

STEREOLOŠKA ANALIZA ZRNASTIH ČELIJA KORE MALOG MOZGA U TOKU RAZVOJA KOD ČOVEKA

Radmila Gudović, Dušica Marić i Nada Mihić

Cilj ovog istraživanja bio je da se odredi numerička gustina zrnastih ćelija u različitim delovima kore malog mozga. Promene numeričke gustine praćene su u predelu hemisfera, crva i pahuljice. Za proučavanje numeričke gustine zrnastih ćelija korišćeno je 25 humanih fetusa različite gestacijske starosti (15 do 31 gestacijska nedelja i jednom mozgu novorođenčeta). Posle uobičajene procedure fiksacije i kalupljena, mozgovi su sečeni u frontalnoj ravni na 6, 15 i 30 μm i bojeni po metodi krezil violet. Stereološka analiza urađena je pomoću metode brojanja uz pomoć višenamenskog testnog sistema M42. Ukupno je u svakom stadijumu brojano po 80 testnih polja. Rezultati stereološke analize ukazuju na stalan porast numeričke gustine zrnastih ćelija u svim proučavanim stadijuma, kao i u svim ispitivanim delovima kore malog mozga. *Acta Medica Medianae* 2005;45(1):47-51.

Ključne reči: čovek, mali mozak, zrnaste ćelije, razvoj, stereologija

Institut za anatomiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

Kontakt: Radmila Gudović
Institut za anatomiju Medicinskog fakulteta
Hajduk Veljkova 2
21000 Novi Sad, Srbija i Crna Gora
Tel.: 021/6615751
E-mail: d.maric@Eunet.yu

Uvod

Mali mozak se opisuje kao struktura koju čine tri sistema čija je uloga da kontrolišu vestibularne, spinalne i kortikalne mehanizme pomoću recipročnih neuronskih veza. Organizacija malog mozga ukazuje da je on uključen u proces fine kontrole motornih pokreta, kao kontrolni sistem koji koristi povratne informacije da bi kontrolisao greške u drugom sistemu. Skorija istraživanja otkrivaju da mali mozak ima značajnu ulogu u kongnitivnim procesima, opažanju (1,2), procesu govora (3), kao i kontroli dvadesetčetvoročasovnog ritma (4). Doyon i sar. (5), u svojim istraživanjima, utvrdili su da mali mozak ima veoma važnu ulogu u bezuslovnom sticanju vizumotorne veštine, naročito u kasnijim stadijumima učenja.

Pomenuti sistemi povezani su, praktično, sa svim delovima centralnog nervnog sistema izuzetno bogatim vezama. Informacije do malog mozga dolaze preko dva odvojena sistema. Jedan sistem čine puzajuća vlakna koja vode poreklo iz olivarnog kompleksa produžene moždine (6). Ova vlakna ukrštaju srednju liniju i stupaju u kontakt sa dendritima Purkinjeovih ćelija.

Drugi put, koji dovodi informacije do malog mozga čini sistem mahovinastih vlakana, koji sa dendritima zrnastih ćelija i Goldži ćelija gradi složenu sinapsu poznatu kao glomerul malog mozga. Putevi koji polaze iz kičmene moždine i

idu ka malom mozgu, zatim putevi koji polaze iz retikularne supstance, mezencefaličnog trigeminalnog jedra, *nuclei pontis*, vestibularnih jedara i drugih struktura centralnog nervnog sistema, predstavljaju, u suštini, mahovinasta vlakna koja se završavaju u zrnastom sloju kore malog mozga gradeći rozetu, odnosno centralni deo glomerula. Zahvaljujući ovakvoj organizaciji, zrnaste ćelije dobijaju informacije iz brojnih delova centralnog nervnog sistema, koje, zatim, putem paralelnih vlakna, šalju ka Pukinjeovoj ćeliji.

