

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГАМКергических ИНТЕРНЕЙРОНОВ И ТРАНСПОРТЕРА ГАМК GAT₁ В СЛОЯХ НЕОКОРТЕКСА В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД У КРЫС

© 2022 г. Л. И. Хожай*

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

**E-mail: astarta0505@mail.ru*

Поступила в редакцию 14.04.2022 г.

После доработки 15.06.2022 г.

Принята к публикации 06.07.2022 г.

Изучено распределение нейронов, содержащих ГАМК, и интенсивность иммуногистохимического мечения транспортера ГАМК GAT₁ в разных слоях неокортекса в течение неонатального периода у крыс. На начальных этапах неонатального периода в слоях II–III и VI имеет место высокая численность нейронов, содержащих ГАМК, которая к концу неонатального периода значительно снижается и тормозные интернейроны распределяются во всех слоях примерно равномерно. К концу неонатального периода значительно повышается уровень иммуногистохимического мечения GAT₁, что, вероятно, может свидетельствовать о возрастании роли синаптической тормозной нейротрансмиссии.

Ключевые слова: ГАМК, GAT₁, ГАМКергические нейроны, неокортекс, неонатальный период

DOI: 10.31857/S0041377122060050

В состав коры головного мозга входят нейроны разных типов, обладающие специфическими морфологическими, молекулярными и функциональными характеристиками и локализующиеся в определенных слоях. Тормозные ГАМКергические интернейроны имеют особый статус, так как при синаптическом торможении обеспечивают стабильность корковых нейронных сетей. Эти нейроны образуют гетерогенную группу клеток, которые не только осуществляют регуляцию активности отдельных популяций пирамидных нейронов неокортекса, но и модулируют пространственно-временную динамику различных форм синхронизированных сетевых колебаний (Klausberger, Somogyi, 2008).

Полагают, что нейронные сети в неокортексе организованы по определенным правилам, которые гарантируют критически важный баланс между количеством возбуждающих и тормозных нейронов, и это соотношение во взрослом неокортексе относительно постоянно (Fishell, Rudy, 2011; Sahara et al., 2012).

Во время эмбриогенеза молодые ГАМКергические нейроны мигрируют из определенных пролиферативных зон вентральной части продолговатого мозга к развивающемуся неокортексу, где первое появление ГАМК в клетках зарегистрировано на 14.5 эмбриональные сутки. На начальных этапах миграция имеет тангенциальное направление, которое затем, в промежуточной зоне неокортекса, меняется на радиальное и нейроны распределяются по слоям,

занимая свое дефинитивное положение (Marín, Rubenstein, 2001).

Развитие неокортекса происходит на протяжении длительного периода времени, который включает как пренатальный, так и неонатальный период, во время которого завершается его формирование и становление нейронных связей, при этом упорядоченное расположение нейронов в слоях неокортекса имеет решающее значение для нормального функционирования ЦНС (Fishell, Rudy, 2011; Sahara et al., 2012). Несмотря на то, что в последние годы были выявлены некоторые механизмы, регулирующие миграцию ГАМК-содержащих нейронов в период развития неокортекса, сведений о динамике распределения ГАМКергических интернейронов в слоях неокортекса в неонатальный период в настоящее время крайне мало.

Для ГАМК выявлено четыре класса транспортных белков: GAT₁, GAT₂, GAT₃ и GAT₄ (или BGT-1 betaine), среди которых GAT₁ считается одним из основных транспортеров при синаптической нейротрансмиссии (Gadea, Lopez-Colome, 2001). Во взрослом мозге этот белок обнаружен как в нейронах, так и в глиальных клетках. Электронно-микроскопические исследования показали, что GAT₁ может присутствовать в цитоплазме и проксимальных отделах отростков нейронов, в терминалях аксонов, образующих симметричные синапсы, в отростках астроцитов (Fattorini et al., 2020). GAT₁ относится к Na⁺-зависимым

транспортным белкам обратного захвата, локализуемым на плазматической мембране нейронов (Augood et al., 1995, Bernstein, Quick, 1999). Функция транспортеров ГАМК заключается в переносе через мембрану аниона этой аминокислоты на основе градиента катиона натрия (Lu et al., 1999; Loo et al., 2000). При тормозной нейротрансдукции скорость обратного захвата ГАМК из синаптической щели или межклеточного пространства, осуществляемого транспортером ГАТ₁, определяет эффективность нейротрансдукции. Вопрос о динамике экспрессии ГАТ₁ в разных слоях неокортекса в неонатальный период развития до настоящего времени остается мало освещенным.

