

© Коллектив авторов, 2019
УДК 611.811:612.647

Е. И. Краснощекова¹, П. А. Зыкин¹, Л. А. Ткаченко¹, А. В. Баскаков¹, Р. А. Насыров²

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И НЕЙРОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБИКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСА МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В ПЛОДНОМ ПЕРИОДЕ

¹ Кафедра цитологии и гистологии (зав. — проф. А. Д. Харазова), Санкт-Петербургский государственный университет;

² кафедра патологической анатомии с курсом судебной медицины (зав. — проф. Р. А. Насыров), ФГБОУВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург

Цель — изучение особенностей цито- и хемоархитектоники субикулярного комплекса мозга плода человека.

Материал и методы. Исследовано 10 полушарий мозга плодов человека 20–26 нед гестации. Материал получен из архива кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета. Гистологические парафиновые срезы окрашивали по Ниссля, а также иммуногистохимически с антителами к слой-специфическим белкам SATB2, FOXP1, CTIP2, TBR1.

Результаты. В составе субикулярного комплекса, включающего субикулюм, пресубикулюм и парасубикулюм, глубокие слои (ру, ро, V, VI) содержат FOXP1/CTIP2 и TBR1-иммунопозитивные нейроны, поверхностные слои (II, III) — SATB2-позитивные клетки.

Выводы. Субикулюм демонстрирует черты двух корковых формаций: аллокортеса (слой FOXP1+/CTIP2+-клеток, отсутствие диссеканты) и периаллокортеса (слой TBR1+-нейронов). Пресубикулюм и парасубикулюм относятся к периаллокортесу, на что указывают островковая структура SATB2+ слоёв II, III и наличие диссеканты.

Ключевые слова: субикулюм, пресубикулюм, парасубикулюм, слой-специфичные белки

Субикулярный комплекс (СК) входит в состав медиальной височной доли (medial temporal lobe), участвует в механизмах долговременной памяти и является её наименее изученной структурой [1, 3]. У человека выделение полей СК осложняется скудными сведениями о нейрохимическом фенотипе его нейронов и объективными ограничениями на гомологию с одноименными структурами животных [1]. В то же время, необходимость четких морфологических характеристик субструктур СК востребована в МРТ-диагностике, так как их объем избирательно уменьшается в зависимости от типа когнитивных нарушений [4].

Цель настоящего исследования — изучение особенностей цито- и хемоархитектоники субикулярного комплекса мозга плода человека на 20–26-й неделях гестации. Выбор пренатального периода объясняется тем, что слабая гирификация коры полушарий, характерная для этого возраста, позволяет более точно выделить особенности корковых формаций.

Материал и методы. Исследовано 10 левых полушарий мозга плодов в возрасте 20–26 нед гестации из архива кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета (СПбГПМУ) с соблюдением положений закона № 8-ФЗ, приказа МЗ РФ № 354 от 06.06.2013 г., с одобрением этического комитета СПбГПМУ (протоколы № 6/5 от 10.06.2014 г.; № 2/5 от 06.02.2019 г.). Весь материал с постмортальным периодом продолжительностью не более 24 ч по заключению патологоанатома не имел неврологических патологий и кровоизлияний, показал отрицательную реакцию на герпес-вирусы (1-, 4-й и 5-й типы). Материал фиксировали в 4% растворе параформальдегида на 0,1M фосфатном буфере, pH 7,4. Блоки височной области полушарий заливали в парафин, фронтальные срезы толщиной 12 мкм готовили на микротоме «Leica» RM 2245 (Leica Microsystems, Германия). Для последующего исследования срезы окрашивали крезиловым фиолетовым по Ниссля или подвергали иммуногистохимической (ИГХ) обработке с применением антител к слой-специфическим белкам: TBR1 (разведение 1:50, Abcam, Великобритания), FOXP1 (1:200, Abcam), SATB2 (1:200, Abcam), CTIP2 (1:20, Abcam). В ходе постмиграционной дифференцировки синтез каждого из этих белков отражает сегрегацию нейронов в определенном слое, их последующую функциональную специализацию. Антитела были успешно использованы для изучения коры большого мозга человека,

