М.Г. Жвания, Т.Н. Болквадзе, Ц.Г. Чхиквишвили, Н.Т. Котария, НД.Джапаридзе, Т.Г. Лордкипанидзе и Т.З. Бикашвили

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ГЛИОЦИТОВ И СООТНОШЕНИЕ МАКРОГЛИОЦИТОВ И НЕЙРОНОВ В ГИППОКАМПЕ КРЫС ПРИ КИНДЛИНГЕ

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

Глиоз — важнейший морфологический коррелят эпилепсии. Представленный в основном пролиферацией и гипертрофией астроцитов и реакцией микроглии (макрофагов) он наиболее характерен для тех отделов эпилептогенных зон, в которых число нейронов значительно уменьшено. Одна из таких структур — гиппокамп, склероз которого развивается уже на ранних стадиях эпилептогенеза. На препаратах, окрашенных крезиловым фиолетовым, проведен количественный анализ глиоцитов и соотношения макроглиоцитов и нейронов в разных отделах гиппокампа крыс через 14 и 30 сут после электрического киндлинга гиппокампа. В тот и другой срок в гиппокампе уменьшается число нейронов и увеличивается количество глиоцитов. Через 14 сут изменения глиоцитов особенно значительно выражены в радиальном и ориентальном слоях аммонова рога, через 30 сут — так же и в пирамидном слое CA3 и хилусе. Таким образом, глиоциты гиппокампа активно вовлекаются в эпилептогенез.

Ключевые слова: глиоциты, количественный анализ, гиппокамп, киндлинг, крыса.

Глиоз — важнейший реактивный феномен, выражающийся, главным образом, в пролиферации астроцитов и специфической реакции микроглиоцитов (макрофагов), характерен для большинства патологических состояний мозга. Развитие глиоза наблюдается при большинстве форм клинической и экспериментальной эпилепсии. Он особенно хорошо выражен в тех отделах эпилептогенных зон, в которых судорожная активность вызывает гибель наибольшего числа нейронов [3, 6, 9, 11]. К таким структурам, в первую очередь, относится гиппокамп: склероз гиппокампа, так же как и глиальная реакция, развиваются уже на самых ранних стадиях эпилептической активности [5, 7, 13].

Киндлинг — специфическая электрическая стимуляция эпилептогенных зон мозга и экспериментальная модель хронической темпоральной эпилепсии — вызывает в гиппокампе различные морфологические изменения [1, 7]. Ранее было показано, что в результате киндлинга вентрального гиппокампа в аммоновом роге и хилусе уменьшается число пирамидных клеток и ГАМК-ергических нейронов [1]. Цель настоящего исследования изучение реакции глиоцитов аммонова рога и хилуса на гибель нейронов данных областей.

Материал и методы. Работа проведена на 12 белых лабораторных крысах-самцах. При проведении экспериментов руководствовались правилами работы с животными, утвержденными специальным советом Института физиологии Грузии.

Контрольную группу (n=4) составляли интактные животные, находившиеся в условиях вивария. Экспериментальным лом натрия (40 мг/кг) вживляли электроды в вентральный гиппокамп [8], который стимулировали на 7-е постоперационные сутки по протоколу быстрого киндлинга (продолжительность раздражительной силы — 10 с, интенсивность — 450 мкА, частота — 40 Гц); через 24 ч после стимуляции животных с 5-минутным интервалом подвергали воздействию 5 тест-стимулов. Исследовали мозг только тех крыс, у которых в ответ на стимуляцию развивались генерализованные судороги IV-V степени (не менее пяти). Контрольных и экспериментальных крыс через 14 и 30 сут после электрического киндлинга перфузировали под внутрибрюшинным наркозом этаминалом натрия (40 мг/кг) интракардиальным введением 4% раствора параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,2-7,4). Мозг извлекали из черепа и дофиксировали в том же растворе параформальдегида в течение 2 ч, после чего на замораживающем микротоме (Leica, Германия) получали серийные срезы толщиной 4 мкм. Срезы окрашивали крезиловым фиолетовым, который позволяет идентифицировать разные отделы и слои гиппокампа, провести количественный анализ нейронов и макроглиоцитов и вычислить глиально-нейрональный индекс (соотношение глиоцитов и нейронов). Такой анализ позволяет избежать погрешностей, опосредованных вариабельностью толщины срезов или гистологическими процедурами, сопутствующими анализу только нейронов или только глиоцитов, и таким образом, оценить результаты с большей объективностью. Подсчет проводили на каждом 3-м срезе (10 срезов от каждого животного) по методу М. West и соавт. [14] в 30 случайных полях зрения в ориентальном, пирамидном и радиальном слоях CA1 и CA3, CA4 и хилусе, с помощью окулярной морфометрической сетки (размер каждого деления сетки — 0,00625 мм²), при об. 40, ок. 40. Число нейронов и глиоцитов определяли по формуле: N=Q- х 1/t, где N — общее число клеток в относительном объеме ткани мозга, с которого были получены срезы; Q- — число клеток в данной серии срезов; t — последовательность срезов, в которых производили подсчет (каждый 3-й срез: $t=1/_3$) [14]. Статистическую

