

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-2-3-7

ВЛИЯНИЕ ФЕНИБУТА НА КОЛИЧЕСТВО ГАМКергических НЕЙРОНОВ В НЕОКОРТЕКСЕ У КРЫС В ЮВЕНИЛЬНОМ И ПРЕПУБЕРТАТНОМ ПЕРИОДАХ ПОСЛЕ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ В ПЕРИНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

В. А. Отеллин¹, Л. И. Хожай¹, И. Н. Тюренков²

Исследование выполнено на крысах линии Вистар. В работе использованы модели недоношенной беременности человека и энцефалопатии новорожденных. Воздействие гипоксии осуществляли на 2 сут постнатального развития. Для выявления ГАМКергических нейронов использовали кроличьи поликлональные антитела к глутаматдекарбоксилазе (GAD-67) (Bioscience, США). Фенибут вводили подкожно, в дозе 15 мг/кг в течение 14 дней. Исследовали сенсомоторную область неокортекса у крыс на 20 и 40 постнатальные сутки (ювенильный и препубертатный периоды). Показано, что у интактных животных количество ГАМКергических нейронов в сенсомоторной коре к 20 дню жизни достигает определенной численности ($141,7 \pm 6,8$), которая возрастает до ($152,8 \pm 6,9$) к 40 сут постнатального периода. У крыс, подвергавшихся воздействию перинатальной гипоксии, на 20 и на 40 сут жизни общее число ГАМКергических нейронов в неокортексе было значительно меньше, чем у интактных животных: ($110,5 \pm 5,8$) и ($92,4 \pm 7,1$), $p < 0,05$, соответственно. У крыс, перенесших гипоксию и получавших фенибут, численность ГАМКергических нейронов соответствовала такому значению у интактных животных — ($144,4 \pm 7,3$) и ($159,2 \pm 5,8$), $p < 0,05$, соответственно.

Ключевые слова: ГАМКергические нейроны; фенибут; перинатальная гипоксия; неокортекс; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в клинических и экспериментальных исследованиях большое внимание уделяют изучению механизмов гипоксически-ишемических поражений головного мозга новорожденных, а также механизмов формирования патологии в перинатальный период, проявляющийся в последующем онтогенезе [3]. Гипоксия в ранний постнатальный период является одной из основных причин возникновения патологии головного мозга, определяемой как гипоксически-ишемическая энцефалопатия или перинатальная энцефалопатия. Последняя подразумевает структурные и функциональные нарушения в различных отделах головного мозга, проявляющиеся задержкой умственного и психического развития, нарушением памяти, внимания, поведения, сна, церебральным параличом, симптоматической эпилепсией [1]. Особенно остро неблагоприятное воздействие гипоксии-ишемии

на ткань мозга может проявляться у недоношенных детей, органы и системы которых к моменту рождения не достигли, как у доношенных, определенной структурной и функциональной зрелости.

В наших предыдущих исследованиях было показано, что перинатальная гипоксия приводит к изменению цитоархитектоники в неокортексе, задержке нейрогенеза, пролонгированной гибели части нейронов и, как результат, — к сокращению численности популяций разных типов нейронов, в том числе и ГАМКергических нейронов в неокортексе [8, 10, 11]. Возможно, это и лежит в основе неврологических и психоэмоциональных нарушений, ювенильной миоклонической эпилепсии, фибриллярных судорог, идеопатической эпилепсии [4 – 6].

В экспериментах на модели преэклампсии было показано, что использование фенибута и его производных улучшает психическое и физическое развитие крыс, родившихся от самок с экспериментальным гестозом, при котором потомство, вследствие нарушения маточно-плацентарного кровообращения, длительное время развивалось в условиях гипоксии [3, 4]. Многие педиатры используют фенибут для коррекции психо-неврологической патологии в детском возрасте [3, 4].

¹ Институт физиологии имени И. П. Павлова РАН, Россия, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6.

² ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Россия, 400131, Волгоград, площадь Павших борцов, д. 1.

