Morfometria neuronów w polach CA1-CA4 hipokampa brzusznego u bydła domowego

IWONA ŁUSZCZEWSKA-SIERAKOWSKA, AGATA WAWRZYNIAK*, ANNA CHARUTA**, MARCIN R. TATARA***, MARIUSZ KLEPACKI, RYSZARD MACIEJEWSKI

Katedra Anatomii Człowieka, Zakład Anatomii Prawidłowej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin

*Katedra Anatomii i Histologii Zwierząt, **Instytut Nauk o Zdrowiu, Wydział Przyrodniczy, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach, ul. Konarskiego 2, 08-110 Siedlce

***Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin

Otrzymano 21.07.2016

Zaakceptowano 15.09.2016

Łuszczewska-Sierakowska I., Wawrzyniak A., Charuta A., Tatara M. R., Klepacki M., Maciejewski R.
Morphometry of ventral hippocampal neurons of CA1-CA4 fields in domestic cattle

Summary

The aim of the study was a morphometric analysis of the ventral hippocampal neurons of the individual CA1-CA4 fields in domestic cattle (*Bos taurus*; N = 6). The hippocampus in cattle is formed by a sizable arched invagination of the medial wall of the lateral ventricle of the brain. The brains were removed and analyzed conventionally with a light microscope. The samples were stained by Nissl's method. The morphometric analysis of the neurons of the hippocampal CA1-CA4 fields included the following parameters: the area of nervous cells and the area of the cell nucleus in μm^2 ; the nucleus-to-cell ratio in %; the average diameter and perimeter of the nervous cell in μm . The morphometric investigations indicate that the cells of the pyramidal layer in the CA1-CA4 fields of the hippocampus in adult domestic cattle differ in terms of their size, shape, and surface area, as well as the surface area of the cell nucleus. The size of cells in CA1 was the largest, fluctuating around 22 μm , whereas in CA4 it amounted to about 19 μm . Cells in CA1 and CA2 had the largest diameter of about 24 μm , whereas cells in the CA4 field had the smallest diameter of about 20 μm . The results obtained suggest a novel approach to studying the morphometric properties of the hippocampus in domestic cattle. Morphometric studies of the central nervous system (CNS) are regarded as a valuable source of data on the function of environmental and pharmacological factors and their effects on several structures of the CNS.

Keywords: hippocampus, domestic cattle, morphometric parameters

Hipokamp jest jednym z podstawowych obszarów neuroanatomicznych wężomózgowia i jego dysfunkcje odgrywają ważną rolę w patogenezie wielu chorób neurologicznych. W ciągu ostatnich dziesięcioleci stał się jednym z najintensywniej badanych obszarów mózgowia u ssaków. Morfologia i fizjologia hipokampa zostały szczegółowo opisane przez wielu autorów (1, 12, 24). Hipokamp właściwy (*hippocampus proper*) z polami CA1-CA4 oraz zakręt zębaty (*gyrus dentatus*) (DG) charakteryzują się odrębną strukturą warstwową. Główne typy komórek DG i hipokampa właściwego to neurony piramidalne oraz ziarniste, znajdujące się w warstwach: piramidalnej (*stratum pyramidale*) (SP) i ziarnistej (*stratum granulosum*) (SG) (2). Twór hipokampa jest elementem układu limbicznego, odgrywającym istotną rolę w procesach poznawczych, takich jak uczenie się, konsolidacja pamięci i wyszukiwania informacji (25). Funkcje poznawcze zależne od hipokampa wpływają na układ cholinergiczny, a ich utrata

jest skorelowana w znacznym stopniu z upośledzeniem funkcji poznawczych (3). Do utraty liczby neuronów dochodzi w okresie poporodowym, gdy istnieje wytworzenie neuronów związanych z pełnioną przez nie funkcją, natomiast neurony niewyspecjalizowane są eliminowane na drodze apoptozy (6). U ludzi, na skutek niewydolności serca, w obszarach korowych mózgowia (np. w płacie czołowym) dochodzi do utraty liczby neuronów nawet do 40%, natomiast w obszarach płata ciemieniowego w znacznie mniejszym stopniu (11). U szczurów w korze mózdzku nie dochodzi do utraty liczby neuronów gruszkowatych i ziarnistych (9). Układ limbiczny inaczej nazywany rąbkowym lub brzeżnym, jest nazwą dla różnych struktur korowych i podkorowych. Obszary układu limbicznego zlokalizowane są głównie w kresomózgowiu w jego części brzusznej, tj. wężomózgowiu. Uważa się, że do struktur układu limbicznego należą ponadto struktury międzymózgowia, takie jak: podwzgórze i wzgórze. Do podstawowych

