

© Коллектив авторов, 2012
УДК 616.831.33

М. С. Попова, В. А. Аниол, Н. А. Лазарева, М. Ю. Степаничев и Н. В. Гуляева

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПОЛЯХ ГИППОКАМПА КРЫС В ХОДЕ РАЗВИТИЯ ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОВОГО КИНДЛИНГА

Лаборатория функциональной биохимии нервной системы (зав. — проф. Н. В. Гуляева),
ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии» РАН, Москва

Развитие пентилентетразолового киндлинга сопровождается дегенерацией и гибелью нейронов в различных полях гиппокампа. Тем не менее, данные о развитии нейродегенеративных процессов в зубчатой извилине (ЗИ) остаются противоречивыми. В нашем исследовании, проведенном на 20 самцах крыс Вистар, было установлено, что выраженность процессов гибели нейронов неодинакова в различных отделах ЗИ. К моменту окончания выработки пентилентетразолового киндлинга в области верхней и нижней ветви ЗИ присутствовали дегенерирующие клетки, но число нейронов не снижалось, тогда как в области угла ЗИ снижение числа нейронов наблюдалось уже начиная с ранних этапов развития киндлинга. Это дает основания предположить наличие функциональной неоднородности популяции гранулярных нейронов по их чувствительности к повреждающему действию судорог.

Ключевые слова: гиппокамп, зубчатая извилина, пентилентетразол, киндлинг, гибель нейронов

Одним из наиболее распространенных морфологических последствий хронической судорожной активности, как в клинике, так и в эксперименте, является дегенерация и гибель нейронов в очаге гипервозбуждения. Для моделирования хронической судорожной активности используют феномен киндлинга, заключающийся в том, что изначально нормальная нервная сеть под воздействием повторяющихся подпороговых конвульсивных стимулов реорганизуется и приобретает повышенную судорожную готовность. Одним из наиболее часто используемых конвульсантов для выработки киндлинга является блокатор ГАМК_A-рецепторов — пентилентетразол (ПТЗ). Сформированный пентилентетразоловый киндлинг (ПТЗК) характеризуется отчетливо выраженным конвульсивным ответом животного на введение подпороговой, изначально неконвульсивной, дозы ПТЗ.

Повторяющаяся судорожная активность при ПТЗК сопровождается избыточной активацией нейронов в некоторых областях мозга, преимущественно в гиппокампе, что может приводить к перегрузке их ионами Ca²⁺ и последующей гибели. В ряде работ было показано, что ПТЗК сопровождается дегенерацией нейронов и снижением плотности расположения нейронов в полях CA1 [7] и CA3 гиппокампа [6, 14], а также в поле CA4

[10]. Тем не менее, данные о развитии нейродегенеративных процессов в зубчатой извилине (ЗИ), являющейся основным афферентным входом в гиппокамп, остаются противоречивыми. Так, Н. Franke и Н. Kittner [4] описывали дистрофические изменения нейронов и снижение плотности их расположения в ЗИ после ПТЗК. Эти наблюдения позднее были подтверждены Т. В. Павловой и соавт. [2]. Однако в других исследованиях не было обнаружено снижения этого показателя [6].

Целью настоящей работы было изучение нейродегенеративных изменений в гиппокампе на разных стадиях развития ПТЗК.

Материал и методы. В работе было использовано 20 самцов крыс линии Вистар (питомник «Столбовая» РАН, Московская область) в возрасте 2 мес средней массой 200 г в начале эксперимента. Животных содержали по 5 особей в пластмассовых клетках в условиях вивария при комнатной температуре и свободном доступе к воде и пище. В виварии поддерживали искусственный световой режим (день 8.00 – 20.00). Проведение экспериментов было согласовано с этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. В ходе работы были приложены все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных.