животным (n=8) под внутрибрюшинным наркозом этамина-

Отделы гиппокампа	Срок наблюдения, сут			
	14		30	
	Контроль	Эксперимент	Контроль	Эксперимент
CA1:				
ориентальный слой/альвеус	2566±24	506±24*	1283±188	590±73*
слой пирамидных клеток	11 832±152	5390±26*	14 285±13	5230±524*
радиальный слой	2291±823	787±22*	8055±144	573±12*
CA3:				
ориентальный слой/альвеус	2492±184	830±113*	1410±350	463±100*
слой пирамидных клеток	16 756±157	5557±118*	8332±131	3040±118*
радиальный слой	4643±158	1067±95*	8332±131	3345±118*
CA4	1073±110	932±149	6803±149	5068±122
Хилус	5245±110	1703±75*	1040±25	1450±330*

Число нейронов в различных отделах гиппокампа крысы ($\overline{x}\pm s_{\overline{x}}$)

Таблица 1

* Здесь и в табл. 2, 3: различия по сравнению с контролем значимы при P<0,05.

обработку полученных данных проводили с использованием компьютерной программы T-test (MINITAB). Различия цифровых данных считали значимыми при P<0,05.

Результаты исследования. Количественный анализ нейронов. Через 14 и 30 сут после киндлинга значимое уменьшение числа нейронов отмечалось во всех слоях СА1 и СА3 и в хилусе. В СА4 количество нейронов уменьшалось незначимо (табл. 1).

Количественный анализ глиоцитов. Через 14 сут после киндлинга число глиоцитов значимо увеличивалось только в ориентальном и радиальном слоях САЗ. Через 30 сут число глиоцитов увеличивалось: в хилусе, во всех слоях САЗ, радиальном и ориентальном слоях СА1. В СА4 число глиоцитов увеличилось незначимо (табл. 2). Глиально-нейрональный индекс. Через 14 сут после киндлинга глиально-нейрональный индекс увеличивался в радиальном слое CA1, ориентальном, радиальном и пирамидном слоях CA3 и хилусе. Через 30 сут после киндлинга увеличение глиально-нейронального индекса характерно уже для всех слоев CA1 и CA3 и хилуса. Значимые изменения не отмечены лишь в CA4 (табл. 3).

В тот и другой экспериментальные сроки особенно значительно возрастал глиальнонейрональный индекс в CA1 и CA3 (рисунок, a, б).

Обсуждение полученных данных. В результате проведенного исследования оказалось, что через 14 и 30 сут после киндлинга вентрального гиппокампа в последнем не только уменьшается число нейронов [1], но и увеличивается

Таблица 2

	Срок наблюдения, сут			
Отдел гиппокампа	14		30	
	Контроль	Эксперимент	Контроль	Эксперимент
CA1:				
ориентальный слой/альвеус	500±95	780±165	500±95	873±168*
слой пирамидных клеток	533±48	534±177	533±48	585±30
радиальный слой	418±73	556±69	418±73	942±35*
CA3:				
ориентальный слой/альвеус	568±21	1072±180*	568±21	950±165*
слой пирамидных клеток	602±25	690±170	602±25	922±163*
радиальный слой	632±25	1170±115*	632±25	1668±423*
CA4	404±30	447±88	404±30	490±155
Хилус	1040±25	1450±330	1040±25	1538±113*

