

УДК 611.018.8:612.65

ЭКСПРЕССИЯ СУБЪЕДИНИЦЫ $\alpha 1$ ИОНОТРОПНОГО ГАМК-А РЕЦЕПТОРА В НЕОКОРТЕКСЕ КРЫС ПОСЛЕ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

© 2020 г. Л. И. Хожай^{1,*}, В. А. Отеллин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: astarta0505@mail.ru

Поступила в редакцию 22.04.2019 г.

После доработки 18.10.2019 г.

Принята к публикации 21.11.2019 г.

Ключевые слова: перинатальная гипоксия, субъединица $\alpha 1$ ГАМК-А ионотропного рецептора, неокортекс

DOI: 10.31857/S0044452920020072

Основным тормозным нейротрансмиттером в ЦНС млекопитающих является γ -аминомасляная кислота (ГАМК). К настоящему времени известно два класса рецепторов ГАМК; ионотропные ГАМК-А и метаботропные ГАМК-В рецепторы [1, 2]. Установлено, что у млекопитающих ГАМК-А рецепторы включают 19 субъединиц, которые сгруппированы в семь классов: α , β , γ , δ , ϵ , π и σ [1, 3]. Комбинации этих субъединиц дают множество изоформ ГАМК-А рецепторов, которые определяют его функциональные свойства и специфичность эффектов модуляторов ГАМК-А рецепторов, таких как нейростероиды, барбитураты, бензодиазепины и цинк, а также кинетику активации рецепторов, влияющую на их десенситизацию [4, 5]. В ГАМК-А рецепторе присутствует целый ряд сайтов связывания аллостерических модуляторов, которые могут повышать или, наоборот, снижать эффективность активации ГАМК-А рецепторов [6], важными из них являются сайты связывания бензодиазепинов и барбитуратов, представляющие собой мишени для ряда препаратов, используемых в клинической практике в качестве антиконвульсантов, антиэпилептических, анксиолитических, миорелаксантов, седативных и гипнотических средств [6].

У крыс ГАМК-А рецептор, включающий субъединицу $\alpha 1$ в комбинации с субъединицами — $\beta 2$ - и $\gamma 2$ -, широко распространен в различных отделах головного мозга: в неокортексе, подкорковых структурах (гиппокампе, таламусе, стриатуме, подкорковых ядрах) [7].

Однако ничего неизвестно об экспрессии субъединицы $\alpha 1$ в неокортексе взрослых животных, перенесших гипоксию в перинатальный период. В связи с этим целью данной работы было изучить

влияние перинатальной гипоксии на уровень экспрессии субъединицы $\alpha 1$ ГАМК-А рецептора, у животных, достигших половозрелого возраста.

Работа проведена на лабораторных крысах линии Wistar из питомника Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Воздействие гипоксией проводилось на 2-е постнатальные сутки. В работе использовали 2 группы животных: 1) крысята, подвергавшиеся в барокамере воздействию гипоксии 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.); 2) контрольные животные 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 на 90-е постнатальные сутки (П90).

Головной мозг извлекали и фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (pH = 7.4), заливали в парафин по общепринятой методике и готовили серийные фронтальные срезы мозга толщиной 6–7 мкм на уровне брегмы –1.80 мм–2.04 м [8].

Иммуногистохимическую реакцию на выявление субъединицы $\alpha 1$ ГАМК-А рецептора проводили с использованием кроличьих поликлональных антител GABA-A Receptor alpha 1 (Abcam, США). В качестве вторичных антител использовали EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США). Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). После проведения иммуногистохимической реакции часть срезов докрашивали гематоксилином Джилла и заключали в синтетическую

Таблица 1. Значения оптической плотности продукта иммунной реакции на выявление субъединицы $\alpha 1$ ГАМК-А рецептора в разных слоях неокортекса в нейронах и нейропиле на 90-е постнатальные сутки у контрольных животных и после воздействия перинатальной гипоксии (в отн. ед.)