Показано, что фенибут обладает антистрессорным, антиоксидантным и антигипоксическим действием. Такие данные позволяют предположить, что фенибут может уменьшать негативное действие гипоксии на формирование пула ГАМКергических нейронов в раннем постнатальном периоде.

Задачей настоящего исследования была оценка действия фенибута на количество ГАМКергических нейронов в неокортексе у крысят ювенильного и препубертатного возраста, подвергшихся воздействию острой гипоксии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 36 крысах линии Вистар (Питомник лабораторных животных “Рапполово”, Ленинградская область, д. Рапполово), содержавшихся в условиях вивария в течение 2 недель до начала эксперимента, на стандартном корме, при свободном доступе к воде и корму, естественном световом режиме. После спаривания крыс в возрасте 5 – 6 мес самок отсаживали в отдельные клетки. После рождения отбирали от каждой самки 3 детенышей, равных по массе, затем их метили и распределяли по 3 группам (12 крысят в каждой). В работе были использованы модели недоношенной беременности человека и энцефалопатии новорожденных [11, 12]. Животных группы 1 (интактной) на 2 постнатальные сутки на 1 ч помещали в камеру, через которую пропускали комнатный воздух при температуре 21 – 23° С и атмосферном давлении 760 мм рт. ст. Животных 2-й контрольной группы и 3-й группы, в последующем получавших фенибут, подвергали гипоксии в боксе с обедненной кислородом дыхательной смесью: кислород — 7,6 – 7,8 %; углекислый газ — 0,15 – 0,21 %; азот — 91,8 %, при температуре 21,3 – 23 °С и нормальном атмосферном давлении (760 мм рт. ст.).

Таблица 1. Количество ГАМКергических нейронов во фрагменте сенсомоторной области неокортекса, включающего все его слои (I – VI) ($M \pm m$)

Группа животных	20 сут	40 сут
1 (негативный контроль)	141,7 ± 6,8	152,8 ± 6,9 + 7,8 % ¹
2 (позитивный контроль)	110,5 ± 5,8 – 22 % ^{2**}	92,4 ± 7,1 – 16,4 % ^{1*} – 39,5 % ^{2**}
3 (опытная)	144,4 ± 7,3 + 1,9 % ² + 30,7 % ^{3*}	159,2 ± 5,8 + 10,2 % ¹ + 4,2 % ² + 72,3 % ^{3**}

Различия между данными группы статистически значимы при: * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$, соответственно (увеличение: окуляр $\times 10$ и объем $\times 10$);

¹ — показатели на 40 сут, по сравнению с таковыми на 20 сут; между группами;

² — сравнение с контрольной группой 1;

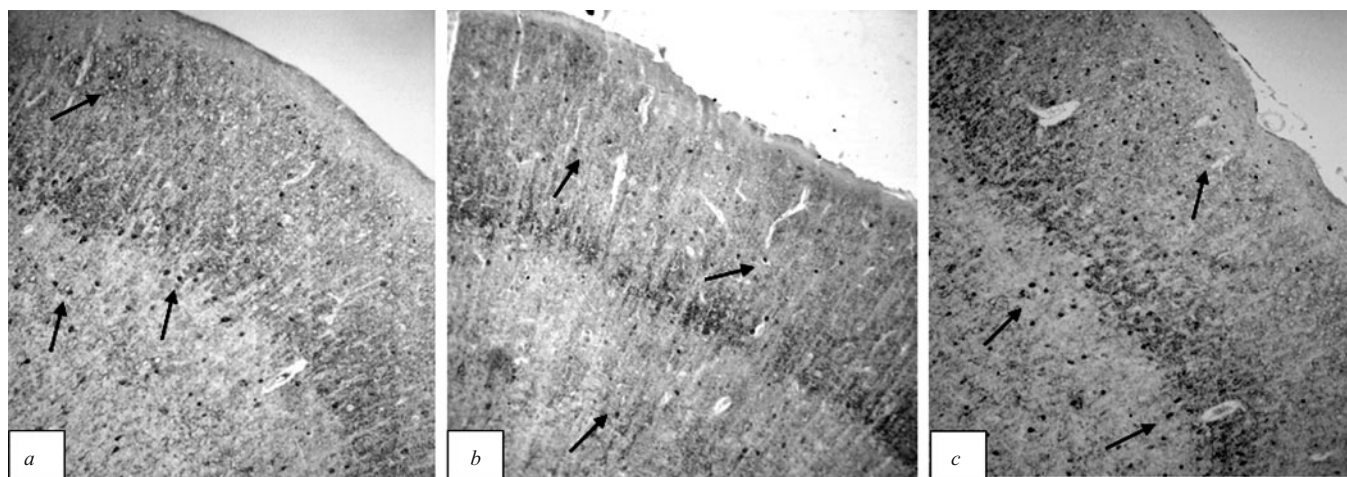
³ — сравнение показателей группы 3 с группой 2.

