

## ХАРАКТЕР ЛОКАЛИЗАЦИИ GABA-ИММУНОПОЗИТИВНЫХ НЕЙРОНОВ И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ GAT<sub>1</sub> ТРАНСПОРТЕРА GABA В НЕОКОРТЕКСЕ КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИИ В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

© 2022 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, Россия

\*e-mail: astarta0505@mail.ru

Поступила в редакцию 06.07.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

Целью работы было изучение распределения нейронов, содержащих GABA, и уровня экспрессии GAT<sub>1</sub> в разных слоях неокортекса крыс в неонатальный период после перинатальной гипоксии. Воздействие гипоксии на мозг новорожденных крыс осуществляли на 2-е неонатальные сутки в течение 1 ч при содержании кислорода в дыхательной смеси – 7.8%. Были применены иммуногистохимические реакции на выявление GABA и GAT<sub>1</sub>. Изучали соматосенсорную область неокортекса на 5-е и 10-е постнатальные сутки (П5, П10). Показано, что на ранних сроках неонатального периода (П5) воздействие перинатальной гипоксии приводит к увеличению числа тормозных интернейронов во всех слоях неокортекса. К концу неонатального периода (П10) их численность в слоях коры снижается, а в слое V значительно сокращается. На протяжении неонатального периода у контрольных животных во всех слоях неокортекса уровень экспрессии GAT<sub>1</sub> постепенно повышается, после воздействия перинатальной гипоксии происходит значительное снижение экспрессии GAT<sub>1</sub>, в том числе, в слоях неокортекса, где количество GABAергических нейронов соответствует контрольному значению. Эти факты свидетельствуют о том, что воздействие острой перинатальной гипоксии может приводить к изменению синаптической трансмиссии GABA в всех слоях неокортекса в конце неонатального периода.

*Ключевые слова:* неокортекс, гипоксия, GABA, транспортер GAT<sub>1</sub>, неонатальный период

DOI: 10.31857/S0044452922060043

Известно, что в неонатальный период головной мозг отличается высокой чувствительностью к воздействию неблагоприятных факторов среды. Гипоксия/ишемия в это время является одним из мощных повреждающих факторов, приводящих к структурно функциональным нарушениям в ЦНС и представляет одну из основных причин детской смертности на ранних постнатальных сроках развития. Новорожденные, в условиях преждевременных родов, испытавшие перинатальную гипоксию, часто имеют сниженную массу тела, а впоследствии, умственную отсталость, синдром дефицита внимания, гиперактивность [1]. Более 70% недоношенных детей, переживших перинатальную гипоксию, страдают от апноэ и других респираторных нарушений, которые приводят к церебральной гипоксемии. Установлено, что результатом повреждающего действия низкого содержания кислорода в тканях организма в неонатальный период являются изменение дифференцировки клеток, частичная утрата нейронов, глии и их клеток-предшественников [2, 3].

Считается, что в период развития и становления формаций мозга расположение и упорядоченное распределение разных типов нейронов в его струк-

турах, в частности, в неокортексе, имеют критическое значение для нормального функционирования ЦНС [4, 5]. Показано, что перинатальная гипоксия оказывает повреждающее действие на тормозные GABAергические нейроны неокортекса [3, 6], однако, вопрос о распределении нейронов, в которых синтезируется GABA, и динамике изменения их численности в разных слоях неокортекса в неонатальный период после воздействия гипоксии, изучен недостаточно.

Транспортные белки для GABA представлены четырьмя классами, из которых GAT<sub>1</sub> является одним из основных транспортеров при синаптической GABAергической нейротрансмиссии [7]. Предполагается, что GAT<sub>1</sub> является Na<sup>+</sup>-зависимым транспортным белком обратного захвата, локализующийся, как правило, на плазматической мембране отростков и тел нейронов [8, 9]. Кроме того, этот транспортный белок был выявлен в цитоплазме нейронов и проксимальных отделах их отростков, в терминалях аксонов, участвующих в формировании симметричных синапсов, в отростках астроцитов [10]. Основная функция GAT<sub>1</sub> заключается в переносе через мембрану аниона этой аминокислоты на основе градиента катиона на-

трия. Эффективность GABAергической нейротрансдачи определяется скоростью обратного захвата GABA, осуществляемого GAT<sub>1</sub> транспортером, из синаптической щели или межклеточного пространства [11, 12]. Установлено, что GAT<sub>1</sub> регулирует активность основных пирамидных нейронов коры и нарушение его экспрессии может быть связано с многочисленными патологическими состояниями головного мозга, включая эпилепсию [7, 12, 13]. Несмотря на значительные повреждения головного мозга, вызываемые гипоксией в ранний период развития, до сих пор не существует эффективных методов коррекции или лечения последствий ее действия.

Транспортеры GABA, а особенно, GAT<sub>1</sub>, от функции которых зависит баланс процессов торможения и возбуждения в мозге, могут выступать мишенями для фармакологического воздействия. Для этого необходимо представлять локализацию экспрессии транспортера в формациях мозга на ранних сроках развития. Вопрос о динамике экспрессии GAT<sub>1</sub> в разных слоях неокортекса в неонатальный период развития после воздействия гипоксии до настоящего времени остается мало изученным.

В связи с этим целью работы было исследование распределения нейронов, содержащих GABA, и уровня экспрессии GAT<sub>1</sub> в разных слоях неокортекса после воздействия перинатальной гипоксии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на лабораторных крысах линии Wistar из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН” (Санкт-Петербург). Все процедуры с животными проводили в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и при соблюдении требований Директив Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных животных, а также требований Комиссии по контролю содержания и использования лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (Протокол № 06/14 от “14” июня 2022 г.).

