

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины»**

На правах рукописи

РАЗЕНКОВА ВАЛЕРИЯ АЛЕКСЕЕВНА

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ В
СТРУКТУРАХ КОНЕЧНОГО МОЗГА**

1.5.22 – клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор РАН
Дмитрий Эдуардович Коржевский

Санкт-Петербург

2024 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ГЛАВА 1. ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
2.1. Общая характеристика глутаматдекарбоксилаз и ГАМК-ергической системы головного мозга	14
2.1.1. Открытие ГАМК. История изучения глутаматдекарбоксилазы.....	14
2.1.2. Биохимические и структурные особенности глутаматдекарбоксилазы.....	16
2.1.3. Синтез и катаболизм ГАМК.....	18
2.2. Функциональное значение ГАМК-ергической системы головного мозга	21
2.2.1. Активность ГАМК-ергической системы при нормальном функционировании ЦНС	21
2.2.2. Роль ГАМК-ергической системы в процессе развития и при старении	29
2.3. ГАМК-ергические интернейроны головного мозга.....	36
2.3.1. Гипотезы происхождения.....	37
2.3.2. Миграция и дифференцировка предшественников ГАМК-ергических клеток.....	38
2.3.3. Разнообразие ГАМК-ергических нейронов головного мозга	39
2.4. Заключение	45
ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	47
3.1. Объекты исследования	47
3.2. Подготовка материала для исследования	47
3.3. Морфологическое исследование головного мозга.....	48
3.3.1. Гистологическое исследование.....	48
3.3.2. Иммуногистохимическое исследование	48
3.4. Фотографирование объектов при микроскопии в проходящем свете и флуоресцентной микроскопии	52
3.5. Морфометрический и статистический анализ.....	52
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	54
4.1. ГАМК-ергические структуры коры головного мозга крыс в процессе постнатального развития и при старении.....	54
4.1.1. Распределение GAD67 в коре головного мозга крыс в процессе постнатального развития и при старении.....	54
4.1.2. Распределение GAD65 в коре головного мозга крыс в процессе постнатального развития и при старении.....	62
4.1.3. Тирозингидроксилаза в коре головного мозга крыс в постнатальном онтогенезе и при старении	65

4.2. ГАМК-ергические структуры подкорковых областей конечного мозга крыс в процессе постнатального развития и при старении	70
4.2.1. Распределение GAD67 в подкорковых структурах в постнатальном онтогенезе и при старении	70
4.2.2. Распределение GAD65 в подкорковых структурах в процессе постнатального развития.....	78
4.3. Особенности становления нейрональной популяции субфорникального органа крыс	80
4.4. Организация ГАМК-ергических синаптических нервных окончаний	89
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	98
5.1. Развитие и старение ГАМК-ергической системы коры головного мозга.....	98
5.2. Особенности формирования и дезорганизации ГАМК-ергических структур стриопаллидарной системы.....	108
5.3. Становление нейрональной популяции субфорникального органа.....	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
ВЫВОДЫ.....	124
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	127
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	157

ГЛАВА 1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Декарбоксилаза глутаминовой кислоты (L-глутамат-1-карбоксилаза, GAD) – это фермент, который катализирует реакции декарбоксилирования L-глутамата с образованием γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), одного из главных тормозных медиаторов ЦНС. Синтез ГАМК происходит в тормозных нейронах, которые, соответственно, называют ГАМК-ергическими. Нейроны, экспрессирующие ГАМК, широко представлены во всей центральной нервной системе млекопитающих, причём в теленцефалических структурах, таких как кора головного мозга, наблюдается наибольшее количество этого нейромедиатора. Повсеместное распространение ГАМК и ГАМК-ергических нейронов в ЦНС свидетельствует об их высокой функциональной значимости. Будучи тормозным нейротрансмиттером, ГАМК играет важную роль в регуляции работы сложных нейронных сетей как коры больших полушарий, так и подкорковых структур головного мозга, участвуя в обработке сенсомоторной информации, процессах обучения, памяти, сна, локомоции и функций нейроэндокринной системы (Gerfen, Economo, Chandrashekar, 2018; Nambu, 2008).

Помимо межнейронных взаимодействий ГАМК и ГАМК-ергические нейроны участвуют в регуляции нейро-глиальных взаимоотношений, которые в значительной мере определяют нормальное функционирование всех структур мозга (Vélez-Fort, Audinat, Angulo, 2012), а также оказывают влияние на проницаемость капилляров головного мозга, путем ингибирования захвата веществ аблюминальной мембраной эндотелиоцитов (Kakee et al., 2001). Также установлено, что в ходе эмбрионального и раннего постнатального онтогенеза ГАМК исполняет функцию морфогена как на уровне эмбриона в целом, так и в развивающейся нервной системе (Kubota, 2014; Magueresse Le, Monyer, 2013). Различными электрофизиологическими методами и техниками иммуномаркирования доказано влияние ГАМК на миграцию и дифференцировку клеток коры головного мозга и стриатума, на рост аксонов, образование синапсов, а также клеточную пролиферацию и ангиогенез (Haydar et al., 2000; Li et al., 2018; Magueresse Le, Monyer, 2013).

Учитывая полифункциональность ГАМК, не удивительно, что любые отклонения от нормального функционирования ГАМК-ергических нейронов, изменения в процессах передачи сигнала, транспорта и метаболизма ГАМК (в частности, изменение распределения фермента синтеза) могут иметь отношение к патогенезу неврологических и психических расстройств человека, таких как эпилепсия, нарушения сна, наркотическая зависимость, алкоголизм,

неврологические заболевания, связанные с нарушением координации движений, такие как болезнь Хантингтона и болезнь Паркинсона, а также расстройства аутистического спектра, болезнь Альцгеймера, биполярное расстройство, шизофрения, депрессия и состояние тревожности (Зайцев и др., 2021; Prévot, Sibille, 2021). Распределение фермента, синтезирующего ГАМК, изменяется при черепно-мозговой травме и ишемическом повреждении головного мозга (Петрова и др., 2013; Kleppner, Tobin, 2002). Эти данные указывают на то, что определение состояния ГАМКергической системы при разных патологических состояниях может иметь значение для выяснения механизмов развития и способов предупреждения энцефалопатий.

Помимо изменений параметров ГАМК-ергической системы в условиях различных патологий мозга, в отдельных работах были отмечены и физиологические изменения ГАМК-ергических элементов в ЦНС с возрастом – как в постнатальном онтогенезе, так и при старении. Однако на эту тему имеются лишь отрывочная информация, которая была получена только в ранний постнатальный период или только в старости, к тому же, только в каком-то одном отделе ЦНС, но нет сравнительных работ, исследовавших ГАМК-ергическую систему сразу в раннем постнатальном периоде, половозрелом возрасте и в старости, причем одновременно в нескольких отделах мозга. Таким образом, неизвестно, какова сравнительная динамика изменений состояния ГАМК-ергических элементов в разных структурах мозга как в постнатальном онтогенезе, так и при старении.

Учитывая многообразие функций ГАМК-ергической системы головного мозга, а также высокую актуальность моделирования физиологических и патофизиологических процессов с участием ГАМК в ЦНС, необходимо иметь четкое представление об изменении распределения фермента, регулирующего ее синтез, на протяжении всего постнатального онтогенеза. Это возможно только при четком и достоверном выявлении ГАМК-продуцирующих нейронов, их проекций и синапсов. Для специфической визуализации медиаторных структур ЦНС не подходят традиционные нейрогистологические методы, такие как окраска по Нисслю или импрегнация серебром. В этом случае перспективными являются методы иммуногистохимии, которые могут использоваться не только в научных исследованиях, но и в патоморфологической диагностике.

Как известно, иммуногистохимическая визуализация медиаторных структур ЦНС в основном выполняется путем выявления самих нейромедиаторов, их везикулярных транспортеров и ферментов синтеза (Коржевский и др., 2014). Поскольку ГАМК-ергические

нейроны содержат фермент синтеза ГАМК – глутаматдекарбоксилазу, её иммуногистохимическое выявление является надежным методом визуализации и исследования ГАМК-ергической медиаторной системы. Важно отметить, что, в отличие от ряда других ферментов, распространение глутаматдекарбоксилазы в теле нейрона носит дискретный характер и приурочено к различным локусам (Pinal, Tobin, 1998). Кроме того, глутаматдекарбоксилаза в организме млекопитающих существует в виде двух изоформ (GAD65 и GAD67), которые кодируются двумя разными генами. Обе формы GAD присутствуют в ЦНС, причём, каждая способна синтезировать ГАМК. Эти две изоформы фермента существенно различаются по своей аминокислотной последовательности (у крысы идентичны только 65% полипептидной цепи двух изоформ), молекулярной массе – 65 кД (GAD65) и 67 кД (GAD67), характеру взаимодействия с кофактором пиридоксаль-5'-фосфатом и механизмам регуляции ферментативной активности (Esclapez et al., 1994). Кроме того, отмечено различие их внутриклеточной локализации: GAD67, как правило, обнаруживают в телах и отростках нейронов, а GAD65 в основном связана с синаптическими терминалями (Kaufman, Houser, Tobin, 1991; Pinal, Tobin, 1998). Имеются отдельные данные, что две изоформы GAD по-разному экспрессируются в мозге в пре- и постнатальном онтогенезе и выполняют различные функции (Stork et al., 2000), однако это единичные исследования, которые не дают целостной картины динамики изменений двух изоформ глутаматдекарбоксилазы. Имеющиеся данные дают основание предположить, что иммуногистохимическое исследование распределения двух изоформ глутаматдекарбоксилазы позволит выявить важные морфохимические особенности ГАМК-ергических нейронов и их синаптических терминалей.

Поэтому, важной и актуальной задачей клеточной биологии, нейроморфологии и нейронаук в целом является восполнение пробелов в наших знаниях о структурных и цитохимических характеристиках ГАМК-ергических нейронов и распределении изоформ глутаматдекарбоксилазы в головном мозге крысы с учетом широкого использования этого вида лабораторных животных для создания экспериментальных моделей патологии головного мозга человека.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время существует большое количество информации о распределении глутаматдекарбоксилазы в как во взрослом мозге, так и в раннем онтогенезе. Установлено существование двух изоформ глутаматдекарбоксилазы, однако отсутствуют достоверные данные об их субклеточной локализации в нейронах различных структур мозга. Экспрессия

мРНК ферментов синтеза ГАМК обнаруживается в различных анатомических структурах ЦНС, при этом распределение двух изоформ не всегда является сходным (Feldblum, Erlander, Tobin, 1993). Известно, что благодаря гидрофобному N-концу изоформа GAD65 способна заякориваться в мембранах секреторных везикул и концентрироваться в нервных окончаниях, а гидрофильный белок GAD67 свободно распределен в цитоплазме. Считается, что ГАМК, синтезируемая GAD67, не участвует в передаче синаптического сигнала, а функционирует в качестве трофического фактора или защитной молекулы при повреждении нейронов и регулятора редокс-потенциала при окислительном стрессе (Pinal, Tobin, 1998). GAD65, напротив, начинает синтезироваться на более поздних этапах развития и в ответ на поступающий сигнал осуществляет быстрое пополнение запаса медиатора в синаптических терминалях (Martin, Rinvall, 1993). Таким образом, хотя и GAD67, и GAD65 опосредуют синтез ГАМК, их внутриклеточная локализация и паттерны распределения в тканях предполагают различные функциональные роли.

К настоящему времени накоплен большой массив данных о том, что ГАМК и ГАМК-ергические нейроны широко распространены в ЦНС млекопитающих, причем, если в дефинитивном мозге ГАМК – это тормозный нейромедиатор (Kleppner, Tobin, 2002), то в пренатальном и раннем постнатальном периоде ГАМК выполняет функцию морфогена, воздействуя на миграцию и дифференцировку клеток коры головного мозга и стриатума, образование синапсов, клеточную пролиферацию и ангиогенез (Li et al., 2018; Magueresse Le, Monyer, 2013). Доказано участие ГАМК и ГАМК-ергических нейронов в разнообразных физиологических функциях мозга, таких как память, обучение, сон, локомоция, регуляция активности нейроэндокринной системы и т.д. Имеются основания предполагать участие ГАМК-ергических нейронов в патогенезе различных нервных и психических заболеваний (Зайцев и др., 2021; Prévot, Sibille, 2021). Кроме того, показано участие ГАМК-ергических нейронов в регуляции нейрон-глиальных взаимодействий и проницаемости гематоэнцефалического барьера (Vélez-Fort, Audinat, Angulo, 2012). Однако, данные о развитии ГАМК-ергической системы и ее структурных элементов в барьерных структурах головного мозга остаются фрагментарными. Ограниченное количество данных свидетельствует об изменении состояния элементов ГАМК-ергической системы с возрастом – в начальный и конечный период жизни, однако они касаются некоторых отдельных структур мозга и не дают сравнительной картины возрастного изменения ГАМК-ергической системы в разных областях головного мозга. Особую важность имеет изучение влияния ГАМК на процессы образования синаптических связей и формирования citoархитектоники коры большого мозга, устанавливающихся в первый месяц

постнатального развития (Warm, Schroer, Sinning, 2022; Zilberter, 2016). Неизвестно, способны ли стволовые клетки нейрогенных зон взрослого мозга дифференцироваться в функциональные ГАМК-ергические нейроны, что важно для пополнения популяции ГАМК-ергических клеток (Lim et al., 2018; Shmakova et al., 2021). В связи с развитием транскриптомных технологий и модификаций уже существующих методических подходов анализа нервной ткани, большое значение приобретает классификация ГАМК-ергических клеток коры и подкорковых структур (Kessaris, Denaha, 2023; Sreenivasan et al., 2022), что ставит задачу исследовать как становление структурных и цитохимических особенностей ГАМК-ергических нейронов в ходе развития, так и их изменения в ходе старения. Исследование морфометрических особенностей тормозных синаптических терминалей требует методического подхода, использующего современные высокочувствительные методы конфокальной лазерной микроскопии (Hughes, Todd, 2022).

В соответствии с этим, необходимым в настоящее время представляется углубление имеющихся фундаментальных знаний об особенностях организации элементов основной тормозной системы ЦНС в ходе проведения комплексного сравнительно-морфологического исследования в различных зонах коры и в подкорковых областях.

Цель настоящего исследования состояла в изучении распределения фермента глутаматдекарбоксилазы в различных областях конечного мозга крыс. Были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Описать изменение распределения изоформ фермента в коре и стриатуме крыс на разных стадиях постнатального развития;
- 2) Провести морфометрический анализ ГАМК-ергических аксосоматических синаптических терминалей на пирамидных клетках коры на разных стадиях онтогенеза;
- 3) Проверить гипотезу о присутствии в субвентрикулярной пролиферативной зоне ГАМК-продуцирующих клеток;
- 4) Выполнить анализ распределения глутаматдекарбоксилазы в барьерных структурах головного мозга: сосудистом сплетении и субфорникальном органе.

Научная новизна

Данная работа представляет собой первое комплексное сравнительно-морфологическое исследование элементов нервной ткани, содержащих различные изоформы глутаматдекарбоксилазы, а также анализ изменений ГАМК-синтезирующих элементов в

процессе постнатального онтогенеза и при старении, выполненное с применением современных иммуногистохимических методов, конфокальной лазерной микроскопии и метода трехмерных реконструкций.

В диссертации дана подробная характеристика распределения декарбоксилаз глутаминовой кислоты в различных областях конечного мозга, благодаря чему получены новые данные, касающиеся цитоплазматической локализации фермента. Показана возрастная динамика ГАМК-ергических клеток и дана подробная морфологическая характеристика их синаптических терминалей. Была проанализирована онтогенетическая динамика синтеза ГАМК клетками эпителия, покрывающего ворсинки сосудистого сплетения. Установлена связь ранних горизонтальных нейронов коры головного мозга крысы, влияющих на миграцию клеток в процессе кортикогенеза, с ГАМК-ергическими клетками неокортекса. Установлено, что на протяжении постнатального онтогенеза, в субвентрикулярной пролиферативной зоне располагаются ГАМК-синтезирующие клетки. Описаны разные типы клеток субфорникального органа и их структурные особенности, характерные для каждого из изученных сроков постнатального онтогенеза. Впервые продемонстрировано, что в субфорникальном органе крысы, наряду с ГАМК-ергическими, присутствуют и собственные катехоламинергические нейроны.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в получении принципиально новых данных об особенностях распределения глутаматдекарбоксилаз конечного мозга крысы на различных сроках постнатального онтогенеза и при старении. Полученные данные значительно расширяют представление о структурной организации ГАМК-ергической системы и позволяют сформулировать ряд гипотез, касающихся классификации ГАМК-синтезирующих клеток мозга крыс, их физиологических особенностей, а также нейросекреторной функции структур головного мозга. Анализ морфологических и морфометрических характеристик ГАМК-ергических терминалей, таких как их размер, плотность и характер распределения, может предоставить ценную информацию о функционировании коры головного мозга. Накопление и систематизация знаний о субфорникальном органе, развитии и взаимодействии его клеточных популяций, будут способствовать лучшему пониманию организации барьерных структур головного мозга.

При проведении данного исследования были разработаны высокочувствительные методы, основанные на иммуногистохимическом выявлении глутаматдекарбоксилазы, которые

могут быть применены как в научных, так и в клинических и диагностических исследованиях. Использованный метод позволяет выявлять клетки, синтезирующие ГАМК, их проекции и синапсы при отсутствии или минимальном фоновом окрашивании. Использование разработанных протоколов иммуногистохимического окрашивания для конфокальной лазерной микроскопии позволяет не только получить представление о локализации и морфологических характеристиках синаптических терминалей, но и дает возможность проводить количественный анализ. На основании полученных результатов была зарегистрирована база данных конфокальных изображений.

Методология и методы исследования

При проведении научно-исследовательской работы в рамках представленной диссертации были применены различные методические подходы. С целью изучения ГАМК-ергических структур на разных стадиях постнатального онтогенеза исследовали срезы головного мозга крыс линии Wistar различных возрастных групп. Для этого в настоящем исследовании была принята существующая классификация (Sengupta, 2013), в соответствии с которой выделили следующие возрастные группы: I – 7 сутки постнатального развития – неонатальный период; II – 14 сутки постнатального развития – неполовозрелый (инфантильный) период; III – 30 сутки постнатального развития – ювенильный период; IV – половозрелые животные (4-6 месяцев); V – старые животные (20-24 месяца) (n = 60). Для проведения морфологического исследования использовали метод иммуногистохимии (ИГХ) с визуализацией методами световой, флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. Выбор метода обусловлен тем, что иммуногистохимия с использованием специфичных антител к маркерным белкам позволяет выявлять как тела, так и отростки нервных клеток, что невозможно при использовании стандартных гистологических окрасок, а построение трехмерных реконструкций дает возможность анализировать объекты сложной формы. Кроме того, применение конфокальной микроскопии позволяет изучать объекты небольшого размера, такие как синаптические терминалы нейронов, а также анализировать пространственное распределение одновременно двух и более маркеров.

Построение трехмерных реконструкций и их проекции на плоскость проводили в программе Zen 3 (Zeiss, Германия). Морфометрический анализ был проведен с применением общедоступной программы цифровой обработки изображений Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/>). Статистический анализ проводили в программе Graph Pad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США). Иллюстрации компоновали с использованием программ

Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Inc., США) и BioRender (<https://www.biorender.com/>).

Работа рассмотрена и одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (заключение №1/20 от 27.02.2020).

Положения, выносимые на защиту:

1) Паттерн распределения декарбоксилаз глутаминовой кислоты в коре и подкорковых структурах головного мозга крысы изменяется в ходе постнатального онтогенеза. На ранних этапах онтогенеза преобладающими областями локализации фермента являются бледный шар и первый слой коры, а также отмечается синтез глутаматдекарбоксилазы нейронами, структурно и топографически соответствующими клеткам Кахаля-Ретциуса. Увеличение доли ГАМК-синтезирующих клеток в конце первого месяца может указывать на наличие периода повышенной активности ГАМК-ергической системы. При старении интенсивность иммуногистохимической реакции на глутаматдекарбоксилазу в нейропиле и перикарионах снижается.

2) ГАМК-ергические аксосоматические терминалы на пирамидных клетках разных отделов коры обладают характерными региональными особенностями, что свидетельствует о различии их функционального статуса. Наибольшим разнообразием показателей размеров на большинстве изученных сроков отличаются ГАМК-ергические терминалы на пирамидных клетках цингулярной области коры. С возрастом происходит увеличение количества ГАМК-ергических синаптических окончаний одновременно с уменьшением их размера.

3) Субвентрикулярная пролиферативная зона содержит глутаматдекарбоксилаза-иммунопозитивные клетки, что свидетельствует о наличии дополнительного источника предшественников ГАМК-продуцирующих клеток.

4) Эпителиоциты сосудистого сплетения головного мозга (сосудистые эпителиоциты) демонстрируют способность к синтезу белка GAD67, вследствие чего, могут служить источником внесинаптической ГАМК, поступающей в цереброспинальную жидкость.

5) ГАМК-ергическая иннервация субфорникального органа формируется в течение первого месяца постнатального онтогенеза и, вероятно, связана с его функциональной ролью хемосенсора ЦНС.

Степень достоверности и апробации результатов исследования

Степень достоверности полученных в работе данных определяется достаточным и

репрезентативным количеством экспериментального материала ($n = 60$), применением адекватных методов исследования, среди которых иммуногистохимия и конфокальная лазерная микроскопия, выполненные с использованием высокоточных лабораторных приборов, таких как световой микроскоп Leica DM750 (Германия), оснащенном фотокамерой ICC50 (Leica, Германия), и конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM800 (Zeiss, Германия), оснащенного системой Airyscan, а также применением методов морфометрического и статистического анализа, выполненных в сертифицированных компьютерных программах LAS EZ (Leica, Германия), Zen 3 (Zeiss, Германия), Fiji/ImageJ (Wayne Rasband (НИН), США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США).

Результаты работы были представлены в качестве устных и стендовых докладов на VII молодежной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2020), XXXIII зимней международной молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2021), 25-ой Всероссийской научной конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей» (Санкт-Петербург, 2021), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 60-летию НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына (Москва, 2021), FENS Forum of Neuroscience (Paris, France, 2022), 46th FEBS Congress (Lisbon, Portugal, 2022), Юбилейной научной конференции «Николай Константинович Кольцов и биология XXI века» (Москва, 2022).

Публикации по теме работы

По теме диссертации опубликовано 16 научных трудов. Из них 8 работ удовлетворяют требованиям ВАК, предъявляемым к публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 7 работ опубликовано в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных Scopus/Web of Science Core Collection. Зарегистрирована 1 база данных, и опубликованы 8 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации

Диссертация написана в соответствии с ГОСТом Р 7.0.11-2011 и состоит из глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений, список литературы. Работа изложена на 159 страницах, содержит 2 таблицы и 47 иллюстраций, в том числе 9 рисунков, 4 графика, 34 микрофотографии. Библиографический указатель содержит 377 источников, в том числе 16 на русском языке и 361 на иностранных языках.

Личное участие автора

Планирование, подготовка и проведение экспериментов, получение материала для гистологического исследования, отработка реакций, анализ полученных препаратов и постановка иммуногистохимических реакций с применением методов световой, флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии, получение микрофотографий препаратов, проведение морфометрического анализа и статистической обработки полученных данных, их обработка и анализ, интерпретация результатов и их обобщение, подготовка текста диссертации и автореферата выполнены автором лично. Автор принимала непосредственное участие в подготовке рукописей статей и материалов научных докладов.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.22 – Клеточная биология, пунктам 1, 2 и 10.

Финансовая поддержка работы

Проведенное исследование входит в научные планы ФГБНУ «ИЭМ». Часть исследований выполнена при поддержке РФФИ (проект № 22-25-00105, руководитель – Коржевский Д.Э., исполнители – Гусельникова В.В., Суфиева Д.А., Разенкова В.А.).

ГЛАВА 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Общая характеристика глутаматдекарбоксилаз и ГАМК-ергической системы головного мозга

2.1.1. Открытие ГАМК. История изучения глутаматдекарбоксилазы

ГАМК (γ -аминомасляная кислота, 4-аминобутановая кислота) представляет собой один из главных тормозных медиаторов центральной нервной системы (ЦНС). Первые упоминания о выделении этого соединения из мозга млекопитающих были опубликованы тремя независимыми группами исследователей в 1950 году (Awapara et al., 1950; Roberts, Frankel, 1950; Udenfriend, 1950), среди которых традиционно выделяют группу Юджина Робертса и Сэма Франкеля (Spiering, 2018). Несмотря на этот факт, определение функции ГАМК датируется лишь 1957 годом, в результате экстракции и дальнейшей идентификации фактора I из ЦНС позвоночных, который, как сообщалось, оказывал ингибирующий эффект на рецепторы растяжения у речного рака (Bazemore, Elliott, Florey, 1957; Kleppner, Tobin, 2002). Инфракрасная спектроскопия этого вещества показала, что фактор I представляет собой гамма-аминомасляную кислоту. Это открытие и закрепило за ГАМК роль основного тормозного нейромедиатора позвоночных.

Еще одним шагом вперед стало определение предшественников биосинтеза ГАМК. С применением радиоактивных изотопов углерода было продемонстрировано, что нервная ткань, в основном, образует ГАМК из другого важного физиологически активного соединения – L-глутаминовой кислоты (глутамата) (Roberts, Frankel, 1950). Это преобразование осуществляется путем реакции декарбоксилирования, при которой разрывается связь между C_{α} -атомом углерода и карбоксильной группой (Iding et al., 1998; Schales, 1951), а непосредственно декарбоксилирование глутамата (**рис. 1**) катализируется ферментом глутаматдекарбоксилазой (КФ. 4.1.1.15, L-глутамат-1-карбоксилиаза, GAD), одним из важнейших ферментов класса декарбоксилаз (КФ 4.1.1) (Сухарева, Дарий, Христофоров, 2001; Yogeswara, Maneerat, Haltrich, 2020).

Однако исследование структуры и биохимических свойств глутаматдекарбоксилазы оказалось лимитировано низким количеством белка (порядка нескольких микрограмм), выделяемого из мозга животных. Несмотря на это, были выделены и проанализированы образцы фермента из нервной ткани крысы (Denner, Wu, 1985), мышцы (Wu, Matsuda, Roberts, 1973), свиньи (Spink et al., 1985), быка (Heinämäki et al., 1983) и человека (Blindermann et al.,

1978). Были изучены кинетические свойства фермента, его предполагаемый молекулярный вес, высказаны первые предположения об аминокислотном составе.

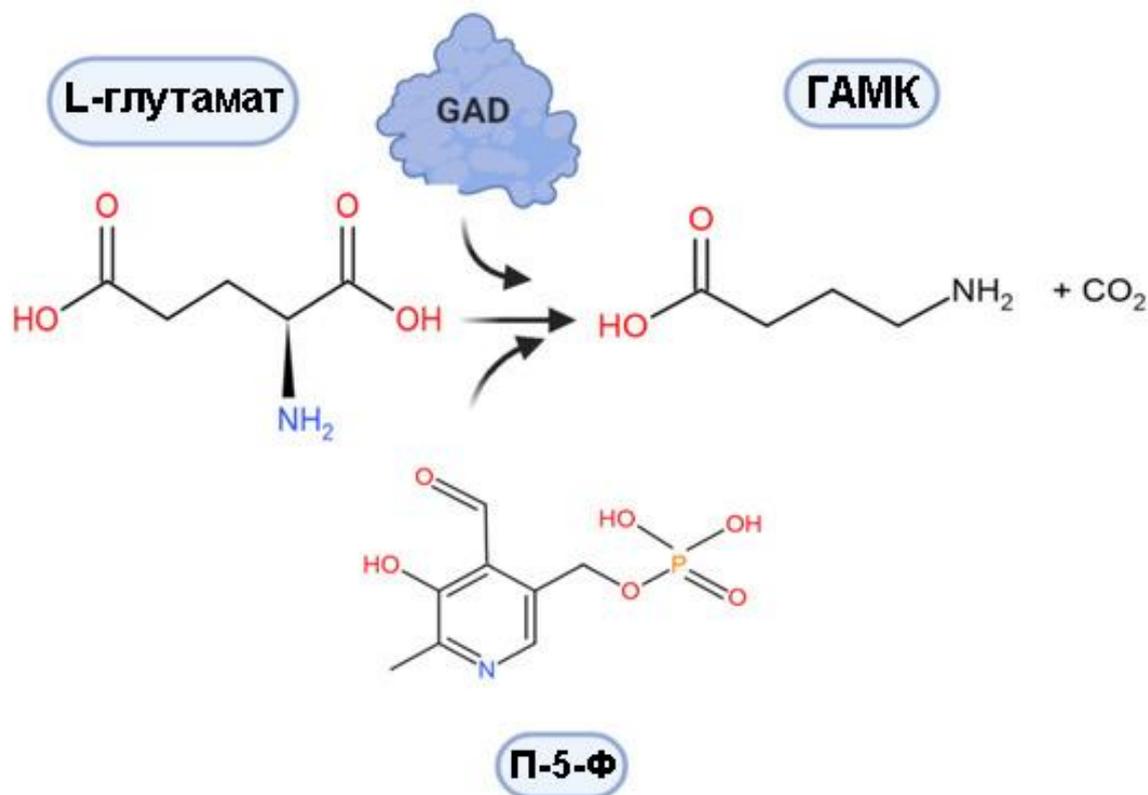


Рисунок 1 – Декарбоксилирование L-глутамата до ГАМК катализируется глутаматдекарбоксилазой (источник исходного изображения: Yogeswara, Maneerat, Haltrich, 2020). П-5-Ф: пиридоксаль-5'-фосфат.

Развитие генной инженерии позволило в несколько раз увеличить выход фермента за счет синтеза белка, транслируемого с рекомбинантной ДНК *E. coli* (Chu, Metzler, 1994). Это позволило оценить спектроскопические характеристики каталитически активной (в том числе при взаимодействии с субстратом) и инертной форм фермента. С дальнейшим методологическим развитием связано выявление разных изоформ фермента, получение их аминокислотной последовательности и трехмерной структуры, визуализация активных центров и сайтов связывания с коферментом (Fenalti et al., 2007; Malashkevich et al., 1998; Soghomonian, Martin, 1998).

К настоящему времени присутствие глутаматдекарбоксилаз подтверждено в тканях как позвоночных (Wu et al., 1985) так и беспозвоночных (Ilg et al., 2013) животных, высших растений (Astegno, Capitani, Dominici, 2015), дрожжей (Coleman et al., 2001) и бактерий (Boura, Brenson, Karatzas, 2020; Sun et al., 2021).

2.1.2. Биохимические и структурные особенности глутаматдекарбоксилазы

В нервной системе млекопитающих глутаматдекарбоксилаза существует в виде двух изоформ (**рис. 2**), имеющих молекулярную массу 65 кД (GAD65) и 67 кД (GAD67) (Petroff, 2002). Обе изоформы фермента кодируются двумя разными независимо регулируемые генами (Vu et al., 1992) и существуют в виде димеров. Каждый мономер состоит из трех доменов: переменного N-концевого и двух консервативных доменов, пиридоксаль-5'-фосфат-связывающего (содержащего каталитический центр) и С-концевого домена (Fenalti et al., 2007). Благодаря вариативности N-концевого домена GAD65 и GAD67 не являются высокоомологичными, и сходство между аминокислотными последовательностями изоформ составляет 64%. N-концевой домен, по-видимому, обуславливает позиционирование изоформ в клетке. Так, пальмитирование цистеинов 30 и 45 обеспечивает сортировку GAD65 к аксональным эндосомам и последующую концентрацию в нервных окончаниях (Kanaani et al., 2004), а фосфорилирование четырех серинов (3, 6, 10 и 13) вблизи гидрофобного N-конца позволяет белку непосредственно закориваться в мембранах секреторных везикул (Namchuk et al., 1997). Гидрофильный N-концевой домен GAD67, в свою очередь, позволяет этой изоформе быть свободно распределенной в цитоплазме клетки (Solimena et al., 1993).

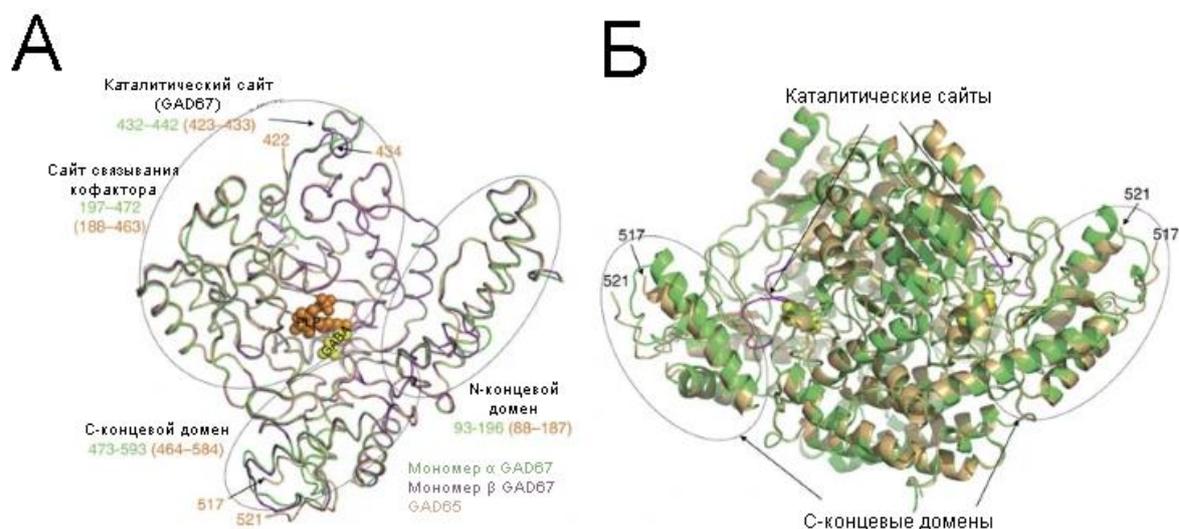


Рисунок 2 – Структура ферментов GAD67 и GAD65. а – наложение α (зеленый цвет), β (фиолетовый цвет) мономеров GAD67 и GAD65 (коричневый цвет); б – структурное наложение димеров GAD67 (зеленый цвет) и GAD65 (светло-коричневый цвет). Пиридоксаль-5'-фосфат и ГАМК в активном центре фермента показаны в виде оранжевых и желтых сфер соответственно (источник исходного изображения: Fenalti et al., 2007).

Интересно, что в дополнение к основной реакции декарбоксилирования L-глутамата с образованием ГАМК, глутаматдекарбоксилаза может катализировать случайную побочную реакцию трансаминирования. Продуктом такой реакции является сукциниловый (янтарный) полуальдегид, а глутаматдекарбоксилаза в этом случае теряет связь со своим кофактором – пиридоксаль-5'-фосфатом, и утрачивает ферментативную активность (Porter et al., 1985). Исследования активности рекомбинантной глутаматдекарбоксилазы показали, что переход из каталитически активной в инертную форму в результате побочной реакции изоформы GAD65 происходит в 15 раз быстрее, чем у изоформы GAD67. И наоборот: скорость образования активной формы GAD65 путем повторного связывания с пиридоксаль-5'-фосфатом в 10 раз превышает скорость образования холофермента GAD67 (Battaglioli, Liu, Martin, 2003). Эти данные позволили предположить, что аутоактивация GAD65 представляет собой ключевой механизм контроля синтеза ГАМК. Сравнение аминокислотных последовательностей и расшифровка кристаллической структуры изоформ 65 и 67, проведенные Fenalti et al. (2007), показали, что сдвиг в сторону реакции трансаминирования может быть связан с различием аминокислотного окружения в каталитическом центре. Так, было установлено, что в активном центре GAD65 вместо тирозина 434 присутствует фенилаланин 283. Это способствует накоплению значительного отрицательного заряда на атоме C-4' (а не C_α, как при декарбоксилировании) глутамата, что приводит к его протонированию с образованием янтарного полуальдегида, высвобождению пиридоксаль-5'-фосфата и инактивации фермента. Таким образом, по мнению авторов, этот механизм позволяет в короткие сроки обеспечить ЦНС дополнительным ГАМК, а также предоставляет убедительное объяснение наличия двух изоформ GAD у позвоночных животных.

Другие изоформы фермента молекулярной массой 25 и 44 кД (GAD25 и GAD44, соответственно) выделены из эмбрионального мозга. Предполагается, что эти формы образуются в результате альтернативного сплайсинга РНК изоформы 67 (Szabo, Katarova, Greenspan, 1994). Укороченная изоформа GAD25 не содержит пиридоксаль-5'-фосфат-связывающего домена, и, следовательно, не отвечает за синтез ГАМК. Помимо ЦНС она обнаружена в инсулоцитах островков Лангерганса, семенниках и коре надпочечников (Chessler, Lernmark, 2000; Korpershoek et al., 2007). GAD44, напротив, каталитически активна и выявляется в головном мозге на поздних стадиях эмбриогенеза, в период дифференцировки предшественников ГАМК-ергических клеток (Szabo, Katarova, Greenspan, 1994). В головном мозге половозрелых животных ни GAD25, ни GAD44 практически не обнаруживаются. Исключение составляют традиционно ассоциируемые с нейрогенезом области:

субвентрикулярная зона (СВЗ), обонятельные луковицы и связывающий их ростральный миграционный путь содержат GAD25 (Popp et al., 2009), – в связи с чем предполагаемая функциональная роль этой изоформы состоит в поддержании процессов клеточной пролиферации и миграции, а также синаптогенеза.

Кроме того предполагается, что существует еще одна изоформа GAD, кодируемая третьим гомологичным геном (Bosma et al., 1999), однако продукт этого гена до сих пор не был выделен. Крупное биоинформатическое исследование Grone и Maruska (Grone, Maruska, 2016) позволило продемонстрировать, что ген *gad3*, кодирующий третью изоформу, сохраняется у разных групп позвоночных животных и выпадает лишь у представителей трибы гоминины (к которой относятся шимпанзе и человек).

Таким образом, на сегодняшний день установлено, что изоформы глутаматдекарбоксилазы 65 и 67 отвечают за синтез практически всей присутствующей в нервной системе ГАМК.

2.1.3. Синтез и катаболизм ГАМК

ГАМК – небелковая аминокислота, обнаруженная практически во всех прокариотических и эукариотических организмах (включая растения). Метаболический путь синтеза ГАМК из глутамата и ее катаболизма до сукцината напрямую связан с циклом трикарбоновых кислот и получил название «ГАМК-шунт» (Schousboe, Waagepetersen, 2017; Waagepetersen, Sonnewald, Schousboe, 1999) (**рис. 3**).

Синтез аминокислоты из L-глутамата происходит в нейроне в аксоплазме синаптического окончания и в перикарионе нейрона. Такая компартментализация обусловлена распределением изоформ глутаматдекарбоксилазы в цитоплазме нейрона (Best, Stagg, Dennis, 2014). Считается, что ГАМК, синтезируемая GAD67 в перикарионе, не участвует в передаче сигнала, а функционирует в качестве трофического фактора (как на ранних этапах развития, так и в зрелых клетках) или защитной молекулы при повреждении нейронов и регулятора редокс-потенциала при окислительном стрессе (Pinal, Tobin, 1998). GAD65, напротив, в основном тесно связана с мембранами синаптических везикул и в ответ на поступающий сигнал осуществляет быстрое пополнение запаса медиатора в синаптических терминалях (Martin, Rimvall, 1993). При этом синтез большей части ГАМК в головном мозге осуществляется посредством работы GAD67 (Best, Stagg, Dennis, 2014). Таким образом, хотя и GAD67, и GAD65 опосредуют синтез ГАМК, их внутриклеточная локализация и паттерны экспрессии в тканях предполагают различные функциональные роли.

В пресинаптических терминалях ГАМК-ергических нейронов ГАМК поступает в везикулы с помощью везикулярного переносчика (vesicular GABA transporter, vGAT), осуществляющего котранспорт ГАМК и ионов хлора за счет электрохимического градиента между цитоплазмой и просветом синаптического пузырька (McIntire et al., 1997). Результатом высвобождения нейромедиатора в синаптическую щель становится его связывание с двумя различными типами рецепторов: ионотропными ГАМК_A и метаботропными ГАМК_B (Ngo, Vo, 2019).

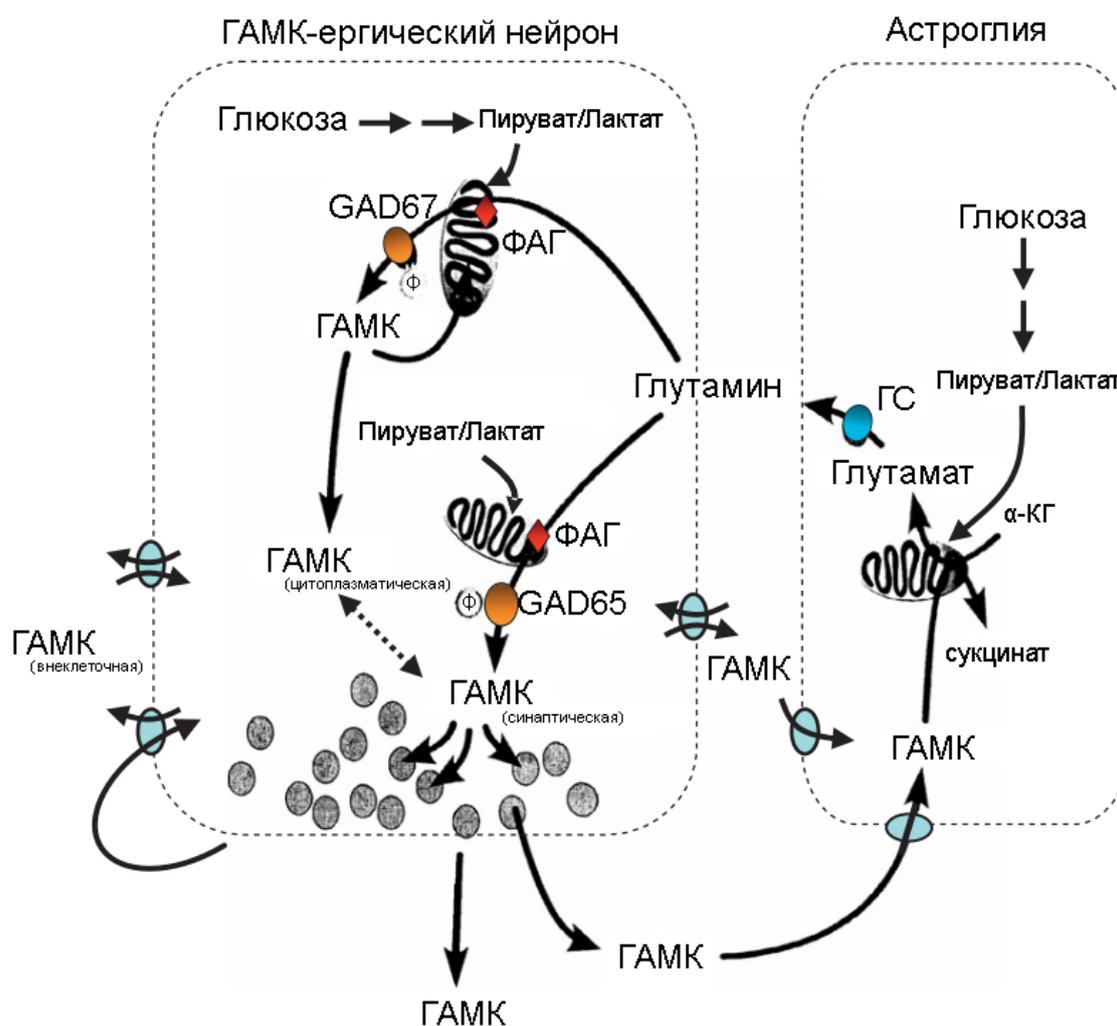


Рисунок 3 – Схематичное изображение метаболизма ГАМК. Цитоплазматический синтез ГАМК обеспечивается в основном GAD67 через ГАМК-шунт. Синтез везикулярной ГАМК катализируется GAD65, а обратный захват ГАМК из синаптической щели астроглией приводит к трансминированию нейромедиатора с помощью ГАМК-Т и образованию глутамата из α-кетоглутарата (α-КГ). В дальнейшем глутамат трансформируется в глутамин ферментом глутаминсинтетазой (ГС). Новый цикл синтеза ГАМК обеспечивается фосфатактивируемой

глутаминазой (ФАГ), катализирующей расщепление глутамина до глутамата (источник исходного изображения: Walls, 2017).

Утилизация избытка ГАМК обеспечивается обратным захватом нейротрансмиттера из синаптической щели астроцитами и пресинаптическими окончаниями. В ходе реакции трансминирования при участии ГАМК-трансаминазы (К.Ф. 2.6.1.19, ГАМК-Т) в матриксе митохондрий происходит образование янтарного полуальдегида. Одновременно ГАМК-Т катализирует трансминирование альфа-кетоглутарата с образованием глутамата. Дальнейшее окисление янтарного полуальдегида сукцинат-полуальдегид-дегидрогеназой (К.Ф. 1.2.1.79, сукцинат-полуальдегид:НАДФ⁺ оксидоредуктаза) до сукцината связывает ГАМК-шунт с циклом трикарбоновых кислот (Schousboe, Waagepetersen, 2017; Walls, 2017).

Помимо глутамина и глутамата, альтернативным источником синтеза ГАМК как в ЦНС, так и за ее пределами могут выступать полиамины. Без участия GAD происходит синтез ГАМК из путресцина, спермина и спермидина (Wong, 2022). Предполагается, что этот путь, основным ферментом которого является моноаминоксидаза В, характерен для раннего постнатального развития организма (Schousboe, Waagepetersen, 2017). Однако основным ферментом синтеза ГАМК остается глутаматдекарбоксилаза, и она же считается традиционным маркером ГАМК-ергических нейронов ЦНС.

Помимо нервной системы ГАМК присутствует и в других органах и тканях. Ее синтезируют бета-клетки островков Лангерганса, а метаболические ферменты, рецепторы и транспортеры ГАМК содержатся в репродуктивных органах (семенниках и яичниках), надпочечниках и желудочно-кишечном тракте (Schousboe, Waagepetersen, 2017).

Ферменты синтеза и деградации, транспортные белки и рецепторы ГАМК в ЦНС представлены в таблице (табл. 1).

Таблица 1 – Белки ЦНС, связанные с ГАМК (по Kleppner, Tobin, 2002 и Walls, 2017).

Белок	Локализация	Предполагаемая функция
Глутаматдекарбоксилаза 65 (GAD65)	Терминали аксонов	Синтез ГАМК
Глутаматдекарбоксилаза 67 (GAD67)	Цитоплазма	
ГАМК-трансаминаза	Митохондрии нейронов,	Ферментативное

(ГАМК-Т)		астроглии	расщепление ГАМК
ГАМК-транспортер тип 1 (GAT1)		Нейроны и астроглия головного мозга	Транспорт ГАМК через плазматическую мембрану
ГАМК-транспортер тип 2 (GAT2)		Астроглия, клетки эпендимы	
ГАМК-транспортер тип 3 (GAT3)		Астроглия	
Транспортер бетаина (BGT-1)		Мягкая и паутинная оболочки мозга, астроглия	
Везикулярный транспортер ГАМК (vGAT)		Мембрана синаптических пузырьков	Упаковка ГАМК в синаптические везикулы
ГАМК _A -рецептор		Постсинаптическая мембрана	Ионотропный рецептор ГАМК, связанный с хлоридным каналом
ГАМК _B -рецептор		Пре- и постсинаптическая мембрана	Метаботропный рецептор ГАМК, сопряженный с G-белком

2.2. Функциональное значение ГАМК-ергической системы головного мозга

2.2.1. Активность ГАМК-ергической системы при нормальном функционировании ЦНС

Функция ГАМК в качестве тормозного нейромедиатора ЦНС в настоящее время не вызывает сомнений. ГАМК играет важную роль в регуляции работы сложных нейронных сетей как коры больших полушарий, так и подкорковых структур головного мозга.

Несмотря на то, что лишь около 20% нейронов коры больших полушарий используют ГАМК в качестве медиатора, сложное соотношение возбуждающих и тормозных сигналов в коре достигается за счет регуляции ГАМК-ергическими интернейронами активности основных эфферентов коры – пирамидных глутаматергических нейронов, и других клеток (Gerfen, Economo, Chandrashekar, 2018; Kubota, 2014; Xu et al., 2004). ГАМК-ергические интернейроны контролируют спайковую активность глутаматергических нейронов (Pouille, Scanziani, 2001), ограничивая течение возбуждающих ионных токов по цепи прямой связи (Ferguson, Gao, 2018). Такая тонкая координация обеспечивается четким разделением локализации ГАМК-ергических

синаптических терминалей на телах и отростках клеток-мишеней и необходима для нормального функционирования ЦНС.

В отличие от нервных клеток коры головного мозга, большинство стриатных нейронов в качестве нейромедиатора используют ГАМК (Nambu, 2008). Иннервация ГАМК-ергических проекционных нейронов стриатума – средних шипиковых нейронов (*medium spiny neurons*, MSN), нейронами разнообразных нервных центров обеспечивает переключение и обработку всей поступающей в неостриатум информации. Эфферентные волокна MSN, в свою очередь, идут к латеральному и медиальному бледному шару (GP) и к *pars reticulata* черной субстанции (Tepper, Lee, 2007; Wilson, 2004; Yager et al., 2015). Эти двунаправленные связи известны как прямой и косвенный (непрямой) пути стриатума (рис. 4).

Прямой путь начинается от глутаматергических нейронов коры или дофаминергических нейронов черной субстанции, которые формируют синаптические терминали на MSN. После переключения в MSN волокна идут к телам и дендритам ГАМК-ергических нейронов медиального бледного шара, аксоны которых направляются к таламусу (Galvan et al., 2005). Активация прямого пути, таким образом, приводит к растормаживанию таламических нейронов путем подавления активности их афферентов – тормозных нейронов медиального бледного шара.

Функция непрямого пути, напротив, заключается в подавлении глутаматергических клеток таламуса (Nambu, 2004). Первые звенья этого пути соответствуют прямому. Переключение сигнала в MSN приводит к торможению ГАМК-ергических клеток латерального GP, которые связаны с нейронами субталамического ядра. Глутаматергические эфференты субталамического ядра проецируют в медиальный бледный шар и *pars reticulata* черной субстанции (Nauta, Cole, 1978). Активированные вследствие этого нейроны медиального бледного шара посылают тормозный сигнал в таламус.

Общепринятым среди исследователей является факт, что каждый из путей стриатума контролируется отдельной популяцией MSN, различающихся по типу представленного на мембране нейронов рецептора дофамина. К первой популяции относятся MSN прямого пути, на плазматической мембране которых преимущественно расположены рецепторы дофамина D1, для второй популяции – MSN непрямого пути – характерно присутствие рецептора дофамина D2 (Calabresi et al., 2014; Gerfen, Surmeier, 2011).

Благодаря описанным нервным путям стриатума обеспечивается централизованная регуляция двигательной активности (Kravitz, Kreitzer, 2012).

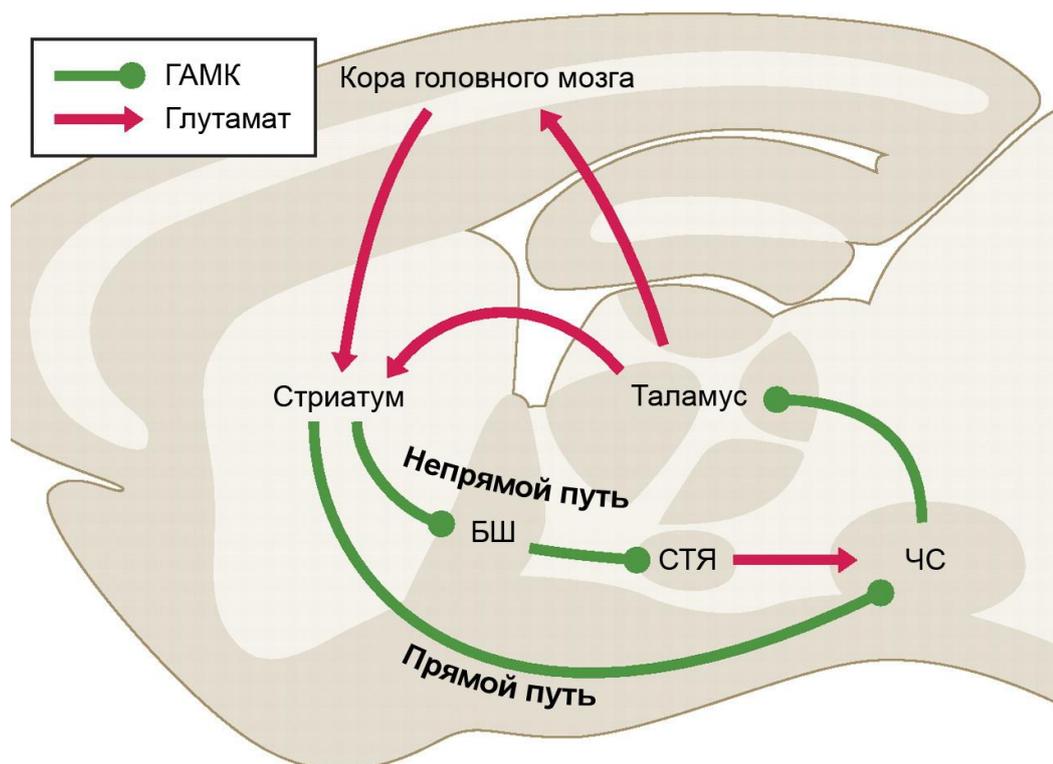


Рисунок 4 – Прямой и непрямого пути стриатума. БШ – бледный шар, СТЯ – субталамическое ядро, ЧС – черная субстанция (источник исходного изображения: Kravitz, Kreitzer, 2012).

Присутствие транспортеров ГАМК на люминальной и аблюминальной мембранах эндотелиоцитов капилляров головного мозга (Kakee et al., 2001) ставит вопрос как о проницаемости барьера для ГАМК, так и о возможном ГАМК-ергическом контроле барьерных структур мозга. В связи с этим, особое внимание в вопросах активности ГАМК-ергической системы могут привлекать к себе области мозга, обеспечивающие поддержание гематоэнцефалического (ГЭБ) и гематоликворного (ГЛБ) барьеров, такие как выстилки желудочков, сосудистое сплетение и субфорникальный орган (СФО) (Hicks et al., 2021; Nelles, Nazrati, 2022).

Сосудистое сплетение головного мозга является одним из ключевых узлов транспорта биологически активных веществ из крови в спинномозговую жидкость (СМЖ), откуда они могут поступать в паренхиму головного и спинного мозга. Исследования транспорта ГАМК через покровные клетки сосудистого сплетения головного мозга (по Terminologia Histologica (Банин, 2009) – сосудистые эпителиоциты), кошки и кролика позволили продемонстрировать, что эпителиоциты сосудистого сплетения способны захватывать аминокислоту путем Na-зависимого котранспорта (Lorenzo, Cutler, 1969; Ramanathan, Brett, Giacomini, 1997). В

дальнейших работах с использованием двусторонней перфузии головного мозга было изучено поступление меченой радиоуглеродом ГАМК в сосудистое сплетение, СМЖ и головной мозг крыс (Al-Sarraf, 2002), что указало на возможность транспорта аминокислоты через барьеры в низких концентрациях. В пользу этого факта могут также говорить смежные исследования, посвященные транспорту аминокислот в ликвор и кровь. Известно, что существует по крайней мере пять различных систем вспомогательных транспортеров в люминальной мембране эндотелиоцитов кровеносных сосудов мозга. Еще две системы переносчиков расположены ассиметрично на обеих сторонах мембраны, а большинство переносчиков, использующих градиент Na^+ , присутствуют на аблюминальной мембране эндотелиоцитов и отвечают за отток молекул аминокислот из нервной ткани в эндотелиальные клетки, и оттуда – в периферический кровоток (Zaragozá, 2020). Становится также известно, что некоторые аминокислоты, а также моноамины, находятся в ликворе в физиологически активных концентрациях (Муртазина и др., 2021). Все это может давать основания для предположения, что существуют механизмы транспорта ГАМК из крови в СМЖ и нервную ткань – и наоборот. Тем не менее, вопрос о проницаемости ГЭБ и/или ГЛБ для ГАМК остается дискуссионным.

Информация о структурно-функциональных отношениях ГАМК-ергических клеток и клеток, выстилающих желудочки головного мозга, на данный момент тоже оказывается фрагментарной. В частности, известно, что эпендимоциты субкомиссурального органа при воздействии нейротоксина 5,7-дигидрокситриптамина (вызывающего дегенерацию серотонинергических структур) накапливают ГАМК в цитоплазме, что свидетельствует о наличии на мембране этих клеток транспортера ГАМК (Didier-Bazes et al., 1992). При этом, по всей видимости, переносчики ГАМК присутствуют только у эпендимоцитов, получающих серотонинергическую иннервацию (Didier-Baze`s et al., 2001). Это свойство эпендимоцитов субкомиссурального органа подчеркивает роль нервного окружения в дифференцировке клеток эпендимной выстилки и косвенно указывает на регионспецифичность такой дифференцировки.

