

УДК 611.018.8:612.61

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СУБЪЕДИНИЦЫ ГАМК<sub>B1</sub> РЕЦЕПТОРА К ГАМК В РАЗНЫХ СЛОЯХ НЕОКОРТЕКСА КРЫС В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

© 2019 г. Л. И. Хожай<sup>1</sup>, \*, В. А. Отеллин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*E-mail: astarta0505@mail.ru

Поступила в редакцию 06.06.2019 г.

После доработки 17.06.2019 г.

Принята к публикации 21.06.2019 г.

Задача настоящей работы заключалась в исследовании уровней содержания субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> рецептора ГАМК<sub>B</sub> в разных слоях неокортекса крыс в отдаленные постнатальные сроки после перинатальной гипоксии. В работе были использованы модели недоношенной беременности человека и воздействия гипоксии в неонатальный период, как общепринятые и широко используемые модели для изучения последствий повреждения мозга в ранний период развития. Субъединицу ГАМК<sub>B1</sub> в нейронах и нейропиле сенсорной области неокортекса выявляли иммуногистохимической реакцией. Показали, что у контрольных крыс, достигших половозрелого возраста, уровень субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> в разных слоях коры различен. В верхних слоях II–IV неокортекса и слое VI, как в нейронах, так и нейропиле, обнаружен высокий уровень субъединицы ГАМК<sub>B1</sub>, однако в глубоком слое V уровень субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> оказался ниже. У крыс, переживших воздействие острой перинатальной гипоксии, в нейронах всех слоев неокортекса значительно снижен (в 2 раза) уровень субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> по сравнению с контрольными значениями. В конечном итоге перинатальная гипоксия может изменять состояние нейронов, экспрессирующих субъединицу ГАМК<sub>B1</sub>, и последствия этих изменений могут сохраняться у взрослых животных. Следствием снижения уровня субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> может быть уменьшение трансмиссии ГАМК, повышение количества высвобождающегося глутамата, усиливающего возбуждение и увеличивающего нейротоксичность. Полученные результаты расширяют возможности поиска новых средств, необходимых для ликвидации последствий острой гипоксии в неонатальный период.

**Ключевые слова:** субъединица ГАМК<sub>B1</sub>, рецепторы, неокортекс, перинатальная гипоксия

**DOI:** 10.1134/S0041377119090062

Одной из актуальных задач современной неврологии является изучение динамики становления структур и функций головного мозга на ранних этапах онтогенеза. Гипоксия новорожденных привлекала и привлекает внимание большого числа исследователей разных специальностей. Повреждения головного мозга после воздействия гипоксии (ишемии) в перинатальный период относятся к основным причинам детской смерти. Показано, что значительная часть новорожденных, перенесших тяжелую гипоксию (ишемию) в неонатальный период, имеет психоневрологические расстройства различной степени тяжести (устойчивые нарушения в виде задержки умственного и двигательного развития, детского церебрального паралича, эпилепсии и др. с последующей инвалидностью с детства). Клиницистами отмечено, что у новорожденных сравнительно часто развиваются энцефалопатии, приводящие в последующем онтогенезе к двигательным нарушениям, судорогам, расстройствам психического развития и другим признакам церебральной недостаточности

(Neakas et al., 1996; Rees et al., 2011; Отеллин и др., 2014).

Для моделирования перинатальной церебральной патологии чаще всего используют лабораторных грызунов, полагая, что между ними и высшими млекопитающими имеется достаточно большое сходство в кровоснабжении мозга и биологии нервных клеток. По ряду морфологических критериев считают, что степень развития мозга крысенка на 2-е постнатальные сутки по структурно-функциональным показателям соответствует уровню развития мозга недоношенного ребенка человека (Clancy et al., 2001). Известно, что функциональные и поведенческие реакции в головном мозге контролируются нейротрансмиттерами, нейропептидами и другими биологически активными соединениями.

Одним из основных тормозных нейротрансмиттеров является ГАМК, активирующая в ЦНС две группы рецепторов: ионотропные (ГАМК<sub>A</sub>/ГАМК<sub>C</sub>) и метаботропные (ГАМК<sub>B</sub>) рецепторы (Anwyll, 1991).