Zrnaste ćelije vode poreklo iz spoljašnjeg zrnastog sloja (7,8), koji predstavlja privremeni proliferativni centar. Ćelije spoljašnjeg zrnastog sloja vode poreklo iz subventrikularne zone rombičke usne (9). Preteče zrnastih ćelija migriraju iz rombičke usne i tangencijalnom migracijom šire se po površini začetka malog mozga i stvaraju spoljašnji zrnasti sloj. U ovom sloju ćelije se dele, a posmitotički neuroni započinju veoma složen proces diferencijacije i migracije ka unutra, kroz molekularni sloj i sloj Pukinjeovih ćelija. Prošavši kroz pomenute slojeve zrnaste ćelije zauzimaju definitivni položaj ispod sloja Pukinjeovih ćelija i grade unutrašnji zrnasti sloj (10,11). U toku migracije Goldži (Golgi) zona zrnastih ćelija počinje da stvara mehuriće koje ispunjava sinaptofizin (12), mada se, najverovatnije pravi sinaptički kontakt između paralelnih vlakana zrnastih ćelija i dendrita Pukinjeovih ćelija još ne razvija. U ovom vremenskom periodu prisutan je, kod miševa, TAG-1 (transient axonal glycoprotein) koji indirektno ukazuje na intenzivan rast aksona, odnosno paralelnih vlakana. Iz ovog kratkog prikaza jasno se uočava da je zrnasta ćelija, sa funkcionalnog stanovišta veoma važna pošto predstavlja most između sistema mahovinastih vlakana i Purkinjeove ćelije.

Cilj rada

Cilj ovog rada bio je, imajući u vidu značaj zrnastih ćelija u procesu funkcionisanja malog mozga, praćenje promena numeričkih gustina zrnastih ćelija u filogenetski različitim delovima kore malog mozga u toku razvoja.

Materijal i metode

Stereološka analiza zrnastih ćelija crva (*vermis*), hemisfera (*hemispherium*) i pahuljice (*flocculus*), u toku razvoja, urađena je na 25 mozgova čovečijih fetusa različite gestacijske starosti (12,5; 15; 17,5; 19,5; 24,5 i 31. nedelje gestacije (g.n.) i jednom mozgu 6 dana starog novorođenčeta). Svi fetusi su dobijeni posle spontanog pobačaja (12,5–31 g.n.). Novorođenče je umrlo usled respiratornog poremećaja. Poremećaji na mozgu fetusa nisu bili uočeni. Starost fetusa određivali smo prema Oliver-Pineau (13). Fetalni mozgovi bili su fiksirani u 10% rastvora formalina, kalupljeni u celuidinu i sečeni u frontalnoj ravni na 6,15 i 30 μm debljine. Preseci su bojeni po metodi krezil-violet. Za stereološku analizu korišćen je svaki peti presek. Ukupno je brojano 80 testnih polja u svakom stadijumu razvoja. Na svakom rezu brojano je 10 testnih polja, pet u levij i pet u desnoj pahuljici, crvu i hemisferi. Prečnik jedra zrnaste ćelije određivan je pomoću okularnog mikrometra. Dobijena vrednost je pomnožena sa $4/\pi$ da bi se izračunao pravi prečnik pošto je utvrđeno da postoji jasna linearna zavisnost između prečnika lopte i veličine profila (14). Stereološku analizu smo radili uz pomoć svetlosnog mikroskopa (occ. 10; obj. 100). Jedra nervnih ćelija brojali smo na optičkom rezu koristeći testni sistem M42 po Weibel-u. Numeričku gustinu jedara nervnih ćelija (N_V), u ovom slučaju, izračunavali smo pomoću sledeće formule (15):

$$N_V = N_A / DF + \bar{D}$$

gde je :

N_V – numerička gustina

N_A – broj jedara nervnih ćelija na testnom polju

DF – subjektivna dubina focusa

D – prosečna vrednost prečnika

Od statističkih parametara izračunavana je prosečna vrednost numeričke gustine, standardna devijacija i standardna greška aritmetičke sredine. Dobijeni rezultati testirani su T-testom.

