

Н.Т. Котария, Т.З. Бикашвили, М.Г. Жвания и Ц.Г. Чхиквишвили

УЛЬТРАСТРУКТУРА ПОЛЯ CA1 ГИППОКАМПА КРЫС ПОСЛЕ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОГО СТАТУСА, ВЫЗВАННОГО СИСТЕМНЫМ ВВЕДЕНИЕМ КАИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Отдел нейроанатомии (зав. — проф. И.К. Сванидзе) Института физиологии им. И.С. Бериташвили, г. Тбилиси, Грузия

Исследована ультраструктура поля CA1 гиппокампа крыс через 14 сут после эпилептического статуса, вызванного введением каиновой кислоты. Изменения строения отмечены в 40% клеток, преимущественно в интернейронах, в которых встречались как обратимые сдвиги (митохондрии с электронно-плотным матриксом или с немногочисленными короткими кристами и умеренно расширенные цистерны гранулярной эндоплазматической сети [ГЭС] с небольшим числом рибосом), так и существенные изменения: набухшие митохондрии с единичными полуразрушенными кристами, в том числе с нарушенными митохондриальными мембранами, патологически расширенные компоненты ГЭС и очаговый или периферический хроматизм. В хроматизированных участках иногда находились мембраноподобные включения и вакуоли. Кроме этого, в нейропиле изредка встречались крупные осмиофильные образования, окруженные астроцитарными отростками со скоплениями гликогена или глиофибрилл. Изменялась и синаптоархитектоника. Часто встречались асимметричные синапсы на мелких дендритах и шипиках, с высокоосмиофильной постсинаптической зоной, в синаптических терминалях которых находились многочисленные синаптические пузырьки и крупные пузырьки с электронно-плотной сердцевинкой. В части пресинаптических окончаний наблюдались отчетливые признаки классической дегенерации по темному типу. Так как во всех измененных нейронах ядро оставалось интактным, можно полагать, что большая часть клеток претерпевали патологические изменения по некротическому типу.

Ключевые слова: гиппокамп, поле CA1, ультраструктура, каиновая кислота, эпилептический статус.