В связи с этим целью работы было изучение распределения нейронов, содержащих ГАМК, и интенсивности иммуногистохимического мечения ГАТ₁ в слоях неокортекса в течение неонатального периода у крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

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

Гистологические и иммуногистохимические методы исследования. Головной мозг извлекали, 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 mm ...0.40 mm (Khazipov et al., 2015). Затем срезы помещали на предметные стекла Super-Frost Plus Gold (Menzel-Glaser, Германия). У интактных животных исследовали соматосенсорную область неокортекса на 5-е ($n = 5$) и 10-е ($n = 5$) сутки постнатального развития (П5, П10). Общий морфологический анализ проводили на цифровых изображениях серийных гистологических срезов, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия) при увеличении объектива 100×.

Иммуногистохимическую реакцию на ГАМК 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, 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). Срезы помещали во вторичные антитела на 40 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). Специфичность иммунной реакции проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител).

Иммуногистохимическую реакцию на ГАТ₁ проводили с использованием первичных кроличьих по-

ликлональных антител (anti-GABA transporter 1; ГАТ₁; ab426, Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 100. После процедуры теплового демаскирования белков в цитратном буфере (рН 6.1) (Dako, Дания) в течение 20 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при 4°C в течение 18 ч. В качестве вторичных реагентов для выявления ГАТ₁ использовали реактивы из набора EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США). Срезы помещали во вторичные антитела на 30 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). Срезы заключали в синтетическую среду Permount (Termo, США). Специфичность иммунной реакции проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител).

Оценка оптической плотности продукта иммуногистохимической реакции. 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 нейрорпиле – сети иммуно-позитивных отростков, терминалей, а также в скоплениях мелких и крупных гранул. Последние, предположительно, считаются терминальными синаптическими структурами и их скоплениями (Guthmann et al., 1998). Для этого контуром выделяли участки сети иммунопозитивных отростков и скоплений гранул. Уровень содержания ГАТ₁ выражали в относительных единицах оптической плотности продукта иммунной реакции. Определяли среднее значение D (отн. ед.) интенсивности окраски в иммунопозитивных отростках и гранулах при увеличении объектива 100×.

Статистическая обработка результатов исследования. При проведении иммуногистохимических реакций все процедуры были стандартизированы и осуществлялись одновременно для гистологических срезов мозга, полученных от животных разного возраста.

Количество иммуноположительных клеток оценивали на стандартной площади 0.1 мм² (условной единице площади) при увеличении объектива 100×. Количественный анализ данных осуществляли на изображениях, полученных с 12–15 гистологических срезов мозга, взятого от 5 животных каждой исследуемой возрастной группы, при помощи пакетов компьютерных программ ImageJ (NIH, США), Origin 5.0. 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., USA), различия считали достоверными при $P < 0.05$.

Использованные реактивы: первичные кроличьи поликлональные антитела к ГАМК (ab8891) и GAT₁ (ab426), вторичные антитела Goat anti-rabbit IgG H&L(HRP) (Abscam, Великобритания); набор реактивов EnVision + 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

Распределение нейронов, содержащих ГАМК, в разных слоях соматосенсорной области неокортекса на 5 постнатальные сутки

На П5 в слое I присутствует небольшое число интернейронов (6.2 ± 0.9 на условной единице площади (здесь и далее)) (табл. 1), сеть иммуноокрашенных отростков, многочисленные синаптические структуры, а также клетки Кахаля–Ретциуса, которые определялись визуально по морфологическим критериям (локализация в слое I, горизонтальная ориентация, овальная форма тела клетки, основные отростки вытянуты параллельно пиальной оболочке).

В слоях II–III иммунопозитивные нейроны, имеющие преимущественно веретеновидную форму тела, располагаются близко друг к другу, их число составляет 18.6 ± 2.1 клеток (табл. 1). Нейропиле развит слабо, хотя иммуноокрашенные отростки образуют рыхлую сеть. Отдельные иммуноокрашенные отростки, отходящие от тел клеток, имеют варикозные расширения и редкие синаптические структуры.

В слоях IV и V присутствуют иммунопозитивные нейроны как веретеновидной, так и мультиполярной формы, при этом их число в 1.5 и 2.3 раза меньше (12.5 ± 1.8 и 8.0 ± 1.4 соответственно), чем в верхних слоях (табл. 1). Нейропиле более развит, сеть иммуноокрашенных отростков плотнее, также присутствуют варикозные расширения и синаптические структуры.

