989, 179, 551-569.
12. Olbrich H. G., Braak H.: Ratio of pyramidal cells versus nonpyramidal cells in sector CA1 of the human Ammon's horn. *J. Anat. Embryol.* 1985, 173, 105-110.
13. Paldino A. M., Purpura D. P.: Quantitative analysis of the spatial distribution of axonal dendritic terminals of hippocampal pyramidal neurons in immature human brain. *Exp. Neurol.* 1979, 64, 604-619.
14. Penfield W., Mithieson G.: Memory. Autopsy findings and comments on the role of hippocampus in experiential recall. *Arch. Neurol.* 1974, 31, 145-154.
15. Sidman R. L., Rakic P.: Development of the human central nervous system. W: *Histology Histopathology of the Nervous System*. Haymaker W., Adams R. D. (wyd.). Charles C., Thomas Pub., Springfield, Illinois, USA, s.43-51.
16. Stephan H., Manolescu J.: Comparative investigations on hippocampus in insectivores and primates. *Z. Mikrosk.-anat. Forsch., Leipzig* 1980, 94, 1025-1050.
17. Vnek N., Rothblat L. A.: The hippocampus and long-term object memory in the rat. *J. Neurosci.* 1996, 16, 2780-2787.
18. Wyss J. M., Van Groen T.: Development of the hippocampal formation. W: *The hippocampus-new vistas*. Chan-Palay V., Köhler C. (wyd.) A. R. Liss, Inc, New York, 1979, s.1-16.

Adres autora: dr Izabela Krakowska, ul. Królowej Jadwigi 6/28, 20-282 Lublin