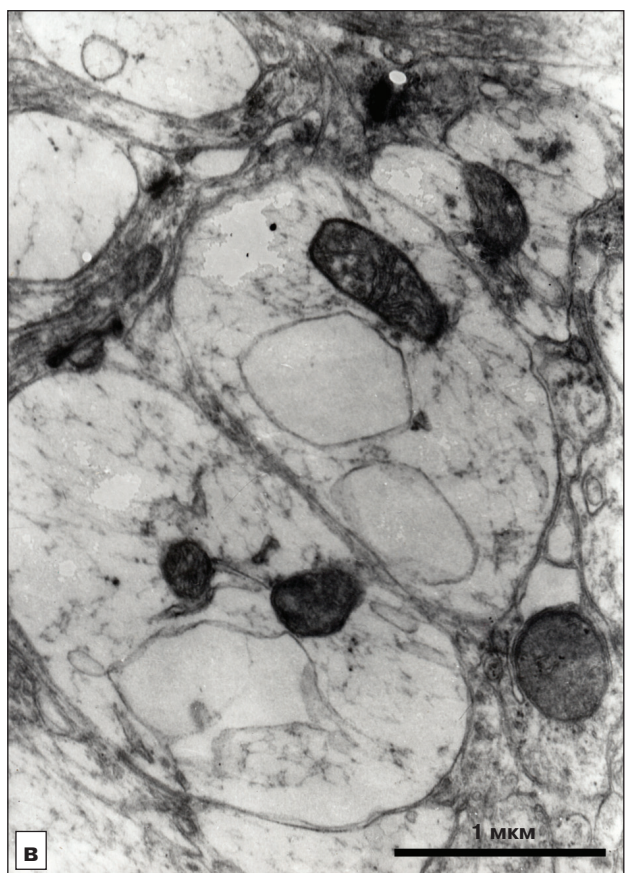
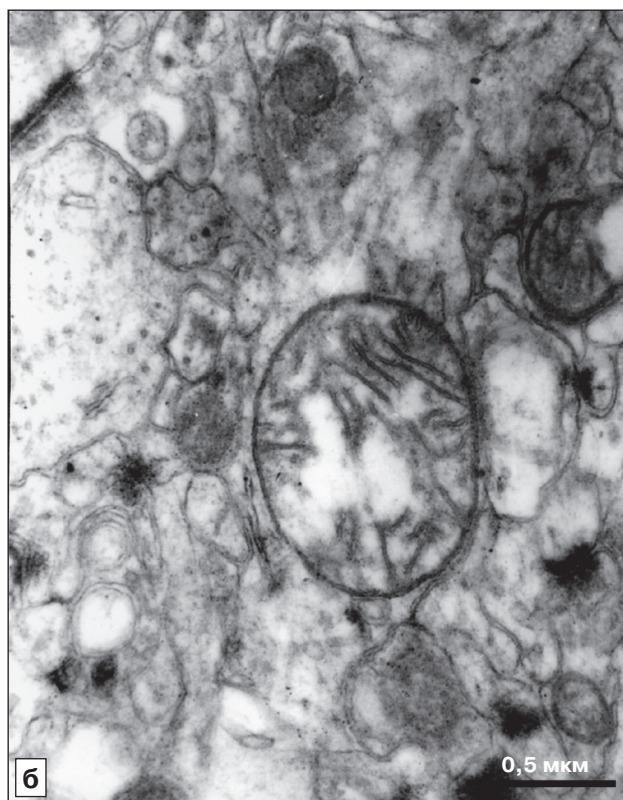
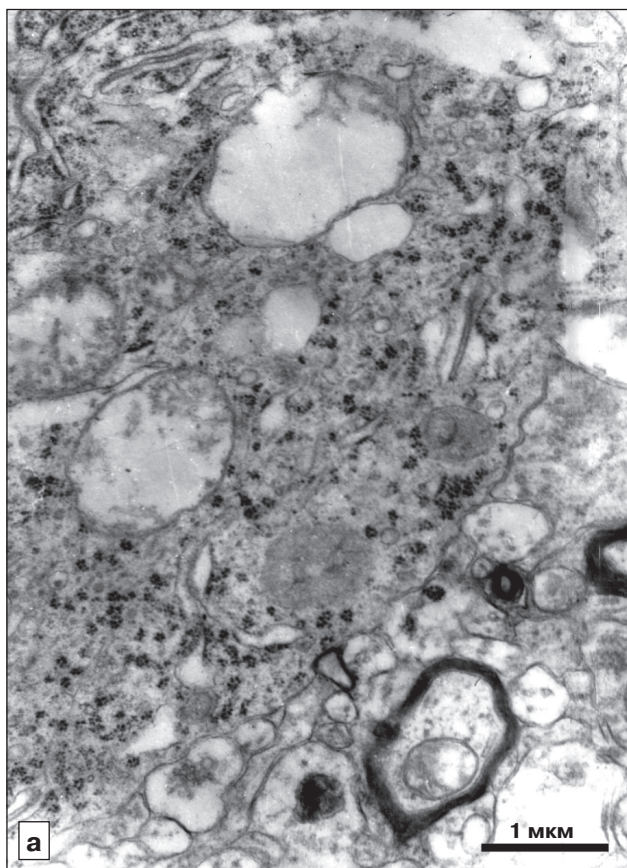
Системное введение животным структурного аналога глутамата — каиновой кислоты (КК) — вызывает возбуждение ряда нейронов ЦНС и приводит к развитию состояния, близкого к парциальной эпилепсии — наиболее распространенной среди пациентов [2]. Характерной особенностью этого состояния является гиппокампальный склероз [5, 12, 13]. В поле CA1 гиппокампа максимальное содержание дегенерирующих клеток (более 50%) было обнаружено через 14 сут после инъекции КК [8]. Не существует единого мнения, какой механизм вызывает повреждение клеток при эпилептогенезе [5, 11, 12]. Однако данный вопрос особенно важен, так как именно этим механизмом определяется то основное патологическое звено, на которое должны действовать терапевтические средства. Согласно молекулярно-биологическим данным (гель-электрофорез, метод TUNEL), клетки гиппокампа дегенерируют путем некроза [5, 12], апоптоза [11] или путем континуума некроз/апоптоз [4]. Однако метод TUNEL, определяющий наиболее характерный показатель апоптоза — фрагментацию ДНК, выявляет и некоторые некротические клетки [3]; не всегда точна детекция апоптоза и гель-электрофорезом [4]. Поэтому необходимо электронно-микроскопическое (ЭМ) исследование, позволяющее выявить: в случае апоптоза — апоптотические тела, в случае некроза — перерождение цитоплазматических органелл [5, 15]. Оно также позволит изучить воздей-

ствие судорожной активности на строение других структурных элементов: синапсов, глиоцитов и др. — вопрос, один из наиболее слабо освещенных в экспериментальной эпилептологии.