Для того, чтобы оценить изменения в мозгу животных на разных стадиях развития ПТЗК, были сформированы 5 групп: контрольная и 4 экспериментальные группы. Животным экспериментальных групп внутривенно вводили ПТЗ (Sigma, США) в дозе 37,5 мг/кг массы тела 1, 3, 5 и 13 раз (n=4

Сведения об авторах:

Попова Мария Сергеевна (e-mail: maxych@rambler.ru), *Аниол Виктор Александрович* (e-mail: aniviktor@narod.ru),
Лазарева Наталья Александровна (e-mail: nalaza@rambler.ru), *Степаничев Михаил Юрьевич* (e-mail: mikhail_stepanichev@yahoo.com),
Гуляева Наталья Валерьевна (e-mail: nata_gul@yahoo.com), лаборатория функциональной биохимии нервной системы,
ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии» РАН, 117485 Москва, ул. Бутлерова, 5а

в каждой группе). ПТЗ растворяли в изотоническом растворе NaCl из расчета 1 мл/кг. Контрольным животным внутрибрюшинно вводили изотонический раствор в эквивалентном объеме. Введение ПТЗ осуществляли 3 раза в неделю в одно и то же время (11.00). Судорожную активность животных оценивали согласно рекомендациям Н. Franke и Н. Kittner [4] в течение 20 мин после введения ПТЗ (0 — отсутствие реакции; 1 — лицевые автоматизмы, подергивание ушей и вибрисс; 2 — конвульсивные волны, распространяющиеся вдоль оси туловища; 3 — миоклонические судороги со вставанием; 4 — генерализованные клонико-клонические судороги с потерей позы).

Через 1 сут после последнего введения ПТЗ животных анестезировали хлоралгидратом и производили интракардиальную перфузию фиксатором, содержащим этанол, формалин, ледяную уксусную кислоту в соотношении 7:2:1, после чего извлекали головной мозг и дофиксировали его в том же фиксаторе в течение 2 ч. Мозг хранили в 70% этаноле до использования, затем дегидратировали и заливали в парафин. Из парафиновых блоков готовили фронтальные срезы толщиной 10 мкм на всем протяжении гиппокампа и наклеивали их на стекла Superfrost/Plus (Fisher Scientific, США). Для определения плотности расположения нейронов в гиппокампе брали серийные срезы с интервалом 250 мкм и окрашивали 0,1% крезильным фиолетовым (Merck, Германия). Другую серию срезов, также взятых с интервалом 250 мкм, окрашивали ванадиевокислым фуксином по методу I. V. Viktorov и соавт. [13] и дополнительно докрашивали толуидиновым синим.

Анализ проводили отдельно для переднего и заднего отдела гиппокампа, для чего брали по 4 среза, сделанных на уровне переднего гиппокампа (–2,8 ... –4,3 мм от брегмы), и по 2 среза заднего отдела гиппокампа (–4,3 ... –4,8 мм от брегмы). Области интереса фотографировали при помощи камеры Camedia C-4000, соединенной с микроскопом Olympus CX-41 (Olympus, Япония). Число нейронов подсчитывали с использованием программного пакета Image Pro Plus (Media Cybernetics, США) в поле CA1 на участке длиной 450 мкм (об. 20, ок. 10), в поле CA2/CA3 в рамке 450×350 мкм (об. 20, ок. 10), в поле CA4 — полностью (об. 20, ок. 10), в ЗИ — в трех случайно выбранных полях длиной 300 мкм (об. 40, ок. 10), расположенных в верхней и нижней ветвях ЗИ и в области ее угла, как было описано ранее [11]. Затем усредняли данные, полученные для правого и левого полушария, и данные по всем срезам для каждого животного.