Rezultati

Unutrašnji zrnasti sloj kojeg sačinjavaju zrele zrnaste ćelije prvi put se pojavljuje u toku razvoja u 15. g.n. u vidu tanke trake koja se nalazi neposredno ispod sloja nezrelih Purkinjeovih ćelija. U predelu pahuljice u 15-toj g. n. unutrašnji zrnasti sloj je slabo vidljiv i nejasno ograničen prema okolnim strukturama tako da je bilo nemoguće sa sigurnošću izbrojati zrnaste ćelije u tom predelu. Histološka analiza ukazuje da unutrašnji zrnasti sloj u kasnijim stadijumima razvoja postaje deblji i gušće naseljen, dok se istovremeno spoljašnji zrnasti sloj istanjuje, mada je na histološkim preparatima prisutan kod novorođenčeta starog 6 dana.

Numerička gustina zrnastih ćelija u predelu hemisfera prikazana je u Tabeli 1, u predelu crva u Tabeli 2, a u predelu pahuljice u Tabeli 3. Numerička gustina zrnastih ćelija u predelu hemisfera pokazuje neprekidan rast koji je statistički značajan ($p < 0,001$) u svim ispitivanim stadijumima, izuzev između 17,5 i 19,5 g.n. gde razlika u vrednostima numeričke gustine nije statistički značajna.

Tabela 1. Numerička gustina zrnastih ćelija u predelu hemisfera

starost	15 g.n.	17,5 g.n.	19,5 g.n.	24 g.n.	31 g.n.	6 dana
X	97000	110000	115000	200000	526000	542000
SD	18700	19000	24000	44000	46000	42000
SE	3200	3200	4000	7400	8400	7000

Tabela 2. Numerička gustina zrnastih ćelija u predelu crva (*vermis*)

starost	15 g.n.	17,5 g.n.	19,5 g.n.	24 g.n.	31 g.n.	6 dana
X	140000	158000	162000	334000	368000	571000
SD	2000	18000	21000	58600	46000	73000
SE	3000	3300	3900	10700	8400	13900

Tabela 3. Numerička gustina zrnastih ćelija u predelu pahuljice (*flocculus*)

starost	15 g.n.	17,5 g.n.	19,5 g.n.	24 g.n.	31 g.n.	6 dana
X		55000	100000	157000	174000	192000
SD		15000	21900	37200	36500	38300
SE		1500	2200	3800	4100	3900

Numerička gustina zrnastih ćelija u predelu crva, kao i numerička gustina zrnastih ćelija u predelu hemisfera pokazuje neprekidan rast koji je statistički značajan u svim proučavanim stadijumima ($p < 0,001$), izuzev između 17,5 i 19,5 g.n. i 31 g.n. i novorođenčeta, gde razlika u vrednostima numeričke gustine, iako postoji, nije statistički značajna.

Porast vrednosti numeričke gustine jedara zrnastih ćelija u predelu pahuljice statistički je značajan ($p < 0,001$) u svim ispitivanim stadijumima.

Upoređujući vrednosti numeričkih gustina za odgovarajuće stadijume razvoja u predelu kore hemisfera (*neocerebellum*), crva (*paleocerebellum*) pahuljice (*archicerebellum*) malog mozga uočavamo da su one različite. Statistička analiza ukazuje da su razlike numeričkih gustina statistički značajne ($p < 0,001$) u svim ispitivanim stadijumima i za sve delove kore malog mozga, sa izuzetkom vrednosti numeričkih gustina u predelu kore hemisfera i crva kod novorođenčeta, gde je statistička značajnost na nivou $p < 0,01$.

Diskusija

Razvoj centralnog nervnog sistema kod kičmenjaka sastoji se iz progresivnih i regresivnih procesa, odnosno fenomena (16,17). Progresivne procese čine proliferacija ćelija, migracija ka njihovom privremenom ili krajnjem odredištu (18), sazrevanje, tj. stvaranje odgovarajućih proteina ćelijske opne, jonskih kanala (19), selektivno nakupljanje sličnih ćelija, stvaranje fenotipskih varijeteta i odgovarajuće orijentacije dendritskog polja, kao i uspostavljanje vrlo složenih veza koje su karakteristične za morfološki i funkcionalno zreo centralni nervni sistem (20). Pored pomenutih progresivnih fenomena, za pravilan razvoj centralnog nervnog sistema veoma je važan i fenomen genetski programirane ćelijske smrti ili apoptoze (21,22,23), koja u suštini predstavlja regresivan proces.