В слое VI присутствуют иммунопозитивные нейроны разной формы и размеров, их количество соответствует числу таких нейронов в верхних слоях (19.3 ± 1.2) (табл. 1). В нейропиле плотность сети иммуноокрашенных отростков аналогична таковой в слое V, отростки имеют варикозные расширения и синаптические структуры.

Распределение нейронов, содержащих ГАМК, в разных слоях соматосенсорной области неокортекса на 10 постнатальные сутки

На П10 в слое I (так же, как и на предыдущем исследованном сроке) присутствует небольшое число интернейронов (табл. 1), плотная сеть иммуноокрашенных отростков, большое количество синаптических структур.

Таблица 1. Распределение нейронов, содержащих ГАМК, в слоях соматосенсорной области неокортекса крыс на 5 и 10 постнатальные сутки

Слои коры	Количество интернейронов на условной ед. площади	
	Сроки развития	
	П5	П10
I	6.2 ± 0.4	5.8 ± 1.2
II–III	18.6 ± 1.4	$9.0 \pm 1.3^*$
IV	12.5 ± 1.8	10.7 ± 1.2
V	8.0 ± 1.4	7.4 ± 0.9
VI	19.3 ± 1.2	$8.5 \pm 0.8^*$

* Различия между животными разных возрастных групп достоверны при $P < 0.05$.

В слоях II–III число иммунопозитивных нейронов значительно меньше (9.0 ± 1.3), чем на предыдущем исследованном сроке (табл. 1), при этом в нейропиле присутствует сеть иммуноокрашенных отростков и синаптических структур, которые локализуются не только на отростках, но и телах пирамидных нейронов.

В слоях IV и V наблюдается сходная картина. Здесь присутствуют веретеновидные, мультиполярные и пирамидные клетки. Число ГАМК-иммунопозитивных нейронов примерно такое же, как в верхних слоях (10.7 ± 1.2 и 7.4 ± 0.9) (табл. 1). В нейропиле выявляется плотная сеть иммуноокрашенных отростков и синаптических структур, располагающихся как на отростках, так и на и телах подавляющего большинства клеток.

В слое VI число иммунопозитивных нейронов примерно такое же, как в верхних слоях II–III, при этом значительно ниже, чем в таковых на П5 (табл. 1). В нейропиле сеть иммунореактивных отростков и синаптических структур менее плотная, чем в верхних слоях.

Таким образом, на П5 в верхних слоях II–III и глубоком слое VI число нейронов, содержащих ГАМК, существенно превышает их количество в слоях IV и V (в 1.5 и 2.3 раза соответственно). К концу неонатального периода (П10) картина меняется: в верхних слоях II–III и слое VI число иммунопозитивных клеток значительно снижается (в 2.1 и 2.3 раза соответственно) и соответствует значениям в слоях IV и V, в которых их число не изменяется в течение неонатального периода.

Интенсивность иммуногистохимического мечения GAT₁ в разных слоях соматосенсорной области неокортекса на 5 и 10 постнатальные сутки (оценка оптической плотности окрашивания (D) в усл. ед.)

На П5 самая высокая интенсивность иммуноокрашивания на GAT₁ имела место в слое I ($0.280 \pm$

Таблица 2. Интенсивность иммуногистохимической реакции на GAT₁ в разных слоях соматосенсорной области неокортекса крыс на 5 и 10 постнатальные сутки (представлены значения оптической плотности продукта иммунной реакции (D) в отн. ед.)

Локализация	D, отн. ед.	
	Сроки развития	
Слои коры	П5	П10
I	0.280 ± 0.004	0.142 ± 0.007*
II–III	0.044 ± 0.002	0.138 ± 0.005*
IV	0.071 ± 0.003	0.091 ± 0.004*
V	0.095 ± 0.004	0.123 ± 0.008*
VI	0.048 ± 0.005	0.069 ± 0.003

* Различия значений D между животными разных возрастных групп достоверны при $P < 0.05$.

± 0.004) (табл. 2, рис. 1а). Интенсивность иммуногистохимической реакции на GAT₁ в других слоях была различной: в слоях II–III и VI она была относительно низкой (0.044 ± 0.002 и 0.048 ± 0.003 соответственно) (рис. 1б), а в слоях IV и V – существенно выше, чем в верхних слоях II–III и слое VI (табл. 2, рис. 1в).

На П10 иммунореактивность на GAT₁ в слое I снижается в 2 раза по сравнению с таковым значением на П5 (рис. 1а, з), в остальных слоях неокортекса (II–III, IV, V и VI) существенно повышается (в 3.1, 1.3 и 1.4 раза соответственно) (рис. 1б, в, д, е, табл. 2). Иногда в глубоких слоях встречаются одиночные иммунопозитивные нейроны (рис. 1е, короткая стрелка).