Цель настоящего исследования — изучение ультраструктуры поля CA1 гиппокампа крысы через 14 сут после эпилептического статуса (ЭС), вызванного системным введением КК.

Материал и методы. Половозрелым крысам-самцам с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» интраперитонеально вводили КК (10 мг/кг), растворенную в 0,9% NaCl (Sigma, N-0250, США). Для ЭМ-исследования отбирали крыс (9 животных), у которых развивался ЭС. Контрольным крысам (5 животных) инъецировали аналогичный объем 0,9% NaCl. Через 14 сут после инъекций под интраперитонеальным хлоралгидратным (4% раствор) наркозом (60 мг/кг) крыс через сердце и аорту перфузировали 2,5% теплым раствором глутаральдегида на фосфатном буфере (pH 7,2–7,4). Мозг извлекали из черепа и дополнительно фиксировали в том же растворе 40 мин. Кусочки мозга с исследуемой структурой (поле CA1 гиппокампа) обрабатывали в 2% холодном (4 °C) растворе четырехоксида осмия, обезживали в этаноле возрастающей концентрации и заливали в аралдит. Тонкие срезы получали на ультратоме фирмы LKB (Швеция), контрастировали по прописи Рейнольдса и исследовали в электронных микроскопах JEOL-100 (Япония) и TESLA (Чехия). У всех животных общее количество просмотренных нейронов (n=80) принимали за 100% и определяли долю клеток с измененной ультраструктурой.

Результаты исследования. Через 14 сут после ЭС ультраструктура в 40% нейро-



Участок поля CA1 гиппокампа крыс через 14 сут после системной инъекции каиновой кислоты.

а — расширенные цистерны гранулярной эндоплазматической сети; б — митохондрия с полуразрушенными кристами; в — дендриты с крупными вакуолями.

плотным матриксом, а также с немногочисленными или единичными короткими кристами и умеренно расширенные цистерны гранулярной эндоплазматической сети (ГЭС) с небольшим числом рибосом; несколько уменьшено число и свободных полисом. Редкими были характерные для нормы скопления ГЭС на периферии клеток. В других клетках встречались существенные изменения: набухшие митохондрии с единичными, полуразрушенными кристами (см. рисунок, б), в том числе с нарушенной наружной митохондриальной мембраной, патологически расширенные компоненты ГЭС и/или очаговый или периферический хроматолиз. В участках хроматолиза иногда находились остатки мембранных структур и вакуолизированные митохондрии, а также вакуолярно расширенные цистерны ГЭС. Обычно этому сопутствовали скопления агранулярной эндоплазматической сети. В некоторых клетках с нормальной или нарушенной ультраструктурой находились неоднородные осмиофильные включения. Было нарушено также строение некоторых дендритных стволов: в ряде из них микротрубочки были единичны или отсутствовали, другие —

нов, в основном интернейронах, была изменена (рисунок, а). В некоторых из них отмечены обратимые сдвиги: митохондрии с электроно-

выглядели набухшими, в третьих — находились измененные митохондрии, вакуоли или включения мембранных структур (см. рисунок, в). Кроме этого, в нейропиле изредка встречались крупные осмиофильные образования, окруженные астроцитарными отростками. Такие образования можно идентифицировать как некротизированные нейроны, реже (если на темном фоне можно было различить синаптические пузырьки) — как дегенерирующие по темному типу, крупные синаптические окончания. Отмечались также умеренно набухшие отростки астроцитов со скоплениями гликогена или глиофибрилл.

Под воздействием КК изменялась и синапто-архитектоника. Так, часто на мелких дендритах и шипиках встречались асимметричные синапсы с высокоосмиофильной постсинаптической зоной, в синаптических терминалях которых находились многочисленные синаптические пузырьки, при этом единичные пузырьки располагались около активной зоны. Кроме того, часто встречались синапсы, в терминалях которых, наряду с обычными, находились крупные пузырьки, в том числе — с электронно-плотной сердцевиной. Вместе с тем, редко встречался характерный для нормы хорошо развитый шипиковый аппарат. Редкими были и «активные» аксосоматические синапсы или синапсы на крупных стволах дендритов.