Ryc. 1. a. Struktura hipokampa brzusznego (pola CA1-CA4) oraz DG u bydła domowego (*Bos taurus*). b. Neurony warstwy piramidальной (SP) pola CA2. Skala podziałki 20 µm. Barwienie metodą Nissla

funkcji tego układu zalicza się między innymi: koordynację czynności układu somatycznego i autonomicznego, udział w procesach zapamiętywania i uczenia się, neurogenezy oraz reakcjach obronnych i agresji. Badania dowiodły, że hipokamp może ulec uszkodzeniu pod wpływem silnego stresu, który może być następstwem zespołu stresu pourazowego, doprowadzającego do wzrostu aktywności osi podwzgórze–przysadka–nadnercza, przyczyniającego się do wydzielania m.in. kortyzolu i w ten sposób wpływającego na uszkodzenie hipokampa (15). Hipokamp właściwy jest częścią tworu hipokampa, położoną najbliżej światła komory bocznej mózgowia. Struktury korowe tworu hipokampa (podpora, hipokamp właściwy, pole zębate) wg Stephana (29) zaliczane są do kory starej (*archicortex*) (5). Wszystkie części tworu hipokampa są ściśle związane z systemem włókien nerwowych. U krowy makroskopowo zakrzywiona struktura hipokampa, podobnie jak u innych gatunków zwierząt, wykazuje pewne podobieństwo do rogów barana, stąd jego nazwa róg ammona (*cornu ammonis*). Obecnie wiele badań dotyczy zmian w mózgowiu związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi. W przebiegu wielu chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN), kora mózgu, mózdzek oraz rdzeń kręgowy stanowią większość struktur wrażliwych na zmiany związane z redukcją liczby neuronów (8). Stan awitaminozy charakteryzujący się niedoborem witamin z grupy B, np. u przeżuwaczy doprowadza do zmian histopatologicznych w mózdku (27). Niektórzy autorzy w swoich badaniach stereologicznych, wykorzystując parametry morfometryczne w celu porównania populacji neuronów w wybranych obszarach mózgowia np. u ryjówki aksamitnej i nornicy rudej, stwierdzili znaczną różnicę pomiędzy badanymi gatunkami zwierząt (17). Dotychczas większość badań koncentrowała się wokół morfologii hipokampa u młodego bydła domowego (10), natomiast nie prowadzono kompleksowych prac morfometrycznych w tym zakresie u dorosłych osobników. Brak badań morfometrycznych dotyczących neuronów hipokampa u dorosłego bydła w polach CA1-CA4 stał się podstawą do przeprowadzenia pomiarów komórek nerwowych w tym obszarze mózgowia.

Celem niniejszych badań była ocena wybranych parametrów morfometrycznych neuronów warstwy piramidальной w poszczególnych polach CA1-CA4 hipokampa brzusznego u bydła domowego.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 6 dojrzałych somatycznie i zdrowych hodowlanych samicach bydła domowego (*Bos taurus*). Mózgi wyizolowano z czaszek i natychmiast utrwalono je w zbuforowanej formalinie, a następnie odwadniano w szeregu alkoholu etylowego o wzrastających stężeniach i zatapiano w bloczki parafinowe. Bloczki parafinowe cięto w mikrotomie na grubość 20 µm, a następnie barwiono metodą Nissla (5, 10). Analizy morfometryczne zdjęć preparatów histologicznych dokonano przy użyciu komputerowego analizatora obrazu w programie Cell[^]D Soft Imaging System (SIS) z podłączoną kamerą digital camera Colorview IIIu (Soft Imaging System).

Parametry morfometryczne neuronów. Przy pomocy pomiarów dokonano analizy morfometrycznej neuronów warstwy piramidальной w polach CA1-CA4 w hipokampie brzusznym. Określano następujące parametry morfometryczne: średni rozmiar neuronów/µm, pole powierzchni ciała komórkowego/µm², pole powierzchni jądra komórkowego/µm², średnicę komórek/µm, obwód komórek/µm oraz wskaźnik jądrowo-komórkowy określający procentowy udział jądra komórki w całym neuronie.

Analiza statystyczna. Wyniki podano w postaci średnich arytmetycznych wraz z odchyleniem standardowym ($\pm$ SD). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Istotność różnic między poszczególnymi polami hipokampa (CA1-CA4) określono testem post-hoc Duncana przy $p < 0,05$.