Сведения об авторах:

Краснощекова Елена Ивановна (e-mail: krasnelena@gmail.com), *Зыкин Павел Александрович*, *Ткаченко Любовь Александровна*, *Баскаков Алексей Владимирович*, кафедра цитологии и гистологии, Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

Насыров Руслан Абдуллаевич (e-mail: rmd99@mail.ru), кафедра патологической анатомии с курсом судебной медицины, ФГБОУВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава РФ, 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул. 2

начиная с 19 нед гестации [5]. Исследование препаратов проводили с помощью микроскопов «Leica» DM 5500 и «Leica» TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия). Локализацию ИГХ-позитивных нейронов в конкретном слое коры устанавливали путем сопоставления с препаратами, окрашенными по Нисслю. Численность иммунопозитивных клеток определяли по модернизированной методике С. Херкулано [4]. Оценивали абсолютное и относительное (%) число ядер с ИГХ-меткой (SATB2, FOXP1, CTIP2 или TBR1) и ядер, окрашенных DAPI, на 1 мм² среза.

Результаты исследования. В настоящее время нет единой классификации слоев субикулярного комплекса. Для разных его полей мы использовали наиболее распространенные обозначения [1, 3]. У плодов 20–26 нед гестации были выделены три субструктуры: собственно субикулюм (Sub), пресубикулюм (PSub) и парасубикулюм (PaSub). Sub является продолжением гиппокампа, состоит из поверхностного молекулярного слоя I и глубокой клеточной зоны, которая прорезывает радиальный и пирамидный слои CA1 гиппокампа, но более редкоклеточная и широкая.