Проводились также исследования с целью охарактеризовать нейрон-глиальные взаимодействия в области 4-го желудочка. Несмотря на наличие на мембране эпендимных клеток ГАМК_A-рецепторов, реконструкция ультраструктуры эпендимы и субэпендимной зоны с помощью электронной микроскопии не позволила выявить в этой зоне функциональные синапсы между нейронами и клетками выстилки. Однако, в этой же работе, на эпендимоцитах мозжечка методом пэтч-кламп при фиксации мембранного потенциала были зарегистрированы ГАМК-опосредованные ионные токи (Reyes-Haro et al., 2013). Принимая во внимание эти

сведения, можно сделать вывод, что регуляция функциональной активности эпендимоцитов в области 4-го желудочка может осуществляться внесинаптической ГАМК.

Наличие ГАМК-ергической иннервации в субфориальном органе было продемонстрировано в 1992 году с помощью иммуногистохимического выявления ГАМК (Weindl et al., 1992). Считается, что ГАМК-ергические терминалы, наблюдаемые в СФО, принадлежат как местным нейронам, так и нейронам областей, прилегающих к передней стенке третьего желудочка: среднего преоптического ядра гипоталамуса и сосудистого органа терминальной пластинки (Osaka, Yamashita, Koizumi, 1992; Tanaka et al., 2002). Роль резидентных ГАМК-ергических клеток СФО, предположительно, состоит в модуляции активности других нейронов в пределах органа (Honda et al., 2001), либо иннервации нейронов среднего преоптического ядра гипоталамуса (Kolaj, Bai, Renaud, 2004). Исследователи предполагают, что ГАМК-ергическая модуляция нейронов СФО в основном опосредуется ГАМК_A рецепторами (Inenaga et al., 1995), при этом афферентные токи могут воздействовать на мишени как через активацию ГАМК_A (Tanaka, Fujisawa, Nomura, 2003), так и посредством связывания с ГАМК_B рецепторами (Kolaj, Bai, Renaud, 2004). Помимо ГАМК, в аксонных терминалах ГАМК-ергических нейронов СФО наблюдали мет-энкефалин (Pickel, Chan, 1994), активность которого в СФО обеспечивает снижение почечной экскреции воды и солей (Fregoneze, Antunes-Rodrigues, 1992), и ангиотензин II (Pickel, Chan, 1995), в нервной системе являющийся основным агентом регуляции питьевого поведения и прессорных реакций кровеносных сосудов мозга (Sakai et al., 2007; Saxena et al., 2015). Это свидетельствует о всесторонней регуляции ГАМК-ергическими клетками процессов водно-солевого обмена, обеспечиваемых СФО.

Модуляция ГАМК-ергической нейротрансмиссии в головном мозге при физиологических условиях достигается различными способами, такими как регуляция метаболизма ГАМК, модулирование активности рецепторов нейромедиатора, а также регуляция внутриклеточной концентрации хлоридов (**рис. 5**).

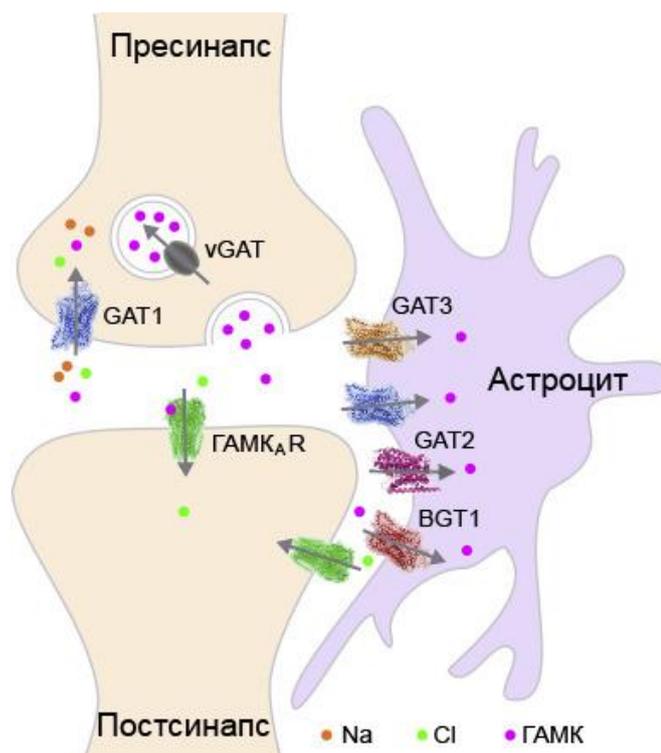


Рисунок 5 – ГАМК-ергический синапс. Субклеточная локализация рецепторов и транспортеров ГАМК. BGT – транспортер бетаина, GAT – транспортер ГАМК, vGAT – везикулярный транспортер ГАМК, R – рецептор (источник исходного изображения: Kicking et al., 2019).

Основой ГАМК-ергической передачи является тесная связь между активностью ГАМК_A-рецептора и низкой внутриклеточной концентрацией ионов Cl⁻, которая поддерживается рядом трансмембранных хлорных переносчиков (Farrant, Kaila, 2007). В первую очередь, это два мембранных насоса: NKCC1 (котранспортер Na-K-Cl 1) и KCC2 (котранспортер K и Cl 2), – действующие в противоположном направлении. Регуляция синтеза и активности KCC2 с помощью фосфорилирования сигнальных белков, а также короткий период полужизни, определяет этот транспортер в качестве одного из основных инструментов контроля электрохимического градиента Cl⁻, а, следовательно, и координации работы нейронных сетей головного мозга (Chamma et al., 2012; Farrant, Kaila, 2007).

Важную роль KCC2 в поддержании баланса работы ЦНС подтверждают эксперименты по нокауту гена этого белка у лабораторных животных. У животных со сниженным содержанием активного KCC2 наблюдаются нарушения опорно-двигательного аппарата, мышечная спастичность, на ЭЭГ отмечается эпилептиформная активность. Животные, нокаутные по KCC2, умирают в неонатальный период вследствие дыхательной недостаточности (Blaesse et al., 2009).

Экспрессия генов, кодирующих субъединицы рецепторов ГАМК, может регулироваться на нескольких уровнях: при инициации транскрипции, путем альтернативного сплайсинга, на уровне трансляции и посттрансляционных модификаций, а также сортинга, транспорта и деградации белка (Steiger, Russek, 2004). Помимо этого, рецепторы ГАМК являются мишенью для большого числа как эндогенных, так и экзогенных модуляторов, регулирующих их функции. Так, положительные аллостерические модуляторы ГАМК_A-рецепторов изменяют фазовое торможение, продлевая период тормозных постсинаптических потенциалов, что, в свою очередь, тормозит возбуждение клетки в ответ на параллельные возбуждающие стимулы (Barker, Hines, 2020; Eyre et al., 2012).

Так как синапс включает в себя не только нейрональные, но и глиальные компоненты (см. рис. 5), которые способны модифицировать синаптическую передачу (Kicking et al., 2019; Verkhratsky, Nedergaard, 2018)(Verkhratsky, Nedergaard, 2018), возможную роль глиоцитов в регуляции баланса тормозных и возбуждающих сигналов нельзя оставлять без внимания. Взаимодействие клеток астроглии с пре- и постсинапсами обеспечивается, с одной стороны, их структурными особенностями, путем формирования перисинаптических отростков, несущих на мембране рецепторы к нейромедиаторам и многие транспортеры для элиминации медиатора из синаптической щели (так называемый «трехчастный синапс»). С другой стороны, перисинаптические отростки астроцитов способны высвобождать активные молекулы, в частности, АТФ/аденозин, глицин, глутамат и ГАМК (Hertz et al., 1989; Shain et al., 1986; Verkhratsky, Nedergaard, 2018). Механизм этого высвобождения до настоящего времени остается неизвестным. Несмотря на обширные исследования структурно-функциональных особенностей трехчастных синапсов, основное внимание сосредоточено на работе глутаматергических синапсов, и тормозным синапсам уделяется меньше внимания (Ishibashi, Egawa, Fukuda, 2019). Не в последнюю очередь это обусловлено высокой гетерогенностью популяции ГАМК-ергических клеток ЦНС.

Так, в соматосенсорной коре и гиппокампе волны кальция (Ca^{2+}) в астроцитах генерируются за счет активации строго определенной группы корковых интернейронов (Mariotti et al., 2018; Matos et al., 2018). Эти результаты позволяют предположить, что астроциты могут воспринимать сигналы отдельных групп интернейронов и тонко влиять на работу нейронных сетей путем стимуляции синаптической передачи ГАМК-ергических клеток.

Высказывается предположение, что значительный вклад в поддержание баланса возбуждающих и тормозных сигналов вносит активность транспортеров ГАМК (Sears, Hewett,

2021). Эта гипотеза представляется убедительной, поскольку при отсутствии в межклеточном пространстве ферментов расщепления данного нейротрансмиттера лимитирующим фактором нейротрансмиттера может быть не только десенсibilизация рецептора после длительного связывания лиганда, но и инактивация нейромедиатора с помощью механизма обратного его захвата, осуществляемого трансмембранными транспортерами на поверхности астроцитов и пресинаптических окончаний.

Данные, полученные на переживающих срезах гиппокампа мышей, нокаутных по GAT1, вносят значительный вклад в подтверждение этой гипотезы. Было показано, что уровень ГАМК-ергической нейротрансмиттерной передачи у мышей-нокаутных увеличивается по сравнению с мышами дикого типа (Jensen et al., 2003). Аналогичные результаты показывают исследования, выполненные с использованием селективных ингибиторов GAT1 (Frahm, Engel, Draguhn, 2001; Nusser, Mody, 2002). Дисфункция транспортера ГАМК также оказывает влияние на поведение лабораторных животных: наблюдались когнитивные нарушения, связанные с активностью септо-гиппокампальной системы (Gong et al., 2009; Gong et al., 2015), а также признаки нарушений болевой чувствительности (Yin et al., 2008), и общее снижение уровня тревожности (Gong et al., 2015). Эти данные, в свою очередь, позволяют рассматривать ингибиторы GAT1 в качестве потенциальных фармакологических агентов, воздействующих на активность ГАМК-ергической системы, нарушенной при некоторых нервных и психических заболеваниях.

Однако влияние других транспортеров ГАМК на равновесие возбуждающих и тормозных сигналов неочевидно. Существуют исследования, демонстрирующие усиленный синтез BGT-1 в астроцитах коры и гиппокампа пациентов с болезнью Альцгеймера (Kwakowsky et al., 2018). В противоположность BGT-1, плотность GAT3 на мембране астроцитов снижается (Salcedo et al., 2021). Таким образом, вопрос о том, могут ли BGT-1 и GAT3 регулировать сдвиг баланса нервных процессов (который возникает при болезни Альцгеймера), оказывается закономерным. О роли GAT2 в регуляции этого процесса известно немного (Sears, Hewett, 2021). Единственным описанным эффектом изменения активности этого типа транспортера ГАМК заключается в повышении содержания таурина в барьерных структурах головного мозга (Zhou et al., 2012). Это указывает, что GAT2, вероятно, обеспечивает транспорт таурина из головного мозга в кровеносную систему, однако, никак не отвечает на вопрос о влиянии GAT2 на уровни возбуждающих и тормозных сигналов.

Вызванное ГАМК ингибирование может быть опосредовано не только классической синаптической передачей и связыванием медиатора с рецептором на постсинаптической

мембране. Данные последних лет указывают на существование внесинаптической нервной передачи путем диффузии ГАМК за пределы синаптической щели или экзоцитоза астроцитами, что опосредует активацию рецепторов, расположенных на различных участках мембраны клетки-мишени (Koh et al., 2023). Механизмы высвобождения нейротрансмиттера варьируют в зависимости от типа клеток, а порой и в пределах определенного типа. Основным механизмом высвобождения ГАМК оказываются везикулярный экзоцитоз, перенос с помощью ГАМК-проницаемых ионных каналов или посредством специализированных транспортеров (Kersanté et al., 2013; Lee et al., 2010; Zhang et al., 2021). Внесинаптическое тоническое ингибирование базируется на активации высокоаффинных рецепторов ГАМК, что отличает его от фазического синаптического торможения, индуцируемого взаимодействием высоких концентраций нейромедиатора в синаптической щели с низкоаффинными рецепторами постсинаптических мембран (Семьянов, 2002).

Регуляция синаптической передачи путем тонического ингибирования происходит медленно (от минуты до часа), что оказывает долговременное влияние на активность головного мозга. Тонический ток ГАМК, по-видимому, оказывает тормозное воздействие на процессы обучения и памяти, двигательные функции, но стимулирует обработку сенсорной информации и поддерживает состояние бессонницы. Двухнаправленное действие тонического тока характерно для различных форм аддиктивного поведения (Koh et al., 2023).

Быстро растущий объем информации раскрывает роль ГАМК в обеспечении когнитивных функций, таких как обучение и память, обработка сенсорной информации, а также координации движений. При этом становится ясно, регуляция работы ГАМК-ергической системы не ограничивается нейронами, а опосредуется и ненейрональными клетками, в особенности, астроцитами. Перспективными направлениями исследования представляются выявление особенностей ГАМК-ергической иннервации барьерных структур головного мозга, к которым относятся выстилка желудочков, сосудистое сплетение и субфорникальный орган.

2.2.2. Роль ГАМК-ергической системы в процессе развития и при старении

Известно, что ГАМК-ергическая система головного мозга участвует в структурной и функциональной организации процессов ЦНС в ходе развития (Foster, Kemp, 2006; Kubota, 2014; Magueresse Le, Monyer, 2013). Во время эмбрионального развития ГАМК начинает синтезироваться задолго до начала синаптогенеза, а ее активное участие в процессах эмбрионального развития подтверждены различными методами иммуномаркирования и электрофизиологически (Behar et al., 1998; Chen, Trombley, Pol Van Den, 1995; Li et al., 2018).

Так, данные, полученные на клеточной культуре эмбриональных нейронов мыши (15 сутки эмбрионального развития, E15), показали, что микромолярных концентраций ГАМК было достаточно для изменения проницаемости мембран нейронов для ионов хлора (Chen, Trombley, Pol Van Den, 1995). Внесинаптическое высвобождение ГАМК на ранних этапах развития (до начала формирования синапсов) создает хемотаксис, необходимый для правильной миграции фенотипически различных популяций предшественников нейронов в процессе кортикогенеза (Behar et al., 1998). Влияние градиента ГАМК на радиально мигрирующие нейроны в пределах формирующейся коры неоднородно: в промежуточной зоне и в субпластинке ГАМК действует как индуцирующий сигнал, а в корковой пластинке верхних слоях как стоп-сигнал (Luhmann, Fukuda, Kilb, 2015). Этот разнонаправленный эффект определяется дифференциальной экспрессией генов и модуляцией активности различных рецепторов ГАМК по мере миграции клеток. Мигрирующие клетки содержат на мембране высокоаффинные ГАМК- ρ -рецепторы (подкласс ГАМК_A-рецепторов, полностью состоящих из субъединиц ρ) и низкоаффинные ГАМК_A-рецепторы. Из-за направленного градиента ГАМК низкоаффинные ГАМК_A-рецепторы активируются только в корковой пластинке, а для активации высокоаффинных ГАМК- ρ -рецепторов оказывается достаточной низкая концентрация ГАМК в промежуточной зоне. Благодаря активации различных сигнальных путей, работа ГАМК- ρ -рецепторов направлена на поддержание миграции изнутри-наружу в корковую пластинку, а активация ГАМК_A-рецепторов по мере продвижения клеток способствует прекращению миграции (Denter et al., 2010; Luhmann, Fukuda, Kilb, 2015). Определяющая роль рецепторов ГАМК была продемонстрирована путем их фармакологической блокировки в период раннего кортикогенеза. Было показано, что это приводит к нарушению миграции нейронов и, таким образом, индуцируют гетеротопию клеток коры головного мозга (Luhmann, Fukuda, Kilb, 2015).

Судя по всему, ГАМК-ергические клетки являются первыми нейронами, обуславливающими синаптическую активность межклеточных сигнальных сетей развивающейся ЦНС (Ben-Ari et al., 2004). С помощью метода фиксации потенциала в переживающих срезах гиппокампа крыс удалось показать, что уже к E18 около 65% интернейронов способны генерировать спонтанные тормозные постсинаптические токи или электрически вызванные потенциалы действия (Hennou et al., 2002). Для пирамидных нейронов эта доля составила 12%, что указывает на более раннее созревание ГАМК-ергических структур по сравнению с глутаматергическими.

И более того, созревание ГАМК-продуцирующих синапсов является необходимым

условием наступления критического периода формирования глазного доминирования, во время которого нейронные связи становятся более пластичными и восприимчивыми к влиянию зрительного опыта (Espinosa, Stryker, 2012). В условиях дефицита ферментов синтеза ГАМК критический период не наступает, что приводит к нарушениям зрения. Стимуляции преждевременного развития ГАМК-ергических интернейронов, напротив, индуцирует критический период преждевременно (Priya et al., 2019).

Считается, что формирование синапсов требует четкой координации работы механизмов высвобождения нейромедиатора в пресинаптической терминали и кластеризации соответствующих рецепторов на постсинаптической мембране. После образования синапса запускаются клеточные и молекулярные процессы, способствующие созреванию нейронных связей. Их созревание требует сопутствующих изменений в пре- и постсинаптических окончаниях, а также изменения градиента хлора. Так, во время раннего синаптогенеза внутриклеточная концентрация хлора в незрелых нейронах выше по сравнению со зрелыми (Gamlin et al., 2018). Однако исследования, затрагивающие синаптогенез в различных областях мозга, показали, что созревание ГАМК-ергических синапсов менее зависимо от высвобождения нейротрансмиттера, чем принято считать (Pei et al., 2015; Wu et al., 2012). Было обнаружено, что полная блокировка высвобождения ГАМК в корзинчатых клетках коры приводит к увеличению плотности нормально сформированных синаптических бутонов по сравнению с интактным контролем (Wu et al., 2012). Эти результаты демонстрируют не только то, что высвобождение ГАМК не является необходимым условием образования тормозных синапсов, но также указывает на вероятное участие нейротрансмиттера в процессе элиминации лишних синаптических контактов. По-видимому, критическими механизмами развития ГАМК-ергических синапсов оказываются кластеризация рецепторов на постсинаптической мембране и поддержание градиента хлора. Это неудивительно, учитывая, что подтип рецептора диктует различные белковые взаимодействия с белками скаффолда и внутриклеточными сигнальными молекулами.

Помимо этого, ГАМК может действовать как модулятор клеточной пролиферации, запуская сигналы в пролиферирующих клетках субвентрикулярной зоны (Haydar et al., 2000). Включение ³H-тимидина или бромдезоксимуридина (BrdU) в клетки эмбрионального мозга (E16–E19) показало, что микромолярные концентрации ГАМК ингибируют синтез ДНК в пролиферирующих клетках (LoTurco et al., 1995).

Гамма-аминомасляная кислота играет важную роль в обеспечении процессов

нейрогенеза и во взрослом мозге. В нейрогенных нишах головного мозга (которыми являются субвентрикулярная (СВЗ) и субгранулярная (СГЗ) зоны) сигналинг с использованием ГАМК опосредует негативную регуляцию пролиферативной активности нейральных стволовых клеток и нейробластов (Ge et al., 2007; Liu et al., 2005). ГАМК-зависимая передача может, однако, не только поддерживать нейральные стволовые клетки в состоянии покоя, но и способствовать их дифференцировке и миграции нейробластов (Bolteus, Bordey, 2004; Trinchero, Giacomini, Schinder, 2021).

До недавнего времени механизм ГАМК-зависимой регуляции клеточного цикла нейральных стволовых клеток оставался неясным. Было показано, что присутствие ингибитора связывания диазепама оказывает аллостерический эффект на ГАМК_A рецепторы, присутствующие на плазматической мембране нейральных стволовых клеток, способствуя их пролиферации (Dumitru et al., 2017; Everlien et al., 2022).

Интересно, что нейроны, по всей видимости, оказываются не единственными клетками головного мозга, способными синтезировать ГАМК. Было показано, что клетки мозговых оболочек и эпителиоциты сосудистого сплетения мышей в период эмбриогенеза содержат один из ферментов синтеза нейромедиатора – GAD65 (Tochitani, Kondo, 2013). Более того, на мембранах этих клеток обнаружен трансмембранный белок-канал бестропин 1, который проницаем для ГАМК и опосредует высвобождение аминокислоты во внеклеточное пространство (Lee et al., 2010; Tochitani, Kondo, 2013). Эти результаты дают основание полагать, что мозговые оболочки и сосудистое сплетение могут выступать в качестве ненейрональных источников гамма-аминомасляной кислоты, роль которой в процессе развития еще предстоит раскрыть.

Были получены косвенные доказательства синтеза ГАМК эндотелиоцитами кровеносных сосудов, в цитоплазме которых локализуется везикулярный транспортер ГАМК – vGAT (Li et al., 2018). Это наблюдение было отмечено в ходе исследования влияния ГАМК на развитие кровеносных сосудов головного мозга. Показано, что частичная или полная блокировка высвобождения ГАМК приводит к порокам развития кровеносной системы ЦНС. В свою очередь, аномальное развитие сосудов патологически влияет на миграцию и локализацию нейронов в головном мозге. Этот феномен авторы и связывают с наличием особого ГАМК-зависимого сигнального пути, который обеспечивается аминокислотой, вырабатываемой клетками эндотелия (Li et al., 2018). Тем не менее, чтобы определить, как именно ГАМК влияет на миграцию клеток и другие процессы развития нервной ткани, необходимы дальнейшие

исследования.

Все это наглядно демонстрирует важную роль ГАМК-ергической системы в нормальном течении эмбриогенеза и раннего постнатального онтогенеза. Однако несмотря на то, что существует большое количество информации о становлении ГАМК-ергической системы, данные о роли ГАМК в развитии ЦНС противоречивы.

Остается не до конца ясным, каким образом система, использующая в основном тормозный нейротрансмиттер, может поддерживать необходимый для нормального функционирования нервной ткани баланс тормозных и возбуждающих сигналов в период эмбриогенеза и раннего постнатального развития. Эксперименты с клеточными культурами частично разрешают это противоречие. На культуре молодых нейронов коры Xing et al. продемонстрировали, что баланс сигналов глутаматергических и ГАМК-ергических клеток зависит не от количества функциональных нейронов необходимой медиаторики в пределах сети, но от их частотных характеристик, в основном – спайковой активности (Xing, Lima de, Voigt, 2021).

Еще одна гипотеза, претендующая на объяснение этого феномена, основана на концепции возбуждающей, а не тормозной активности ГАМК-ергических клеток в молодом мозге (Ben-Ari, 2002; Ben-Ari et al., 2012). Как известно, торможение клетки-мишени основано на открытии хемочувствительных калиевых и хлорных каналов, что вызывает гиперполяризацию постсинаптической мембраны путем входа в клетку ионов Cl^- и утечки ионов K^+ . Согласно этой гипотезе, на ранних этапах развития высвобождение ГАМК приводит, наоборот, к деполяризации постсинаптической мембраны. основополагающим механизмом этого явления является низкий уровень синтеза постсинаптической клеткой нейронального котранспортера KCC2 (Rivera et al., 1999). Таким образом, возбуждающее действие ГАМК-ергических нейронов обеспечивает синхронизированную активность нейронов (Flossmann et al., 2019) и поддерживает активность-зависимое образование глутаматергических и ГАМК-ергических синапсов (Ben-Ari, 2006; Oh et al., 2016; Wang, Kriegstein, 2009). Переключение возбуждающей потенциации на тормозную происходит у грызунов уже после рождения – в первую неделю постнатального развития (Ben-Ari et al., 1989).

Следует отметить, что подтвердить эту гипотезу *in vivo* до сих пор не удалось. Даже те клетки, которые в культуре являются возбуждающими, в функциональном головном мозге проявляли тормозную активность (Kirmse et al., 2015; Valeeva et al., 2016). Другие авторы также оспаривают эту гипотезу, обращая внимание на то, что подтверждающие ее данные получены

на переживающих срезах мозга, в которых присутствуют поврежденные клетки, что может приводить к ошибочным результатам (Bregestovski, Bernard, 2012; Zilberter, 2016). Их наблюдения ставят под сомнение предыдущие выводы о роли ГАМК в процессе эмбрионального развития нервной ткани и синаптогенеза.

Тем не менее, как минимум в одной из структурных областей головного мозга вероятное возбуждающее действие ГАМК-ергической системы удалось зафиксировать *in vivo* (Murata, Colonnese, 2020). Авторы данной работы модулировали активность ГАМК-ергических интернейронов области CA1 гиппокампа с помощью вирусной трансдукции генов двух типов рецепторов, один из которых возбуждал интернейроны при воздействии клозапин-N-оксида, а другой – подавлял их активность под влиянием сальвинорина В. Индукция активности ГАМК-ергических клеток на третьи постнатальные сутки приводила к увеличению активности пирамидных клеток гиппокампа, и наоборот, снижение активности интернейронов затормаживало пирамидные клетки гиппокампа. Эффект воздействия препаратов менялся на противоположный к концу первой недели постнатального онтогенеза. Другие результаты были получены при работе со зрительными отделами коры больших полушарий: здесь на всех изученных сроках ГАМК-ергические нейроны обладали тормозной активностью (Murata, Colonnese, 2020). Вероятно, стоит признать, что переключение возбуждающей/тормозной активности ГАМК-ергической системы имеет место лишь в отдельных структурах развивающейся ЦНС.

Дискуссионным оказывается и вопрос, остается ли постоянным соотношение синтеза, распада и сигналинга ГАМК и глутамата в ходе постнатального онтогенеза. Известно, что концентрации этих аминокислот могут значительно изменяться на протяжении всего онтогенеза, предположительно, вследствие структурно-функциональных изменений региональной ткани. Результаты показывают, что в неполовозрелый и ювенильный периоды ГАМК- и глутаматергические нейроны претерпевают всплеск активности метаболизма нейротрансмиттеров (Chowdhury et al., 2007; Steel et al., 2020). Считается, что с возрастом метаболическая активность, а, следовательно, и уровни ГАМК и глутамата снижаются (Burianova et al., 2009; Mora, Segovia, Arco del, 2008), что, потенциально может привести к ковариации концентраций нейротрансмиттеров с целью сохранить баланс возбуждающих/тормозных сигналов. Однако, крупное сравнительное исследование, предпринятое с целью выяснения этого вопроса, не показало корреляции между снижением концентраций ГАМК и глутамата в ходе старения (Steel et al., 2020). Можно возразить, что представленная работа обосновывала свои результаты на данных измерения концентрации

химических веществ посредством магнитно-резонансной спектроскопии человеческого мозга, для которого характерна значительная популяционная изменчивость. Кроме того, авторы признают относительно небольшой разброс исследуемой выборки (18-35 лет), и высказывают надежду, что с увеличением возрастного диапазона станет возможным получить более точный набор данных (Steel et al., 2020). С другой стороны, все же следует предполагать, что механизмы, лежащие в основе функциональной реорганизации нейронов и нейронных сетей при старении, могут существенно отличаться по сравнению с периодом половой зрелости. И наконец, использование альтернативного подхода в измерении концентрации нейротрансмиттеров в аналогичном исследовании помогло установить корреляцию между их возрастным снижением в затылочной коре при отсутствии корреляции в префронтальной (Rideaux et al., 2022). Таким образом, методические подходы к анализу ковариации возбуждающих и тормозных сигналов ЦНС нуждаются в пересмотре.

Нормальное старение связано со структурными и функциональными изменениями в мозге, которые отражаются в различных когнитивных, поведенческих и клинических нарушениях. Происходят нарушения моторной функции, процессов обучения и памяти. Значительную роль в регуляции этих процессов играет ГАМК-ергическая система (Cuypers, Maes, Swinnen, 2018).

Одним из основных признаков старения является снижение нейропластичности, что во многом связано с изменением морфологии нейронов, которые могут приводить к нарушению синаптических связей и клеточной проводимости (Hof, Morrison, 2004; Ibañez et al., 2023). Об этом может сигнализировать изменение секреции медиатора, его рецептора или фермента синтеза. В частности, было выявлено, что активность связывания ГАМК_B-рецепторов с лигандом в гиппокампе и префронтальной коре крыс снижается при старении. Любопытным результатом стало то, что это снижение не всегда коррелировало с ухудшением способности к пространственному обучению. В гиппокампе изменение этих двух параметров было, судя по всему, взаимозависимо. И напротив, ухудшение способности к обучению было никак не связано с активностью рецептора в префронтальной коре (McQuail et al., 2012). Эти данные демонстрируют, что связанные со старением изменения регионспецифичны. Вследствие сложности устройства головного мозга выглядит логичным, что различные нервные центры по-разному и в разной степени подвержены влиянию старения.

Было также показано, что структурные и функциональные изменения ГАМК-ергических интернейронов коры оказывают непосредственное влияние на возрастную дегенерацию

пирамидных нейронов (Koliatsos et al., 2006). Авторы предполагают, что уровень синтеза этими клетками другого нейромедиатора – оксида азота (NO), может служить маркером коркового повреждения на ранних стадиях болезни Альцгеймера. Дальнейшие исследования могут быть направлены на освещение вопросов о том, какие нейротрансмиттеры, непосредственно связанные с интернейронами и/или ГАМК-ергической передачей, также оказывают влияние на морфофункциональные изменения, происходящие в неокортексе.

Принимая во внимание важную роль ГАМК в обеспечении функций стриатума, значительные колебания концентрации нейромедиатора с возрастом следует ожидать и в этой области конечного мозга. Однако данные, характеризующие биохимические изменения зачастую противоречивы (Hermans et al., 2017; Mora, Segovia, Arco del, 2008; Segovia et al., 1999). Происходящие в ходе старения колебания базальных концентраций ГАМК, по крайней мере, частично обусловлены уменьшением объема серого вещества (Maes et al., 2018), которое может быть индивидуальным в каждом исследованном случае. Еще одной возможной причиной несоответствий могут оказаться сигнальные каскады, специфичные для той или иной области головного мозга.

Будущие исследования должны пролить свет на взаимосвязь между ГАМК-опосредованными процессами и нейродегенеративными нарушениями при старении. В этом отношении, помимо сосредоточения внимания исследователей только на ГАМК-опосредованных тормозных процессах, многообещающим направлением является в этом контексте рассмотрение глутаматергической системы (как системы основного возбуждающего нейромедиатора), а также других нейромедиаторных систем ЦНС.

2.3. ГАМК-ергические интернейроны головного мозга

Комплексная обработка входящей и регуляция выходящей информации в регионах конечного мозга обеспечивается тонкой координацией работы нервных сетей. Их функциональная активность, в свою очередь, напрямую зависит от активности интернейронов – клеток, которые впервые были описаны Саньяго Рамон-и-Кахалем в его работе, выделившей две основные группы нейронов коры на основе их удаленности от клеток-мишеней (Ramón y Cajal, 1911). Аксоны интернейронов, в основном, не покидают пределов определенной области ЦНС, а функция этих клеток состоит в избирательной модуляции активности нейронных цепей. Большинство интернейронов являются ГАМК-ергическими (Kubota, 2014; Lim et al., 2018).

Нетрудно догадаться, что тонкая пространственно-временная настройка возбудимости нервных клеток, осуществляемая интернейронами, подразумевает их широкое разнообразие.

Большинство исследователей сходятся во мнении, что интернейроны можно разделить на дискретные группы согласно их специализации на выполнении той или иной функции в нейронных сетях (Blatow, Caputi, Monyer, 2005; Markram et al., 2004). Для выработки критериев классификации в 2008 году в городе Петилья де Арагон была созвана конференция, результатом которой стала учреждение номенклатуры признаков групп ГАМК-ергических интернейронов (Ascoli et al., 2008). Согласно рекомендациям Петильянской терминологии основным критерием, по которым интернейроны можно отнести к той или иной группе, являлось совокупное сходство их морфологических, молекулярных и электрофизиологических свойств.

Систематика групп ГАМК-ергических интернейронов и в настоящее время остается актуальной проблемой современной нейробиологии. Модификация уже существующих и появление новых методических подходов анализа нервной ткани приводит к накоплению крупного массива данных, нуждающихся в сортировке (Gouwens et al., 2020; Que et al., 2021; Terreg et al., 2018). Не стоит забывать и о том, что это разнообразие напрямую связано с дифференцировкой и развитием нервных клеток в процессе эмбриогенеза и раннего постнатального онтогенеза (Lim et al., 2018; Williams, Riedemann, 2021). В связи с этим, важным представляется обсудить способы классификации интернейронов в различных отделах конечного мозга в контексте их онтогенетического развития.

2.3.1. Гипотезы происхождения

Считается, что ГАМК-ергические клетки образуются из предшественников в эмбриональном субпаллиуме, в области ганглиозного возвышения и преоптической зоны гипоталамуса (Lodato, Arlotta, 2015; Marín, Anderson, Rubenstein, 2000). ГАМК-ергические нейроны развиваются под регуляцией типичных для субпаллиума транскрипционных факторов (семейство *Dlx*, *Ascl1*, *Gsx1* и *Gsx2*), однако на их разнообразие влияют дополнительные транскрипционные факторы, которые ограничивают дифференцировку предшественников только в определенные типы интернейронов (Liu et al., 2019; Long et al., 2009; Sandberg et al., 2016; Wang et al., 2013; Wang et al., 2010). Образование тормозных нейронов в эмбриогенезе происходит в четко ограниченный период, длительность которого специфична для разных видов млекопитающих (Lodato, Arlotta, 2015). Так, у людей закладка ГАМК-ергических клеток начинается на 5-й неделе беременности и длится до 20-й недели (Bystron, Blakemore, Rakic, 2008). У грызунов этот интервал короче: от E11 до E19 у мышей (Takahashi, Nowakowski, Caviness, 1995) и от E13 до E21 у крыс (Bayer, Altman, 1991; Chesselet et al., 2007).

Несмотря на то, что ганглиозное возвышение считается основным источником ГАМК-ергических клеток, ряд авторов предполагает возможность наличия клеток-предшественников в субвентрикулярной зоне боковых желудочков мозга (Al-Jaberi et al., 2015; Lim et al., 2018; Radonjić et al., 2014; Shmakova et al., 2021).

2.3.2. Миграция и дифференцировка предшественников ГАМК-ергических клеток

В связи с местом своего происхождения, ГАМК-ергические нейроны заселяют регионы конечного мозга путем тангенциальной, а не радиальной миграции. Хотя радиальная миграция и является важным механизмом, участвующим в формировании гистогенетических рядов конечного мозга, процессы тангенциальной миграции, как предполагается, способствуют морфогенезу ядер субпаллиума и формированию ламинарной структуры коры (Marín, 2015). На данный момент не до конца остаются выясненными ключевые игроки (клетки, сигнальные пути и молекулы), регулирующие этот путь миграции.

Известно, что будущие корковые интернейроны имеют различные пути миграции в зависимости от места возникновения (Marín, 2013). Так, интернейроны, двигаясь из медиального ганглиозного возвышения, проникают в кору двумя путями: вдоль дорсальной и вентральной границ развивающегося стриатума. ГАМК-ергические клетки, происходящие из каудального ганглиозного возвышения, продвигаются к зонам своей локализации в коре через ее каудальный полюс (Yozu, Tabata, Nakajima, 2005), а интернейроны преоптической области идут вдоль дорсальной границы стриатума (Gelman et al., 2009). Предполагается, что будущие корковые интернейроны следуют градиенту концентрации, созданному комбинацией хемоаттрактантов, одним из которых является нейрегулин-1 (Nrg1). При этом, хеморепеллентную активность субпаллиальных структур, препятствующую заселению корковыми нейронами подкорковых ядер, проявляют семафорины 3 класса: Sema3A и Sema3F (Marín et al., 2001; Marín, 2013).

Интернейроны стриатума и бледного шара закладываются в медиальном ганглиозном возвышении и преоптической зоне. О молекулярных механизмах миграции подкорковых ГАМК-ергических клеток известно совсем немного. Основным их отличительным признаком считается отсутствие на мембране рецепторов нейропиллина и семафоринов (Marín, Anderson, Rubenstein, 2000; Nóbrega-Pereira et al., 2008).

Окончательное формирование элементов тормозной системы происходит в постнатальном онтогенезе. Процессы миграции, происходящие в эмбриональном развитии, сменяются процессами дифференцировки и созревания. У грызунов в конце первой недели

после рождения начинают формироваться функциональные синаптические связи, а созревание ГАМК-ергических интернейронов происходит в первый месяц постнатального развития (Okaty et al., 2009; Rice et al., 1985; Vincent, Pabreza, Benes, 1995).

2.3.3. Разнообразие ГАМК-ергических нейронов головного мозга

Высокое разнообразие морфологических, молекулярных и физиологических характеристик ГАМК-ергических клеток привело к разработке сложной номенклатуры тормозных нейронов головного мозга (Ascoli et al., 2008; Defelipe et al., 2013; Mihaljević et al., 2019). Наиболее распространенная номенклатура разделяет их на три крупные группы: парвальбумин-положительные (PV^+), соматостатин-положительные (SST^+) и нейроны, содержащие на мембране ионотропный рецептор серотонина 5-НТ3а ($5HT3aR^+$) (Rudy et al., 2011). Несмотря на то, что такой принцип классификации не является всеобъемлющим и точным, совокупность именно этих признаков охватывает все разнообразие тормозных нейронов, а перекрытие между группами ГАМК-ергических нейронов, в свою очередь, сведено к минимуму.

2.3.3.1. Кора

Наибольший интерес для исследователей в последние годы представляют ГАМК-ергические нейроны коры головного мозга. Открытие и дальнейшая модификация методов изучения экспрессии генов позволила получить большой массив данных транскриптомов отдельных клеток (Harris et al., 2018). На основании этих данных и принципах Петильянской классификации было выделено около 20 типов ГАМК-ергических клеток, сгруппированных в три крупные обозначенные выше группы (**рис. 6**) (Lim et al., 2018). Важно упомянуть, что распределение интернейронов в коре достаточно неравномерно и характеризуется значительными межвидовыми различиями (Druga, Salaj, Al-Redouan, 2023), поэтому, когда говорят об интернейронах коры головного мозга, чаще всего подразумевают неокортекс мыши.

Интересно также, что корковые интернейроны, в дополнение к классическому нейротрансмиттеру ГАМК, могут синтезировать и другие активные биомолекулы, способные выступать в качестве медиаторов (такие как соматостатин, вазоактивный интестинальный пептид (ВИП), холецистокинин, нейропептид Y и т. д.) (Зайцев, 2013; Tremblay, Lee, Rudy, 2016).

Самой распространенной группой интернейронов (около 40% от всей популяции) являются PV^+ клетки (Druga, Salaj, Al-Redouan, 2023). Это типичные быстроразряжающиеся

интернейроны (то есть, отвечающие на деполяризацию частыми и очень короткими потенциалами действия), которые можно разделить на три класса, согласно их морфологии (**рис. 6**). Это корзинчатые клетки, клетки-канделябры или аксо-аксональные интернейроны и трансламинарные клетки (Lim et al., 2018; Tremblay, Lee, Rudy, 2016). Однако не все авторы выделяют последний класс (Druga, Salaj, Al-Redouan, 2023; Tremblay, Lee, Rudy, 2016).

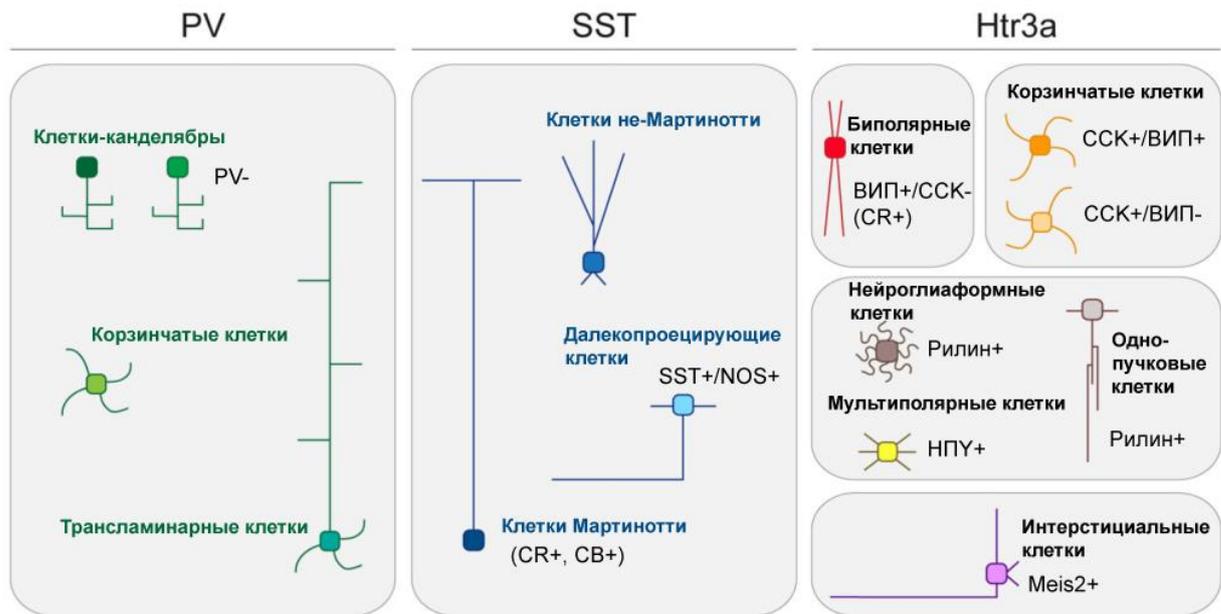


Рисунок 6 – Классификация интернейронов коры. PV – парвальбумин, SST – соматостатин, Htr3a – 5-HT_{3a}-рецептор, CB – кальбиндин, CCK – холецистокинин, CR – кальретинин, NOS – NO-синтаза, VIP – вазоактивный интестинальный пептид, NPY – нейропептид Y (источник исходного изображения: Lim et al., 2018).

Среди PV⁺ клеток самой многочисленной группой оказываются корзинчатые клетки. Их тела можно обнаружить во всех областях и слоях неокортекса, за исключением слоя I (**рис. 7**). Аксоны имеют извилистый паттерн ветвления, наиболее интенсивно ветвятся в том же слое, где залегает тело клетки (Зайцев, 2013), а синапсы образуют на телах и проксимальных дендритах как пирамидных клеток, так и других интернейронов (Hu, Gan, Jonas, 2014). Мультиполярные клетки-канделябры получили свое название из-за характерной морфологии своих вертикально ориентированных отростков. Тела клеток-канделябров часто встречаются на границе I и II слоя и в слое VI неокортекса (Taniguchi, Lu, Huang, 2013), а их аксоны контактируют с начальными сегментами аксонов пирамидных клеток (Somogyi, Freund, Cowey, 1982). Несмотря на то, что аксо-аксональные клетки традиционно относят к PV⁺ интернейронам, в пределах популяции выделяется многочисленная PV⁻ группа (**см. рис. 6**). Так называемые трансламинарные

интернейроны встречаются в коре значительно реже. Они залегают в глубоких слоях (V и VI), и посылают свои аксоны через всю толщу коры, что позволяет им воздействовать на пирамидные клетки различных слоев (Lim et al., 2018).

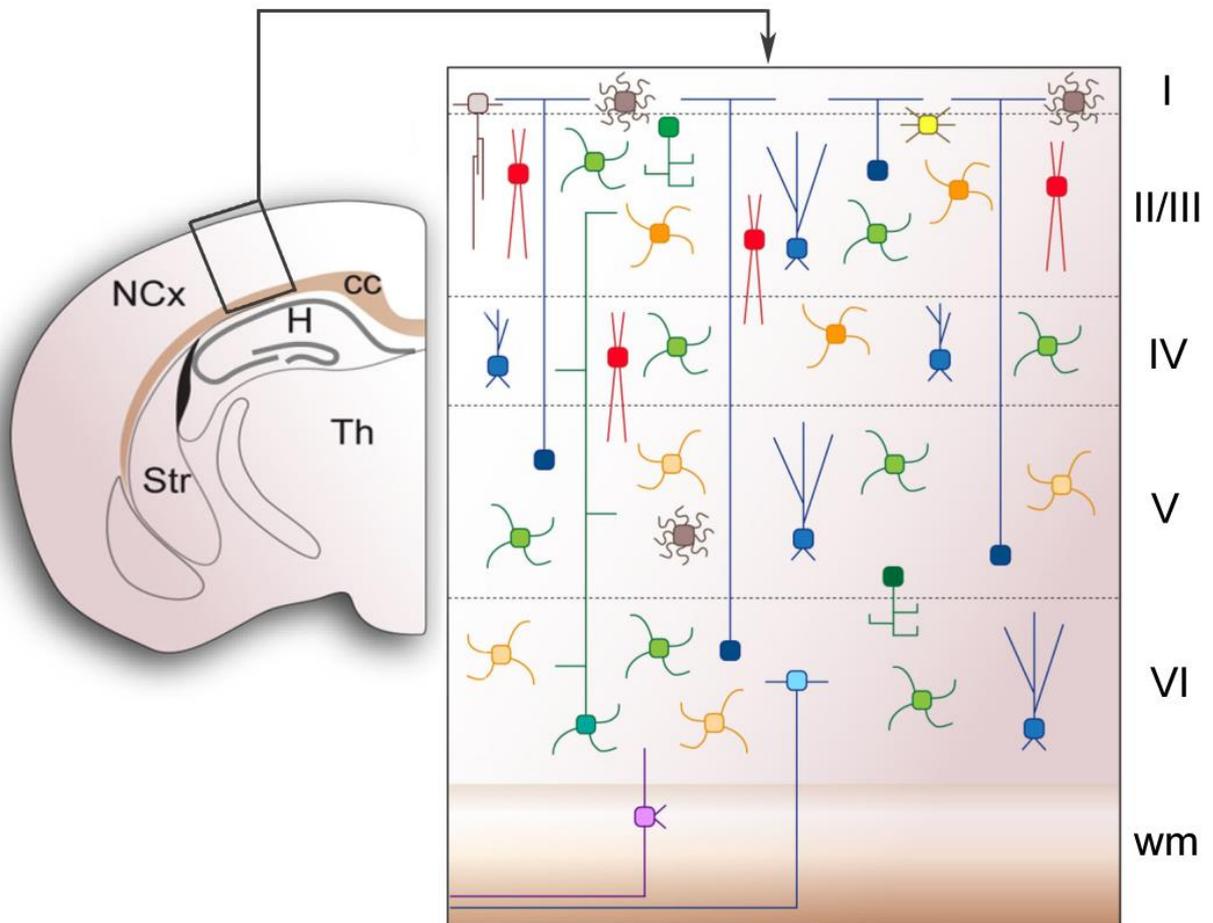


Рисунок 7 – Распределение различных классов интернейронов в неокортексе. Цветовая кодировка соответствует цветам рисунка 6. I-VI – слои коры, NCx – неокортекс, H – гипоталамус, Th – таламус, Str – стриатум, cc – мозолистое тело, wm – белое вещество (источник исходного изображения: Lim et al., 2018).

Вторая большая группа ГАМК-ергических интернейронов определяется по содержанию нейропептида соматостатина (SST) и преимущественной иннервацией дендритов клеток-мишеней (Lim et al., 2018). Их условно разделяют на два основных класса: клетки Мартиноцци и клетки не-Мартиноцци (Tremblay, Lee, Rudy, 2016). Клетки Мартиноцци, описанные в 1889 году Карло Мартиноцци – учеником Камилло Гольджи, представляют собой биполярные или мультиполярные клетки. Их отличительной особенностью является уникальное с точки зрения морфологии вертикально ориентированное аксонное дерево, которое, доходя до I слоя коры,

разветвляется горизонтально и охватывает значительную часть близлежащего нейропиля (Defelipe et al., 2013). На основе имеющихся данных можно констатировать, что клетки Мартинолли можно обнаружить во всех слоях коры, за исключением I. У крыс, в отличие от мышей, можно выделить значительную фракцию клеток Мартинолли, расположенных в IV слое (Markram et al., 2015), что является характерным примером межвидовых различий распределения ГАМК-ергических клеток. При этом независимо от того, в каком слое расположены клетки Мартинолли, их аксон всегда направлен в первый слой (Wang et al., 2004).

SST⁺ клетки, не являющиеся клетками Мартинолли, локализованы в II-VI слоях коры (рис. 7). В частности, особенно многочисленны они в слое IV (Ma et al., 2006), где иннервируют, в первую очередь, PV⁺ корзинчатые клетки (Scala et al., 2019).

Отдельно выделяют особый класс далекопроецирующих SST⁺ ГАМК-ергических нейронов, которые иннервируют клетки дальних областей неокортекса за счет аксонов, идущих в составе белого вещества мозолистого тела (как показано на рис. 7). Они наиболее распространены в глубоких слоях коры (как правило, в VI) и часто, наряду с ГАМК, коэкспрессируют синтазу оксида азота (NOS), хондролектин и нейропептид Y (Lim et al., 2018; Riedemann, 2019).

Третья группа корковых интернейронов, пожалуй, самая гетерогенная. Ключевой признак, по которому клетки объединены в данную группу – это присутствие на их мембране рецептора серотонина 5-HT_{3a} (5-HT_{3aR}⁺) (Lim et al., 2018; Tremblay, Lee, Rudy, 2016). Большую часть этой группы составляют интернейроны, содержащие ВИП. Морфологически ВИП-содержащие интернейроны чаще всего являются биполярными клетками с вертикально ориентированными аксонами. Они наиболее распространены в поверхностных слоях коры – II и III, и содержат кальций-связывающий белок кальретинин (рис. 6). При оптогенетической стимуляции ВИП-содержащих клеток отмечено, что их основной мишенью оказываются SST⁺ нейроны (Arpicella, Marchionni, 2022). Это свидетельствует о том, что активность ВИП⁺ нейронов приводит к растормаживанию как возбуждающих эфферентов коры, так и определенных ГАМК-ергических нейронов (а именно, PV⁺ корзинчатых клеток).

Холецистокинин-положительные корзинчатые клетки могут также содержать ВИП. Они мультиполярные, образуют тесные синаптические связи с соседними пирамидными и интернейронами и содержатся во II-IV слоях коры (Lim et al., 2018). Анализ транскриптома 5-HT_{3aR}⁺ нейронов показал, что холецистокинин-положительные корзинчатые клетки также могут быть ВИП-негативными (Tasic et al., 2018). Этот тип клеток обнаруживается в глубоких

слоях коры: V и VI (рис. 7).

В первом слое коры расположены рилин-содержащие нейроглиаформные и колончатые однопучковые клетки (*sigle-bouquet cells*), а также мультиполярные клетки, содержащие нейропептид Y (Lim et al., 2018; Overstreet-Wadiche, McBain, 2015; Schuman et al., 2019). Отличительной особенностью нейроглиаформных клеток является то, что они не образуют классических синапсов. Аксон нейроглиаформной клетки формирует густую сеть, занимающую большой объем в пределах I слоя. ГАМК высвобождается в межклеточное вещество коры внесинаптически, что позволяет нейромедиатору активировать рецепторы на расстоянии посредством объемной нейротрансмиссии (Overstreet-Wadiche, McBain, 2015). Однопучковые клетки морфологически напоминают нейроглиаформные, но аксон их не ветвится, а направлен в глубокие слои коры. Этот класс интернейронов также выделяют не все исследователи (Kelsom, Lu, 2013; Lim et al., 2018; Rudy et al., 2011). До сих пор остается невыясненным, являются ли рилин-содержащие интернейроны родственными клеткам Кахаля-Ретциуса. Клетки Кахаля-Ретциуса играют ключевую роль в миграции нейронов развивающейся коры благодаря секреции гликопротеина рилина (Derer, Derer, Goffinet, 2001), однако об их происхождении, развитии и дальнейшей судьбе известно очень мало. Следует все же отметить, что происхождение этих клеток из ганглиозного возвышения (López-Mengual et al., 2022) может указывать на филогенетическую близость клеток Кахаля-Ретциуса интернейронам коры.

Мультиполярные НПУ⁺ интернейроны нейроны обладают нерегулярной спайковой активностью и особенно многочисленны на границе между I и II слоем. Предполагается, что они также содержат NO-синтазу (Karagiannis et al., 2009). В белом веществе головного мозга также найдены ГАМК-ергические интернейроны, принадлежащие к группе 5-HT_{3aR}⁺ (Frazer et al., 2017; Lim et al., 2018). Их аксоны, в основном, направлены к клеткам полосатого тела.

Нельзя отрицать, что транскрипционное, биохимическое и анатомическое разнообразие корковых интернейронов напрямую связано с развитием коры. Как известно, в ходе первой недели постнатального онтогенеза интернейроны проникают в кортикальную пластинку, где на них оказывает влияние микроокружение. Это взаимодействие необходимо для правильного созревания большинства интернейронов (Lim et al., 2018; Okaty et al., 2009). Таким образом, понимание изменений, происходящих с ГАМК-ергическими структурами в процессе развития, может оказаться важным шагом в направлении раскрытия механизмов сборки и созревания как отдельных клеток, так и нейронных сетей коры.

2.3.3.2. Подкорковые области

ГАМК-ергические клетки стриатума условно можно разделить на четыре класса, три из которых будут относиться к интернейронам: средние шипиковые нейроны (или MSN), парвальбумин-содержащие интернейроны, кальретицин-содержащие интернейроны и соматостатин-содержащие интернейроны (Marín, Anderson, Rubenstein, 2000; Tepper, Wilson, Koós, 2008). Функция ГАМК-ергических интернейронов состоит в торможении MSN (Tepper, Bolam, 2004).

Более 90% популяции нейронов стриатума составляют MSN. Они же являются основными эфферентами этой области конечного мозга. Отличительной особенностью MSN являются их дендриты, густо покрытые шипиками. Через них MSN принимают сигналы от глутаматергических клеток коры и таламуса. Другой отличительной особенностью MSN является обилие дофаминовых (D1 и D2) рецепторов, обусловленное плотной катехоламинергической иннервацией (Zhou, 2020).

Как и в коре, большинство интернейронов стриатума являются PV⁺ (Rymar et al., 2004). Их тела в среднем имеют диаметр 16–18 мкм и образуют покрытые шипиками умеренно ветвящиеся дендриты (Kawaguchi, 1993; Koós, Tepper, 1999). В распределении PV⁺ аксонов и синаптических терминалей наблюдается медиально-латеральный градиент (Bolam, Bevan, 2001), что позволяет делать предположения о важности активности этих клеток в поддержании функции латеральных областей стриатума. PV⁺ интернейроны не только оказывают мощное тормозное влияние на MSN, но и связаны между собой электротонически системой щелевых контактов (Koós, Tepper, 1999; Koos, Tepper, Wilson, 2004). Их активность модулируется клетками коры, MSN, холинергических клеток стриатума и других PV⁺ нейронов (Tepper, Koós, Wilson, 2004).

Вторая группа ГАМК-ергических интернейронов выделяется по наличию кальций-связывающего белка кальретицина. У крыс эти клетки составляют около 0,8% стриатных нейронов (Rymar et al., 2004). Тела их среднего размера, дендриты немногочисленны, не содержат шипиков, редко ветвящиеся. Некоторые из них также проявляют активность синтазы оксида азота (NOS) (Bennett, Bolam, 1993a; Bennett, Bolam, 1993b).

Третья группа ГАМК-ергических интернейронов содержит соматостатин. В число синтезируемых белков входят также НPY и NOS (Tepper, Bolam, 2004). Эти нейроны среднего размера (Kawaguchi, 1993). Их активность модулируется холинергическими клетками стриатума и дофаминергическими эфферентами черной субстанции (Tepper, Koós, Wilson,

2004).

В дополнение к этим четырем группам, у трансгенных мышей были обнаружены ГАМК-ергические клетки, коэкспрессирующие тирозингидроксилазу (Terper et al., 2018). Однако остается неясным, можно ли выделить эту группу у других распространенных лабораторных животных.

К сожалению, большинство работ по настоящей тематике относится к концу XX – началу XXI века и игнорирует особенности онтогенеза ГАМК-ергических клеток стриатума. Поэтому представляется актуальным обратить внимание на ГАМК-ергические нейроны данной области в контексте их развития.