Рецепторы ГАМК<sub>B</sub> представляют собой гетеродимеры, состоящие из двух субъединиц: ГАМК<sub>B1</sub> и ГАМК<sub>B2</sub>, связанных с гетеротримерным G-белком, и проводящие продолжительное синаптическое торможение (Bettler, Tiao, 2006; Bourgon, 2001). Однако весьма мало известно об их субклеточной локализации. Определено, что рецепторы ГАМК<sub>B</sub> могут находиться как пре-, так и постсинаптически (Brown et al., 1979; Chaudhry et al., 1995; Castillo et al., 1997), при этом не известно, располагаются ли постсинаптические рецепторы ГАМК<sub>B</sub> в синаптической щели напротив места выброса ГАМК, или расположены на удалении от синапса. Существует мнение, что рецепторы ГАМК<sub>B</sub> расположены далеко от места выброса нейротрансмиттера и активируются ГАМК, покидающей синаптическую щель, т.е. при спilloвере ГАМК (Scanziani, 1998; Cherubini, Conti, 2001). С другой стороны, известно, что изменения числа, активности и (или) локализации рецепторов могут значительно изменять уровень синаптического торможения (Bettler, Tiao, 2006).

Показано, что рецепторы ГАМК<sub>B</sub> могут играть важную роль в снижении чрезмерного глутаматергического возбуждения, которое имеет место при гипоксии (ишемии). Активация пресинаптических рецепторов ГАМК<sub>B</sub> может сокращать высвобождение глутамата и, тем самым, приводить к снижению его избыточного уровня, оказывающего токсическое действие и вызывающего гибель нейронов. Участие возбуждающих глутаматных рецепторов в механизмах повреждения структуры мозга и их причастность к гибели клеток после воздействия гипоксии (ишемии) в значительной степени изучено (Schwartz-Bloom, Sah, 2001). Однако реакции тормозных ГАМК<sub>B</sub> рецепторов на воздействие гипоксии исследованы крайне мало (Schwartz-Bloom, Sah, 2001). Влияние гипоксии на экспрессию рецепторов ГАМК<sub>B</sub> в мозге взрослых животных исследовали в основном в гиппокампе (Bourgon, 2001; Cimaroni et al., 2009).

В настоящее время в имеющейся литературе нет сведений о распределении элементов ГАМКергической системы в разных слоях неокортекса у животных, перенесших перинатальную гипоксию. Между тем, этот вопрос представляет значительный интерес, поскольку каждый слой неокортекса характеризуется своеобразным клеточным составом, особенностями строения афферентных и эфферентных межнейронных связей и их участием в многочисленных функциях головного мозга. В связи с этим задача настоящей работы заключалась в изучении уровня содержания субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> в разных слоях неокортекса крыс в отдаленные постнатальные сроки после воздействия перинатальной гипоксии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа проведена на лабораторных крысах линии Wistar из питомника Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург).

**Гипоксия.** Воздействие гипоксии на новорожденных крысят осуществляли в отдельной камере в течение 1 ч при содержании в дыхательной смеси кислорода, углекислого газа и азота в соотношении (7.6–7.8) : (0.15–0.21) : 91.8%, при температуре 21.3–23.0°C и нормальном общем атмосферном давлении (760 мм рт. ст.). Воздействие гипоксии проводили на 2-е постнатальные сут, когда развитие головного мозга крыс соответствует стадии развития ЦНС у недоношенных детей человека (Clancy et al., 2001). В работе использовали 2 группы животных: группу крысят, которую подвергали в барокамере воздействию гипоксии и группу контрольных животных того же возраста, которых помещали в барокамеру без воздействия гипоксии. Каждая группа содержала по 8–10 крысят, отобранных из разных пометов. У животных исследовали сенсомоторную область неокортекса через 90 сут постнатального развития.

