

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Л. И. Хожай, В. А. Отеллин, 2014
УДК 612.273.2:611.813.1.018:612.65:599.323.4

Л. И. Хожай и В. А. Отеллин

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГАМК-ЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ В НЕОКОРТЕКСЕ У КРЫС В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

Лаборатория онтогенеза нервной системы (зав. — чл.-кор. РАН проф. В. А. Отеллин),
Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

На крысах линии Вистар изучили распределение ГАМК-ергических нейронов в разных областях неокортекса (фронтальной, сенсомоторной, зрительной) в разные сроки постнатального периода развития после воздействия перинатальной гипоксии. Для выявления этих нейронов использовали антитела к GAD-67 — маркеру ГАМК-ергических нейронов. Установлено, что воздействие перинатальной гипоксии приводит к значимому снижению количества GAD-67-экспрессирующих нейронов как в верхних, так и глубоких слоях коры в ювенильном возрасте (20 сут постнатального периода развития), которое сохраняется к предпубертатному периоду (40-е сутки). У подопытных животных на 40-е сутки в каждом из слоев неокортекса число нейронов, синтезирующих GAD-67, было в 2 раза ниже, чем в контроле. Вероятно, резкое уменьшение количества ГАМК-ергических нейронов в неокортексе может быть следствием повреждающего воздействия острой перинатальной гипоксии на процессы миграции клеток-предшественников из субвентрикулярной зоны либо на синтез факторов, контролирующих эти миграционные процессы, а также на созревание ГАМК-ергических нейронов и как результат — на более позднюю экспрессию GAD-67.

Ключевые слова: *неокортекс, ГАМК-ергические нейроны, перинатальная гипоксия*

Острая гипоксия в неонатальный период является одной из основных причин возникновения патологии головного мозга у новорожденных, которая в настоящее время определяется как перинатальная энцефалопатия. Ее последствия могут проявляться в виде ряда нервно-психических расстройств и заболеваний. Известно, что воздействие гипоксии в перинатальный период вызывает изменение citoархитектоники неокортекса, задержку нейрогенеза, пролонгированную гибель части нейронов, что в результате приводит к сокращению численности популяций разных типов нейронов в различных областях коры. Эти изменения сопровождаются нарушениями ряда физиологических поведенческих реакций [1–3]. Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), являясь мощным тормозным нейротрансмиттером, осуществляет контроль практически всех функций ЦНС; нейроны, синтезирующие ГАМК, присутствуют во всех формациях мозга. Однако особенности распределения ГАМК-ергических нейронов в неокортексе в ранний постнатальный период мало исследованы, а последствия воздействия перинатальной гипоксии на их распределение

практически не изучены. ГАМК синтезируется из глутаминовой кислоты при участии фермента глутамат-декарбоксилазы (GAD). Одна из изоформ фермента — GAD-67, присутствующая в теле и отростках нейронов, широко используется как маркер ГАМК-ергических интернейронов [5].

Цель настоящей работы — изучить распределение GAD-67-иммунопозитивных нейронов в разных областях неокортекса (фронтальной, сенсомоторной, зрительной) у крыс в разные сроки постнатального периода развития после воздействия перинатальной гипоксии.

Материал и методы. Все процедуры были проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Воздействие гипоксии на головной мозг новорожденных крысят осуществляли в барокамере, оснащенной устройством для автоматически управляемого обогрева, смены газовой смеси и определения скорости потока газа. Азотно-кислородную газовую смесь готовили с помощью газосмесительной установки (Laorg, Франция). Подопытных животных помещали в барокамеру на 1 ч. Во время экспериментов содержание кислорода в барокамере составляло 7,6–7,8%; углекислого газа — 0,15–0,20%; азота — 91,8%; температура — 21,3–23 °С; при нормальном

Сведения об авторах:

Хожай Людмила Ивановна (e-mail: astarta0505@mail.ru), *Отеллин Владимир Александрович* (e-mail: v.otellin@mail.ru), лаборатория онтогенеза нервной системы, Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

общем давлении. В работе были использованы 2 группы животных: 1-я группа — крысы (n=18), подвергавшиеся в барокамере воздействию гипоксии (экспериментальная группа); 2-я группа (n=14) — интактные животные того же возраста (контрольная группа). Воздействие гипоксии осуществляли на 2-е постнатальные сутки. Изучение мозга как у контрольных, так и у экспериментальных животных проводили на 20-е и 40-е постнатальные сутки, т.е. в конце детского (ювенильного) периода и начале препубертатного, когда начинается половое созревание и изменяется гормональный статус организма. В каждый срок исследования использовано по 5–6 животных.

