

УДК 611.81.013:611.811.013

## РАЗВИТИЕ ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ КОРЫ ПОЛУШАРИЙ КОНЕЧНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ВО ВТОРОМ ТРИМЕСТРЕ ГЕСТАЦИИ

© 2010 г. Е. И. Краснощекова<sup>1</sup>, П. А. Зыкин<sup>1</sup>, Л. А. Ткаченко<sup>1</sup>, Т. Ю. Смолина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет

<sup>2</sup>Перинатальное отделение городского патологоанатомического бюро Санкт-Петербурга

Поступила в редакцию 05.08.2009 г.

Пренатальный онтогенез коры полушарий конечного мозга человека характеризуется особенностями, которые делают ее организацию уникальной. По этой причине результаты модельных экспериментов по развитию мозга животных не могут быть экстраполированы на морфогенез коры в течение среднего и позднего периодов гестации у человека. Настоящее исследование, посвященное изучению особенностей развития пирамидных нейронов коры полушарий конечного мозга человека, выполнено на мозге восьми плодов 16–26 гестационных недель. Иммуногистохимическое маркирование нейронов проведено с использованием антител к структурному белку микротрубочек *MAP2*. Начало экспрессии этого белка соответствует началу дендрогенеза, а приуроченность *MAP2* к соме и дендритам позволяет определить морфотип нейронов и их локализацию в определенном слое коры. Показано, что иммунопозитивные пирамидные нейроны появляются в слое *eV* корковой пластинки уже на 18 неделе гестации. К 25 гестационной неделе в корковой пластинке выявляются две различные популяции пирамидных нейронов: в слое *eV* и позже развивающемся слое *eIII*. В соответствии с известным фактом повышенной уязвимости дифференцирующихся нейронов, по сравнению с нейробластами и зрелыми клетками, результаты исследования дают возможность предполагать, что критические периоды развития для популяций кортикофугальных и кортикокортикальных пирамидных клеток приходятся на разные этапы второго триместра гестации.

*Ключевые слова:* неокортекс, пренатальный онтогенез, иммуногистохимия, структурный белок микротрубочек *MAP2*, критический период развития.

Решение одного из фундаментальных вопросов нейробиологии – ранней предуготовленности мозга человека к биосоциальным воздействиям, предполагает изучение механизмов нейрогенеза и патогенеза неокортекса в пренатальный период. Проблема формирования мозга в онтогенезе – одна из приоритетных в медицине и биологии. Большое число клинических наблюдений и экспериментальных исследований на животных свидетельствуют о том, что воздействия неблагоприятных факторов среды в определенные периоды пренатального формирования мозга и его функций (критические периоды) оставляют длительный след, создают основу для развития многообразных нервно-психических изменений, проявляющихся после рождения по мере взросления особи [1]. Среди недоношенных новорожденных дефекты мозга составляют подавляющую часть органических поражений, что свидетельствует о влиянии патологических факторов на мозг в течение беременности и/или постнатально, когда условия морфогенеза, в связи с преждевременным рождением, становятся отличными от внутриутробных, сопутствующих развитию мозга при нормально протекающей беременности [2].

Эмбриональное развитие коры полушарий конечного мозга происходит сложно, в нем выделяют несколько этапов. Начальным этапом становления коры является процесс формирования препластинки или примордиального плексиформного слоя [3, 4]. На 7–8 постовульационной неделе у человека нейробласты корковой пластинки расщепляют препластинку на маргинальную зону и субпластинку. В дальнейшем маргинальная зона образует слой I дефинитивной коры, последовательные волны миграции нейробластов образуют закладку слоев корковой пластинки по принципу “изнутри-наружу”, субпластинка в той или иной степени элиминируется и присутствует, главным образом, в развивающемся мозге млекопитающих [5, 6].

В наших ранее выполненных исследованиях были выявлены определенные закономерности развития корковой пластинки и субпластинки в височной и постцентральной областях коры мозга человека в течение второго – третьего триместров гестации. Для объективной оценки онтогенетических преобразований неокортекса был разработан количественный критерий дифференцировки субпластинки в его составе, а именно – положительно коррелирующие показатели снижения клеточной плотности

наружной каймы корковой пластинки (слоя eII) и верхней зоны субпластинки ( $sp_u$ ). Полученные результаты позволили выдвинуть предположение о том, что дифференцировка нейронов слоев V–VI, организующих кортикоспинальные, кортикотектальные, кортикобульбарные, кортикоталамические связи (далее в статье эфферентный комплекс коры), происходит в присутствии субпластинки и незначительно зависит от ее состояния. Слой II–IV, основная составляющая ассоциативного комплекса коры, нейроны которого организуют кортико-кортикальные (внутрикорковые, внутри- и межполушарные) связи, начинают дифференцироваться усиленным темпом только после начала элиминации нейронов субпластинки в конце второго триместра гестации [7].