**Гистологическое исследование.** Головной мозг извлекали и фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7.4). Материал обезжизняли, заливали в парафин по общепринятой методике и готовили серийные фронтальные срезы мозга толщиной 6–7 мкм на уровне брегмы (1.80–2.04 мм) (Paxinos, Watson, 1998). Затем срезы помещали на предметные стекла SuperFrost Plus Gold (Menzel-Glaser, Германия).

**Иммуногистохимическая реакция.** Этим методом на гистологических срезах выявляли нейроны, содержащие субъединицу ГАМК<sub>B1</sub>, используя первичные поликлональные кроличьи антитела (Anti-GABA<sub>RB1</sub>; Abcam, США). Антитела разводили в 1000 раз, окрашивали в течение 18 ч при 4°C. В качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора EnVision + System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США) и окрашивали в течение 40 мин при 30°C в термостате. Для визуализации продукта реакции применяли хромоген DAB+ (Dako, Дания). После проведения иммуногистохимической реакции часть срезов докрашивали гематоксилином Майера (Bio-Optica, Италия) и заключали в заливочную среду Permaunt (Termo, США).

**Статистическая оценка оптической плотности продукта реакции.** Все процедуры при проведении иммуногистохимической реакции были стандартизированы и осуществлялись одновременно для гистологических срезов, полученных от контрольных и подопытных животных.

Количественную оценку иммунореактивности производили с использованием системы анализа изображения, включающей световой микроскоп Olympus CX31 (Япония), цветную цифровую камеру VideoZavr Standard VZ-C31Sr и программное обеспечение Видеозавр Мультиметр 2.3 (разработка ООО

АТМ-практика, Санкт-Петербург). Оценивали оптическую плотность (D) продукта реакции в цитоплазме иммунопозитивных нейронов и в нейропиле в сети иммунопозитивных отростков, терминалей, а также в скоплениях мелких и крупных гранул (последние предположительно считаются терминальными (Guthmann et al., 1998)). Для этого, используя систему анализа изображений, контуром выделяли иммуноокрашенные нейроны, участки сети отростков и скопления гранул. Уровень содержания субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> выражали в отн. ед. оптической плотности продукта иммунной реакции D (отн. ед.).

Определяли среднее значение D интенсивности окраски в иммунопозитивных нейронах и нейропиле при увеличении объектива 100×. Измерения проводили на 10 серийных срезах мозга, взятого от 3–4 животных каждой исследуемой группы. Вычисляли среднее арифметическое значение и ошибку среднего значения. Для анализа и сравнения результатов между разными группами животных использовали *t*-критерий Стьюдента и *oneway*ANOVA (Statistica 8.0, Statsoft Inc., USA) с достоверностью различий при  $P < 0.05$ .

**Использованные реактивы:** антитела Anti-GABABR1 antibodies (Abcam, США); реактивы из набора En-Vision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США); хромоген DAB+ (Dako, Дания); гематоксилин Майера (Bio-Optica, Италия); синтетическая среда для заключения гистологических срезов Permaunt (Termo, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Распределение субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> в разных слоях сенсомоторной области неокортекса у контрольных животных через 90 сут постнатального развития.** У контрольных животных значения D продукта иммуногистохимической реакции на выявление уровня субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> в разных слоях неокортекса различаются. В цитоплазме нейронов в верхних слоях II–IV неокортекса эти значения самые высокие (табл. 1). В глубоких слоях V и VI они ниже в 1.5 и 1.3 раза соответственно (табл. 1), при этом в слое V эти значения ниже, чем в слое VI. В нейропиле уровень содержания субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> (значения D) в отростках, терминалях и синаптических структурах самый высокий в слое I. Затем к глубокому слою VI он постепенно снижается (в 3.3 раза; табл. 1).