Для проведения гистологических исследований мозг крыс фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) в течение 24 ч, обезживали и заливали в парафин по общепринятой методике, готовили серийные фронтальные срезы толщиной 5–7 мкм.

Иммуноцитохимическую реакцию для выявления GAD-67 проводили с использованием кроличьих поликлональных антител (Spring Bioscience, США). В качестве вторичных реагентов для GAD-67 использовали реактивы из набора EnVision+System-HRP (DakoCytomation, США). Для визуализации продукта реакции пользовались хромогеном DAB+ (Dako, Дания). После проведения иммуноцитохимической реакции часть срезов докрашивали гематоксилином Джилла и заключали в синтетическую заливочную среду Permount (Termo, США). При проведении иммуноцитохимической реакции все процедуры были стандартизированы и осуществлялись одновременно на гистологических срезах, полученных от контрольных и подопытных животных.

На цифровых изображениях серийных срезов, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия), подсчитывали число GAD-67-иммунопозитивных нейронов на площади 0,1 мм² в разных слоях (II–VI) исследуемых областей неокортекса. Статистическую обработку полученных морфологических показателей осуществляли при помощи пакета прикладных компьютерных программ Statistica 6.0, ImageScore Color и ORIGIN50. Значимость различий определяли по величине t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при P<0,05.

Результаты исследования. В контроле на 20-е и 40-е сутки GAD-67-иммунопозитивные

нейроны присутствуют во всех слоях неокортекса, их довольно много, они диффузно равномерно рассеяны по всему неокортексу. Нейроны могут располагаться группами по 4–6 клеток, по 2 клетки или поодиночке.

Иммуноцитохимическое исследование показало, что у контрольных животных (на 20-е и 40-е сутки) в исследуемых областях неокортекса (фронтальной, сенсомоторной, зрительной) в слоях II и III довольно большое количество GAD-67-иммунопозитивных нейронов и в эти сроки значимо не различается (таблица). В слое IV на 20-е сутки численность иммунопозитивных нейронов высокая, однако, к 40-м суткам она в 2 раза снижается. В глубоких слоях V и VI количество меченых клеток также большое, однако их число в слое V с возрастом незначимо снижается, а в слое VI к 40-м суткам не изменяется (см. таблицу).

У крыс, перенесших острую гипоксию в перинатальный период, как на 20-е, так и на 40-е сутки постнатального развития GAD-67-иммунопозитивные нейроны присутствуют во всех слоях неокортекса, распределены диффузно, однако их количество значимо меньше, чем в контроле (см. таблицу).