Genetski programirana ćelijska smrt još uvek je nedovoljno razjašnjen fenomen koji predstavlja okosnicu razvoja centralnog nervnog sistema. Poznato je da programirana ćelijska smrt sa karakteristikama apoptoze deluje kako na neuroblaste, tako i na postmitotične neurone, pre nego što njihovi aksoni stupe u sinaptički kontakt sa svojim ciljem (24). Novija istraživanja, takođe, ukazuju da nervne ćelije za svoje preživljavanje zahtevaju prisustvo različitih podsticaja (stimulusa) koji deluju na odgovarajuće receptore. Koja vrsta podsticaja će biti potrebna za njihovo preživljavanje zavisi prvenstveno od vrste ćelije i stepena njenog razvoja (25). Nedostatak odgovarajućih podsticaja dovodi do jedne vrste ćelijskog samoubistva.

Ako se napred navedene činjenice uzmu u obzir lako se može zaključiti da same ćelije imaju veoma aktivnu ulogu u procesu svoje smrti, koja se kao prirodna pojava pojavljuje u toku razvoja, kao veoma važna karakteristika neurogeneze, a označena je kao programirana ćelijska smrt (26).

Istraživanja Oppenheim-a (16) ukazuju da ukupno smanjenje broja ćelija u nekoj nervnoj

strukturi kod kičmenjaka može da bude 50% pa i više.

Proučavanja ponašanja broja zrnastih ćelija izraženih u vidu numeričke gustine, ukazuje da njihov broj neprekidno raste u toku razvoja i da se tendencija porasta broja ćelija nastavlja i posle rođenja, tačnije sve do kraja prve, a možda i druge godine života, kada se spoljašnji zrnasti sloj kao sekundarni proliferativni centar konačno iscrpljuje. Kao što je već napomenuto, unutrašnji zrnasti sloj, odnosno zrnasti sloj pojavljuje se u 15-toj g.n. (27,28,29) i u toku razvoja, debljina ovog sloja tj. numerička gustina jedara zrnastih ćelija stalno raste u svim ispitivanim delovima kore malog mozga. Porast numeričke gustine jedara zrnastih ćelija u predelu hemisfera je statistički značajan ($p < 0,001$) u svim ispitivanim stadijumima, izuzev između 17,5 i 19,5 g.n. gde razlika u vrednostima numeričke gustine nije statistički značajna. Uočen je i statistički značajan porast numeričke gustine jedara zrnastih ćelija u predelu crva u svim ispitivanim stadijumima ($p < 0,001$), izuzev između 17,5 i 19,5 g.n. i 31 g.n. i novorođenčeta, gde razlika u vrednostima numeričke gustine, iako postoji, nije statistički značajna. Međutim, porast vrednosti numeričke gustine jedara zrnastih ćelija u predelu pahuljice statistički je značajan ($p < 0,001$) u svim ispitivanim stadijumima.

Ako uporedimo vrednosti numeričkih gustina jedara zrnastih ćelija za odgovarajuće stadijume razvoja u predelu kore hemisfera (*neocerebellum*), crva (*paleocerebellum*) i pahuljice (*archicerebellum*) malog mozga uočavamo da su njihove vrednosti različite i da je razlika numeričkih gustina statistički značajna ($p < 0,001$) u svim ispitivanim stadijumima i za sve delove kore malog mozga, sa izuzetkom vrednosti numeričkih gustina u predelu kore hemisfera i crva kod novorođenčeta, gde je statistička značajnost na nivou $p < 0,01$.

Međutim, zbog postojanja spoljašnjeg zrnastog sloja ovi naši rezultati nisu konačni. Pri određivanju konačnog broja zrnastih ćelija u kori malog mozga moraju se uzeti u obzir i gubici prekursora budućih zrnastih ćelija zbog nedostatka faktora koji su potrebni za njihovo preživljavanje i dalje sazrevanje, kao i neadekvatnih sinaptičkih kontakata između paralelnih vlakana i Purkinjeovih ćelija.