Число глиоцитов в различных отделах гиппокампа крысы ($\overline{x}\pm s_{\overline{x}}$)

Таблица З

- 0 0		$\langle - \rangle$
	μπαίζα ο κασπμητή το απάσταν συππαγάλητα γκι ται τ	(VIC-
і.пально-нсирональный	ΠΗΠΟΚΕ Β ΠΑΣΠΗΥΗΡΙΧ ΟΙ ΠΟΠΑΧ Ι ΜΗΠΟΚΑΜΠΑ ΚΟΡΙΟΡΙ	1 4 - 5 1
- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		(x)

	Срок наблюдения, сут			
Отдел гиппокампа	14		30	
	Контроль	Эксперимент	Контроль	Эксперимент
CA1:				
ориентальный слой/альвеус	0,19±0,03	0,24±0,13	0,39±0,04	1,5±0,5*
слой пирамидных клеток	0,26±0,23	0,10±0,04	0,40±0,009	0,110±0,020*
радиальный слой	0,15±0,05	0,74±0,19*	1,60±0,003	1,6±0,5*
CA3:				
ориентальный слой/альвеус	0,23±0,05	1,30±0,27*	0,340±0,105	2,07±0,20*
слой пирамидных клеток	0,40±0,003	0,130±0,005*	0,10±0,010	0,19±0,05*
радиальный слой	0,14±0,06	1,12±0,18*	0,6±0,4	5,0±1,2*
CA4	0,38±0,05	0,51±0,19	0,150±0,020	0,12±0,05
Хилус	0,20±0,05	1,08±0,25*	0,80±0,020	0,91±0,09*



Изменение глиально-нейронального индекса в различных отделах гиппокампа крысы через 14 сут (а) и 30 сут (б) после киндлинга.

По горизонтальной оси: I— CA1; II— CA3; III— CA4; IV— хилус; A— ориентальный слой; Б— пирамидный слой; В— радиальный слой; по оси ординат— изменение глиально-нейронального индекса (%) по сравнению с контролем, принятым за 100.

количество глиоцитов, а также соответственно и глиально-нейрональный индекс. Через 14 сут изменения глиоцитов особенно значительно выражены в радиальном и ориентальном слоях аммонова рога, через 30 сут — также в пирамидном слое САЗ и хилусе. Таким образом, при развитии судорожной активности в патологический процесс активно включаются глиоциты основных отделов гиппокампа. В радиальном и ориентальном слоях аммонова рога в норме обычно сконцентрированы многочисленные и разнообразные ГАМКергические интернейроны [2, 4, 10, 12]. Так как при эпилептогенезе гибель клеток наиболее выражена именно в этих слоях, можно предположить, что астроциты активно участвуют в реорганизации внутригиппокампальных кругов, нарушенных в результате эпилептогенеза. Хотя в нашем материале увеличению числа глиоцитов всегда сопутствовало уменьшение количества нейронов, есть данные, что для развития астроглиоза при эпилепсии гибель нейронов обязательным условием не является [6]. Согласно имеющимся данным, в нормальном мозгу астроциты, наделенные многочисленными рецепторами глутамата и ГАМК, представляют собой основные структуры, посредством которых происходит деградация и рециклирование выделенного из нейронов глутамата [3, 6]. При патологии данная функция астроцитов нарушается. Так, при склерозе аммонова рога глутамат должен вызывать длительную деполяризацию астроцитов, способствуя генерации или распространению судорожной активности [11]. В астроцитах также находятся особые каналы, активность которых зависит от уровня экстрацеллюлярного глутамата ЦНС; таким образом, эти каналы в большой степени определяют активность мозга как в норме, так и при нарушении метаболизма данного трансмиттера. Так, в случае небольшого (вследствие патологии) «поглощения» глутамата его высокие концентрации остаются в экстрацеллюлярном пространстве, что может вызвать чрезмерное возбуждение нейронов и их возможную гибель в результате токсикоза. Однако эффектное «очищение» межклеточного пространства от глутамата (отражением чего, возможно, является увеличение числа глиоцитов) непрямым путем также может вызвать чрезмерную нейронную активность. Включение компенсаторных механизмов будет способствовать «поддержанию» в синаптической щели «досудорожного» уровня трансмиттера. В этот процесс активно должны быть включены макроглиоциты.