Таким образом, на П5 самая высокая интенсивность иммуномечения GAT₁ обнаруживается в слое I, в остальных слоях (по сравнению со слоем I) она значительно ниже: в слоях II–III в 6.4 раза, в слоях IV и V – в 3.5 и 3.0 раза, в слое VI – в 5.8 раз. К концу неонатального периода (П10) в слое I интенсивность иммуномечения GAT₁ снижается в 2 раза (по сравнению со значениями на П5), в остальных слоях этот показатель существенно увеличивается: более всего интенсивность иммуномечения GAT₁ повышается в верхних слоях II–III (в 3.1 раза), в слоях IV и V – в 1.3 раза, а в слое VI – в 1.4 раза (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Созревание ГАМКергической системы у большинства млекопитающих и человека, в основном, происходит в постнатальный период (Warm et al., 2021). В ходе пренатального развития тормозные интернейроны неокортекса возникают из различных популяций прогениторных клеток, локализующихся в вентральной части конечного мозга в области sub-pallium, которая в этот период имеет пять основных

пролиферативных зон: латеральное, медиальное и каудальное ганглиозные возвышения, преоптическую область и перегородку (Wonders, Anderson, 2006; Gelman, Marín, 2010). Подавляющее большинство интернейронов происходит из медиального ганглиозного возвышения (Butt et al., 2005; Flames et al., 2007; Fogarty et al., 2007; Inan et al., 2012; Taniguchi et al., 2013) и миграция предшественников интернейронов начинается на 14 эмбриональный день (Warm et al., 2021). Однако механизмы, которые контролируют распределение мигрирующих интернейронов по слоям во время развития неокортекса, в настоящее время до конца не ясны. Вместе с тем, существует несколько версий. Предполагают, что этот процесс связан с изменением направления миграции интернейронов: от тангенциального к радиальному, во время которого они распределяются по слоям коры (Lavdas et al., 1999; Marín, Rubenstein, 2001; Wichterle et al., 2001). Есть доказательство, что интернейроны заселяют глубокие или верхние слои коры в зависимости от получаемых специфических сигналов от пирамидных нейронов, локализующихся в этих слоях (Lodato et al., 2011). С другой стороны, полагают, что в медиальном ганглиозном возвышении присутствуют две разные линии прогениторных клеток: одна генерирует интернейроны в основном для глубоких слоев (V и VI) и другая – для верхних слоев (II–IV) (Ciceri et al., 2013). И, наконец, есть мнение, что в ходе развития на более ранних сроках возникает популяция интернейронов, которая заселяет глубокие слои (VI и V), а интернейроны, появляющиеся на более поздних сроках, распределяются в верхних слоях (II–IV) неокортекса (Valcanis, Tan, 2003; Pla et al., 2006; Rymar, Sadikot, 2007).

Установлено, что во время развития мозга незрелые нейроны высвобождают ГАМК, которая выступает в это время в качестве возбуждающего транмиссера, необходимого для процессов миграции (в этот момент высвобождаемая ГАМК представляет хемоаттрактант), дифференцировки, экспрессии рецепторов и установления нейронных связей (Rheims et al., 2008; Terrapola et al., 2019). Созревание тормозной системы совпадает с появлением коррелированных паттернов спонтанной активности нейронов у новорожденных грызунов и человека, которая обеспечивается деполяризацией незрелых нейронов, вызванной возбуждающим эффектом ГАМК. Считают, что деполяризация и нейронная активность являются ключевыми регуляторами субклеточных процессов, которые лежат в основе смены в развитии сигналов ГАМК, таких как экспрессия транспортеров, изменение концентрации хлоридов, экспрессия рецепторов к ГАМК и ГАМКергический синаптогенез (Flossmann et al., 2019; Hanson et al., 2019). Было выявлено, что для поддержания уровня сетевой активности необходима определенная численность популяции интернейронов в развивающемся мозге (Sukenik et al., 2021).