Обсуждение полученных данных. Итак, через 14 сут после системной инъекции крысам КК в поле СА1 гиппокампа выявлены разные фазы патологии клеток, преимущественно интернейронов и синапсов. Отмеченные асимметричные синапсы иногда рассматривают как высокоактивные [1, 10]. Согласно другому предположению, присутствие в терминалях единичных пузырьков отражает уменьшение в мозгу ряда медиаторов [1]. Обе особенности — большое число высокоактивных синапсов и изменение соотношения нейромедиаторов — характерны для разных форм эпилепсии [10]. Реактивные изменения, выражающиеся в умеренном набухании или умеренной деструкции части митохондрий и ГЭС, соответствуют стадии, во время которой клетка компенсирует нарушения за счет собственных резервов. В отличие от этого, наличие в клетках существенных деструктивных изменений свидетельствует о том, что собственные ресурсы клетки не обеспечивают нормальный обмен не только функциональных, но и структурных белков. Однако репаративные возможности большинства таких клеток, по-видимому, не исчерпаны. На это указывают скопления компонентов агранулярной эндоплазматической сети, сохранность строения некоторой части митохондрий и целостность ядерной

оболочки и плазмолеммы [1]. Присутствие в тот же экспериментальный срок разных стадий перерождения нейронов указывает на неодинаковое время вовлечения интернейронов гиппокампа в вызванный КК эпилептогенез.

Так как в нейронах исключительно все нарушения касались строения цитоплазматических органелл, а ядро оставалось интактным, можно предположить, что через 14 сут после системного введения КК в гиппокампе развивается некроз нейронов. Некроз описан и при других формах экспериментальной эпилепсии [5, 13]. Вместе с тем, знаменательно присутствие измененных митохондрий в большом числе нейронов. Митохондриальная дисфункция представляет собой характерную особенность эпилептического состояния [7, 14]. С другой стороны, известно, что вызванный длительной деполяризацией, окислительным стрессом и повышенной проницаемостью митохондриальных мембран митохондриальный стресс является важнейшим триггером программной гибели клеток — апоптоза [7, 9]. Поэтому не исключено, что наблюдаемые нами структурные нарушения, по крайней мере, части митохондрий, вызваны активацией митохондриальной цитохром-оксидазы, характерной для ранних стадий апоптоза [15]. Таким образом, часть клеток могут перерождаться путем апоптоза. Предположение о развитии апоптоза при эпилепсии высказано в ряде работ [6, 11, 12]. Согласно другому мнению, гибель нейронов гиппокампа происходит в рамках континуума: апоптоз—некроз [4, 5]. Наши данные подтверждают это предположение, однако, необходимо дополнительное молекулярно-биологическое исследование.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боголепов Н.Н. Ультраструктура мозга при гипоксии. М., Медицина, 1979.
2. Ben-Ari Y. and Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci.*, 2000, v. 23, p. 580–587.
3. Charriaut-Marlangue C. and Ben-Ari Y. A Cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *NeuroReport*, 1995, v. 7, № 1, p. 61–67.
4. Doonan F. and Cotter T.G. Morphological assessment of apoptosis. *Methods*, 2008, v. 44, № 3, p. 200–204.
5. Fujikawa D.G., Shinmei S.S. and Cai B. Kainic acid – induced seizures produce necrotic, not apoptotic neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience*, 2000, v. 98, № 1, p. 41–53.
6. Heinemann U., Buchheim K., Gabriel S. et al. Cell death and metabolic activity during epileptiform discharges and status epilepticus in the hippocampus. *Prog. Brain Res.*, 2002, v. 135, p. 197–200.
7. Jiang W., Du B., Chi Z. et al. Preliminary explorations of the role of mitochondrial proteins in refractory epilepsy: some findings

- from comparative proteomics. *J. Neurosci. Res.*, 2007, v. 85, № 14, p. 3160–1170.
8. Kotaria N.T., Bolkvadze T., Chkhikvishvili C.L. et al. Quantitative analysis of cells in rat hippocampus at different time-points after status epilepticus induced by kainic acid administration. *Georgian J. Neurosci.*, 2006, v. 1, № 5, p. 47–52.
9. Kunz W.S., Kadin A.P., Vielhaber S. et al. Mitochondrial complex 1 deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.*, 2000, v. 48, p. 766–773.
10. Leite J.P., Neder L., Arisi G.M. et al. Plasticity, synaptic strength, and epilepsy: what can we learn from ultrastructural data? *Epilepsia*. 2005, v. 6 Suppl. 5, p. 134–141.
11. Mikati M.A., Abi-Habib R.J., El Sabban M.E. et al. Hippocampal programmed cell death after status epilepticus: evidence for NMDA receptor and ceramide mediated mechanism. *Epilepsia*, 2003, v. 44, p. 282–291.
12. Pollard H., Charriaud-Marlangue C., Cantagrel S. et al. Kainate acid-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience*, 1994, v. 63, p. 7–18.
13. Walter C., Murphy B.L., Pun R.Y. et al. Pilocarpine-induced seizures cause selective time-dependent changes to adult-generated hippocampal dentate granule cells. *J. Neurosci.*, 2007, v. 27, № 28, p. 7541–7552.
14. Yao-Chung Chuang, Alice Y.W., Jui-Wei Lin et al. Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus during kainic acid-induced status epilepticus in the rat. *Epilepsia*, 2004, v. 45, № 10, p. 1202–1209.
15. Zhivotosky B. and Orrenius S. Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 2001, Chapter 18, Unit 18.3, p. 207–221.