**Распределение субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> в разных слоях сенсомоторной области неокортекса у животных, переживших перинатальную гипоксию, через 90 сут постнатального развития.** У животных, переживших воздействие гипоксии в перинатальный период, уровень содержания субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> (значения D) как в цитоплазме нейронов, так и в отростках и синаптических структурах в нейропиле значительно снижен по сравнению с таковым в контроле. Однако так же, как у контрольных животных, уровень

**Таблица 1.** Значения оптической плотности D продукта иммунной реакции на выявление субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> рецептора ГАМК<sub>B</sub> в разных слоях неокортекса в нейронах и нейропиле крыс через 90 сут постнатального развития в контроле и после воздействия перинатальной гипоксии

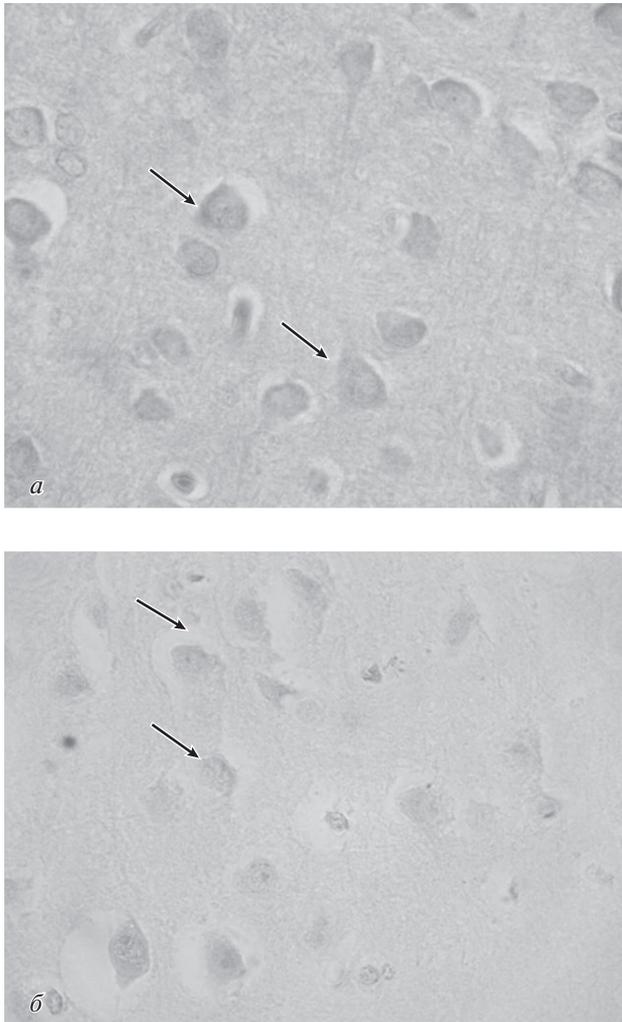
Локализация в неокортексе	D, отн.ед.	
	контроль	после гипоксии
Слой I: нейропиле	0.08 ± 0.004*	0.052 ± 0.007**
Слой II–IV: нейроны, нейропиле	0.205 ± 0.012* 0.064 ± 0.04*	0.102 ± 0.006** 0.044 ± 0.005*
Слой V: нейроны, нейропиле	0.133 ± 0.008* 0.028 ± 0.004	0.057 ± 0.007** 0.035 ± 0.005
Слой VI: нейроны, нейропиле	0.153 ± 0.006* 0.024 ± 0.006	0.083 ± 0.005** 0.044 ± 0.008*

Примечание. Различия достоверны при  $P < 0.05$ : \*между значениями в каждой группе и \*\* между значениями в разных группах.

содержания субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> (значения D) в цитоплазме нейронов самый высокий в верхних слоях II–IV неокортекса. В глубоких слоях V и VI, примерно как и в контроле, этот уровень ниже в 1.8 и 1.3 раза, соответственно (табл. 1). В нейропиле уровень субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> (значения D) в отростках и синаптических структурах примерно одинаковый во всех слоях неокортекса (различия не достоверны,  $P < 0.05$ ) (табл. 1).

У подопытных животных уровень субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> (значения D) в цитоплазме нейронов в верхних слоях II–IV неокортекса значительно ниже (в 2 раза), чем таковой в контроле ( $P < 0.05$ ). В слое V и VI содержание субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> (значения D) ниже контрольного в 2 и 1.8 раза соответственно ( $P < 0.05$ ) (табл. 1; рис. 1а, б). В нейропиле во всех слоях неокортекса уровень субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> (значения D) в отростках, терминалях и синаптических структурах был в 1.5 раза ниже уровень у контрольных животных ( $P < 0.05$ ) (табл. 1).