Слои неокортекса		Контроль	После воздействия перинатальной гипоксии
Слой I	(нейропиле)	0.204 ± 0.18	0.077 ± 0.017 *
Слой II–IV	(нейроны)	0.062 ± 0.13	0.083 ± 0.008
	(нейропиле)	0.042 ± 0.005	0.027 ± 0.006 *
Слой V	(нейроны)	0.132 ± 0.016	0.053 ± 0.011 *
	(нейропиле)	0.058 ± 0.009	0.035 ± 0.007 *
Слой VI	(нейроны)	0.098 ± 0.014	0.114 ± 0.01
	(нейропиле)	0.047 ± 0.009	0.021 ± 0.006*

* – Различия достоверны при $p < 0.05$.

заливочную среду Permaunt (Termo, США). При проведении иммуногистохимической реакции все процедуры были стандартизированы и осуществлялись одновременно для гистологических срезов, полученных от контрольных и подопытных животных.

Оптическую плотность продукта реакции оценивали в телах нейронов (выделяли иммунопозитивные нейроны) и нейропиле (выделяли участки сплетений иммунопозитивных отростков, терминалей, мелких зерен и крупных гранул (последние, предположительно, считают синаптическими структурами и их скоплениями [9]). Количественную оценку иммунореактивности производили с использованием системы анализа изображения, включающей световой микроскоп Olympus CX31 (Япония), цифровую камеру VideoZavr Standard VZ-C31Sr и программное обеспечение Видеозавр Мультиметр 2.3 (разработка ООО “АТМ-практика”, Санкт-Петербург). Оценивали среднюю оптическую плотность окраски в иммунопозитивных нейронах и нейропиле в относительных единицах.

Компьютерную морфометрию для подсчета иммунопозитивных нейронов проводили на изображениях, полученных с гистологических препаратов фронтальных срезов на стандартной площади 0.1 мм² (условная единица площади) при увеличении ок. ×10; об. ×100. Подсчитывали средние арифметические значение и ошибку среднего значения. Измерения проводили на 10 серийных срезах мозга, взятого от 4–5 животных каждой исследуемой группы. Для статистической обработки данных использовали компьютерные программы Statistica 7.0 и 8.0. (Statsoft Inc., USA). Для анализа и сравнения результатов между разными группами животных использовали *t* критерий Стьюдента и oneway ANOVA. Данные считались значимо отличимыми при уровне достоверности $p < 0.05$.

Исследование распределения иммунореактивных нейронов в разных слоях сенсомоторной области коры у контрольных животных показало, что в верхних слоях II–IV присутствовало 7.5 ± 1.1 имму-

нопозитивных нейронов, число иммунонегативных нейронов составляло 20.8 ± 1.9, а общее число клеток – 28.3 ± 1.5 на условную единицу площади. В слое V присутствовало 5.8 ± 0.7 иммунопозитивных нейронов и 12.6 ± 0.8 иммунонегативных, общее число клеток было равно 18.4 ± 0.8. В слое VI 10.3 ± 1.2 иммунопозитивных нейронов, 12.7 ± 1.4 иммунонегативных, общее число клеток составляло 23.4 ± 1.3.

У животных, переживших воздействие перинатальной гипоксии в верхних слоях II–IV, число иммунопозитивных нейронов составляло 6.1 ± 1.7 на условную единицу площади и иммунонегативных 12.5 ± 1.6 (значения достоверно различимы от таковых в контроле, $p < 0.05$), общее число клеток составляло 18.0 ± 1.8 (значения достоверно различимы от таковых в контроле, $p < 0.05$). В слое V число иммунопозитивных нейронов было равно 5.2 ± 0.9 на условную единицу площади, иммунонегативных 6.8 ± 1.1 (значения достоверно различимы от таковых в контроле, $p < 0.05$), общее число клеток – 12.2 ± 2.0 (значения достоверно различимы от таковых в контроле, $p < 0.05$). В слое VI число иммунопозитивных нейронов 7.4 ± 1.0, иммунонегативных 8.1 ± 0.7 (значения достоверно различимы от таковых в контроле, $p < 0.05$), общая численность клеток – 15.8 ± 2.1 на условную единицу площади (значения достоверно различимы от таковых в контроле, $p < 0.05$).