Wyniki i omówienie

Wartości parametrów morfometrycznych dotyczących neuronów piramidálních w polach CA1-CA4 hipokampa brzusznego u bydła domowego przedstawiono na ryc. 2, 3, 4. Neurony piramidalne z licznymi dendrytami stanowią główną populację komórek obszaru hipokampa w polach CA1-CA4. Twór hipokampa zaliczony przez Stephana (29) do kory starej (*archicortex*), został przez Blackstada (1) podzielony na dwie części: okolicę górną (*regio superior*) (RS) i okolicę dolną (*regio inferior*) (RI). Z badań przeprowadzonych u bydła jest to najbardziej

uzasadniony jest podział hipokampa. Najważniejszą, a zarazem najszerszą warstwą hipokampa właściwego opisaną przez Blackstada jest warstwa komórek piramidalnych. Warstwa ta utworzona jest przez grube pasmo gęsto obok siebie ułożonych komórek nerwowych kształtu piramidalnego, pomiędzy którymi zlokalizowane są naczynia krwionośne i pojedyncze włókna nerwowe. Pasma to jest charakterystyczne dla RS i RI hipokampa właściwego. Według poglądów dotyczących pól hipokampa właściwego u różnych gatunków zwierząt (2, 19), pierwszy podział dokonany przez Lorento de Nó (13) na cztery pola odpowiada podziałowi przyjętemu u bydła (5, 10). W badaniach własnych u bydła domowego zaobserwowano również podział hipokampa brzusznego obejmujący charakterystyczne dla tej struktury mózgowia pola CA1-CA4 (ryc. 1a, b). Parametry morfometryczne opisano w różnych strukturach układu limbicznego np.: u człowieka, królika, szczura, szynszyli, świnki morskiej, psa, małpy, ryjówki i myszokoczka (4, 8, 16-20, 23, 28, 31). W badaniach na dorosłych szczurach wykazano, że w wyniku procesu starzenia dochodzi do niejednakowej utraty liczby neuronów w różnych obszarach mózgowia, np. w podwzgórzu, w jądrze łukowatym (14). Na podstawie badań stereologicznych ludzkiego hipokampa wykazano spadek liczby neuronów w regionach podporę (*subicular*) oraz w DG, natomiast w polach CA1-CA2 i CA3 hipokampa nie zaobserwowano ich spadku (32-34). W badaniach własnych stwierdzono, że w obszarze hipokampa brzusznego u bydła domowego główną populację neuronów stanowią neurony piramidalne (ryc. 1b). Największe neurony obserwowano w polu CA1 (22,3 μm), a najmniejsze w polu CA4 (19,1 μm). Średnia wartość obwodu komórek wynosiła w polach: CA1 – 70,1 μm , CA2 – 68,1 μm , CA3 – 65,2 μm , a CA4 – 64,5 μm . Największą średnicę wykazywały neurony piramidalne w polu CA1 (24,2 μm), a w polach CA3-CA4 wartości były zbliżone i wynosiły, odpowiednio: CA3 – 20,4 μm , a CA4 – 20,1 μm (ryc. 2). W polach CA1-CA3 komórki piramidalne były gęsto upakowane, a ich perikariony mocno wybarwione, natomiast w polu CA4 luźniej rozmieszczone z jaśniej wybarwioną neuroplazmą (ryc. 1a, 1b). Największą średnią wielkość pola powierzchni komórki (274,7 μm^2) oraz największą średnią wielkość pola powierzchni jądra komórkowego (141,1 μm^2) wykazywały neurony w polu CA1 (ryc. 3). Na preparatach histologicznych wybarwionych me-

Ryc. 2. Parametry morfometryczne neuronów piramidalnych (wielkość neuronów (μm), średnica komórek (μm), obwód komórek (μm)) w polu CA1-CA4 hipokampa brzusznego

Ryc. 3. Parametry morfometryczne neuronów piramidalnych (pole powierzchni ciała komórkowego (μm^2), pole powierzchni jądra komórkowego (μm^2)) w polu CA1-CA4 hipokampa brzusznego

Ryc. 4. Wskaźnik jądrowo-komórkowy (%) w polach CA1-CA4 hipokampa brzusznego

todą Nissla jądra neuronów piramidalnych położone były centralnie, z dobrze uwidocznionym jądrem. W polach CA1-CA4 wskaźnik jądrowo-komórkowy wahał się w granicach 51-52% (ryc. 4). Na podstawie dokonanych pomiarów pola komórki oraz wyliczonego wskaźnika jądrowo-komórkowego można wnioskować, że intensywność wzrostu pola jądra u dorosłego bydła pokrywa się ze wzrostem pola komórki. Szczegółowe dane z dokonanych pomiarów w poszczególnych polach

CA1-CA4 hipokampa brzuszego podano na ryc. 2, 3, 4. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że w poszczególnych polach CA1-CA4 hipokampa brzuszego u bydła domowego nie występują istotne statycznie różnice dotyczące badanych parametrów ($p > 0,05$).