В работе использовали модель недоношенной беременности человека, т.е. модель общей гипоксии, которая воспроизводит спектр повреждений мозга, наблюдаемых у недоношенных новорожденных детей при условии недоразвития респираторной системы и нарушения респираторных функций (асфиксии). Считается, что развитие мозга новорожденных крыс на 1–2-е сутки соответствует степени развития мозга преждевременно родившихся детей (примерно 29–30 нед беременности) [1]. Использование этой модели исключает смертность животных, при этом гипоксия оказывает повреждающее действие на структуры ЦНС.

### *Воздействие гипоксии*

Воздействие общей острой гипоксии осуществляли на 2-е постнатальные сутки в специальной камере в течение 1 ч при содержании в дыхательной смеси: кислорода – 7.6–7.8%; углекислого газа – 0.15–0.21%; азота – 91.8%, при температуре 21.3–23°C и нормальном общем атмосферном давлении (760 мм рт.ст.).

В работе использовали 2 группы животных: (1) крысы, подвергавшиеся в барокамере воздействию гипоксии ( $n = 12$ ); и (2) контрольные животные тех же возрастных сроков ( $n = 12$ ). Исследование проводили на 5-е и 10-е постнатальные сутки (P5, P10), т.е. в середине и конце неонатального периода. Изучали соматосенсорную область неокортекса, которая является зоной обработки информации, поступающей от сенсорных рецепторов (тактильных, болевых, температурных, давления), инициации мышечного ответа, двигательного поведения, она имеет связи с таламическими структурами и спинным мозгом, здесь осуществляется обработка сигналов, полученных от чувствительных периферических рецепторов.

### *Гистологические и иммуногистохимические методы исследования*

Головной мозг извлекали и фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (рН 7.4), заливали в парафин по общепринятой методике и готовили серийные фронтальные срезы мозга толщиной 6–7 мкм на уровне брегмы – 0.60–0.40 мм (по стереотаксическому атласу координатных таблиц мозга крыс на P5 и P10 [14]). Срезы помещали на предметные стекла Super-Frost Plus Gold (Menzel-Glaser, Германия) и получали цифровые изображения серийных гистологических срезов при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) при увеличении объектива 100× и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия).

Иммуногистохимическую реакцию на GABA проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA antibody, ab8891, Abcam, Великобритания) в разведении 1:1000. После процедуры теплового демаскирования белков в цитратном буфере (рН 6.1) (Dako, Дания) в течение 25 мин и блокировки эндогенной пероксидазы раствором 3% перекиси водорода в течение 30 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при 4°C в течение 16 ч. В качестве вторичных антител использовали Goat anti-rabbit IgG H&L(HRP) (Abcam, Великобритания), помещая в них срезы на 40 мин при комнатной температуре.

Иммуногистохимическую реакцию на GAT<sub>1</sub> проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA trans-

porter 1; GAT<sub>1</sub>; ab426, Abcam, Великобритания) в разведении 1:100. После процедуры теплового демаскирования белков в цитратном буфере (рН 6.1) (Dako, Дания) в течение 20 мин и блокировки эндогенной пероксидазы раствором 3% перекиси водорода в течение 30 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при 4°C в течение 18 ч. В качестве вторичных реагентов для GAT<sub>1</sub> использовали реактивы из набора EnVision+System- HRP Labeled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США). Срезы помещали во вторичные антитела на 30 мин при комнатной температуре. Визуализацию продукта обеих иммунных реакций осуществляли использованием хромогена DAB+ (Dako, Дания), специфичность реакций проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител). Срезы заключали в синтетическую среду Permaunt (Termo, США).

*Статистическая обработка полученных данных и оценка оптической плотности продукта иммуногистохимической реакции*

При проведении иммуногистохимических реакций все процедуры были стандартизированы и осуществлялись одновременно для гистологических срезов мозга, полученных от контрольных и подопытных животных.

Количество иммуноположительных клеток оценивали на стандартной площади 0.1 мм<sup>2</sup> (условной единице площади) при увеличении объектива 100×. Количественный анализ данных осуществляли на изображениях, полученных с 10–15 гистологических срезов мозга, взятого от 6 животных каждой исследуемой возрастной группы, при помощи пакетов компьютерных программ ImageJ (NIH, США), Origin 5.0.

Оценку интенсивности иммунной реакции производили с использованием системы анализа изображения, включающей световой микроскоп Olympus CX31 (Япония), цветную цифровую камеру VideoZavr Standard VZ-C31Sg и программное обеспечение Видеозавр Мультиметр 2.3 (Санкт-Петербург). Оценивали оптическую плотность (D) продукта реакции в нейропиле: в сети иммунопозитивных отростков, терминалей, а также в скоплениях мелких и крупных гранул. Последние, предположительно, считаются терминальными синаптическими структурами и их скоплениями [15]. Для этого контуром выделяли участки сети иммунопозитивных отростков и скоплений гранул. Уровень содержания GAT<sub>1</sub> выражали в значениях оптической плотности (D) (условных единицах; у.е.) продукта иммунной реакции. Определяли среднее значение D в иммунопозитивных отростках и гранулах при увеличении объектива 100×. Измерения

проводили на 15 серийных срезах мозга, взятого от 5 животных каждой исследуемой группы.