Число поврежденных нейронов с гиперхромной цитоплазмой, ацидофилией ядра, сопровождающейся размыванием его границ и исчезновением ядрышка, подсчитывали на срезах, окрашенных ванадиевокислым фуксином с докрасиванием толуидиновым синим. В поле CA4 подсчет производили в рамке 500×100 мкм (об. 20, ок. 10), а в ЗИ — в трех случайно выбранных рамках 500×100 мкм (об. 20, ок. 10), расположенных в области ее верхней и нижней ветви, а также угла. Поскольку в поле CA1 и CA2/3 встречались лишь единичные поврежденные нейроны, их подсчет в этих полях не производили.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 7.0 (StatSoft, США). Силу судорог на разных этапах ПТЗК сравнивали при помощи парного t-теста для зависимых переменных. Для оценки изменений плотности расположения нейронов в различных полях гиппокампа использовали метод однофакторного дисперсионного анализа с последующим сравнением групп, используя тест Ньюмана – Кеулса.

Параметр числа поврежденных клеток не подчинялся нормальному распределению, поэтому для оценки изменений этого показателя использовали непараметрический однофакторный дисперсионный анализ Краскела – Уоллиса с последующим сравнением групп, пользуясь тестом Манна – Уитни. Числовые данные во всех случаях представлены в виде среднего показателя и его стандартной ошибки.

Результаты исследования. Регулярное введение ПТЗ в дозе 37,5 мг/кг приводило к прогрессирующему усилению судорожной активности животных с $1,93 \pm 0,05$ баллов после первой инъекции ПТЗ до $3,05 \pm 0,05$ баллов после последней инъекции ПТЗ. Начиная с 4-й инъекции ПТЗ и до конца выработки ПТЗК, судорожная активность была значимо выше, чем после 1-й инъекции ($P < 0,01$). В течение последних 7 инъекций у животных наблюдались преимущественно миоклонические судороги со вставанием (стадия 3). После 9 инъекций ПТЗ дальнейший рост силы судорог в ответ на последующие введения хемоконвульсанта прекращался ($P > 0,05$), что указывало на завершение процедуры выработки киндлинга.

Анализ препаратов, окрашенных крезильным фиолетовым, позволил выявить наличие морфологических изменений в гиппокампе животных, перенесших ПТЗК. Так, если у контрольных животных пирамидные нейроны поля CA4 имели правильную форму и отчетливо различимое ядро (рис. 1, а, б), то у животных, получивших 13 инъекций ПТЗ, в пирамидном слое присутствовало большое число сморщенных клеток с гиперхромной цитоплазмой (см. рис. 1, д, е). У контрольных животных клетки зернистого слоя ЗИ имели округлую форму и ядро с отчетливо различимыми ядрышками (см. рис. 1, в, ж). После 13 инъекций ПТЗ в зернистом слое ЗИ развивались изменения похожие на таковые в поле CA4. На внутренней границе зернистого слоя появлялись группы клеток неправильной формы с признаками гиперхроматоза (см. рис. 1, г, з). Такие поврежденные нейроны отсутствовали у контрольных животных и животных, получивших 1, 3 и 5 инъекций ПТЗ.

На препаратах, окрашенных ванадиевокислым фуксином и толуидиновым синим, нейроны зернистого слоя ЗИ и пирамидные нейроны гиппокампа у контрольных крыс имели голубую цитоплазму и светло-голубое ядро с четкими границами и красное ядрышко. В ходе развития ПТЗК были выявлены необратимо поврежденные нейроны — сморщенные клетки с интенсивно окрашенной темно-фиолетовой цитоплазмой и красным ядром (рис. 2). Обнаружено, что у животных, получивших 13 инъекций ПТЗ, плотность расположения необратимо поврежденных нейронов в поле CA4 и ЗИ была значимо выше по сравнению с таковой