Результаты исследования показали, что в сенсомоторной области неокортекса у контрольных животных, достигших половозрелого возраста, самый высокий уровень содержания субъединицы ГАМК<sub>B1</sub> как в нейронах, так и в нейропиле наблюдался в верхних слоях II–IV неокортекса. Достаточно высоким ее уровень был и в слое VI. Присутствие в этих слоях коры значительного количества “непирамидных” вставочных ГАМКергических интернейронов, способных экспрессировать как ГАМК, так и рецепторные белки к ней, может объяснять наличие высокого уровня содержания субъединицы ГАМК<sub>B1</sub>. Большое количество контактных зон в этих слоях обеспечивается отростками, приносящими сюда афферентную информацию от нейронов таламуса, а также ассоциативных и комиссуральных волокон, которыми эти слои связаны с другими областями неокортекса.



**Рис. 1.** Иммуногистохимическая реакция на выявление субъединицы  $\text{GAMK}_{\text{B1}}$  в неокортексе крысы (сенсомоторная область, слой VI) через 90 сут постнатального развития в контроле (а) и после перинатальной гипоксии (б). Стрелки показывают иммунопозитивные нейроны. Оптическая плотность продукта реакции после перинатальной гипоксии снижается. Об.: 100  $\times$ .

Напротив, самый низкий уровень содержания субъединицы  $\text{GAMK}_{\text{B1}}$  был отмечен в слое коры V. Вероятно, это объясняется тем, что в этом слое вставочных нейронов меньше, здесь присутствуют большие пирамидные нейроны, аксоны которых представляют собой проекционные, быстро проводящие сигнал, миелиновые волокна, которые направляются к таламусу, полосатому телу, ядрам ствола мозга и спинного мозга.

У крыс, переживших воздействие острой перинатальной гипоксии, выявлено значительное снижение (в 2 раза) уровня содержания субъединицы  $\text{GAMK}_{\text{B1}}$  в нейронах всех слоев неокортекса по сравнению с контролем, при этом в нейропиле в верхних слоях неокортекса он незначительно ниже, а в гл-

боких слоях V и VI примерно соответствует контрольным значениям. Вероятно, воздействие гипоксии в неонатальный период изменяет состояние  $\text{GAMK}_{\text{B1}}$  интернейронов, влияет на синаптогенез, и эти последствия сохраняются у взрослых животных. Известно, что одной из причин либо повреждения нейронов, либо их гибели, является так называемый, глутаматный каскад, возникающий в ответ на гипоксию. Воздействие гипоксии на нейроны вызывает повышенную экспрессию глутамата, в свою очередь, возбуждающего NMDA рецепторы, которые открывают натриевые и кальциевые каналы, при этом в клетку поступает значительное количество кальция в обмен на натрий. Одновременно в нейроне интенсивно синтезируются вторичные мессенджеры, которые вместе со свободным кальцием активируют внутриклеточные ферментные системы, что приводит к еще большему высвобождению глутамата. Избыточное содержание в цитоплазме свободного кальция служит одной из причин активации ферментных систем, разрушающих ДНК, белки и фосфолипиды (Paradia, Hardingham, 2007).

Интересные данные были получены при изучении влияния гипоксии (ишемии) на уровни субъединиц  $\text{GAMK}_{\text{B1}}$  и  $\text{GAMK}_{\text{B2}}$  в гиппокампе. Было показано, что через 4 ч после гипоксии (ишемии) экспрессия обеих субъединиц почти отсутствовала в CA1 (Cho et al., 2004). Однако механизм нарушения экспрессии рецепторных белков после воздействия гипоксии остался неясным. Тем не менее, считают, что  $\text{GAMK}_{\text{B}}$  рецепторы играют критическую роль в точном регулировании тормозной синаптической трансмиссии  $\text{GAMK}$  (Cossart et al., 2001).