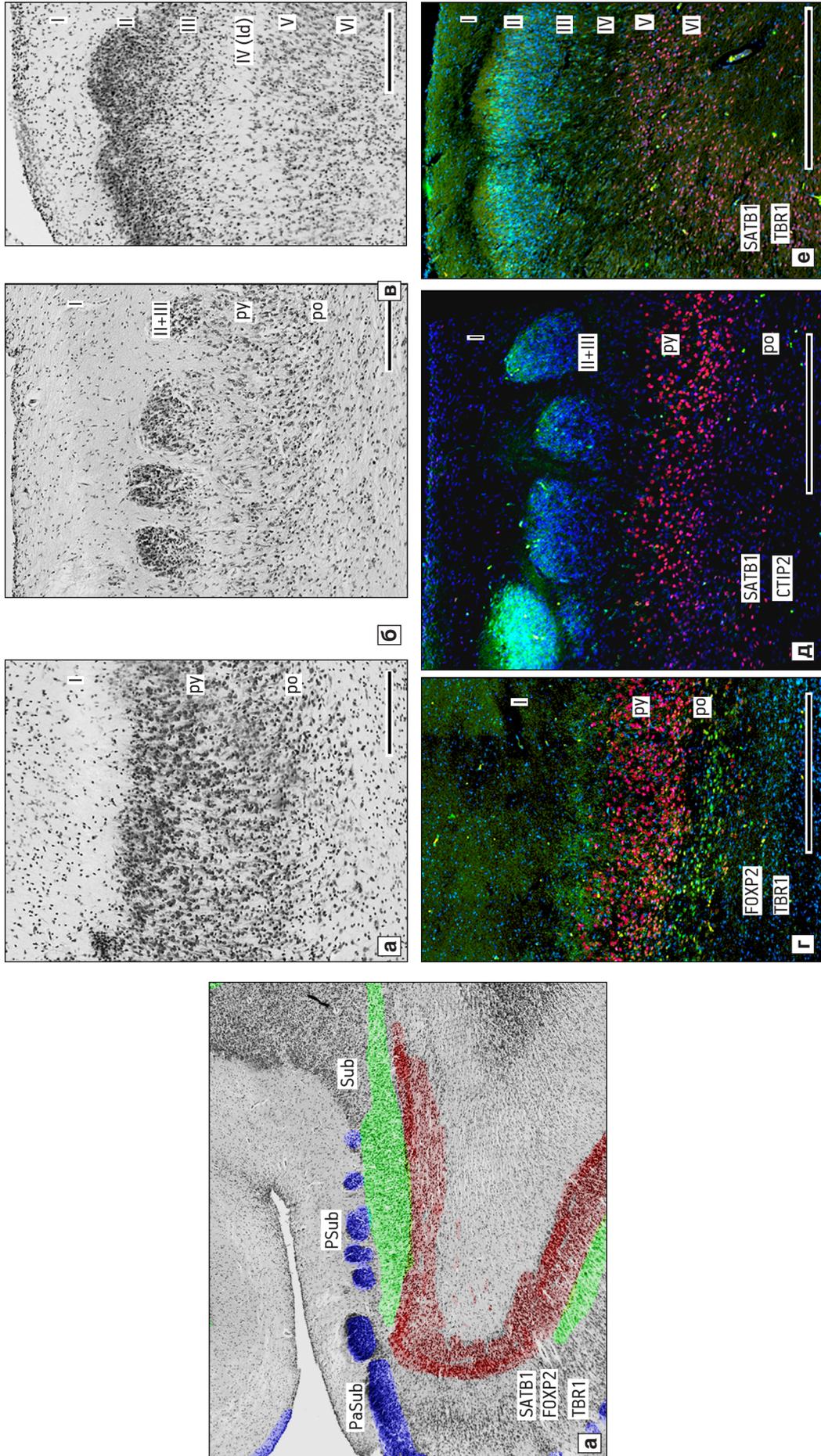
Начиная с 23 нед гестации, глубокая зона была разделена на два слоя: образованный пирамидными нейронами ru и po, в котором преобладали полиморфные клетки (рисунк, б). PSub отличался тем, что на границе слоя I и глубокой клеточной зоны, которая без видимых изменений продолжается из Sub, появились островки плотно упакованных клеток диаметром от 70 до 100 мкм, разделенные бесклеточными промежутками того же размера. Таких островков в разных исследованных образцах насчитывали от 3 до 5, все они имели четкие границы с подлежащим слоем. Как принято в указанных выше источниках, мы обозначили их слой II+III, а глубокие, переходящие из субикулюма слои, — пирамидный (ru) и полиморфный (po). Типичная для периаллокортекса диссеканта в PSub не идентифицировалась (см. рисунок, в). Цитоархитектоника PaSub существенно отличалась от PSub тем, что глубокая часть островков здесь более редкоклеточна, чем поверхностная, что позволило уверенно выделить слои II и III. Одновременно границы между островками сглаживались, слой III становился шире, отделяясь от глубокой клеточной зоны хорошо выраженной бесклеточной диссекантой. Несмотря на то, что слои PaSub не гомологичны слоям неокортекса, для их обозначения мы использовали ту же последовательность римских цифр от I до VI, ориентируясь на обзорные публикации по теме [3]. Таким образом, PaSub приобрел типичное для периаллокортекса строение: слой I — молекулярный или маргинальная зона, слой II представлен островками плотно упакованных клеток, слой III, постепенно расширяющийся

от PaSub к энторинальной коре, образован пирамидными нейронами, слой IV (Id) — бесклеточная диссеканта, слой V разделен на подслои: Va — узкий слой крупных пирамидных нейронов, Vb — более мелкоклеточный, слой VI — полиморфный, постепенно переходящий в подлежащее белое вещество (см. рисунок, г).