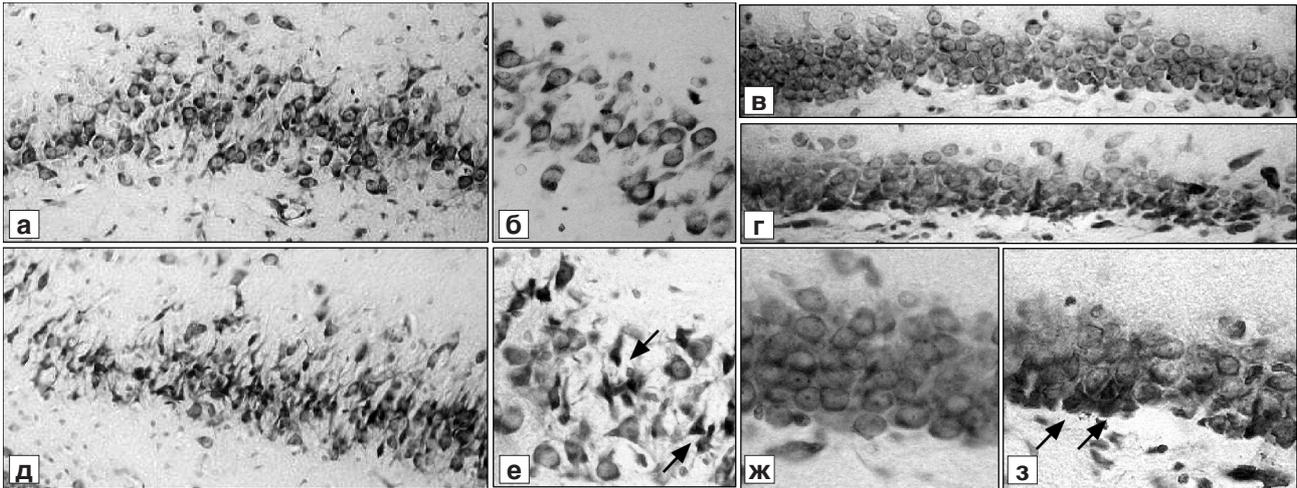


Рис. 1. Гиппокамп у контрольных (а, б, в, ж) крыс и после пентилентетразолового киндинга (д, е, г, з).

а, б, д, е — поле СА4; в, г, ж, з — зубчатая извилина. Стрелки — нейроны с признаками дегенерации. Окраска крезилевым фиолетовым. а, д — об. 10, ок. 10; б–г, е — об. 20, ок. 10; ж, з — об. 40, ок. 10.

у контрольных животных и у животных, получивших 1, 3 и 5 инъекций ПТЗ ($P < 0,05$; тест Манна—Уитни) (рис. 3).

Анализ плотности расположения нейронов отдельно в переднем и заднем отделе гиппокампа не выявил различий в динамике гибели нейронов, поэтому в дальнейшем эти данные были объединены. В поле СА1 не наблюдалось значимого снижения плотности расположения пирамидных нейронов при развитии ПТЗК [$F(4,15)=2,446$; $P < 0,1$], тогда как в поле СА3 и СА4 — значимое уменьшение их плотности [$F(4,15)=4,586$; $P < 0,05$ и $F(4,15)=6,854$; $P < 0,005$, см. рис. 4, а]. Аналогичное прогрессивное снижение плотности нейронов по мере развития ПТЗК обнаружено в ЗИ [$F(4,15)=3,749$; $P < 0,005$]. После 13 инъекций ПТЗ плотность расположения нейронов в ЗИ становилась значимо меньше, чем у контрольных животных ($P < 0,05$; post-hoc тест Ньюмана—Кеулса). Важно отметить, что снижение плотности расположения нейронов на фоне развития ПТЗК было выражено неодинаково в различных отде-

лах ЗИ (см. рис. 4, б). Так, при отдельном анализе полей зрения, взятых из верхней и нижней ветвей ЗИ, не было обнаружено значимого снижения этого показателя после 13 инъекций ПТЗ по сравнению с таковым в контрольной группе ($P > 0,1$; post-hoc тест Ньюмана—Кеулса). Напротив, в области угла ЗИ нейроны были чувствительны к повреждающему действию ПТЗК. Плотность расположения нейронов в области угла ЗИ снижалась по мере развития киндинга [$F(4,15)=6,575$; $P < 0,005$], при этом, уже начиная с 3-го введения ПТЗ, плотность нейронов в этой области ЗИ становилась меньше контрольных значений ($P < 0,01$; post-hoc тест Ньюмана—Кеулса).