Известно, что рецепторы  $\text{GAMK}_{\text{B}}$  связаны с трехмерным G-белком (Clark, Cull-Candy, 2002), который способствует сопряжению рецепторов с определенными эффекторными молекулами или ионными каналами и выступает в качестве молекулярного переключателя. Активация рецептора, содержащего субъединицу  $\text{GAMK}_{\text{B1}}$ , опосредуемая G-белком, может запускать различные реакции: ингибирование активности аденилатциклазы, стимулирование фосфолипазы A2, активирование калиевых каналов, инактивирование потенциал-зависимых кальциевых каналов и моделирование инозитолфосфолипидного гидролиза (Clark, Cull-Candy, 2002). Многие фармакологические психотропные препараты действуют через рецепторы, сопряженные с G-белками, в том числе, наркотические вещества героин, кокаин и др. В связи с этим, рецепторы  $\text{GAMK}_{\text{B}}$  являются вероятными мишенями для фармакологических препаратов при широком спектре психиатрических и неврологических расстройств.

В заключение следует отметить, что воздействие гипоксии в пренатальный период приводит к значительному снижению уровня субъединицы  $\text{GAMK}_{\text{B1}}$ , которое сохраняется у животных в отдаленные постнатальные сроки. Следствием такого снижения

уровня ГАМК<sub>B1</sub>, вероятно, будет сокращение тормозной нейротрансмиссии ГАМК, смещение баланса высвобождающегося глутамата в сторону его увеличения, влекущее за собой усиление возбуждения и повышение нейротоксичности.

Представленная работа имеет фундаментальный характер, но направлена на решение и прикладных проблем, поскольку определяет одну из мишеней воздействия гипоксии, а полученные результаты могут расширить возможности поиска новых средств, необходимых для ликвидации последствий острой гипоксии в неонатальный период.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.И. Мироновой (Лаборатория нейроэндокринологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН) за предоставленную возможность использовать компьютерное программное обеспечение для анализа оптической плотности продукта иммуногистохимической реакции.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановой темы Института физиологии им. И.П. Павлова РАН

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и при соблюдении требований Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных животных. Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Работа не содержит результатов экспериментов с участием людей в качестве объектов исследований.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликтов интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Otellin V.A., Khozhai L.I., Shishko T.T.* 2014. Реакции нервных элементов неокортекса на воздействие гипоксии в раннем периоде новорожденности. Журн. эволюц. биохим. физиол. 50(2) : 148–154. (*Otellin V.A., Khozhai L.I., Shishko T.T.* 2014. Reactions of nervous elements neocortex on influence hypoxia in the early neonatal period. J. Exper. Theor. Physics. 50(2) : 148–154).
- Anwyl R.* 1991. Modulation of vertebrate neuronal calcium channels by transmitters. Brain Res. Brain Res. Rev. 16 : 265–281.
- Bettler B., Tiao J.Y.* 2006. Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABA<sub>B</sub> receptors. Pharmacol. Ther. 110 : 533–543.
- Bouron A.* 2001. Modulation of spontaneous quantal release of neurotransmitters in the hippocampus. Prog. Neurobiol. 63 : 613–635.
- Brown D.A., Adams P.R., Higgins A.J., Marsh S.* 1979. Distribution of gaba-receptors and gabacarrriers in the mammalian nervous system. J. Physiol. 75 : 667–671.
- Castillo P.E., Malenka R.C., Nicoll R.A.* 1997. Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. Nature. 388 : 182–186.
- Chaudhry F.A., Lehre K.P., van Lookeren Campagne M.* 1995. Glutamate transporters in glial plasma membranes: Highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. Neuron. 15 : 711–720.
- Cherubini E., Conti F.* 2001. Generating diversity at GABAergic synapses. Trends Neurosci. 24 : 155–162.
- Cho S., Liu D., Fairman D., Li P., Jenkins L., McGonigle P., Wood A.* 2004. Spatiotemporal evidence of apoptosis-mediated ischemic injury in organotypic hippocampal slice cultures. Neurochem. Int. 45 : 117–127.
- Cimarosi H., Kantamneni S., Henley J.M.* 2009. Ischaemia differentially regulates GABA<sub>B</sub> receptor subunits in organotypic hippocampal slice cultures. Neuropharmacol. 56 : 1088–1096.
- Clancy B., Darlington R.B., Finlay B.L.* 2001. Translating developmental time across mammalian species. Neurosci. 105 : 7–17.
- Clark B.A., Cull-Candy S.G.* 2002. Activity-dependent recruitment of extrasynaptic NMDA receptor activation at an AMPA receptor-only synapse. J. Neurosci. 22 : 4428–4436.
- Cossart R., Tyzio R., Dinocourt C.* 2001. Presynaptic kainate receptors that enhance the release of GABA on CA1 hippocampal interneurons. Neuron. 29 : 497–508.
- Guthmann A., Fritschy J.M., Ottersen O.P., Torp R., Herbert H.* 1998. GABA, GABA transporters, GABA(A) receptor subunits, and GAD mRNAs in the rat parabrachial and Kölliker-Fuse nuclei. J. Comp. Neurol. 400 : 229–243.
- Neakas C., Buwalda B., Luiten P.* 1996. Hypoxia and brain development. Progress Neurobiol. 49 : 1–51.
- Papadia S., Hardingham G.E.* 2007. The dichotomy of NMDA receptor signaling. Neuroscientist. 13 : 572–579.
- Paxinos G., Watson C.* 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. L.: Acad. Press. 456 p.
- Rees S., Harding R., Walker D.* 2011. The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain. Int. J. Dev. Neurosci. 29 : 551–63.
- Scanziani M., Gahwiler B.H., Chazotte S.* 1998. Target cell-specific modulation of transmitter release at terminals from a single axon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95 : 12004–12009.
- Schwartz-Bloom R.D., Sah R.* 2001. Gamma-aminobutyric acid (A) neurotransmission and cerebral ischemia. J. Neurochem. 77 : 353–371.