Еще одним белым пятном в вопросах организации ГАМК-ергической системы конечного мозга является ее развитие, функционирование и дезорганизация (в ходе нормального старения) в малоизученных областях конечного мозга. Такими областями являются барьерные зоны головного мозга. Барьерную функцию выполняют такие области как выстилка желудочков, сосудистое сплетение и циркумвентрикулярные или околожелудочковые органы ЦНС (такие как СФО) (Langlet et al., 2013; McKinley, Clarke, Oldfield, 2004). Несмотря на то, что наличие ГАМК-ергических структур в этих областях не подвергается сомнению (Honda et al., 2001; Lim et al., 2018; Tochitani, Kondo, 2013), их пространственная организация, взаимодействия с другими тканевыми компонентами, а также становление в процессе развития изучены недостаточно.

2.4. Заключение

Известно, что ГАМК-ергическая система головного мозга участвует в структурной и функциональной организации процессов ЦНС как в ходе онтогенеза, так и во зрелом возрасте. Она влияет на баланс возбуждения и торможения, на позиционирование нейронов и формирование капилляров головного мозга в эмбриогенезе. В настоящее время существует большое количество информации о распределении глутаматдекарбоксилаз конечного мозга как в норме, так и при становлении ГАМК-ергической системы. При этом, особенности формирования ГАМК-синтезирующих клеток и их связей в период раннего постнатального развития, а также в процессе естественного старения на данный момент остаются дискуссионными. В частности, не до конца выяснена роль ГАМК в регуляции процесса синаптогенеза, происходящего в первый месяц постнатального развития (Zilberter, 2016). Неисследованным остается вопрос о наличии клеток-предшественников ГАМК-ергических нейронов в субвентрикулярной зоне боковых желудочков мозга в постнатальном онтогенезе

(Lim et al., 2018; Shmakova et al., 2021). Большое значение приобретает исследование структурных особенностей синаптических терминалей ГАМК-ергических клеток (Hughes, Todd, 2022). Неохарактеризованными остаются особенности развития ГАМК-ергической сигнальной системы и распределения ее элементов в различных структурах головного мозга (таких как выстилка желудочков, субфорникальный орган). В связи с этим, не оставляет сомнения необходимость в проведении комплексного сравнительно-морфологического исследования особенностей организации ГАМК-ергических структур в различных зонах коры и в подкорковых областях с применением современных методов иммуномаркирования.

ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Объекты исследования

В качестве материала для исследования были использованы парафиновые срезы головного мозга крыс породы Wistar (n=60). Крысы содержались в виварии с естественным циклом день/ночь и свободным доступом к еде и воде. При содержании и умерщвлении животных соблюдали основные принципы Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.) и «Правила надлежащей лабораторной практики» (приказ №199н от 01.04.2016 г. Минздрава России). На проведение исследования получено положительное заключение локального этического комитета ФГБНУ «ИЭМ» (заключение №1/20 от 27.02.2020).

С целью исследования распределения глутаматдекарбоксилаз в конечном мозге на разных стадиях постнатального онтогенеза образцы головного мозга были взяты у крыс 5 возрастных групп, которые были выделены в соответствии с классификацией (Sengupta, 2013): I – 7 сутки постнатального развития, который относится к неонатальному периоду (n = 12); II – 14 сутки постнатального развития – неполовозрелый (инфантильный) период (n = 12); III – 30 сутки постнатального развития – ювенильный период (n = 12); IV – половозрелые животные (4-6 месяцев) (n = 12); V – старые животные (20-24 месяца) (n = 12). Получение крысят с датированным сроком рождения было осуществлено согласно рекомендациям, данным в главе XX справочно-методического пособия «Объекты биологии развития» (Дыбан, 1975).

3.2. Подготовка материала для исследования

Образцы головного мозга крыс фиксировали погружным способом в цинк-этанол-формальдегиде (Коржевский и др., 2013а) в течение 24 часов при комнатной температуре. После фиксации образцы обезживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Проводку материала осуществляли с использованием автоматического устройства подготовки проб для гистологической лаборатории STP-120 Spin tissue processor Microm (Thermo Scientific, Германия) по следующей схеме: 96%-й этанол (первая смена 4 часа, вторая, третья и четвертая смены – по 5 часов каждая), абсолютный спирт (24 часа), смесь абсолютного спирта/ксилола в соотношении 1:1 (5 часов), две смены ксилола (по 5 часов каждая), парафин при температуре 60°C (первая смена – 4 часа, вторая смена – 5 часов). После окончания проводки материал заливали в парафин тип 6 (Richard-Allan Scientific, США). На ротационном микротоме Microm HM 325 (Thermo Scientific, США) изготавливали гистологические срезы толщиной 5 мкм, которые наклеивали на стекла с адгезивным покрытием «Superfrost Ultra Plus»

(Menzel Gläser, Германия) или силанизированные стекла марки Histobond® (Marienfeld, Германия). Для обзорных окрасок применяли стекла (Menzel Gläser, Германия), обработанные специальным адгезивом на основе бычьего сывороточного альбумина (патент RU 2386137 C1).

3.3. Морфологическое исследование головного мозга

3.3.1. Гистологическое исследование

Для обзорной окраски нейронов конечного мозга срезы окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля. Для этого препараты депарафинировали и регидратировали по стандартной методике: со срезов удаляли парафин в двух сменах ксилола (по 10 мин каждая), срезы регидратировали в спиртах нисходящей концентрации (две смены 96% этанола по 5 мин, одна смена 70% этанола – 5 мин) и промывали в дистиллированной воде (5 мин). Затем на срезы наносили раствор толуидинового синего (БиоВитрум, Россия) и оставляли на 7 минут при комнатной температуре. После этого краситель удаляли со срезов, споласкивали их в дистиллированной воде (30 сек) и дифференцировали окраску в 96% этаноле, контролируя процесс под микроскопом. После достижения оптимальной окраски срезы обезвоживали в изопропанолу (в двух сменах по 5 мин), смеси изопропанола и орто-ксилола в соотношении 1:1 (5 мин) и просветляли в орто-ксилолу (в двух сменах по 5 мин) («Вектон», Россия). Полученные препараты заключали в среду Cytoseal 60 (23-244257, Richard-Allan Scientific, США).

3.3.2. Иммуногистохимическое исследование

Изучение распределения глутаматдекарбоксилазы проводили с помощью иммуногистохимического выявления двух изоформ фермента: GAD67 и GAD65. Дополнительно для оценки катехоламинергической иннервации коры и СФО использовали иммуногистохимическую реакцию на тирозингидроксилазу, которая является ферментом синтеза катехоламинов и маркерным белком катехоламинергических структур ЦНС. Популяцию клеток, покрывающих СФО, изучали с применением антител к виментину (маркерный белок эпендимной глиии). Использовали следующие первичные реагенты:

- Кроличьи поликлональные антитела к GAD67 (E10260, Spring Bioscience, США) в разведении 1:600 для световой и 1:300 для флуоресцентной микроскопии
- Кроличьи поликлональные антитела к GAD65 (E3310, Spring Bioscience, США) в разведении 1:1000.

- Кроличьи поликлональные антитела к тирозингидроксилазе (ТГ, ab112, Abcam, Великобритания) в разведении 1:1000 для световой и 1:500 для флуоресцентной микроскопии.
- Мышиные моноклональные (клон V9) антитела к виментину (M0725, Agilent, США) в разведении 1:100.

Для визуализации иммуногистохимической реакции применяли световую и конфокальную лазерную сканирующую микроскопию.

В качестве вторичных реагентов для световой микроскопии использовали козы антигена против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (SPD-015, Spring Bioscience, США). Для визуализации продукта реакции использовали хромоген 3'3-диаминобензидин из набора DAB+ (K3468, Agilent, США). Часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином либо 1% водным раствором альцианового синего 8GX (33864-99-2, Loba Chemie, Индия).

Чтобы получить препараты для исследования на конфокальном сканирующем микроскопе, срезы, после инкубации во вторичных антителах и отмывки в буфере, обрабатывали раствором козых антител против пероксидазы хрена, конъюгированные с флуорохромом Cy3 (123-165-021, Jackson ImmunoResearch, США; рабочее разведение 1:100). Подкраску ядер осуществляли при помощи ДНК-связывающего красителя SYTOX Green (S33025, Invitrogen, США) в разведении 1:100.

Для постановки двойной иммунофлуоресцентной реакции на ТГ и виментин в качестве вторичных реагентов применяли меченный биотином-SP Fab-фрагмент иммуноглобулина осла против иммуноглобулинов мыши (715-067-003, Jackson ImmunoResearch, США) и козы антигена против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (SPD-015, Spring Bioscience, США). После инкубации во вторичных антителах срезы обрабатывали конъюгатом стрептавидина с флуорохромом Cy5 (016-170-084, Jackson ImmunoResearch, США; разведение 1:100), а также раствором козых антител против пероксидазы хрена, конъюгированных с флуорохромом Cy3 (123-165-021, Jackson ImmunoResearch, США; разведение 1:100). Подкраску ядер осуществляли с использованием ДНК-связывающего красителя SYTOX Green в разведении 1:100 (S33025, Invitrogen, США).

3.3.3. Процедура иммуногистохимического окрашивания для световой микроскопии

Препараты депарафинировали по стандартной методике и подвергали тепловому демаскированию в модифицированном цитратном буфере (S1700, Agilent, США) в течение 22 мин. Буфер для демаскирования предварительно нагревали в термостате до 60°C. Проводили ингибирование эндогенной пероксидазы путем обработки срезов 3%-ным водным раствором перекиси водорода в течение 10 мин. Для блокировки неспецифического связывания вторичных антител на препараты наносили необходимое количество блокировочного раствора (Protein block DP-125, Spring Bioscience, США) и оставляли при комнатной температуре на 10 мин. Затем со срезов удаляли излишки блокировочного раствора и, не промывая препараты, наносили раствор первичных антител, помещали во влажные камеры и инкубировали при температуре 27°C от 12 часов (при реакции на ТГ) до 3-х суток (при постановке реакции на GAD65 и GAD67).

После инкубации в первичных антителах и промывания срезов в фосфатно-солевом буфере (PBS), на срезы наносили антикроличьи вторичные реагенты, конъюгированные с полимером и пероксидазой хрена для связывания соответствующих первичных антител. Инкубацию проводили во влажных камерах в термостате при 27°C в течение 25 мин. Визуализацию продукта иммуногистохимической реакции проводили с использованием хромогена 3'3'-диаминобензидинтетрагидрохлорида из набора DAB+ (K3468, Agilent, США). Контроль образования окрашенного продукта реакции осуществляли под микроскопом. При достижении оптимальной окраски со срезов смывали хромоген при помощи 3%-го раствора пероксида водорода и промывали препараты в дистиллированной воде (2 смены по 5 мин). Часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином (Бiovитрум, Россия) в течение 40-60 сек, после чего промывали в слабощелочной воде (100 мкл 10%-го раствора аммиака на 100 мл дистиллированной воды). Часть срезов подкрашивали альциановым синим. Для этого срезы размещали во влажной камере, наносили на них раствор красителя и ставили в термостат 40°C на 40 минут. Препараты промывали от красителя в дистиллированной воде, обезвоживали в изопропанолу и просветляли в орто-ксилолу стандартным способом. Закрывали препараты в перманентную среду Cytoseal 60.

Контроль использованных в работе антител осуществляли следующим образом. В качестве положительного контроля антигена при постановке иммуногистохимических реакций на GAD65 и GAD67 были использованы препараты мозжечка крысы, для нейронов которых

хорошо известна локализация этого белка (Greif et al., 1991). В качестве положительного контроля при выявлении катехоламинергических структур были использованы препараты промежуточного мозга крысы на уровне черной субстанции (Rabeu, Nefti, 1990). Для постановки отрицательного контроля антител на один из срезов обрабатываемой серии препаратов вместо раствора первичных антител наносили раствор для разведения антител Antibody Diluent (Spring Bioscience, США).

3.3.4. Процедура иммуногистохимического окрашивания для конфокальной микроскопии

В настоящем исследовании высокочувствительные методы конфокальной лазерной микроскопии конфокальная применялись с целью изучения синаптических терминалей ГАМК-ергических клеток, выявления тонкой организации иммуноположительных волокон и/или тел клеток, а также изучения пространственных отношений нервных волокон и глиальных клеток (эпендимной глиии и/или таницитов).

Для ИГХ исследования с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа препараты депарафинировали и регидратировали по общепринятой методике. Затем проводили демаскирование антигена в, предварительно нагретом до 60°C, модифицированном цитратном буфере (S1700, Agilent, США), в пароварке в течение 24 мин. Путем обработки срезов последовательно 3%-м водным раствором перекиси водорода и блокировочным раствором (Protein block DP-125, Spring Bioscience, США), при комнатной температуре в течение 10 мин, проводили блокировку эндогенной пероксидазы и неспецифического связывания антител соответственно. Со срезов удаляли излишки блокировочного раствора и, не промывая препараты, наносили раствор первичных антител (для постановки монореакции), либо смесь (в соотношении 1:1) растворов двух первичных антител (для двойного иммуноокрашивания). Препараты инкубировали во влажной камере в термостате при 27°C в течение 3-х (при постановке монореакции) либо 4-х (при двойном иммуномечении) суток.

Для выявления кроличьих первичных антител использовали козы вторичные антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System. В случае постановки двойного иммуноокрашивания на срезы наносили смесь (1:1) Fab-фрагмента антимышиного иммуноглобулина осла, меченного биотином-SP, и козых антикроличьих антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Во вторичных реагентах препараты инкубировали 30 минут (при монореакции) или 3,5 часа (в случае двойной реакции) во влажной камере в термостате при температуре 27°C. Для

выявления антител с пероксидазной меткой на срезы, после промывки в PBS, наносили козьи антитела против пероксидазы хрена, конъюгированные с флуорохромом Cy3. При постановке двойной иммунофлуоресцентной реакции на срезы наносили смесь из антител против пероксидазы хрена и конъюгата стрептавидина с флуорохромом Cy5 (для выявления биотинилированных антител) в соотношении 1:1. Антитела или смесь антител инкубировали в течение 40 мин в термостате при 27°C. Подкраску ядер осуществляли с помощью флуоресцентного ядерного красителя SYTOX Green в разведении 1:100. Инкубацию проводили 30 мин в термостате при 27°C. Полученные препараты промывали последовательно в двух сменах PBS (5 мин), после чего обезвоживали в изопропанол (2 смены по 30 сек), смеси изопропанола и орто-ксилола 1:1 (30 сек) и просветляли в орто-ксилоле (2 смены по 30 сек). Препараты заключали в перманентную среду Cytoseal 60.

3.4. Фотографирование объектов при микроскопии в проходящем свете и флуоресцентной микроскопии

Анализ и фотографирование полученных гистологических препаратов проводили на световом микроскопе Leica DM750 (Германия), оснащенный фотокамерой ICC50 (Leica, Германия). Применяли программу захвата и анализа изображений LAS EZ (Leica, Германия).

Исследование флуоресцентно окрашенных препаратов проводили с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM800 (Zeiss, Германия), оснащенного системой Airyscan. Для возбуждения флуоресценции SYTOX Green применяли лазер с длиной волны 488 нм, для Cy3 – 561 нм, Cy5 – 640 нм. Использовали объективы Plan-Apochromat 20×/0.8 M27 и Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DICM27 (масляная иммерсия). Обработку полученных изображений проводили в программе Zen 3 (Carl Zeiss AG, Германия).

3.5. Морфометрический и статистический анализ

Для анализа возрастной динамики количества ГАМК-ергических клеток в программе Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/>) (Schindelin et al., 2012) проводили подсчет клеток на препаратах, окрашенных иммуногистохимически, и препаратах, окрашенных толуидиновым синим по методу Ниссля, по четырем полям зрения в рамке 270 × 203 мкм на увеличении ×40 для каждого случая. После этого количество GAD67-положительных клеток делили на общее число клеток для вычисления процентного соотношения. Данные представлены в виде средней ± стандартного отклонения.

Площадь, занимаемую катехоламинергическими структурами, оценивали после

разделения каналов (DAB/hematoxylin) с использованием опции «Color Deconvolution» с последующим применением опции «Treshold» и «Measure Particles». Измеряли общую площадь (area), занимаемую телами и/или отростками иммунопозитивных клеток (в квадратных мкм) в рамке 270×203 мкм на увеличении $\times 40$, затем стандартизировали по длине шкалы в 1 мм^2 . Данные представляли в виде среднего значения \pm стандартного отклонения.

Размер пирамидных нейронов и ГАМК-ергических синаптических терминалей оценивали в программе Fiji путем вычисления площади (area) путем применения опции «Treshold» и «Measure Particles». Дополнительно считали плотность распределения синаптических терминалей на единицу периметра пирамидного нейрона (10 мкм). данные представлены в виде среднего \pm стандартного отклонения. Размер синаптических терминалей помимо абсолютных значений оценивали также по медиане и размаху.

Для оценки возрастных изменений распределения GAD67 в области сосудистого сплетения определяли интенсивность флуоресценции красного канала в программах Zen 3 и Fiji на каждом изображении по методике, описанной Шиханом и соавторами (Shihan et al., 2021). Среднюю интенсивность флуоресценции представляли в виде условных единиц яркости пикселей для 8-битных изображений (от 0 до 255). Данные представлены в виде средней \pm стандартное отклонение.

Статистический анализ был выполнен в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США). Проверку данных на соответствие нормальному распределению осуществляли с применением критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения данных, соответствующих нормальному распределению, применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA и апостериорный критерий Тьюки. Данные, несоответствующие нормальному распределению, сравнивали с использованием одностороннего дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса и апостериорного критерия Данна. Для оценки влияния нескольких факторов на измеренные параметры применяли двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA. Распределение считали соответствующим нормальному при $p > 0,05$. Значимым считали различия групп при $p < 0,05$.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1. ГАМК-ергические структуры коры головного мозга крыс в процессе постнатального развития и при старении

4.1.1. Распределение GAD67 в коре головного мозга крыс в процессе постнатального развития и при старении

На препаратах мозга крысы GAD67 выявляется в виде тел отдельных нервных клеток, проксимальных концов их отростков, а также большого количества попавших в плоскость среза ГАМК-ергических синаптических терминалей.

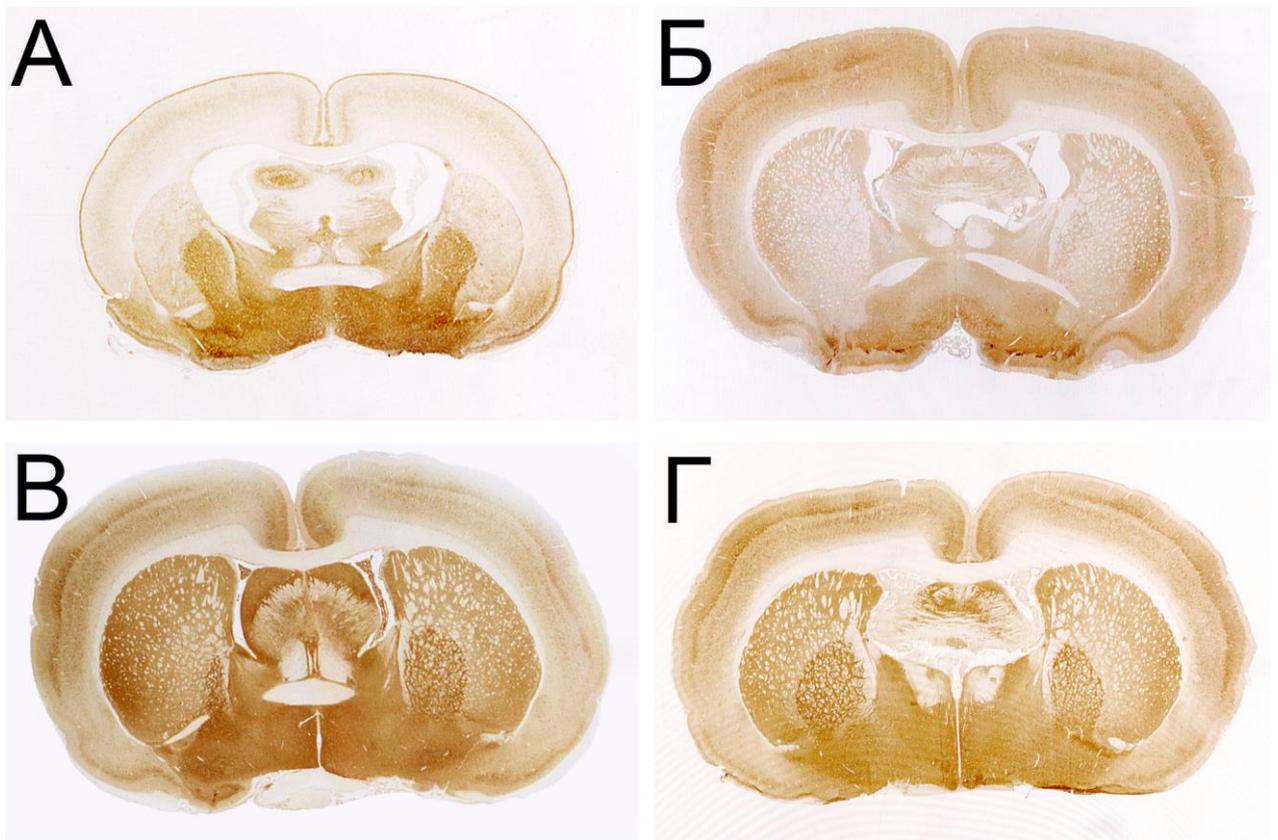


Рисунок 8 – Распределение GAD67-положительных ГАМК-ергических структур в головном мозге на разных сроках постнатального онтогенеза. Иммуногистохимическая окраска на GAD67. а – 7 сутки постнатального развития; б – 30 сутки постнатального развития; в – взрослое животное; г – старое животное.

В ходе основного иммуногистохимического исследования было выявлено, что на 7-е сутки постнатального развития характерно интенсивное окрашивание вентральной области мозга и I слоя неокортекса (**рис. 8а**). Интенсивная окраска I слоя коры обусловлена скоплением большого количества ГАМК-ергических терминалей. Тела ГАМК-ергических интернейронов,

как правило, располагаются в нижележащих слоях (V-VI сенсомоторной и инсулярной). В пириформной коре II-III слои содержат иммунопозитивные клетки. При этом, для I слоя цингулярной области коры характерно присутствие не только синаптических терминалей, но и тел клеток с выраженной цитоплазматической реакцией на GAD67 (**рис. 9б, в**). Тела ГАМК-ергических нейронов разнообразны по своим формам и размерам, преобладают веретеновидные и грушевидные клетки. Содержание ГАМК-ергических клеток в коре невелико и составляет около 7 % ($6,96 \pm 0,42\%$). Несмотря на наличие GAD67-положительных терминалей аксонов, выявляемых во всех структурах мозга к концу первой недели постнатального развития, на этом сроке не наблюдаются сформированные ГАМК-ергические аксосоматические пресинаптические окончания на интернейронах.

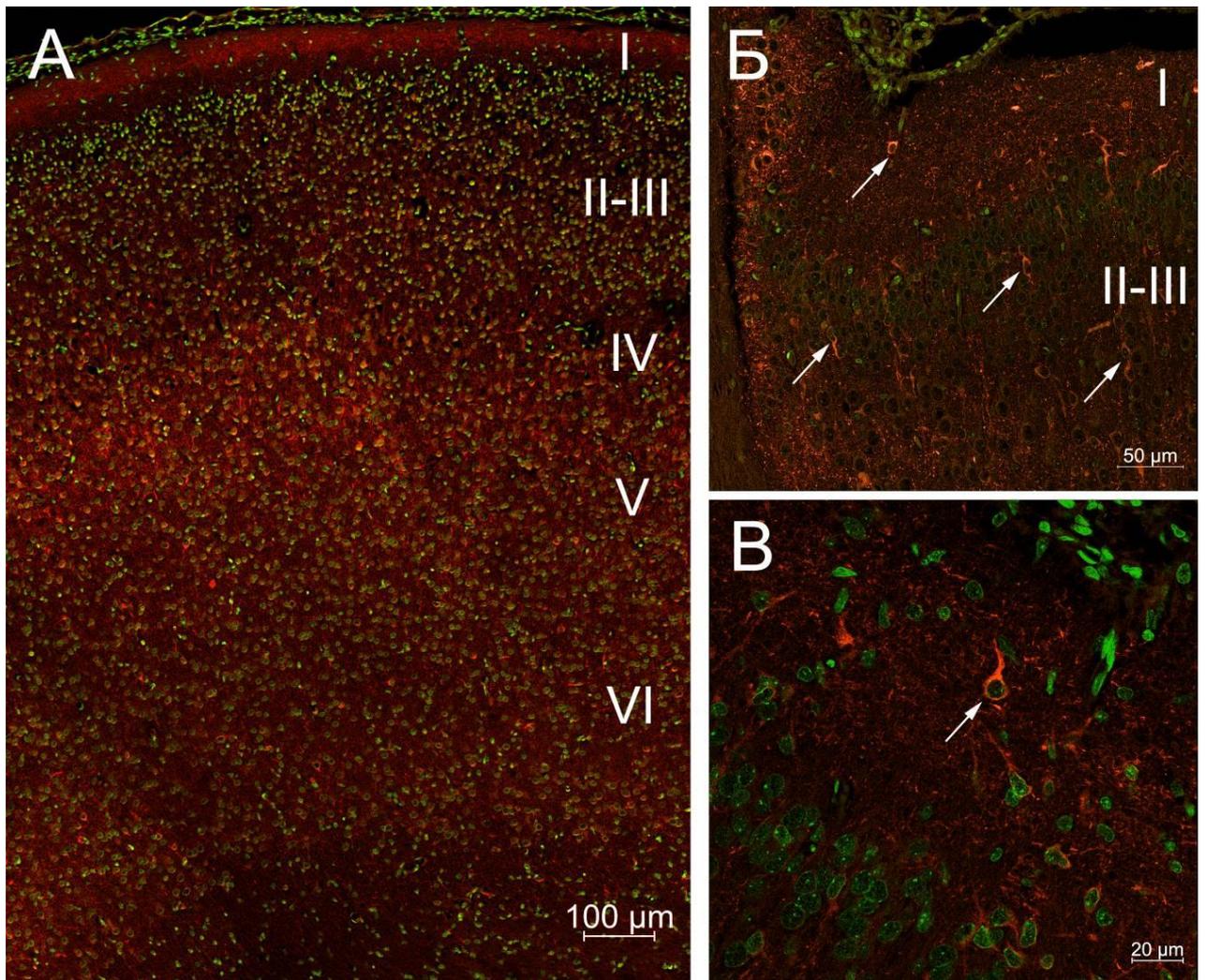


Рисунок 9 – GAD67 в коре крыс к концу первой недели постнатального развития. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 (красный) с подкраской ядер SytoxGreen (зеленый). а – сенсомоторная область коры; б – цингулярная область коры; в – цингулярная область коры,

первый слой. Стрелки указывают на ГАМК-ергические интернейроны.

При исследовании препаратов на большом увеличении было показано, что фермент распределен равномерно по цитоплазме перикариона нейронов, а отростки клеток не выявляются или прослеживаются только на небольшом расстоянии (примерно 10-15 мкм) от тела клетки. Несмотря на то, что GAD67 не выявляется в ядре, в различных отделах головного мозга отмечали клетки с выраженными ядерными инвагинациями, которые отчетливо выявляются с помощью иммуногистохимической реакции на GAD67 (см. рис. 12). Такие клетки немногочисленны, чаще всего наблюдаются в средних слоях цингулярной и инсулярной коры.

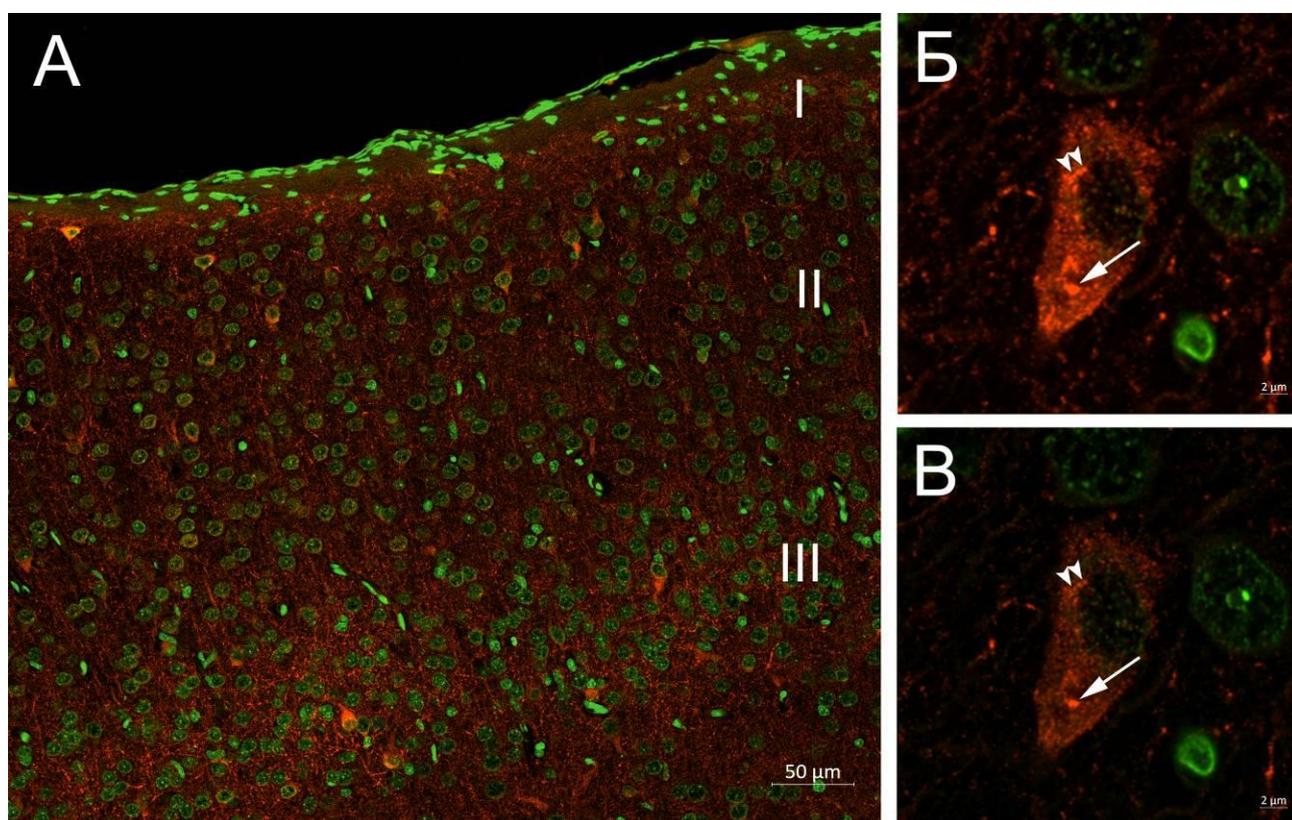


Рисунок 10 – Распределение GAD67 в коре 14-дневных крыс. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 (красный) с подкраской ядер SytoxGreen (зеленый). а – сенсомоторная область коры; б – ГАМК-ергический интернейрон коры; в – ГАМК-ергический интернейрон коры, технология Airyscan. Стрелки указывают на дискретные скопления GAD67 в цитоплазме клетки, двойные стрелки – на скопления вокруг ядра.

В коре головного мозга животных к концу второй недели постнатального развития наблюдали незначительное визуальное снижение интенсивности реакции в области I слоя по сравнению с P7. В большинстве зон коры иммуноокрашивание позволяет выявить слои (в

частности, III слой, который выделяется на препаратах благодаря интенсивной окраске). В инсулярной, двигательной и в дисгранулярной соматосенсорной коре отсутствует четкое послойное распределение фермента. Число GAD67-содержащих нейронов составляет $5 \pm 1,14\%$ клеток коры. В I слое сенсомоторной коры можно отметить наличие довольно мелких ГАМК-продуцирующих клеток (см. рис. 11), расположенных горизонтально в пределах слоя. В коре встречаются клетки с треугольной, овальной или круглой формой сомы, отростки которых на светооптическом уровне неразличимы. Веретеновидные интернейроны коры представляют собой типичные биполярные нейроны. Грушевидные клетки формируют, как правило, один крупный отросток, ветвящийся надвое на некотором отдалении от сомы (порядка 10 мкм). В цитоплазме клеток GAD67 распределен диффузно, с формированием округлых дискретных скоплений вокруг ядра (рис. 10б, в).

На 30-е сутки постнатального развития проявляется четкая слоистость распределения GAD67, обусловленная интенсивным окрашиванием синаптических окончаний ГАМК-ергических интернейронов, сконцентрированных на телах и отростках пирамидных клеток III и V слоя. Для инсулярной зоны коры характерна слабая окраска при сохранении ламинарности распределения GAD67. Скопления ГАМК-ергических терминалей в I слое коры, характерного для 7-х и, частично, 14-х постнатальных суток, на этом сроке не наблюдается. Как и на предыдущем сроке, в этом слое коры можно наблюдать мелкие, горизонтально расположенные GAD67-содержащие клетки с сомой овальной или вытянутой формы. Дополнительно в области сенсомоторной коры на P30 можно выделить популяцию клеток с треугольными перикарионами, расположенных непосредственно под мягкой мозговой оболочкой (рис. 11б). Подобная локализация характерна и для некоторых GAD67-содержащих нейронов цингулярной коры. Форма их перикариона варьирует: встречаются не только треугольные, но также овальные и круглые клетки. В подлежащих областях коры также располагаются разнообразные по своим формам и размерам тела GAD67-положительных нейронов. Для этого срока характерно наибольшее процентное содержание ГАМК-ергических интернейронов коры (one-way ANOVA, $F=18,54$, $P<0,0001$, post-hoc критерий Тьюки $P<0,0001$), которое составляет $15,22 \pm 3,08\%$ (рис. 14). На телах интернейронов впервые выявлены синаптические окончания. Сохраняется как формирование ферментом шарообразных скоплений вблизи ядерной мембраны клеток, так и ядерные инвагинации интернейронов, хорошо контрастирующиеся с помощью ИГХ реакции (рис. 12).

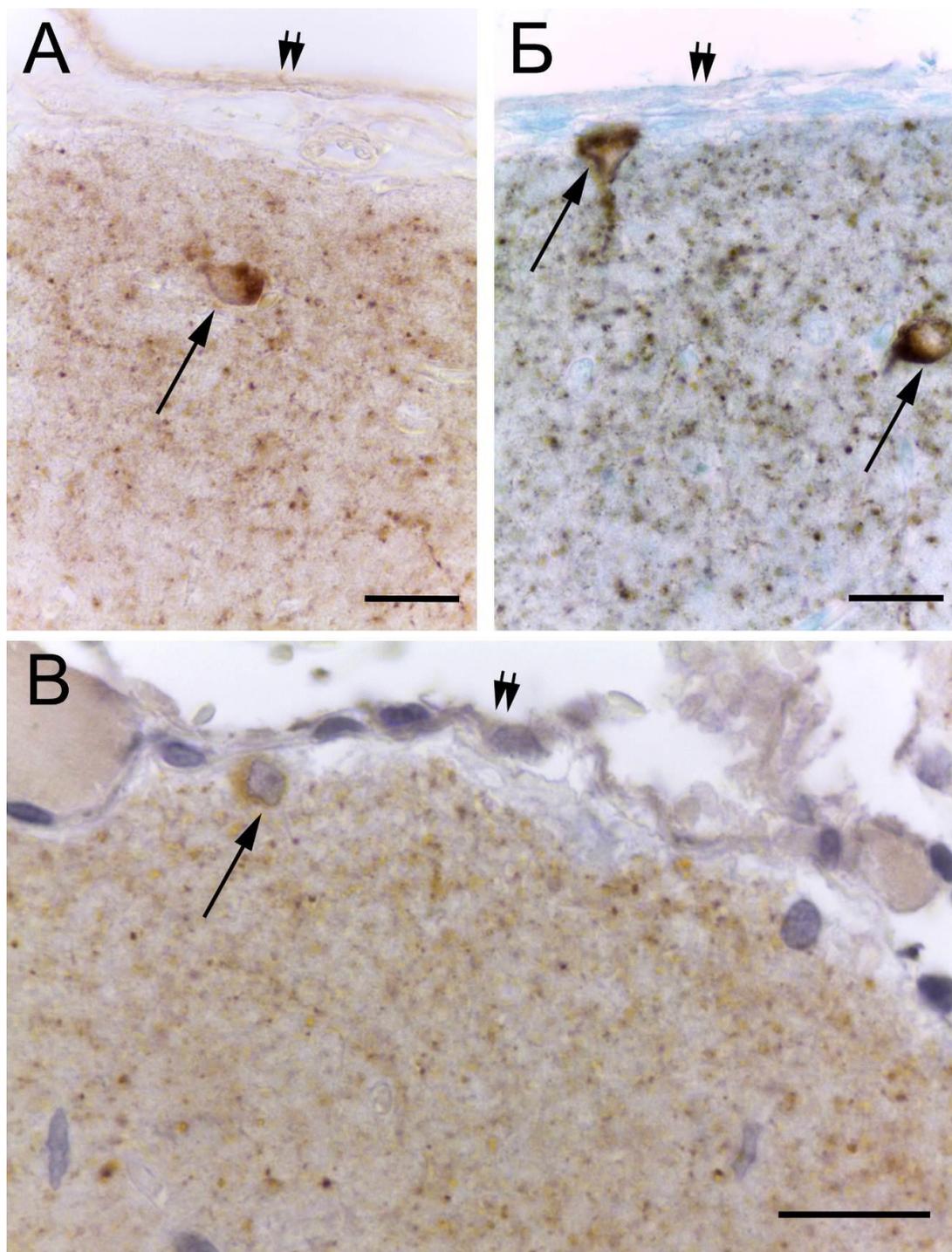


Рисунок 11 – ГАМК-ергические нейроны первого слоя коры. Иммуногистохимическая окраска на GAD67. а – 14 сутки постнатального развития, первичная двигательная кора; б – 30 сутки постнатального развития, первичная двигательная кора, подкраска альциановым синим; в – взрослое животное, цингулярная кора, подкраска гематоксилином. Стрелки указывают на GAD67-содержащие клетки, двойные стрелки отмечают оболочки мозга. Масштабный отрезок – 20 мкм.

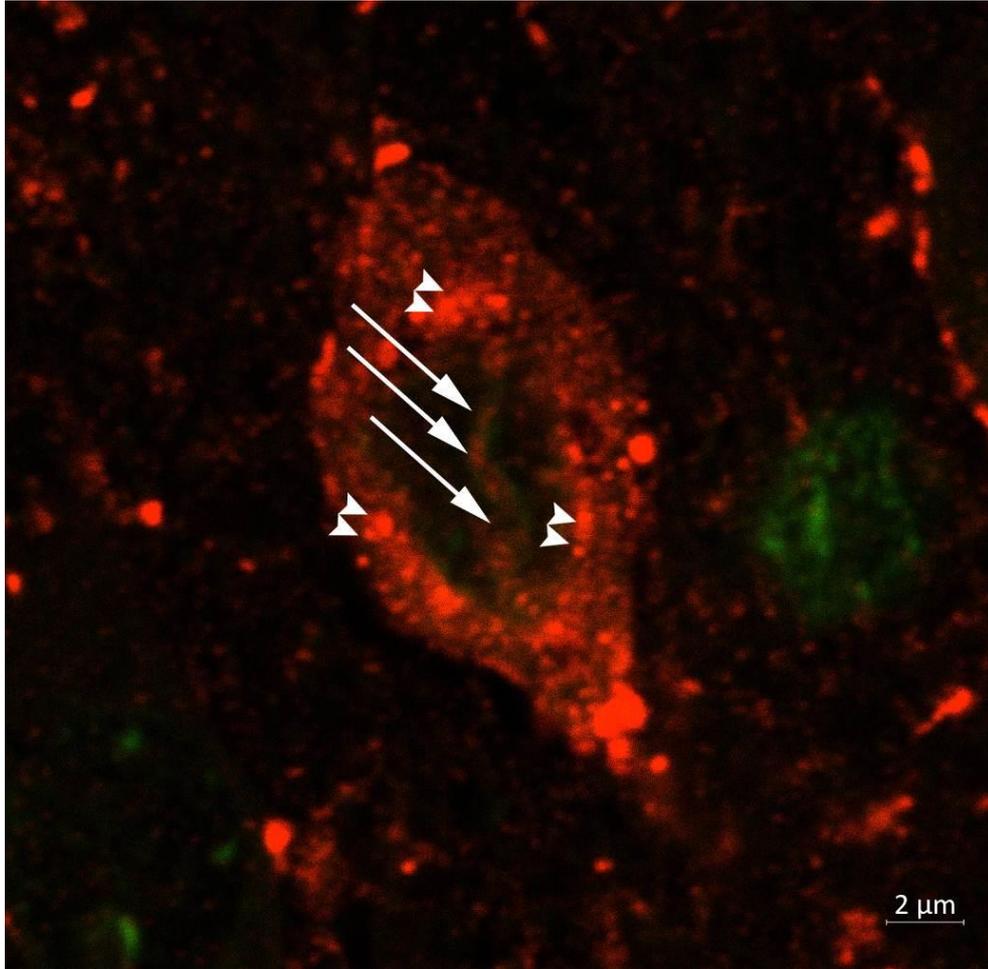


Рисунок 12 – Особенности цитоплазматического распределения GAD67 в корковом интернейроне 30-дневных крыс. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 (красный) с подкраской ядер SytoxGreen (зеленый). Стрелки указывают на контурируемую GAD67 ядерную инвагинацию, двойные стрелки – на дискретные скопления вокруг ядра.

В коре половозрелых животных (5-6 месяцев), подобно 30-дневным, GAD67 имеет четкую ламинарность распределения и наиболее интенсивно выявляется в II-III и V слоях. Интенсивность реакции на GAD67 в II-III и V слоях коры обусловлена большой концентрацией ГАМК-ергических синаптических терминалей на телах пирамидных нейронов этих слоев (**рис. 13**). В нейропиле I и IV слоев коры ГАМК-ергические терминали расположены с меньшей плотностью. Высокой интенсивностью окрашивания отличается цингулярная (в особенности, область пояса) и сенсомоторная зоны коры, остальные области коры, за исключением инсулярной, дающей слабую реакцию, характеризуются средней интенсивностью. Тела GAD-иммунопозитивных клеток разнообразны по своим размерам и формам. Выявляются веретеновидные, звездчатые, треугольные, овальные и круглые нейроны. Доля тормозных интернейронов резко падает по сравнению с предыдущим сроком и в среднем составляет $7,22 \pm$

2,46% (one-way ANOVA, $F=18,54$, $P<0,0001$, post-hoc критерий Тьюки $P<0,0001$). Наибольшая концентрация тел нейронов I слоя определяется в инсулярной и цингулярной коре. В этих же зонах отмечали слабоокрашенные клетки овальной или веретеновидной формы, прилегающие к мягкой мозговой оболочке (рис. 11в). В области пояса располагаются как слабоокрашенные клетки, так и клетки с интенсивной реакцией на GAD67 (рис. 14). Распределение GAD67 в цитоплазме клеток диффузное, однако, вокруг ядра можно наблюдать кольцо интенсивно окрашенного продукта реакции.

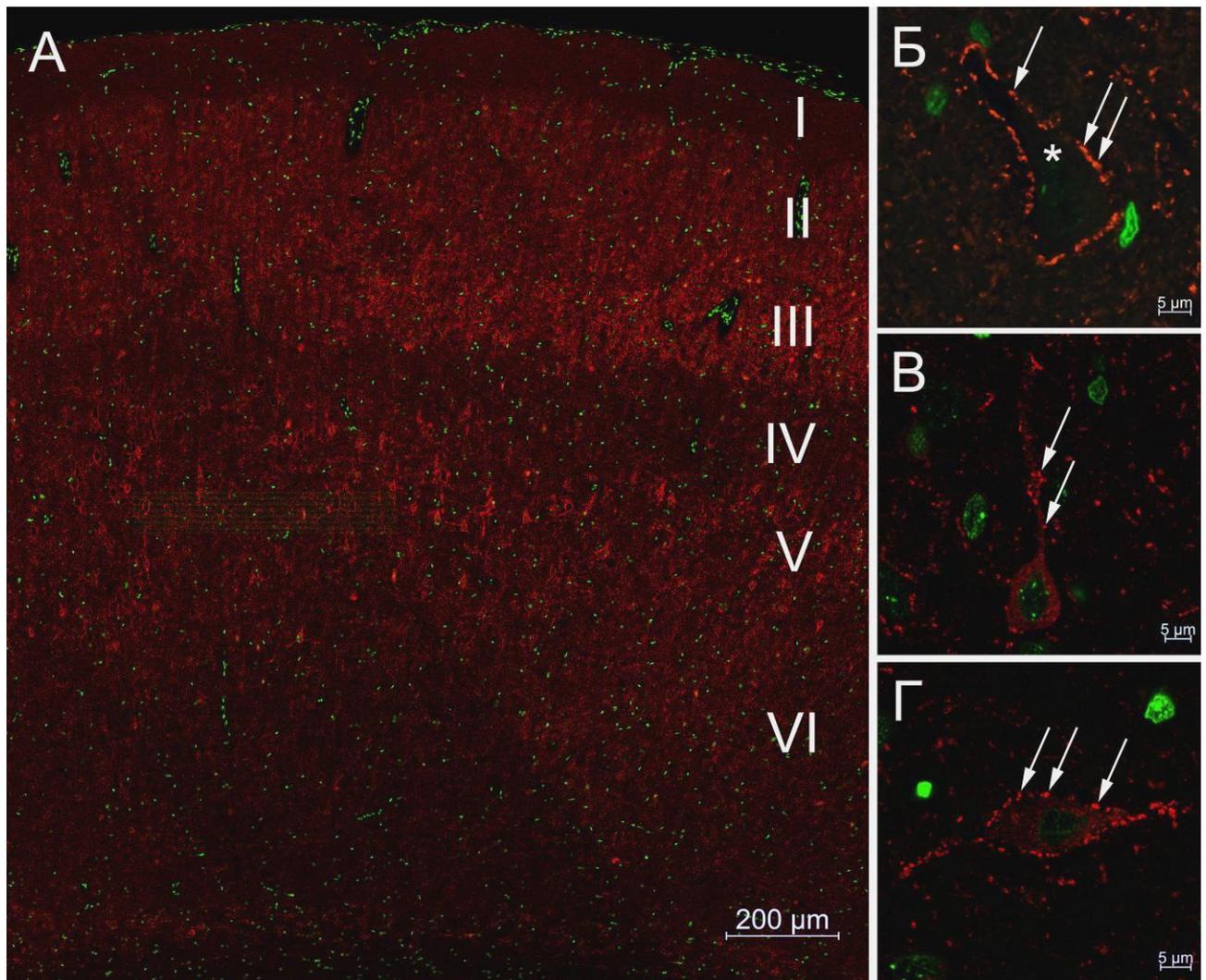


Рисунок 13 – GAD67 в сенсомоторной области коры взрослых животных. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 (красный) с подкраской ядер SytoxGreen (зеленый). а – общий вид; б – пирамидный нейрон; в – грушевидный интернейрон; г – веретеновидный горизонтальный интернейрон. Стрелки указывают на ГАМК-ергические синаптические терминали, звездочка – пирамидный нейрон.

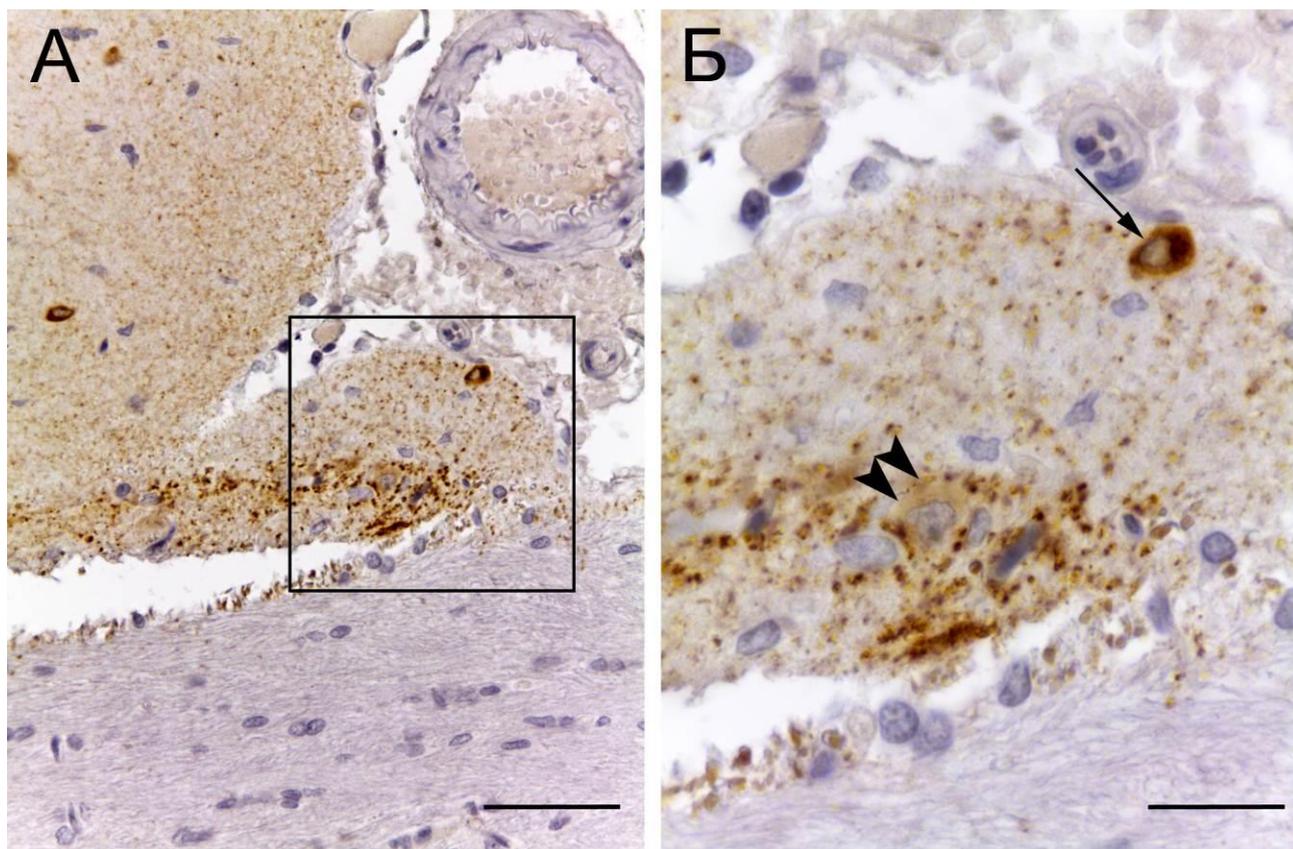


Рисунок 14 – ГАМК-ергические нейроны пояса у взрослых животных. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 с подкраской гематоксилином. а – цингулярная кора и область пояса; б – область пояса, большое увеличение. Рамка ограничивает область интереса, стрелка указывают на клетку с интенсивной реакцией на GAD67, двойная стрелка – клетку со слабой реакцией. Масштабные отрезки: 50 мкм (а), 20 мкм (б).

У старых крыс (23-24 месяца), также как у P30 и взрослых животных, распределение фермента проявляет чёткую ламинарность с максимальной интенсивностью в II-III и V слоях и минимальной в IV и VI (**рис. 8г**). Сохраняется различная интенсивность окрашивания областей коры, характерная для более ранних сроков (P30, половозрелые животные), а именно: высокоинтенсивная окраска в цингулярной и сенсорной областях, окраска средней интенсивности двигательной и пириформной областей, слабая окраска инсулярной зоны коры. Наименьшая концентрация GAD-содержащих синаптических бутонов определяется в I слое и нижней части VI слоя, на границе с белым веществом мозолистого тела. Распределение ГАМК-ергических синаптических терминалей и тел нейронов у старых животных подобно описанному у половозрелых крыс, однако имеет место визуальное снижение интенсивности реакции по сравнению с предыдущими сроками. Средняя доля GAD67-иммунореактивных клеток в коре составляет $7,96 \pm 1,95\%$ и не показывает статистически достоверных различий со всеми

исследуемыми сроками постнатального развития кроме P30 (one-way ANOVA, $F=18,54$, $P<0,0001$, post-hoc критерий Тьюки $P<0,0001$).

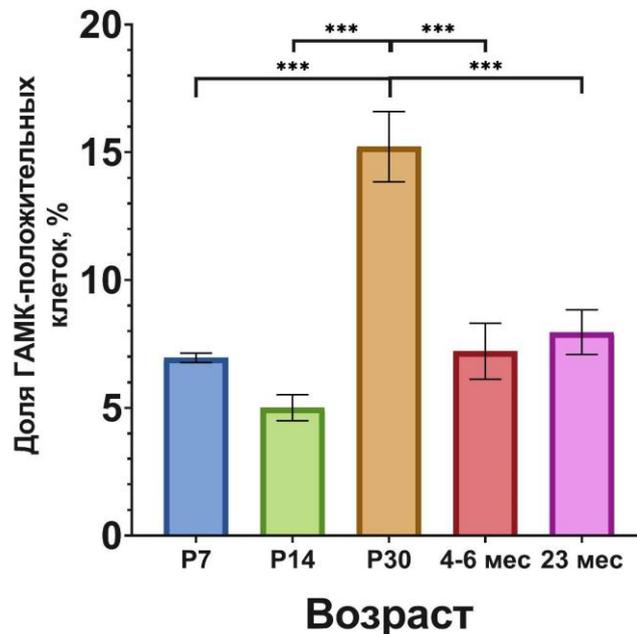


Рисунок 15 – Возрастная динамика изменения доли ГАМК-ергических клеток в исследуемых областях мозга. P7, P14, P30 – 7-е, 14-е и 30-е постнатальные сутки соответственно. P-value: * – $<0,05$; ** – $<0,01$; *** – $<0,001$.

4.1.2. Распределение GAD65 в коре головного мозга крыс в процессе постнатального развития и при старении

В результате проведенной обработки на препаратах отчетливо выявляются GAD-положительные синаптические терминалы.

В коре 7-дневных животных содержание GAD65 незначительно. В большинстве зон окраска слабая, умеренной интенсивностью реакции отличается только I слой инсулярной, пириформной и цингулярной коры. I слой соматосенсорной коры окрашен неравномерно: небольшое скопление ГАМК-ергических терминалов в поверхностной части слоя сменяется единичными или полным отсутствием синаптических бутонов в подлежащей части слоя. Единичные синаптические терминалы выделяются в нижележащих слоях по всему объему коры так, что невозможно выделить отдельные слои.

У 14-дневных крыс GAD65 с умеренной интенсивностью окрашивал I слой кортекса, III и VI слои соматосенсорной, нижние слои инсулярной коры и область пояса. Небольшое количество GAD65-иммунопозитивных клеток на этом сроке можно найти по всему объему

коры (**рис. 16**). В отличие от довольно интенсивной реакции на GAD67, перикарионы клеток дают слабую цитоплазматическую реакцию на GAD65. Присутствие таких нейронов характерно для всех слоев коры, и в основном их отмечали в II-V слоях соматосенсорной и двигательной, VI слое инсулярной и цингулярной, II слое пириформной коры. К концу первого месяца постнатального онтогенеза GAD65-положительные клетки в коре встречаются редко, не чаще 1-2 на срез. Обычно их регистрировали в инсулярной коре и в прилежащих к ней зонах вторичной соматосенсорной коры. При этом, иммунопозитивные нейроны различаются по интенсивности: на срезах присутствуют клетки с интенсивной цитоплазматической реакцией на GAD65 и слабоокрашенные клетки (**рис. 17**).