Все статистически обработанные данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего ( $m \pm SEM$ ). Для анализа и сравнения полученных результатов между разными группами животных использовали *t*-критерий Стьюдента и *oneway* ANOVA (Statistica 8.0, Statsoft Inc., США), различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Количество нейронов, иммунопозитивных на GABA, в разных слоях соматосенсорной области неокортекса на 5-е неонатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия перинатальной гипоксии*

У животных в контроле (на П5) в слое I присутствует небольшое число интернейронов ( $6.2 \pm 0.9$ , табл. 1), сеть иммунопозитивных отростков и многочисленные синаптические структуры. В слоях II–III число иммунопозитивных нейронов на единицу площади составляет  $18.6 \pm 2.1$  (табл. 1), при этом нейропиле развит слабо, присутствуют отдельные иммунопозитивные отростки, имеющие варикозные расширения и редкие синаптические структуры (рис. 1а). В слоях IV и V число иммунопозитивных нейронов в 1.5 и 2.3 раза меньше ( $12.5 \pm 1.8$  и  $8.0 \pm 1.4$  соответственно), чем в верхних слоях II–III (табл. 1). Нейропиле содержит более плотную сеть иммунопозитивных отростков, имеющих варикозные расширения и синаптические структуры. В слое VI количество иммунопозитивных нейронов соответствует таковому в верхних слоях ( $19.3 \pm 1.2$ ) (табл. 1). Плотность распределения синаптических структур и сети иммунопозитивных отростков с варикозными расширениями в нейропиле аналогична таковой в слое V.

После воздействия гипоксии в слоях I и II–III количество иммунопозитивных нейронов такое же, как и в аналогичных слоях у животных в контроле, в слоях IV и V число таких нейронов существенно повышается в 1.3 и 2.5 раза соответственно, в слое VI незначительно снижается (табл. 1). Таким образом, исследование показало, что у контрольных животных на П5 в верхних слоях II–III и глубоком слое VI число нейронов, иммунопозитивных на GABA, существенно превышает их количество в слоях IV и V. После воздействия гипоксии в верхних слоях высокая численность таких нейронов сохраняется, а в глубоких слоях IV и V их число значительно увеличивается и примерно соответствует их числу в верхних слоях.

**Таблица 1.** Количество нейронов иммунопозитивных на GABA в слоях соматосенсорной области неокортекса на 5-е и 10-е постнатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия гипоксии (число клеток на у. е. площади)

Слой неокортекса	Число нейронов, иммунопозитивных на GABA, на у. е. площади			
	Сроки развития			
	П5 (контроль)	П5 (гипоксия)	П10 (контроль)	П10 (гипоксия)
I	6.2 ± 0.4	4.8 ± 1.4	5.8 ± 1.2	6.4 ± 1.3
II–III	18.6 ± 1.4	19.9 ± 1.4	9.0 ± 1.3	7.3 ± 1.1
IV	12.5 ± 1.8	16.2 ± 1.5	10.7 ± 1.2	12.4 ± 0.9
V	8.0 ± 1.4	20.1 ± 0.9	7.4 ± 0.9	4.3 ± 1.0*
VI	19.3 ± 1.2	16.4 ± 1.3	8.5 ± 0.8	8.3 ± 0.8

\* Отличия количественных значений в слоях неокортекса между животными разных возрастных групп достоверны при  $p < 0.05$ .

*Количество нейронов, иммунопозитивных на GABA, в разных слоях соматосенсорной области неокортекса на 10-е неонатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия перинатальной гипоксии*

У животных в контроле (на П10) в слое I, также как и на предыдущем сроке исследования, находится небольшое число иммунопозитивных нейронов (табл. 1), присутствуют сеть иммунопозитивных отростков и большое количество синаптических структур. В слоях II–III число иммунопозитивных нейронов на у.е. площади значительно ниже ( $9.0 \pm 1.3$ ), чем таковое на П5 (табл. 1) (рис. 1a,b). В глубоких слоях IV, V и VI численность иммунопозитивных нейронов близка по значению и также соответствует таковой в верхних слоях II–III ( $10.7 \pm 1.2$ ,  $7.4 \pm 0.9$  и  $8.5 \pm 0.8$ ; табл.1). В нейропиле всех слоев присутствует сеть иммунопозитивных отростков и синаптических структур, располагающихся как на отростках, так и на и телах большинства клеток.

После воздействия гипоксии у крыс (на П10) в слое I число иммунопозитивных клеток соответствует контрольному значению. В слоях II–III, IV и VI количество иммунопозитивных нейронов также сопоставимо с его значениями в контроле (табл. 1). Однако в слое V число иммунопозитивных нейронов оказалось значительно меньше (в 1.7 раза), чем у контрольных животных (табл. 1). Таким образом, у контрольных животных к концу неонатального периода (П10) в разных слоях (II–III, IV, V и VI) неокортекса значения численности нейронов, иммунопозитивных на GABA, сопоставимы между собой, т.е. тормозные интернейроны примерно равномерно распределяются в слоях неокортекса. После воздействия гипоксии численность нейронов, иммунопозитивных на GABA, в слоях почти не меняется за исключением их числа в слое V, где оно значительно сокращается.

*Оптическая плотность (D) продукта иммунной реакции на GAT<sub>1</sub> в разных слоях соматосенсорной области неокортекса на 5-е неонатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия перинатальной гипоксии*

У животных в контроле на П5 обнаружен самый высокий показатель оптической плотности продукта иммунной реакции на GAT<sub>1</sub> в слое I, самый низкий в слоях II–III (рис. 1c) и слое VI (табл. 2). После воздействия перинатальной гипоксии у крыс на П5 в верхних слоях I и II–III D существенно возрастает (в 1.25 и 2.4 раза соответственно). В слоях IV и VI почти не изменяется, а в слое V снижается почти в 1.5 раза (табл. 2).