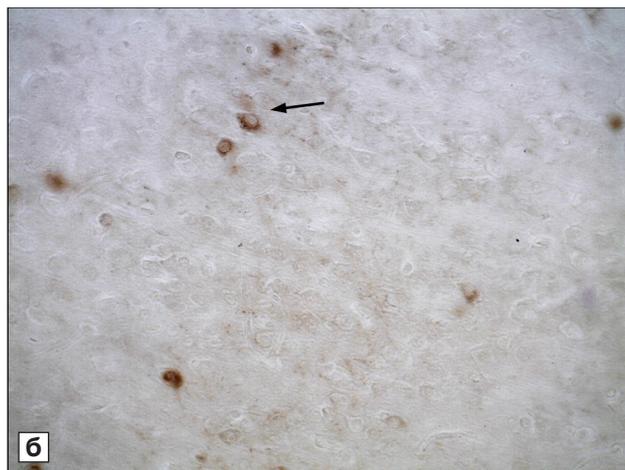
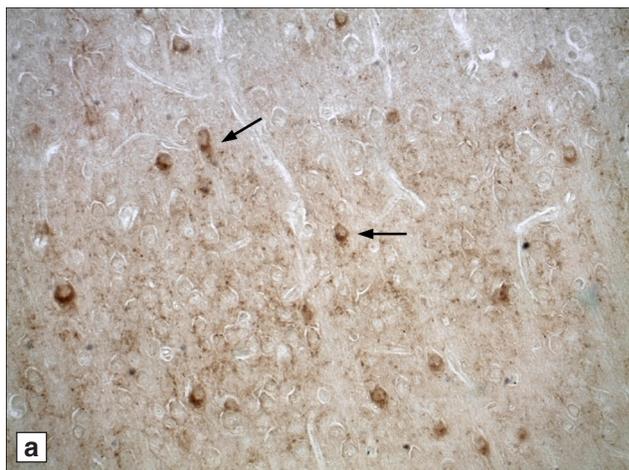
У подопытных животных на 20-е сутки в верхних (II–III) слоях коры наблюдается значимое снижение численности иммунопозитивных нейронов по сравнению с таковой в контроле и к 40-м суткам она не изменяется. В слое IV на 20-е сутки количество иммунопозитивных нейронов снижается в 2 раза и остается таким же на 40-е сутки. В слое V также имеет место значимое уменьшение числа меченых нейронов по сравнению с таковым в контроле (рисунок, а, б), которое не увеличивается к 40-м суткам. В слое VI численность иммунопозитивных нейронов также значимо снижена по сравнению с контролем и с возрастом (к 40-м суткам) практически не меняется.

Обсуждение полученных данных. Проведенное исследование показало, что на 20-е сутки после рождения у контрольных животных популяции нейронов, синтезирующих GAD-67, присутствуют в каждом слое неокортекса (II–VI), численность которых сохраняется к препубертатному периоду развития (40-е сутки). Воздействие перинатальной гипоксии приводит к существенному снижению количества GAD-67-экспрессирующих нейронов как в верхних, так и глубоких слоях коры в ювенильном возрасте, эта сокращенная численность меченых нейронов сохраняется к препубертатному периоду.

Количество GAD-67-экспрессирующих нейронов в слоях неокортекса у крыс в контроле и после перинатальной гипоксии ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, на площади среза 0,1 мм²)

Слои неокортекса	Контроль		Воздействие гипоксии	
	20-е сутки	40-е сутки	20-е сутки	40-е сутки
II–III	14,0±0,8	10,0±0,9	5,0±1,9**	7,0±0,6**
IV	16,0±1,5	8,0±2,3*	7,0±1,2**	5,0±2,5
V	15,0±2,1	11,0±1,8	4,0±2,1**	6,0±1,5**
VI	12,0±0,9	12,0±1,5	8,0±1,6**	6,0±1,4**

* Различия значимы по сравнению с показателями у крыс на 20-е сутки после рождения при P<0,05; ** различия значимы по сравнению с контролем того же срока исследования при P<0,05.



Неокортекс крысы, сенсомоторная область (слой V) на 20-е сутки постнатального развития в контроле (а) и после воздействия перинатальной гипоксии (б).

а — иммунопозитивные нейроны; б — сокращение численности иммунопозитивных нейронов. Стрелки — иммунопозитивные нейроны. Иммуноцитохимическая реакция на GAD-67. Об. 40, ок. 10

ду (40-е сутки). У подопытных животных на 40-е сутки число GAD-67-синтезирующих нейронов в каждом из слоев неокортекса было в 2 раза ниже, чем в контроле.