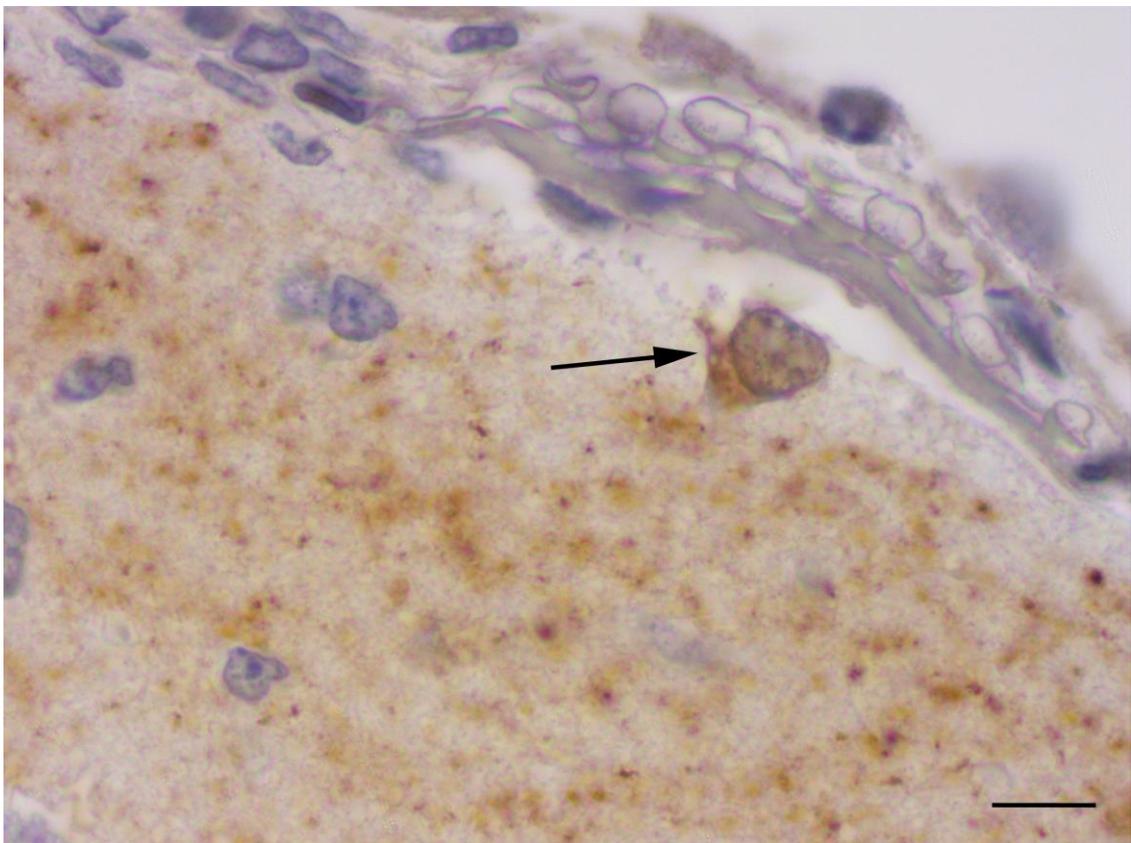


Рисунок 16 – Первый слой неокортекса 14-дневных крыс. Иммуногистохимическая окраска на GAD65 с подкраской гематоксилином. Стрелка указывает на клетку с цитоплазматической реакцией на GAD65. Масштабный отрезок – 10 мкм.

Распределение GAD65 в коре половозрелых животных имеет свои региональные особенности. На малом увеличении эта изоформа кажется равномерно распределенной по всем зонам серого вещества коры с усиленной реакцией в I слое. На большом увеличении можно заметить, что в цингулярной области коры дополнительно выделяется полоска интенсивной иннервации нейронов III слоя. Частичное усиление интенсивности окрашивания в III и V слое

выявляли в двигательных и соматосенсорных областях неокортекса. В инсулярной коре реакция на фермент четко выделяет I слой, практически исчезает в подлежащих слоях, и снова усиливается в VI, а для пириформной коры послойное снижение интенсивности GAD65-положительной ГАМК-ергической иннервации происходит по градиенту снаружи-внутри. Единичные клетки с положительной цитоплазматической реакцией на GAD65 локализованы в области пояса. В отличие от GAD67, изоформа GAD65 формирует округлые скопления по всему объему перикариона (**рис. 18**).

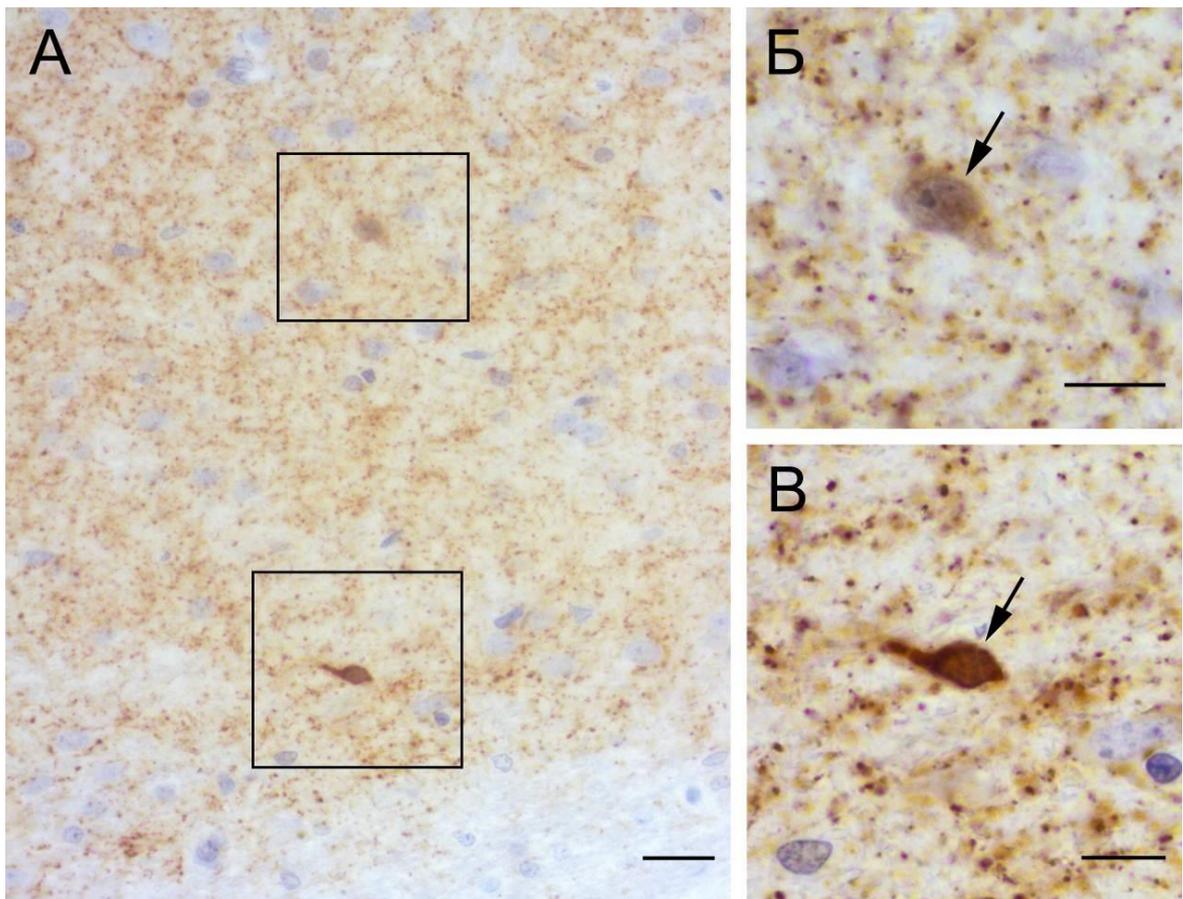


Рисунок 17 – Клетки с цитоплазматической реакцией на GAD65 у 1-месячных крыс. Иммуногистохимическая окраска на GAD65 с подкраской гематоксилином. а – нижние слои вторичной двигательной коры. Рамки ограничивают области, представленные на б, в; б – клетка со слабой реакцией на GAD65, в – клетка с интенсивной реакцией на GAD65. Стрелки указывают на GAD65-иммунопозитивные клетки. Масштабные отрезки: 20 мкм (а), 10 мкм (б, в).

При старении общая интенсивность ИГХ окрашивания снижается так, что с использованием одного этого метода невозможно выделить отдельные слои коры. Область пояса, характеризующаяся достаточно сильной реакцией на предыдущих сроках, у старых

животных не контурируется с помощью реакции на GAD65.

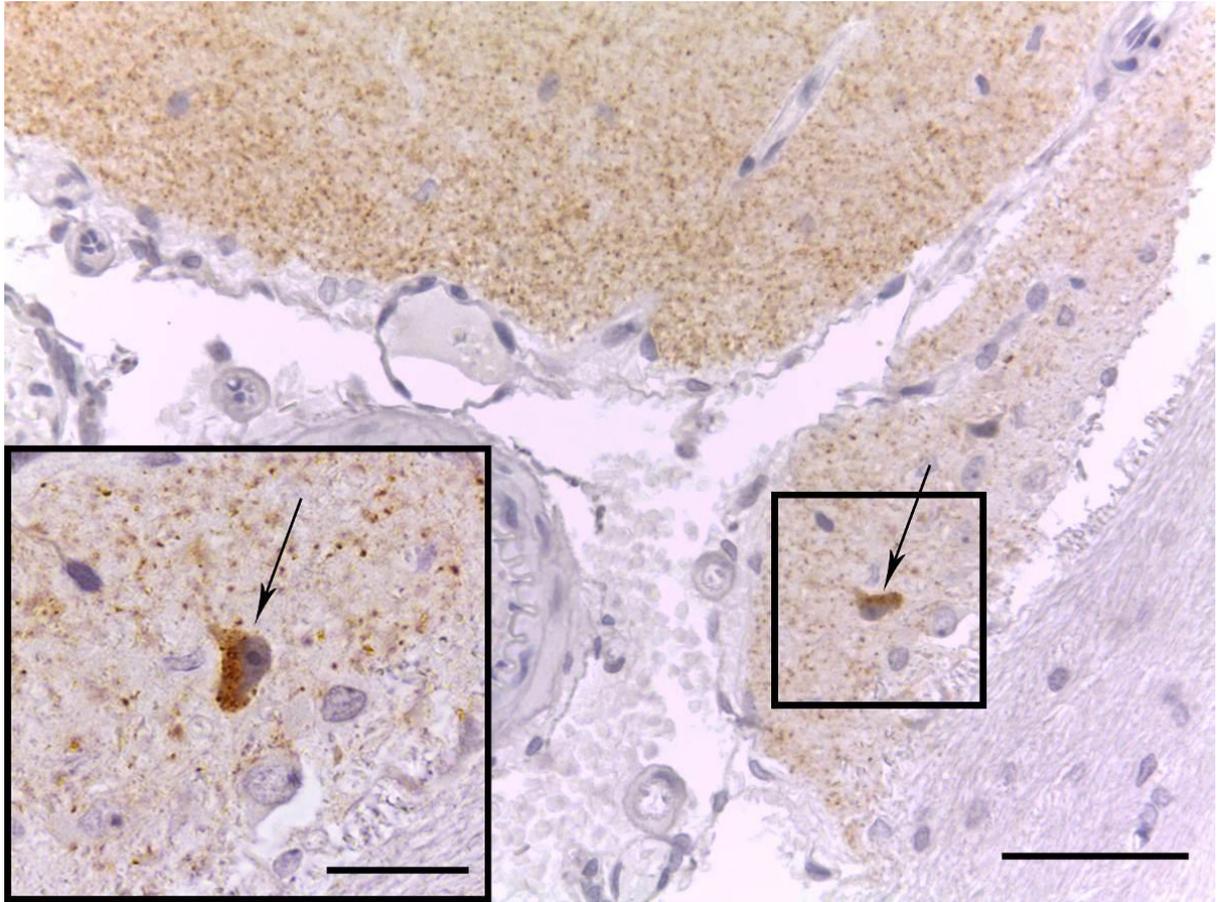


Рисунок 18 – Цингулярная кора и область пояса половозрелых крыс. Иммуногистохимическая окраска на GAD65 с подкраской гематоксилином. Стрелки указывают на иммунопозитивные клетки, выноска – увеличенный фрагмент области пояса, содержащий GAD65-положительную клетку. Масштабные отрезки: 50 мкм, 20 мкм (вставка).

4.1.3. Тирозингидроксилаза в коре головного мозга крыс в постнатальном онтогенезе и при старении

В слоях неокортекса на 7-е постнатальные сутки распределены редкие ТГ-иммунореактивные волокна. В первом слое коры они представлены, в основном перерезанными поперек отростками нейронов (**рис. 19**). В нижележащих слоях расположены тонкие волокна с четкообразными утолщениями. Отдельные волокна могут прослеживаться на небольшом расстоянии в толще нейропиля. Плотность их распределения неравномерна в различных слоях коры: наиболее высокая в верхних и нижних слоях, низкая – в средних. В шестом слое коры содержится большое количество горизонтальных катехоламинергических волокон. Область пояса и первый слой цингулярной коры заполнены крупными, перерезанными поперек,

интенсивно окрашенными отростками.

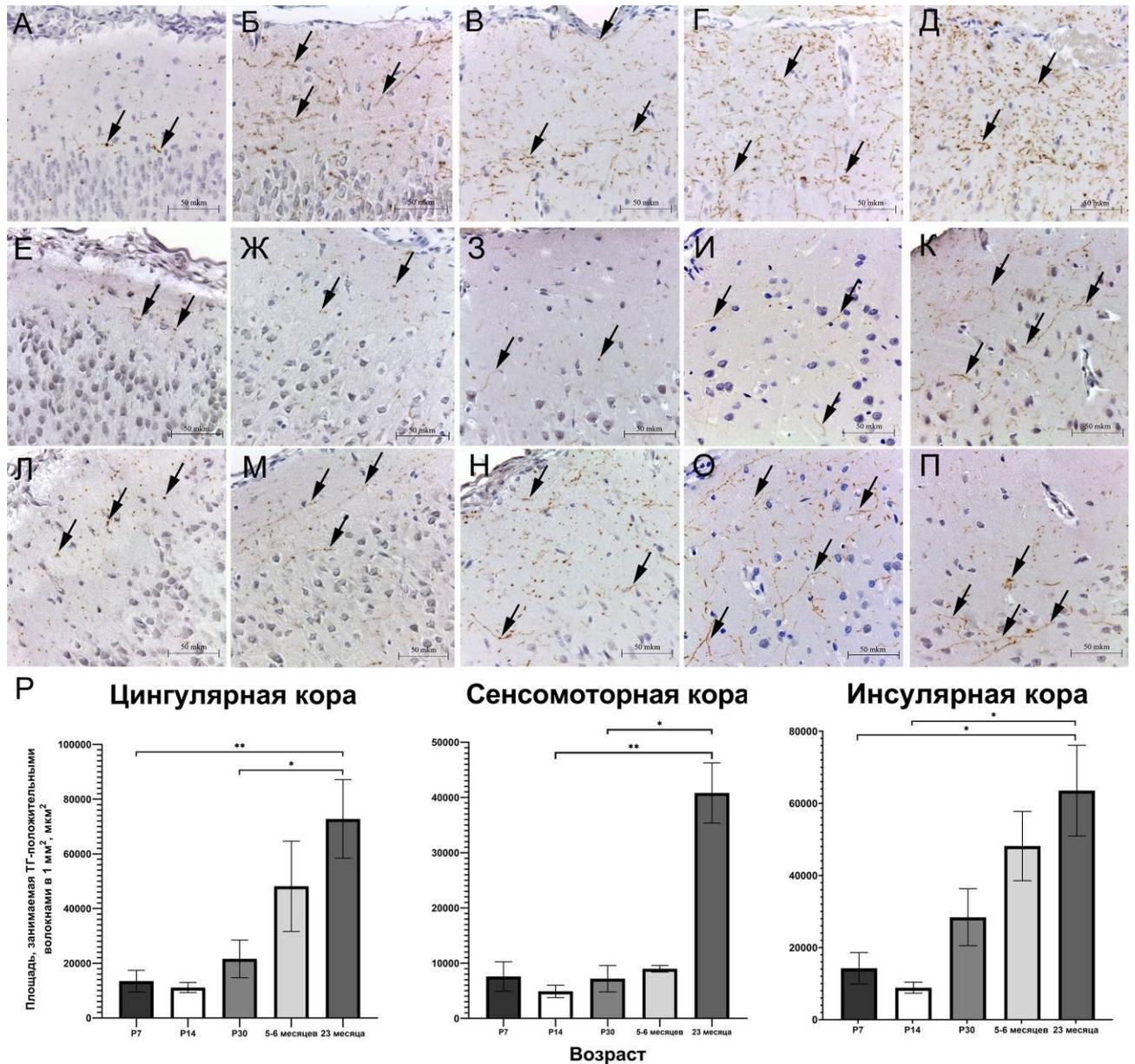


Рисунок 19 – Морфологические изменения, происходящие с ТГ-положительными волокнами в области цингулярной (а-д), сенсомоторной (е-к) и инсулярной (л-п) коры в ходе постнатального онтогенеза и при старении. Иммуногистохимическая окраска на ТГ с подкраской гематоксилином. а, е, л – 7-е сутки постнатального развития; б, ж, м – 14-е сутки постнатального развития; в, з, н – 30-е сутки постнатального развития; г, и, о – половозрелое животное; д, к, п – старое животное; р – динамика изменения плотности распределения ТГ-положительных волокон коры в ходе постнатального онтогенеза и при старении. Стрелки указывают на катехоламинергические волокна. P7, P14, P30 – 7-е, 14-е, 30-е сутки постнатального развития соответственно. P-value: * – <0.05; ** – <0.01. Масштабный отрезок:

50 мкм.

Помимо отростков, в коре могут располагаться единичные тела катехоламинергических нейронов. Это довольно крупные клетки овальной или звездчатой формы, от сомы которых отходит один ветвящийся отросток. Наиболее часто они встречаются в VI слое вторичной двигательной области сенсомоторной коры и в пириформной коре (рис. 20а, б).

К 14-м и далее, к 30-м постнатальным суткам незначительно возрастает интенсивность реакции за счет усиления ветвления ТГ-положительных отростков в пределах коры. В первом слое цингулярной коры волокна активно ветвятся, однако, их ветви в большинстве случаев не выходят за пределы слоя. Данное наблюдение неприменимо для вертикально направленных редковетвящихся волокон III-V слоев, которые могут проходить через несколько слоев коры. В VI слое и поясе наблюдали в основном перерезанные поперёк волокна с высокой интенсивностью иммуногистохимической реакции. Варикозные расширения ТГ-содержащих отростков у животных P14 хорошо выделяются на фоне тонких волокон. Плотность волокон в сенсомоторной коре по сравнению с остальными изучаемыми отделами коры кажется низкой, но это различие не достигает уровня статистической значимости (Kruskal-Wallis test, post-hoc критерий Данна $P=0,06$, $N=5,360$ для P14 и $P=0,07$, $N=5,040$ для P30). В прилегающем к белому веществу VI слое интенсивность реакции возрастает за счет наличия в нем умеренного количества горизонтальных волокон. Как и у 7-дневных животных, на срезах головного мозга крыс P14 и P30 четко выделяется инсулярная кора. Для ее первого слоя характерно наличие поперечноперерезанных отростков катехоламинергических клеток. В отличие от области поясной коры, длинных ветвящихся волокон в первом слое почти не встречается. Средние слои инсулярной коры заполнены большим количеством тонких сильноветвящихся волокон. В основном эти ветви не выходят за пределы своих слоев. Для инсулярной и цингулярной областей коры на этом сроке характерна примерно одинаковая интенсивность послойного распределения ТГ-иммунопозитивных волокон.

В нижележащих слоях (V, VI) неокортекса 14-дневных крыс располагаются единичные ТГ-содержащие клетки. Эти клетки, как и на сроке P7, имеют овальную или звездчатую форму с одним, либо несколькими тонкими отростками (рис. 20в). ТГ-иммуноположительные нейроны у 30-дневных животных не наблюдали.

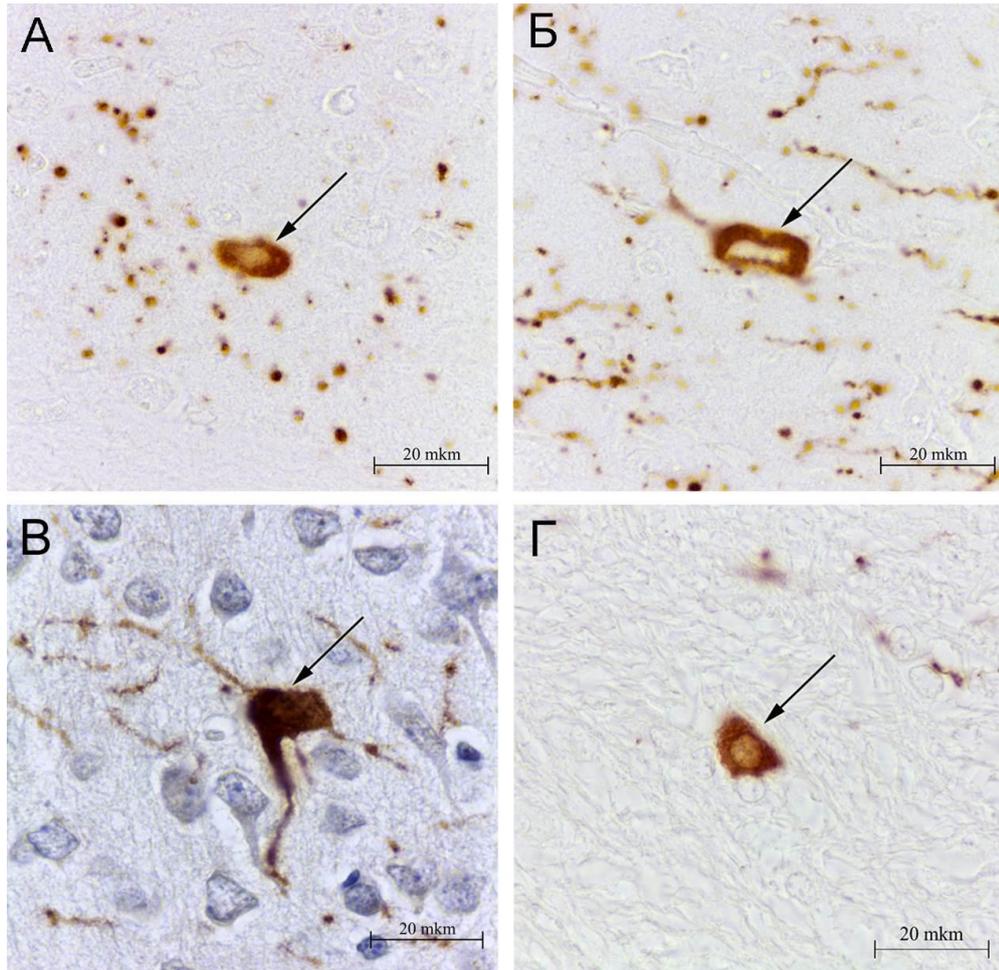


Рисунок 20 – ТГ-иммунопозитивные клетки в коре головного мозга крыс разного возраста. Иммуногистохимическая окраска на ТГ с подкраской (в) и без подкраски (а, б, г) гематоксилином. а – 7-е сутки постнатального развития, VI слой цингулярной коры; б – 7-е сутки постнатального развития, III слой пириформной коры; в – 14-е сутки постнатального развития, VI слой двигательной коры; г – старое животное, белое вещество. Стрелки указывают на катехоламинергические клетки. Масштабный отрезок: 20 мкм.

У половозрелых животных происходит увеличение плотности распределения волокон в нейропиле инсулярной и цингулярной областей коры (а также во вторичной двигательной коре, прилежащей к цингулярной). В остальной сенсомоторной коре наблюдали очень слабую реакцию во всех слоях кроме шестого. Наиболее плотно в цингулярной коре располагаются волокна в верхних и средних слоях, и, наоборот, в области инсулярной коры большое количество сильноветвящихся отростков выявляли в средних и нижних слоях. На этом исследуемом сроке также выявляются единичные катехоламинергические нейроны. Их наблюдали реже, чем у 7-дневных животных и только в нижних слоях прилежащей к цингулярной коре вторичной двигательной коры. Что касается различий между разными

регионами кортекса, наименьшей плотностью распределения ТГ-иммунопозитивных отростков отличается сенсомоторная область коры (Kruskal-Wallis test, post-hoc критерий Данна, $P=0,002$, $N=9,5$).

В ходе исследования препаратов коры старых животных было отмечено, что ТГ-содержащие волокна сенсомоторной и цингулярной областей коры начинают более интенсивно ветвиться. Это привело к кажущемуся усилению интенсивности иммуногистохимической реакции в сенсомоторной коре при снижении общей интенсивности окрашивания. С помощью морфометрического анализа было показано, что, действительно, площадь, занимаемая отростками катехоламинергических нейронов сенсомоторной коры, увеличивается в ходе постнатального онтогенеза в сравнении с ранними сроками (Kruskal-Wallis test, post-hoc критерий Данна, $P=0,005$, $N=14,78$), но не с половозрелыми животными (Kruskal-Wallis test, post-hoc критерий Данна, $P=0,94$, $N=14,78$). При этом плотность иммунопозитивных волокон остается примерно одинаковой во всех изученных областях коры (ANOVA, post-hoc критерий Тьюки, $P=0,17$, $F=2,06$), в отличие от половозрелых животных, для сенсомоторной области коры которых было характерно наименьшая плотность реакции. У 23-месячных крыс, как и у 30-дневных животных, ТГ-положительных клеток в неокортексе не выявляли, но наблюдали редкие нейроны в прилегающих к коре проводящих путях мозолистого тела (рис. 20г).

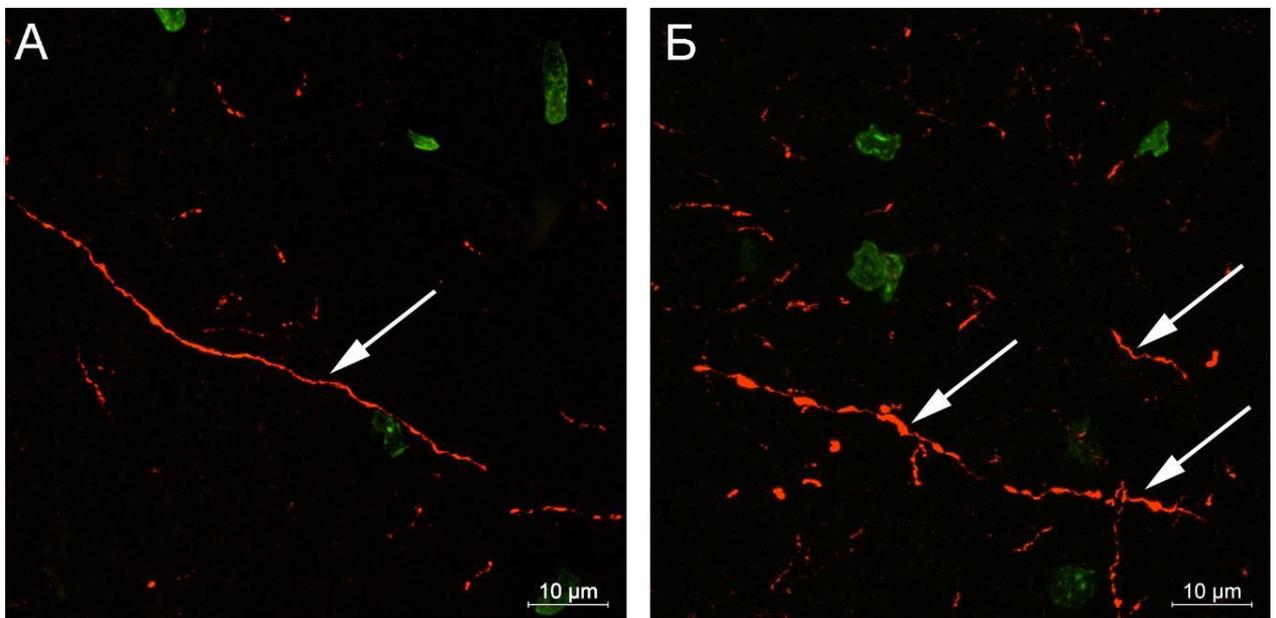


Рисунок 21 – Первый слой сенсомоторной коры у половозрелых (а) и старых (б) животных. Иммуногистохимическая окраска на ТГ (красный) с подкраской ядер SytoxGreen (зеленый). Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, двухмерная проекция Z-серии толщиной 3 мкм. Стрелки указывают на ТГ-положительные волокна.

Результаты, касающиеся плотности распределения волокон катехоламинергических нейронов в коре головного мозга, были проверены с использованием методов конфокальной микроскопии. Для этого проводили последовательное сканирование участков сенсомоторной коры по оси Z с шагом 0,2 мкм, что позволило получить трехмерные реконструкции выбранных областей с конечной толщиной 3 мкм. Было выявлено, что описанное на световом уровне распределение ТГ-иммунопозитивных волокон в области сенсомоторной коры наблюдается и при применении высокоточных методов сканирующей конфокальной лазерной микроскопии (**рис. 21**). Как показал анализ оптических срезов, для области сенсомоторной коры старых животных характерно усиление иммуногистохимической реакции вследствие более активного ветвления катехоламинергических волокон.

4.2. ГАМК-ергические структуры подкорковых областей конечного мозга крыс в процессе постнатального развития и при старении

4.2.1. Распределение GAD67 в подкорковых структурах в постнатальном онтогенезе и при старении

У крыс к концу первой недели постнатального развития усиленная реакция в подкорковых структурах отмечена в обонятельном бугорке, гипоталамусе и бледном шаре. В полосатом теле области с интенсивной окраской чередуются с областями окраски средней интенсивности (**рис. 22а**). Отдельно стоит отметить интенсивную реакцию на GAD67 в области, прилегающей к наружной капсуле. GAD-положительные клетки у 7-дневных крыс отсутствуют в области бледного шара, в районе полосатого тела распространены относительно равномерно и составляют $4,38 \pm 0,35\%$ клеток стриатума. Это довольно крупные клетки ($107,3 \pm 35,18 \text{ мкм}^2$) треугольной, овальной или грушевидной формы. От тел грушевидных клеток отходит один или несколько крупных неветвящихся отростков, которые можно проследить в толще нейропилия на расстоянии около 8-10 мкм от тела. В субвентрикулярной зоне выявляются клетки с отчетливой цитоплазматической реакцией на GAD67 (**рис. 23а**). Присутствуют одиночные клетки с ядерными инвагинациями, хорошо визуализируемыми с помощью иммуногистохимической реакции. Они располагаются в субвентрикулярной зоне и в полосатом теле (**см. рис. 22б**).

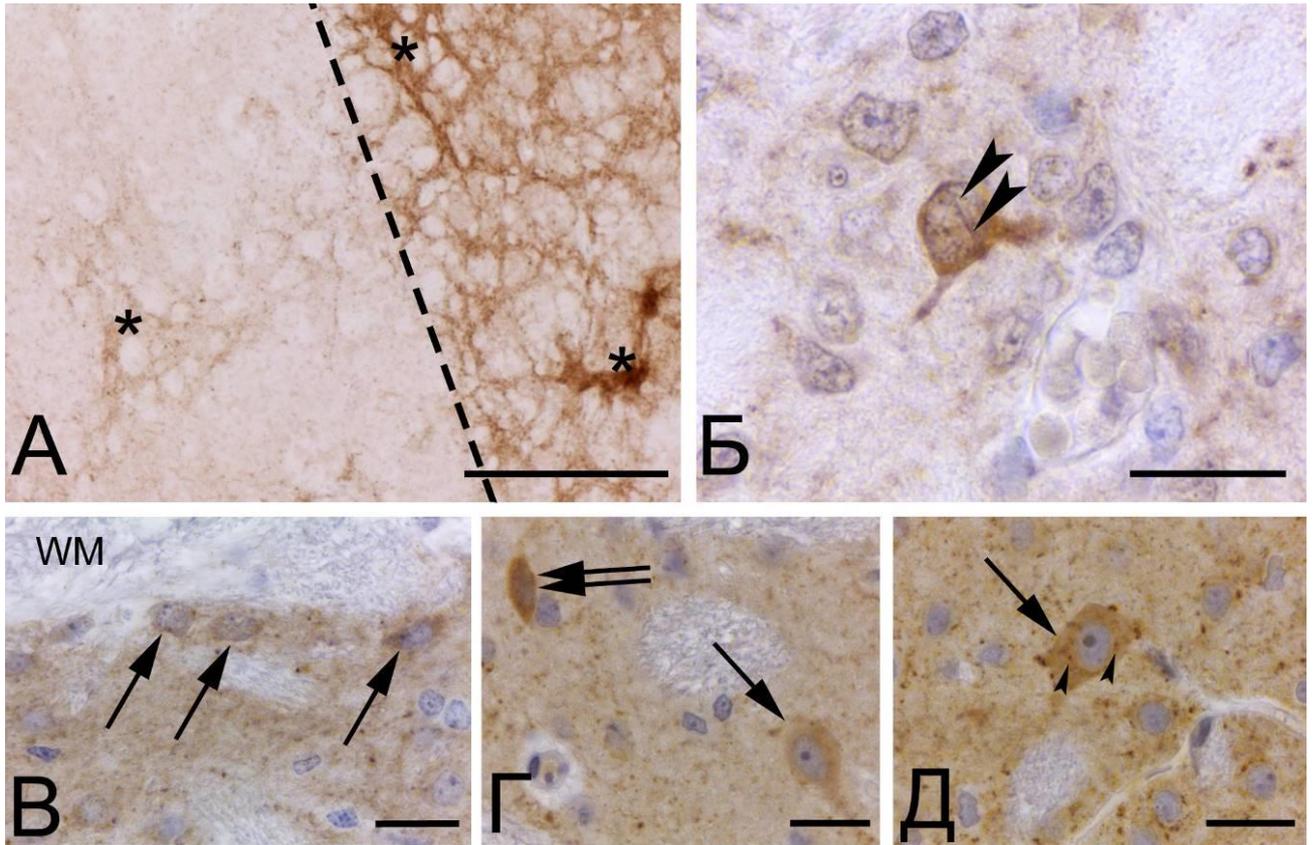


Рисунок 22 – GAD67 стриопаллидарной системы на разных сроках постнатального развития. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 с подкраской гематоксилином. а – 7 сутки постнатального развития, граница между стриатумом и бледным шаром (обозначена штриховкой). Звездочки маркируют области с усиленной экспрессией фермента; б – 7 сутки постнатального развития, ГАМК-ергическая клетка стриатума. Головки стрелок указывают на ядерные инвагинации; в – 30 сутки постнатального развития, наружная капсула. Стрелки указывают на веретеновидные клетки со слабой реакцией на GAD67, WM – прилежащее белое вещество; г – половозрелое животное. Стрелка указывает на клетку со слабой реакцией на GAD67, двойная стрелка – с усиленной реакцией; д – ГАМК-ергическая клетка стриатума (стрелка). Головки стрелок указывают на дискретные скопления фермента в цитоплазме клетки. Масштабные линейки: 200 мкм (а), 20 мкм (б-д).

Как и у 7-дневных крыс, в подкорковых областях реакция на GAD67 наибольшей интенсивности у P14 наблюдается в бледном шаре, обонятельном бугорке и гипоталамусе. В пределах полосатого тела интернейроны распределены равномерно, их количество составляет $4,04 \pm 0,7\%$ клеток стриатума. Величина перикарионов остается относительно постоянной, колеблется в пределах $121,4 \pm 19,27 \text{ мкм}^2$. У веретеновидных биполярных и грушевидных униполярных клеток, также присутствующих на предыдущей исследуемой стадии развития,

отростки начинают активно ветвиться. Интенсивность ИГХ реакции в нейропиле стриатума возрастает за счет развивающихся GAD67-содержащих волокон и синаптических терминалей, а неравномерность окрашивания, отмеченная на предыдущем сроке, не проявляется. Граница между СВЗ и стриатумом прослеживается, а в пределах СВЗ также, как и на предыдущем сроке, выявляются GAD-иммунопозитивные клетки. Эти клетки в основном расположены одиночно, имеют овальную или веретеновидную форму и небольшой объем цитоплазмы (**рис. 23б**). В апикальной части некоторых эпителиальных клеток, покрывающих ворсинки сосудистого сплетения, появляется реакция на GAD67 (**рис. 26б, д**). Постановка отрицательного контроля показала, что наблюдаемая реакция не является следствием неспецифического фонового связывания вторичных реагентов. Средняя интенсивность флуоресценции в этой области составляет $26,14 \pm 12,47$ условных единиц яркости.

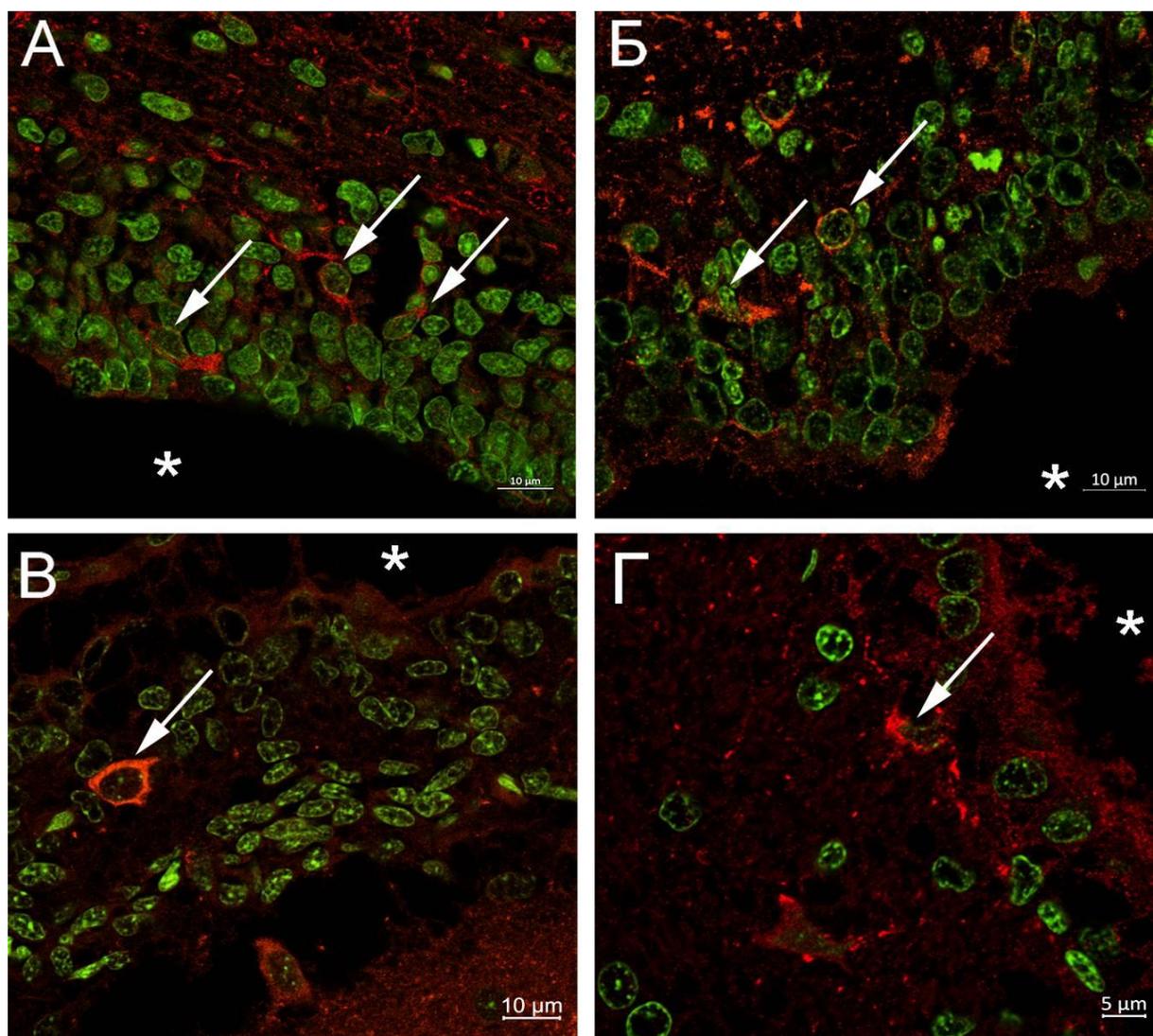


Рисунок 23 – GAD67-положительные структуры в области субвентрикулярной зоны крыс на разных сроках постнатального развития. Иммуногистохимическая окраска на GAD67

(красный) с подкраской ядер SytoxGreen (зеленый). а – 7 сутки постнатального развития; б – 14 сутки постнатального развития; в – 30 сутки постнатального развития; г – старое животное. Стрелки указывают на GAD67-содержащие клетки в пределах субвентрикулярной зоны, звездочка – полость бокового желудочка.

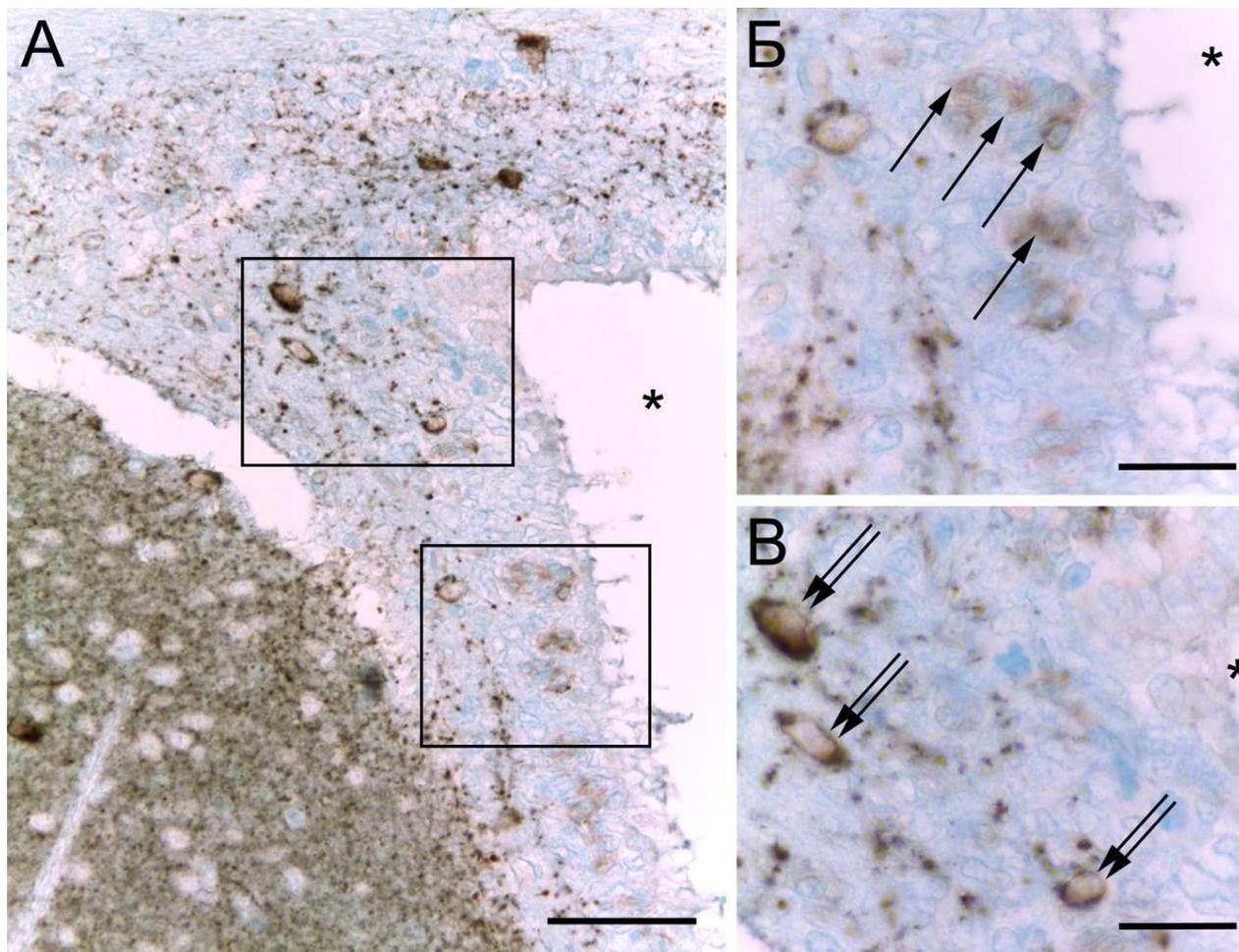


Рисунок 24 – GAD67-положительные структуры в области субвентрикулярной зоны 30-дневных крыс. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 с подкраской альциановым синим. а – 30 сутки постнатального развития, общий вид. Рамки ограничивают области, представленные на б, в; б, в – области интереса на большом увеличении. Стрелки указывают на слабоокрашенные веретеновидные клетки, двойные стрелки – крупные овальные клетки. Звездочка обозначает боковой желудочек. Масштабные отрезки: 50 мкм (а), 20 мкм (б, в).

У животных P30 как в полосатом теле, так и в бледном шаре наблюдается окрашивание средней интенсивности. В бледном шаре развитые GAD67-содержащие синаптические терминалы четко контурируют клетки-мишеней. Для этого срока характерно наибольшее процентное содержание ГАМК-ергических интернейронов в подкорковых структурах: $6,25 \pm$

1,44% (one-way ANOVA, $F=8,07$, $P=0,0006$, post-hoc критерий Тьюки $P<0,04$). Интернейроны в полосатом теле распределены равномерно, впервые на этом сроке можно различить две популяции клеток в зависимости от интенсивности окрашивания: клетки с сильно выраженной реакцией на GAD67 и клетки со слабой реакцией на GAD67. Часто слабоокрашенные клетки наблюдаются вблизи белого вещества наружной капсулы мозга (**рис. 23в**), и имеют веретеновидную или овальную форму. GAD67-иммунопозитивные нейроны часто вплотную прилегают к пучкам белого вещества стриатума, а единичные клетки можно найти непосредственно в зоне белого вещества. У этих нейронов светлое, крупное ядро, окруженное узкой полоской цитоплазмы. Большинство иммунопозитивных клеток полосатого тела имеют звездчатую форму. Тела нейронов крупные ($102,3 \pm 26,40$ мкм²), по форме круглые, овальные, грушевидные, звездчатые или веретеновидные. Формирование ферментом дискретных сферических скоплений в цитоплазме клетки отмечали как вокруг ядра, так и по остальному объему перикариона нейронов с интенсивным ИГХ окрашиванием на GAD67. Для клеток со слабой реакцией на антиген подобная морфологическая картина нехарактерна. GAD67-положительные структуры в субвентрикулярной зоне также выявляются на этом сроке (**рис. 23в, 24**). Присутствуют небольшие скопления слабоокрашенных веретеновидных клеток, локализованных вблизи эпендимы, так и одиночные крупные овальные или круглые клетки с малым объемом цитоплазмы и интенсивной окраской на антиген (**рис. 24б, в**). Реакция на GAD67 в сосудистом сплетении у одномесячных животных сохраняется. Фермент содержится в апикальной части всех эпителиальных клеток сплетения. Средняя интенсивность флуоресценции невелика и составляет $66,32 \pm 8,91$ условных единиц яркости.

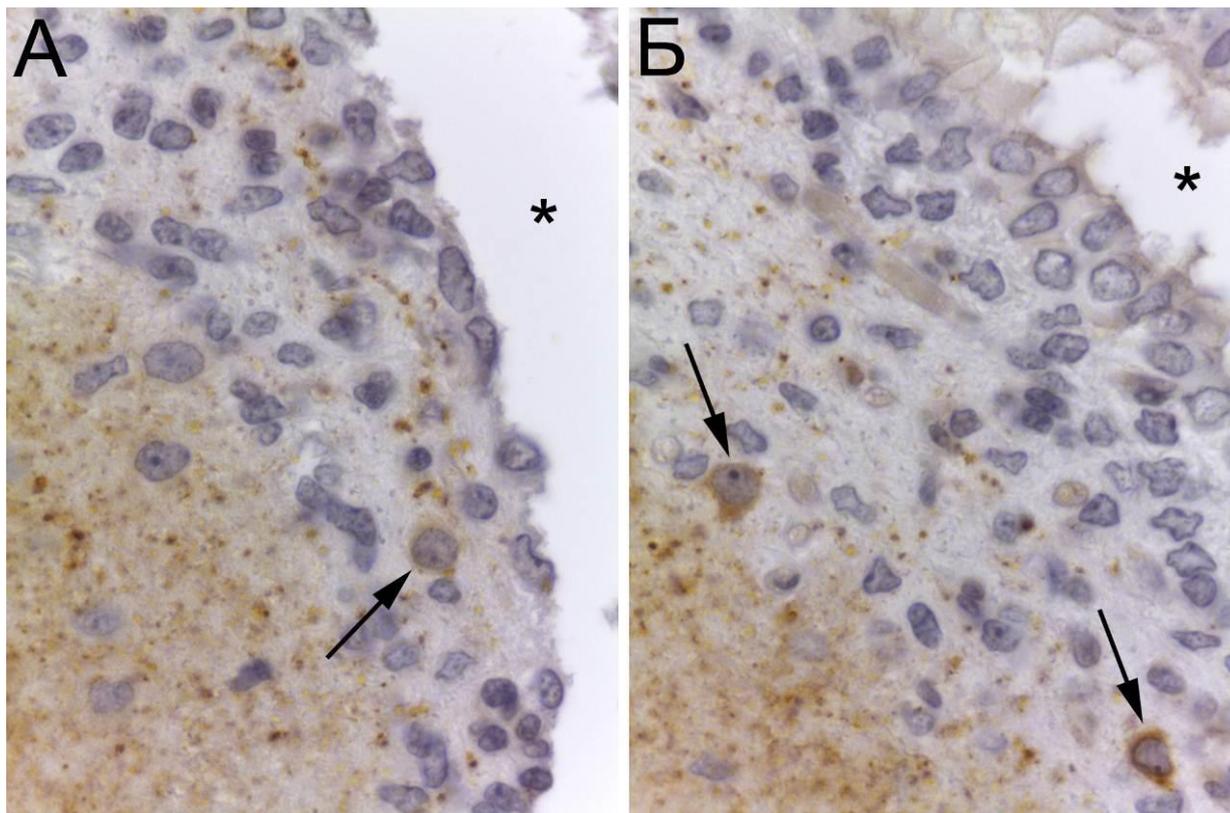


Рисунок 25 – ГАМК-ергические клетки субвентрикулярной зоны взрослых животных. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 с подкраской гематоксилином. а – вентральная область, присутствие клеток со слабой реакцией; б – дорсальная область, клетки с реакцией средней интенсивности. Стрелка указывает на GAD67-положительные клетки, звездочка – полость желудочка.

В подкорковых структурах половозрелых животных изоформа GAD67 дает реакцию высокой интенсивности в вентральных областях мозга: в области гипоталамуса, обонятельного бугорка и в бледном шаре. На препаратах также выражена реакция в полосатом теле. Благодаря неодинаковой интенсивности иммуногистохимической реакции возможно различие структур бледного шара и полосатого тела на анатомическом уровне. ГАМК-ергические нейроны у взрослых животных крупные ($107,2 \pm 9,036 \text{ мкм}^2$), распределены диффузно по всему стриатуму. Все формы тел клеток – овальные, круглые, грушевидные, веретеновидные, звездчатые – отмеченные на предыдущих стадиях, характерны и для половозрелых крыс. В подкорковых структурах можно выявить две популяции ГАМК-ергических интернейронов: клетки с сильно выраженной реакцией на GAD67 и клетки с умеренной реакцией на GAD67 (**рис. 22г**). Интересно, что GAD67 может быть распределен в цитоплазме перикариона как равномерно, без образования конгломератов, так и с образованием скоплений внутри клетки. При этом, характер распределения фермента в цитоплазме, по-видимому, не зависит от интенсивности

окрашивания, как это было отмечено у одномесячных животных (рис. 22д). ГАМК-продуцирующие клетки составляют $2,99 \pm 0,92\%$ клеток в подкорковых структурах. Вблизи эпендимной выстилки субвентрикулярной зоне отсутствуют скопления ГАМК-ергических клеток, которые присутствовали на срезах на предыдущих сроках, однако наблюдаются единичные нейроны с положительной иммуногистохимической реакцией на GAD67 (рис. 25). В этом возрасте также наблюдается скопление фермента в апикальной части эпителиальных клеток (рис. 26в, е), при этом средняя интенсивность флуоресценции ($178,5 \pm 50,33$ условных единиц яркости) наивысшая среди исследуемых сроков (как показал критерий Краскела-Уоллиса, post-hoc критерий Данна, $P=0,0002$, $N=21,84$).

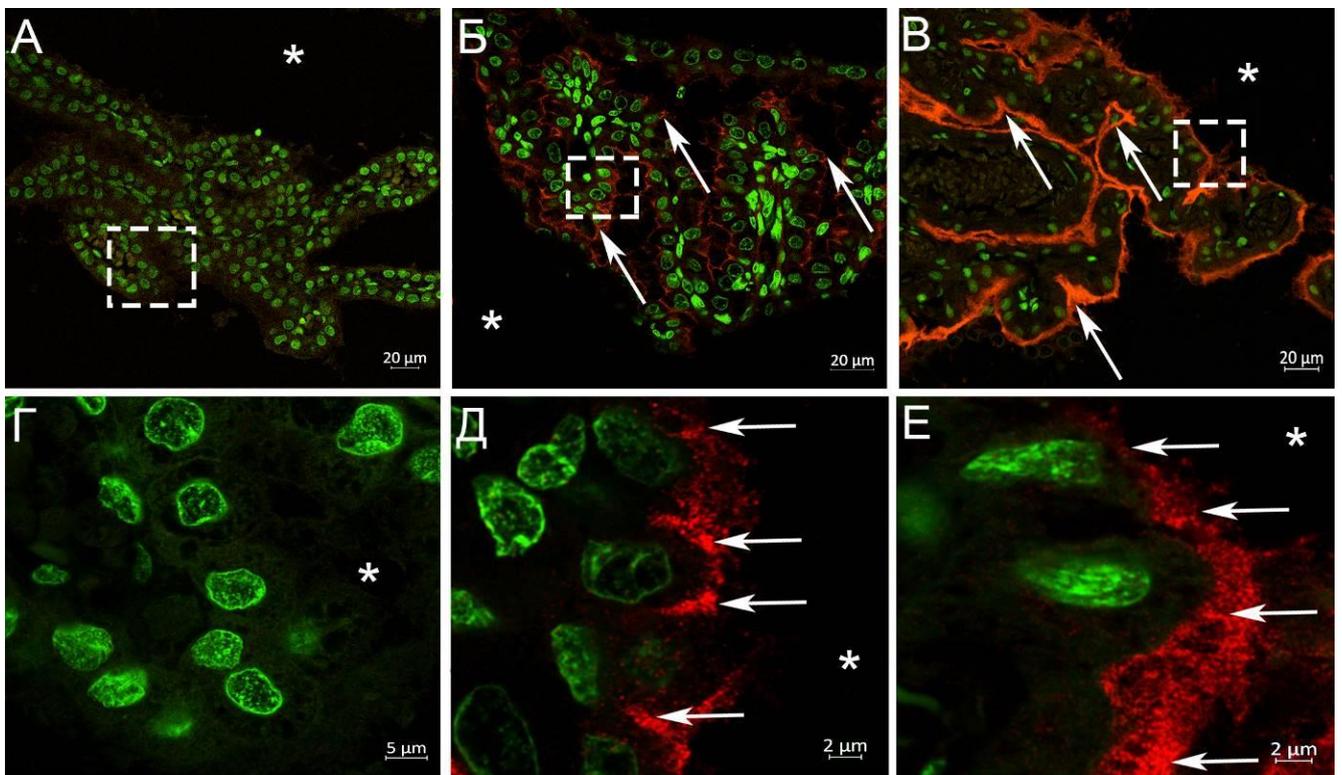


Рисунок 26 – GAD67 в сосудистом сплетении. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 (красный) с подкраской ядер SytoxGreen (зеленый). а, г – 7 сутки постнатального развития, отсутствие реакции; б, д – 14 сутки постнатального развития, частичная реакция; в, е – взрослое животное, повсеместная реакция. Рамки ограничивают области, представленные на г-е. Стрелка указывает на скопление фермента в апикальной части эпителиальных клеток, звездочка – полость желудочка.

При изучении препаратов головного мозга старых крыс визуально было отмечено общее снижение интенсивности реакции по сравнению с другими сроками при сохранении пространственного распределения и морфологии клеток подобно таковому, наблюдаемому на

срезах взрослых животных. Сохраняется различная интенсивность в окрашивании полосатого тела и бледного шара, при этом ИГХ реакция на GAD67 в хвостатом ядре имеет хорошо выраженный градиент: высокая интенсивность окраски в латеральной, прилежащей к субкортикальному белому веществу, зоне снижается в вентромедиальном направлении так, что область вокруг бледного шара отличается наиболее слабой реакцией (см. рис. 8г). Происходит увеличение доли белого вещества, причем в латеральной части стриатума это характеризуется увеличением количества достаточно мелких в диаметре скоплений проводящих пучков на поле зрения, а в медиальной – разрастанием пучков белого вещества. Доля интернейронов стриатума старых крыс составляет $3,69 \pm 0,9\%$. Клетки имеют размеры в пределах $105,1 \pm 7,70 \text{ мкм}^2$, с толстыми или средней толщины отростками, встречаются биполярные и мультиполярные клетки. Отростки клеток на этой стадии слабо ветвятся и прослеживаются только на небольшом расстоянии от сомы. Нейроны со слабой интенсивностью реакции на GAD67 у старых крыс отсутствуют или не выявлены. В единичных клетках стриатума определяли инвагинации ядерной оболочки, выявляемые с помощью ИГХ реакции на GAD67. У старых животных, как и на протяжении первого месяца постнатального онтогенеза, можно заметить ГАМК-ергические клетки в субвентрикулярной зоне (рис. 22г). На этом сроке средняя интенсивность флуоресценции GAD67 в сосудистом сплетении понижается до $57,21 \pm 15,82$ условных единиц яркости.