Базовые типы корковых нейронов происходят из разных герминативных зон: проекционные пирамидные из вентрикулярной, субвентрикулярной паллиальной области, а часть интернейронов, кроме того, из ганглионарных бугорков субпаллиальной области [8]. В последние два десятилетия классификацию корковых нейронов успешно осуществляют с помощью молекулярных маркеров, которые позволяют не только выделять определенные морфотипы клеток, но и получать сведения об их функциональных особенностях. У грызунов выделены экспрессионные факторы, которые определяют постмитотическую и постмиграционную специализацию пирамидных нейронов. Так синтез *Sox5* характерен для всей совокупности кортикофугальных нейронов, а *Satb2* маркирует пирамидные клетки слоев II–IV, которые образуют кортико-кортикальные внутри- и межполушарные ассоциативные связи [9]. У мышей, ноль-мутантных по *Satb2*, пирамидные нейроны этих слоев посылают свои аксоны субкортикально через внутреннюю капсулу, то есть специализируются как кортикофугальные клетки [10]. У грызунов клетки, инициирующие кортико-кортикальные связи, не имеют строгой приуроченности к верхнему этажу коры и в слое V образуют смешанную с кортикофугальными нейронами популяцию. Вместе с тем по синтезу отдельных транскрипционных факторов в этом морфологически едином слое можно выделить кортико-кортикальные пирамидные клетки, экспрессирующие *Lmo4*, и кортикоспинальные, экспрессирующие *Clim1* [11]. Таким образом, результаты молекулярно-биологических исследований свидетельствуют о том, что морфологически единая популяция пирамидных клеток, в соответствии с функциональной специализацией, неоднородна по экспрессии генов и, соответственно, по синтезируемым белкам, очередность постмитотической и постмиграционной дифференцировки этих нейронов также детерминирована [12].

Молекулярные механизмы, контролирующие этапы нейрогенеза коры в пренатальном периоде у человека, по понятным причинам изучить в полном объеме не представляется возможным. В то же время

знание последовательности созревания функционально специализированных нейронов очень важно для формирования представлений об очередности критических периодов развития и о механизмах патогенеза. В процессе нейрогенеза некоторые из белков синтезируются только нейронами (но не нейробластами и глиальными клетками), в их числе – белок *MAP2*. Структурные белки, ассоциированные с микротрубочками, или *MAP* (*microtubule associated proteins*), относятся к фибриллярным белкам, которые обратимо связываются с микротрубочками, способствуя их полимеризации. Белок *MAP2* обнаружен в нейронах, в то время как *MAP4* встречается во многих иных клетках [13]. Синтез *MAP2* сопутствует началу дендрогенеза и знаменует собой процесс включения клетки в нейронные сети. Ранняя экспрессия, а также приуроченность этого белка к соме и дендритам делает его уникальным маркером развивающихся нейронов [14].

Принимая во внимание важное значение структурных признаков, характеризующих последовательные этапы кортикогенеза, целью настоящей работы явилось иммуногистохимическое, с применением антител к *MAP2*, изучение особенностей развития пирамидных нейронов в составе ассоциативного (инициирующего кортико-кортикальные связи) и эфферентного (инициирующего кортикофугальные связи) комплексов коры полушарий конечного мозга человека в течение второго триместра гестации.

## МЕТОДИКА

Материалом исследования явились фронтальные срезы левого и правого полушарий мозга восьми плодов человека обоих полов в возрасте 16–26 недель гестации. При идентификации области исследования руководствовались цитоархитектоническими картами Г.И. Полякова для мозга плодов второго триместра гестации [3]. Исследовался мозг плодов, которые по заключению патологоанатома не имели неврологической патологии. Анатомическое строение коры полушарий каждого мозга, с целью идентификации борозд, извилин, границ областей, сопоставляли с имеющимися в литературе сведениями об этом для соответствующего гестационного срока [15, 16].