*Оптическая плотность (D) продукта иммунной реакции на GAT<sub>1</sub> в разных слоях соматосенсорной области неокортекса на 10-е неонатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия перинатальной гипоксии*

У контрольных крыс D в слое I (по сравнению с П5) резко снижается (в 2 раза). В слоях II–III (рис. 1d), IV, V и VI существенно повышается (в 3.1; 1.3; 1.3 и 1.4 раза соответственно) (табл. 2). После воздействия перинатальной гипоксии у крыс на П10 D в слое I почти соответствует контрольному уровню ( $0.142 \pm 0.007$  и  $0.128 \pm 0.008$ ), в слоях II–III (рис. 1e), IV и V D значительно снижается по сравнению с контрольными значениями в 3.8, 2.9 и 2.2 раза соответственно, однако, в слое VI D соответствует таковому значению в контроле (табл. 2). Таким образом, на протяжении неонатального периода у крыс в контроле в разных слоях соматосенсорной области коры интенсивность экспрессии GAT<sub>1</sub> меняется. В слое I на П5 она имеет самое высокое значение по сравнению с другими слоями, к концу неонатального периода (П10) она значительно снижается, а во всех остальных слоях интенсивность экспрессии GAT<sub>1</sub> существенно повышается. Воздействие гипоксии приводит к резкому увеличению экспрессии GAT<sub>1</sub> во всех слоях

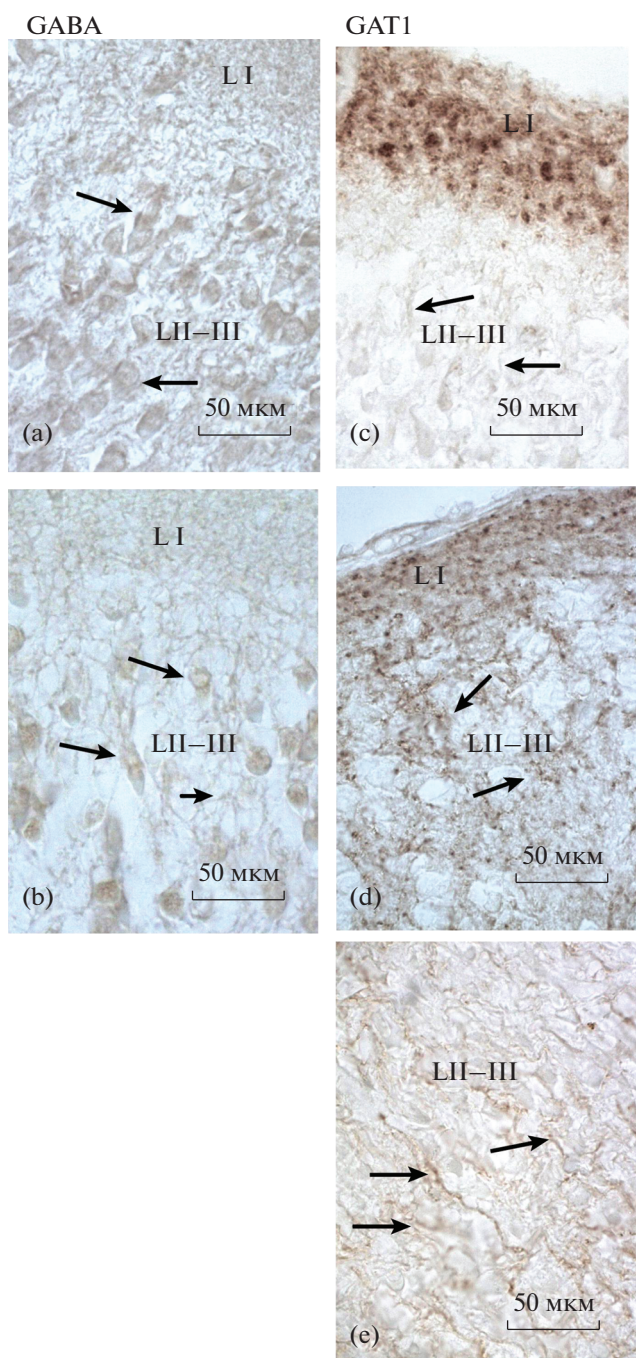
на П5. К концу неонатального периода (П10) интенсивность экспрессии  $GAT_1$  в слоях I и VI соответствует контрольным значениям, а в остальных слоях (II–III, IV и V) значительно снижается.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Установлено, что во время развития подавляющее большинство ГАВАергических нейронов происходит из медиального ганглиозного возвышения, одной из пролиферативных зон области subpallium, локализуемой в вентральной части конечного мозга [16–20]. Из этой зоны молодые ГАВАергические нейроны мигрируют в развивающиеся формации мозга, в том числе, и неокортекс, однако, механизмы, которые контролируют распределение мигрирующих нейронов по слоям коры, в настоящее время до конца неясны.

Во время раннего развития мозга высвобождаемая незрелыми нейронами ГАВА представляет трансмиссер, оказывающий возбуждающее действие, обусловленное деполяризацией незрелых нейронов. К деполяризации приводит активация ГАВА A рецептора, который открывает ионные каналы и вызывает отток ионов хлора, значительно снижая его внутриклеточную концентрацию и приводя к возникновению возбуждающего потенциала. Полагают, что возбуждающий эффект ГАВА необходим для осуществления процессов миграции (в этот момент ГАВА выступает как хемоаттрактант), для начальной дифференцировки нейронов, экспрессии рецепторов и установления нейронных связей [21, 22]. Одновременно с созреванием тормозной системы появляются коррелированные паттерны спонтанной активности нейронов у новорожденных грызунов и человека. Эта сетевая спонтанная активность обеспечивается деполяризацией незрелых нейронов, которая вызывается возбуждающим эффектом ГАВА. Установлено, что деполяризующее действие ГАВА и сетевая нейронная активность являются ключевыми регуляторами процессов, происходящих на субклеточном уровне, таких как экспрессия транспортеров, высвобождение хлоридов, экспрессия рецепторов к ГАВА и ГАВАергический синаптогенез, которые, в результате, лежат в основе смены возбуждающей функции ГАВА на тормозную [23, 24]. Было выявлено, что для поддержания уровня сетевой активности необходима определенная численность популяции интернейронов в развивающемся неокортексе [25].