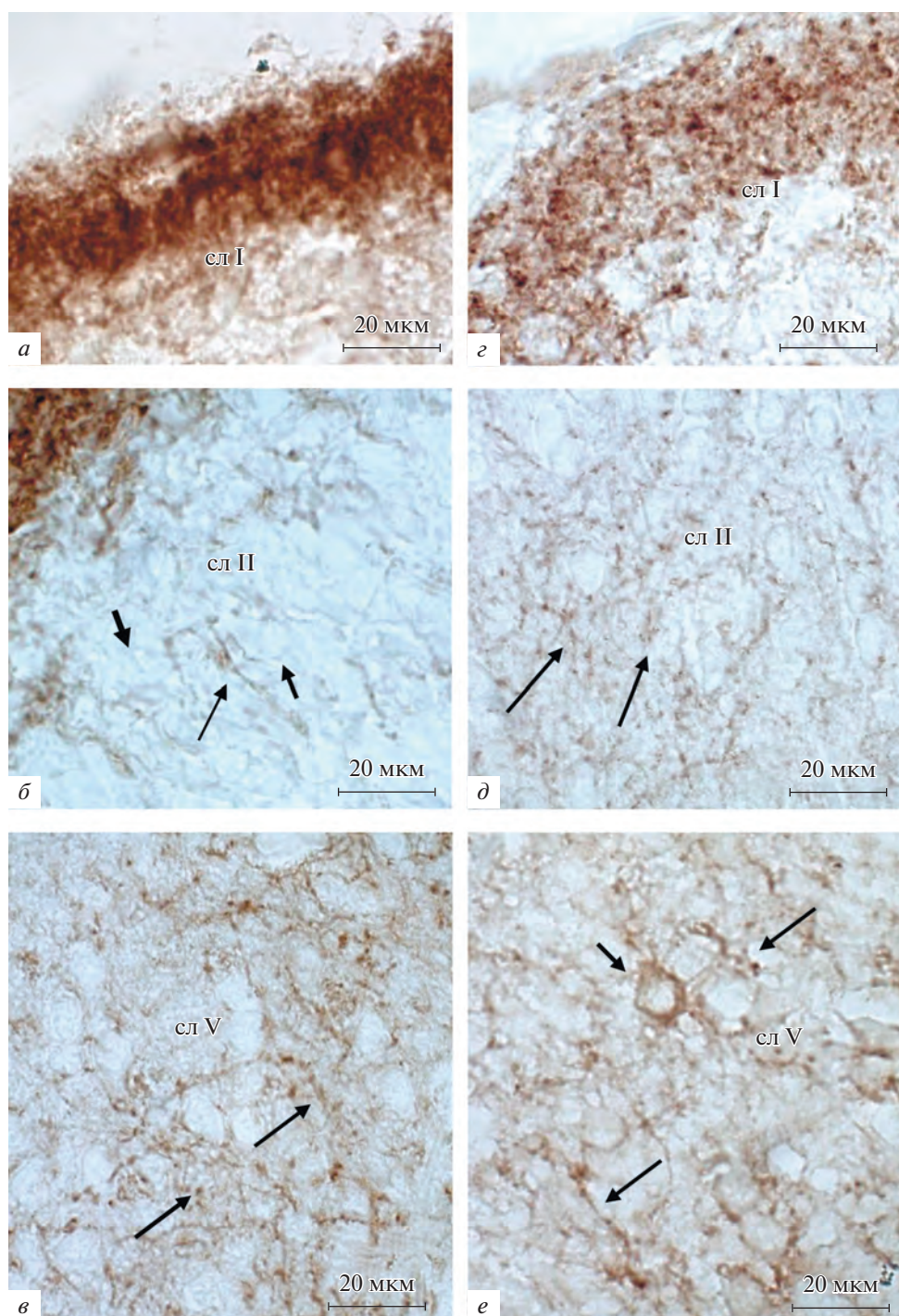


Рис. 1. Соматосенсорная область неокортекса крысы на П5 (а–в) и на П10 (г–е); иммуногистохимическая реакция на GAT₁. а, г – Слой I, снижение интенсивности иммуногистохимической реакции на GAT₁ к концу неонатального периода (к П10). б, д – Слой II, видны тела неокрашенных нейронов (короткие стрелки), увеличение интенсивности иммуногистохимической реакции на GAT₁ к концу неонатального периода (к П10), иммуноокрашенные отростки и синаптические структуры (длинные стрелки). в, е – слой V, наблюдаются высокая интенсивность иммуногистохимической реакции на GAT₁ на П5 и П10, иммуноокрашенные отростки и синаптические структуры (длинные стрелки), одиночные иммунопозитивные нейроны (короткие стрелки). Увел.: об. 100×.