В целом, цитоархитектоника полей субикулярного комплекса соответствует взрослому мозгу [3], но вопросы о границе с аллокортексом, о гомологии слоев глубокой клеточной зоны и критериях выделения слоев II и III остались открытыми. Для их выяснения было проведено ИГХ-исследование, в результате которого обнаружено, что антитела к слой-специфическим белкам избирательно маркируют нейроны определенных слоев (см. рисунок, а, д, е, ж). Этот факт подтвержден подсчетом ядер нейронов, маркированных SATB2, FOXP1, CTIP2 или TBR1 и ядер, окрашенных DAPI, в каждом конкретном слое (таблица).

В слое ru Sub и PSub доля FOXP1+/CTIP2+-клеток достигала 40,5%, при этом паттерн маркированных нейронов продлевался в пирамидный слой поля CA1 гиппокампа. Численность таких нейронов резко снижалась в PaSub, где единичные FOXP1+/CTIP2+-клетки обнаружены только в подслое Va. Массово TBR1+-нейроны (до 25%) появились в слое po Sub на границе с CA1 гиппокампа, далее высокая плотность TBR1+-клеток отмечена в слое VI периаллокортекса, включая PaSub и энторинальную кору. На поверхности островков PSub выявлены SATB2+-нейроны, их число составило в среднем 2,5% от всех клеток островков. В слое II PaSub доля SATB2+-нейронов возросла до 38,5%, в то время как в слое III — только 10,7%.

Обсуждение полученных данных. В работе установлены ранее неизвестные нейрохимические характеристики субикулярного комплекса мозга плода человека [1, 3]. Поле Sub традиционно рассматривают в составе гиппокампа, обосновывая это сходной с CA1 цитоархитектоникой [1]. По нашим данным, слой ru Sub и пирамидный слой поля CA1 содержат FOXP1+/CTIP2+-клетки, а в слое po Sub сегрегированы TBR1+-нейроны, которые в CA1 отсутствуют. Таким образом, слой po нейрохимически идентичен слою VI PaSub и энторинальной коры, а слой ru — пирамидному слою поля CA1/, т. е. полю Sub присущи черты двух корковых формаций — аллокортекса и периаллокортекса. Диссеканта, как характерный признак периаллокортекса, дифференцируется только в PaSub, однако дискретные совокупности SATB2+-нейронов, которые



Цитоархитектоника и хемоархитектоника субикулярного комплекса мозга 24-недельного плода человека.

а — поля субикулярного комплекса, паттерны иммунореактивных клеток отмечены цветом; б — субикулум, в — пресубикулум, г — парасубикулум; верхняя панель; д — субикулум, е — пресубикулум, ж — парасубикулум. а-г — окраска по Нисслю; д-ж — иммуногистохимическая реакция на слой-специфичные антигены. Обозначения см. в тексте. Мерная риска — 100 мкм

**Число иммунопозитивных ядер нейронов и ядер, окрашенных DAPI, в слоях полей субикулярного комплекса
(средняя величина±SD)**

Поля	Слои					
	II	III	py	po	V	VI
Sub			CTIP 197±20; FOXP 120±17; TBR 30±2; DAPI 526±70	CTIP 15±4; FOXP 13±3; TBR 79±10; DAPI 460±57		
PSub	SATB 26±5; DAPI 976±101		CTIP 192±21; FOXP 187±22; TBR 30±7; DAPI 624±57	CTIP 11±3; FOXP 5±3; TBR 128±21; DAPI 544±59,0		
PaSub	SATB2 226±31; DAPI 602±57	SATB 64±7; CTIP 12±1; FOXP 8±2; DAPI 580±76	–	–	CTIP 10±3; FOXP 7±1; TBR 3±1; DAPI 80±11	CTIP 8±1; FOXP 12±1; TBR 194±20; DAPI 563±52

она отделяет от слоя FOXP1+/CTIP2+-клеток, появляются в PSub, где диссеканта не имеет вида непрерывного бесклеточного слоя. Мы полагаем, что сегрегация SATB2+ в поверхностных слоях Psub и PaSub подтверждает их принадлежность периллокортексу. Полученные результаты, уточняющие филогенетические характеристики и анатомические границы субикулярного комплекса, могут быть важны для МРТ-диагностики [4].