Развитие неокортекса у млекопитающих и человека происходит на протяжении длительного времени, как в пренатальный, так и неонатальный периоды. Во время последнего завершаются процессы миграции нейронов, их дифференцировка и становление нейронами. Установлено, что верхние слои (II–III) неокортекса образуются последними [26, 27].



**Рис. 1.** Соматосенсорная область неокортекса крысы на П5 (a,c) и П10 (b, d, e), верхние слои II–III (L II–III) у контрольных животных (a,b,c,d) и после воздействия перинатальной гипоксии (e). Иммуногистохимические реакции на ГАВА (a, b) и  $GAT_1$  (c, d, e); a – плотное расположение нейронов, содержащих ГАВА (стрелки); b – снижение плотности распределения нейронов, содержащих ГАВА (длинные стрелки), сеть иммунопозитивных на ГАВА отростков (короткая стрелка); c – отдельные иммунопозитивные на  $GAT_1$  отростки (стрелки); d – сеть иммунопозитивных отростков и гранул (синаптических структур) на  $GAT_1$  (стрелки); e – отдельные иммунопозитивные на  $GAT_1$  отростки нейронов (стрелки).

**Таблица 2.** Показатели оптической плотности ( $D$ ) продукта иммунной реакции на  $GAT_1$  в слоях соматосенсорной области неокортекса на 5-е и 10-е неонатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия гипоксии (в у. е.)

Слой неокортекса	$D$ (у. е.)			
	Сроки развития			
	П5 (контроль)	П5 (гипоксия)	П10 (контроль)	П10 (гипоксия)
I	$0.280 \pm 0.004$	$0.350 \pm 0.008$	$0.142 \pm 0.007^*$	$0.128 \pm 0.008$
II–III	$0.044 \pm 0.002$	$0.106 \pm 0.007$	$0.138 \pm 0.005^*$	$0.036 \pm 0.004^*$
IV	$0.071 \pm 0.003$	$0.059 \pm 0.006$	$0.091 \pm 0.004^*$	$0.031 \pm 0.005^*$
V	$0.095 \pm 0.004$	$0.064 \pm 0.008$	$0.123 \pm 0.008^*$	$0.055 \pm 0.008^*$
VI	$0.048 \pm 0.005$	$0.053 \pm 0.007$	$0.069 \pm 0.003$	$0.067 \pm 0.006$

\* Отличия значений  $D$  в разных слоях неокортекса между животными различных возрастных групп достоверны при  $p < 0.05$ .

Результаты проведенного исследования показали, что в неонатальный период у крыс, как у контрольных, так и переживших перинатальную гипоксию, в разных слоях неокортекса имеет место динамика изменения численности тормозных интернейронов и экспрессии  $GAT_1$ . Выявлено, что на начальных сроках (П5) неонатального периода в верхних слоях II–III число клеток, иммунопозитивных на ГАВА, существенно превосходит их численность в более глубоких слоях. Кроме того, эти клетки имеют веретеновидную форму, которая, как правило, характерна для незрелых нейронов, здесь слабо развит нейропил и крайне мало синаптических структур. Ранее было высказано предположение, что одним из факторов, оказывающих влияние на миграционное поведение нейронов, является программа внутреннего созревания ГАВАергических нейронов, согласно которому мигрирующие клетки, достигнув в неокортексе определенного местоположения, могут временно находиться в периоде ожидания: или завершения определенного этапа своей дифференцировки, или созревания своих будущих мишеней и, затем, могут продолжить миграцию [28]. Вероятно, повышенное число молодых интернейронов в верхних слоях II–III на П5 может быть временным локальным скоплением клеток, находящихся в состоянии ожидания, и свидетельствовать о том, что на П5 процессы формирования верхних слоев и дифференцировки нейронов еще не завершены.

К концу неонатального периода (к П10), в верхних слоях происходит значительное снижение числа нейронов, позитивных на ГАВА, которое становится сопоставимым с численностью интернейронов в слоях VI и V. Установлено, что на ранних сроках неонатального периода в развивающийся неокортекс продолжается миграция молодых ГАВАергических нейронов, которые проходят через белое вещество, слой VI и далее мигрируют в слои, расположенные выше [29]. Результаты данного исследования показали, что на П5 в слое VI (также как и в слоях II–III) присутствует значи-

тельное число ГАВАергических нейронов, которое также можно рассматривать как скопление молодых нейронов, находящихся либо в состоянии транзита, либо в определенном периоде ожидания. Далее в слое VI численность ГАВАергических нейронов снижается более, чем в 2 раза, и становится сопоставимой с числом интернейронов в остальных слоях II–V, т.е. к концу неонатального периода у контрольных животных тормозные ГАВАергические интернейроны в разных слоях коры распределяются почти равномерно.