Всем животным 1 и 2 контрольных групп со 2 постнатальных суток после воздействия гипоксии вводили 0,9 % раствор натрия хлорида, а животным 3-й группы вводили фенибут подкожно в дозе 15 мг/кг в течение 14 дней.

Морфологические исследования мозга проводили на 20 и 40 постнатальные сутки (ювенильный и препубертатный периоды). Оба эти срока развития связаны с определенными изменениями: на 20 день крысята покидают гнездо, у них меняется тип питания, возникают новые поведенческие реакции; 40 день — препубертатный период — начальная фаза полового созревания, начало секреции половых гормонов и развития вторичных половых признаков, изменение психо-эмоциональных реакций. Для исследования была выбрана сенсомоторная область неокортекса, контролирующая преимущественно моторные функции и сенсорную обратную связь, функциональное объединение которых образует единый двигательный анализатор, контролирующий целенаправленные движения. Повреждение сенсомоторной коры приводит к нарушению инициации движений, неправильному их выполнению (движения приобретают атактический или спастический характер), либо к параличу. По наблюдениям клиницистов среди последствий воздействия перинатальной гипоксии у новорожденных наиболее частыми являются нарушения двигательных реакций.

Для проведения гистологических исследований выделяли головной мозг после декапитации гильотиной, фиксировали в течение 24 ч в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (pH 7,4). Фиксированный материал обезвоживали и заливали в парафин по общепринятой гистологической методике. Фронтальные серийные срезы неокортекса толщиной 4 – 5 мкм производили на микротоме фирмы Reihert (Германия). Для выявления ГАМКергических нейронов использовали кроличьи поликлональные антитела к глутаматдекарбоксилазе (GAD-67) (Bioscience, США); в качестве вторичных реагентов для GAD-67 использовали реактивы из набора EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США). Для визуализации продукта иммуногистохимической реакции использовали хромоген DAB+(3,3'-диаминобензидин) (Dako, Дания). После проведения иммунной реакции часть срезов докрашивали гематоксилином Джилла и заключали в синтетическую заливочную среду Permaunt (Termo, США). При проведении иммуногистохимической реакции все процедуры были стандартизированы и проводились одновременно для гистологических срезов, полученных от контрольных и подопытных групп животных.

Количественный подсчет ГАМКергических нейронов проводили на цифровых изображениях серийных срезов, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия). Подсчитывали общее число ГАМКергических нейронов в сенсомоторной



Неокортекс крысы, сенсомоторная область на 40 постнатальные сутки. Иммуногистохимическая реакция на выявление GAD-67; *a* — контроль; *b* — после воздействия перинатальной гипоксии; *c* — после воздействия перинатальной гипоксии и применения фенибута (стрелка — иммунореактивные нейроны на GAD-67). Увеличение: окуляр $\times 10$; объектив $\times 10$.