Мозг фиксировали в 4% растворе параформальдегида на 0.1M фосфатном буфере, pH 7.4. Выделенные блоки коры заливали в парафин, полученные срезы, толщиной 12 мкм, окрашивали крезильным фиолетовым по Нисслю, флуоресцентным красителем *DAPI* для клеточных ядер.

Имуногистохимическую идентификацию нейронов проводили с использованием антител к структурному белку микротрубочек *MAP2*. Использовали первичные моноклональные антитела мыши производства “Sigma”, клон *HM2*, вторичные антитела ло-

шади против иммуноглобулина мыши (легкая и тяжелая цепь), конъюгированные с флуоресцином (FITC) производства “Vector Labs”. Для снижения автофлуоресценции препаратов была проведена адаптация стандартного метода исследования, которая заключалась в предварительной обработке депарафинированных срезов 1% раствором хлорного железа. Далее препараты обрабатывали по стандартному протоколу и исследовали на конфокальном микроскопе Leica TCS SPE. *MAP2* и *DAPI* обладают разными спектрами испускания и поглощения света, поэтому использование лазеров с разной длиной излучаемой волны позволило отдельно регистрировать эти флуорохромы: синюю окраску ядер *DAPI* и зеленые *MAP2*-позитивные нейроны.

На оцифрованных изображениях, используя программы Морфо-тест и ImageJ, измеряли толщину коры, слоев и площади профильных полей *MAP2*-позитивных нейронов. По этому показателю выделяли размерные классы нейронов и подсчитывали количество клеток каждого класса в составе слоя. При статистической обработке результатов использовали критерий Стьюдента. Оценка значимости достоверных различий определялась при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Особенности кортикогенеза изучали в коре пред-, постцентральной и задней височной областей коры полушарий мозга плодов человека 16–26 недель гестации. Выбор этих областей для изучения динамики развития пирамидных нейронов корковой пластинки определялся тем, что в нашей ранее выполненной работе именно здесь к середине второго триместра гестации были обнаружены *MAP2*-позитивные клетки [17]. Далее детальная последовательность нейрогенеза излагается на примере развития коры пред- и постцентральной областей. На протяжении второго триместра пренатальное становление неокортекса характеризуется выраженной зональной гетерохронией, при этом пред- и постцентральные извилины находятся в одной зоне, развиваясь синхронно [3]. Анатомически данная область коры характеризуется тем, что уже к 16 неделе в ней достаточно четко намечены закладки борозд (центральной, пред- и постцентральных), которые отграничивают ее от соседних корковых территорий.

При анализе препаратов мозга 16–17-недельных плодов, окрашенных по методу Ниссля, обнаружено, что кора исследованной области цитоархитектонически разделяется на маргинальную зону (слой *eI*), корковую пластинку (*cp*) и субпластинку (*sp*). Корковая пластинка в этом возрасте не имеет ламинарной организации. Формации препластинки удается выделить по признаку более высокой плотности клеточности верхней зоны субпластинки (*sp<sub>u</sub>*) и сниженной клеточной плотности маргинальной зоны. Ширина коры пред- и постцентральной изви-

лин изменялась от  $510 \pm 12$  мкм в вентральной их части до  $545 \pm 22$  мкм в дорзальной.

Препараты, окрашенные *DAPI*, демонстрируют сходные с цитоархитектоническими характеристиками коры, то есть на них также возможно выделение маргинальной зоны, корковой пластинки и субпластинки, которые различаются по плотности клеточных ядер.

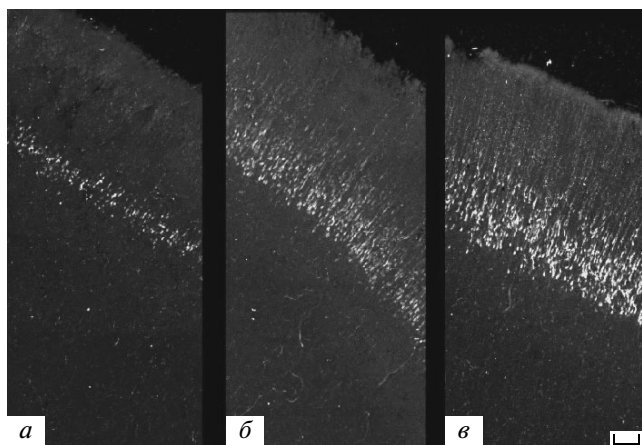
Иммуноцитохимическая обработка препаратов мозга 16-недельных плодов показала отсутствие *MAP2*-позитивных нейронов в корковой пластинке изученных областей коры. Такие нейроны отмечены только в формациях препластинки: клетки Кахаля-Ретциуса в маргинальной зоне и интерстициальные нейроны в субпластинке.