Результаты проведенного исследования показали, что на протяжении неонатального периода в разных слоях неокортекса количество нейронов, содержащих

ГАМК, изменяется. На более раннем сроке (П5) неонатального периода самая высокая численность популяции интернейронов была отмечена в

слоях II–III и VI. В это время в верхних слоях II–III отмечены слабо развитый нейропилль, веретеновидная форма клеток, которая свойственна незрелым нейронам, а также крайне малое количество синаптических структур. Это дает основание предполагать, что окончательное становление верхних слоев и дифференцировка как пирамидных нейронов, так и интернейронов в это время еще не завершены, в отличие от глубоких слоев IV, V и VI, в которых нейроны часто имеют пирамидную или мультиполярную форму и несколько отростков, где более развит нейропилль и присутствуют синаптические структуры. Это согласуется с утверждением, что к середине неонатального периода в неокортексе завершается стратификация и нейроны начинают формировать синапсы (Warm et al., 2021). Результаты нашего исследования свидетельствуют, что к концу неонатального периода (P10) нейроны, содержащие ГАМК, примерно равномерно распределяются по всем слоям (II–III–VI) коры, также отмечено, что уровень экспрессии GAT_1 в этих слоях значительно повышается по сравнению с предыдущим сроком развития, что может свидетельствовать об увеличении трансмиссии ГАМК.

Полагают, что одним из факторов, оказывающих влияние на миграционное поведение нейронов, является программа внутреннего созревания ГАМКергических нейронов. В соответствии с этим предположением, в неокортексе мигрирующие нейроны могут находиться в периоде ожидания завершения определенного этапа своей дифференцировки или созревания своих мишеней и далее продолжать миграцию (Bartolini et al., 2013). В связи с этим, большое количество молодых интернейронов в верхних слоях (на P5) можно рассматривать как их временное локальное скопление в период ожидания дифференцировки и созревания. Вероятно, окончательное завершение этих процессов в верхних слоях происходит к концу неонатального периода, и результатом этого является значительное снижение численности нейронов, содержащих ГАМК. Известно, что в неонатальный период продолжается миграция клеток в неокортекс, при этом они проходят через белое вещество мозга, слой VI и далее распределяются по всем вышележащим слоям развивающегося неокортекса (Marín, Rubenstein, 2001). На P5 скопление интернейронов в слое VI может свидетельствовать о том, что здесь также временно может находиться популяция молодых интернейронов, которые после определенного периода ожидания будут распределяться по разным слоям неокортекса до конца неонатального периода. Полученные данные согласуются с наблюдениями других авторов о том, что миграция нейронов завершается к концу 1-й постнатальной недели (Lim et al., 2018). Скопления молодых интернейронов, обнаруженные в верхних II–III и глубокоом VI слоях, также можно рассматривать как временные и необходимые для осуществления нейронной активности, за которой последуют процессы созревания, смены

функции ГАМК, экспрессия рецепторных белков и транспортеров.

Слой I играет особую критическую роль в формировании слоев и неокортекса в целом (Marín-Padilla, 1998; Soriano, del Rio, 2005). Слой I содержит две основные популяции нейронов: клетки Кахаля–Ретциуса, локализующиеся в поверхностном субслое, и ГАМКергические интернейроны, мигрирующие сюда из области subpallium и располагающиеся в нижнем субслое (Hevner et al., 2003; Villar-Cerviño et al., 2013). Присутствующие в нейропиле отростки локальных интернейронов и аксоны клеток Мартинотти, образуют мощные ГАМКергические связи с клетками Кахаля–Ретциуса, также здесь находятся дендриты пирамидных нейронов нижележащих слоев (Cosgrove, Massaferrì, 2012). Результаты данного исследования показали, что на P5 и P10 в слое I присутствует одинаковое количество интернейронов, при этом на P5 имеет место самая высокая интенсивность экспрессии GAT_1 . Далее, к концу неонатального периода, интенсивность экспрессии GAT_1 в слое I значительно снижается (в 2 раза). В одной из работ (Dvorzhak, et al., 2010) было показано, что количество самой ГАМК вблизи ГАМКергических синапсов на клетках Кахаля–Ретциуса снижается в 2 раза в период с P2 до P7 и имеет тенденцию к дальнейшему снижению. Уменьшение количества ГАМК будет приводить к снижению экспрессии транспортера GAT_1 . Подтверждением этого предположения могут быть данные, полученные при изучении синтеза поверхностных белков, показавших, что снижение экспрессии поверхностного транспортера GAT_1 коррелирует с сокращением транспорта ГАМК. Вероятно, изменение трансмиссии ГАМК к концу неонатального периода связано с окончанием формирования верхних слоев неокортекса, установлением дефинитивных синаптических связей и, в результате, снижением трансмиссии ГАМК в слое I, которая в этот ранний период может выполнять модуляторную роль.