Pa i pored navedenih činjenica, broj zrnastih ćelija u toku razvoja neprekidno raste. To se može objasniti činjenicom, da je zrnasta ćelija zrela kada dođe do svog konačnog odredišta i da je sposobna da stvara sinaptičke kontakte sa nadolazećim mahovinastim vlaknima koja pristižu u zrnasti sloj iz brojnih predela centralnog nervnog sistema krajem 16-te g.n. i naročito su brojna u 28. g.n. (30). Izuzetno brojna nadolazeća mahovinasta vlakna u periodu između 21-22. g.n. i 30-31. g.n. stvaraju laminu diskansu (31), a taj period odgovara i enormnom porastu numeričke gustine jedara zrnastih ćelija u ispitivanim delovima kore malog mozga. Iako lamina dissecans nestaje u 30-31. g.n. broj ćelija i dalje raste, najverovatnije zato što zrele zrnaste ćelije koje dolaze u unutrašnji zrnasti sloj čekaju brojna

slobodna mahovinasta vlakna. Ova pretpostavka ima svoje utemeljenje u dokazanoj činjenici da neuron–cilj (mahovinasto vlakno u ovom slučaju) odnos ima ključnu ulogu u određivanju konačnog broja neurona (32). Razlika u vrednosti numeričke gustine jedara zrnastih ćelija u predelu corpus-a cerebelli (hemisfere i vermis) i pahuljice može se objasniti različitim brojem mahovinastih vlakana koja pristižu u te delove kore, kao i brojem Purkinjeovih ćelija.

Naime, u svojim istraživanjima, Zanjani i sar. (33) došli su do zaključka da Purkinjeova

ćelija reguliše roditeljsku populaciju ćelija koje će dati zrnaste ćelije kao i preživljavanje i njihovo sazrevanje.

Zaključak

Imajući u vidu navedene činjenice, možemo da zaključimo da konačni broj zrnastih ćelija zavisi od broja funkcionalno korisnih sinaptičkih kontakata, sa jedne strane, između paralelnih vlakana i Purkinjeovih ćelija, a sa druge između mahovinastih vlakana i zrnastih ćelija.