Поступила в редакцию 23.04.08
Получена после доработки 24.11.08

THE ULTRASTRUCTURE OF HIPPOCAMPAL CA1 AREA OF THE RAT AFTER STATUS EPILEPTICUS PROVOKED BY KAINIC ACID SYSTEMIC ADMINISTRATION

Kotaria N.T., Bikashvili T.Z., Zhvania M.G. and Chkhikvishvili T.G.

The ultrastructure of hippocampal CA1 area was investigated in rats 14 days after status epilepticus was induced by kainic acid. The structural alterations were found in 40% of the cells, predominantly in interneurons, which demonstrated both reversible changes (mitochondria with a dilated space between cristae and electron-dense matrix or mitochondria with few short cristae and moderately widened rough endoplasmic reticulum [RER] cisterns with few ribosomes) and more significant alterations (swollen mitochondria containing single dilapidated cristae, including those with damaged mitochondrial membranes, pathologically dilated RER profiles and focal or peripheral chromatolysis. In the areas subjected to chromatolysis, the membrane-like inclusions and vacuoles were sometimes observed. Besides, large osmophilic irregular structures, surrounded by astrocyte processes rich in glycogen granules and gliofibrils, were rarely found in the neuropil. The synaptic architectonics was also changed. Asymmetrical synapses on small dendrites and spines containing osmophilic postsynaptic zone were frequently observed. Their synaptic endings contained numerous synaptic vesicles and large vesicles with a central dense core. Some part of presynaptic endings showed clear signs of a classical dark-type degeneration. As in all the altered neurons the nucleus remained intact, we suggest that after status epilepticus the majority of the cells underwent the necrotic-type pathological changes.

Key words: *hippocampus, area CA, kainic acid, ultrastructure, status epilepticus.*

Department of Neuroanatomy, I. Beritashvili Institute of Physiology, Tbilisi, Georgia

© Коллектив авторов, 2008
УДК 611.813.3:612.647

А.С. Харламова, В.М. Барабанов и С.В. Савельев

РАЗВИТИЕ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЛУКОВИЦ У ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА (ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Лаборатория развития нервной системы (зав. — проф. С.В. Савельев) Научно-исследовательского института морфологии человека РАН, Москва

Проведено иммуногистохимическое исследование обонятельных лукович (ОЛ) плодов человека. В работе использовали иммуногистохимические маркеры специфичных для нервной системы белковых комплексов S-100 и SNAP-25. На 20–22-й неделе развития клеток, экспрессирующих белок S-100, в ОЛ было обнаружено больше, чем в исследованной области новой коры (участки gyrus rectus и gyrus orbitalis longitudinalis internus). Выявленные количественные различия указывают на гетерохронность глиальной дифференцировки в ОЛ и коре мозга. Иммунопозитивная реакция на SNAP-25 была впервые выявлена по периферии ОЛ и в клубочках у плодов человека на 15–16-, 20–22-й неделе развития. По результатам иммуногистохимической реакции ОЛ с антителами к SNAP-25 можно утверждать, что функционирование обонятельной системы человека ранее 20–22-й недели развития невозможно. В ОЛ плодов на 28–29-й неделе развития интенсивность иммуногистохимической реакции имела топологические различия. Реакция с антителами к SNAP-25 в ОЛ доношенных плодов была сходна с реакцией в ОЛ взрослых людей. Результаты иммуногистохимического исследования с использованием реакции на белковый комплекс SNAP-25 ОЛ у плодов разного возраста позволяют предположить, что функционирование первичного обонятельного центра человека начинается не раньше 30-й недели развития.

Ключевые слова: *обонятельные луковичы, развитие, иммуногистохимия, S-100, SNAP-25.*