В настоящее время установлено, что в период развития в неокортексе происходит активная миграция клеток предшественников ГАМК-ергических нейронов. Существуют 2 популяции клеток-предшественников, появляющиеся в разные периоды развития и в различных областях развивающегося переднего мозга. Одна из них возникает в эмбриональный период в вентральной части переднего мозга (в субпаллиальной и преоптической областях), а другая — в пери- и постнатальный периоды развития в субвентрикулярной зоне латеральных желудочков и зубчатой извилине гиппокампа [4]. Предполагают, что субвентрикулярная зона в неонатальный период включает 2 различные линии клеток-предшественников, дифференцировка которых идет по разным направлениям — нейрогенному и глиогенному. Нейрогенные предшественники локализуются предпочтительно в глубоких слоях коры и медленно функционально созревают [6, 7].

Наблюдающееся в данном исследовании резкое сокращение численности ГАМК-ергических нейронов в неокортексе у подопытных животных может быть результатом повреждающего воздействия острой перинатальной гипоксии на процессы миграции клеток-предшественников из субвентрикулярной зоны либо на синтез факторов, контролирующих эти миграционные процессы, а также на созревание ГАМК-ергических нейронов

и как результат — на более позднюю экспрессию GAD-67.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-00160 и грантом Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине».

ЛИТЕРАТУРА

1. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ватаева Л.А. и Шишко Т.Т. Отдаленные последствия воздействия гипоксии в перинатальный период развития на структурно-функциональные характеристики мозга у крыс. Рос. физиол. журн., 2011, т. 97, № 10, с. 1092–1100.
2. Отеллин В.А., Хожай Л.И. и Ватаева Л.А. Влияние гипоксии в раннем перинатальном онтогенезе на поведение и структурные характеристики головного мозга. Журн. эволюц. биохим., 2012, т. 46, № 5, с. 467–473.
3. Отеллин В.А., Хожай Л.И. и Шишко Т.Т. Реакции нервных элементов неокортекса на воздействие гипоксии в раннем периоде новорожденности у крыс. Журн. эволюц. биохим., 2014, т. 50, № 2, с. 148–154.
4. Bolteus A.J. and Bordey A. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. J. Neurosci., 2004, v. 24, p. 7623–7631.
5. Kaufman D.L., Houser C.R. and Tobin A.J. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct interneuronal distribution and cofactor interactions. J. Neurochem. 1991. v. 56, № 2, p. 720–723.
6. Le Magueresse C., Alfonso J., Khodosevich K. et al. «Small axonless neuron»: postnatally generated neocortical interneurons with delayed functional maturation. J. Neurosci., 2011, v. 31, № 46, p. 16731–16747.
7. Marín O. and Rubenstein J.L. Cell migration in the forebrain. Annu. Rev. Neurosci., 2003, v. 26, p. 441–483.

Поступила в редакцию 25.04.2014

THE DISTRIBUTION OF GABA-ERGIC NEURONS IN RAT NEOCORTEX IN THE POSTNATAL PERIOD AFTER THE PERINATAL HYPOXIA

L.I. Khozhai and V.A. Otellin

The distribution of GABA-ergic neurons in different areas of the neocortex (frontal, sensorimotor, visual cortex) was studied in Wistar rats at different time periods of postnatal development after their exposure to perinatal hypoxia. To identify these neurons, the antibodies against GAD-67, the marker of GABA-ergic neurons, were used. It was found that the exposure to perinatal hypoxia caused a significant reduction in the number of GAD-67-expressing neurons in both upper and deep layers of the cortex

in juvenile age (day 20 of postnatal period), that persisted until the prepubertal period (day 40). In experimental animals at postnatal day 40, the numbers of neurons that synthesized GAD-67, were two times lower in each of the layers of the neocortex than those in control animals. It is suggested that a drastic reduction in the number of GABA-ergic neurons in the neocortex could be a result of the damaging effects of acute perinatal hypoxia on the processes of progenitor cell migration from the subventricular zone, or on the synthesis of the factors controlling these migration processes as well as on GABA-ergic neuron maturation, leading to a delay of GAD-67 expression.

Key words: *neocortex, GABA-ergic neurons, perinatal hypoxia*
Laboratory of the Nervous System Ontogenesis, RAS
I.P.Pavlov Institute of Physiology, St.Petersburg