Literatura

- Gao JH, Parsons LM, Bower JM, Xiong JL, Fox PT. Cerebellum implicated in sensory acquisition and discrimination rather than motor control. *Science* 1996; 272: 545-2.
- Andreasen NC, O'Leary DS, Ciradlo T, Arndt S, Rezaei K, Ponto LL, et al. Schizophrenia and cognitive dysmetria: a positron-emission study of dysfunctional prefrontal-thalamic-cerebellar circuitry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9985-90.
- Gordon N. Speech, language, and the cerebellum. *Eur J Disord Comm* 1996;31:359-67.
- Fauteck JD, Lerch A, Bergmann M, Moller M, Fraschini F, Wittkowski W, Stankov B. The adult human cerebellum is a target of the neuroendocrine system involved in the circadian timing. *Neurosci Lett* 1994;178:60-4.
- Doyon J, Owen AM, Petrides M, Sziklas V, Avans AC. Functional anatomy of visuomotor skill learning in human subjects examined with positron emission tomography. *Eur Neurosci* 1996;8:637-48.
- Batini C, Courastier J, Destobes J, Gioanni H, Everewtt J. The climbing fibers of the cerebellar cortex, their origin and pathway in cat. *Exp Brain Res* 1976;26:407-22.
- Zsang L, Goldman JE. Generation of cerebellar interneurons from dividing progenitors in white matter. *Neuron* 1996; 16:47-54.
- Hallonet ME, Teillet MA, Le Douarin NM. A new approach to the development of the cerebellum provided by the quail-chick marker system. *Development* 1990;108:19-31.
- Adler J, Cho NK, Hatten ME. Embryonic precursor cells from the rhombic lip are specified to a cerebellar granule cell identity. *Neuron* 1996; 17:389-99.
- Komuro H, Rakić P. Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J Neurosci* 1998; 18: 1487-90.
- Komuro H, Yacubova E, Yacubova E, Rakić P. Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci* 2001;21 (2):527-40.
- Fujita M, Kadota T, Sato T. Developmental profiles of synaptophysin in granule cells of rat cerebellum: an immunohistochemical study. *J Electron Microsc* 1996; 45:185-94.
- Kostović I. Razvitak i građa moždane kore. Zagreb; JUMENA; 1979.
- Elias H, Hyde DM. A guide to practical stereology. Basel: Karger; 1983.
- Pajer Z, Kališnik M. The particle number estimation and the depth of focus. *Acta Stereol* 1984;3:19-22.
- Oppenheim RW. Naturally occurring cell death during neuronal development *TINS* 1985;8:487-93.
- Carlson M, Earls F, Todd RD. The importance of regressive changes in the development of the nervous system: towards a neurobiological theory of child development. *Psychiatry Dev* 1988;6:1-22.
- Herschkowitz N. Brain development in the fetus, neonate and infant. *Biol Neonate* 1988;54:1-19.
- Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 1997;277 (5324):372-372.
- Cowan WM, Fawcett JW, O'Leary DM, Stanfield BB. Regressive events in neurogenesis. *Science* 1969; 225:1258-65.
- Hamburger V. Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. *J Comp Neurol* 1975; 160: 535-46.
- Hamano S, Goto N, Nara T. Development of the human motor trigeminal nucleus. *Pediatr Neurosci* 1988; 14:230-5.
- Lossi L, Merighi A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Progress in Neurobiology* 2003; 69:287-12.
- Marin-Teva JL, Dussart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells *Neuron* 2004; 41:535-47.
- Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. Apoptosis and dependence receptor: a molecular basis for cellular addiction. *Physiol Rev* 2004;84:411-30.
- Monti B, Contestabile A. Blockade of the NMDA receptor increases developmental apoptotic elimination of granule neurons and activates caspases in the rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 2000;12(9):3117-23.
- Gudović R, Drinčević D. Stereological analysis of the granular and Purkinje cells during development. I. Vermis. *Verh Anat Gesell* 1990; 171:44.
- Gudović R, Stojišić Lj, Mihić N, Marić D. Ratio of the granule to Purkinje cells in flocculus cerebelli. IV Symposium of stereology in memory of prof. DR. Milan Kecman. Abstract book, Novi Sad. 1998;3.
- Gudović R. Stereological analysis of the granular and Purkinje cells during development. II. Cortex cerebelli. *Verh Anat Gesell* 1991;172:4.
- Yu MC, Cho E, Luo CB, Li WW, Shen WY, Yew DT. Immunohistochemical studies of GABA and parvalbumin in the developing human cerebellum. *Neurosci* 1999;70:267-76.
- Rakić R, Sidman RL. Histogenesis of cortical layers in human cerebellum, particularly the lamina dissecans. *J Comp Neurol* 1970;130:437-500.
- Lohof AM, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Synapse elimination in central nervous system: functional significance and cellular mechanisms. *Rev Neurosci* 1996;7:85-101.
- Zanjani HS, Vogel MW, Delhaye-Bouchaud N, Martinou JC, Mariani J. Increased inferior olivary neuron and cerebellar granule cell number in transgenic mice overexpressing the human Bcl-2 gene. *J Neurobiol* 1997;32:506-12.

STEREOLOGICAL ANALYSIS OF HUMAN CEREBELLAR GRANULE CELLS IN DEVELOPING BRAIN

Radmila Gudovic, Dusica Maric and Nada Mihic

The aim of this investigation was to determine the numerical density of human cerebellar granule cells in three different parts of cerebellar cortex i.e. hemispherium, vermis and flocculus. Stereological analysis of human cerebellar granule cells was performed at various stages of fetal development (15 th to 31 st gestation week) and one brain of a six day-old newborn. The brains were fixed in formalin, embedded in paraffin and cut in frontal plane in 6,15, and 30 μm . The slices were stained with Cresyl-violet. Each fifth slice was analyzed using the light microscope, and numerical density of granule cell nuclei was performed by point counting method using multipurpose test system M42. The total of test fields was counted in each stage. The analysis of the obtained value for the numerical density of the nerve cell nuclei indicates a constant increase during development in all investigate parts of the cerebellar cortex. *Acta Medica Medianae 2005;45(1):47-51.*

Key words: *human, cerebellum, granule cell, development, stereology*