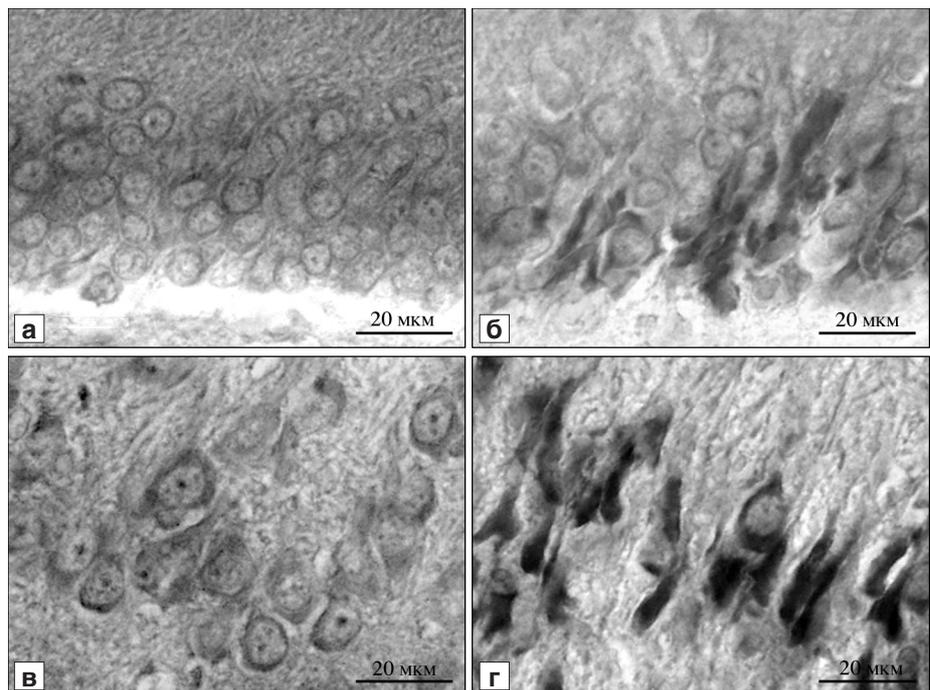


Рис. 2. Нейроны зернистого слоя зубчатой извилины (а, б) и поля СА4 гиппокампа (в, г) контрольных крыс (а, в) и после 13 инъекций пентилентетразола. Окраска ванадиевофуксин и толуидиновым синим.