Начиная с 18 недели, наблюдали усложнение структуры коры благодаря стратификации корковой пластинки: маргинальная зона (слой *eI*) по-прежнему четко отделена от формаций корковой пластинки и отличается сравнительной редкостночностью; слой *eII* (наружный край корковой пластинки) дифференцируется четко благодаря очень высокой плотности клеток; середину поперечника корковой пластинки образует самый широкий в этот период онтогенеза единый слой *eIII–eV*, который, по сравнению с выше- и нижележащими слоями, характеризуется небольшим повышением плотности клеток; слой *eVI* менее густоклеточен по сравнению с этим недифференцированным слоем; субпластинку можно отграничить от слоя *eVI* благодаря сравнительно высокой плотности клеток в ее верхней зоне *sp<sub>u</sub>*. Ширина коры изученных областей составляет от  $950 \pm 14$  мкм в вентральной части до  $1100 \pm 31$  мкм в дорзальной.

Анализ препаратов, окрашенных *DAPI*, показал такую же, как при окраске по Ниссля, закономерность в чередовании слоев, которые можно выделить по более или менее густому скоплению клеточных ядер.

Иммуногистохимическое исследование показало, что на этом сроке в средней части поперечника корковой пластинки появляются *MAP2*-позитивные нейроны, которые по морфологическим признакам можно отнести к пирамидным. В период с 18 по 20 недели иммунопозитивные нейроны характеризуются вытянутой округло-треугольной формой тела, коротким, извитым неветвящимся апикальным дендритом, при этом клетки располагаются компактно, образуя в нижней части единого недифференцированного слоя *eIII–eV* пласт толщиной около 194 мкм (рис. 1, а).

Начиная с 21 недели, происходит заметное увеличение количества *MAP2*-позитивных нейронов и расширение зоны поперечника, которую они занимают в корковой пластинке, до 249.3 мкм. Все иммунопозитивные клетки являются пирамидными, их апикальные дендриты удается проследить вплоть до середины слоя *eIII–eV* (рис. 1, б). При этом наблю-



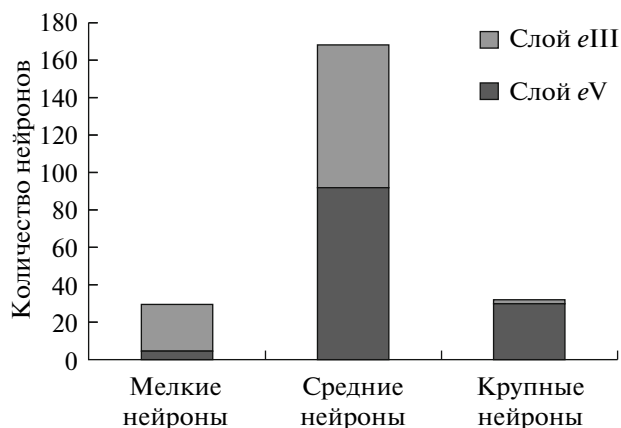
**Рис. 1.** Локализация *MAP2*-позитивных нейронов в коре прецентральной извилины мозга человека не разных сроках гестации. *a* – 18 недель; *б* – 22 недели; *в* – 25 недель. Масштабная линейка = 100 мкм.

дается дифференцировка нейронов по размеру профильного поля, благодаря чему их можно разделить на мелкие (45–90 мкм<sup>2</sup>), средние (91–190 мкм<sup>2</sup>) и крупные (191–380 мкм<sup>2</sup>). Анализ локализации и количества нейронов, относящихся к каждому из трех размерных классов, показал, что средние и мелкие равномерно распределены по поперечнику зоны иммунопозитивных клеток, а крупные приурочены только к ее внутренней части (рис. 2).

К концу второго триместра (на 25–26 неделе) поперечник зоны *MAP2*-позитивных нейронов в пределах корковой пластинки расширяется до 437.8 мкм, при этом можно наблюдать его отчетливое разделение на два уровня. Нижний уровень формируют средние, крупные, очень небольшое количество мелких нейронов, а верхний – средние и мелкие пирамидные клетки. Причем число крупных пирамид, которые локализованы только на нижнем уровне, заметно возрастает по сравнению с более ранними сроками (рис. 2). Эти два уровня иммунопозитивных клеток разделены промежутком со сниженной плотностью таких нейронов (рис. 1, в).