Таким образом, у животных, подвергавшихся воздействию перинатальной гипоксии, общая численность нейронов сокращалась в верхних слоях на 36.4% (II–IV), в глубоких слоях (V) на 33.3% и (VI) на 32.6%. Сравнительный анализ количественных данных по слоям сенсомоторной области неокортекса показал, что у животных, переживших перинатальную гипоксию, в глубоких слоях число нейронов, экспрессирующих $\alpha 1$ субъединицу ГАМК-А рецептора, снижалось на 37.2%. Выявлено, что у подопытных животных в слое I оптическая плотность продукта реакции по сравнению с

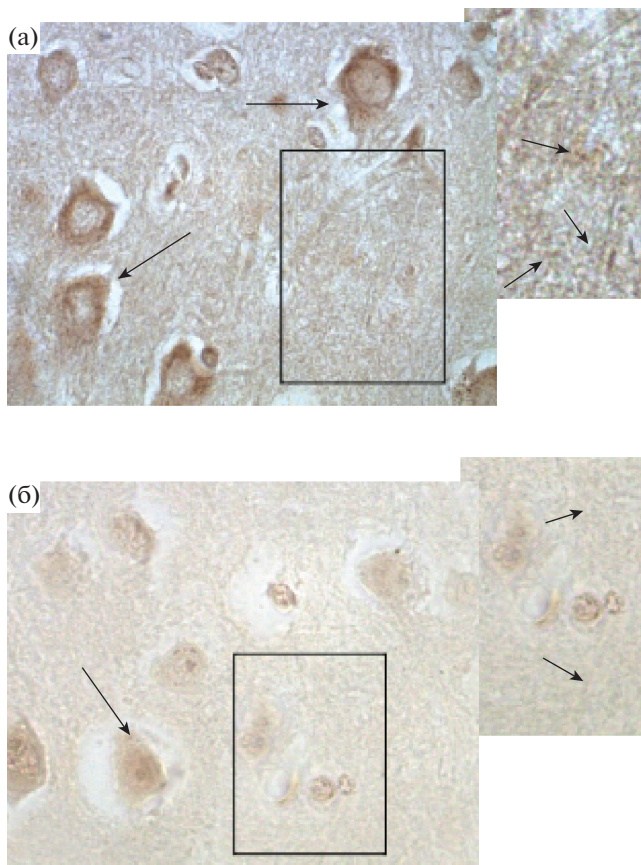


Рис. 1. Неокортекс крысы на 90 постнатальные сутки, сенсомоторная область. Иммуногистохимическая реакция на выявление субъединицы $\alpha 1$ ГАМК-А рецептора: а – контроль; б – после воздействия перинатальной гипоксии. Снижение интенсивности экспрессии субъединицы $\alpha 1$ ГАМК-А рецептора в слое V (длинная стрелка – иммунопозитивные нейроны, короткая стрелка – иммунопозитивные отростки, гранулы и их скопления в нейропиле); Увел. ок. $\times 10$; об. $\times 100$.

контролем значимо снижалась в 2.6 раза (табл. 1). В верхних слоях (II–IV) в телах нейронов ее значения примерно одинаковы во всех сериях опытов и соответствуют контролю. Однако в нейропиле в отростках и синаптических структурах у контрольных животных значения оптической плотности продукта реакции в 1.5 раза выше, чем после воздействия гипоксии (табл. 1; рис. 1).

В глубоких слоях (V) у контрольных животных в цитоплазме нейронов и в нейропиле в отростках и синаптических структурах эти значения значимо выше (в 2.5 и в 1.6 раза соответственно), чем после воздействия гипоксии (табл. 1; рис. 1). В слое VI как у контрольных животных, так и подопытных, в цитоплазме нейронов значения оптической плотности продукта реакции примерно одинаковы. Однако у крыс в контроле в нейропиле в отростках и синаптических структурах эти значения значимо выше (в 2.2 раза), чем у животных, переживших перинатальную гипоксию (табл. 1).