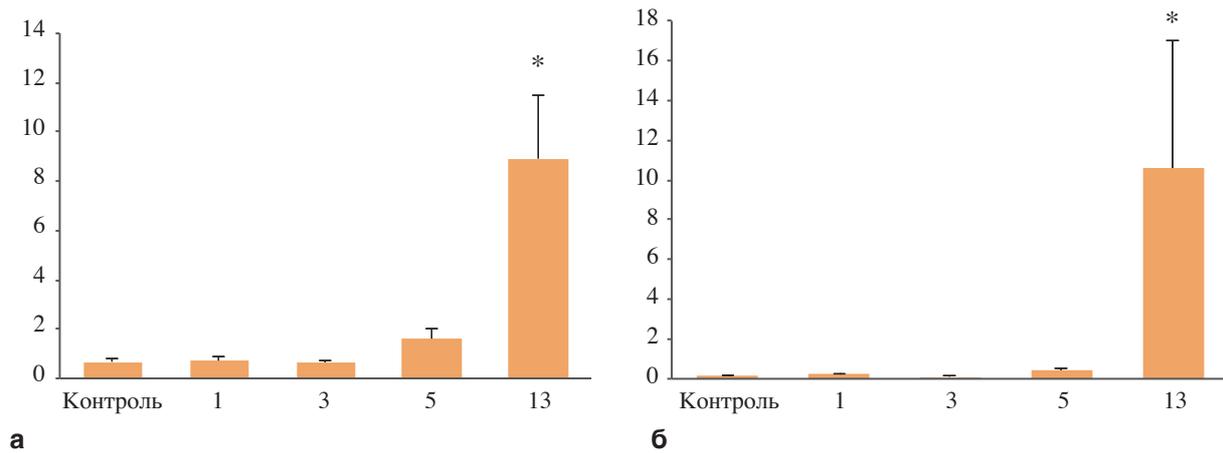


Рис. 3. Количество поврежденных нейронов зернистого слоя зубчатой извилины (а) и поля СА4 гиппокампа (б) у контрольных крыс и после различного числа инъекций пентилентетразола (ПТЗ).

По оси абсцисс — число инъекций ПТЗ; по оси ординат — исследованный показатель; звездочка — различия по сравнению с контролем значимы при $P < 0,05$; вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

Обсуждение полученных данных. Выработка киндлинга представляет собой процесс прогрессивного снижения порога судорожной активности на фоне повторяющегося субконвульсивного стимула. В зависимости от типа стимуляции судорог киндлинг можно подразделить на электрический, химический и аудиогенный. В основе всех видов киндлинга лежит повторяющаяся нарастающая активность нервных сетей мозга, которая в случае распространения на двигательные нейроны проявляется в виде

приступа моторных судорог. Тем не менее, даже в отсутствие моторных судорог на электроэнцефалограмме можно отметить характерные проявления эпилептиформной активности [8]. В свою очередь, избыточная нейрональная активация при генерировании судорожных разрядов сопровождается резким увеличением содержания Ca^{2+} в цитоплазме, что может приводить к дегенерации и гибели нейронов в очаге судорожной активности. Дегенерация и гибель нейронов при повторяющейся судорожной активности не зависит от