Параллельное исследование препаратов, окрашенных по Нисслю, указывает на то, что к концу второго триместра в пределах единого слоя *eIII–eV* корковой пластинки появляется сравнительно плотноклеточный слой. Этот слой, обозначенный как *eIV*, позволил выделить слой *eV* – ниже и слой *eIII* – выше его. Общая ширина коры на этом сроке в дорзальной части пред- и постцентральной извилин достигает  $1750 \pm 20$  мкм.

Применение двух флуоресцентных красителей позволяет исследовать отдельно распределение *MAP2*-позитивных нейронов (зеленое свечение) и цитоархитектонику того же участка коры по плотности расположения окрашенных *DAPI* ядер (синее свечение). Последующее совмещение таких изобра-



**Рис. 2.** Количество *MAP2*-позитивных нейронов трех размерных классов в слоях *eIII* и *eV* постцентральной извилины мозга 25-недельного плода.

жений позволяет локализовать *MAP2*-позитивные клетки в пределах определенного цитоархитектонического слоя. Установлено, что крупные иммунопозитивные пирамидные нейроны располагаются в слое *eV*, а мелкие – в слое *eIII*. Слой *eIV*, который можно идентифицировать по высокой плотности ядер, содержит лишь единичные *MAP2*-позитивные нейроны (рис. 3, *a, б*). К концу второго триместра иммунопозитивные клетки характеризуются появлением базальных дендритов, апикальные дендриты прослеживаются до слоя *eII*, иногда удается наблюдать их короткие боковые ветви (рис. 1, в; рис. 3, в, г).

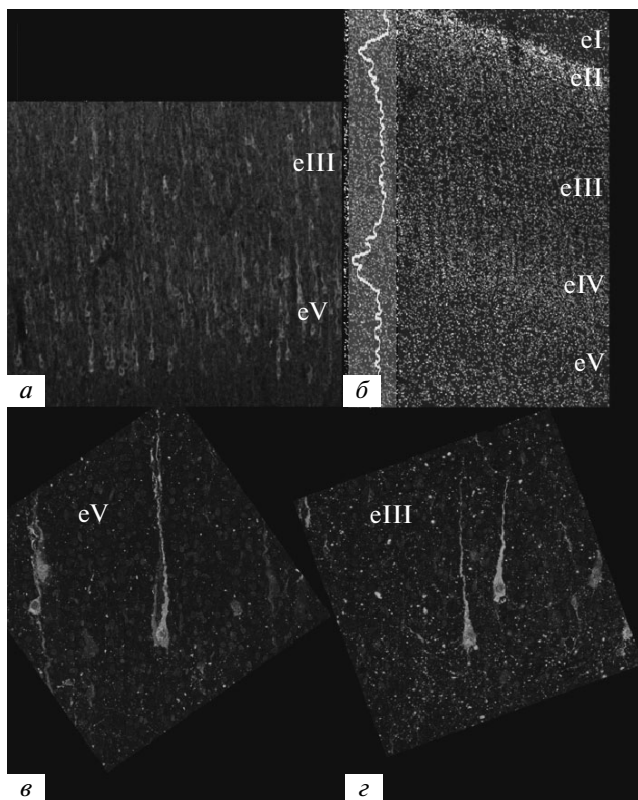
Таким образом, к концу второго триместра гестации в коре пред- и постцентральной извилин можно выделить слои препластинки (*eI* и субпластинку) и корковой пластинки (*eII, eIII, eIV, eV, eVI*).

Такая же очередность дифференцировки слоев *MAP2*-позитивных нейронов в течение второго триместра характерна и для задней височной области.