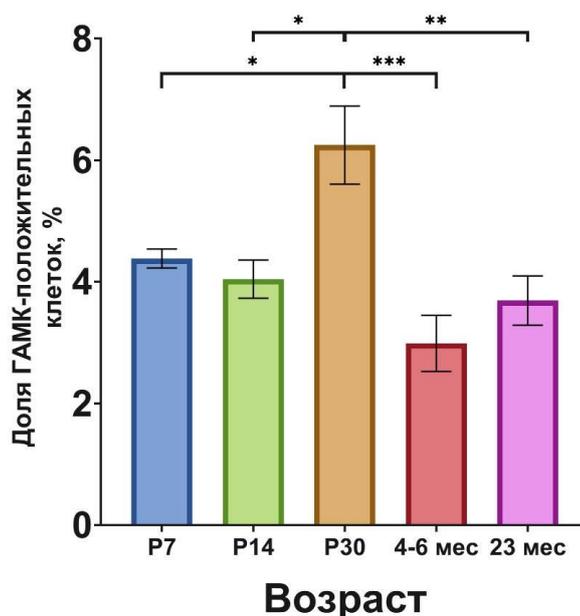


Рисунок 27 – Возрастная динамика изменения доли ГАМК-ергических клеток стриатума. P7, P14, P30 – 7-е, 14-е и 30-е постнатальные сутки соответственно. P-value: * – $< 0,05$; ** – $< 0,01$; *** – $< 0,001$.

4.2.2. Распределение GAD65 в подкорковых структурах в процессе постнатального развития

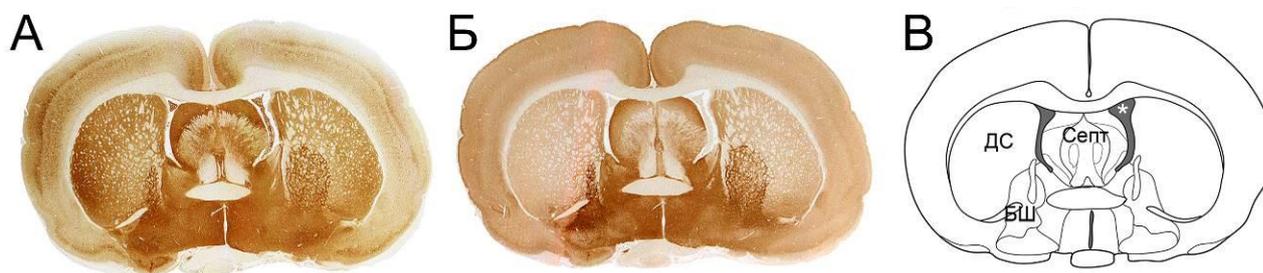


Рисунок 28 – GAD в структурах конечного мозга крыс. Фронтальные срезы на уровне 0.4 мм от Брегмы: а – распределение GAD67; б – распределение GAD65; в – схема структур конечного мозга. ДС – дорсальный стриатум (хвостатое ядро и скорлупа), БШ – бледный шар, Септ – септальная зона. Звездочка отмечает боковые желудочки.

Подкорковые зоны 7-дневных и 14-дневных крыс выделяются интенсивным окрашиванием зон, расположенных вблизи вентральной поверхности конечного мозга. Наиболее слабоокрашенной областью на этом сроке является хвостатое ядро. Усиленной реакцией в этой зоне отличается узкая полоска большого количества иммунопозитивных синаптических терминалей, окруженных слабоокрашенным нейропилем, вблизи внешней капсулы головного мозга. Помимо этого, в вентромедиальной части полосатого тела выявляются скопления продукта реакции, которые при рассмотрении препаратов на большом увеличении оказываются компактными скоплениями синаптических терминалей, контурирующих отростки своих клеток-мишеней (**рис. 30**). В противоположность хвостатому ядру расположенный медиальнее бледный шар дает усиленную реакцию на GAD65. У крыс P7, распределение фермента в пределах бледного шара, как и в близлежащей структуре, неравномерно. Наблюдали островки с высокой, средней и низкой концентрацией ГАМК-ергических терминалей (**рис. 30а**). Однако к концу второй недели постнатального онтогенеза интенсивность реакции становится однородной. В вентральном паллидуме и в преоптической области гипоталамуса отмечали наличие клеток с цитоплазматической реакцией на GAD65 (**рис. 29а**). В отличие от GAD67, распределенной в нейроне диффузно, изоформа GAD65 выявляется в цитоплазме клеток в виде крупных округлых скоплений.

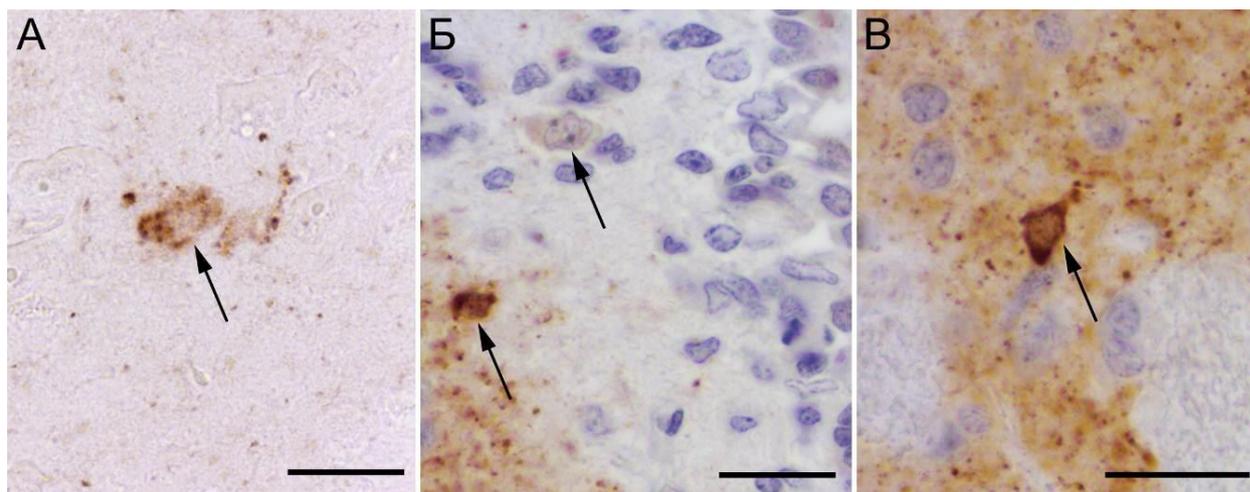


Рисунок 29 – GAD65-содержащие клетки. Иммуногистохимическая окраска на GAD65. а – 7-е сутки постнатального развития, область гипоталамуса; б – 30-е сутки постнатального развития, граница стриатума и субвентрикулярной зоны; в – 30-е сутки постнатального развития, стриатум. Стрелки указывают на клетки с положительной иммуногистохимической реакцией на GAD65. Масштабные отрезки: 20 мкм.

В полосатом теле 30-дневных и половозрелых животных GAD65-иммунопозитивные терминали редки, отдельные крупные скопления синаптических бутонов концентрируются на границе с бледным шаром. Граница между бледным шаром и стриатумом четко прослеживается (см. рис. 28б, 30в, г). Сохраняется неравномерность ИГХ окрашивания внутри области бледного шара, причем наибольшая интенсивность наблюдается по периметру структуры. В вентральной части стриатума половозрелых животных, вблизи желудочков головного мозга (но не в субвентрикулярной зоне), выявляются мелкие клетки, содержащие GAD65 в цитоплазме. Они имеют овальную или круглую форму перикариона. В противоположность этому, на сроке P30 цитоплазматическая реакция на GAD65 в ГАМК-ергических клетках обнаруживается как в стриатуме, так и в СВЗ. Цитоплазма GAD65-иммунопозитивных клеток СВЗ дает слабую реакцию, ядро имеет множественные инвагинации, а отростки отсутствуют или на световом уровне неразличимы (рис. 29в). GAD65 в цитоплазме клеток у одномесячных животных распределен равномерно без формирования скоплений.

Как и в коре, в подкорковых областях старых животных с помощью реакции на GAD65 практически невозможно дифференцировать структуры стриатума несмотря на то, что на вентральной поверхности мозга в области гипоталамуса и в бледном шаре сохраняется усиленная по сравнению с остальными областями реакция. При этом, большая часть нейропилия бледного шара иммуногистохимически неотличима от прилежащего полосатого тела, а границы

прослеживаются только в вентромедиальных и вентролатеральных областях. Клетки, содержащие GAD65 в цитоплазме, на этом сроке отсутствуют или не выявлены.

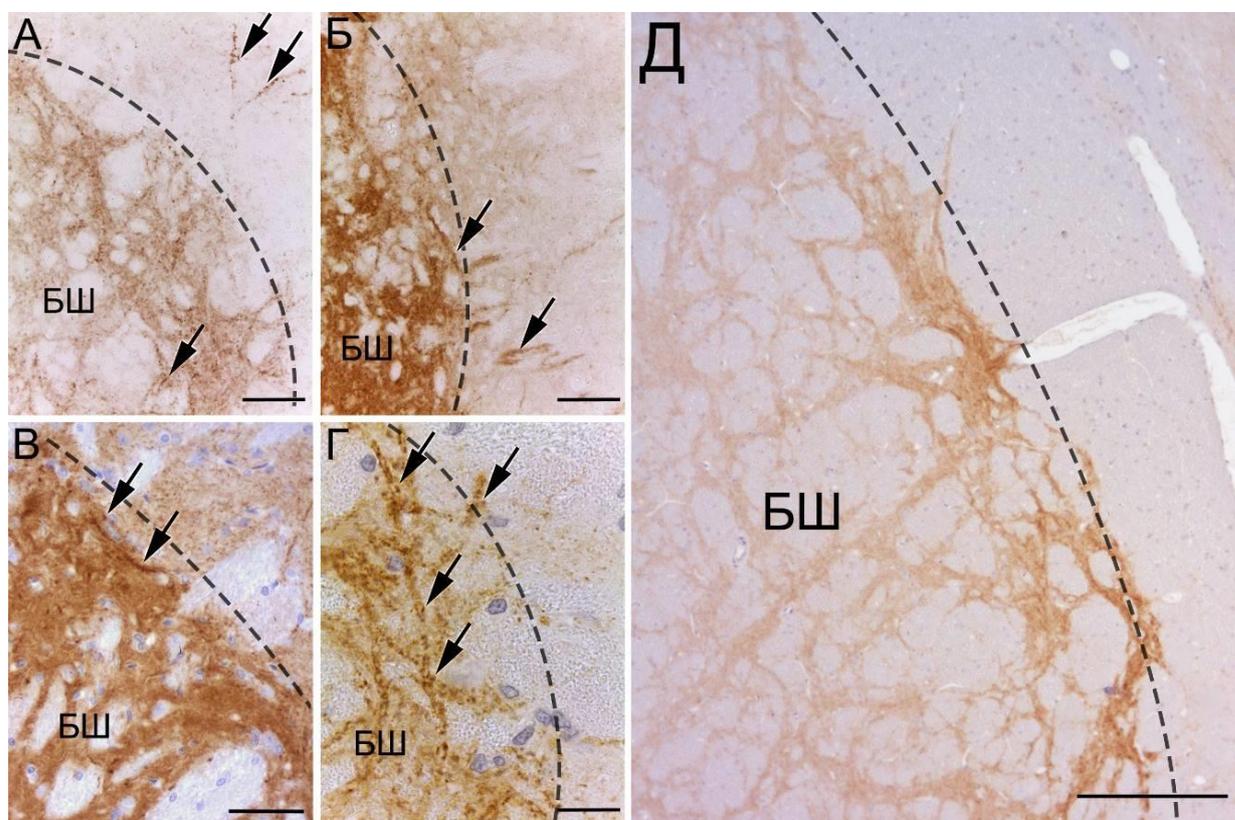


Рисунок 30 – Граница между стриатумом и бледным шаром крыс на разных этапах постнатального онтогенеза. Иммуногистохимическая окраска на GAD65. а – 7-е сутки постнатального развития; б – 14-е сутки постнатального развития; в – 30-е сутки постнатального развития; г – половозрелое животное; д – старое животное. БШ – бледный шар. Стрелки указывают на скопления GAD65-положительных синаптических терминалей, штриховка отмечает границу между структурами. Масштабные отрезки: 50 мкм (а-в), 20 мкм (г), 200 мкм (д).

4.3. Особенности становления нейрональной популяции субфорникального органа крыс

Чтобы проследить становление ГАМК- и катехоламинергической иннервации СФО, было предпринято сравнительно-морфологическое исследование срезов головного мозга крыс на разных сроках постнатального онтогенеза.

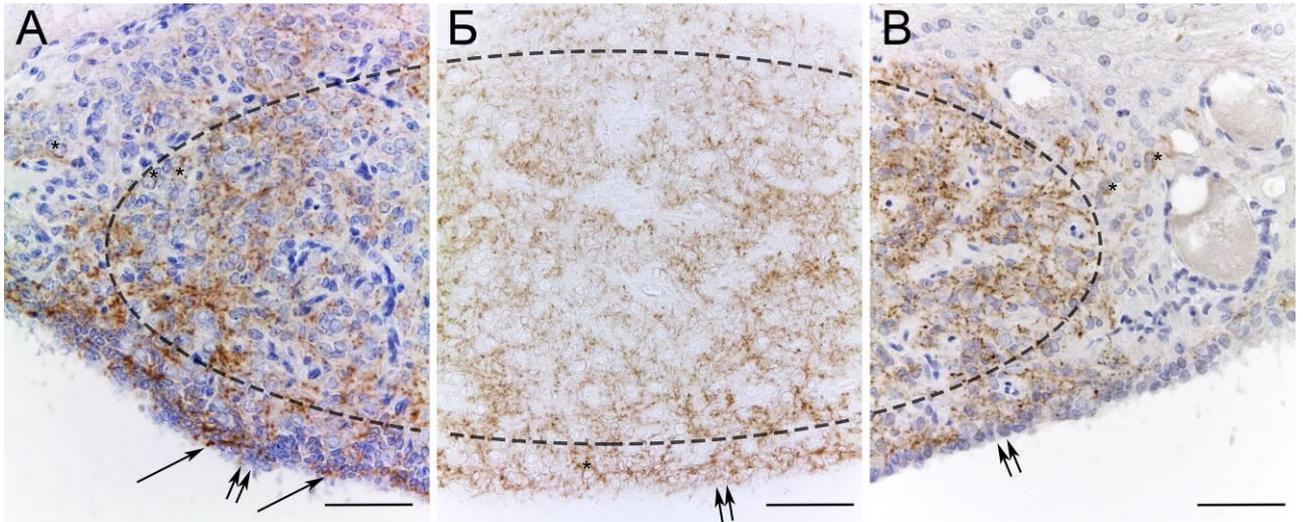


Рисунок 31 – Субфорникальный орган крысы, общий вид. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 без подкраски (б) и с подкраской гематоксилином (а, в). а – 7-е сутки постнатального развития; б – 14-е сутки постнатального развития; в – 30-е сутки постнатального развития. Стрелка указывает на ГАМК-ергические волокна в контакте с цереброспинальной жидкостью, двойная стрелка – слой эпендимных клеток. Штриховка ограничивает центральную область субфорникального органа, звездочки обозначают клетки с цитоплазматической реакцией на GAD67. Масштабный отрезок: 50 мкм.

GAD67-содержащие структуры в субфорникальном органе 7-дневных крыс представляют собой как тела, так и отростки ГАМК-ергических клеток (**рис. 31**). Немногочисленные GAD67-положительные клетки располагаются преимущественно в латеральных частях СФО и вблизи покрывающих орган клеток. Отростки и синаптические терминалы ГАМК-ергических клеток располагаются в СФО повсеместно, прилегают к телам и отросткам клеток СФО, располагаются вблизи кровеносных сосудов и эпендимного пласта (**рис. 32а**). В латеральных частях органа и в субэпендимном слое отростки ГАМК-ергических нейронов (которые можно проследить в толще нейропиля благодаря присутствию GAD67 в волокнах клеток СФО) формируют горизонтально расположенные пучки и могут не только примыкать к клеткам эпендимного слоя, но также проходить сквозь ряды таницитов и доходить до просвета желудочка (**см. рис. 31а**). К концу второй недели постнатального развития в СФО наблюдается равномерное распределение ГАМК-ергических синаптических терминалов, с концентрацией большого количества синаптических бутонов в субэпендимной зоне. На этом сроке GAD67 в волокнах ГАМК-синтезирующих клеток наблюдается только в субэпендимной зоне (**рис. 31б**).

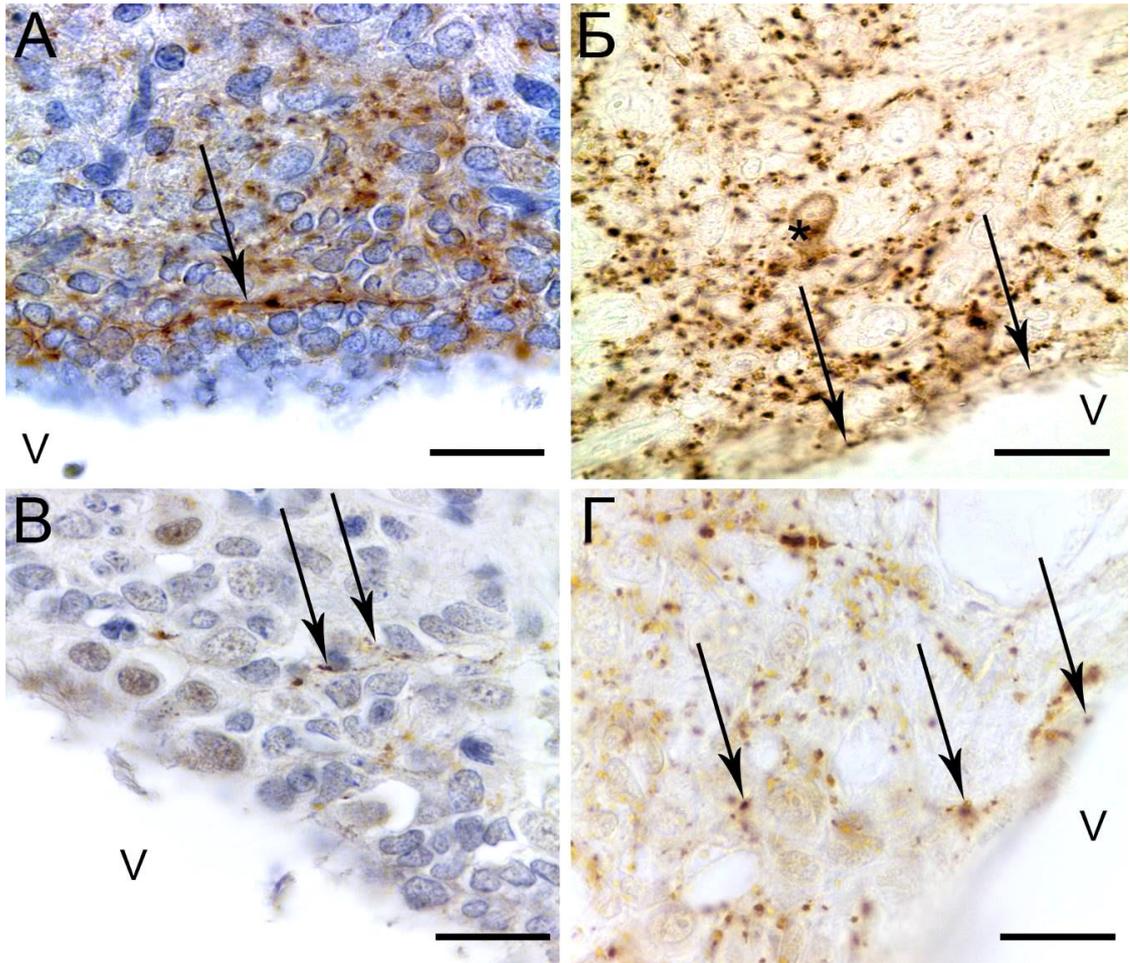


Рисунок 32 – Распределение GAD в субфорникальном органе крыс. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 (а, б) и GAD65 (в, г). а – 7-е постнатальные сутки, субэпендимная зона. Стрелка указывает на GAD67-содержащее волокно; б – взрослое животное, субэпендимная зона. Стрелки указывают на ГАМК-ергические терминали в эпендимном слое, звездочка – GAD67-положительная клетка; в – 7-е постнатальные сутки, латеральная зона; г – взрослое животное, латеральная зона. Стрелки указывают на GAD65-содержащие синаптические терминали. V – полость желудочка. Масштабный отрезок: 20 мкм.

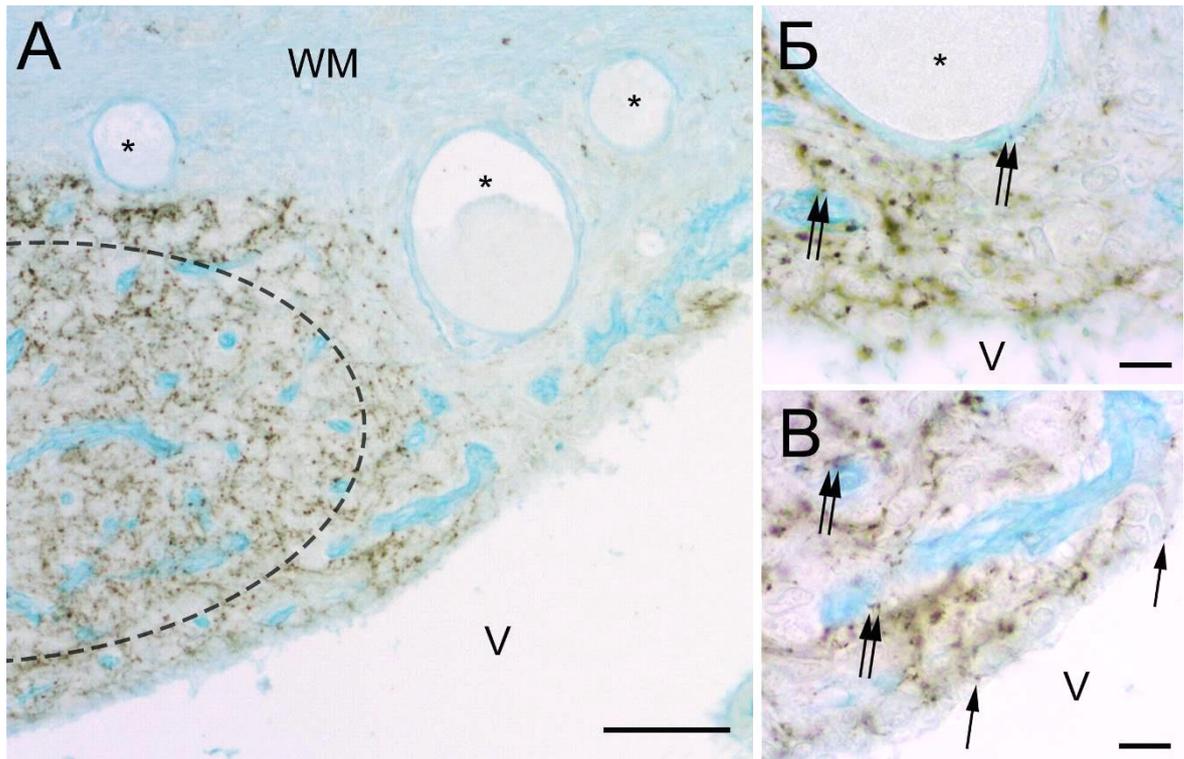


Рисунок 33 – Субфорникальный орган крысы к концу 1-го месяца постнатального онтогенеза. Иммуногистохимическая окраска на GAD65 с подкраской альциановым синим. а – общий вид; б – латеральная зона; в – субэпендимная зона. Стрелки указывают на синаптические терминалы в контакте с эпендимоцитами и ликвором, двойные стрелки – синапсы в периваскулярной зоне. Штриховка ограничивает центральную часть субфорникального органа, звездочка обозначает просвет сосудов. WM – белое вещество, V – полость желудочка. Масштабные отрезки: 50 мкм (а), 10 мкм (б, в).

На 7-е постнатальные сутки и к концу второй недели постнатального развития GAD65-иммунопозитивные структуры в пределах СФО редки и встречаются лишь в краевых зонах органа (**рис. 32в**). Повсеместную ИГХ реакцию синаптических терминалей на GAD65 впервые выявляли на 30-е постнатальные сутки (**рис. 33**). Как GAD67-, так и GAD65-содержащие пресинаптические окончания густо покрывают клетки СФО. Единичные синаптические терминалы обнаруживаются в периваскулярном пространстве кровеносных сосудов (**см. рис. 33б**). GAD67-содержащие клетки дают слабую или умеренную ИГХ реакцию в цитоплазме и локализованы в латеральной зоне СФО, между крупными кровеносными сосудами, и под эпендимным пластом. У половозрелых животных также отмечается интенсивная ГАМК-ергическая иннервация СФО. Синаптические бутоны, содержащие GAD67 и GAD65, распределены равномерно по всему объему СФО с незначительным увеличением интенсивности реакции в субэпендимной зоне, периваскулярном пространстве септальных вен

и вблизи прилегающего белого вещества. ГАМК-ергические нейроны в СФО представлены в небольшом количестве, GAD67-иммунопозитивные клетки располагаются в краевых зонах органа: в субэпендимной зоне, в латеральных частях вблизи крупных сосудов, у прилегающего к СФО белого вещества спайки свода. У старых животных наблюдали повышенное накопление липофусцина в клетках, расположенных в латеральной области СФО (рис. 34). GAD65-содержащих клеток в составе СФО ни на одном из исследуемых сроков не было обнаружено.

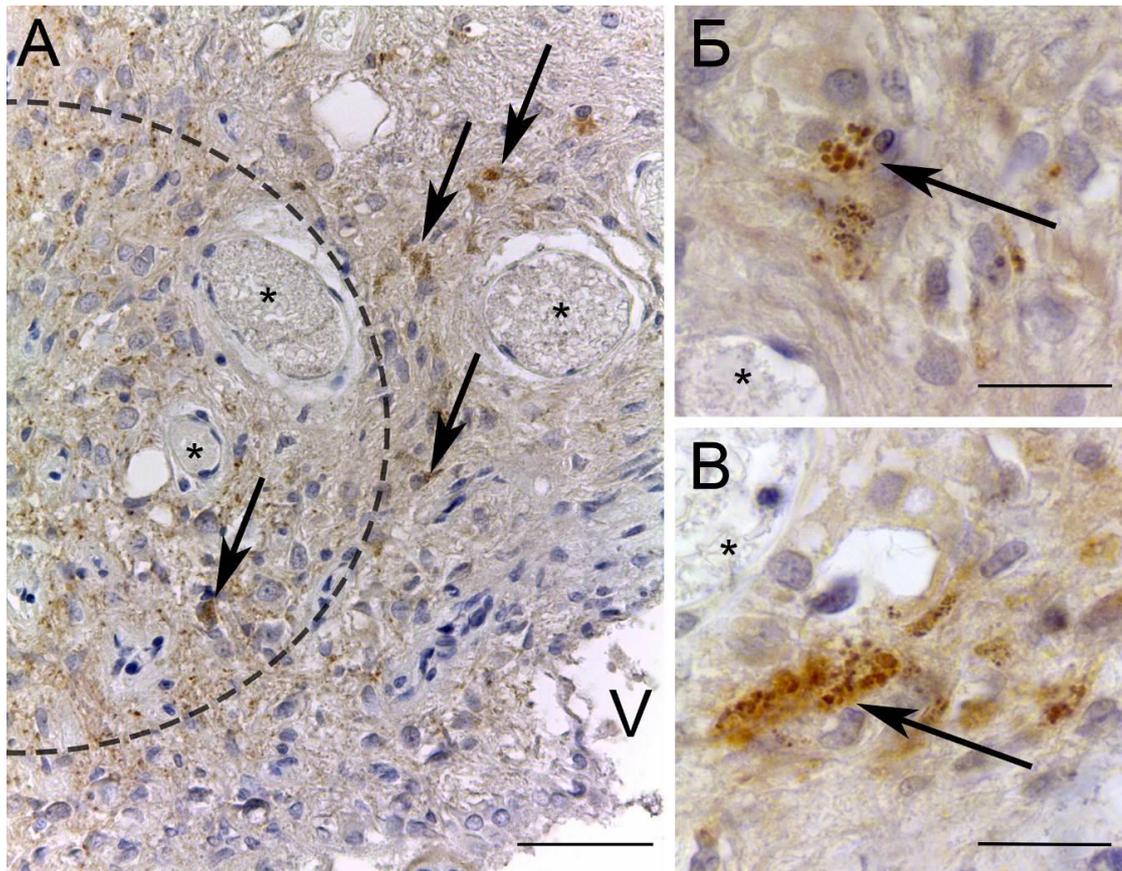


Рисунок 34 – Субфорникальный орган 23-месячной крысы. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 с подкраской гематоксилином. а – общий вид; б, в – клетки, содержащие липофусцин, в латеральной зоне. Стрелки указывают на липофусцин-содержащие клетки, штриховка ограничивает центральную часть субфорникального органа, звездочка обозначает просвет сосудов. V – полость желудочка. Масштабные отрезки: 50 мкм (а), 20 мкм (б, в).

Катехоламинергические структуры СФО в конце первой и второй недели постнатального развития представляют собой немногочисленные, редковетвящиеся ТГ-содержащие волокна с крупными четкообразными утолщениями. Чаще всего это горизонтально ориентированные структуры, которые формируют пучки на краях субфорникального органа и выходят за его пределы в контакте с выстилкой эпендимного слоя (рис. 35а). Отдельные отростки

катехоламинергических клеток контактируют и с клетками, покрывающими СФО. Немногочисленные вертикально направленные волокна проходили через всю паренхиму органа в центральной зоне. Реакцию на ТГ отмечали также вблизи эндотелия капилляров и септальных вен. Также отростки катехоламинергических нейронов присутствуют в близлежащем сосудистом сплетении (рис. 36в).

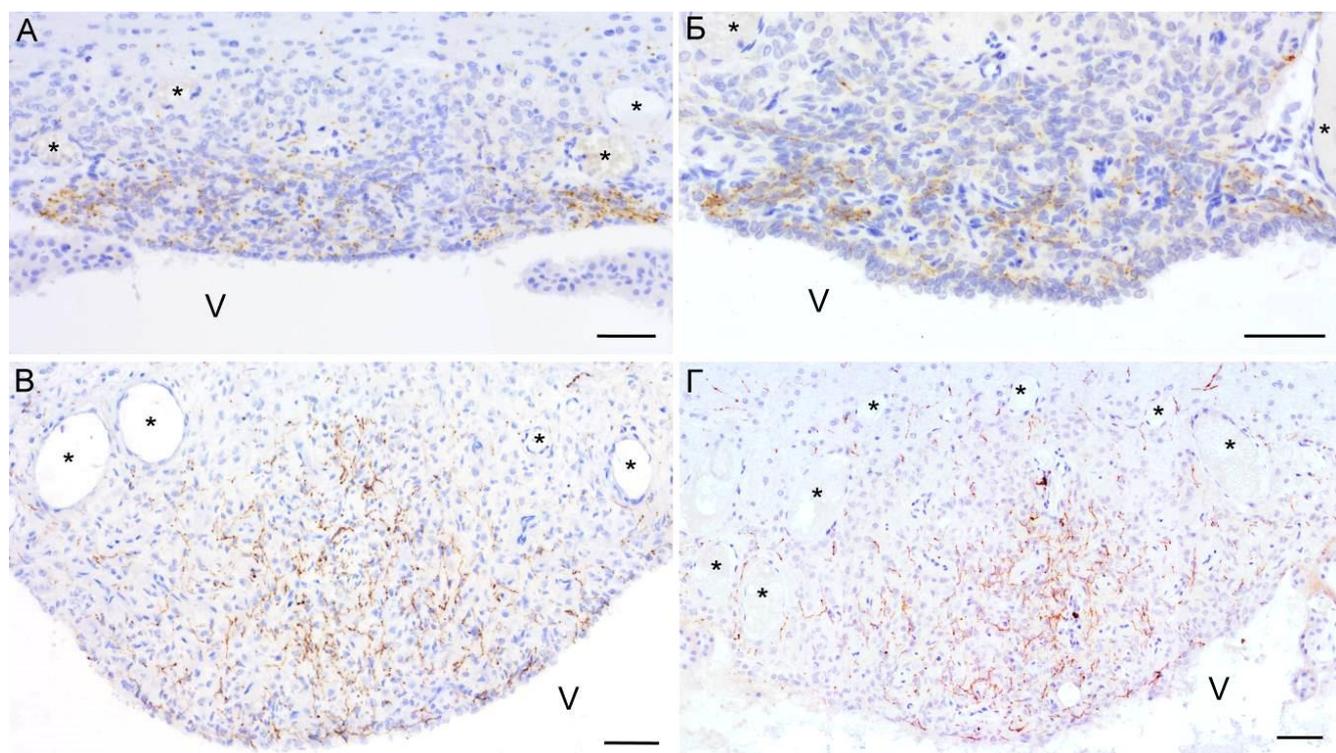


Рисунок 35 – Распределение катехоламинергических волокон в СФО на разных этапах постнатального развития. Иммуногистохимическая реакция на ТГ с подкраской гематоксилином. а – 14-е сутки постнатального развития; б – 30-е сутки постнатального развития; в – взрослое животное; г – старое животное. V – полость желудочка, звездочки обозначают просветы крупных кровеносных сосудов. Масштабные отрезки: 50 мкм.

Интенсивную реакцию на ТГ в латеральных зонах субфорникального органа в связи с расположением в этой области плотного скопления отростков катехоламинергических нейронов отмечали и к концу 1-го месяца постнатального развития. Однако на этом сроке различия в распределении катехоламинергических структур между центральной и латеральной зонами выражены не так ярко, как на 7-е и 14-е постнатальные сутки. На сроке P30 в центральной зоне наблюдали интенсивно ветвящиеся яркоокрашенные волокна с многочисленными четкообразными утолщениями. Заметно, что часть волокон находится в субэпендимной зоне. В каудальной же части органа отростки сконцентрированы вблизи

выстилки желудочка. Отдельно следует отметить ТГ-иммунопозитивные волокна, которые проходят сквозь выстилку желудочка и напрямую контактируют с СМЖ (см. рис. 36в).

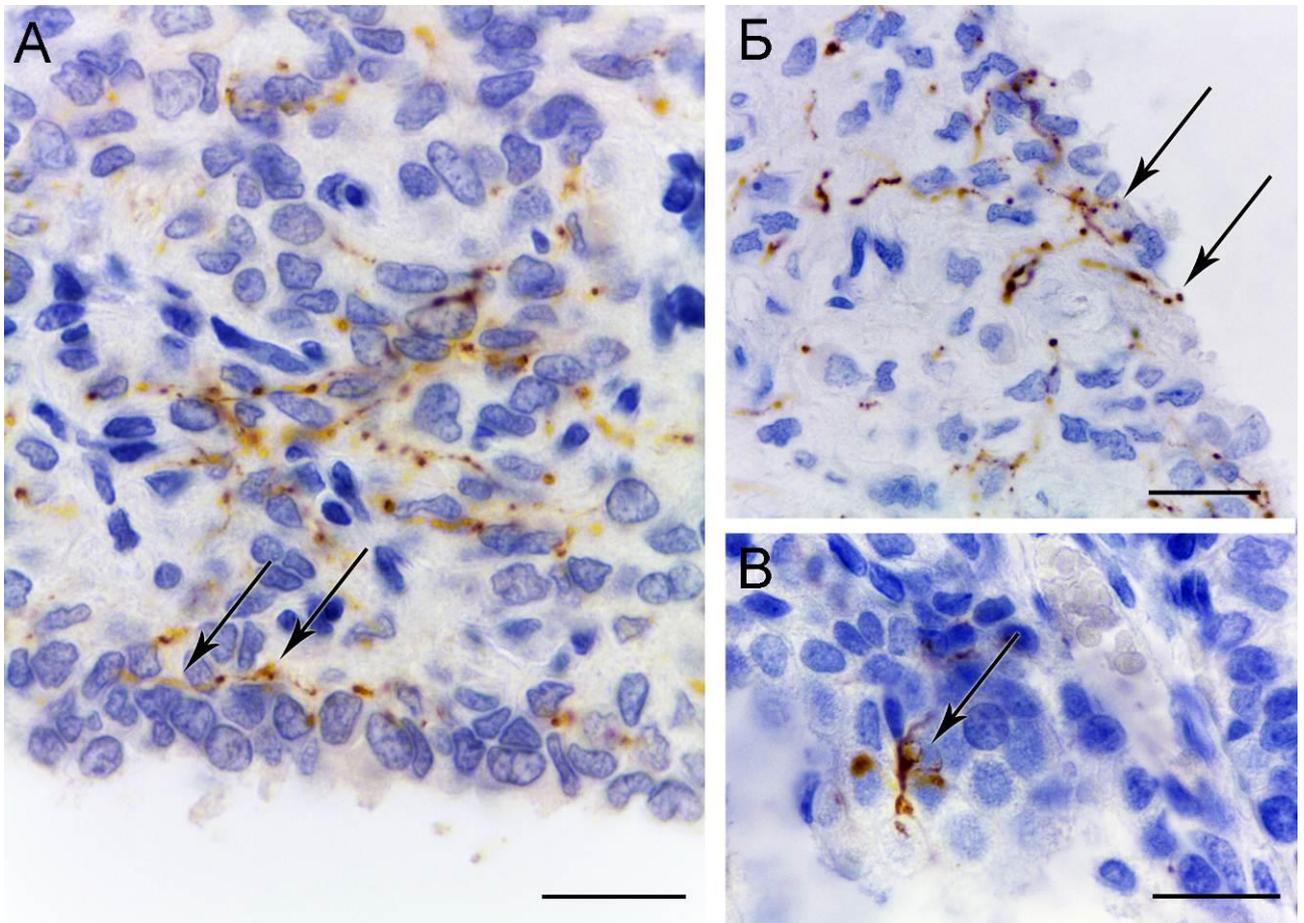


Рисунок 36 – Особенности локализации ТГ-положительных волокон в СФО. Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу с подкраской гематоксилином. а – 30-е постнатальные сутки, стрелки указывают на субэпендимные волокна; б – взрослое животное, стрелки указывают на волокна в контакте с цереброспинальной жидкостью; в – ТГ-положительная реакция в сосудистом сплетении. Стрелка указывает на катехоламинергические волокна. Масштабный отрезок: 20 мкм.

Плотность распределения катехоламинергических волокон в центральной зоне субфорикулярного органа половозрелых животных возрастает и на этом сроке сравнима с таковой в латеральной зоне. ТГ-иммунопозитивные отростки центральной зоны длинные, активно ветвятся и пронизывают СФО вертикально от прилегающего белого вещества и до субэпендимной зоны. Значительная часть отростков занимает субэпендимное положение. Как и на Р30, отдельные катехоламинергические волокна у взрослых животных находятся в прямом контакте с СМЖ. В составе септальных вен отмечены ТГ-иммунопозитивные периваскулярные

клетки. Можно заметить, что интенсивность реакции на ТГ снижается в rostrocaudальном направлении, и в ростральном СФО наблюдается малое количество катехоламинергических волокон. Однако здесь отмечали наличие слабоокрашенных ТГ-положительных клеток (**рис. 37а**). У старых животных вертикально ориентированные отростки катехоламинергических клеток центральной зоны становятся еще более разветвленными (**рис. 35г**). Вблизи кровеносных сосудов могут располагаться наиболее крупные расширения ТГ-иммунопозитивных волокон, диаметр которых достигает 5-8 мкм (**см. рис. 38**).

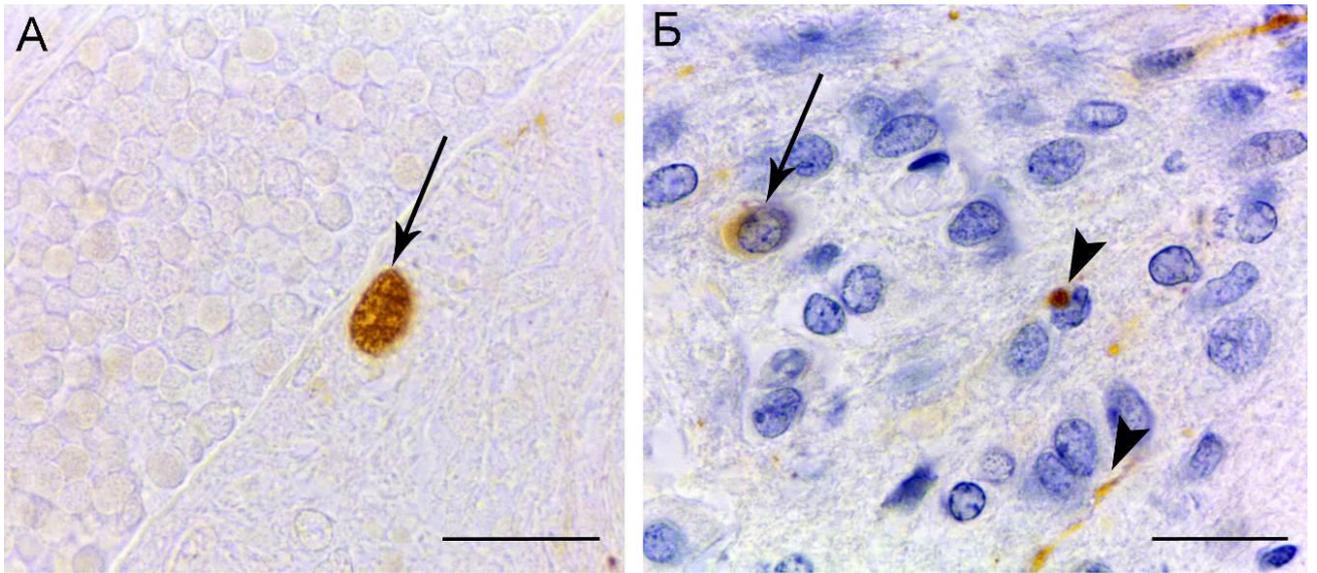


Рисунок 37 – Клетки в составе СФО, содержащие тирозингидроксилазу. Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу с подкраской гематоксилином. Стрелки указывают на ТГ-положительные клетки, головка стрелки – катехоламинергические волокна. а – периваскулярная клетка рядом с септальной веной; б – ТГ-положительная клетка СФО. Масштабный отрезок: 20 мкм.

С целью изучить пространственную организацию катехоламинергических волокон в СФО была поставлена двойная иммунофлуоресцентная реакция на виментин и тирозингидроксилазу. В результате иммуногистохимической реакции четко выявляются ТГ-положительные волокна и виментин-положительные эпендимоциты и танициты, и их удлиненные отростки (**рис. 39**). Эти отростки прослеживаются на большом расстоянии и проходят через весь СФО. Часть отростков оканчивается на кровеносных сосудах внутри СФО. ТГ-положительные волокна направляются параллельно отросткам эпендимоцитов и таницитов и часто идут совместно с ними.

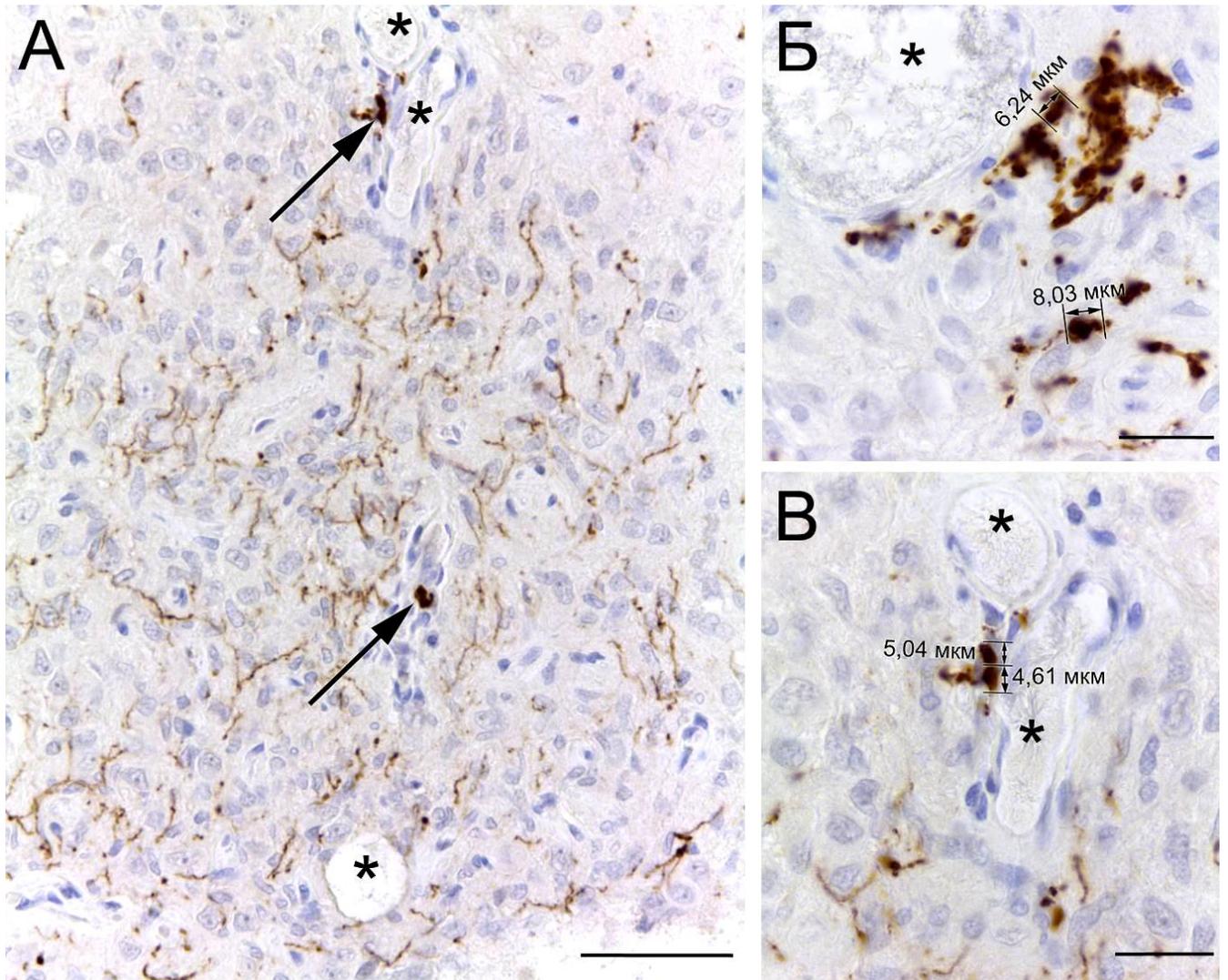


Рисунок 38 – Морфологические особенности катехоламинергических волокон в СФО старых крыс. Иммуногистохимическая реакция на ТГ с подкраской гематоксилином. а – центральная зона СФО; б, в – крупные утолщения катехоламинергических волокон вблизи сосудов. Звездочки обозначают просветы сосудов, стрелки указывают на утолщения иммунопозитивных волокон. Масштабные отрезки: 50 мкм (а), 20 мкм (б, в).

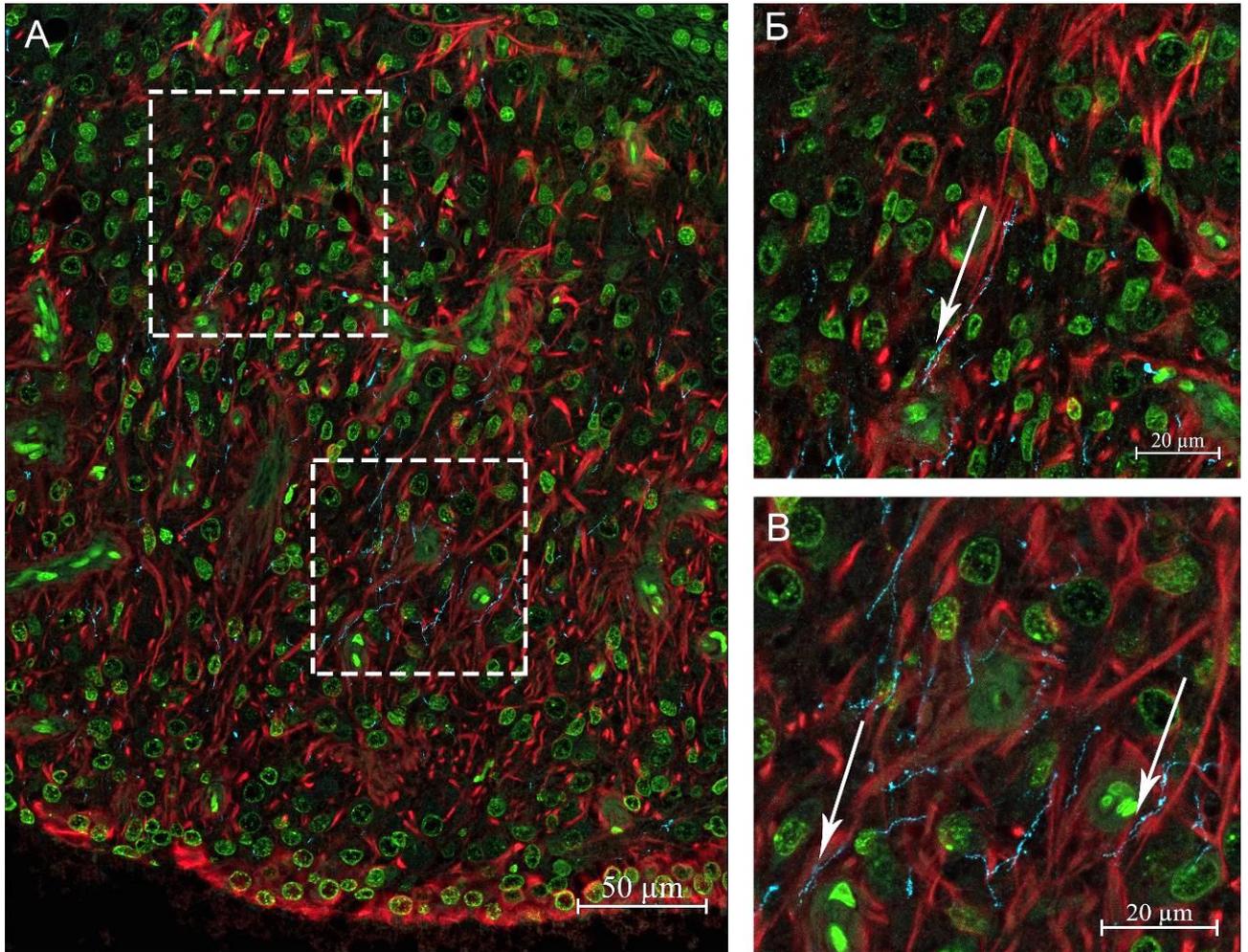


Рисунок 39 – Пространственное распределение виментина и тирозингидроксилазы в тканях субфорникального органа. Двойная иммунофлуоресцентная реакция на виментин (красный) и ТГ (голубой) с подкраской ядер SytoxGreen (зеленый). Конфокальная лазерная микроскопия. Двухмерная проекция 3х оптических срезов панорамы из 12-ти кадров. Величина Z-серии – 1 мкм. а – общий вид. Рамки ограничивают области, представленные на б, в; б, в – области интереса на большом увеличении. Стрелки указывают на совместно расположенные отростки эпендимоцитов СФО и ТГ-положительные волокна. Масштабные отрезки: 50 мкм (а), 20 мкм (б, в).

4.4. Организация ГАМК-ергических синаптических нервных окончаний

Для морфометрической оценки синаптических терминалей ГАМК-ергических клеток было проведено исследование с применением высокочувствительных методов конфокальной лазерной микроскопии. В качестве объекта морфометрического исследования были выбраны аксосоматические ГАМК-ергические синапсы на глутаматергических пирамидных нейронах и ГАМК-ергических интернейронах различных областей коры на трех стадиях постнатального

развития (30-дневные, половозрелые и старые животные).

В ходе проведения анализа было выявлено, что исследуемые ГАМК-ергические терминалы у крыс Вистар представляют собой относительно крупные структуры и располагаются равномерно по периметру клетки (рис. 40). Часто терминалы формируют скопления по 3-5 синаптических бутонов (рис. 40в).

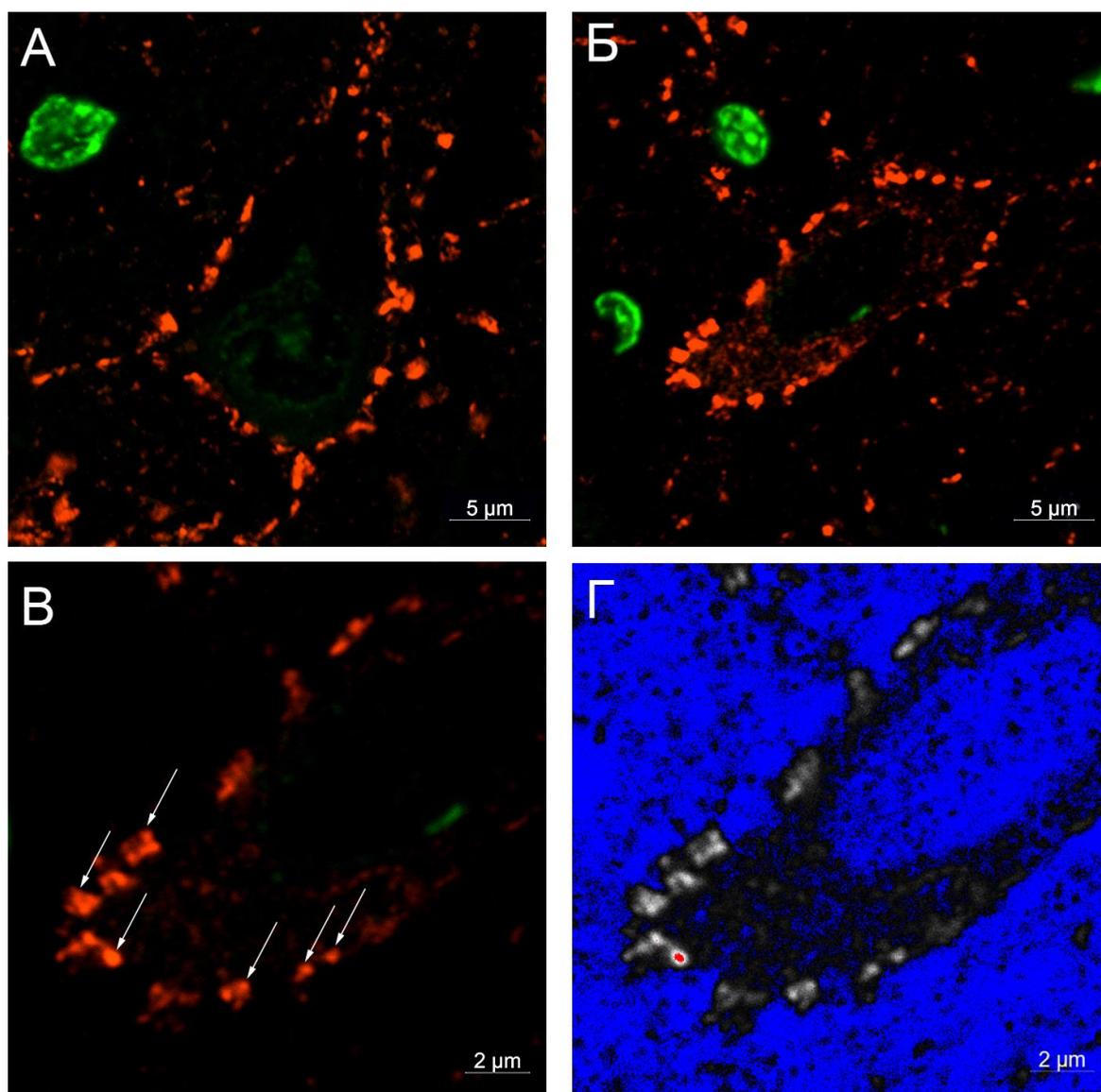


Рисунок 40 – Синаптические терминалы на телах нейронов в головном мозге половозрелых крыс. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 (красный) с подкраской ядер SytoxGreen (зеленый). а – пирамидный нейрон III слоя коры; б – корковый ГАМК-ергический интернейрон; в – корковый ГАМК-ергический интернейрон, большое увеличение; г – корковый ГАМК-ергический интернейрон, большое увеличение, профиль Range Indicator. Стрелки указывают на ГАМК-ергические синаптические терминалы.