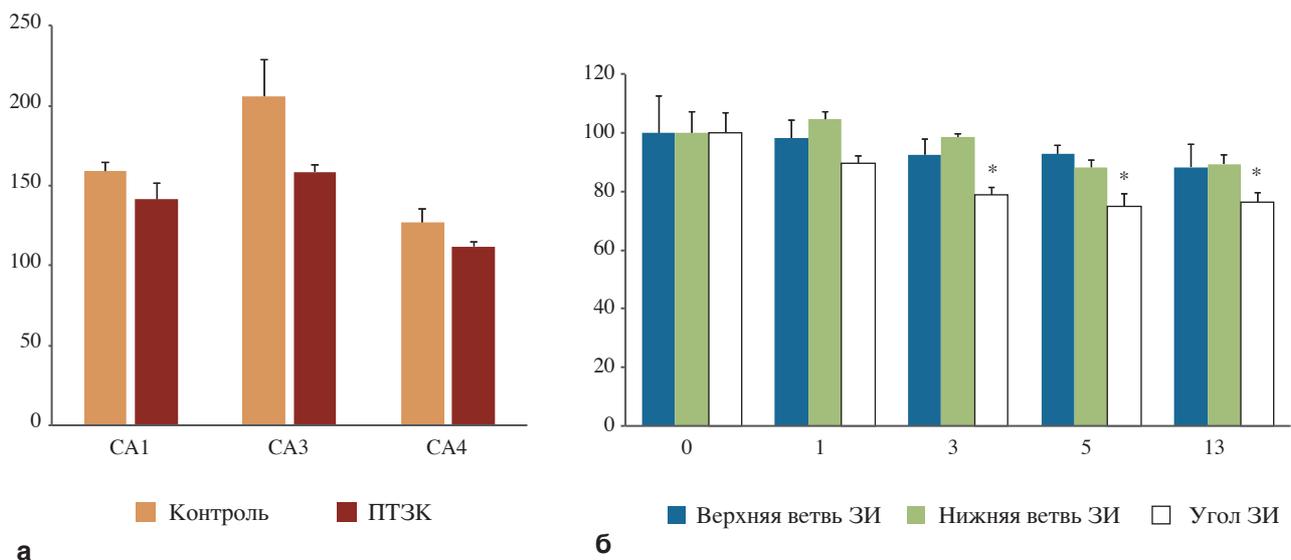


Рис. 4. Плотность расположения нейронов у крыс в полях аммонова рога (а) и в зубчатой извилине (ЗИ) (б) при пентилентетразоловом киндлинге (ПТЗК).

По оси абсцисс: а — поля аммонова рога; б — число инъекций пентилентетразола; по оси ординат: а — количество нейронов на стандартной площади среза; б — доля нейронов по сравнению с контролем, принятым за 100; звездочки — различия по сравнению с контролем значимы при $P < 0,001$; вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

природы конвульсивного стимула и была описана в разных областях мозга при электрическом [1, 3], химическом [2, 4] и аудиогенном [5] киндлинге.

В нашей работе было обнаружено, что развитие ПТЗК сопровождается появлением поврежденных нейронов в поле СА4 и ЗИ гиппокампа, а также снижением плотности расположения нейронов в полях СА3, СА4 и ЗИ, в последней преимущественно в области ее угла.

Наличие гиперхромных нейронов в поле СА4 и ЗИ гиппокампа крыс после ПТЗК указывает на развитие необратимых нейродегенеративных изменений [13]. Преимущественная локализация поврежденных нейронов по внутренней границе ЗИ и в поле СА4 может указывать на избирательную чувствительность находящихся здесь тормозных интернейронов к действию судорог.