Większość struktur należących do układu limbicznego różnych gatunków zwierząt została dobrze opisana tylko na podstawie cech morfologicznych, ale nie w oparciu o analizę morfometryczną. Wielu autorów (19, 20) wykazało, że w różnych obszarach układu limbicznego dochodzi do wzrostu liczby neuronów wraz ze wzrostem objętości komórek. Statystycznie istotne różnice parametrów morfometrycznych komórek piramidalnych w polach CA1-CA4 hipokampa wykazano u człowieka, psa, szczura oraz myszy (8, 19, 20, 31). Neurony piramidalne w polach CA1-CA3 odgrywają istotną rolę w funkcjach hipokampa związanych z uczeniem się oraz pamięcią przestrzenną. Najwięcej badań u zdrowych osobników w obszarze hipokampa właściwego odnosi się do pól CA1-CA3. Przy zastosowaniu metod stereologicznych u pacjentów z chorobą Alzheimera nie zawsze dochodzi do zmiany liczby neuronów w polach CA1-CA2-CA3 hipokampa (8, 30, 34), natomiast w korze nowej u pacjentów z chorobą Alzheimera odnotowano wahania objętościowe, którym nie towarzyszyła utrata neuronów (21, 22). Mechanizm ten najprawdopodobniej związany jest z utratą połączeń synaptycznych oraz utratą liczby dendrytów. Wraz z procesem starzenia dochodzi w mózgowiu do nieodwracalnych zmian wiążących się z utratą liczby neuronów (7). Niektórzy autorzy (26) sądzą, że ubytek neuronów jest procesem nieodwracalnym, postępującym, nie związanym z procesem starzenia, natomiast utrata połączeń synaptycznych jest procesem odwracalnym.

W dostępnym piśmiennictwie ostatnich lat brak jest doniesień o morfologii oraz badań odnoszących się do analizy morfometrycznej hipokampa brzuszego u bydła domowego. Wyniki otrzymane w niniejszych badaniach mogą świadczyć o nowatorskim spojrzeniu na morfometrię hipokampa brzuszego u bydła domowego. Badania morfometryczne OUN stanowią cenne źródło umożliwiające określenie funkcjonowania oraz wpływu różnych czynników środowiskowych i farmakologicznych dotyczących struktur OUN. Ponadto analiza morfometryczna gwarantuje otrzymywanie coraz to dokładniejszych wyników, które mogą być podstawą lepszego zrozumienia morfologii oraz zmian zachodzących w układzie nerwowym.