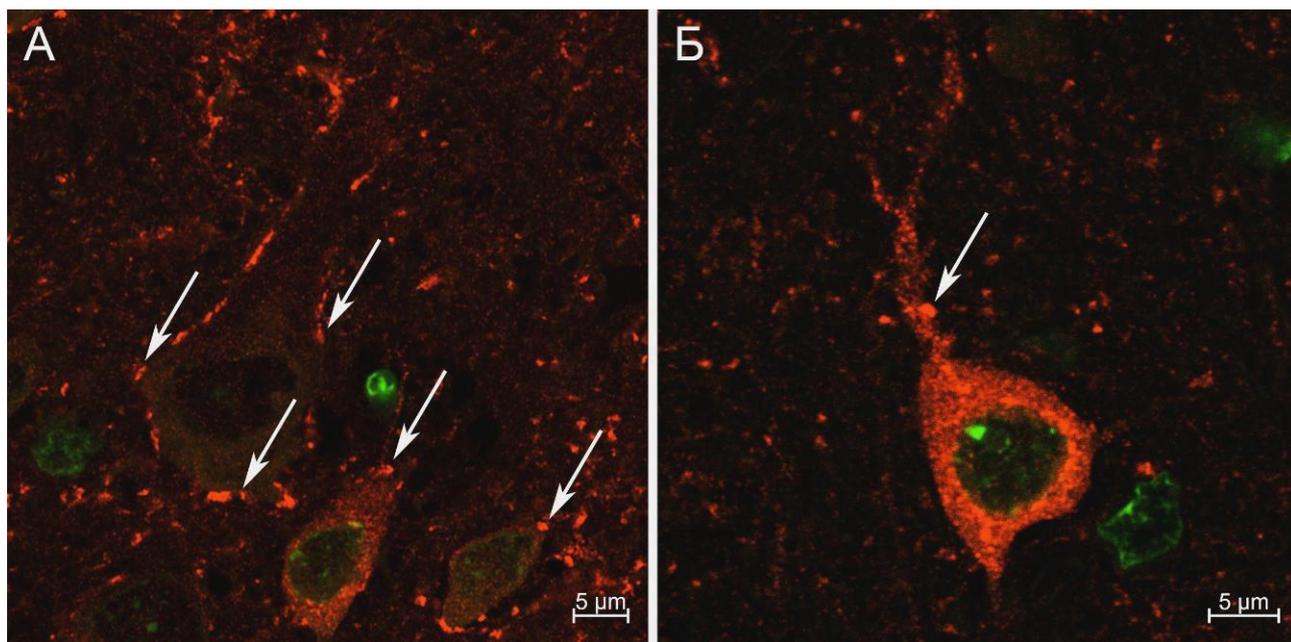


Рисунок 41 – Синаптические терминалы на телах нейронов в головном мозге 30-дневных крыс. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 (красный) с подкраской ядер SytoxGreen (зеленый). а – пирамидный нейрон V слоя цингулярной коры; б – корковый ГАМК-ергический интернейрон. Стрелки указывают на ГАМК-ергические синаптические терминалы.

У 30-дневных животных аксосоматические терминалы на телах пирамидных нейронов небольшие (**рис. 41а**) во всех изученных областях коры: в среднем $0,3 \pm 0,09$ мкм² для цингулярной, $0,37 \pm 0,11$ мкм² для сенсомоторной и $0,22 \pm 0,05$ мкм² для пириформной, – и их размеры не отличаются статистически (one-way ANOVA, $F=4,22$, $P=0,05$). Вариабельность размеров пресинаптических терминалы в пределах трех разных областей на этом сроке низкая, размах размера площадей составляет $0,2$ мкм² в цингулярной коре, $0,24$ мкм² в сенсомоторной и $0,11$ мкм² в пириформной (**рис. 44б**). Наибольшей плотностью распределения обладают аксосоматические терминалы сенсомоторной коры: $7,31 \pm 0,28$ синаптических бутонов на 10 мкм цитоплазматической мембраны пирамидного нейрона (как показано с помощью однофакторной ANOVA с применением post-hoc критерия Тьюки, $F=15,65$, $P=0,0012$). Средние значения этого параметра в цингулярной и пириформной коре на этом сроке равны $6,13 \pm 0,47$ мкм² и $5 \pm 0,86$ мкм², соответственно. Размер самих пирамидных нейронов также оказывается различным и составляет $113,9 \pm 3,28$ мкм² для цингулярной области коры, $169 \pm 16,5$ мкм² для сенсомоторной и $82,86 \pm 16,84$ мкм² для пириформной. С помощью статистического анализа показано, что различия между значениями этих параметров достоверны (one-way ANOVA, post-hoc критерий Тьюки, $F=40,3$, $P<0,0001$). Согласно результатам статистического анализа, наиболее крупные пирамидные нейроны находятся в области сенсомоторной коры. Небольшой

вариабельностью как между отделами коры, так и по сравнению с синаптическими окончаниями на пирамидных нейронах, отличаются на этом сроке развития пресинаптические терминалы на интернейронах (two-way ANOVA, результаты по фактору «тип нейронов» $F=0,2$, $P=0,66$, результаты по фактору «отдел коры» $F=0,2$, $P=0,82$). Средние значения площади ГАМК-ергических терминалей на телах интернейронов составляют $0,29 \pm 0,12$ мкм² в цингулярной, $0,3 \pm 0,1$ мкм² в сенсомоторной и $0,38 \pm 0,17$ мкм² в пириформной областях коры. Следует отметить, что ГАМК-ергические синаптические терминалы на GAD67-содержащих интернейронах наблюдаются в небольших количествах, порядка 1-5 синаптических бутона на клетку (см. рис. 41б).

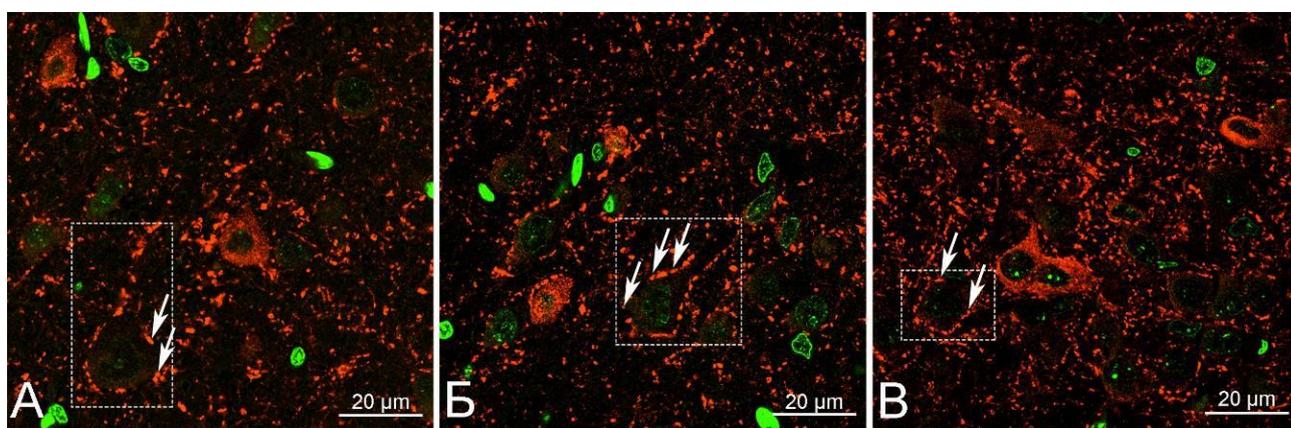


Рисунок 42 – ГАМК-ергические синаптические терминалы на пирамидных нейронах разных областей коры головного мозга половозрелой крысы. Иммуногистохимическая реакция на GAD67, визуализация с помощью флуорохрома Cy3 (красный) с окраской ядер SytoxGreen (зеленый). а – сенсомоторная кора; б – цингулярная кора; в – пириформная кора. Рамка ограничивает пирамидный нейрон, стрелки указывают на ГАМК-ергические синаптические терминалы.

У половозрелых животных пресинаптические терминалы на пирамидных нейронах крупнее (см. рис. 40а, 44а), а их размеры в пределах одной области коры сильнее варьируют. Статистической достоверности в размерах по сравнению с предыдущим сроком достигают аксосоматические терминалы на больших пирамидах сенсомоторной коры (one-way ANOVA, post-hoc критерий Тьюки, $F=5,28$, $P=0,03$). В областях цингулярной и сенсомоторной коры размеры синаптических окончаний колеблются в пределах $0,5-0,9$ мкм² (в среднем $0,69 \pm 0,25$ мкм² и $0,66 \pm 0,16$ мкм² соответственно). Наиболее мелкие синаптические бутоны наблюдали в пириформной коре (рис. 43в), их размеры не выходили за пределы $0,5$ мкм² (в среднем $0,35 \pm 0,12$ мкм²). Наибольшим разбросом значений площади синаптических терминалей

характеризуется цингулярная кора, размах значений равен $0,51 \text{ мкм}^2$. В сенсомоторной и пириформной областях коры размах составляет $0,35 \text{ мкм}^2$ и $0,28 \text{ мкм}^2$ соответственно. Плотность распределения синаптических бутонов на единицу длины в различных областях примерно одинакова в областях старой коры и составляет в среднем 5 синапсов на 10 мкм, а именно: $5,26 \pm 0,44$ на 10 мкм для цингулярной и $5,12 \pm 0,4$ на 10 мкм для пириформной (**рис. 44в**). В области неокортекса плотность распределения пресинаптических терминалей незначительно повышается и равна $6,57 \pm 0,56$ на 10 мкм (Kruskal-Wallis test, post-hoc критерий Данна, $H=7,15$, $P=0,015$). При этом размеры тел самих пирамидных нейронов в неокортексе ($213,7 \pm 10,74 \text{ мкм}^2$) существенно превосходят размеры тел в областях старой коры ($124 \pm 8,13 \text{ мкм}^2$ в цингулярной и $114,3 \pm 16,95 \text{ мкм}^2$ в пириформной), что дополнительно подтверждается статистическим анализом (one-way ANOVA, post-hoc критерий Тьюки, $F=76,98$, $P<0,0001$). По сравнению с предыдущим сроком размеры пирамидных нейронов сенсомоторной и цингулярной коры также возрастают статистически достоверно (one-way ANOVA, post-hoc критерий Тьюки, $F=5,28$, $P=0,03$ для области сенсомоторной коры, Kruskal-Wallis test, post-hoc критерий Данна, $H=7,65$, $P=0,008$ для области цингулярной коры). Размеры пресинаптических терминалей на ГАМК-ергических интернейронах оказываются сходны с размером синаптических окончаний на пирамидных нейронах ($0,46 \pm 0,15 \text{ мкм}^2$ в цингулярной, $0,49 \pm 0,17 \text{ мкм}^2$ в сенсомоторной, $0,32 \pm 0,09$ в пириформной) и остаются постоянными в пределах исследуемых областей коры (two-way ANOVA, результаты по фактору «тип нейронов» $F=4,45$, $P=0,05$, результаты по фактору «отдел коры» $F=1,6$, $P=0,25$).

У животных, достигших возраста 23-х месяцев размеры синапсов незначительно снижаются, при этом плотность их распределения на единицу длины возрастает. В области пириформной коры (**см. рис. 44в**) различия в плотности распределения по сравнению с предыдущими исследованными сроками достигают статистической значимости (one-way ANOVA, post-hoc критерий Тьюки, $F=23,01$, $P=0,0003$). Размеры синаптических терминалей на пирамидных нейронах равны $0,52 \pm 0,24 \text{ мкм}^2$ и $0,33 \pm 0,05 \text{ мкм}^2$ для цингулярной и пириформной областей коры, соответственно, и $0,52 \pm 0,09 \text{ мкм}^2$ для неокортекса. Наибольшей вариабельностью размеров отличаются пресинаптические терминали цингулярной коры, размах площадей которых составляет $0,51 \text{ мкм}^2$ по сравнению с $0,21 \text{ мкм}^2$ в сенсомоторной и $0,12 \text{ мкм}^2$ в пириформной (**рис. 44б**). Плотность их распределения составляет около 7-8 пресинаптических бутонов на 10 мкм плазмалеммы: $7,04 \pm 1,5$ на 10 мкм в цингулярной, $7,61 \pm 0,49$ на 10 мкм в пириформной и $7,92 \pm 1,48$ на 10 мкм в сенсомоторной коре. Наименьшим размером пирамидных нейронов характеризуется пириформная область коры (по сравнению с

сенсомоторной, Kruskal-Wallis test, post-hoc критерий Данна, $H=9,85$, $P=0,0002$). В этой же области коры размеры пирамидных нейронов снижаются по сравнению с размерами клеток у половозрелых животных (Kruskal-Wallis test, post-hoc критерий Данна, $H=6,96$, $P=0,019$). Различия в размерах пресинаптических терминалей на интернейронах всех изученных отделов коры остаются статистически недостоверными для всех сроков (two-way ANOVA, результаты по фактору «срок постнатального развития» $F=2,53$, $P=0,1$, результаты по фактору «отдел коры» $F=0,08$, $P=0,92$). Несмотря на то, что значения размеров синаптических терминалей на интернейронах широко варьируют на протяжении всего постнатального развития, отмечено, что в области сенсомоторной коры к 23-м месяцам размах значений имеет небольшую величину (как можно увидеть на рис. 44г) и составляет $0,09 \text{ мкм}^2$.

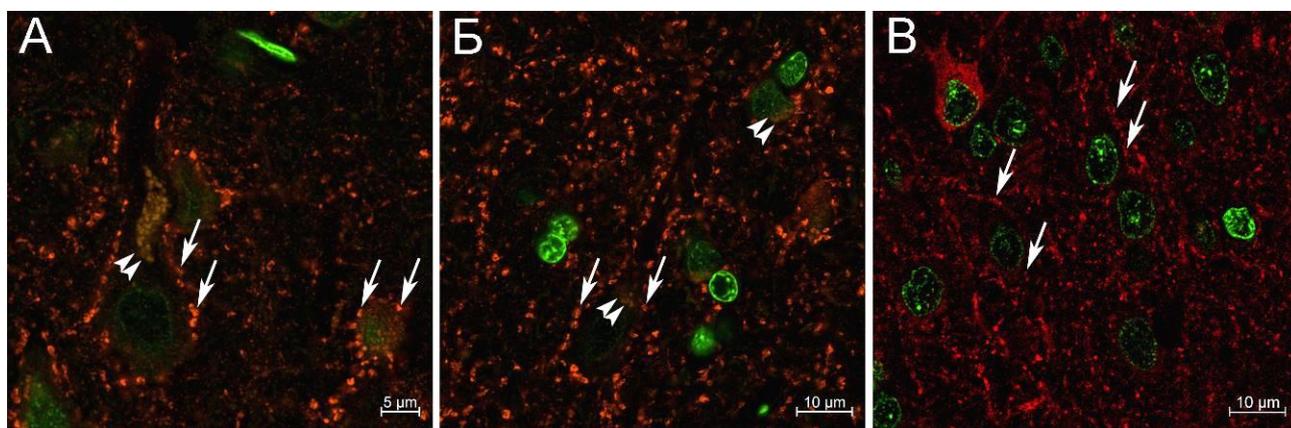


Рисунок 43 – ГАМК-ергические синаптические терминали на клетках разных областей коры головного мозга старых крыс. Иммуногистохимическая реакция на GAD67, визуализация с помощью флуорохрома Cy3 (красный) с окраской ядер SytoxGreen (зеленый). а – сенсомоторная кора; б – цингулярная кора; в – пириформная кора. Стрелки указывают на ГАМК-ергические синаптические терминали, двойные стрелки – скопления липофусцина в цитоплазме клеток.

Результаты проведенных измерений представлены в таблице (Табл. 2)

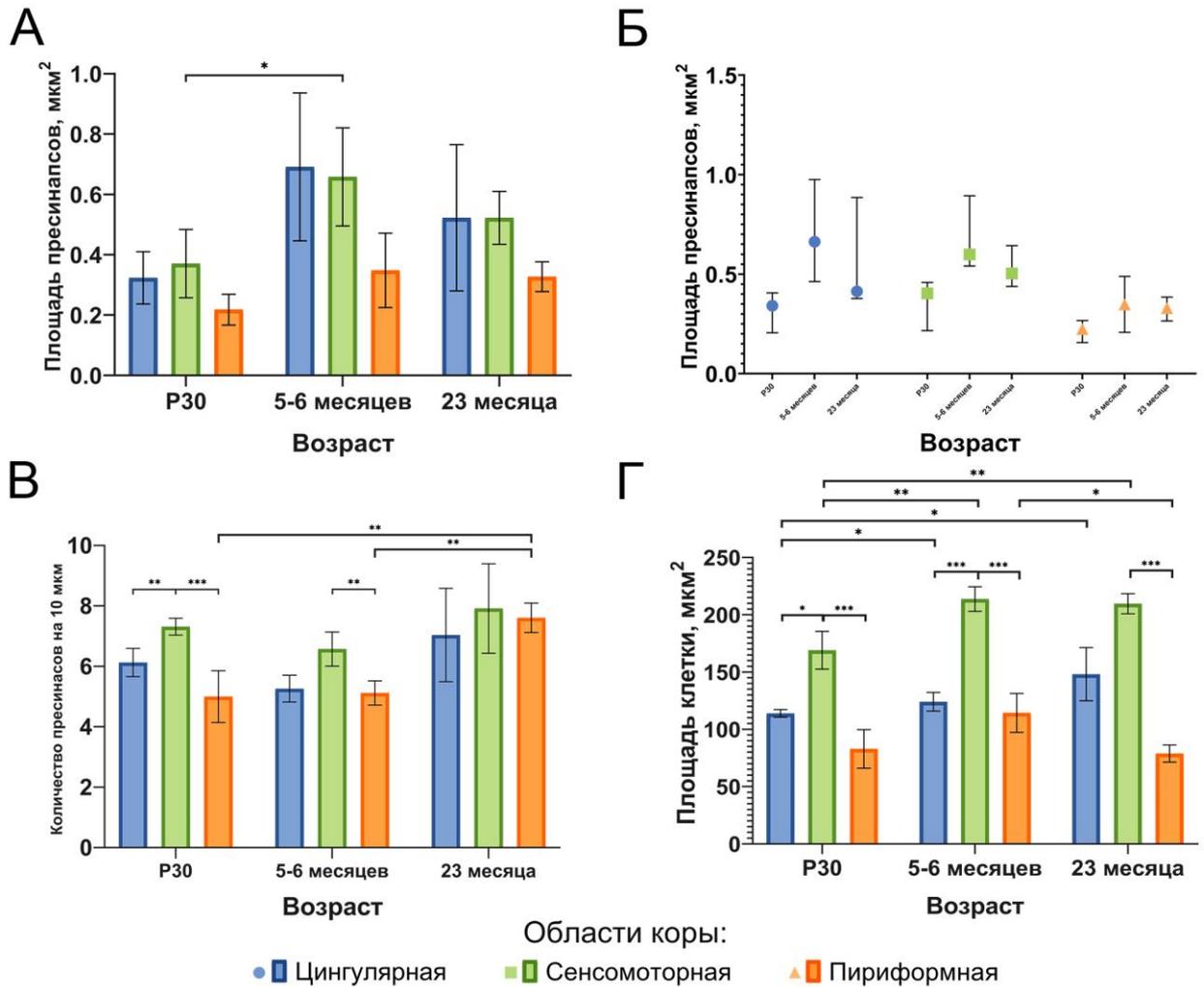


Рисунок 44 – Некоторые морфометрические показатели ГАМК-ергических аксосоматических терминалей на пирамидных нейронах разных областей коры головного мозга крыс на трех сроках постнатального развития. Данные представлены в виде среднего \pm стандартного отклонения (а, в, г) и медианы \pm размаха (б). а, б – размер (area) ГАМК-ергических пресинаптических терминалей; в – плотность распределения синаптических терминалей на единицу периметра пирамидного нейрона (10 мкм); г – размер (area) пирамидных нейронов. P30 – 30-е постнатальные сутки. P-value: * – $<0,05$; ** – $<0,01$; *** – $<0,001$.

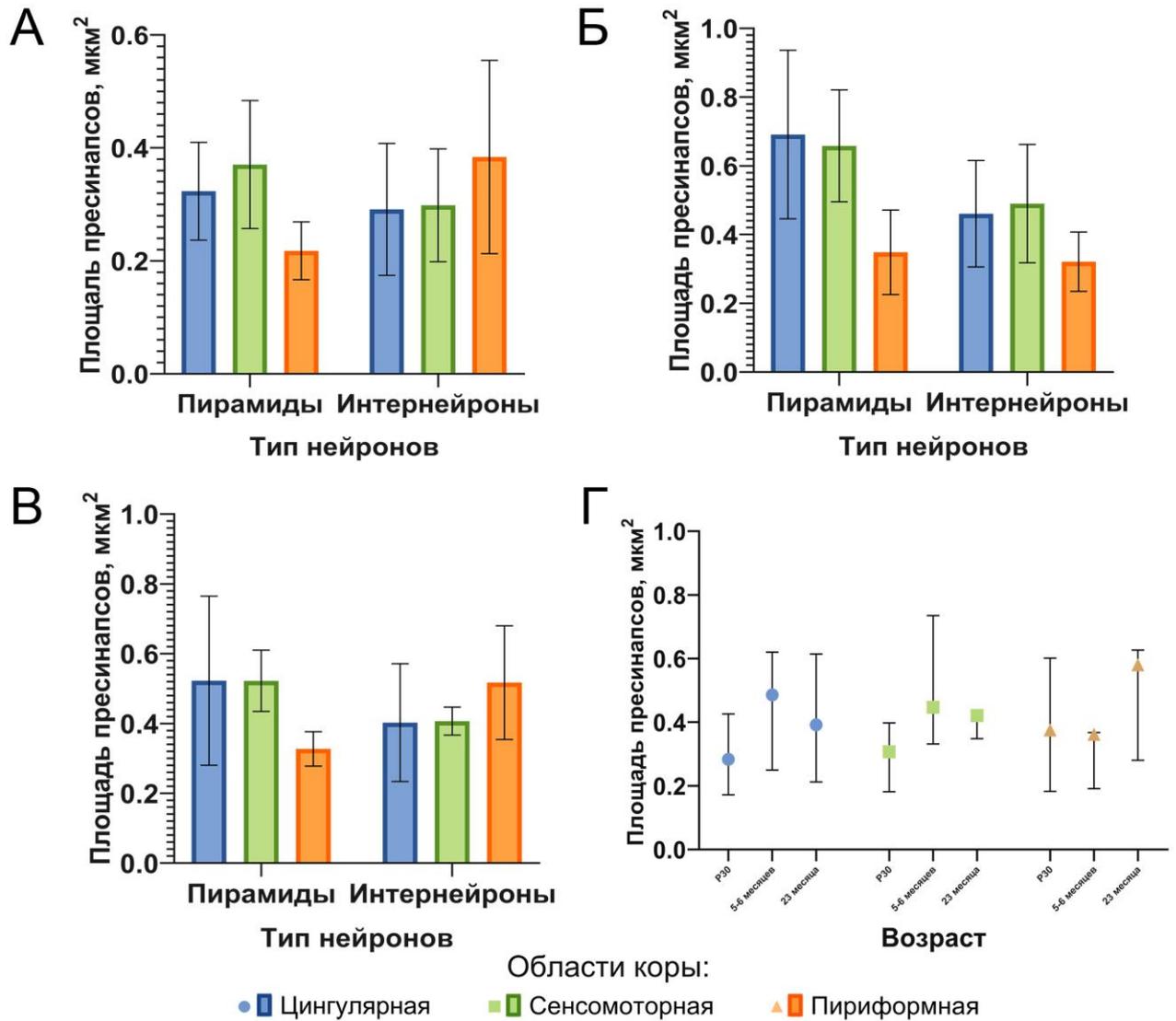


Рисунок 45 – Сравнение размеров (area) ГАМК-ергических пресинаптических терминалей разных областей коры головного мозга крыс на трех сроках постнатального развития. Данные представлены в виде среднего \pm стандартного отклонения (а-в) и медианы \pm размаха (г). а – 30-е сутки постнатального развития; б – половозрелое животное; в – старое животное; г – размер (area) ГАМК-ергических пресинаптических терминалей на интернейронах. P30 – 30-е постнатальные сутки. P-value: * – $<0,05$; ** – $<0,01$; *** – $<0,001$.

Таблица 2 – Морфометрическая характеристика ГАМК-ергических синаптических терминалей и пирамидных нейронов трех областей коры головного мозга крысы на разных сроках постнатального развития (среднее \pm стандартное отклонение).

Параметры	Срок развития	Область коры		
		Сенсомоторная	Цингулярная	Пириформная
Размер пирамидных нейронов, мкм ²	1 месяц	169 \pm 16,5	113,9 \pm 3,28	82,86 \pm 16,84
	5-6 месяцев	213,7 \pm 10,74	124 \pm 8,13	114,3 \pm 16,95
	23 месяца	209,6 \pm 8,78	148,1 \pm 23,21	78,83 \pm 7,48
Плотность распределения синапсов на единицу длины периметра пирамидного нейрона (10 мкм)	1 месяц	7,31 \pm 0,28	6,13 \pm 0,47	5 \pm 0,86
	5-6 месяцев	6,57 \pm 0,56	5,26 \pm 0,44	5,12 \pm 0,4
	23 месяца	7,92 \pm 1,48	7,04 \pm 1,54	7,61 \pm 0,49
Размер пресинаптических терминалей на пирамидных нейронах, мкм ²	1 месяц	0,37 \pm 0,11	0,32 \pm 0,09	0,22 \pm 0,05
	5-6 месяцев	0,66 \pm 0,16	0,69 \pm 0,25	0,35 \pm 0,12
	23 месяца	0,52 \pm 0,09	0,52 \pm 0,24	0,33 \pm 0,05
Размер пресинаптических терминалей на интернейронах, мкм ²	1 месяц	0,3 \pm 0,1	0,29 \pm 0,12	0,38 \pm 0,17
	5-6 месяцев	0,49 \pm 0,17	0,46 \pm 0,15	0,32 \pm 0,09
	23 месяца	0,41 \pm 0,04	0,4 \pm 0,17	0,52 \pm 0,16

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведенного исследования нами были охарактеризованы возрастные изменения структурно-функциональной организации GAD-содержащих клеток и их синаптических терминалей в различных отделах конечного мозга (неокортекс, субпаллиум, барьерные структуры) на протяжении всего постнатального онтогенеза. В результате был определен ряд морфологических и цитохимических признаков дифференцировки этих структур в ходе раннего развития, а также описаны изменения, которым они подвергаются в ходе естественного старения.

5.1. Развитие и старение ГАМК-ергической системы коры головного мозга

Было продемонстрировано, что дифференцировка и созревание ГАМК-ергических структур, выявляемых с помощью ИГХ реакции на глутаматдекарбоксилазу (тела клеток и синаптические терминали), продолжают в ходе раннего постнатального развития головного мозга крыс.

Отличительной особенностью коры 7-дневных крыс является четко выраженная реакция на GAD67, но не GAD65, в первом слое во всех областях коры. Эта реакция обусловлена скоплением большого количества ГАМК-ергических синаптических терминалей, и лишь в цингулярной и пириформной областях коры наблюдалась реакция перикарионов на фермент. Как известно, в первый слой коры свои аксоны проецируют клетки Мартинотти, где они устанавливают синаптические связи с апикальными дендритами пирамидных клеток (Wang et al., 2004). Учитывая данные Favuzzi и соавт. (Favuzzi et al., 2019), согласно которым, большинство тормозных синапсов в течение первой недели постнатального развития создается клетками Мартинотти, можно полагать, что именно их синаптические терминали выявлялись при исследовании препаратов верхних слоев неокортекса. При этом, судя по данным настоящего исследования, ГАМК-ергическая трансмиссия в первом слое коры обеспечивается, в основном, за счет работы фермента изоформы GAD67. Заметная активность GAD65, которую можно предполагать, судя по усиленной интенсивности реакции на этот маркер, присуща клеткам, посылающим свои аксоны в первый слой инсулярной, пириформной и цингулярной коры. Как и в случае с другими отделами коры, такими клетками могут оказаться ранние нейроны Мартинотти. Отмеченная в соответствии с полученными результатами исследования слабая представленность GAD65 в коре молодых животных ставит вопрос о функциональном значении активности изофермента в раннем постнатальном развитии. Описанные ранее эксперименты на грызунах, нокаутных по *gad1* или *gad2* (Asada et al., 1997; Jiang et al., 2022),

позволили установить, что синтез ГАМК в перинатальном периоде обеспечивается, в основном, именно GAD65 (71% от всего уровня ГАМК на E20 у крыс и 87% на P0 у мышей). Таким образом, вклад GAD67 в синтез ГАМК во время эмбрионального развития ЦНС крыс довольно низок. Однако, судя по полученным нами данным, к концу первой постнатальной недели, по-видимому, большое значение приобретает накопление именно GAD67, и только в областях, связанных с лимбической системой (Vogt, 2019), содержание GAD65 соответствует содержанию другой изоформы. При дальнейшем развитии интенсивности ИГХ реакции разных изоферментов выравниваются. Интересно, что на всех изученных сроках, начиная с P14, присутствие фермента GAD65 отмечали не только в синаптических терминалях, но и в перикарионах отдельных клеток. Они распространены по всему объему коры (за исключением слоя I) на препаратах 14-дневных крыс, и в дальнейшем встречаются достаточно редко, в основном, в лимбических отделах коры: в инсулярной коре и области пояса. Такая локализация не является классической для GAD65, поскольку традиционно считается, что эта изоформа фермента в основном связана с синаптическими терминалями (Pinal, Tobin, 1998). Это обусловлено функциональной активностью GAD65 и обеспечивается с помощью быстрого транспорта к пресинаптическим терминалям (Kajita, Mushiake, 2021). Известно, что ассоциация GAD65 с мембранами транспортных везикул определяется двумя последовательными раундами посттрансляционных модификаций N-концевого домена (Namchuk et al., 1997). Первый из этих раундов позволяет GAD65 ковалентно связываться с мембранами ЭПР и аппарата Гольджи и циркулировать между этими органеллами, и только после второго раунда происходит закоривание фермента в мембранах синаптических везикул (Shi, Veit, Baekkeskov, 1994). Таким образом, можно предположить три возможных фактора, приводящие к высокому содержанию GAD65 в перикарионе нейронов: высокая скорость синтеза белка, медленная посттрансляционная модификация или торможение транспорта фермента к синаптическим сайтам. До этого присутствие GAD65 в цитоплазме регистрировали только в результате экспериментальных модификаций внутриклеточного распределения белка, например, с использованием агентов, приводящих к разрушению микротрубочек (таких как колхицин), а следовательно, к нарушению аксонального или дендритного транспорта (Kajita, Mushiake, 2021) или с применением специальных трансгенных конструкций (Wierenga et al., 2010). Таким образом, наличие GAD65 не только в терминалях, но и в цитоплазме клеток, при физиологических условиях в настоящей работе отмечено впервые. Несмотря на то, что функциональная связь накопления GAD65 в соме с другими внутриклеточными процессами остается неясной, по-видимому, она имеет значение для развития головного мозга.

Возвращаясь к обсуждению особенностей распределения фермента в первом слое коры на разных этапах развития, следует упомянуть, что GAD-положительные клетки в ходе исследования чаще всего наблюдалось в цингулярной зоне на всех сроках развития. Это соответствует представлениям о сложной структуре этой области коры (Григорьев и др., 2018; Fedosikhina, 1986). Считается, что в первом слое отсутствуют возбуждающие нейроны, а ГАМК-ергические интернейроны представлены двумя классами 5-HT_{3a}R⁺ клеток: нейроглиаформными (Oláh et al., 2009) и однопучковыми клетками (single-bouquet cells) (Jiang et al., 2013). Особенности клеточного состава первого слоя в различных областях коры головного мозга могут быть связаны с функциональной специализацией структур первого слоя коры.

Еще одним важным вопросом, касающимся исследования цитоархитектоники первого слоя, является выявление особенностей структурно-функциональных изменений, происходящих в горизонтальных нейронах Кахаля-Ретциуса. Как было отмечено, эти клетки расположены в I слое развивающегося мозга, а их функция определяется секрецией рилина, градиент которого необходим для правильной миграции нейронов коры во время эмбрионального и раннего постнатального развития (Kohn et al., 2015). Поскольку клетки Кахаля-Ретциуса, как во время эмбрионального, так и во время постнатального развития, содержат на мембранах ГАМК_A-рецепторы, а ГАМК- и соматостатин-содержащие клетки Мартинонни в ходе онтогенеза дифференцируются достаточно рано, рядом авторов было высказано предположение, что наблюдаемые в первом слое ГАМК-ергические терминалы принимают участие в формировании колонок головного мозга за счет регуляции работы клеток Кахаля-Ретциуса (Cheng, Yeh, Yeh, 2006; Gonchar, Wang, Burkhalter, 2008; Wang et al., 2004). Дальнейшая судьба горизонтальных нейронов Кахаля-Ретциуса остается вопросом дискуссионным. Согласно исследованиям, проводимым на мышах, эти клетки погибают путем апоптоза в течение первых двух недель постнатального развития (Chowdhury et al., 2010; Derer, Derer, 1990). Существует и гипотеза, что клетки Кахаля-Ретциуса крыс претерпевают фенотипическую трансформацию в горизонтальные ГАМК-ергические клетки. Она основана на том факте, что рилин-содержащие клетки во взрослом мозге относятся к ГАМК-ергическим нейронам (Imamoto et al., 1994; Sarnat, Flores-Sarnat, 2002). В неокортексе мышей, по-видимому, рилин-продуцирующие ГАМК-ергические клетки являются отдельной популяцией нейронов, обеспечивающей, вместе с клетками Кахаля-Ретциуса, регуляцию послойного распределения корковых нейронов (Vilchez-Acosta et al., 2022). Однако это необязательно справедливо в отношении неокортекса крыс. При анализе препаратов крыс P14 в первом слое сенсомоторной

коры были отмечены горизонтальные ГАМК-продуцирующие клетки. В пользу возможности причисления найденных клеток к горизонтальным нейронам Кахаля говорит их морфологическое сходство. Еще одним косвенным доказательством может служить открытие различных областей зарождения клеток Кахаля-Ретциуса (Bielle et al., 2005), говорящее в пользу гетерогенности их популяции, а также в пользу того, что в разных отделах развивающейся коры могут существовать и отдельные субпопуляции. Наши данные, таким образом, свидетельствуют о том, что к концу второй недели постнатального онтогенеза по крайней мере некоторые клетки Кахаля-Ретциуса крыс могут претерпевать фенотипическую трансформацию в ГАМК-ергические интернейроны неокортекса. Показано также, что на последующих сроках ГАМК-ергические клетки, морфологически соответствующие клеткам Кахаля-Ретциуса, часто располагаются непосредственно под оболочками мозга. Это иллюстрирует процесс развития нейропиля, происходящий в ходе раннего постнатального развития. В результате, клетки, которые на более ранних сроках могли находиться в толще I слоя или на его нижней границе, оказываются оттеснены наверх. Согласно классификации ГАМК-ергических клеток коры мыши, рилин-продуцирующие клетки взрослого мозга относятся к нейроглиаформным и однопучковым нейронам (Lim et al., 2018). Таким образом, их функциональная значимость у мышей определяется регуляцией работы интернейронов II/III слоев (Jiang et al., 2013) и внесинаптической экскрецией ГАМК (Oláh et al., 2009). Однако, принимая во внимание межвидовую гетерогенность, литературные и представленные в настоящей работе данные, следует признать, что функцию ГАМК-ергических нейронов Кахаля-Ретциуса крыс еще только предстоит выяснить.

Несмотря на наши данные о том, что первые ГАМК-ергические синапсы можно наблюдать в коре на ранних сроках, сформированные синаптические терминалы на интернейронах коры и GAD-содержащих клетках стриатума в настоящей работе наблюдали к концу первого месяца постнатального развития. У мышей, первые синапсы начинают формироваться на 5-8 постнатальные сутки, а пик синаптогенеза приходится на 10-е сутки (Favuzzi et al., 2019). У крыс активное созревание ГАМК-ергических синапсов также происходит к концу первой постнатальной недели. Показано, что частота спонтанных постсинаптических токов от ГАМК-ергических клеток приобретает статистически достоверные ненулевые значения только к P7, а отношение частот сигналов глутамат/ГАМК превышало единицу до 11-х суток постнатального развития, что говорит о более раннем развитии глутаматергической проводимости по сравнению с ГАМК-ергической (Naskar et al., 2019). Предположительно, это связано с формированием таламокортикальных связей, которые

формируются после первой недели развития (Molnár, Blakemore, 1995). Таким образом, развитие ГАМК-ергической иннервации обусловлено необходимостью обработки сенсорной информации. С помощью поведенческих тестов было выявлено, что на второй неделе жизни крысы действительно начинают исследовать окружающую среду (Naskar et al., 2019). Поэтому кажется логичным, что к середине второй недели постнатального развития, после полного развития моторных и сенсорных функций, происходит усиление синаптогенеза, который продолжается в течение длительного периода до 30-х суток.

При этом синаптические контакты, как коммуникационные единицы ЦНС, обладают высокой пластичностью и на последующих сроках постнатального развития. Морфометрический анализ аксосоматических синаптических терминалей на пирамидных клетках коры показал, что к концу первого месяца развития синаптические бутоны не только еще не достигают средних размеров, которыми они обладают во взрослом возрасте, но и не демонстрируют многообразия в размерах (как показывает размах значений на разных сроках). Интересно, что наибольший размах размеров у синаптических окончаний во взрослом возрасте и у старых животных наблюдается в цингулярной области коры. При этом, размеры самих пирамидных клеток в этой области заметно меньше, чем в сенсомоторной, и сравнимы с размерами пирамидных нейронов пириформной коры. Значительная разница в размерах пирамидных клеток пириформной коры и ГАМК-ергических синаптических терминалей, образованных на телах этих нейронов, по сравнению со значениями в неокортексе, была ожидаема, принимая во внимание то, что эта область относится к палеокортексу, а ее пирамидные нейроны гомологичны скорее пирамидным клеткам III, но не V слоя неокортекса (Klingler, 2017; Luzzati, 2015). Поскольку характерное для палеокортекса распределение интернейронов не совпадает с их распределением в неокортексе, можно сделать предположение, что размеры ГАМК-ергических синаптических терминалей пириформной коры связаны с особенностями citoархитектоники и послойной организацией этой области (Suzuki, Bekkers, 2010). Однако схожие размеры пирамидных нейронов цингулярной коры именно с клетками пириформной, а не сенсомоторной коры оказались неожиданным результатом. В дополнение к этому, плотность распределения синапсов на телах пирамид оказывается близкой именно в этих двух областях. По-видимому, это может быть связано с уникальной организацией поясной коры (Григорьев и др., 2018; Коржевский и др., 2013b).

Распределение и размер синаптических окончаний также меняется при старении, показано, что размеры синапсов снижаются, хотя различия не достигают статистической значимости благодаря размаху значений, а плотность их распределения на единицу длины,

наоборот, возрастает. Колебания плотности отмечается при различных заболеваниях, оказывающих влияние на когнитивные функции, такие как болезнь Альцгеймера и шизофрения (Roberts et al., 2015; Scheff, Price, 2001). Увеличение количества тормозных контактов одновременно с нарушением функций интернейронов наблюдается в пириформной коре при экспериментальном моделировании эпилептических припадков (Gavrilovici et al., 2012; Pollock et al., 2014). Однако изменения, происходящие при старении, следует отличать от изменений, связанных с ухудшением когнитивных функций при патологиях ЦНС. Тем не менее, количество синаптических окончаний на телах пирамидных нейронов может отражать функциональное состояние коры больших полушарий. В частности, снижение размеров синаптических бутонов в совокупности с увеличением плотности их распределения может рассматриваться как компенсаторный ответ на дегенеративные изменения, связанные со старением.

На 30-е сутки постнатального развития регистрировали самое высокое содержание ГАМК-ергических интернейронов среди всех возрастов как в коре, так и в подкорковых структурах. В недавних исследованиях распределения рецепторов ГАМК также было выявлено увеличение плотности ГАМК_B рецепторов от P30 до P90 (Behuet et al., 2019). Поскольку происходит увеличение плотности постсинаптических терминалей, можно было бы ожидать увеличение числа и синаптических терминалей вследствие либо появления новых связей между нейронами, либо увеличения количества самих ГАМК-ергических нейронов. Это позволяет предположить участие ГАМК-ергических нейронов в поздних стадиях развития головного мозга. Ранее было показано, что распределение разных сплайс-изоформ ГАМК_B рецепторов в ходе постнатального онтогенеза было различным. Уровни ГАМК_{B1b} были низкими при рождении, увеличивались после P5, достигали пика на P10 и впоследствии снижались во время созревания (Fritschy, 1999). Этот пик соответствует увеличению плотности рецепторов с P0 до P10, когда они достигают своего максимума, а затем незначительно уменьшаются, но остаются примерно на том же уровне до P90 (Behuet et al., 2019). Однако, согласно результатам проведенного статистического анализа, доля ГАМК-ергических клеток, выявленных в конце второй недели постнатального развития, отличается от доли клеток на сроке P7 незначительно, и только к концу 1-го месяца доля интернейронов возрастает практически в два раза. В связи с этим можно утверждать, что пик, наблюдаемый нами на сроке P30 не является остаточным от сформировавшегося на 10-е сутки, а, напротив, это самостоятельное увеличение числа интернейронов.

Похожие данные получали Ehrlich и соавт. (Ehrlich et al., 2013; Ryan, Ehrlich, Rainnie,

2016) при исследовании другой структуры конечного мозга – базолатерального комплекса миндалевидного тела. На 21-е постнатальные сутки в созревающих нейронах авторы наблюдали кратковременное снижение тока ГАМК через ГАМК_A рецепторы, которое затем восстанавливалось к сроку P28. Дальнейшая морфологическая реконструкция нейронов миндалины крысы на 7-е, 14-е, 21-е, 28-е и 60-е постнатальные сутки показала, что ветвление дендритного дерева и плотность шипиков значительно возрастает к P28. В совокупности эти данные позволили авторам показать, что ГАМК-ергическая система миндалины полностью созревает к концу первого месяца постнатального онтогенеза. В таком случае, можно было бы утверждать, что ГАМК-ергическая система коры и стриатума также достигает показателей, характерных для взрослого мозга, к 30-м суткам постнатального развития. Однако, в таком случае, неясным остается значение падения доли ГАМК-ергических клеток, которое было установлено в коре и стриатуме после P30 – у половозрелых животных. Вероятно, этот пик отражает период наибольшей активности ГАМК-ергической системы, к которому, в рамках настоящего исследования, следует отнести конец первого месяца постнатального развития.

При постановке иммуногистохимической реакции на GAD67 наблюдали окрашивание слабой интенсивности в области инсулярной коры у крыс всех возрастов. Распределение GAD65 в этой области четко контурирует первый и шестой слои, а содержание фермента в II-V слоях оценивали как незначительное. Ключевыми нейротрансмиттерами этой области коры считаются ГАМК и дофамин. ГАМК-ергические интернейроны инсулярной коры получают сигналы от аксонов дофаминергических нейронов вентральной области покрышки (Ohara et al., 2003). Поскольку исследования показали, что дофаминергическая стимуляция может влиять на уровни синтеза мРНК GAD67 (Rétaux, Trovero, Besson, 1994), а активация μ -опиоидных рецепторов снижает высвобождение ГАМК из синаптических терминалей (Reeves et al., 2022), можно предположить, что низкое содержание фермента в инсулярной коре может быть связано с дофаминовым контролем.

Низкое содержание глутаматдекарбоксилазы также могло бы быть связано с преобладанием далекопроецирующих интернейронов над интернейронами, образующими связи внутри области инсулярной коры. Поскольку GAD65 и GAD67, в отличие от других ферментативных маркеров нейронов: тирозингидроксилазы и холинацетилтрансферазы (Колос и др., 2016), не распределены равномерно по цитоплазме клетки, интенсивность окрашивания кажется меньшей, чем в других зонах коры. Однако на сегодняшний день информации об интернейронном составе этой области и их связях недостаточно, чтобы сделать вывод о снижении интенсивности окрашивания GAD65/GAD67 в связи с преобладанием

далекопроецирующих нейронов в инсулярной области коры.

Наблюдение, касающееся сниженной интенсивности реакции на глутаматдекарбоксилазу в области инсулярной коры, повлекло за собой дополнительное исследование с использованием иммуногистохимического выявления тирозингидроксилазы. Оно показало неоднородность распределения ТГ-иммуноположительных волокон и терминалей в отделах коры конечного мозга. Высоким содержанием катехоламинергических волокон на ранних постнатальных сроках и у половозрелых животных отличаются области серого вещества, соответствующие тем отделам лимбической системы, которые тесно связаны с мезокортикальными дофаминергическими нейронами вентральной области покрышки и черной субстанции и норадренергических нервных клеток голубого пятна (Fallon, 1981; Ohara et al., 2003). К таким областям относится и инсулярная кора. С точки зрения послойного распределения довольно интенсивно окрашены нижние слои коры (V-VI) и область пояса, где, в основном, проходят проводящие пути (Григорьев и др., 2018). При этом у старых животных катехоламинергические волокна распределены по всему неокортексу примерно с одинаковой интенсивностью.

Особый интерес к изучению постнатального развития катехоламинергической системы коры головного мозга возникло благодаря данным, иллюстрирующим непрерывное развитие дофаминергической системы вплоть до достижения половой зрелости (Reynolds, Flores, 2021). В частности, показано, что активность дофамина в лобных отделах коры растет линейно с момента рождения и до достижения возраста половой зрелости (Berger et al., 1985a; Reynolds et al., 2018). Это явление авторы связывают с поздним формированием катехоламинергической иннервации в онтогенезе. К примеру, созревание дофаминергической иннервации коры у грызунов продолжается до 90-х постнатальных суток (Areal, Blakely, 2020). В отношении же норадренергической системы головного мозга данные неоднозначны. С одной стороны, отмечают, что активность этой медиаторной системы достигает уровня, характерного для половозрелых крыс, уже на 9-е постнатальные сутки, что указывает на быстрое градуальное созревание норадренергической иннервации (Levitt, Moore, 1979). С другой стороны, исследователи отмечают, что плотность норадренергических волокон окончательно устанавливается лишь к концу третьей недели постнатального онтогенеза (Latsari et al., 2002). С помощью количественного анализа, проведенного в настоящем исследовании, показано, что плотность ТГ-положительных волокон в областях, относящихся к лимбической системе, после 14-го дня постнатального развития имеет тенденцию к увеличению, но остается относительно постоянной в сенсомоторной области коры. Таким образом, опираясь на полученные нами данные, следует согласиться с обеими представленными гипотезами развития и уточнить, что

темпы и интенсивность развития катехоламинергических систем коры имеют свои региональные особенности.

Для сенсомоторной коры отмечена и другая отличительная черта: если для всех изученных стадий в данной области сохраняются относительно постоянные значения плотности волокон, то при старении происходит резкое увеличение этих значений. Вместе с тем, видимых морфологических и морфометрических изменений в остальных изученных областях в ходе нормального старения не наблюдается.

Это кажется неожиданным ввиду общепринятых представлений о преобладании в ЦНС инволюционных процессов над пролиферативными в ходе старения (Зиматкин, 2021), однако, увеличение плотности ТГ-положительных волокон может отражать проходящие в мозге дегенеративные изменения. Так, развивающийся при естественном старении окислительный стресс негативно влияет на состояние катехоламинергической системы (Norrara et al., 2018), поэтому представляется логичным возникновение компенсаторных механизмов, препятствующих развивающимся в ходе старения нейродегенеративным процессам. Предполагается также возможным, что данное компенсаторное увеличение плотности волокон может быть вызвано снижением количества рецепторов катехоламинов на клетках-мишенях при старении (Weiss, Greenberg, Cantor, 1979). Вдобавок к этому, рядом авторов при исследовании глутаматергической медиаторной системы отмечена усиленная активность синаптической передачи при развитии заболеваний, ведущих к ухудшению когнитивных функций (Bell, Bennett, Cuello, 2007; L'Esperance et al., 2024; Taipala et al., 2022). Вполне вероятно, что катехоламинергическая система может реагировать на патологические изменения, приобретенные при старении, сходным образом.

Механизм, благодаря которому происходит разрастание ТГ-позитивных волокон, остается неопределенным. Мы можем полагать, что росту волокон может способствовать усиленная у старых животных экспрессия глиального нейротрофического фактора (Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) в коре (Matsunaga, Isobe, Shirokawa, 2006), который, как известно положительно регулирует уровни катехоламинов головного мозга (Grondin et al., 2019).

Описанные на световом уровне результаты воспроизводятся с применением высокоточных методов сканирующей конфокальной микроскопии. Поскольку толщина оптических срезов конфокального микроскопа задается с помощью программного обеспечения настройками сканирования, полученные изображения устраняют возможные погрешности

толщины изготавливаемых парафиновых срезов. Это сводит к минимуму связанное с этими погрешностями получение ложноположительных результатов. В соответствии с этим, действительно можно полагать, что у катехоламинергических волокон сенсомоторной коры существуют свои структурные особенности, которые проявляются в ходе старения. Однако выявить, какая именно из катехоламинергических систем – дофамин- или норадренергическая – дает подобную реакцию при старении, в рамках настоящего исследования не представляется возможным. Таким образом, данное наблюдение нуждается в дальнейших исследованиях.

Исследование распределения ТГ также выявило в сером веществе коры ТГ-иммунопозитивные клетки. Отмечается, что эти клетки присутствуют у разных видов млекопитающих (Benavides-Piccione, DeFelipe, 2007; Berger et al., 1985b; Satoh, Suzuki, 1990; Weihe et al., 2006). В коре грызунов катехоламинергические нейроны присутствуют преимущественно в глубоких слоях, причем их количество достигает максимума к концу второй недели, а затем постепенно снижается (Berger et al., 1985b; Satoh, Suzuki, 1990). По всей видимости, наличие ТГ-содержащих нейронов характерно для коры на любом сроке постнатального развития, и их отсутствие на срезах мозга взрослых животных скорее связано либо с низкой частотой встречаемости (по сравнению с 7- и 14-дневными крысами), либо вследствие изменений количества базального уровня фермента, присутствующего в этих клетках. Научная группа Asmus (Asmus et al., 2008; Asmus et al., 2011) показала, что ТГ у крыс часто колокализуется в клетках с такими биологически активными соединениями как кальретинин, холинацетилтрансфераза (ХАТ) и ВИП. Поскольку известно, что ХАТ, кальретинин и ВИП являются биохимическими маркерами большой группы ГАМК-ергических интернейронов – 5-НТ3аR⁺, а присутствие в клетке большого количества кальретинина в отсутствие ВИП или ХАТ позволяет отнести интернейроны к группе SST⁺ (Tremblay, Lee, Rudy, 2016), можно полагать, что клетки, наблюдаемые нами в коре, относятся к двум крупнейшим систематическим группам ГАМК-ергических интернейронов коры мозга крысы. Судя по их локализации, ТГ-содержащие клетки стоит отнести к биполярным и интерстициальным 5-НТ3аR⁺ клеткам или к SST⁺ клеткам, не являющиеся клетками Мартинотти. При этом, можно ожидать, что ГАМК-ергические интерстициальные клетки крыс, в отличие от мышинных (Lim et al., 2018), содержат тирозингидроксилазу.

Таким образом, развитие ГАМК-ергической системы коры головного мозга характеризуются рядом структурных и цитохимических перестроек, среди которых переключение синтеза нейромедиатора главным образом на GAD67 в первую неделю постнатального развития, фенотипическая трансформация клеток Кахаля-Ретциуса, наличие

периода повышенной активности в конце первого месяца. Старение коры головного мозга сопровождается компенсаторными изменениями, наиболее примечательными из которых оказываются колебания морфометрических показателей синаптических терминалей и увеличение плотности волокон катехоламинергических клеток сенсомоторной коры.

5.2. Особенности формирования и дезорганизации ГАМК-ергических структур стриопаллидарной системы

Как было показано, наибольшей интенсивностью реакции на глутаматдекарбоксилазу на ранних этапах постнатального развития характеризуются вентральные структуры мозга. К 30-м постнатальным суткам резкое различие в интенсивности окрашивания начинает снижаться. Тем не менее, в подкорковых структурах у половозрелых животных полосатое тело проявляет меньшую интенсивность окрашивания на фермент, чем бледный шар, что сохраняется и при старении. Интересной особенностью распределения как GAD67, так и GAD65, в процессе развития стала ярко выраженная неоднородность скопления иммунопозитивного продукта реакции в стриатуме и латеральном бледном шаре крыс P7, которая исчезает на последующих изученных сроках. Похожая морфологическая картина на ранних сроках развития характерна для катехоламинергических структур стриатума. Во время развития полосатого тела млекопитающих ранняя формирующаяся дофаминовая иннервация распадается на макроскопические участки – дофаминовые островки (Graybiel, 1984). Установлено, что дофаминовые островки соответствуют стриосомным компартментам и состоят из аксонов дофаминовых нейронов черной субстанции (Graybiel et al., 1981; Herkenham, Pert, 1981). Они могут подавлять высвобождение ГАМК путем воздействия на μ -опиоидные рецепторы на пресинаптической мембране MSN в стриосомах (Reeves et al., 2022), а, следовательно, и на активность прямого и непрямого путей стриатума. Тесная взаимосвязь развития катехоламинергической и ГАМК-ергической систем стриатума маркируется, таким образом, морфологическим распределением TH-позитивных и GAD-позитивных структур.

Поскольку эфферентные волокна MSN оказывают тормозное влияние на клетки различных компартментов бледного шара (Prager, Plotkin, 2019; Yager et al., 2015), не кажется удивительным, что раннее развитие нигростриарного пути может отражаться мозаичным распределением фермента и в GP. Помимо этого, как показывает анализ препаратов, в бледном шаре на протяжении всего постнатального развития, по-видимому, наиболее активна именно изоформа GAD65. А при старении заметную ИГХ реакцию на GAD65 наблюдали, как и у крыс P7, в латеральном GP. Как известно, в ходе старения происходит уменьшение общего числа

дофаминергических нейронов вследствие усиления окислительного стресса (Norrara et al., 2018), что приводит к усилению тормозной модуляции бледного шара. Таким образом, распределение GAD65 как в полосатом теле, так и в GP, у старых животных может быть обусловлено компенсаторными механизмами. В соответствии с этим, нами была предпринята попытка представить схему развивающихся и стареющих базальных ганглиев с точки зрения двух нейромедиаторных систем (**рис. 46**).

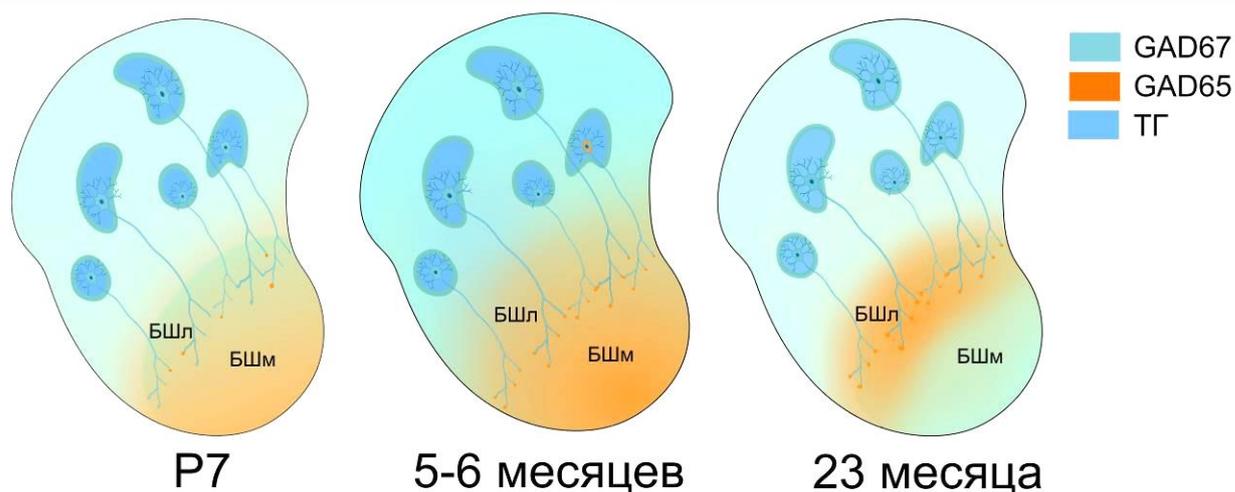


Рисунок 46 – Предполагаемое взаимодействие ГАМК- и дофаминергической систем в раннем постнатальном развитии и при старении. БШм, БШл – бледный шар медиальный и латеральный соответственно, GAD – глутаматдекарбоксилаза, ТГ – тирозингидроксилаза.