Судя по количеству и послойному распределению иммунопозитивных клеток, предцентральная, постцентральная и задняя височная области в течение второго триместра развиваются гетерохронно: в дорзальных отделах этих областей иммунопозитивные клетки как слоя *eV*, так и слоя *eIII* появляются раньше, чем в вентральных. Такое гетерохронное развитие не только слоев, но и отдельных корковых территорий, определяемое по распределению и численности *MAP2*-позитивных нейронов, хорошо прослеживается при реконструкции фронтальных срезов анатомической области (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящее исследование, целью которого явилось изучение особенностей развития пирамидных нейронов в течение второго триместра гестации, выполнено иммуногистохимическим методом с при-

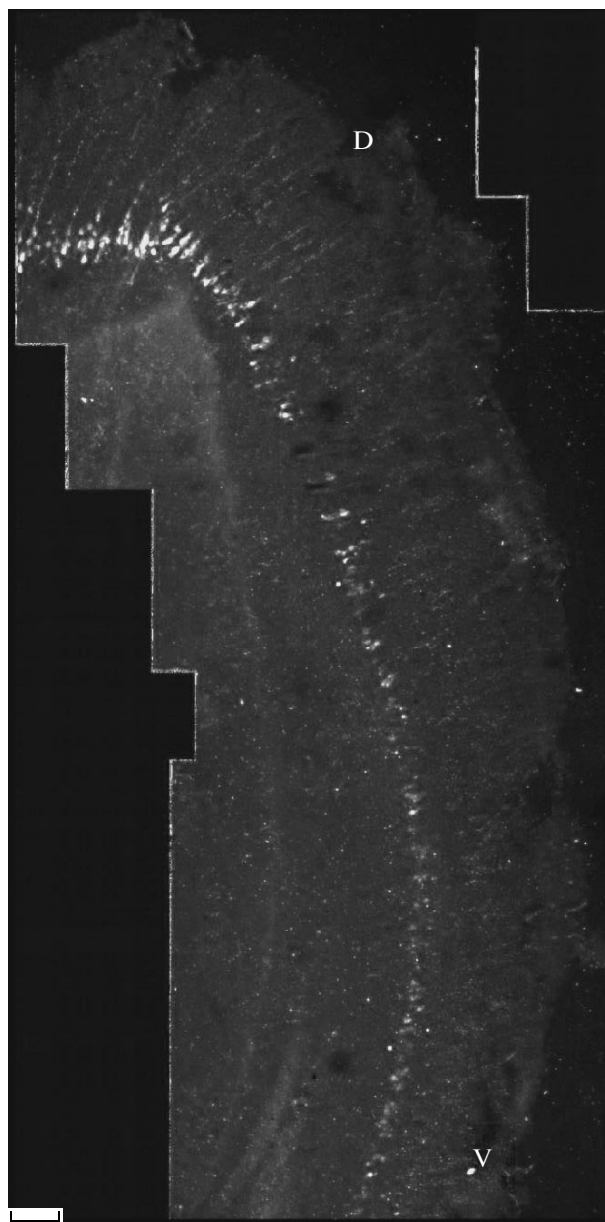


**Рис. 3.** Кора постцентральной извилины мозга 25-недельного плода.

*a* – *MAP2*-позитивные нейроны в слоях *eIII* и *eV*; *б* – цитоархитектоника коры на фронтальном срезе, окраска *DAPI*, слева – график плотности клеточных ядер в слоях; *в* – пирамидные нейроны слоя *eV*; *г* – пирамидные нейроны слоя *eIII*.

менением антител к белку *MAP2*. Данный белок регулирует стабилизацию микротрубочек, играет важную роль в формировании специфического рисунка дендритного дерева, что позволяет определять морфотип клеток уже на ранних стадиях нейрогенеза [18, 19]. Результаты настоящего исследования указывают на то, что первые *MAP2*-позитивные пирамидные нейроны появляются в корковой пластинке на 18 неделе гестации. Появление таких клеток происходит на фоне первичного расслоения корковой пластинки. Далее, вплоть до окончания второго триместра, в пред-, постцентральной и задней височной областях наблюдается постепенное увеличение количества *MAP2*-позитивных нейронов, при этом более крупные клетки входят в состав слоя *eV*, а мелкие – в слой *eIII*. Цитоархитектонически эти слои удается выделить благодаря появлению плотноклеточного слоя *eIV*, в котором иммунопозитивные клетки единичны.

Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные свидетельствуют о том, что процессы специализации и дифференцировки нейронов коры мозга млекопитающих начинаются по окончании процессов миграции, после того как



**Рис. 4.** Распределение *MAP2*-позитивных нейронов в коре задней височной области 23-недельного плода. Реконструкция серии фронтальных срезов. Масштабная линейка = 200 мкм. *D* – дорзальный полюс, *V* – вентральный полюс височной области.