Снижение плотности расположения нейронов в полях СА3 и СА4 при развитии ПТЗК было неоднократно описано в литературе [6, 10, 14], тогда как данные о гибели нейронов в ЗИ при хронической судорожной активности в настоящее время остаются противоречивыми. Н. Franke и Н. Kittner [4], выполнившие одно из наиболее полных исследований динамики нейродегенерации при ПТЗК, обнаружили снижение числа нейронов в ЗИ спустя 2 нед после окончания выработки киндлинга. Похожие результаты были получены Т. В. Павловой и соавт. [2, 9], показавшими, что снижение плотности расположения нейронов в ЗИ после ПТЗК сопровождается появлением дегенерирующих нейронов, экспрессирующих белок циклин В1. Это позволило предложить запуск аберрантного клеточного цикла в качестве одного из возможных механизмов гибели нейронов при экспериментальной судорожной активности. Тем не менее, в ряде работ не было обнаружено дегенерации или снижения плотности расположения нейронов в ЗИ после ПТЗК [6, 12]. Эти противоречия могут быть объяснены различными подходами к оценке морфологических изменений в ЗИ в работах разных авторов. В нашем исследовании было установлено, что выраженность процессов гибели нейронов неодинакова в различных отделах ЗИ. К моменту окончания выработки ПТЗК в области верхней и нижней ветви ЗИ присутствовали дегенерирующие клетки, но число нейронов не снижалось, тогда как в области угла ЗИ снижение числа нейронов наблюдалось уже начиная с ранних этапов развития ПТЗК. Это дает основание предположить наличие функциональной неоднородности популяции нейронов зернистого слоя ЗИ по их чувствительности к повреждающему действию судорог.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болквадзе Т. А., Джапаридзе Н. Д., Жвания М. Г. и др. Гибель клеток гиппокампа крыс в результате киндлинга. *Морфология*, 2007, т. 132, вып. 2, с. 49–52.
2. Павлова Т. В., Яковлев А. А., Степанчиков М. Ю. и Гуляева Н. В. Пентилентетразоловый киндлинг у крыс: связана ли нейродегенерация с проявлениями судорожной активности? *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, 2005, т. 91, № 7, с. 764–775.
3. Brandt C., Ebert U. and Löscher W. Epilepsy induced by extended amygdala-kindling in rats: lack of clear association between development of spontaneous seizures and neuronal damage. *Epilepsy Res.*, 2004, v. 62, № 2–3, p. 135–156.
4. Franke H. and Kittner H. Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylene-tetrazol-kindled rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2001, v. 70, № 2–3, p. 291–303.
5. Galvis-Alonso O. Y., Cortes De Oliveira J. A. and Garcia-Cairasco N. Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). *Neuroscience*, 2004, v. 125, № 3, p. 787–802.
6. Huang Y. L., Sun D. and Liu Y. L. Pathological changes of brain at different maturational stages caused by pentylene-tetrazol-induced repeated seizure in rat models. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.*, 2005, v. 43, № 12, p. 930–934.
7. Mortazavi F., Ericson M., Story D. et al. Spatial learning deficits and emotional impairments in pentylene-tetrazole-kindled rats. *Epilepsy Behav.*, 2005, v. 7, № 4, p. 629–638.
8. Oghlakan R. O., Tilelli C. Q., Hiremath G. K. et al. Single injection of a low dose of pentylene-tetrazole leads to epileptogenesis in an animal model of cortical dysplasia. *Epilepsia*, 2009, v. 50, p. 801–810.
9. Pavlova T., Stepanichev M. and Gulyaeva N. Pentylene-tetrazole kindling induces neuronal cyclin B1 expression in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.*, 2006, v. 392, № 1–2, p. 154–158.
10. Rauca C., Pohle W., Grunenberg K. and Franze S. Hypothermia inhibits pentylene-tetrazol kindling and prevents kindling-induced deficit in shuttle-box avoidance. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2000, v. 65, № 1, p. 23–30.
11. Stepanichev M. Y., Zdobnova I. M., Zarubenko I. I. et al. Studies of the effects of central administration of beta-amyloid peptide (25–35): pathomorphological changes in the Hippocampus and impairment of spatial memory. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2006, v. 36, № 1, p. 101–106.
12. Tian F. F., Zeng C., Guo T. H. et al. Mossy fiber sprouting, hippocampal damage and spontaneous recurrent seizures in pentylene-tetrazole kindling rat model. *Acta Neurol. Belg.*, 2009, v. 109, № 4, p. 298–304.
13. Victorov I. V., Prass K. and Dirnagl U. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, 2000, v. 5, № 2, p. 135–139.
14. Zhang L. S., Ma Y. Y. and Li Q. Effects of endogenous histamine on memory impairment induced by pentylene-tetrazole-kindled epilepsy in rats. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.*, 2006, v. 35, № 6, p. 630–634.

Поступила в редакцию 10.12.2011
Получена после доработки 12.03.2012

NEURODEGENERATIVE CHANGES IN RAT HIPPOCAMPAL AREAS DURING THE PENTYLENETETRAZOLE KINDLING DEVELOPMENT

M. S. Popova, V. A. Aniol, N. A. Lazareva, M. Yu. Stepanichev and N. V. Guliayeva

The development of pentylenetetrazole-induced kindling is accompanied by neurodegeneration and neuronal loss in different areas of the hippocampus. However, the data on neurodegeneration development in the dentate gyrus remain controversial. In our study that was performed on 20 Wistar male rats, it was found that the process of neuronal loss was expressed unequally along

the dentate gyrus. By the end of pentylenetetrazole kindling development, degenerating cells were present in the superior and inferior blades of the dentate gyrus, whereas the neuronal density in these areas was not reduced. On the other hand, in the angle of the dentate gyrus neuronal loss was already detected at the very early stages of kindling development. These findings allow to suggest a functional heterogeneity of a population of granule cells in relation to their susceptibility to seizure-induced injury.

Key words: *dentate gyrus, pentylenetetrazole, kindling, neuronal loss.*

Laboratory of the Biochemistry of the Nervous System, RAS Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Moscow