В подкорковых структурах на различных сроках также присутствовали клетки с цитоплазматической реакцией на GAD65. На 7-й и 14-й день постнатального развития они расположены в вентральном паллидуме и в преоптической области гипоталамуса, а уже на последующих сроках выявляются в дорсальном и вентральном стриатуме, а также в субвентрикулярной зоне. Отсюда вытекает то, что цитоплазматическое распределение GAD65 не является уникальным для корковых областей конечного мозга, а наоборот – является типичным для ЦНС. Еще одной общей особенностью для коры и подкорковых структур становится наличие нейронов с четко выделенными ядерными инвагинациями. Часто подобные деформации ядра наблюдают в головном мозге пациентов, страдающих различными типами деменций или другими заболеваниями, которые могут сопровождаться деменцией, например, болезнью Альцгеймера (Cristi, Rapuri, Coyne, 2023; Frost, 2023; Paonessa et al., 2019). Их связывают с мутациями Тау-белка (Microtubule-associated protein tau, MAPT), влияющими на неправильную локализацию микротрубочек, что приводит к деформации ядерной ламины и нарушению ядерно-цитоплазматического транспорта (Paonessa et al., 2019). Однако вопросы

корреляции нейродегенеративных заболеваний с наличием ядерных инвагинаций остаются спорными. Исследование срезов моторной коры пациентов с диагностированным боковым амиотрофическим склерозом или лобно-височной деменцией не выявило ни увеличения частоты инвагинаций ядерной оболочки, ни различий в форме или размере ядер по сравнению с контрольными препаратами (Coyne, Rothstein, 2021). По всей видимости, измененная морфология ядра не всегда связана с патологией. В работах по изучению миграции клеток было показано, что деформации ядра, опосредованные ламинами A/C, позволяет клетке двигаться среди волокон коллагена, сохраняя при этом свою морфологию (Katiyar et al., 2022). Вполне вероятно, что инвагинации GAD-содержащих клеток на ранних сроках развития и локализованных в СВЗ нейробластов – на всех исследованных сроках – способствуют именно их перемещению в толще нейропиля. Функциональное значение ядерных инвагинаций в коре и стриатуме более зрелых животных заслуживает отдельного обсуждения. В последние годы стало очевидно, что ядерная оболочка представляет собой нечто большее, чем пассивный барьер, отделяющий ядро от цитоплазмы. Ядерная оболочка не только контролирует транспорт макромолекул между нуклео- и цитоплазмой, но также обеспечивает места закрепления хромосом и цитоскелета на периферии ядра. Так, становится понятным, что ядерная оболочка скелетных мышц и кардиомиоцитов содержит инвагинации, обогащенные саркоплазматической Ca^{2+} -АТФазой 1 (Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 1, SERCA1) (Duan et al., 2019). Кальций в ядре мышечных клеток участвует в регуляции транскрипции генов, а исследования показывают, что концентрация нуклеоплазматического Ca^{2+} в значительной степени определяется концентрацией цитоплазматического (Kiess, Kockskämper, 2019). Таким образом, ядерные инвагинации организуют особый клеточный компартмент, обогащенный кальцием. Справедливо полагать, что активно синтезирующие белок клетки, которыми являются нейроны, могут использовать схожие механизмы для облегчения транспорта биологически активных молекул, влияющих на генную экспрессию.

Продемонстрировано, что GAD67-положительные клетки стриатума к концу первого постнатального месяца можно четко разделить на нейроны с интенсивным и слабым иммуноокрашиванием. Клетки с разной интенсивностью реакции на GAD67 сохранялись и у половозрелых животных, что кажется логичным, судя по данным литературы, однако при старении на препаратах головного мозга оставались только интенсивно окрашенные клетки. В дополнение к этому, при старении в стриатуме крыс пропадает и цитоплазматическая реакция на GAD65. Сниженную экспрессию гена *gad1*, а, следовательно, синтеза GAD67 и гомеостаза ГАМК обычно связывают функциональными нарушениями работы ЦНС, ассоциированными с

когнитивными нарушениями, такими как шизофрения, биполярное и большое депрессивное расстройство (Kimoto, Vazmi, Lewis, 2014; Miyata et al., 2019; Miyata et al., 2021). Однако слабую иммунореактивность части клеток по отношению к GAD67, наблюдаемую в здоровом мозге, очевидно, следует трактовать как вариант нормы. Похожее соотношение интенсивностей окрашивания наблюдали Давила и соавт. (Dávila et al., 2005) при иммуногистохимическом выявлении кальбиндин-содержащих клеток в дорсальной и вентральной части комплекса ограда. Авторы предположили, что интенсивность окрашивания на кальбиндин может быть связана с фенотипом ГАМК-ергических нейронов. Действительно, рекомендации Петильянской терминологии по классификации интернейронов (Ascoli et al., 2008) предполагают возможность отнесения ГАМК-ергических клеток к различным группам в зависимости от их молекулярных свойств, в частности, от уровня содержания того или иного белка в цитоплазме.

Другим предметом обсуждения является причина потери иммунореактивности к GAD67 и GAD65 в стареющем мозге. Относительно уменьшения количества ГАМК-ергических нейронов данные неоднозначны. Одни авторы сообщают об утрате нейронов (Ding et al., 2017), другие – склоняются к тому, что старение не связано с массовой потерей нервных клеток, но скорее с изменением биохимических процессов (снижение тканевого дыхания и синтеза белков) и дезорганизацией ультраструктурных элементов нейронов (Зиматкин, 2021; Rozyska, Liguz-Leczna, 2017). Относительно уменьшения числа ГАМК-ергических клеток при старении наши собственные количественные данные однозначно указывают на сохранение постоянства клеточного состава. Однако, качественный анализ распределения изоформ фермента предоставил дополнительную информацию, согласно которой, ГАМК-ергические клетки стриатума полностью теряют цитоплазматическую активность на GAD65 и частично – на GAD67 (по крайней мере, на уровне чувствительности иммуногистохимического метода). Таким образом, в стареющих ГАМК-ергических клетках подкорковых структур происходят заметные цитохимические перестройки.

Как показано в настоящем исследовании, цитоплазматическая реакция на GAD67 выявляет заметные конгломераты фермента, чаще всего, в околядерной области перикариона. На ранних сроках такие скопления присутствовали в клетках с сильно выраженной реакцией на GAD67, как в коре, так и в стриатуме, а уже у половозрелых животных могли присутствовать и в слабоокрашенных клетках.

Это наблюдение расходится с традиционными представлениями о локализации GAD67, который описывается как цитозольный белок, диффузно распределенный в цитоплазме за счет

гидрофильных аминокислотных последовательностей (Solimena et al., 1993). Однако, формирование дискретного кольцевидного продукта реакции в перинуклеарной области, продемонстрированное в настоящей работе при использовании высокочувствительной системы Airyscan (Huff, 2015), свидетельствует в пользу способности белка связываться с мембранами (ЭПР или аппарата Гольджи) и цитозольными везикулами. В частности, возможность GAD67 заякориваться на внутриклеточных мембранах путем образования гетеродимеров с трансмембранными белками продемонстрирована в работе Kanaani и соавторов (Kanaani et al., 2010). В более ранних работах методом электрофореза в неденатурирующем геле (т. е., в котором сохраняется нативная структура белковых молекул) показано, что GAD65 и GAD67 нейронов мозжечка крысы чаще всего существуют в мультимерной, а не мономерной форме (Sheikh, Martin, 1996). Также, хотя цитозольные белки традиционно синтезируются на свободных рибосомах (Alberts et al., 2022), нельзя исключать вероятность синтеза этой изоформы фермента на рибосомах гранулярного ЭПР. В этом случае локализация фермента может быть обусловлена повышенной концентрацией синтезированного белка вблизи рибосом эндоплазматического ретикула. Таким образом несмотря на то, что GAD67 считается цитозольным белком, по-видимому, он также может быть либо частично ассоциирован с внутриклеточными мембранами, или существовать в виде крупных гетерогенных или гомогенных белковых комплексов.

Субвентрикулярная зона является крупнейшим герминативным центром взрослого мозга (Alvarez-Buylla, Herrera, Wichterle, 2000) и, в основном, состоит из четырех типов клеток. Это эпендимные клетки типа E, выстилающие поверхность боковых желудочков, и три типа пролиферирующих клеток: мультипотентные глиальные клетки типа B, которые дают начало активно пролиферирующим клеткам типа C, формирующие, в свою очередь, нейробласты типа A (Bond, Ming, Song, 2021). GAD67-положительные клетки здесь наблюдали на всех исследуемых сроках. Поскольку предполагается, что субвентрикулярная зона служит второстепенным, в дополнение к ганглиозному возвышению, источником клеток-предшественников ГАМК-ергических нейронов (Shmakova et al., 2021), можно ожидать присутствие этих клеток не только на постнатальных, как было показано в настоящей работе, но и на эмбриональных стадиях развития мозга. Действительно, в экспериментах на мышах продемонстрировано, что ГАМК-положительные клетки можно наблюдать в субвентрикулярной зоне в позднем пренатальном (E14-E19) и раннем постнатальном онтогенезе (P0-P8) (Magueresse Le, Monyer, 2013). ГАМК-ергические клетки также наблюдали в вентрикулярной зоне в эмбриогенезе (E14-E20) у крыс Вистар (Cobas et al., 1991). Среди

изученных сроков наиболее выделяется конец первого постнатального месяца, когда цитоплазматическая реакция на GAD67 в СВЗ проявляется в двух, четко дифференцируемых, типах клеток: слабоокрашенных веретенновидных, образующих небольшие скопления вблизи эпендимы, и одиночных, крупных, овальных или круглых клетках с малым объемом цитоплазмы и интенсивной окраской на антиген. Оба этих типа клеток можно отнести к малодифференцированным нейробластам (тип А), которые, в зависимости от степени накопления фермента, по-видимому, отражают разные стадии дифференцировки прогениторов ГАМК-ергических клеток. На этом же сроке клетки СВЗ также дают слабую иммуногистохимическую реакцию на GAD65, структура которых (овальная или круглая сома, отсутствие отростков множественные ядерные инвагинации) также позволяет отнести их к пролиферирующим нейробластам. Ни на предыдущих, ни на последующих изученных сроках не удалось так четко разделить две популяции ГАМК-продуцирующих нейробластов. Принимая во внимание это, а также факты, обсужденные ранее, можно заключить, что конец первого месяца постнатального онтогенеза оказывается сроком наибольшей активности ГАМК-ергической системы.

В нашем исследовании впервые было обращено внимание на онтогенетическую динамику иммунореактивности GAD67 в покровном эпителии сосудистого сплетения (эпителии эпендимоглиального типа по Н.Г. Хлопину (Хлопин, 1946) или сосудистом эпителии (Банин, 2009)). Ранее, в сосудистом сплетении мозга эмбрионов мышей была отмечена иммуногистохимическая реакция на другой фермент синтеза ГАМК – GAD65 (Tochitani, Kondo, 2013). В противоположность этому, GAD67 на данном этапе развития не был обнаружен. Хотя в отдельных публикациях также можно наблюдать, что апикальная часть эпителиоцитов сосудистого сплетения мозга взрослых животных содержит GAD67 (Andrews et al., 2017), авторы не акцентируют на этом внимания, поскольку эта область не является их зоной интереса. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что наличие GAD67 в этой зоне не является артефактом иммуногистохимического окрашивания. Об этом свидетельствует и то, что в препаратах отрицательного контроля никакой иммунореактивности как со стороны сосудистого сплетения, так и со стороны остальных структур, не было отмечено. Поэтому возникает вопрос о том, могут ли клетки сосудистого сплетения вырабатывать внесинаптическую ГАМК. Поскольку локализация фермента приближена к апикальной поверхности и известно, что ГАМК содержится в СМЖ, можно предположить, что выработка ГАМК в сосудистом сплетении осуществляется для дальнейшего транспорта в СМЖ. Существует мнение, что ГАМК поступает в СМЖ из крови (Al-Sarraf, 2002). Однако известно,

что такой продукт сыворотки крови как транстиретин (преальбумин) попадает в СМЖ не из крови, но синтезируется в эпителиоцитах сосудистого сплетения (Vieira, Saraiva, 2014). В статье Муртазиной и коллег (Murtazina et al., 2021) отмечается, что присутствующие в ликворе моноамины, а именно: дофамин, норадреналин и серотонин, преимущественно имеют нейрональное происхождение, а не поступают из кровотока. Еще одно важное наблюдение состоит в том, что эти вещества обнаруживаются в СМЖ на физиологически активных уровнях. Таким образом, эпителиоциты, по всей видимости, могут выделять в СМЖ биологически активные вещества, действующие как нейрогормоны. Кроме того, было выявлено, что уровень транспорта ГАМК в СМЖ снижается у половозрелых крыс по сравнению с молодыми животными (Al-Sarraf, 2002). Сходные результаты получены при измерении авторами поглощения глутамата и аспартата сосудистыми сплетениями боковых желудочков со стороны крови и ликвора на разных этапах развития. Было установлено, что у взрослых крыс накопление обеих аминокислот в сосудистом сплетении в 2-3 раза выше по сравнению с новорожденными особями (Al-Sarraf, Preston, Segal, 1997). Все это может указывать на то, что синтез ГАМК в апикальной части эпителиоцитов сосудистого сплетения с помощью GAD67 действительно происходит и усиливается с возрастом.

Таким образом, важно подчеркнуть, что онтогенетическая динамика распределения GAD в подкорковых структурах не ограничена традиционными интернейронами и средними шипиковыми нейронами. При этом, у ГАМК-ергических структур стриопаллидарной системы и коры существуют схожие особенности (такие как возрастная динамика доли тормозных клеток, цитоплазматическая реакция на GAD65, инвагинация ядерной оболочки), которые позволяют выявить общие закономерности ГАМК-ергической системы крыс, как при физиологической норме во взрослом возрасте, так и в процессе развития и старения. Внесинаптическое высвобождение ГАМК эпителиоцитами сосудистого сплетения подчеркивает нейросекреторную функцию сосудистого сплетения головного мозга.

5.3. Становление нейрональной популяции субфорникального органа

К одним из наиболее примечательных структур головного мозга относятся циркумвентрикулярные (или околожелудочковые) органы. Такие органы примечательны наличием в их кровеносной сети фенестрированных капилляров, а также особой структурой эндимной выстилки, состоящей не только из кубических эндимных клеток, но и биполярных клеток с длинными базальными отростками (Korzh, Kondrychyn, 2020; Langlet et al., 2013). Поэтому, структурная организация гематоэнцефалического и

ликвороэнцефалического барьеров в пределах циркумвентрикулярных органов оказывается в значительной степени иной по сравнению с барьерной системой остального мозга. Циркумвентрикулярные органы разделяют на секреторные и сенсорные. К последней группе относят и суфорикулярный орган (Jeong, Dow, Young, 2021).

СФО представляет собой компактное клеточное скопление, расположенное вблизи третьего желудочка в области межжелудочкового (Монроева) отверстия (*foramen interventriculare s. Monro*) между столбами свода конечного мозга млекопитающих. Обильная васкуляризация, наличие сети фенестрированных капилляров и высокоспециализированных глиальных клеток, покрывающих СФО, делает составляющие орган ткани и клетки чувствительными к изменениям состава крови и СМЖ (McKinley et al., 2003). Как одно из ключевых звеньев в регуляции энергетического и водно-солевого баланса организма он обладает многочисленными двунаправленными связями с различными интегративными структурами ЦНС, которые способствуют выполнению функций СФО (Hicks et al., 2021; Pulman et al., 2006; Zimmerman et al., 2019). Несмотря на растущий интерес к исследованию физиологических функций СФО, организация и взаимодействие его тканевых компонентов – нейрональных, глиальных и васкулярных элементов – остаются малоизученными.

В ходе настоящей работы впервые было проведено сравнительно-онтогенетическое исследование ГАМК- и катехоламинергической иннервации субфорникального органа крыс. По данным Dellmann и Stahl (Dellmann, Stahl, 1984), у крыс формирование СФО начинается на 17-е сутки эмбрионального развития и к концу беременности еще остается незрелым, и дифференцировка клеточных элементов продолжается в постнатальном онтогенезе до 5-х суток. Предполагается, что после 5-х постнатальных суток структурные изменения в пределах СФО носят преимущественно количественный характер. Полученные нами данные свидетельствуют, что это предположение не верно. По нашим наблюдениям, на протяжении первых двух недель постнатального развития клеточные элементы СФО претерпевают изменения, которые можно охарактеризовать как качественные. Так, на ранних сроках (P7, P14) ГАМК-ергические структуры преимущественно содержат глутаматдекарбоксилазу изоформы 67. Локализация второй изоформы ГАМК-синтезирующего фермента, GAD65, в синаптических терминалах в пределах СФО на ранних сроках ограничивается латеральными частями органа и областью вблизи эпендимного слоя. Популяция GAD67-содержащих клеток на ранних сроках также ограничена преимущественно этими областями СФО. Наши результаты также показывают, что в течение первых двух недель постнатального развития наблюдается довольно скудное, за исключением латеральной зоны органа, обогащение СФО катехоламинергическими

волокнами, по сравнению с одномесячными и половозрелыми животными.

Выделение различных областей СФО исследователями осуществляется согласно рекомендациям McKinley и соавт. (McKinley et al., 2003), дифференцировавшими СФО на дорсолатеральную оболочку и вентромедиальную сердцевину (центральную область). Придерживаясь этой рекомендации, следует отнести ранние GAD65-положительные терминалы к структурам оболочки. Она обогащена нейронами, формирующими основные эфференты СФО (McKinley et al., 2019), поэтому неудивительно, что клетки этой области находятся под активным ГАМК-ергическим контролем даже на ранних сроках постнатального развития.

Установленный в данной работе характер распределения ТГ на протяжении первого месяца постнатального развития позволяет проследить становление катехоламинергической иннервации СФО и, возможно, установить ее источники. Принимая во внимание взаиморасположение СФО и основных проводящих путей головного мозга, можно предположить следующие три источника вставания ТГ-содержащих волокон: свод мозга, белое вещество спайки свода и путь, идущий вдоль кровеносных сосудов органа. Известно, что многие афферентные волокна, идущие к СФО, проходят в субэпендимном пространстве вдоль стенок желудочка через спайку свода (Lind, Hoese van, Johnson, 1982). Если рассматривать центры, катехоламин-продуцирующие нейроны которых посылают свои эфференты в СФО, следует обратить внимание на норадренергические волокна, исходящие из ядра одиночного пути (NTS), которые, как сообщается (Tanaka et al., 1997), влияют на активность нейронов СФО. Эти волокна идут в составе медиального переднемозгового пучка (Kawai, 2018), в составе которого, как известно, проходят и дофаминергические волокна мезолимбического пути (Moini, Piran, 2020). Поэтому, опираясь на приведенные литературные данные, и на полученные нами результаты, можно говорить о том, что одним из основных путей вставания катехоламинергических волокон в СФО является ветвь переднемозгового пучка, проходящая через спайку свода. При этом, результаты проведенной конфокальной сканирующей микроскопии показали, что ход отдельных катехоламинергических волокон во взрослом СФО параллелен виментин-положительным отросткам клеток эпендимы. Поскольку эпендимные клетки СФО имеют длинный базальный отросток, оплетающий кровеносные сосуды подлежащей нервной ткани, и, благодаря этому, признаются научным сообществом как таницитоподобные (Korzh, Kondrychyn, 2020; Langlet et al., 2013), можно ожидать, что они, как и танициты, обладают схожестью с радиальной глией (Bolborea, Dale, 2013; Goodman, Najihosseini, 2015). Тогда функциональный смысл этого наблюдения может заключаться в том, что виментин-содержащие клетки эпендимы СФО выступают в качестве скаффолда для

растущих катехоламинергических нервных волокон.

Примечательным наблюдением, касающимся внутриклеточного распределения глутаматдекарбоксилазы на ранних сроках развития, оказалось ее наличие в отростках GAD67-положительных клеток. Поскольку известно, что GAD67 характеризуется преимущественной локализацией в перикарионе и синаптических терминалях интернейронов (Esclapez et al., 1994), его наличие в отростках клеток у крыс P7 является неожиданным результатом иммуногистохимической реакции. С одной стороны, можно предположить, что на сроке P7 скорость транспорта фермента снижена по сравнению со скоростью в более зрелом СФО. Это и позволяет накопиться в отростках такому количеству фермента, который улавливается иммуногистохимическими методами. Доказательство этого наблюдения может быть получено путем визуализации внутриклеточного транспорта с использованием мультифотонной микроскопии. С другой стороны, как становится известно в последнее время, ГАМК-ергические клетки способны к объемной, а не только синаптической нейротрансмиссии (Lim et al., 2018; Overstreet-Wadiche, McBain, 2015). Внесинаптическое торможение может быть критически важным на ранних стадиях развития, в условиях, когда синаптические связи еще не полностью сформированы (Naskar et al., 2019). Подобная гипотеза ставит задачу исследовать механизмы нейротрансмиссии клетками раннего СФО электрофизиологически, к примеру, методом локальной фиксации потенциала.

Благодаря присутствию GAD67 в нервных волокнах на сроке P7, было показано, что отростки ГАМК-ергических клеток могут как примыкать к клеткам эпендимного слоя, так и проходить сквозь ряды покрывающих клеток и доходить до просвета желудочка. На последующих сроках контакт с эпендимным пластом и ликвором также можно наблюдать, несмотря на концентрацию GAD, в том числе, GAD65, в терминалях, но не отростках ГАМК-ергических клеток.

Обращаясь к данным литературы, можно заметить, что ассоциация глиальных клеток выстилки желудочка с ГАМК-ергическими клетками отмечается также в исследованиях другого циркумвентрикулярного органа – медиобазального гипоталамуса. Авторы замечают, что присутствие вблизи тел таницитов vGAT, транспортера ГАМК, может маркировать нейроглиальные контакты синаптоидного типа (Bolborea, Langlet, 2021; Pasquettaz et al., 2021). Такое соединение благоприятствует двунаправленной передаче сигналов между формирующими его клетками (Natton, 2002). Более того, нами показано, что ТГ-позитивные волокна СФО крыс также часто занимают субэпендимное положение и могут проникать сквозь

эпендимный слой. Как и в случае с ГАМК, данные о наличии на мембране таницитоподобных клеток СФО рецепторов к катехоламинам отсутствуют. Однако, для таницитов медиобазального гипоталамуса установлено наличие на мембране нейронального фосфопротеина, регулируемого дофамином и цАМФ (32-kD dopamine and cAMP regulated phosphoprotein, DARPP-32) (Meister et al., 1988). Двойное иммуномечение антителами против ТГ и DARPP-32 выявило тесную связь между ТГ-положительными волокнами и DARPP-32-содержащими таницитами (Hökfelt et al., 1988), что, в совокупности, дает основание считать, что дофамин, как и ГАМК, контролирует активность таницитов. Вопрос о том, является ли эти нейроглиальные контакты в СФО двунаправленными, остается открытым.

Существует мнение, что большинство нервных клеток, контактирующих с СМЖ, могут выступать в качестве хеморецепторов и отвечать за несинаптическое восприятие сигналов и дальнейшую их передачу в различные области головного мозга (Vigh et al., 2004). Это хорошо согласуется не только с хорошо известной интегративной функцией СФО благодаря рецепции метаболитов и передаче информации в другие области мозга (Pulman et al., 2006), но и с данными этой работы, касающимися реакции на GAD и ТГ вблизи эндотелия капилляров и септальных вен. Они находятся чаще всего в центральной области СФО, которая, как сообщается, содержит густую сеть капилляров со сниженной скоростью кровотока и максимальной проницаемостью для переносимых кровью веществ (Horwath et al., 2017). Два этих свойства предполагают прямой, высокоэффективный обмен сигнальными молекулами между кровью и тканями СФО. Таким образом, центральная область СФО реагирует на вещества периферической крови, а его оболочка – на факторы цереброспинальной жидкости, что делает орган уникальным сенсором. При этом существует вероятность, что роль контактов отростков нервных клеток с СМЖ не ограничивается хеморецепцией. Отмечается, что моноамины, в том числе, дофамин и норадреналин, обнаруживаются в СМЖ на физиологически активных уровнях и, кроме того, имеют преимущественно нейрональное происхождение (Муртазина и др., 2021). Таким образом, катехоламинергические волокна СФО, по всей видимости, могут выделять в СМЖ биологически активные вещества, действующие как нейроромоны. Из этого следует, что, как минимум, катехоламинергические, а, как максимум, катехоламинергические и ГАМК-ергические волокна СФО могут влиять на состав крови и СМЖ как напрямую, так и опосредованно, через воздействие на клетки эпендимы.

Несмотря на то, что ГАМК-ергическая иннервация СФО повсеместна, и синаптические терминалы, содержащие GAD распределены равномерно по всей паренхиме, полученные нами результаты свидетельствуют, что тела ГАМК-синтезирующих клеток ограничены областью так

называемой оболочки. Топографическое распределение ГАМК-ергических нейронов и их терминалей в органе, вероятно определяет их эфферентные связи и опосредует физиологические функции. Сходная с нашими результатами четкая зональность СФО отмечена также в иммуногистохимическом исследовании, касающемся распределения кальбиндина и кальретинина (Huang, Egan, Fry, 2019). Было показано, что все нейроны СФО можно разделить на две популяции согласно содержанию этих белков, причем клетки центральной зоны обнаруживают в цитоплазме кальбиндин, тогда как в краевых зонах органа расположены исключительно кальретинин-содержащие клетки. Поэтому проведенное нами исследование может давать некоторое представление о систематической принадлежности ГАМК-ергических клеток СФО.

Нами впервые было показано, что некоторые периваскулярные клетки (или перициты) в СФО иммунопозитивны на ТГ. Перициты расположены периэндотелиально, образуют многочисленные контакты с эндотелием капилляров и посткапиллярных венул – и являются структурной единицей ГЭБ (Zheng, Chopp, Chen, 2020). ТГ-иммунопозитивные перициты СФО были локализованы рядом с эндотелием септальных вен, расположенных в дорсолатеральных областях. Малопонятно, какова функциональная роль ТГ в этих клетках. В различных работах сообщается, что эндотелиальные клетки и перициты способны синтезировать дофамин после системного введения предшественника катехоламинов – L-ДОФА (Angela Cenci, 2014), а в условиях индуцированной спинномозговой травмы или в ответ на стимуляцию рецептора PDGFR β (бета-рецептор фактора роста тромбоцитов, platelet-derived growth factor receptor beta) способны к синтезу декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (ДАА) (Gacsb, Barbariga, Paul, 2020; Li et al., 2017). В дополнение к этому, следует упомянуть о наличии в головном мозге нейронов, содержащих только по одному из ферментов синтеза дофамина – ТГ или ДАА – моноферментных нейронов (Угрюмов, 2009). Принимая во внимание отмеченные факты, можно предположить, что перициты СФО, как и моноферментные нейроны, способны участвовать в комплементарном синтезе дофамина.

Наши наблюдения показали, что у взрослых животных в пределах СФО встречаются отдельные клетки с ТГ-иммунопозитивной реакцией средней интенсивности. До настоящего времени считалось, что в СФО отсутствует собственная популяция катехоламинергических нейронов. Ввиду недостаточной изученности, физиологическая роль этих клеток остается неизвестной. Принимая во внимание то, что в СФО наблюдались лишь одиночные ТГ-положительные клетки и только у взрослых животных, можно говорить о том, что популяция катехоламинергических нейронов в СФО немногочисленна и появляется на поздних сроках

постнатального развития.

Что касается возрастных изменений нейрональных элементов СФО, в настоящей работе было показано, что клетки центральной и дорсолатеральной зоны приобретают морфологические признаки стареющих. В первую очередь это отмечается по наличию в них крупных гранул неразлагаемого продукта окисления липидов, белков и металлов – липофусцина. Накопление липофусцина в цитоплазме сигнализирует об инволюции нервных клеток вследствие нарушения липидного обмена и дисфункции лизосомального аппарата (Jellinger, 2001; Salmonowicz, Passos, 2017). Помимо липофусцина, еще одним морфологическим признаком старения можно считать отмеченную в данной работе структурные изменения отростков катехоламинергических клеток, наблюдаемую в виде крупных расширений терминалей вблизи сосудов. Публикуется все больше свидетельств корреляции старения с такими структурными изменениями как: уменьшение числа волокон нервных клеток при увеличении их диаметра, упрощение арборизации дендритов, утолщение миелиновой оболочки и удлинение расстояния между точками ветвления (Dickstein et al., 2007; Stahon et al., 2016; Sutherland et al., 2021). Часто это связывают с нарастанием окислительного стресса, характерного для стареющей ЦНС, и дисфункцией митохондриального аппарата, также подвергающегося структурным перестройкам (Yang, Park, Lu, 2023). Интересно отметить, что морфологические признаки старения наиболее часто наблюдали в клетках и волокнах, приближенных к кровеносным сосудам СФО, что позволяет предложить еще одну причину наблюдаемых нами морфологических изменений клеток, а именно: особенности организации ГЭБ в этой области головного мозга. С одной стороны, известно, что составной частью ГЭБ в СФО являются ножки таницитоподобных клеток (Langlet et al., 2013). Учитывая, что дезорганизацию отростков таницитов при старении неоднократно отмечают во многих исследованиях (Коорман, Taziaux, Bakker, 2017; Yin, Gore, 2010), стоит признать, что и схожие с ними клетки, покрывающие субфорникальный орган, могут вносить определенный вклад в нарушение его барьерных функций. С другой стороны, на полученных препаратах, подкрашенных альциановым синим (гистологическим красителем, выявляющим базальные мембраны), можно заметить, что периваскулярные пространства СФО значительно расширены по сравнению с другими отделами мозга. При старении периваскулярные пространства, как сообщается, могут расширяться (Laveskog et al., 2018; Park et al., 2023), а базальная мембрана сосудов становиться еще более извилистой и менее четко очерченной (Yin, Gore, 2010). Это не может не оказывать влияние на проницаемость сосудов и ГЭБ. Аномальная проницаемость приводит к усилению экссудации жидкости и атрофическим изменениям окружающей нервной

ткани. С этой точки зрения крупные варикозные расширения отростков нейронов может быть рассмотрены как маркер инволютивных процессов, которым, принимая во внимание структурные особенности, СФО может быть подвержен особенно сильно.

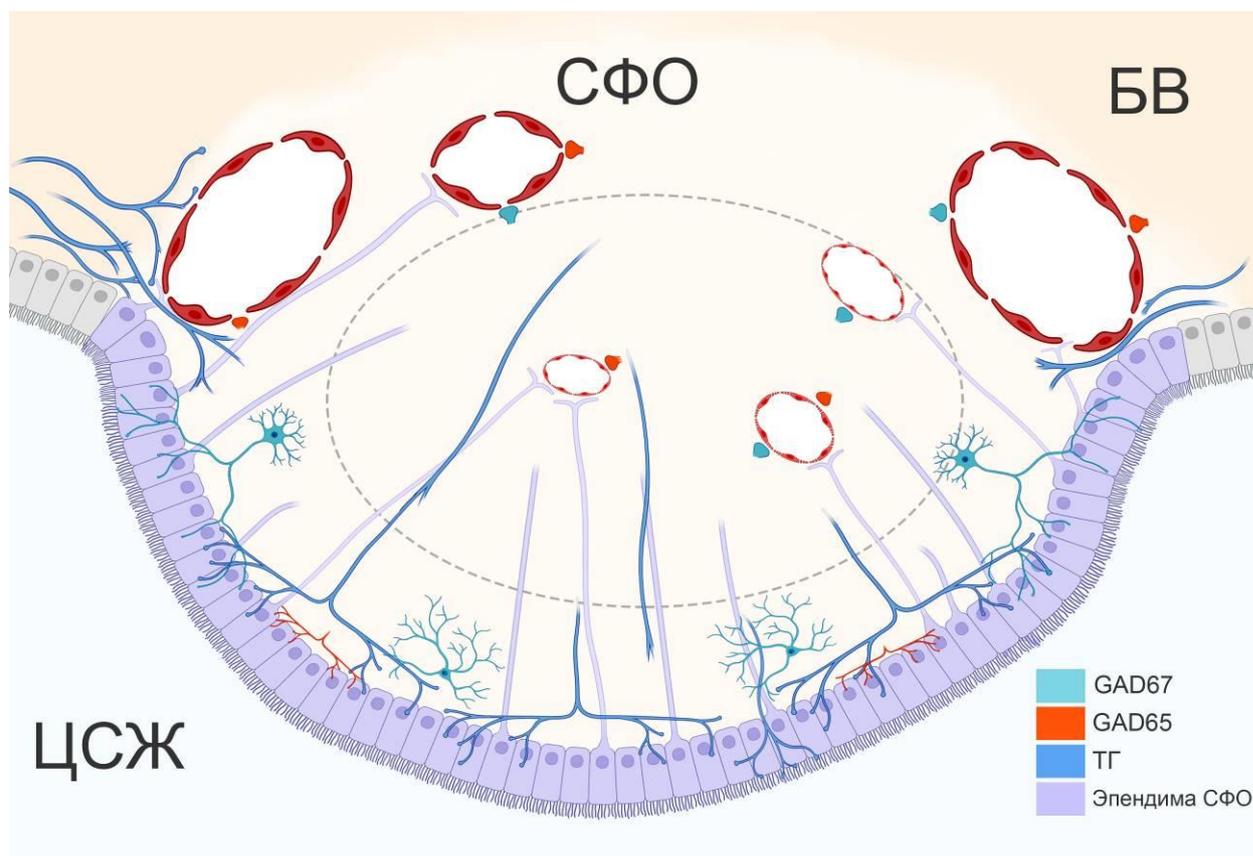


Рисунок 47 – Взаимодействие изученных нейрональных и глиальных компонентов субфорникального органа. Согласно полученным данным, не все покрывающие орган клетки имеют базальные отростки. СФО – субфорникальный орган, СМЖ – цереброспинальная жидкость, БВ – белое вещество, GAD – глутаматдекарбоксилаза, ТГ – тирозингидроксилаза. Штриховка обозначает центральную область субфорникального органа.

Таким образом, в настоящей работе был частично охарактеризован нейрональный компонент СФО (рис. 47). Исследование препаратов на разных сроках постнатального онтогенеза показало, что на ранних сроках ГАМК-ергические структуры преимущественно содержат GAD67, а распределение GAD65 ограничивается зоной оболочки, обогащенной нейронами, формирующими основные эфференты СФО. Наличие GAD67 в отростках клеток у крыс P7 ставит вопрос о характере ГАМК-ергической синаптической передачи в раннем СФО. Выявлено главное направление вставания катехоламинергических волокон в СФО, которое особенно отчетливо наблюдается на ранних сроках. Полученные данные позволяют полагать, что волокна катехоламинергических нейронов на ранних сроках поступают в СФО от

переднемозгового пучка через спайку свода. Параллельный отросткам эпендимоцитов и таницитов ход ТГ-положительных волокон можно трактовать в пользу того, что танициты играют роль скаффолда для развивающейся в процессе онтогенеза катехоламинергической иннервации. Локализованные в субэпендимном слое катехоламинергические волокна и ГАМК-ергические терминалы контактируют с клетками выстилки, а также проходят сквозь эпендимный пласт и контактируют напрямую с СМЖ. В работе впервые получено свидетельство существования в СФО собственных катехоламинергических нейронов. Согласно приведенным данным, клетки оболочки СФО наиболее подвержены дегенеративным процессам, происходящим в ходе нормального старения. Это можно заметить по накоплению липофусцина и дезорганизации ТГ-положительных волокон.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного исследования был получен ряд новых данных о структурно-онтогенетической динамике ГАМК-ергических нейронов и терминалей различных отделов конечного мозга крысы. Показано, что ГАМК-ергические структуры на ранних сроках преимущественно содержат GAD67, и только на последующих стадиях GAD65 начинает играть существенную роль в обеспечении головного мозга ГАМК. Характер распределения GAD67 в первых слоях коры на протяжении первого месяца постнатального развития позволяет предполагать возможность фенотипической трансформации части рилин-продуцирующих клеток Кахаля-Ретциуса крыс в ГАМК-ергические интернейроны. По мере созревания головного мозга происходит и усиливается синтез ГАМК эндотелиоцитами сосудистого сплетения. Статистические и качественные данные в совокупности дают основания полагать, что конец первого месяца постнатального онтогенеза оказывается сроком наибольшей активности ГАМК-ергической системы. В работе обращено внимание на цитоплазматическое содержание GAD65 как клетками коры, так и нейронами подкорковых структур, что поднимает вопрос о пересмотре классических представлений о внутриклеточной локализации изоформ глутаматдекарбоксилаз. Результаты иммуногистохимического окрашивания на тирозингидроксилазу позволяют отнести катехоламин-содержащие клетки неокортекса крысы к биполярным и интерстициальным ГАМК-ергическим клеткам, а также к ГАМК-ергическим нейронам, не являющимся клетками Мартинотти. Охарактеризовано становление катехоламинергической иннервации субфорникального органа, которая формируется волокнами переднемозгового пучка. Вглубь органа катехоламинергические волокна прорастают вдоль виментин-содержащих клеток. Получено свидетельство существования в субфорникальном органе популяции собственных катехоламинергических нейронов.

Старение оказывает дестабилизирующее влияние на ГАМК-ергические структуры головного мозга. Это выражается общим снижением интенсивности иммуногистохимического окрашивания на GAD67 и GAD65 в нейроне, а также снижением иммунореактивности перикарионов, и структурными перестройками. Полученные данные указывают на то, что, в сравнении с другими изученными областями конечного мозга, наиболее подвержены дегенеративным процессам, происходящим в ходе нормального старения, клетки субфорникального органа, вероятно, вследствие особой организации гематоэнцефалического барьера в этой области.

ВЫВОДЫ

1) Развитие ГАМК-ергической системы головного мозга в раннем постнатальном онтогенезе сопровождается рядом структурных и цитохимических перестроек. На протяжении первых двух недель постнатального развития областями с наибольшим содержанием ГАМК-ергических структур являются первый слой коры головного мозга и бледный шар. К концу первого месяца формируется характерная для последующих стадий онтогенеза ламинарность распределения глутаматдекарбоксилаза-иммунопозитивных структур в коре головного мозга.

2) Начиная со второй недели постнатального развития, нейроны, структурно и топографически соответствующие клеткам Кахаля-Ретциуса характеризуются накоплением фермента GAD67 в цитоплазме, что может указывать на их принадлежность к ГАМК-ергической медиаторной системе неокортекса.

3) Синаптические терминалы ГАМК-ергических нейронов коры головного мозга крысы характеризуются вариабельностью размеров, что может указывать на их разный функциональный статус. Наибольшее разнообразие размеров характерно для ГАМК-ергических синаптических терминалов цингулярной области коры головного мозга. При старении происходит снижение интенсивности иммуногистохимической реакции нейропиля и перикарионов нервных клеток на глутаматдекарбоксилазу, увеличение количества ГАМК-ергических синаптических окончаний и уменьшение размера ГАМК-ергических терминалов.

4) На протяжении всего постнатального онтогенеза в субвентрикулярной зоне головного мозга присутствуют глутаматдекарбоксилаза-содержащие клетки – вероятные предшественники ГАМК-ергических нейронов.

5) Начиная с первого месяца постнатального развития, эпителиоциты сосудистого сплетения содержат фермент GAD67, что является свидетельством в пользу возможной выработки в сосудистом сплетении внесинаптической ГАМК.

6) В течение первого месяца постнатального развития формируется ГАМК-ергическая иннервация субфорникального органа с характерными региональными особенностями. Отростки ГАМК-ергических клеток контактируют с эндотелиоцитами, клетками эпендимного слоя и, проникая через него, с ликвором, что позволяет предполагать как секреторную, так и рецепторную функции этих клеток.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 5HT_{3aR}** – 5-hydroxytryptamine receptor 3a, ионотропный рецептор серотонина 5-HT_{3a}
- ВИП** – вазоактивный интестинальный пептид
- ГАМК** – γ -аминомасляная кислота, 4-аминобутановая кислота
- ГАМК-Т** – ГАМК-трансаминаза
- ГЛБ** – гематоликворный барьер
- ГЭБ** – гематоэнцефалический барьер
- ДАА** – декарбоксилаза ароматических L-аминокислот
- ИГХ** – иммуногистохимическая реакция
- НПУ** – нейропептид Y
- СВЗ** – субвентрикулярная зона
- СГЗ** – субгранулярная зона
- СМЖ** – спинномозговая жидкость
- СФО** – субфорникальный орган
- ТГ** – тирозингидроксилаза
- ХАТ** – холинацетилтрансфераза
- ЦНС** – центральная нервная система
- BGT-1** – betaine/GABA transporter-1, транспортер бетаина
- СВ** – calbindin, кальбиндин
- ССК** – cholecystokinin, холецистокинин
- CR** – calretinin, кальретинин
- DARPP-32** – 32-kD dopamine and cAMP regulated phosphoprotein, нейрональный фосфопротеин, регулируемый дофамином и цАМФ
- GAD** – glutamate decarboxylase, L-глутамат-1-карбоксилаза, глутаматдекарбоксилаза
- GAT** – GABA transporter, транспортер ГАМК

GDNF – glial cell line-derived neurotrophic factor, глиальный нейротрофический фактор

GP – globus pallidus, бледный шар

KCC2 – K-Cl cotransporter 2, котранспортер К и Cl 2

NKCC1 – Na-K-Cl cotransporter 1, котранспортер Na-K-Cl 1

NOS – nitric oxide synthase, синтаза оксида азота

MAPT – microtubule-associated protein tau, Тау-белок

MSN – medium spiny neurons, средние шипиковые нейроны

PV – parvalbumin, парвальбумин

SERCA1 – sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1, саркоплазматическая Ca²⁺-АТФаза 1

SST – somatostatin, соматостатин

vGAT – vesicular GABA transporter, везикулярный переносчик ГАМК

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Банин В. В. Terminologia Histologica. Международные термины по цитологии и гистологии человека / под ред. В. В. Банин, В. Л. Быков. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 272 с.
2. Григорьев И. П. и др. Распределение низкомолекулярных белков нейрофиламентов в поясной коре головного мозга крысы // Морфология. 2018. Т. 154. № 5. С. 7–12.
3. Дыбан А. П. Лабораторные млекопитающие: мышь, крыса, кролик, хомячок // Объекты биологии развития. Москва: Наука, 1975. С. 505–566.
4. Зайцев А. В. Классификация и функции ГАМКергических интернейронов новой коры млекопитающих // Биологические мембраны. 2013. Т. 30. № 4. С. 253–270.
5. Зайцев А. В. и др. Синаптические дисфункции при эпилепсии // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2021. Т. 107. № 4–5. С. 492–517–492–517.
6. Зиматкин С. М. Закономерности постнатального развития нейронов мозга // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2021. Т. 19. № 1. С. 106–111.
7. Колос Е. А. и др. Неоднородность реакции на холинацетилтрансферазу в холинергических нейронах // Нейрохимия. 2016. Т. 33. № 1. С. 56–62.
8. Коржевский Д. Э. и др. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуоцитохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии // Морфология. 2013а. Т. 143. № 2. С. 81–85.
9. Коржевский Д. Э. и др. Холинергические структуры поясной коры головного мозга крысы // Медицинский академический журнал. 2013b. Т. 13. № 4. С. 49–53.
10. Коржевский Д. Э. и др. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии / под ред. Д.Э. Коржевский. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2014. 118 с.
11. Муртазина А. Р. и др. Сравнительный анализ содержания моноаминов как нейрогормонов в ликворе и крови крыс в онтогенезе // Acta Naturae. 2021. Т. 13. № 4. С. 89–97.
12. Петрова Е. С. и др. ГАМК-ергические нейроны стриатума крыс в норме и при ишемическом повреждении // Асимметрия. 2013. Т. 7. № 3. С. 4–9.
13. Семьянов А. В. ГАМК-эргическое торможение в ЦНС: типы ГАМК-рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия // Нейрофизиология. 2002. Т. 34. № 1. С. 71–80.

14. Сухарева Б. С., Дарий Е. Л., Христофоров Р. Р. Глутаматдекарбоксилаза: структура и каталитические свойства // *Успехи биологической химии*. 2001. Т. 41. С. 131–162.
15. Угрюмов М. В. Синтез моноаминов немонаминергическими нейронами: иллюзия или реальность? // *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*. 2009. Т. 95. № 3. С. 273–282.
16. Хлопин Н. Г. *Общебиологические и экспериментальные основы гистологии*. Ленинград: Изд-во Акад. наук СССР, 1946. 491 с.
17. Al-Jaberi N. et al. The early fetal development of human neocortical GABAergic interneurons // *Cereb. Cortex*. 2015. V. 25. № 3. P. 631–645.
18. Al-Sarraf H. Transport of ^{14}C - γ -aminobutyric acid into brain, cerebrospinal fluid and choroid plexus in neonatal and adult rats // *Dev. Brain Res.* 2002. V. 139. № 2. P. 121–129.
19. Al-Sarraf H., Preston J. E., Segal M. B. Acidic amino acid accumulation by rat choroid plexus during development // *Dev. Brain Res.* 1997. V. 102. № 1. P. 47–52.
20. Alberts B. et al. *Molecular biology of the cell*. New York: W. W. Norton & Company, 2022. Вып. 7th. 1–1552 P.
21. Alvarez-Buylla A., Herrera D. G., Wichterle H. The subventricular zone: source of neuronal precursors for brain repair // *Prog. Brain Res.* 2000. V. 127. P. 1–11.
22. Andrews W. D. et al. Semaphorin3A–neuropilin1 signalling is involved in the generation of cortical interneurons // *Brain Struct. Funct.* 2017. V. 222. № 5. P. 2217–2233.
23. Angela Cenci M. Presynaptic Mechanisms of l-DOPA-Induced Dyskinesia: The Findings, the Debate, and the Therapeutic Implications // *Front. Neurol.* 2014. V. 5. № NOV.
24. Apicella A. junior, Marchionni I. VIP-expressing GABAergic neurons: disinhibitory vs. inhibitory motif and its role in communication across neocortical areas // *Front. Cell. Neurosci.* 2022. V. 16.
25. Areal L. B., Blakely R. D. Neurobehavioral changes arising from early life dopamine signaling perturbations // *Neurochem. Int.* 2020. V. 137. P. 104747.
26. Asada H. et al. Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997. V. 94. № 12. P. 6496–6499.

27. Ascoli G. A. et al. Petilla terminology: Nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex // *Nat. Rev. Neurosci.* 2008. V. 9. № 7. P. 557–568.
28. Asmus S. E. et al. Neurochemical characterization of tyrosine hydroxylase-immunoreactive interneurons in the developing rat cerebral cortex // *Brain Res.* 2008. V. 1222. P. 95–105.
29. Asmus S. E. et al. Increasing proportions of tyrosine hydroxylase-immunoreactive interneurons colocalize with choline acetyltransferase or vasoactive intestinal peptide in the developing rat cerebral cortex // *Brain Res.* 2011. V. 1383. P. 108–119.
30. Astegno A., Capitani G., Dominici P. Functional roles of the hexamer organization of plant glutamate decarboxylase // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1854. № 9. P. 1229–1237.
31. Awapara J. et al. Free gamma-aminobutyric acid in brain // *J. Biol. Chem.* 1950. V. 187. № 1. P. 35–39.
32. Barker J. S., Hines R. M. Regulation of GABAA receptor subunit expression in substance use disorders // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 12. P. 1–22.
33. Battaglioli G., Liu H., Martin D. L. Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: Implications for the regulation of GABA synthesis // *J. Neurochem.* 2003. V. 86. № 4. P. 879–887.
34. Bayer S. A., Altman J. *Neocortical Development*. New York: Raven Press, 1991. 1–255 P.
35. Bazemore A. W., Elliott K. A. C., Florey E. Isolation of factor I // *J. Neurochem.* 1957. V. 1. № 4. P. 334–339.
36. Behar T. N. et al. Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus // *J. Neurosci.* 1998. V. 18. № 16. P. 6378–87.
37. Behuet S. et al. Developmental Changes of Glutamate and GABA Receptor Densities in Wistar Rats // *Front. Neuroanat.* 2019. V. 13. № 100. P. 1–14.
38. Bell K. F. S., Bennett D. A., Cuello A. C. Paradoxical upregulation of glutamatergic presynaptic boutons during mild cognitive impairment // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. № 40. P. 10810–10817.
39. Ben-Ari Y. Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture // *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. V. 3. № 9. P. 728–739.
40. Ben-Ari Y. et al. Interneurons set the tune of developing networks // *Trends Neurosci.*

2004. V. 27. № 7. P. 422–427.

41. Ben-Ari Y. Basic developmental rules and their implications for epilepsy in the immature brain. , 2006. 91–102 P.

42. Ben-Ari Y. et al. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders // *Neuroscientist*. 2012. V. 18. № 5. P. 467–486.

43. Ben-Ari Y. et al. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones // *J. Physiol.* 1989. V. 416. № 1. P. 303–325.

44. Benavides-Piccione R., DeFelipe J. Distribution of neurons expressing tyrosine hydroxylase in the human cerebral cortex // *J. Anat.* 2007. V. 211. № 2. P. 212–222.

45. Bennett B. D., Bolam J. P. Characterization of calretinin-immunoreactive structures in the striatum of the rat // *Brain Res.* 1993a. V. 609. № 1–2. P. 137–148.

46. Bennett B. D., Bolam J. P. Two populations of calbindin D28k-immunoreactive neurones in the striatum of the rat // *Brain Res.* 1993b. V. 610. № 2. P. 305–310.

47. Berger B. et al. Postnatal ontogenesis of the dopaminergic innervation in the rat anterior cingulate cortex (area 24). Immunocytochemical and catecholamine fluorescence histochemical analysis // *Brain Res.* 1985a. V. 353. № 1. P. 31–47.

48. Berger B. et al. Transient expression of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in some neurons of the rat neocortex during postnatal development // *Brain Res.* 1985b. V. 355. № 1. P. 141–144.

49. Best J. G., Stagg C. J., Dennis A. Other significant metabolites: myo-inositol, GABA, glutamine, and lactate // *Magnetic resonance spectroscopy: tools for neuroscience research and emerging clinical applications* / под ред. C. Stagg, D. Rothman. New York: Academic Press, 2014. P. 122–138.

50. Bielle F. et al. Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8. № 8. P. 1002–1012.

51. Blaesse P. et al. Cation-chloride cotransporters and neuronal function // *Neuron*. 2009. V. 61. № 6. P. 820–838.

52. Blatow M., Caputi A., Monyer H. Molecular diversity of neocortical GABAergic interneurons // *J. Physiol.* 2005. V. 562. № Pt 1. P. 99.

53. Blindermann J. -M et al. Purification and some properties of L-glutamate decarboxylase from human brain // *Eur. J. Biochem.* 1978. V. 86. № 1. P. 143–152.
54. Bolam J. P., Bevan M. D. Microcircuits of the Striatum // *Basal Ganglia Thalamus Heal. Mov. Disord.* 2001. P. 29–39.
55. Bolborea M., Dale N. Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance // *Trends Neurosci.* 2013. V. 36. № 2. P. 91–100.
56. Bolborea M., Langlet F. What is the physiological role of hypothalamic tanycytes in metabolism? // *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2021. V. 320. № 6.
57. Bolteus A. J., Bordey A. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 35. P. 7623–7631.
58. Bond A. M., Ming G. li, Song H. Ontogeny of adult neural stem cells in the mammalian brain // *Current Topics in Developmental Biology.* : Academic Press, 2021. P. 67–98.
59. Bosma P. T. et al. Multiplicity of glutamic acid decarboxylases (GAD) in vertebrates: molecular phylogeny and evidence for a new GAD paralog // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. № 3. P. 397–404.
60. Boura M., Brenson D., Karatzas K. A. G. A novel role for the glutamate decarboxylase system in *Listeria monocytogenes*; protection against oxidative stress // *Food Microbiol.* 2020. V. 85.
61. Bregestovski P., Bernard C. Excitatory GABA: How a correct observation may turn out to be an experimental artifact // *Front. Pharmacol.* 2012. V. 3. № 65. P. 8.
62. Bu D. F. et al. Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992. V. 89. № 6. P. 2115–2119.
63. Burianova J. et al. Age-related changes in GAD levels in the central auditory system of the rat // *Exp. Gerontol.* 2009. V. 44. № 3. P. 161–169.
64. Bystron I., Blakemore C., Rakic P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited // *Nat. Rev. Neurosci.* 2008 92. 2008. V. 9. № 2. P. 110–122.
65. Calabresi P. et al. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal // *Nat. Neurosci.* 2014 178. 2014. V. 17. № 8. P. 1022–1030.
66. Chamma I. et al. Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission // *Front. Cell. Neurosci.* 2012. V. 6. № JANUARY.

67. Chen G., Trombley P. Q., Pol A. N. Van Den. GABA receptors precede glutamate receptors in hypothalamic development; differential regulation by astrocytes // *J. Neurophysiol.* 1995. V. 74. № 4. P. 1473–1484.

68. Cheng Q., Yeh P. W. L., Yeh H. H. Cajal-Retzius cells switch from expressing γ -less to γ -containing GABAA receptors during corticogenesis // *Eur. J. Neurosci.* 2006. V. 24. № 8. P. 2145–2151.

69. Chesselet M. F. et al. Development of striatal fast-spiking GABAergic interneurons // *Prog. Brain Res.* 2007. V. 160. P. 261–272.

70. Chessler S. D., Lernmark Å. Alternative splicing of GAD67 results in the synthesis of a third form of glutamic-acid decarboxylase in human islets and other non-neural tissues // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 7. P. 5188–5192.

71. Chowdhury G. M. I. et al. Glutamatergic and GABAergic neurotransmitter cycling and energy metabolism in rat cerebral cortex during postnatal development // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007. V. 27. № 12. P. 1895–1907.

72. Chowdhury T. G. et al. Fate of Cajal-Retzius neurons in the postnatal mouse neocortex // *Front. Neuroanat.* 2010. V. 4. № 10. P. 1–8.

73. Chu W. C., Metzler D. E. Enzymatically active truncated cat brain glutamate decarboxylase: expression, purification, and absorption spectrum // *Arch. Biochem. Biophys.* 1994. V. 313. № 2. P. 287–295.

74. Cobas A. et al. Prenatal development of the intrinsic neurons of the rat neocortex: A comparative study of the distribution of GABA-immunoreactive cells and the GABAA receptor // *Neuroscience.* 1991. V. 40. № 2. P. 375–397.

75. Coleman S. T. et al. Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 1. P. 244–250.

76. Coyne A. N., Rothstein J. D. Nuclear lamina invaginations are not a pathological feature of C9orf72 ALS/FTD // *Acta Neuropathol. Commun.* 2021. V. 9. № 1.

77. Cristi A. C., Rapuri S., Coyne A. N. Nuclear pore complex and nucleocytoplasmic transport disruption in neurodegeneration // *FEBS Lett.* 2023. V. 597. № 20. P. 2546–2566.

78. Cuypers K., Maes C., Swinnen S. P. Aging and GABA // *Aging (Albany NY)*. 2018. V. 10. № 6. P. 1186.
79. Dávila J. C. et al. Embryonic and postnatal development of GABA, calbindin, calretinin, and parvalbumin in the mouse claustral complex // *J. Comp. Neurol.* 2005. V. 481. № 1. P. 42–57.
80. Defelipe J. et al. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. V. 14. № 3. P. 202–216.
81. Dellmann H. D., Stahl S. J. Fine structural cytology of the rat subfornical organ during ontogenesis // *Brain Res. Bull.* 1984. V. 13. № 1. P. 135–145.
82. Denner L. A., Wu J. -Y. Two forms of rat brain glutamic acid decarboxylase differ in their dependence on free pyridoxal phosphate // *J. Neurochem.* 1985. V. 44. № 3. P. 957–965.
83. Denter D. G. et al. GABAC receptors are functionally expressed in the intermediate zone and regulate radial migration in the embryonic mouse neocortex // *Neuroscience*. 2010. V. 167. № 1. P. 124–134.
84. Derer P., Derer M. Cajal-retzius cell ontogenesis and death in mouse brain visualized with horseradish peroxidase and electron microscopy // *Neuroscience*. 1990. V. 36. № 3. P. 839–856.
85. Derer P., Derer M., Goffinet A. Axonal secretion of reelin by cajal-retzius cells: Evidence from comparison of normal and *Reln*^{Orl} mutant mice // *J. Comp. Neurol.* 2001. V. 440. № 2. P. 136–143.
86. Dickstein D. L. et al. Changes in the structural complexity of the aged brain // *Aging Cell*. 2007. V. 6. № 3. P. 275.
87. Didier-Baze`s M. et al. Cell lineage of the subcommissural organ secretory ependymocytes: differentiating role of the environment // *Microsc. Res. Tech.* 2001. V. 52. P. 461–467.
88. Didier-Bazes M. et al. Developmental neuron-glia interactions: role of serotonin innervation upon the differentiation of the ependymocytes of the rat subcommissural organ // *Prog. Brain Res.* 1992. V. 91. № C. P. 343–347.
89. Ding Y. et al. Changes in GABAergic markers accompany degradation of neuronal function in the primary visual cortex of senescent rats // *Sci. Reports* 2017 71. 2017. V. 7. № 1. P. 1–15.
90. Druga R., Salaj M., Al-Redouan A. Parvalbumin-positive neurons in the neocortex: a review // *Physiol. Res.* 2023. V. 72. № Suppl 2. P. S173.