Таким образом, в неонатальный период в неокортексе происходят завершающие процессы формирования тормозных ГАМКергических локальных сетей. Показано, что эти процессы сопровождаются изменением количества ГАМКергических нейронов в разных слоях коры и изменением интенсивности иммуногистохимической реакции на GAT_1 . На начальных этапах неонатального периода в слоях II–III и VI имеет место высокая численность популяции нейронов, содержащих ГАМК, которая к концу неонатального периода значительно снижается и тормозные интернейроны распределяются во всех слоях примерно равномерно. К концу неонатального периода, по данным иммуногистохимического анализа, значительно повышается уровень GAT_1 , что, вероятно, может свидетельствовать об увеличении синаптической тормозной нейропередачи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00052/22).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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. Протоколы экспериментов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор сообщает об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Augood S.J., Herbison A.E., Emson P.C.* 1995. Localization of GAT-1 GABA transporter mRNA in rat striatum: cellular co-expression with GAD, mRNA, GAD, immunoreactivity, and parvalbumin mRNA. *J. Neuroscience*. V. 15. P. 665.
- Bartolini G., Ciceri G., Marín O.* 2013. Integration of GABAergic interneurons into cortical cell assemblies: lessons from embryos and adults. *Neuron*. V. 79. P. 849.
- Bernstein E.M., Quick M.W.* 1999 Regulation of γ -aminobutyric acid (GABA) transporters by extracellular GABA. *J. Biol. Chem.* V. 274. P. 889.
- Butt S.J., Fuccillo M., Nery S., Noctor S., Kriegstein A., Corbin J.G., Fishell G.* 2005. The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron*. V. 48. P. 591.
- Ciceri G., Dehorter N., Sols I., Huang Z. J., Maravall M., Marín O.* 2013. Lineage-specific laminar organization of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Neurosci.* V. 16. P. 1199.
- Cosgrove K.E., Maccaferri G.* 2012. mGlu1 α -dependent recruitment of excitatory GABAergic input to neocortical Cajal-Retzius cells. *Neuropharmacology*. V. 63. P. 486.
- 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.* V. 588. P. 2351.
- Fattorini G., Melone M., Conti F.* 2020. A reappraisal of GAT-1 localization in neocortex. *Front. Cell Neurosci.* V. 14. P. 9.
- Fishell G., Rudy B.* 2011. Mechanisms of inhibition within the telencephalon: “Where the wild things are”. *Annu. Rev. Neurosci.* V. 34. P. 535.
- Flames N., Pla R., Gelman D.M., Rubenstein J.L., Puellas L., Marín O.* 2007. Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J. Neurosci.* V. 27. P. 9682.
- Flossmann T., Kaas T., Rahmati V., Kiebel S.J., Witte O.W., Holthoff K., Kirmse K.* 2019. Somatostatin interneurons promote neuronal synchrony in the neonatal hippocampus. *Cell Rep.* V. 26. P. 3173.
- Fogarty M., Grist M., Gelman D., Marín O., Pachnis V., Kessaris N.* 2007. Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J. Neurosci.* V. 27. P. 10935.
- Gadea A., Lopez-Colome A.M.* 2001. Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. *J. Neurosci. Res.* V. 63. P. 461.
- Gelman D.M., Marín O.* 2010. Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci.* V. 31. P. 2136.
- 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 Kolliker-Fuse nuclei. *J. Comp. Neurol.* V. 400. P. 229.
- Hanson E., Armbruster M., Lau L.A., Sommer M.E., Klafz Z.J., Swanger S.A., Traynelis S., Moos S.J., Noubary F., Chadchankar J., Dulla C.G.* 2019. Tonic activation of GluN2C/GluN2D-containing NMDA receptors by ambient glutamate facilitates cortical interneuron maturation. *J. Neurosci.* V. 39. P. 3611.
- Hevner R.F., Neogi T., Englund C., Daza R.A.M., Fink A.* 2003. Cajal–Retzius cells in the mouse: Transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Dev. Brain Res.* V. 141. P. 39.
- Inan M., Welagen J., Anderson S.A.* 2012. Spatial and temporal bias in the mitotic origins of somatostatin- and parvalbumin-expressing interneuron subgroups and the chandelier subtype in the medial ganglionic eminence. *Cereb. Cortex*. V. 22. P. 820.
- Khazipov R., Zaynutdinova D., Ogievetsky E., Valeeva G., Mitrushkina O., Manent J.-B., Represa A.* 2015. Atlas of the postnatal rat brain in stereotaxic coordinates. *Front. Neuroanat.* V. 9. P. 161.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00161>
- Klausberger T., Somogyi P.* 2008. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science*. V. 321. P. 53.
- Lavdas A.A., Grigoriou M., Pachnis V., Parnavelas J.G.* 1999. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* V. 19. P. 7881.
- Lim L., Pakan J.M.P., Selten M.M., Marques-Smith A., Llorca A., Bae S.E.* 2018. Optimization of interneuron function by direct coupling of cell migration and axonal targeting. *Nat. Neurosci.* V. 21. P. 920.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0162-9>
- Lodato S., Rouaux C., Quast K.B., Jantrachotechatchawan C., Studer M., Hensch T.K., Arlotta P.* 2011. Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron*. V. 69. P. 763.
- Loo D.D., Eskandari S., Boorer K.J.* 2000. Role of Cl⁻ in electrogenic Na⁺-coupled cotransporters GAT1 and SGLT1. *J. Biol. Chem.* V. 275. P. 37414.
- Lu C.C., Hilgemann D.W.* 1999. GAT1 (GABA:Na⁺:Cl⁻) cotransport function. Steady state studies in giant *Xenopus* oocyte membrane patches. *J. Gen. Physiol.* V. 114. P. 429.
- Marín O., Rubenstein J.L.R.* 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 2. P. 780.
- Marín-Padilla M.* 1998. Cajal–Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci.* V. 21. P. 64.