Слой I играет важную роль в формировании слоев неокортекса [30, 31]. В неонатальный период в слое I присутствуют две популяции нейронов: клетки Cajal-Retzius и ГАВАергические интернейроны, мигрирующие сюда из области subpallium [32, 33]. Находящиеся в нейропиле слоя I отростки локальных ГАВАергических нейронов и аксоны клеток Мартинотти образуют мощные ГАВАергические связи с клетками Cajal-Retzius, здесь же присутствуют дендриты пирамидных нейронов нижележащих слоев, устанавливающие связи с клетками Cajal-Retzius [34]. Результаты исследования показали, что у контрольных животных на протяжении неонатального периода в слое I количество ГАВАергических нейронов не изменяется, однако, при этом на П5 имеет место самая высокая интенсивность экспрессии  $GAT_1$ . К концу неонатального периода в слое I интенсивность экспрессии  $GAT_1$  значительно снижается. Ранее было показано, что на клетках Cajal-Retzius вблизи ГАВАергических синапсов количество ГАВА снижается в 2 раза в период с П2 по П7 и имеет тенденцию к дальнейшему снижению [35]. Следовательно, уменьшение количества ГАВА будет приводить к снижению экспрессии транспортера  $GAT_1$ . Это предположение было подтверждено данными, полученными при изучении синтеза поверхностных белков, показавших, что снижение экспрессии поверхностного транспортера  $GAT_1$  коррелирует с сокращением транспорта ГАВА [35]. Вероятно, снижение трансмиссии ГАВА в слое I к концу

неонатального периода связано с завершающими процессами формирования верхних слоев неокортекса и установлением дефинитивных синаптических связей.

Полученные данные показали, что воздействие перинатальной гипоксии приводит к существенному повышению численности ГАВАергических нейронов во всех слоях неокортекса на ранних сроках неонатального периода. Эти данные согласуются с результатами других авторов, сообщивших, что перинатальная гипоксия вызывает длительное повышение уровня ГАВА в неокортексе и гиппокампе [3, 36, 37]. Однако к концу неонатального периода число ГАВАергических нейронов во всех слоях неокортекса снижается и примерно соответствует контрольным значениям на П10, кроме слоя V, где количество ГАВАергических нейронов значительно меньше, чем в контроле.

Вероятно, воздействие гипоксии вызывает временную задержку процессов миграции нейронов, развития нейропиля, что может приводить к их скоплению в слоях неокортекса, которое нивелируется к концу неонатального периода. В этот период мигрирующие нейроны в слой V, вероятно, оказываются самыми высокочувствительными к гипоксии, что приводит к их частичной утрате. Было высказано предположение, что у части молодых ГАВАергических нейронов, направляющихся в неокортекс, период их миграции через белое вещество головного мозга совпадает с периодом особой чувствительности к воздействию гипоксии [38].

Результаты исследования свидетельствуют о том, что у контрольных животных на протяжении неонатального периода, в отличие от слоя I, во всех слоях неокортекса происходит постепенное увеличение экспрессии  $GAT_1$  и количества синаптических структур. Выявлено, что воздействие гипоксии приводит (на П5) к увеличению экспрессии  $GAT_1$  в верхних слоях I–III, однако, в глубоких слоях IV–VI было отмечено снижение экспрессии  $GAT_1$ . К концу неонатального периода (П10) было обнаружено резкое снижение экспрессии  $GAT_1$  во всех слоях неокортекса, даже в тех слоях, в которых численность ГАВАергических нейронов соответствовала контрольным значениям.

Наблюдения, полученные в недавних работах, показали, что воздействие гипоксии на ранних сроках неонатального периода вызывает нарушение ветвления дендритных отростков нейронов коры. Считают, что уменьшение сложности ветвления дендритных ветвей является отражением нарушения созревания основных проекционных нейронов [39]. В другом исследовании в ответ на воздействие гипоксии у плода овцы были выявлены нарушения созревания дендритного отростка пирамидных нейронов во всех кортикальных слоях и общее уменьшение объема мозга. Показано, что эти нарушения созревания нейронов совпадают с

критическим периодом установления нейронных связей [40]. Наряду с упрощением сложности ветвления дендритного отростка будут происходить нарушение процессов синаптогенеза и сокращение количества синаптических контактов между пирамидными и ГАВАергическими нейронами, что, в свою очередь, будет приводить к снижению синаптической трансмиссии ГАВА во всех слоях неокортекса. Вероятно, этим можно объяснить выявленное нами значительное снижение экспрессии  $GAT_1$  во всех слоях неокортекса после воздействия гипоксии, не смотря на сходное число ГАВАергических интернейронов в слоях коры у контрольных и подопытных животных, установившееся к концу неонатального периода.