Результаты исследования показали, что воздействие гипоксии в перинатальный период в сенсомоторной области неокортекса вызывает структурные изменения в цитоархитектонике, которые сохраняются до периода полового созревания. Во всех слоях коры значительно сокращается общая численность нейронов. Выявлено, что перинатальная гипоксия оказывает негативное воздействие на тормозную ГАМКергическую систему, последствия которого сохраняются у животных в отдаленные постнатальные сроки. Так, число нейронов, экспрессирующих субъединицу $\alpha 1$ ГАМК-А рецептора, сокращается более чем на 37%. Показано, что имеет место снижение интенсивности экспрессии субъединицы $\alpha 1$ ГАМК-А рецептора во всех слоях коры, при этом более значимое снижение отмечено в слое V. В контроле в неокортексе присутствует значительное количество вставочных ГАМКергических интернейронов, которые способны экспрессировать как ГАМК, так и рецепторные белки к ней, присутствующие в цитоплазме клеток, отростках и синапсах. Известно, что окончательное становление неокортекса, в том числе стратификация, происходит в ранний постнатальный период (первые 4 недели). Воздействие перинатальной гипоксии может нарушать как пролиферацию и дифференцировку ГАМКергических нейронов, так и их миграцию к дефинитивному месту расположения, что может сокращать численность их популяции. Более того, перинатальная гипоксия может влиять на формирование нейропила и синаптогенез, при этом уменьшается число отростков, а также изменяется структура синапсов. В литературе есть сведения о нарушении экспрессии ГАМК-B1 и ГАМК-B2 субъединиц в гиппокампе после воздействия гипоксии/ишемии [10]. Однако механизм нарушения экспрессии субъединиц как ГАМК-B1, ГАМК-B2, так и в нашей работе $\alpha 1$ ГАМК-А после воздействия гипоксии остается неясным.

В заключение следует отметить, что воздействие гипоксии в перинатальный период приводит к сокращению общей численности нейронов в неокортексе, к уменьшению числа ГАМКергических нейронов, экспрессирующих субъединицу $\alpha 1$, и снижению уровня ее экспрессии, которые выявляются у животных в отдаленные сроки. Можно предположить, что эти изменения снижают передачу торможения в этой области коры. Учитывая широкую распространенность ГАМК-А рецептора в мозге млекопитающих, его важную роль в синаптической передаче торможения, субъединица $\alpha 1$ может быть удобной мишенью при применении фармакологических препаратов при ряде заболеваний центральной нервной системы. Данная работа выявила одну из мишеней воздействия гипоксии, а результаты будут способствовать поиску новых средств фармакологической коррекции ее последствий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Вере Ивановне Мироновой, научному сотруднику лаборатории нейроэндокринологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, за предоставленную возможность использовать компьютерное программное обеспечение для анализа оптической плотности продукта реакции после иммуноокрашивания гистологических препаратов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводились 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.

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kalanjati P., Miller S.M., Ireland Z., Colditz P.B., Bjorkman S.T.* Developmental expression and distribution of

GABA(A) receptor $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ - and $\beta 2$ -subunits in pig brain. *Dev. Neurosci.* 33. 2: 99-109. 2011.

2. *Gaspary H.L., Wang W., Richerson G.B.* Carrier-mediated GABA release activates GABA receptors on hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 80 (1): 270–281. 1998.

3. *Hevers W., Korpi E.R., Luddens H.* Assembly of functional $\alpha 6\beta 3\gamma 2\delta$ GABA(A) receptors in vitro. *Neuroreport.* 11 (18): 4103–4106. 2000.

4. *Banks M.I., Pearce R.A.* Kinetic differences between synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors in CA1 pyramidal cells. *J. Neurosci.* 20 (3): 937–948. 2000.

5. *Cherubini E., Conti F.* Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci.* 24 (3): 155–162. 2001.

6. *Bai D., Zhu G., Pennefather P.* Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid(A) receptors in hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.* 59 (4): 814–824. 2001.

7. *Pirker S., Schwarzer C., Wieselthaler A., Sieghart W., Sperk G.* GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience.* 101 (4): 815–50. 2000.

8. *Paxinos G., Watson C.* The Rat Brain in stereotaxic coordinates. London: Press. 1998.

9. *Guthmann A., Fritschy J.M., Ottersen O.P., Torp R., Herbert H.* GABA, GABA transporters, GABA(A) receptor subunits, and GAD mRNAs in the rat parabrachial and Kölliker-Fuse nuclei. *J. Comp. Neurol.* 400 (2): 229–243. 1998.

10. *Cho S., Liu D., Fairman D., Li P., Jenkins L., McGonigle P., Wood A.* Spatiotemporal evidence of apoptosis-mediated ischemic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem. Int.* 45: 117–127. 2004.

Expression of GABA_A Receptor Subunit $\alpha 1$ in Rat Neocortex after Perinatal Hypoxia

L. I. Khozhai^{a,#} and V. A. Otellin^a

^a Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

[#]e-mail: astarta0505@mail.ru