Работа выполнена при финансовой поддержке СПбГУ, грант № 1.38.333.2015, использовано оборудование РЦ МиКТ Научного Парка СПбГУ (проект № 109-306)

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: Е. И. К., П. А. З., Р. А. Н.

Сбор и обработка материала: Л. А. Т., П. А. З.

Статистическая обработка данных: А. В. Б., П. А. З.

Анализ и интерпретация данных: Е. И. К., П. А. З.

Написание текста: Е. И. К., Р. А. Н.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА.

- Ding S.L. Comparative anatomy of the prosubiculum, subiculum, presubiculum, postsubiculum and parasubiculum in human, monkey, and rodent // *J. Comp. Neurol.* 2013. Vol. 521, № 18. P. 4145–4162. doi: 10.1002/cne.23416
- Herculano-Houzel S., Lent R. Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain // *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25, № 10. P. 2518–2521. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4526-04.2005
- Insausti R., Muñoz-López M., Insausti A.M., Artacho-Péruela E. The Human Periallocortex: Layer Pattern in Presubiculum, Parasubiculum and Entorhinal Cortex. A Review // *Front. Neuroanat.* 2017. Vol. 11. P. 84. doi: 10.3389/fnana.2017.00084
- Kang D.W., Lim H.K., Joo S.H., Lee N.R., Lee C.U. The association between hippocampal subfield volumes and education in cognitively normal older adults and amnesic mild cognitive impairment patients // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2018. Vol. 14. P. 143–152. doi: 10.2147/NDT.S151659
- Saito T., Hanai S., Takashima S., Nakagawa E., Okazaki S., Inoue T., Miyata R., Hoshino K., Akashi T., Sasaki M., Goto Y.,

Hayashi M., Itoh M. Neocortical layer formation of human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific marker expression // *Cereb. Cortex.* 2011. Vol. 21, № 3. P. 588–596. doi: 10.1093/cercor/bhq125

Поступила в редакцию 01.04.2019

Получена после доработки 21.05.2019

MORPHOLOGICAL AND NEUROCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE SUBICULAR COMPLEX OF THE HUMAN FETAL BRAIN

E. I. Krasnoschekova¹, P. A. Zykin¹, L. A. Tkachenko¹, A. V. Baskakov¹, R. A. Nasyrov²

Objective — to study the characteristics of cytoarchitecture and chemoarchitecture of the subicular complex in the human fetal brain.

Material and methods. Ten hemispheres of human fetal brain were studied at 20–26 weeks of gestation. The material was obtained from the archive of the Department of Pathological Anatomy with a Course of Forensic Medicine of St. Petersburg State Pediatric Medical University. Histological paraffin sections were stained according to Nissl method, and immunohistochemically with antibodies raised against the layer-specific proteins SATB2, FOXP1, CTIP2, TBR1.

Results. The deep layers (py, po, V, VI) of the subicular complex, which includes subiculum, presubiculum and parasubiculum, contained FOXP1 / CTIP2 and TBR1 immunopositive neurons, and the superficial layers (II, III) contained SATB2-positive cells.

Conclusions. Subiculum demonstrates the features of two cortical formations: the allocortex (the layer of FOXP1+/CTIP2+ cells, the absence of lamina dissecans) and the periallocortex (the layer of TBR1+ neurons). Presubiculum and parasubiculum are components of the periallocortex, which is indicated by the island pattern of SATB2+ layers II, III and the presence of lamina dissecans.

Key words: *subiculum, presubiculum, parasubiculum, layer-specific proteins*

¹ Department of Cytology and Histology, Saint Petersburg University, 7–9 Universitetskaya emb., St. Petersburg 199034;

² Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, St. Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya St., St. Petersburg 194100