области неокортекса на стандартной площади $1,06 \text{ мм}^2$ при увеличении: окуляр $\times 10$ и объектив $\times 10$; в отдельных слоях коры число нейронов подсчитывали при увеличении окуляра $\times 10$ и объектива $\times 40$. Подсчитывали среднее число ГАМКергических нейронов и стандартную ошибку среднего значения. Для статистической обработки данных использовали прикладные компьютерные программы Statistica 8.0. Приведенные в таблицах результаты представлены как средние значения подсчетов клеток в указанных фрагментах коры у разных групп животных \pm средняя ошибка. Для анализа данных и сравнения результатов между разными группами животных использовали *t*-критерий Стьюдента и *one-way ANOVA*. Результаты считались значимо различимыми при уровне достоверности $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У животных контрольной группы 1 ювенильного возраста иммунореактивные нейроны в большом количестве присутствуют во всех слоях неокортекса, распределены диффузно и равномерно (рисунок).

У животных группы 2, перенесших перинатальную гипоксию, общее число ГАМКергических нейронов в сенсомоторной области неокортекса было меньше (на 22%), а на 40 день — на 65,4%, по сравнению с этими показателями у крыс группы 1 (табл. 1). У крысят группы 3, получавших в течение 14 сут фенибут и достигших ювенильного и препубертатного возраста, общее число ГАМКергических нейронов не отличалось от показателей группы 1, однако было значительно выше на 20 сут (на 30,7%), а на 40 сут — на 72,3%, чем у животных группы 2 (табл. 1). При этом у живот-

Таблица 2. Количество ГАМКергических нейронов в разных слоях сенсомоторной области неокортекса (20 и 40 постнатальные сутки) ($M \pm m$)

Срок эксперимента, сут	Группа животных	Количество GAD-67-иммуноположительных нейронов во II – VI слоях сенсомоторной области неокортекса			
		II – III	IV	V	VI
20	Контрольная группа 1	$14,4 \pm 1,3$	$14,1 \pm 1$	$18,2 \pm 1,1$	$17,6 \pm 0,9$
	Контрольная группа 2	$10,1 \pm 1,1$ (– 42,6 % ¹)*	$10,3 \pm 1,4$ (– 36,9 % ¹)*	$11,3 \pm 0,9$ (– 61,1 % ¹)*	$8,5 \pm 1,2$ (– 107 % ¹)**
	Опытная группа 3	$9,5 \pm 1,7$ (– 51,6 % ^{1,**} , – 6,3 % ²)	$12,3 \pm 1,2$ (– 14,6 % ¹ , + 19,4 % ²)	$15,3 \pm 0,7$ (– 19 % ¹ , + 35,4 % ²)*	$15,1 \pm 1,2$ (– 16,6 % ¹ , – 77,6 % ²)**
40	Контрольная группа 1	$14,2 \pm 1,8$	$14,7 \pm 1,3$	$11,4 \pm 1,2$	$14,0 \pm 0,9$
	Контрольная группа 2	$6,3 \pm 1,2$ (– 125,4 % ¹)	$6,1 \pm 1,1$ (– 140 % ¹)	$6,3 \pm 1,4$ (– 81 % ¹)	$8,7 \pm 1,2$ (– 60,9 % ¹)
	Опытная группа 3	$13,1 \pm 1,3$ (– 8,4 % ¹ , + 107,9 % ²)**	$12,4 \pm 0,9$ ** (– 18,5 % ¹ , + 105,3 % ²)**	$13,7 \pm 0,8$ (+ 8,3 % ¹ , + 117,5 % ²)**	$12,4 \pm 1,1$ ** (– 12,9 % ¹ , + 42,5 % ²)*

Результаты статистически значимы при: * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$, соответственно (увеличение: окуляр $\times 10$ и объектив $\times 10$).

¹ Сравнение с контрольной группой 1.

² Сравнение показателей группы 3 с показателями группы 2.