## DISTRIBUTION OF THE GABA<sub>B1</sub> SUBUNIT OF THE RECEPTOR TO GABA IN DIFFERENT LAYERS OF RAT NEOCORTEX IN THE REMOTE TIMES AFTER PERINATAL HYPOXIAS

L. I. Khozhai<sup>a, \*</sup> and V. A. Otellin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, 199034 Russia*

<sup>\*</sup>*E-mail: astarta0505@mail.ru*

The study of distribution of GABA<sub>B1</sub> subunit of GABA<sub>B</sub> receptor in different layers of rats neocortex in remote post-natal times after perinatal hypoxias was the object of the present work. In this work, we used models of preterm pregnancy in humans and effect of hypoxia in the neonatal period as generally accepted and widely used models for studying the effects of brain damage in the early period of development. The GABA<sub>B1</sub> subunit in the neurons and neuropil of the sensorimotor region of the neocortex was detected by an immunohistochemical reaction. It has been revealed that in the control rats which have reached sexually mature of age, the level of GABA<sub>B1</sub> subunit differs in different layers of neocortex. In upper layers II–IV and deep layer VI of the neocortex as in neurones and neuropil, the high level of the GABA<sub>B1</sub> subunit is present. However, the level of GABA<sub>B1</sub> subunit in deep layer V was found to be more low. At the rats which had experienced the influence of sharp perinatal hypoxia, significant decrease (in 2 times) was revealed in the level of GABA<sub>B1</sub> subunit in comparison with control values in neurones of all layers of the neocortex. As result, perinatal the hypoxia can invoke change of the state of neurones expressing GABA<sub>B1</sub>, and consequences of these changes can be remained at mature animals. Reduction of inhibitory transmission GABA, increase of quantity released glutamate, enhancing excitation and increasing neurotoxicity might be a consequence of the decrease in the level of GABA<sub>B1</sub> subunit. The present research is directed to revealing of the target of influence perinatal to a hypoxia, and the received results will promote searching for new means that are necessary for liquidation of consequences of a sharp hypoxia in the neonatal period.

**Keywords:** GABA<sub>B1</sub> subunit, receptors, neocortex, perinatal hypoxia