91. Duan J. et al. The cell-wide web coordinates cellular processes by directing site-specific Ca²⁺ flux across cytoplasmic nanocourses // *Nat. Commun.* 2019 101. 2019. V. 10. № 1. P. 1–12.

92. Dumitru I. et al. Diazepam binding inhibitor promotes stem cell expansion controlling environment-dependent neurogenesis // *Neuron*. 2017. V. 94. № 1. P. 125- 137.e5.

93. Ehrlich D. E. et al. Postnatal maturation of GABAergic transmission in the rat basolateral amygdala // *J. Neurophysiol.* 2013. V. 110. № 4. P. 926.

94. Esclapez M. et al. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms // *J. Neurosci.* 1994. V. 14. № 3 Pt 2. P. 1834–1855.

95. Espinosa J. S., Stryker M. P. Development and plasticity of the primary visual cortex // *Neuron*. 2012. V. 75. № 2. P. 230.

96. Everlien I. et al. Diazepam binding inhibitor governs neurogenesis of excitatory and inhibitory neurons during embryonic development via GABA signaling // *Neuron*. 2022. V. 110. № 19.

97. Eyre M. D. et al. Setting the time course of inhibitory synaptic currents by mixing multiple GABA(A) receptor α subunit isoforms // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. № 17. P. 5853–5867.

98. Fallon J. Collateralization of monoamine neurons: mesotelencephalic dopamine projections to caudate, septum, and frontal cortex // *J. Neurosci.* 1981. V. 1. № 12. P. 1361–1368.

99. Farrant M., Kaila K. The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling // *Prog. Brain Res.* 2007. V. 160. P. 59–87.

100. Favuzzi E. et al. Distinct molecular programs regulate synapse specificity in cortical inhibitory circuits // *Science (80-.)*. 2019. V. 363. № 6425. P. 413–417.

101. Fedosikhina L. A. Ultrastructure of layer 1 of the rat cingulate cortex // *Neurosci. Behav. Physiol.* 1986. V. 16. № 4. P. 340–345.

102. Feldblum S., Erlander M. G., Tobin A. J. Different distributions of GAD65 and GAD67 mRNAs suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles // *J. Neurosci. Res.* 1993. V. 34. № 6. P. 689–706.

103. Fenalti G. et al. GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007 144. 2007. V. 14. № 4. P. 280–286.

104. Ferguson B. R., Gao W. J. PV interneurons: critical regulators of E/I balance for prefrontal cortex-dependent behavior and psychiatric disorders // *Front. Neural Circuits*. 2018. V. 12. P. 362145.
105. Flossmann T. et al. Somatostatin interneurons promote neuronal synchrony in the neonatal hippocampus // *Cell Rep*. 2019. V. 26. № 12. P. 3173- 3182.e5.
106. Foster A. C., Kemp J. A. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics // *Curr. Opin. Pharmacol*. 2006. V. 6. № 1 SPEC. ISS. P. 7–17.
107. Frahm C., Engel D., Draguhn A. Efficacy of background GABA uptake in rat hippocampal slices // *Neuroreport*. 2001. V. 12. № 8. P. 1593–1596.
108. Frazer S. et al. Transcriptomic and anatomic parcellation of 5-HT3AR expressing cortical interneuron subtypes revealed by single-cell RNA sequencing // *Nat. Commun*. 2017. V. 8.
109. Fregoneze J. B., Antunes-Rodrigues J. Role of opioid peptides and subfornical organ in the renal function of intact and hypophysectomized rats // *Physiol. Behav*. 1992. V. 51. № 2. P. 287–292.
110. Fritschy J. M. GABAB-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: Developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization // *Eur. J. Neurosci*. 1999. V. 11. № 3. P. 761–768.
111. Frost B. Alzheimer’s disease and related tauopathies: disorders of disrupted neuronal identity // *Trends Neurosci*. 2023. V. 46. № 10. P. 797–813.
112. Gaceb A., Barbariga M., Paul G. An in vitro partial lesion model of differentiated human mesencephalic neurons: effect of pericyte secretome on phenotypic markers // *J. Mol. Neurosci*. 2020. V. 70. № 11. P. 1914–1925.
113. Galvan A. et al. GABAergic modulation of the activity of globus pallidus neurons in primates: in vivo analysis of the functions of GABA receptors and GABA transporters // *J. Neurophysiol*. 2005. V. 94. № 2. P. 990–1000.
114. Gamlin C. R. et al. Assembly and maintenance of GABAergic and glycinergic circuits in the mammalian nervous system // *Neural Dev*. 2018 131. 2018. V. 13. № 1. P. 1–17.
115. Gavrilovici C. et al. The loss of interneuron functional diversity in the piriform cortex after induction of experimental epilepsy // *Neurobiol. Dis*. 2012. V. 48. № 3. P. 317–328.
116. Ge S. et al. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis // *Trends*

Neurosci. 2007. V. 30. № 1. P. 1–8.

117. Gelman D. M. et al. The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons // J. Neurosci. 2009. V. 29. № 29. P. 9380–9389.

118. Gerfen C. R., Economo M. N., Chandrashekar J. Long distance projections of cortical pyramidal neurons. // J. Neurosci. Res. 2018. V. 96. № 9. P. 1467–1475.

119. Gerfen C. R., Surmeier D. J. Modulation of striatal projection systems by dopamine // Annu. Rev. Neurosci. 2011. V. 34. P. 441–466.

120. Gonchar Y., Wang Q., Burkhalter A. H. Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining // Front. Neuroanat. 2008. V. 1. № 3. P. 11.

121. Gong N. et al. GABA transporter-1 activity modulates hippocampal theta oscillation and theta burst stimulation-induced long-term potentiation // J. Neurosci. 2009. V. 29. № 50. P. 15836–15845.

122. Gong X. et al. γ -aminobutyric acid transporter-1 is involved in anxiety-like behaviors and cognitive function in knockout mice // Exp. Ther. Med. 2015. V. 10. № 2. P. 653.

123. Goodman T., Hajihosseini M. K. Hypothalamic tanycytes-masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions // Front. Neurosci. 2015. V. 9. № OCT. P. 387.

124. Gouwens N. W. et al. Integrated morphoelectric and transcriptomic classification of cortical GABAergic cells // Cell. 2020. V. 183. № 4. P. 935- 953.e19.

125. Graybiel A. M. et al. Direct demonstration of a correspondence between the dopamine islands and acetylcholinesterase patches in the developing striatum // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1981. V. 78. № 9. P. 5871–5875.

126. Graybiel A. M. Correspondence between the dopamine islands and striosomes of the mammalian striatum // Neuroscience. 1984. V. 13. № 4. P. 1157–1187.

127. Greif K. F. et al. Postnatal expression of glutamate decarboxylases in developing rat cerebellum // Neurochem. Res. 1991. V. 16. № 3. P. 235–242.

128. Grondin R. et al. GDNF revisited: A novel mammalian cell-derived variant form of GDNF increases dopamine turnover and improves brain biodistribution // Neuropharmacology. 2019. V. 147. P. 28–36.

129. Grone B. P., Maruska K. P. Three distinct glutamate decarboxylase genes in vertebrates //

Sci. Rep. 2016. V. 6.

130. Harris K. D. et al. Classes and continua of hippocampal CA1 inhibitory neurons revealed by single-cell transcriptomics // PLOS Biol. 2018. V. 16. № 6. P. e2006387.

131. Hatton G. I. Glial-neuronal interactions in the mammalian brain // Am. J. Physiol. - Adv. Physiol. Educ. 2002. V. 26. № 1–4. P. 225–237.

132. Haydar T. F. et al. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones // J. Neurosci. 2000. V. 20. № 15. P. 5764–5774.

133. Heinämäki A. A. et al. Resolution and purification of taurine- and GABA-synthesizing decarboxylases from calf brain // Neurochem. Res. 1983. V. 8. № 2. P. 207–218.

134. Hennou S. et al. Early sequential formation of functional GABA(A) and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus // Eur. J. Neurosci. 2002. V. 16. № 2. P. 197–208.

135. Herkenham M., Pert C. B. Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum // Nature. 1981. V. 291. № 5814. P. 415–418.

136. Hermans L. et al. The aging brain and changes in GABA concentrations // Front. Neurosci. 2017. V. 11.

137. Hertz L. et al. Development of monoamine oxidase activity and monoamine effects on glutamate release in cerebellar neurons and astrocytes // Neurochem. Res. 1989. V. 14. № 10. P. 1039–1046.

138. Hicks A. I. et al. Anatomical organization of the rat subfornical organ // Front. Cell. Neurosci. 2021. V. 15.

139. Hof P. R., Morrison J. H. The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits // Trends Neurosci. 2004. V. 27. № 10. P. 607–613.

140. Hökfelt T. et al. DARPP-32 as a marker for D-1 dopaminergic cells in the rat brain: prenatal development and presence in glial elements (tanycytes) in the basal hypothalamus // Adv. Exp. Med. Biol. 1988. V. 235. P. 65–82.

141. Honda E. et al. Spontaneously active GABAergic interneurons in the subfornical organ of rat slice preparations // Neurosci. Lett. 2001. V. 306. № 1–2. P. 45–48.

142. Horwath J. A. et al. Obesity-induced hepatic steatosis is mediated by endoplasmic

reticulum stress in the subfornical organ of the brain // JCI insight. 2017. V. 2. № 8.

143. Hu H., Gan J., Jonas P. Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin⁺ GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function // Science. 2014. V. 345. № 6196.

144. Huang S., Egan J. M., Fry W. M. Electrophysiological properties of rat subfornical organ neurons expressing calbindin D28K // Neuroscience. 2019. V. 404. P. 459–469.

145. Huff J. The Airyscan detector from ZEISS: confocal imaging with improved signal-to-noise ratio and super-resolution // Nat. Methods. 2015. V. 12. № 12. P. i–ii.

146. Hughes D. I., Todd A. J. Visualizing synaptic connectivity using confocal and electron microscopy: neuroanatomical approaches to define spinal circuits // Neuromethods. 2022. V. 178. P. 181–201.

147. Ibañez S. et al. Myelin dystrophy in the aging prefrontal cortex leads to impaired signal transmission and working memory decline: a multiscale computational study // bioRxiv Prepr. Serv. Biol. 2023.

148. Iding H. et al. Application of α -keto acid decarboxylases in biotransformations // Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol. 1998. V. 1385. № 2. P. 307–322.

149. Ilg T. et al. Glutamate decarboxylase of the parasitic arthropods *Ctenocephalides felis* and *Rhipicephalus microplus*: Gene identification, cloning, expression, assay development, identification of inhibitors by high throughput screening and comparison with the orthologs from *Drosophila melanogaster* and mouse // Insect Biochem. Mol. Biol. 2013. V. 43. № 2. P. 162–177.

150. Imamoto K. et al. Cajal-Retzius neurons identified by GABA immunohistochemistry in layer I of the rat cerebral cortex // Neurosci. Res. 1994. V. 20. № 1. P. 101–105.

151. Inenaga K. et al. GABAergic inhibitory inputs to subfornical organ neurons in rat slice preparations // Brain Res. 1995. V. 705. № 1–2. P. 85–90.

152. Ishibashi M., Egawa K., Fukuda A. Diverse actions of astrocytes in GABAergic signaling // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 12.

153. Jellinger K. A. Cell death mechanisms in neurodegeneration // J. Cell. Mol. Med. 2001. V. 5. № 1. P. 1–17.

154. Jensen K. et al. GABA transporter-1 (GAT1)-deficient mice: differential tonic activation of GABAA versus GABAB receptors in the hippocampus // J. Neurophysiol. 2003. V. 90. № 4. P.

2690–2701.

155. Jeong J. K., Dow S. A., Young C. N. Sensory circumventricular organs, neuroendocrine control, and metabolic regulation // *Metabolites*. 2021. V. 11. № 8.

156. Jiang W. et al. Impact of GAD65 and/or GAD67 deficiency on perinatal development in rats // *FASEB J*. 2022. V. 36. № 2.

157. Jiang X. et al. The organization of two new cortical interneuronal circuits // *Nat. Neurosci*. 2013. V. 16. № 2. P. 210–218.

158. Kajita Y., Mushiake H. Heterogeneous GAD65 expression in subtypes of GABAergic neurons across layers of the cerebral cortex and hippocampus // *Front. Behav. Neurosci*. 2021. V. 15. P. 236.

159. Kakee A. et al. Efflux of a suppressive neurotransmitter, GABA, across the blood-brain barrier // *J. Neurochem*. 2001. V. 79. № 1. P. 110–118.

160. Kanaani J. et al. Palmitoylation controls trafficking of GAD65 from Golgi membranes to axon-specific endosomes and a Rab5a-dependent pathway to presynaptic clusters // *J. Cell Sci*. 2004. V. 117. № Pt 10. P. 2001–2013.

161. Kanaani J. et al. Two distinct mechanisms target GAD67 to vesicular pathways and presynaptic clusters // *J. Cell Biol*. 2010. V. 190. № 5. P. 911–925.

162. Karagiannis A. et al. Classification of NPY-expressing neocortical interneurons // *J. Neurosci*. 2009. V. 29. № 11. P. 3642.

163. Katiyar A. et al. The nucleus bypasses obstacles by deforming like a drop with surface tension mediated by lamin A/C // *Adv. Sci*. 2022. V. 9. № 23. P. 2201248.

164. Kaufman D. L., Houser C. R., Tobin A. J. Two Forms of the γ -Aminobutyric Acid Synthetic Enzyme Glutamate Decarboxylase Have Distinct Intraneuronal Distributions and Cofactor Interactions // *J. Neurochem*. 1991. V. 56. № 2. P. 720–723.

165. Kawaguchi Y. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum // *J. Neurosci*. 1993. V. 13. № 11. P. 4908–4923.

166. Kawai Y. Differential ascending projections from the male rat caudal nucleus of the tractus solitarius: an interface between local microcircuits and global macrocircuits // *Front. Neuroanat*. 2018. V. 12. P. 63.

167. Kelsom C., Lu W. Development and specification of GABAergic cortical interneurons // *Cell Biosci.* 2013 31. 2013. V. 3. № 1. P. 1–19.
168. Kersanté F. et al. A functional role for both γ -aminobutyric acid (GABA) transporter-1 and GABA transporter-3 in the modulation of extracellular GABA and GABAergic tonic conductances in the rat hippocampus // *J. Physiol.* 2013. V. 591. № Pt 10. P. 2429.
169. Kessar N., Denaxa M. Cortical interneuron specification and diversification in the era of big data // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2023. V. 80.
170. Kicking S. et al. Structural and molecular aspects of betaine-GABA transporter 1 (BGT1) and its relation to brain function // *Neuropharmacology.* 2019. V. 161. P. 107644.
171. Kiess T. O., Kockskämper J. SERCA activity controls the systolic calcium increase in the nucleus of cardiac myocytes // *Front. Physiol.* 2019. V. 10. № FEB. P. 429857.
172. Kimoto S., Bazmi H. H., Lewis D. A. Lower expression of glutamic acid decarboxylase 67 in the prefrontal cortex in schizophrenia: contribution of altered regulation by Zif268 // *Am. J. Psychiatry.* 2014. V. 171. № 9. P. 969–978.
173. Kirmse K. et al. GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo // *Nat. Commun.* 2015. V. 6.
174. Kleppner S. R., Tobin A. J. GABA // *Encycl. Hum. Brain.* 2002. P. 353–367.
175. Klingler E. Development and organization of the evolutionarily conserved three-layered olfactory cortex // *eNeuro.* 2017. V. 4. № 1.
176. Koh W. et al. GABA tone regulation and its cognitive functions in the brain // *Nat. Rev. Neurosci.* 2023 249. 2023. V. 24. № 9. P. 523–539.
177. Kohno T. et al. Importance of reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis // *J. Neurosci.* 2015. V. 35. № 11. P. 4776–4787.
178. Kolaj M., Bai D., Renaud L. P. GABAB receptor modulation of rapid inhibitory and excitatory neurotransmission from subfornical organ and other afferents to median preoptic nucleus neurons // *J. Neurophysiol.* 2004. V. 92. № 1. P. 111–122.
179. Koliatsos V. E. et al. Early involvement of small inhibitory cortical interneurons in Alzheimer's disease // *Acta Neuropathol.* 2006. V. 112. № 2. P. 147–162.

180. Koopman A. C. M., Taziaux M., Bakker J. Age-related changes in the morphology of tanycytes in the human female infundibular nucleus/median eminence // *J. Neuroendocrinol.* 2017. V. 29. № 5.
181. Koós T., Tepper J. M. Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons // *Nat. Neurosci.* 1999. V. 2. № 5. P. 467–472.
182. Koos T., Tepper J. M., Wilson C. J. Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 36. P. 7916–7922.
183. Korpershoek E. et al. Expression of GAD67 and novel GAD67 splice variants during human fetal pancreas development: GAD67 expression in the fetal pancreas // *Endocr. Pathol.* 2007. V. 18. № 1. P. 31–36.
184. Korzh V., Kondrychyn I. Origin and development of circumventricular organs in living vertebrate // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2020. V. 102. P. 13–20.
185. Kravitz A. V., Kreitzer A. C. Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment // *Physiology (Bethesda)*. 2012. V. 27. № 3. P. 167–177.
186. Kubota Y. Untangling GABAergic wiring in the cortical microcircuit // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2014. V. 26. P. 7–14.
187. Kwakowsky A. et al. Gamma-aminobutyric acid A receptors in Alzheimer's disease: highly localized remodeling of a complex and diverse signaling pathway // *Neural Regen. Res.* 2018. V. 13. № 8. P. 1362–1363.
188. L'Esperance O. J. et al. Functional connectivity favors aberrant visual network c-Fos expression accompanied by cortical synapse loss in amyloidosis // *bioRxiv Prepr. Serv. Biol.* 2024.
189. Langlet F. et al. Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain // *J. Comp. Neurol.* 2013. V. 521. № 15. P. 3389–3405.
190. Latsari M. et al. Noradrenergic innervation of the developing and mature visual and motor cortex of the rat brain: a light and electron microscopic immunocytochemical analysis // *J. Comp. Neurol.* 2002. V. 445. № 2. P. 145–158.
191. Laveskog A. et al. Perivascular spaces in old age: assessment, distribution, and correlation with white matter hyperintensities // *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* 2018. V. 39. № 1. P. 70–76.
192. Lee S. et al. Channel-mediated tonic GABA release from glia // *Science (80-.)*. 2010. V.

330. № 6005. P. 790–796.

193. Levitt P., Moore R. Y. Development of the noradrenergic innervation of neocortex // *Brain Res.* 1979. V. 162. № 2. P. 243–259.

194. Li S. et al. Endothelial cell-derived GABA signaling modulates neuronal migration and postnatal behavior // *Cell Res.* 2018. V. 28. № 2. P. 221–248.

195. Li Y. et al. Pericytes impair capillary blood flow and motor function after chronic spinal cord injury // *Nat. Med.* 2017. V. 23. № 6. P. 733–741.

196. Lim L. et al. Development and functional diversification of cortical interneurons // *Neuron.* 2018. V. 100. № 2. P. 294–313.

197. Lind R. W., Hoesen G. W. van, Johnson A. K. An HRP study of the connections of the subfornical organ of the rat // *J. Comp. Neurol.* 1982. V. 210. № 3. P. 265–277.

198. Liu X. et al. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8. № 9. P. 1179–1187.

199. Liu Z. et al. Sp9 Regulates Medial Ganglionic Eminence-Derived Cortical Interneuron Development // *Cereb. Cortex.* 2019. V. 29. № 6. P. 2653–2667.

200. Lodato S., Arlotta P. Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2015. V. 31. P. 699–720.

201. Long J. E. et al. *Dlx1&2* and *Mash1* transcription factors control MGE and CGE patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways // *Cereb. Cortex.* 2009. V. 19. № SUPPL. 1. P. 96–106.

202. López-Mengual A. et al. Involvement of mechanical cues in the migration of Cajal-Retzius cells in the marginal zone during neocortical development // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. V. 10.

203. Lorenzo A. V., Cutler R. W. P. Amino acid transport by choroid plexus in vitro // *J. Neurochem.* 1969. V. 16. № 4. P. 577–585.

204. LoTurco J. J. et al. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis // *Neuron.* 1995. V. 15. № 6. P. 1287–1298.

205. Luhmann H. J., Fukuda A., Kilb W. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. V. 9. № JAN.

206. Luzzati F. A hypothesis for the evolution of the upper layers of the neocortex through co-option of the olfactory cortex developmental program // *Front. Neurosci.* 2015. V. 9. № APR.
207. Ma Y. et al. Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 19. P. 5069–5082.
208. Maes C. et al. Age-related differences in GABA levels are driven by bulk tissue changes // *Hum. Brain Mapp.* 2018. V. 39. № 9. P. 3652.
209. Magueresse C. Le, Monyer H. GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex // *Neuron.* 2013. V. 77. № 3. P. 388–405.
210. Malashkevich V. N. et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the beta-isoform of glutamate decarboxylase from *Escherichia coli* // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 1998. V. 54. № Pt 5. P. 1020–1022.
211. Marín O. et al. Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions // *Science.* 2001. V. 293. № 5531. P. 872–875.
212. Marín O. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons // *Eur. J. Neurosci.* 2013. V. 38. № 1. P. 2019–2029.
213. Marín O. Tangential migration in the telencephalon // *The Rat Nervous System.* : Academic Press, 2015. Вып. Fourth Edition. P. 45–58.
214. Marín O., Anderson S. A., Rubenstein J. L. R. Origin and molecular specification of striatal interneurons // *J. Neurosci.* 2000. V. 20. № 16. P. 6063–6076.
215. Mariotti L. et al. Interneuron-specific signaling evokes distinctive somatostatin-mediated responses in adult cortical astrocytes // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1.
216. Markram H. et al. Interneurons of the neocortical inhibitory system // *Nat. Rev. Neurosci.* 2004. V. 5. № 10. P. 793–807.
217. Markram H. et al. Reconstruction and simulation of neocortical microcircuitry // *Cell.* 2015. V. 163. № 2. P. 456–492.
218. Martin D. L., Rinvall K. Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis in the brain // *J. Neurochem.* 1993. V. 60. № 2. P. 395–407.
219. Matos M. et al. Astrocytes detect and upregulate transmission at inhibitory synapses of somatostatin interneurons onto pyramidal cells // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1.

220. Matsunaga W., Isobe K., Shirokawa T. Involvement of neurotrophic factors in aging of noradrenergic innervations in hippocampus and frontal cortex // *Neurosci. Res.* 2006. V. 54. № 4. P. 313–318.
221. McIntire S. L. et al. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter // *Nature*. 1997. V. 389. № 6653. P. 870–876.
222. McKinley M. J. et al. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain // *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 2003. V. 172.
223. McKinley M. J. et al. From sensory circumventricular organs to cerebral cortex: Neural pathways controlling thirst and hunger // *J. Neuroendocrinol.* 2019. V. 31. № 3.
224. McKinley M. J., Clarke I. J., Oldfield B. J. *Circumventricular Organs // The Human Nervous System: Second Edition.* : Academic Press, 2004. P. 562–591.
225. McQuail J. A. et al. GABA(B) receptor GTP-binding is decreased in the prefrontal cortex but not the hippocampus of aged rats // *Neurobiol. Aging.* 2012. V. 33. № 6. P. 1124.e1-1124.e12.
226. Meister B. et al. DARPP-32, a dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein in tanycytes of the mediobasal hypothalamus: distribution and relation to dopamine and luteinizing hormone-releasing hormone neurons and other glial elements // *Neuroscience.* 1988. V. 27. № 2. P. 607–622.
227. Mihaljević B. et al. Classification of GABAergic interneurons by leading neuroscientists // *Sci. data.* 2019. V. 6. № 1. P. 221.
228. Miyata S. et al. Loss of glutamate decarboxylase 67 in somatostatin-expressing neurons leads to anxiety-like behavior and alteration in the akt/gsk3 β signaling pathway // *Front. Behav. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 462062.
229. Miyata S. et al. Global knockdown of glutamate decarboxylase 67 elicits emotional abnormality in mice // *Mol. Brain.* 2021. V. 14. № 1. P. 1–14.
230. Moini J., Piran P. Limbic, olfactory, and gustatory systems // *Funct. Clin. Neuroanat.* 2020. P. 467–495.
231. Molnár Z., Blakemore C. How do thalamic axons find their way to the cortex? // *Trends Neurosci.* 1995. V. 18. № 9. P. 389–397.
232. Mora F., Segovia G., Arco A. del. Glutamate-dopamine-GABA interactions in the aging

basal ganglia // *Brain Res. Rev.* 2008. V. 58. № 2. P. 340–353.

233. Murata Y., Colonnese M. T. GABAergic interneurons excite neonatal hippocampus in vivo // *Sci. Adv.* 2020. V. 6. № 24.

234. Murtazina A. R. et al. A Comparative Analysis of CSF and the Blood Levels of Monoamines As Neurohormones in Rats during Ontogenesis // *Acta Naturae.* 2021. V. 13. № 4. P. 89–97.

235. Nambu A. A new dynamic model of the cortico-basal ganglia loop // *Prog. Brain Res.* 2004. V. 143. P. 461–466.

236. Nambu A. Seven problems on the basal ganglia // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2008. V. 18. № 6. P. 595–604.

237. Namchuk M. et al. Phosphorylation of serine residues 3, 6, 10, and 13 distinguishes membrane anchored from soluble glutamic acid decarboxylase 65 and is restricted to glutamic acid decarboxylase 65alpha // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 3. P. 1548–1557.

238. Naskar S. et al. The development of synaptic transmission is time-locked to early social behaviors in rats // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 1–12.

239. Nauta H. J. W., Cole M. Efferent projections of the subthalamic nucleus: an autoradiographic study in monkey and cat // *J. Comp. Neurol.* 1978. V. 180. № 1. P. 1–16.

240. Nelles D. G., Hazrati L.-N. Ependymal cells and neurodegenerative disease: outcomes of compromised ependymal barrier function // *Brain Commun.* 2022. V. 4. № 6.

241. Ngo D. H., Vo T. S. An updated review on pharmaceutical properties of gamma-aminobutyric acid // *Molecules.* 2019. V. 24. № 15.

242. Nóbrega-Pereira S. et al. Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors // *Neuron.* 2008. V. 59. № 5. P. 733–745.

243. Norrara B. et al. Pattern of tyrosine hydroxylase expression during aging of mesolimbic pathway of the rat // *J. Chem. Neuroanat.* 2018. V. 92. P. 83–91.

244. Nusser Z., Mody I. Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells // *J. Neurophysiol.* 2002. V. 87. № 5. P. 2624–2628.

245. Oh W. C. et al. De novo synaptogenesis induced by GABA in the developing mouse cortex // *Science (80-.).* 2016. V. 353. № 6303. P. 1037–1040.

246. Ohara P. T. et al. Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat // *J. Neurocytol.* 2003. V. 32. № 2. P. 131–141.
247. Okaty B. W. et al. Transcriptional and electrophysiological maturation of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 21. P. 7040–7052.
248. Oláh S. et al. Regulation of cortical microcircuits by unitary GABA-mediated volume transmission // *Nature.* 2009. V. 461. № 7268. P. 1278–1281.
249. Osaka T., Yamashita H., Koizumi K. Inhibitory inputs to the subfornical organ from the AV3V: Involvement of GABA // *Brain Res. Bull.* 1992. V. 29. № 5. P. 581–587.
250. Overstreet-Wadiche L., McBain C. J. Neurogliaform cells in cortical circuits // *Nat. Rev. Neurosci.* 2015. V. 16. № 8. P. 458–468.
251. Paonessa F. et al. Microtubules deform the nuclear membrane and disrupt nucleocytoplasmic transport in Tau-mediated frontotemporal dementia // *Cell Rep.* 2019. V. 26. № 3. P. 582- 593.e5.
252. Park C. hyun et al. Characteristics of perivascular space dilatation in normal aging // *Hum. Brain Mapp.* 2023. V. 44. № 8. P. 3232–3240.
253. Pasquettaz R. et al. Peculiar protrusions along tanycyte processes face diverse neural and nonneural cell types in the hypothalamic parenchyma // *J. Comp. Neurol.* 2021. V. 529. № 3. P. 553–575.
254. Pei Z. et al. Conditional knock-out of vesicular GABA transporter gene from starburst amacrine cells reveals the contributions of multiple synaptic mechanisms underlying direction selectivity in the retina // *J. Neurosci.* 2015. V. 35. № 38. P. 13219–13232.
255. Petroff O. A. C. GABA and glutamate in the human brain // *Neuroscientist.* 2002. V. 8. № 6. P. 562–573.
256. Pickel V. M., Chan J. Met5-enkephalin is localized within axon terminals in the subfornical organ: Vascular contacts and interactions with neurons containing gamma-aminobutyric acid // *J. Neurosci. Res.* 1994. V. 37. № 6. P. 735–749.
257. Pickel V. M., Chan J. Co-localization of angiotensin II and gamma-aminobutyric acid in axon terminals in the rat subfornical organ // *Neurosci. Lett.* 1995. V. 193. № 2. P. 89–92.
258. Pinal C. S., Tobin A. J. Uniqueness and redundancy in GABA production // *Perspect. Dev.*

Neurobiol. 1998. V. 5. № 2–3. P. 109–118.

259. Pollock E. et al. Metalloproteinase inhibition prevents inhibitory synapse reorganization and seizure genesis // *Neurobiol. Dis.* 2014. V. 70. P. 21–31.

260. Popp A. et al. Adult and embryonic GAD transcripts are spatiotemporally regulated during postnatal development in the rat brain // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 2.

261. Porter T. G. et al. Transaminations catalysed by brain glutamate decarboxylase // *Biochem. J.* 1985. V. 231. № 3. P. 705–712.

262. Pouille F., Scanziani M. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition // *Science (80-.).* 2001. V. 293. № 5532. P. 1159–1163.

263. Prager E. M., Plotkin J. L. Compartmental function and modulation of the striatum // *J. Neurosci. Res.* 2019. V. 97. № 12. P. 1503.

264. Prévot T., Sibille E. Altered GABA-mediated information processing and cognitive dysfunctions in depression and other brain disorders // *Mol. Psychiatry.* 2021. V. 26. № 1. P. 151–167.

265. Priya R. et al. Vesicular GABA Transporter Is Necessary for Transplant-Induced Critical Period Plasticity in Mouse Visual Cortex // *J. Neurosci.* 2019. V. 39. № 14. P. 2635–2648.

266. Pulman K. J. et al. The subfornical organ: a central target for circulating feeding signals // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 7. P. 2022–2030.

267. Que L. et al. Transcriptional and morphological profiling of parvalbumin interneuron subpopulations in the mouse hippocampus // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1.

268. Rabey J. M., Hefti F. Neuromelanin synthesis in rat and human substantia nigra // *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* 1990. V. 2. № 1. P. 1–14.

269. Radonjić N. V. et al. Diversity of Cortical Interneurons in Primates: The Role of the Dorsal Proliferative Niche // *Cell Rep.* 2014. V. 9. № 6. P. 2139–2151.

270. Ramanathan V. K., Brett C. M., Giacomini K. M. Na⁺-dependent γ -aminobutyric acid (GABA) transport in the choroid plexus of rabbit // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1997. V. 1330. № 1. P. 94–102.

271. Ramón y Cajal S. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés.* Paris: Maloine, 1911. 993 P.

272. Reeves K. C. et al. Opioid receptor-mediated regulation of neurotransmission in the brain // *Front. Mol. Neurosci.* 2022. V. 15.

273. Rétaux S., Trovero F., Besson M.-J. Role of dopamine in the plasticity of glutamic acid decarboxylase messenger RNA in the rat frontal cortex and the nucleus accumbens // *Eur. J. Neurosci.* 1994. V. 6. № 12. P. 1782–1791.

274. Reyes-Haro D. et al. γ -Aminobutyric acid- ρ expression in ependymal glial cells of the mouse cerebellum // *J. Neurosci. Res.* 2013. V. 91. № 4. P. 527–534.

275. Reynolds L. M. et al. DCC receptors drive prefrontal cortex maturation by determining dopamine axon targeting in adolescence // *Biol. Psychiatry.* 2018. V. 83. № 2. P. 181–192.

276. Reynolds L. M., Flores C. Mesocorticolimbic dopamine pathways across adolescence: diversity in development // *Front. Neural Circuits.* 2021. V. 15. P. 94–111.

277. Rice F. L. et al. A Comparative analysis of the development of the primary somatosensory cortex: Interspecies similarities during barrel and laminar development // *J. Comp. Neurol.* 1985. V. 236. № 4. P. 477–495.

278. Rideaux R. et al. On the relationship between GABA⁺ and glutamate across the brain // *Neuroimage.* 2022. V. 257.

279. Riedemann T. Diversity and function of somatostatin-expressing interneurons in the cerebral cortex // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 12.

280. Rivera C. et al. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation // *Nature.* 1999. V. 397. № 6716. P. 251–255.

281. Roberts E., Frankel S. gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid // *J. Biol. Chem.* 1950. V. 187. № 1. P. 55–63.

282. Roberts R. C. et al. Decreased synaptic and mitochondrial density in the postmortem anterior cingulate cortex in schizophrenia // *Schizophr. Res.* 2015. V. 168. № 1–2. P. 543–553.

283. Rozycka A., Liguz-Leczna M. The space where aging acts: focus on the GABAergic synapse // *Aging Cell.* 2017. V. 16. № 4. P. 634–643.

284. Rudy B. et al. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons // *Dev. Neurobiol.* 2011. V. 71. № 1. P. 45–61.

285. Ryan S. J., Ehrlich D. E., Rainnie D. G. Morphology and dendritic maturation of

developing principal neurons in the rat basolateral amygdala // *Brain Struct. Funct.* 2016. V. 221. № 2. P. 839–854.

286. Rymar V. V. et al. Neurogenesis and stereological morphometry of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons of the neostriatum // *J. Comp. Neurol.* 2004. V. 469. № 3. P. 325–339.

287. Sakai K. et al. Local production of angiotensin II in the subfornical organ causes elevated drinking // *J. Clin. Invest.* 2007. V. 117. № 4. P. 1088–1095.

288. Salcedo C. et al. Downregulation of GABA transporter 3 (GAT3) is associated with deficient oxidative GABA metabolism in human induced pluripotent stem cell-derived astrocytes in Alzheimer's disease // *Neurochem. Res.* 2021. V. 46. № 10. P. 2676–2686.

289. Salmonowicz H., Passos J. F. Detecting senescence: a new method for an old pigment // *Aging Cell.* 2017. V. 16. № 3. P. 432.

290. Sandberg M. et al. Transcriptional Networks Controlled by NKX2-1 in the Development of Forebrain GABAergic Neurons // *Neuron.* 2016. V. 91. № 6. P. 1260–1275.

291. Sarnat H. B., Flores-Sarnat L. Role of Cajal-Retzius and subplate neurons in cerebral cortical development // *Semin. Pediatr. Neurol.* 2002. V. 9. № 4. P. 302–308.

292. Satoh J., Suzuki K. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the mouse cerebral cortex during the postnatal period // *Dev. Brain Res.* 1990. V. 53. № 1. P. 1–5.

293. Saxena A. et al. Angiotensin II type 1a receptors in subfornical organ contribute towards chronic intermittent hypoxia-associated sustained increase in mean arterial pressure // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2015. V. 308. № 5. P. H435–H446.

294. Scala F. et al. Layer 4 of mouse neocortex differs in cell types and circuit organization between sensory areas // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1.

295. Schales O. Amino acid decarboxylases // *Enzymes* / под ред. J. B. Sumner, K. Myrback. New York: Academic Press, 1951. P. 216–247.

296. Scheff S. W., Price D. A. Alzheimer's disease-related synapse loss in the cingulate cortex // *J. Alzheimer's Dis.* 2001. V. 3. № 5. P. 495–505.

297. Schindelin J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // *Nat. Methods* 2012 97. 2012. V. 9. № 7. P. 676–682.

298. Schousboe A., Waagepetersen H. S. Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) // Curated Ref. Collect. Neurosci. Biobehav. Psychol. 2017. P. 511–515.
299. Schuman B. et al. Four unique interneuron populations reside in neocortical layer 1 // J. Neurosci. 2019. V. 39. № 1. P. 125–139.
300. Sears S. M. S., Hewett S. J. Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance // Exp. Biol. Med. (Maywood). 2021. V. 246. № 9. P. 1069–1083.
301. Segovia G. et al. Effects of aging on the interaction between glutamate, dopamine, and GABA in striatum and nucleus accumbens of the awake rat // J. Neurochem. 1999. V. 73. № 5. P. 2063–2072.
302. Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's // Int. J. Prev. Med. 2013. V. 4. № 6. P. 624–30.
303. Shain W. et al. Activation of beta-adrenergic receptors stimulates release of an inhibitory transmitter from astrocytes // J. Neurochem. 1986. V. 46. № 4. P. 1298–1303.
304. Sheikh S. N., Martin D. L. Heteromers of glutamate decarboxylase isoforms occur in rat cerebellum // J. Neurochem. 1996. V. 66. № 5. P. 2082–2090.
305. Shi Y., Veit B., Baekkeskov S. Amino acid residues 24-31 but not palmitoylation of cysteines 30 and 45 are required for membrane anchoring of glutamic acid decarboxylase, GAD65 // J. Cell Biol. 1994. V. 124. № 6. P. 927–934.
306. Shihan M. H. et al. A simple method for quantitating confocal fluorescent images // Biochem. Biophys. Reports. 2021. V. 25. № 100916. P. 1–21.
307. Shmakova A. A. et al. Urokinase receptor uPAR overexpression in mouse brain stimulates the migration of neurons into the cortex during embryogenesis // Russ. J. Dev. Biol. 2021. V. 52. № 1. P. 53–63.
308. Soghomonian J. J., Martin D. L. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? // Trends Pharmacol. Sci. 1998. V. 19. № 12. P. 500–505.
309. Solimena M. et al. Association of GAD-65, but not of GAD-67, with the Golgi complex of transfected Chinese hamster ovary cells mediated by the N-terminal region // Proc. Natl. Acad. Sci. 1993. V. 90. № 7. P. 3073–3077.
310. Somogyi P., Freund T. F., Cowey A. The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of

the rat, cat and monkey // *Neuroscience*. 1982. V. 7. № 11. P. 2577–2607.

311. Spiering M. J. The discovery of GABA in the brain // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. № 49. P. 19159.

312. Spink D. C. et al. Characterization of three kinetically distinct forms of glutamate decarboxylase from pig brain // *Biochem. J.* 1985. V. 231. № 3. P. 695–703.

313. Sreenivasan V. et al. Input-specific control of interneuron numbers in nascent striatal networks // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2022. V. 119. № 20.

314. Stahon K. E. et al. Age-related changes in axonal and mitochondrial ultrastructure and function in white matter // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. № 39. P. 9990–10001.

315. Steel A. et al. Regional balance between glutamate+glutamine and GABA+ in the resting human brain // *Neuroimage*. 2020. V. 220.

316. Steiger J. L., Russek S. J. GABAA receptors: building the bridge between subunit mRNAs, their promoters, and cognate transcription factors // *Pharmacol. Ther.* 2004. V. 101. № 3. P. 259–281.

317. Stork O. et al. Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65 // *Brain Res.* 2000. V. 865. № 1. P. 45–58.

318. Sun L. et al. Characterization of three glutamate decarboxylases from *Bacillus* spp. for efficient γ -aminobutyric acid production // *Microb. Cell Fact.* 2021. V. 20. № 1.

319. Sutherland T. C. et al. Age-dependent decline in neuron growth potential and mitochondria functions in cortical neurons // *Cells*. 2021. V. 10. № 7.

320. Suzuki N., Bekkers J. M. Inhibitory neurons in the anterior piriform cortex of the mouse: Classification using molecular markers // *J. Comp. Neurol.* 2010. V. 518. № 10. P. 1670–1687.

321. Szabo G., Katarova Z., Greenspan R. Distinct protein forms are produced from alternatively spliced bicistronic glutamic acid decarboxylase mRNAs during development // *Mol. Cell. Biol.* 1994. V. 14. № 11. P. 7535.

322. Taipala E. et al. rTg(TauP301L)4510 mice exhibit increased VGlut1 in hippocampal presynaptic glutamatergic vesicles and increased extracellular glutamate release // *Front. Synaptic Neurosci.* 2022. V. 14.

323. Takahashi T., Nowakowski R. S., Caviness V. S. Early ontogeny of the secondary

proliferative population of the embryonic murine cerebral wall // *J. Neurosci.* 1995. V. 15. № 9. P. 6058–6068.

324. Tanaka J. et al. Ascending pathways from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat // *Brain Res.* 1997. V. 777. № 1–2. P. 237–241.

325. Tanaka J. et al. GABAergic systems in the nucleus tractus solitarius regulate noradrenaline release in the subfornical organ area in the rat // *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 2002. V. 100. № 1–2. P. 58–65.

326. Tanaka J., Fujisawa S., Nomura M. GABAergic modulation of the ANG II-induced drinking response in the rat medial preoptic nucleus // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003. V. 76. № 1. P. 43–51.

327. Taniguchi H., Lu J., Huang Z. J. The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex // *Science.* 2013. V. 339. № 6115. P. 70–74.

328. Tasic B. et al. Shared and distinct transcriptomic cell types across neocortical areas // *Nature.* 2018. V. 563. № 7729. P. 72–78.

329. Tepper J. M. et al. Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons: Update 2018 // *Front. Neuroanat.* 2018. V. 12. P. 91.

330. Tepper J. M., Bolam J. P. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2004. V. 14. № 6. P. 685–692.

331. Tepper J. M., Koós T., Wilson C. J. GABAergic microcircuits in the neostriatum // *Trends Neurosci.* 2004. V. 27. № 11. P. 662–669.

332. Tepper J. M., Lee C. R. GABAergic control of substantia nigra dopaminergic neurons // *Prog. Brain Res.* 2007. V. 160. P. 189–208.

333. Tepper J. M., Wilson C. J., Koós T. Feedforward and feedback inhibition in neostriatal GABAergic spiny neurons // *Brain Res. Rev.* 2008. V. 58. № 2. P. 272–281.

334. Tochtani S., Kondo S. Immunoreactivity for GABA, GAD65, GAD67 and Bestrophin-1 in the Meninges and the Choroid Plexus: Implications for Non-Neuronal Sources for GABA in the Developing Mouse Brain // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. P. 7.

335. Tremblay R., Lee S., Rudy B. GABAergic interneurons in the neocortex: from cellular properties to circuits // *Neuron.* 2016. V. 91. № 2. P. 260–292.

336. Trincherro M. F., Giacomini D., Schinder A. F. Dynamic interplay between GABAergic networks and developing neurons in the adult hippocampus // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2021. V. 69. P. 124–130.
337. Udenfriend S. Identification of gamma-aminobutyric acid in brain by the isotope derivative method // *J. Biol. Chem.* 1950. V. 187. № 1. P. 65–69.
338. Valeeva G. et al. An optogenetic approach for investigation of excitatory and inhibitory network GABA actions in mice expressing channelrhodopsin-2 in GABAergic neurons // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. № 22. P. 5961–5973.
339. Vélez-Fort M., Audinat E., Angulo M. C. Central role of GABA in neuron-glia interactions // *Neuroscientist.* 2012. V. 18. № 3. P. 237–250.
340. Verkhratsky A., Nedergaard M. Physiology of astroglia // *Physiol. Rev.* 2018. V. 98. № 1. P. 239–389.
341. Vieira M., Saraiva M. J. Transthyretin: A multifaceted protein // *Biomol. Concepts.* 2014. V. 5. № 1. P. 45–54.
342. Vigh B. et al. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain // *Histol. Histopathol.* 2004. V. 19. № 2. P. 607–628.
343. Vilchez-Acosta A. et al. Specific contribution of Reelin expressed by Cajal-Retzius cells or GABAergic interneurons to cortical lamination // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2022. V. 119. № 37.
344. Vincent S. L., Pabreza L., Benes F. M. Postnatal maturation of GABA-immunoreactive neurons of rat medial prefrontal cortex // *J. Comp. Neurol.* 1995. V. 355. № 1. P. 81–92.
345. Vogt B. A. Cingulate cortex in the three limbic subsystems // *Handb. Clin. Neurol.* 2019. V. 166. P. 39–51.
346. Waagepetersen H. S., Sonnewald U., Schousboe A. The GABA paradox: multiple roles as metabolite, neurotransmitter, and neurodifferentiative agent // *J. Neurochem.* 1999. V. 73. № 4. P. 1335–1342.
347. Walls A. B. GABA synthesis and metabolism // *Curated Ref. Collect. Neurosci. Biobehav. Psychol.* 2017. P. 433–439.
348. Wang B. et al. Loss of Gsx1 and Gsx2 function rescues distinct phenotypes in Dlx1/2

mutants // *J. Comp. Neurol.* 2013. V. 521. № 7. P. 1561–1584.

349. Wang D. D., Kriegstein A. R. Defining the role of GABA in cortical development // *Journal of Physiology*. : *J Physiol*, 2009. P. 1873–1879.

350. Wang Y. et al. Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat // *J. Physiol.* 2004. V. 561. № 1. P. 65–90.

351. Wang Y. et al. GABAB receptor-dependent modulation of network activity in the rat prefrontal cortex in vitro // *Eur. J. Neurosci.* 2010. V. 31. № 9. P. 1582–1594.

352. Warm D., Schroer J., Sinning A. GABAergic interneurons in early brain development: conducting and orchestrated by cortical network activity // *Front. Mol. Neurosci.* 2022. V. 14. P. 807969.

353. Weihe E. et al. Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2006 264. 2006. V. 26. № 4. P. 657–676.

354. Weindl A. et al. Neurotransmitters and receptors in the subfornical organ. Immunohistochemical and electrophysiological evidence // *Progress in brain research* / под ред. S. Waxman et al. : Elsevier, 1992. P. 261–269.

355. Weiss B., Greenberg L., Cantor E. Age-related alterations in the development of adrenergic denervation supersensitivity // *Fed. Proc.* 1979. V. 38. № 5. P. 1915–1921.

356. Wierenga C. J. et al. Molecular and electrophysiological characterization of GFP-expressing CA1 interneurons in GAD65-GFP mice // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 12.

357. Williams R. H., Riedemann T. Development, diversity, and death of MGE-derived cortical interneurons // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 17.

358. Wilson C. J. Basal Ganglia // *The synaptic organization of the brain* / под ред. G. M. Shepherd. Oxford: Oxford University Press, 2004. Вып. 5th. P. 361–414.

359. Wong W. Pathogenic putrescine // *Sci. Signal.* 2022. V. 15. № 751. P. eade8161.

360. Wu J. Y. et al. L-Glutamate decarboxylase from brain // *Methods Enzymol.* 1985. V. 113. P. 3–10.

361. Wu J. Y., Matsuda T., Roberts E. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from mouse brain // *J. Biol. Chem.* 1973. V. 248. № 9. P. 3029–3034.

362. Wu X. et al. GABA signaling promotes synapse elimination and axon pruning in developing cortical inhibitory interneurons // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. № 1. P. 331–343.
363. Xing W., Lima A. D. de, Voigt T. The structural E/I balance constrains the early development of cortical network activity // *Front. Cell. Neurosci.* 2021. V. 15. P. 687306.
364. Xu Q. et al. Origins of cortical interneuron subtypes. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 11. P. 2612–22.
365. Yager L. M. et al. The ins and outs of the striatum: role in drug addiction // *Neuroscience.* 2015. V. 301. P. 529.
366. Yang S., Park J. H., Lu H. C. Axonal energy metabolism, and the effects in aging and neurodegenerative diseases // *Mol. Neurodegener.* 2023 181. 2023. V. 18. № 1. P. 1–32.
367. Yin F. X. et al. Hypoalgesia in mice lacking GABA transporter subtype 1 // *J. Neurosci. Res.* 2008. V. 86. № 2. P. 465–470.
368. Yin W., Gore A. C. The hypothalamic median eminence and its role in reproductive aging // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010. V. 1204. P. 113–122.
369. Yogeswara I. B. A., Maneerat S., Haltrich D. Glutamate decarboxylase from lactic acid bacteria – a key enzyme in GABA synthesis // *Microorganisms.* 2020. V. 8. № 12. P. 1–24.
370. Yozu M., Tabata H., Nakajima K. The caudal migratory stream: a novel migratory stream of interneurons derived from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse forebrain // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. № 31. P. 7268–7277.
371. Zaragoza R. Transport of amino acids across the blood-brain barrier // *Front. Physiol.* 2020. V. 11.
372. Zhang X. et al. NG2 glia-derived GABA release tunes inhibitory synapses and contributes to stress-induced anxiety // *Nat. Commun.* 2021 121. 2021. V. 12. № 1. P. 1–18.
373. Zheng Z., Chopp M., Chen J. Multifaceted roles of pericytes in central nervous system homeostasis and disease // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2020. V. 40. № 7. P. 1381–1401.
374. Zhou F. M. The striatal medium spiny neurons: what they are and how they link with Parkinson's disease // *Genet. Neurol. Behav. Diet Park. Dis. Neurosci. Park. Dis. Vol. 2.* 2020. P. 395–412.
375. Zhou Y. et al. Deletion of the γ -aminobutyric acid transporter 2 (GAT2 and SLC6A13)

gene in mice leads to changes in liver and brain taurine contents // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 42. P. 35733–35746.

376. Zilberter M. Reality of inhibitory GABA in neonatal brain: Time to rewrite the textbooks? // J. Neurosci. 2016. V. 36. № 40. P. 10242–10244.

377. Zimmerman C. A. et al. A gut-to-brain signal of fluid osmolarity controls thirst satiation // Nature. 2019. V. 568. № 7750. P. 98–102.

**СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ**

**Статьи, опубликованные в ведущих научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ,
и изданиях, входящих в зарубежные базы данных:**

1) Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Гусельникова В.В., Колос Е.А., Петрова Е.Р., Кирик О.В., Суфиева Д.А., **Разенкова В.А.**, Антипова М.В., Черныш М.В. Иммуногистохимические маркеры для нейробиологии // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т.19, № 4. – С. 7–24. – *RSCI*.

2) **Разенкова В. А.**, Коржевский Д. Э. ГАМК-ергические аксосоматические синапсы нейронов коры головного мозга крысы // Цитология. – 2020. – Т. 62, №11. – С. 815–821. – *RSCI*. (Переводная версия статьи: **Razenkova V.A.**, Korzhevskii D.E. GABAergic axosomatic synapses of rat brain cortex // Cell and Tissue Biology. – 2021. – V. 15, №3. – P. 267–272. – *Scopus*).

3) **Разенкова В.А.**, Коржевский Д.Э. Определение ГАМК-эргических нейронов и синаптических терминалей в головном мозге крысы с использованием иммуногистохимической реакции к двум изоформам глутаматдекарбоксилазы // Медицинский академический журнал. – 2021. – Т. 21, № 2. – С. 63–73. – *RCSI*.

4) **Разенкова В.А.**, Коржевский Д.Э. Морфологические изменения ГАМКергических структур головного мозга крысы в ходе постнатального развития. Нейрохимия. – 2022. – Т. 39, №1. – С. 59–69. – *RCSI*. (Переводная версия статьи: **Razenkova V.A.**, Korzhevskii D.E. Morphological changes in GABAergic structures of the rat brain during postnatal development // Neurochemical Journal. – 2022. – V. 16, №1. – P. 58–67. – *Web of Science*).

5) **Разенкова В.А.**, Коржевский Д.Э. Катехоламинергические структуры конечного мозга крысы в ходе раннего постнатального развития и при старении. Онтогенез. – 2022. – Т. 53, № 3. – С. 214–223. – *RSCI*. (Переводная версия статьи: **Razenkova V.A.**, Korzhevskii D.E. Catecholaminergic rat's forebrain structures in early postnatal development and aging // Russian Journal of Developmental Biology. – 2022. – V. 53, №. 3.– P. 208–216 – *Web of Science*).

6) **Разенкова В.А.**, Коржевский Д.Э. Катехоламинергические структуры субфорникального органа крысы. Цитология. – 2022. – Т 64, № 4, С. 372–380. – *RSCI*. (Переводная версия статьи: **Razenkova V.A.**, Korzhevskii D.E. Catecholaminergic structures of the rat subfornical organ // Cell and Tissue Biology. – 2022. – V. 16, № 6. – P. 568–575. – *Scopus*).

7) **Разенкова В.А.**, Коржевский Д.Э. Особенности распределения ГАМК- и нитроксидаэргических структур субфорникального органа крыс-самцов породы Вистар в раннем постнатальном развитии // Онтогенез. – 2023. – Т. 54, № 3. – С. 226–231. – *RSCI*. (Переводная версия статьи: **Razenkova V.A.**, Korzhevskii D.E. Structural organization of GABA- and nitroxidergic systems of subfornical organ in Wistar rats postnatal development // Russian Journal of Developmental Biology. – 2023. – V. 54, № 3. – P. 205–209. – *Web of Science*).

Результаты интеллектуальной деятельности:

1) Свидетельство о государственной регистрации базы данных 2022620288 Российская Федерация. ГАМК-ергические структуры сенсомоторной коры развивающегося мозга: N 2022620027: заявл. 11.01.2022: опубл. 04.02.2022 / **Разенкова В.А.**, Кирик О.В., Коржевский Д.Э.; заявитель и правообладатель ФГБНУ «ИЭМ». – 1 с.

Тезисы докладов:

1) **Разенкова В.А.** Распределение GAD67 в коре головного мозга половозрелых крыс породы Вистар и мышей линии C57/Bl6 / В.А. Разенкова // XXVI Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины-2020»: тез. докл. (Санкт-Петербург, 26-27 марта 2020 г.). – Санкт-Петербург, 2020. – С. 385-387.

2) **Разенкова В.А.**, Коржевский Д.Э. Морфологические особенности ГАМК-ергической системы головного мозга крысы в конце первой недели постнатального развития / **В.А. Разенкова**, Д.Э. Коржевский // VII Молодежная школа-конференция ИНЦ РАН: Гены & Клетки. – 2020. – Т. 15, № 3. – С. 174. – *Scopus*.

3) **Разенкова В.А.**, Коржевский Д.Э. Морфологические признаки, характерные для ГАМК-ергической системы головного мозга крысы при нормальном старении / **В.А. Разенкова**, Д.Э. Коржевский // XXXIII Зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»: тез. докл. (Москва, 8-11 февраля 2021 г.). – Москва, 2021. – С. 120.

4) **Разенкова В.А.**, Коржевский Д.Э. Морфологические изменения ГАМК-ергической системы головного мозга крысы в первый месяц постнатального развития / **В.А. Разенкова**, Д.Э. Коржевский // Вопросы морфологии XXI века: Сборник трудов. – СПб: ООО «Издательство ДЕАН», 2021. – С. 139-140.

5) **Разенкова В.А.** Влияние старения на распределение тирозингидроксилазы в структурах головного мозга крыс Вистар / В.А. Разенкова // Всероссийская научная

конференция с международным участием, посвященной памятной дате института (60-летию НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына): тез. докл. (Москва, 18-19 ноября 2021 г.). – Москва, 2021. – С. 182-184.

6) **Razenkova V.A.**, Korzhevskii D.E. GABAergic system of subfornical organ in adult and aged rats / **V.A. Razenkova**, D.E. Korzhevskii // The Biochemistry Global Summit, 25th IUBMB Congress, 46th FEBS Congress, 15th PABMB Congress: FEBS Open Bio. – 2022. – V.12, №S1. – P. 153. DOI: 10.1002/2211-5463.13440 – *Web of Science*

7) **Razenkova V.A.**, Korzhevskii D.E. Structural organization of subfornical organ's neurotransmitter systems in adult rats / **V.A. Razenkova**, D.E. Korzhevskii // FENS Forum of Neuroscience: тез. докл. (Paris, France, 9-14 July 2022). – Paris, 2022. – P. 3347.

8) **Разенкова В.А.**, Коржевский Д.Э. Особенности распределения ГАМК- и нитроксидергических структур субфорникального органа крыс-самцов породы Вистар в раннем постнатальном развитии / **В.А. Разенкова**, Д.Э. Коржевский // Юбилейная научная конференция «Николай Константинович Кольцов и биология XXI века»: тез. докл. (Москва, 3-8 октября, 2022 г.). – Москва, 2022. – С. 72–73.