ных контрольной группы (группа 1) и получавших фенибут (группа 3) препубертатного возраста обнаружено незначительное увеличение числа ГАМКергических нейронов в сенсомоторной области неокортекса, тогда как у животных группы 2 количество этих нейронов уменьшилось на 19,5 %.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у животных, подвергавшихся воздействию перинатальной гипоксии, как на 20 сут, так и на 40 сут жизни общее число ГАМКергических нейронов в неокортексе значительно меньше, чем у животных группы 1, т.е. фенибут нормализует число ГАМКергических нейронов в неокортексе у крыс, перенесших гипоксию в перинатальный период.

У крыс группы 2, достигших ювенильного и пубертатного возраста, во всех слоях сенсомоторной области неокортекса отмечается меньшее число тормозных ГАМКергических нейронов, особенно на 40 сут жизни, по сравнению с интактными животными группы 1 (табл. 2).

У крыс группы 3, которые получали фенибут, отмечена меньшая численность ГАМКергических нейронов во всех слоях сенсомоторной области, по сравнению с контрольной группой 1, но значительно большее, чем у животных контрольной группы 2, особенно на 40 сут после рождения (табл. 2).

В последнее десятилетие получены новые факты, касающиеся механизмов межнейронных взаимодействий во всех слоях коры головного мозга. В частности, установлено, что кортикальные нейроны формируют микроцепи, которые функционально организованы в виде вертикальных колонок, охватывающих все слои. Они включают и ГАМКергические тормозные интернейроны [2, 9, 13]. В неокортексе, центральной структуре конечного мозга млекопитающих, с участием ГАМК осуществляются многочисленные сенсорные, моторные и когнитивные функции. Есть данные о том, что кортикальные ГАМКергические интернейроны, функционирующие в локальных тормозных сетях, регулируют возбуждение пирамидных нейронов, генерацию кортикальных ритмов, организацию сенсорных полей и кортикальную пластичность [10]. Сокращение численности популяции неокортикальных тормозных интернейронов, установленное в нашей работе, может лежать в основе неврологических и психических нарушений (эпилепсия, шизофрения, аутизм, врожденное слабоумие), которые наблюдаются у детей с постинсультной энцефалопатией.

Изучение динамики изменения численности ГАМКергических нейронов в неокортексе в ювенильном и препубертатном периодах, когда продолжает осуществляться реализация программы морфогенетического становления мозга, показало, что применение фенибута сразу после воздействия гипоксии нивелирует ее повреждающие эффекты в отношении численности тормозных интернейронов.

Учитывая важную роль ГАМКергических нейронов в функционировании ЦНС и в развитии различных ее патологий, можно предположить, что значительное уменьшение числа тормозных нейронов объясняет поведенческие нарушения у ювенильных крыс, перенесших перинатальную гипоксию [2].

Полученные данные, по нашему мнению, имеют большое значение для разработки стратегии фармакологической коррекции негативных последствий гипоксически-ишемических поражений головного мозга новорожденных, а также обосновывают перспективность применения фенибута для профилактики и лечения психо-неврологических нарушений в постнатальном периоде у детей, перенесших гипоксию в раннем неонатальном возрасте.

ВЫВОДЫ

1. У интактных крыс количество ГАМКергических нейронов в сенсомоторной коре на 20 и 40 день жизни составило, соответственно, $(141,7 \pm 6,8)$ и $(152,8 \pm 6,9)$ на площади $1,06 \text{ мм}^2$. У крыс, перенесших гипоксию на 2 сут постнатального периода, общее число ГАМКергических нейронов в той же области сенсомоторной коры на 20 и 40 сут было статистически значимо меньше: $(110,5 \pm 5,8)$ и $(92,4 \pm 7,1)$, $p < 0,05$, соответственно, чем таковое у интактных животных.