Таким образом, проведенное исследование показало, что в течение неонатального периода в разных слоях неокортекса существует динамика изменения как числа нейронов, содержащих ГАВА, так и экспрессии  $GAT_1$ . Середина неонатального периода (П5) – это срок, когда активно идет процесс стратификации, который заканчивается к П7 и, вероятно, происходит завершение формирования верхних слоев, которые в ходе развития образуются последними. Показано, что у животных в контроле к концу неонатального периода молодые ГАВАергические нейроны распределяются по слоям неокортекса почти равномерно и к этому времени существенно повышается уровень экспрессии  $GAT_1$ , что может свидетельствовать об установлении синаптической трансмиссии ГАВА. Воздействие гипоксии приводит сначала к повышению числа интернейронов в слоях коры, но к концу неонатального периода их количество снижается и соответствует контрольным значениям, при этом резко снижается уровень экспрессии  $GAT_1$ , что скорее всего можно рассматривать как нарушение ГАВАергического синаптогенеза и общего созревания нейронов неокортекса.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-015-00052\22.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (В.А.О., Л.И.Х.), сбор, обработка и анализ данных (Л.И.Х.), написание и редактирование текста (Л.И.Х.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Otellin VA, Khozhai LI, Shishko TT, Vershinina EA* (2021) Nucleolar ultrastructure in neurons of the rat neocortical sensorimotor area during the neonatal period after perinatal hypoxia and its pharmacological correction. *J Evol Biochem Physiol* 57: 1251–1256. <https://doi.org/10.1134/S0022093021060053>
2. *McClendon E, Kevin C, Gong X, Sharifnia E, Hagen M, Cai V, Shaver D, Riddle A, Dean JM, Gunn AJ, Mohr C, Kaplan JS, Rossi DJ, Kroenke CD., Hohimer AR, Back SA* (2014) Prenatal cerebral ischemia triggers dysmaturation of caudate projection neurons. *Ann Neurol* 75: 508–524. <https://doi.org/10.1002/ana.24100>
3. *Pozdnyakova N, Dudarenko M, Borisova T* (2019) Age-dependency of levetiracetam effects on exocytotic GABA release from nerve terminals in the hippocampus and cortex in norm and after perinatal hypoxia. *Cel Mol Neurobiol* 39: 701–714. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00676-6>
4. *Fishell G, Rudy B* (2011) Mechanisms of inhibition within the telencephalon: “where the wild things are”. *Annu Rev Neurosci* 34: 535–567. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113717>
5. *Sahara S, Yanagawa Y, O’Leary DD, Stevens CF* (2012) The fraction of cortical GABAergic neurons is constant from near the start of cortical neurogenesis to adulthood. *J Neurosci* 32: 4761–4761. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6412-11.2012>
6. *Хожай ЛИ, Отеллин ВА* (2021) Реорганизация сети интернейронов, экспрессирующих парвальбумин, в неокортексе крыс после перинатальной гипоксии и возможность ее фармакологической коррекции. *Рос физиол журн* 107: 1–10. [*Khozhai LI, Otellin VA* (2021) Reorganization of a network of interneurons expressing parvalbumin in the rat’s neocortex after perinatal hypoxia and the possibility of its pharmacological correction. *Russ J Physiol* 107: 1–10. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813921100125>
7. *Gadea A, Lopez-Colome AM* (2001) Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. *J Neurosci Res* 63: 461–468. <https://doi.org/10.1002/jnr.1040>
8. *Augood SJ, Herbison AE, Emson PC* (1995) Localization of GAT-1 GABA transporter mRNA in rat striatum: cellular coexpression with GAD67 mRNA, GAD67 immunoreactivity, and parvalbumin mRNA. *J Neurosci* 15: 865–874. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00865.1995>
9. *Bernstein EM, Quick MWJ* (1999) Regulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) transporters by extracellular GABA. *Biol Chem*. 274: 889–895. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.2.889>
10. *Fattorini G, Melone M, Conti F* (2020) A reappraisal of GAT-1 localization in neocortex. *Front Cell Neurosci* 14: 9–20. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00009>
11. *Loo DD, Eskandari S, Boorer KJ* (2000) Role of Cl<sup>-</sup> in electrogenic Na<sup>+</sup>-coupled cotransporters GAT1 and SGLT1. *J Biol Chem* 275:37414–37422. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007241200>
12. *Lu CC, Hilgemann DW* (1999) GAT1 (GABA:Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup>) cotransport function. Steady state studies in giant *Xenopus* oocyte membrane patches. *J Gen Physiol* 114:429–444. <https://doi.org/10.1085/jgp.114.3.429>
13. *Qian Z, Lin Y, Xing J, Qiu Y, Ren L* (2018) Expression and functions of glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters in ischemic models. *Mol Med Rep* 17: 8196–8202. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8888>
14. *Khazipov R, Zaynutdinova D, Ogievetsky E, Valeeva G, Mitrukhina O, Manent J-B, Represa A* (2015) Atlas of the postnatal rat brain in stereotaxic coordinates. *Front Neuroanat* 9: 161. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00161>
15. *Guthmann A, Fritschy JM, Ottersen OP, 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.
16. *Butt SJ, Stacey JA, Teramoto Y, Vagnoni C* (2017) A role for GABAergic interneuron diversity in circuit development and plasticity of the neonatal cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol* 43: 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.03.011>
17. *Flames N, Pla R, Gelman DM, Rubenstein JL, Puelles L, Marín O* (2007) Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J Neurosci* 27: 9682–9695. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2750-07.2007>
18. *Gelman DM, Marín O* (2010) Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 31: 2136–2141. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07267.x>
19. *Fogarty M, Grist M, Gelman D, Marín O, Pachnis V, Kessar N* (2007) Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J Neurosci* 27: 10935–10946. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1629-07.2007>
20. *Taniguchi H, Lu J, Huang ZJ* (2013) The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex. *Science* 339: 70–74. <https://doi.org/10.1126/science.1227622>
21. *Teppola H, Aćimović J, Linne ML* (2019) Unique features of network bursts emerge from the complex interplay of excitatory and inhibitory receptors in rat neocortical networks. *Front Cell Neurosci* 13: 377388. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00377>
22. *Rheims S, Minlebaev M, Ivanov A, Represa A, Khazipov R, Holmes GL* (2008) Excitatory GABA in rodent developing neocortex in vitro. *J Neurophysiol* 100: 609–619. <https://doi.org/10.1152/jn.90402.2008>
23. *Hanson E, Armbruster M, Lau LA, Sommer ME, Klafit ZJ, Swanger SA* (2019) Tonic activation of GluN2C/GluN2D-containing NMDA receptors by ambient glutamate facilitates cortical interneuron maturation. *J Neurosci* 39: 3611–3626. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1392-18.2019>
24. *Flossmann T, Kaas T, Rahmati V, Kiebel SJ, Witte OW, Holthoff K* (2019) Somatostatin interneurons promote neuronal synchrony in the neonatal hippocampus. *Cell Rep* 26: 3173–3182. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.061>