- Pla R., Borrell V., Flames N., Marín O.* 2006. Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling. *J. Neurosci.* V. 26. P. 6924.
- Rheims S., Minlebaev M., Ivanov A., Represa A., Khazipov R., Holmes G., Ben-Ari Y., Zilberter Y.* 2008. Excitatory GABA in rodent developing neocortex in vitro. *J. Neurophysiol.* V. 100. P. 609.
- Rymar V.V., Sadikot A.F.* 2007. Laminar fate of cortical GABAergic interneurons is dependent on both birthdate and phenotype. *J. Comp. Neurol.* V. 501. P. 369.
- Sahara S., Yanagawa Y., O'Leary D.D., Stevens C.F.* 2012. The fraction of cortical GABAergic neurons is constant from near the start of cortical neurogenesis to adulthood. *J. Neurosci.* V. 32. P. 4761.
- Soriano E., del Río J.A.* 2005. The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron.* V. 46. P. 389.
- 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*, V. 118. P. e2018459118.
- Taniguchi H., Lu J., Huang Z.J.* 2013. The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex. *Science.* V. 339. P. 70.
- Teppola H., Aćimović J., Linne M.L.* 2019. Unique features of network bursts emerge from the complex interplay of excitatory and inhibitory receptors in rat neocortical networks. *Front. Cell. Neurosci.* V. 13. P. 377.
- Valcanis H., Tan S.S.* 2003. Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex. *J. Neurosci.* V. 23. P. 5113.
- Villar-Cerviño V., Molano-Mazón M., Catchpole T., Valdeolmillos M., Henkemeyer M., Martínez L.M., Borrell V., Marín O.* 2013. Contact repulsion controls the dispersion and final distribution of Cajal-Retzius cells. *Neuron.* V. 77. P. 457.
- Warm D., Schroer J., Sinning A.* 2021. Gabaergic interneurons in early brain development: conducting and orchestrated by cortical network activity. *Front. Mol. Neurosci.* V. 14. P. 807969.
- Wichterle H., Turnbull D.H., Nery S., Fishell G., Alvarez-Buylla A.* 2001. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development.* V. 128. P. 3759.
- Wonders C.P., Anderson S.A.* 2006. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 7. P. 687.

Distribution of GABAergic Interneurons and GAT₁ GABA Transporter in Neocortical Layers in the Neonatal Period In Rats

L. I. Khozhai*

Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, 199034 Russia

**e-mail: astarta0505@mail.ru*

We studied the distribution of neurons containing GABA and the intensity of immunohistochemical labeling of the GAT₁ GABA transporter in different layers of the neocortex during the neonatal period in rats. At the initial stages of the neonatal period in layers II–III and VI, there is a high population of neurons containing GABA, which significantly decreases by the end of the neonatal period and inhibitory interneurons are distributed approximately evenly in all layers. By the end of the neonatal period, the level of GAT₁ immunolabeling significantly increases, which may indicate an increase in synaptic inhibitory neurotransmission

Keywords: GABA, GAT₁, GABAergic neurons, neocortex, neonatal period