2. У крыс, получавших фенибут в течение 14 сут (с 3 по 17 день жизни), число ГАМКергических нейронов в неокортексе на 20 и 40 сут составило $(144,4 \pm 7,3)$ и $(159,2 \pm 5,8)$, что соответствовало его значению у интактных животных и статистически значимо ($p < 0,05$) превышало их количество у крыс, перенесших воздействие перинатальной гипоксии.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Моргун, Т. Е. Таранушенко, Е. Д. Хилажева и др., *Вестник РАМН*, **12**, 26 – 35 (2013). doi: 10.15690/vramn.v68i12.856.
2. В. А. Отеллин, Л. И. Хожай, Т. Т. Шишко, И. Н. Тюренков, *Морфология*, **150**(6), 7 – 12 (2016).
3. В. Н. Перфилова, Л. Б. Иванова, В. И. Карамышева, Д. Д. Бородин, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **75**(3), 18 – 20 (2012); doi: 10.30906/0869-2092-2012-75-3-18-20.
4. И. Н. Тюренков, В. Н. Перфилова, Т. А. Попова и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **155**(3), 340 – 343 (2013).
5. E. E. Benarroch, *Neurology*, **81**(3), 273 – 280 (2013); doi: 10.1212/WNL.0b013e31829c002f.
6. G. T. Gonzalez-Burgo, D. E. Miyamae, Y. P. Pafundo, et al., *Cereb. Cortex*, **25**(11), 4076 – 4093 (2015); doi: 10.1093/cercor/bhu122.
7. M. Herrera-Marschit, T. Neira Pefia, E. Rojas-Mancilla, et al., *Adv. Neurobiol.*, **10**, 169 – 198 (2015); doi: 10.1007/978-1-4939-1372-5 9.
8. L. I. Khozhai, V. A. Otellin, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **45**(5), 490 – 492 (2015); doi: 10.1007/s11055-015-0100-1.
9. P. Mendez, A. Bacci, *Neural Plast.*, **2011**, ID 976856 (2011); doi: 10.1155/2011/976856.
10. F. J. Northigton, R. Chavez-Valdez, L. J. Martin, *Ann. Neurol.*, **69**(5), 743 – 758 (2011); doi: 10.1002/ana.22419.

11. V. A. Otellin, L. I. Khozhai, L. A. Vataeva, *J. Evolution. Biochem. Physiol.*, **48**(5–6), 540–554 (2012).
12. R. C. Vannucci, S. J. Vannucci, *Ann. NY Acad. Sci.*, **835**(1), 234–249 (1997).
13. A. V. Zaitsev, D. A. Lewis, *Eur. J. Neurosci.*, **38**(7), 2988–2998 (2013).

Поступила 06.02.20

THE EFFECT OF PHENIBUT ON THE NUMBER OF GABAergic NEURONS IN RAT NEOCORTEX DURING JUVENILE AND PREPUBERANT PERIODS AFTER ACUTE HYPOXIA IN THE PERINATAL PERIOD

V. A. Otellin¹, L. I. Khozhai¹, and I. N. Tyurenkov²

¹ Volgograd State Medical University 1, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

² Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia

Effects of phenibut were studied on Wistar rats with models of premature human pregnancy and newborn encephalopathy. Animals were exposed to hypoxia on the 2nd day of postnatal development. GABAergic neurons were detected using rabbit polyclonal antibodies to glutamate decarboxylase (GAD-67). Phenibut was administered subcutaneously at a dose of 15 mg/kg for 14 days. The sensorimotor region of neocortex was examined in rats on 20th and 40th postnatal days (juvenile and prepuberant periods). The number of GABAergic neurons in the sensorimotor cortex of intact animals at 20th day of life reaches 141.7 ± 6.8 and increases to 152 ± 6.9 at the 40th day of life. In rats exposed to perinatal hypoxia on the 20th and 40th day of life, the total number of GABAergic neurons in the neocortex was significantly lower than that in intact animals (110.5 ± 5.8 and 92.4 ± 7.1 , $p < 0.05$), respectively. In hypoxic phenibut-treated rats, the numbers of GABAergic neurons were close to that in intact animals (144.4 ± 7.3 and 159.2 ± 5.8 , $p < 0.05$, respectively).

Keywords: GABAergic interneurons; phenibut; perinatal hypoxia; neocortex; rats.