Piśmiennictwo

- Blackstad T. W.: Commissural connections of the hippocampal region in the rat with special reference to their mode of termination. *J. Comp. Neurol.* 1956, 105, 417-453.
- Caesar M., Aertsen A.: Morphological organization of rat hippocampal slice cultures. *J. Comp. Neurol.* 1991, 307, 87-106.
- Eichenbaum H.: Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 2004, 44, 109-120.
- El Falougy H., Kubikova E., Benuska J.: The microscopical structure of the hippocampus in the rat. *Bratisl. Lek. Listy* 2008, 109, 106-110.
- Eustachiewicz R.: Topografia i cytoarchitektonika tworów hipokampa (formatio hippocampi) u krowy. *Ann. UMCS sec. DD* 1996, 51, 25-40.
- Finch C. E.: Neuron atrophy during aging: programmed or sporadic. *Trends Neurosci.* 1993, 16, 104-110.
- Flood D. G., Coleman P. D.: Dendritic regression dissociated from neuronal death but associated with partial deafferentiation in aging rat supraoptic nucleus. *Neurobiol. Aging* 1993, 14, 575-587.
- Kaufmann A., Barnasu H., Nowakowski K., Decol C., Gurka P., Ransmayr G., Hinterhuber H., Winkler H., Marksteiner J.: Synaptic loss reflected by secretoneurin-like immunoreactivity in the human hippocampus in Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurosci.* 1998, 10, 1084-1094.
- Korbo L., Andersen B. B., Ladefoged O., Moller A.: Total number of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.* 1993, 609, 262-268.
- Krakowska I.: Rozwój hipokampa w życiu płodowym bydła. *Med. Weter.* 2003, 59, 74-76.
- Kumar R., Yadav S. K., Palomares J. A., Park B., Joshi S. H., Ogren J. A., Macey P. M., Fonarow G. C., Harper R. M., Woo M. A.: Reduced regional brain cortical thickness in patients with heart failure. *PLoS One* 2015, 10, 1-16.
- Llorens-Martín M., Rábano A., Ávila J.: The Ever-Changing Morphology of Hippocampal Granule Neurons in Physiology and Pathology. *Front Neurosci.* 2016, 9, 1-20.
- Lorente de Nó R.: Studies of the structure of the cerebral cortex. The area entorhinalis. *J. Psychol. Neurol.* 1933, 45, 381-438.
- Madeira M. D., Sousa N., Santer R. M., Paula-Barbosa M. M., Gundersen H. J. G.: Age and sex do not affect the volume cell number, or cell size of the suprachiasmatic nucleus of the rat: an unbiased stereological study. *J. Comp. Neurol.* 1995, 361, 585-601.
- McEwen S. B., Sapolsky M. R.: Stress and cognitive function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1995, 5, 205-216.
- 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. *Neuropath. Pol.* 1989, 27, 39-53.
- Najdzion J., Wasilewska B., Bogus-Nowakowska K., Równiak M., Akowski W., Robak A.: A morphometric analysis of the geniculate bodies in selected mammalian species. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2012, 56, 205-210.
- Penfield W., Mathieson G. Memory: Autopsy findings and comments on the role of hippocampus in experiential recall. *Arch. Neurol.* 1974, 31, 145-154.
- Ragbetli M. C., Aydinlioglu A., Koyun N., Yayici R., Arslan K.: Total neuron numbers in CA1-4 sectors of the dog hippocampus. *Indian J. Med. Res.* 2010, 131, 780-785.
- Rapp P. R., Stack E. C., Gallagher M.: Morphometric studies of the aged hippocampus: I. Volumetric analysis in behaviorally characterized rats. *J. Comp. Neurol.* 1999, 403, 459-470.
- Regeur L., Jensen G. B., Pakkenberg H., Evans S. M., Pakkenberg B.: No global neocortical nerve cell loss in brains from patients with senile dementia of Alzheimer's type. *Neurobiol. Aging* 1994, 15, 347-352.
- Royet J. P.: Stereology: a method for analyzing images. *Progr. Neurobiol.* 1991, 37, 433-447.
- Równiak M., Robak A., Sztajn S., Bogus-Nowakowska K., Wasilewska B., Najdzion J.: The morphometric study of the amygdala in the rabbit. *Folia Morphol.* 2007, 66, 44-53.
- Rycerz K., Krawczyk A., Jaworska-Adamu J., Krawczyk-Marć I.: Effects of monosodium glutamate treatment on calretinin-immunoreactive neurons in hippocampus of postnatal rats. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2014, 52, 281-288.
- Schiller D., Eichenbaum H., Buffalo E. A., Davachi L., Foster D. J., Leutgeb S., Ranganath C.: Memory and Space: Towards an Understanding of the Cognitive Map. *J. Neurosci.* 2015, 35, 13904-13911.
- Selkoe D. J.: Cerebral and mental aging. *Scientific American* 1992, 267, 134-142.
- Sołtysiak Z., Dzimira S.: The histopathological changes of neocortical of cerebral cortex in the ruminants. *Życie Wet.* 1999, 74, 92-94.
- Spalding K. L., Bergmann O., Alkass K., Bernard S., Salehpour M., Huttner H. B., Boström E., Westerlund L., Vial C., Buchholz B. A., Possnert G., Mash D. C., Druid H., Frisen J.: Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 2013, 153, 1219-1227.
- Stephan H.: Vergleichend-anatomische Untersuchungen an Insektivorengehirnen. V.V. Die Quantitative Zusammensetzung der Oberflächen des Allocortex. *Acta Anatomica* 1961, 44, 12-59.
- Vogels O. J. M., Broere C. A. J., Nieuwenhuys R.: Neuronal hypertrophy in the human supraoptic and paraventricular nucleus in aging and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1990, 109, 62-65.
- Wasilewska B., Najdzion J., Równiak M., Bogus-Nowakowska K., Nowakowski J. J., Robak A.: Morphometric comparative study of the striatum and globus pallidus of the common shrew, bank vole, rabbit and fox. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2012, 56, 411-414.
- West M. J.: New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol. Aging* 1993, 14, 275-285.
- West M. J.: Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol. Aging* 1993, 14, 287-293.
- West M. J., Gundersen H. J. G.: Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 1990, 296, 1-22.

Adres autora: dr Iwona Łuszczewska-Sierakowska, Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin; e-mail: iwona.luszczewska-sierakowska@umlub.pl