нейробласты займут место в соответствующем цитоархитектоническом слое. Молекулярно-биологические исследования показывают, что этот процесс регулируется несколькими экспрессионными факторами и у животных, ноль-мутантных по каждому из них, избирательно нарушаются процессы аксо- или дендрогенеза нейронов определенного слоя [12, 20]. В свете этих данных, которые раскрывают общие закономерности онтогенеза неокортекса, полученные нами результаты о трех размерных классах *MAP2*-позитивных нейронов эмбриональной коры

человека, их приуроченности к определенным слоям корковой пластинки можно интерпретировать как свидетельство гетерохронной дифференцировки функционально специализированных пирамидных клеток: сначала кортикофугальных слоя *eV*, позже кортико-кортикальных слоя *eIII*. Полученные данные о ранней дифференцировке пирамидных нейронов находят подтверждение в результатах экспериментального исследования, согласно которым нейроны корковой пластинки из переживающих срезов коры мозга 18–22-недельных плодов человека генерируют потенциалы действия [21].

Как известно, в ходе онтогенеза нейроны, вставшие на путь дифференцировки, повышено уязвимы, по сравнению с нейробластами и зрелыми клетками [22]. Исследования последних лет раскрыли биохимические механизмы высокой уязвимости нейронов на этапе дифференцировки и их апоптоза в случае гипоксически-ишемических воздействий [23]. Данные о гетерохронной дифференцировке кортикофугальных и кортико-кортикальных пирамидных нейронов указывают на то, что критические периоды развития приходятся для этих клеток на разные этапы второго триместра. С учетом этих результатов можно предположить, что в зависимости от временного совпадения критического периода развития определенной популяции клеток и неблагоприятного периода беременности, патологический процесс затронет разные системы мозга и избирательно повлияет на организацию проводящих трактов. В частности, разнообразные агенезии мозолистого тела у новорожденных [24] могут быть следствием избирательной гибели кортико-кортикальных нейронов из-за воздействия антенатальных повреждающих факторов в определенный период гестации или преждевременного рождения. Такое предположение не противоречиво в аспекте строгой топической упорядоченности кортико-кортикальных связей, проходящих в составе мозолистого тела [25, 26].

## ВЫВОДЫ

1. Начиная с 18-й недели гестации, в корковой пластинке прецентральной, постцентральной и задней височной областей коры появляются первые *MAP2*-позитивные пирамидные нейроны.

2. Начиная с 21-й недели гестации, *MAP2*-позитивные пирамидные нейроны дифференцируются по размеру профильного поля на три размерных класса: крупные, средние и мелкие.

3. К концу второго триместра гестации *MAP2*-позитивные пирамидные нейроны входят в состав двух слоев – *eIII* и *eV*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ордян Н.Э.* Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. СПб.: Деятка, 2007. 236 с.
2. *Пальчик А.Б., Шабалов Н.П.* Гипоксически-ишемическая энцефалопатия новорожденных. М.: МЕДпресс-информ, 2006. 253 с.
3. *Поляков Г.И.* Ранний и средний онтогенез коры большого мозга человека. М., 1937. 57 с.
4. *Sidman R., Rakic P.* Development of the human central nervous system // *Histology and histopathology of the nervous system* / Eds. Haymaker W., Adams R.D. Springfield, IL, 1982. P. 3.
5. *Shatz C.J., Chun J.J.M., Luskin M.B.* The role of the subplate in the development of the mammalian telencephalon // *Cerebral Cortex*. 1988. V. 7. P. 35.
6. *Kostovic I., Rakic P.* Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain // *J. Comp. Neurol.* 1990. V. 297. № 3. P. 441.
7. *Краснощеклова Е.И., Федосеева К.Н., Самарина А.С., Смолина Т.Ю.* Пренатальный онтогенез височной области коры мозга человека // *Рос. физиол. журн.* 2007. № 7. С. 762.
8. *Molnar Z., Metin C., Stoykova A., et al.* Comparative aspects of cerebral cortical development // *Eur. J. Neurosci.* 2006. V. 23. P. 921.
9. *Fishell G., Hanashima C.* Pyramidal neurons grow up and change their mind // *Neuron*. 2008. V. 57. P. 333.
10. *Alcamo E.A., Chirivella L., Dautzenberg M. et al.* Satb2 regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex // *Neuron*. 2008. V. 57. P. 364.
11. *Azim E., Shnyder S.J., Cederquist G.Y. et al.* Lmo4 and Clim1 progressively delineate cortical projection neuron subtypes during development // *Cerebral Cortex*. 2009. V. 19. P. 62.
12. *Merot Y., Retaux S., Tsen Heng J.* Molecular mechanisms of projection neuron production and maturation in the developing cerebral cortex // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2009. V. 20. P. 726.
13. *Минин А.А., Кулик А.В.* Внутриклеточный транспорт. Принципы регуляции // *Успехи биологической химии*. 2004. Т. 44. С. 225.
14. *Lyck L., Dalmau I., Chemnitz J. et al.* Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex // *J. Histochem. & Cytochem.* 2008. V. 56. № 3. P. 201.
15. *Chi J.G., Dooling E.C., Gilles F.H.* Gyral development of the human brain // *Ann. Neurol.* 1977. V. 1. P. 86.
16. *Bayer S.A., Altman J.* Atlas of human central nervous system development: The human brain during the second trimester. Boca Raton, FL, CRC Press, 2005. 369 p.
17. *Зыкин П.А., Краснощеклова Е.И., Федосеева К.Н. и др.* Особенности развития коры полушарий конечного мозга человека в течение 16–20 недель гестации (гистологическое, иммуногистохимическое исследование) // *Вестник СПбГУ*. 2009. Сер. 3. Вып. 2. С. 81.
18. *Sanchez C., Diaz-Nido J., Avila J.* Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its rele-