25. *Sukenik N, Vinogradov O, Weinreb E, Segal M, Levina A, Moses E* (2021) Neuronal circuits overcome imbalance in excitation and inhibition by adjusting connection numbers. *Proc Natl Acad Sci USA* 118: e2018459118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2018459118>
26. *Fishell G, Rudy B* (2011) Mechanisms of inhibition within the telencephalon: “where the wild things are”. *Annu Rev Neurosci* 34: 535–567. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113717>
27. *Sahara S, Yanagawa Y, O’Leary DD, Stevens CF* (2012) The fraction of cortical GABAergic neurons is constant from near the start of cortical neurogenesis to adulthood. *J Neurosci* 32: 4755–4761. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6412-11.2012>
28. *Bartolini G, Ciceri G, Marín O* (2013) Integration of GABAergic interneurons into cortical cell assemblies: lessons from embryos and adults. *Neuron* 79: 849–864. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.014>
29. *Marín O, Rubenstein JLR* (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2 (11): 780–790. <https://doi.org/10.1038/35097509>
30. *Marín-Padilla M* (1998) Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci* 21: 64–71. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(97\)01164-8](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(97)01164-8)
31. *Soriano E, del Río JA* (2005) The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron* 46: 389–394. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.019>
32. *Hevner RF, Neogi T, Englund C, Daza RAM, Fink A* (2003) Cajal–Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Devel Brain Res* 141: 39–53. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(02\)00641-7](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(02)00641-7)
33. *Villar-Cerviño V, Molano-Mazón M, Catchpole T, Valdeolillos M, Henkemeyer M, Martínez LM, Borrell V, Marín O* (2013) Contact repulsion controls the dispersion and final distribution of Cajal-Retzius cells. *Neuron* 77: 457–471. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.023>
34. *Cosgrove KE, Maccafferri G* (2012) mGlu1 $\alpha$ -dependent recruitment of excitatory GABAergic input to neocortical Cajal-Retzius cells. *Neuropharmacology* 63: 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.025>
35. *Dvorzhak A, Myakhar O, Unichenko P, Kirmse K, Kirischuk S* (2010) Estimation of ambient GABA levels in layer I of the mouse neonatal cortex in brain slices. *J Physiol* 588: 2351–2360. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187054>
36. *Pozdnyakova N, Dudarenko M, Yatsenko L, Himmelreich N, Krupko O, Borisova T* (2014) Perinatal hypoxia: different effects of the inhibitors of GABA transporters GAT1 and GAT3 on the initial velocity of [<sup>3</sup>H]GABA uptake by cortical, hippocampal, and thalamic nerve terminals. *Croat Med J* 55: 250–258. <https://doi.org/10.3325/cmj.2014.55.250>
37. *Qian Z, Lin Y, Xing J, Qiu Y, Ren L* (2018) Expression and functions of glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters in ischemic models. *Mol Med Rep* 17: 8196–8202. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8888>
38. *Hamasaki T, Goto S, Nishikawa S, Ushio Y* (2003) Neuronal cell migration for the developmental formation of the mammalian striatum. *Brain Res Rev* 41:1–12. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(02\)00216-3](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(02)00216-3)
39. *Warm D, Schroer J, Sinning A* (2021) GABAergic interneurons in early brain development: conducting and orchestrated by cortical network activity. *Front Mol Neurosci* 14: 807969. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.807969>
40. *Dean J, McClendon E, Hansen K, Azimi-Zonooz A, Chen K, Riddle A, Gong X, Sharifnia E, Hagen M, Ahmad T, Leigland L, Hohimer A, Kroenke C, Back S* (2013) Prenatal cerebral ischemia disrupts MRI-defined cortical microstructure through disturbances in neuronal arborization. *Sci Transl Med* 5(168): 168ra7. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004669>

## Distribution of GABAergic Neurons and Expression Levels of GABA Transporter 1 in the Rat Neocortex during the Neonatal Period after Perinatal Hypoxic Exposure

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

<sup>a</sup> Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>#</sup>e-mail: astarta0505@mail.ru

The aim of this work was to study the distribution of GABA-expressing neurons and the level of GABA transporter type 1 (GAT<sub>1</sub>) expression in different layers of the rat neocortex in the neonatal period after perinatal hypoxia. Perinatal hypoxic exposure was carried out on neonatal day 2 for 1 h (7.8% O<sub>2</sub> in the breathing gas mixture). GABA and GAT<sub>1</sub> were localized immunohistochemically. The neocortical somatosensory area was studied on postnatal days 5 and 10 (P5, P10). It was found that at the early neonatal stage (P5), perinatal hypoxic exposure leads to an increase in the number of GABAergic inhibitory interneurons in all layers of the neocortex. By the end of the neonatal period (P10), their number in the cortical layers decreases, while in layer V, decreases significantly. In control animals, the GAT<sub>1</sub> expression level gradually increases throughout the neonatal period in all layers of the neocortex. After perinatal hypoxic exposure, GAT<sub>1</sub> expression decreases significantly, including in the neocortical layers, where the number of GABAergic neurons corresponds to the control value. These findings indicate that the exposure to acute perinatal hypoxia can lead to changes in GABAergic synaptic transmission in all layers of the neocortex at the end of the neonatal period.

**Key words:** neocortex, hypoxia, GABA, GAT<sub>1</sub>, neonatal period