ЛИТЕРАТУРА

- Жвания М., Болквадзе Т., Джапаридзе Н. и др. Влияние киндлинга на ГАМК-ергические нейроны гиппокампа и пириформной коры крысы. Бюл. экспер. биол., 2005, т. 140, № 1, с. 48–50.
- Жвания М., Джапаридзе Н. и Болквадзе Т. Структурные особенности некоторых интернейронов поля САЗ и мшистых волокон. Морфология, 2005, т. 127, № 1, с. 78–83.
- Bachoo R.M., Kim R.S., Ligon K.L. et al. Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, v. 101, № 22, p. 8384–8389.
- Cossart R., Petaniek Z., Dimitrin D. et al. Interneurons targeting similar layers receive synaptic inputs with similar kinetics. Hippocampus, 2006, v. 26, № 2, p. 408–420.
- 5. Covolan L., Ribeiro L.T., Longo B.M., Mello L.E. Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus. Hippocampus, 2000, v. 10, № 2, p. 169–180.
- Girardi E., Ramos A.J., Vanore G. and Brusco A. Astrocytic response in hippocampus and cerebral cortex in an experimental epilepsy model. Neurochem. Res., 2004, v. 18, № 2, p. 371– 377.
- Mody I. Synaptic plasticity and kindling. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsy. Third Edition: Advances in Neurology. 1999, v. 79, p. 631–643.
- 8. Paxinos G. and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, Academic, 1998.
- Seifert G., Huttman K., Schramm J. and Steinhauser Ch. Enhanced relative expression of glutamate receptor 1 flip AMPA receptor subunits in hippocampal astrocytes of epilepsy patients with Ammon's Horn sclerosis. Neuroscience, 2004, v. 24, № 8, p. 1996–2003.

- Urban Z., Magloczky Z. and Freund T.E. Calretinin-containing interneurons innervate both principal cells and interneurons in the CA1 region of the human hippocampus. Acta Biol. Hung., 2002, v. 53, № 1–2, p. 205–220.
- Vessal M., Dugani C.B., Solomon D.A. et al. Might astrocytes play a role in maintaining the seizure-prone state? Brain Res., 2005, v. 1044, № 2, p. 190–196.
- Vida I., Bartos M. and Jonas P. Shunting inhibition improves robustness of gamma oscillations in hippocampal interneuron networks by homogenizing firing rates. Neuron, 2006, v. 49, № 1, p. 107–117.
- Vida L. and Frotscher M. A hippocampal interneuron associated with the mossy fiber system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000, v. 97, № 3, p. 1275–1280.
- West M., Slomianka I. and Gundersen H.J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of rat hippocampus using optical fractionators. Anat. Rec., 1991, v. 231, p. 482–497.

Поступила в редакцию 23.04.08 Получена после доработки 25.03.09

QUANTITATIVE ANALYSIS OF GLIOCYTES AND MACROGLIOCYTE–NEURONAL RATIO IN RAT HIPPOCAMPUS AFTER KINDLING

M.G. Zhvania, T.N. Bolkvadze, T.G. Chkhikvishvili, N.T. Kotaria, N.D. Dzhaparidze, T.G. Lordkipanidze and T.Z. Bikashvili

Gliosis is one of the main morphological correlates of epilepsy. It is presented predominantly by proliferation and hypertrophy of astrocytes and activated microglia (macrophages) and is most characteristic to those areas of the epileptogenic zones, where the loss of neurons is significant. One of such structures is the hippocampus, the sclerosis of which develops already at the early stages of epileptogenesis. Using the slides stained with cresylviolet, the quantitative analysis of gliocytes and of macrogliocyte-neuronal ratio was performed in all the areas of the hippocampus 14 and 30 days after electrical kindling. After both time intervals, the decrease of the number of neurons and the increase of the number of gliocytes were found in all the regions of the hippocampus. After 14 days the changes of gliocytes were particularly significant in the radial and oriental layers of the Ammon's horn, after 30 days they were also pronounced in CA3 pyramidal cell layer of and in hilus. Thus, hippocampal gliocytes are actively involved in the epileptogenesis.

Key words: gliocytes, quantitative analysis, hippocampus, kindling, rat.

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