- vance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function // *Progress in Neurobiology*. 2001. V. 61. P. 133.
19. *Lingwood B., Healy G., Sullivan S. et al.* MAP2 provides reliable early assessment of neural injury in the newborn piglet model of birth asphyxia // *J. Neurosci. Methods*. 2008. V. 171. P. 140.
  20. *Barnes A.P., Lilley B.N., Pan Y.A. et al.* LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons // *Cell*. 2007. V. 129. P. 549.
  21. *Moore A.R., Filipovic R., Mo Z. et al.* Electrical excitability of early neurons in the human cerebral cortex during the second trimester of gestation // *Cerebral Cortex*. 2009. V. 19. № 8. P. 1795.
  22. *Жаботинский Ю.М.* Нормальная и патологическая морфология нейрона. Л., 1965. 165 с.
  23. *Blomgren K., Hagberg H.* Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain // *Free Radical Biology & Medicine*. 2006. № 40. P. 388.
  24. *Paul L.K., Brown W.S., Adolphs R. et al.* Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity // *Nature Reviews Neuroscience*. 2007. V. 8. P. 287.
  25. *Hofer S., Frahm J.* Topography of the human corpus callosum revisited—Comprehensive fiber tractography using diffusion tensor magnetic resonance imaging // *NeuroImage*. 2006. V. 32. P. 989.
  26. *Park H.-J., Kim J.J., Lee S.-K. et al.* Corpus callosal connection mapping using cortical gray matter parcellation and DT-MRI // *Human Brain Mapping*. 2008. V. 29. P. 503.

## Features of Human Cortical Pyramidal Neurons Development during Second Gestational Trimester

**E. I. Krasnoshchekova, P. A. Zykin, L. A. Tkachenko, T. Yu. Smolina**

Prenatal ontogeny of human neocortex have distinctive features that make it unique. Experimental data obtained on animal models could not be easily extrapolated on human corticogenesis of middle and late gestational period. Our research was aimed at features of human cortical pyramidal neurons development within 16–26 gestational weeks. Material was obtained during legal autopsies. Neurons were marked using indirect immunofluorescence with primary antibodies against phosphorylated and dephosphorylated microtubule associated protein MAP2. Expression of this protein marks the beginning of dendrogenesis. Morphotype and position of neuron within embryonic cortical layers could be easily identified due to abundance of MAP2 in neuron body and dendrites. It was shown, that MAP2 positive neurons are identifiable in embryonic cortical layer eV as early as 18th gestational week. At 25th gestational week two populations of pyramidal neurons are apparent inside cortical plate. In addition to layer eV neurons that have had differentiated earlier, layer eIII neurons appears. According to fact that differentiating neurons are more vulnerable to damaging factors than neuroblasts and mature neurons, our results suggest that critical periods for cortico-cortical and corticofugal populations of pyramidal cells occurs at different stages of second gestational trimester.

*Key words:* neocortex, prenatal ontogeny, immunohistochemistry, MAP2 protein, critical period of prenatal development.