

УДК 611.018.8:612.65

## ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ГАМК И $\alpha 1$ -СУБЪЕДИНИЦЫ ГАМК<sub>A</sub>-РЕЦЕПТОРА В КЛЕТКАХ СУБВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНЫ МОЗГА КРЫСЫ В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

© 2021 г. Л. И. Хожай\*

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

\*E-mail: astarta0505@mail.ru

Поступила в редакцию 24.05.2021 г.

После доработки 15.06.2021 г.

Принята к публикации 21.06.2021 г.

Цель работы заключалась в выявлении иммуноцитохимическими методами ГАМК и  $\alpha 1$ -субъединицы ГАМК<sub>A</sub>-рецептора в неонатальный период развития (5-е и 10-е сутки постнатального развития) у крыс. Показано, что в субвентрикулярной зоне (СВЗ) в неонатальный период, также как и в СВЗ взрослого мозга присутствуют все типы прогениторных клеток. Значительная часть прогениторных клеток (30%) дифференцируется по нейрональному типу и представляет собой мигрирующие юные нейробласты (тип А), количество которых остается постоянным на протяжении всего неонатального периода. Юные нейробласты и часть астроцитоподобных стволовых клеток иммуноположительны на ГАМК, число таких клеток составляет около 40% и сохраняется постоянным на протяжении всего неонатального периода. Подавляющее большинство клеток СВЗ – юные нейробласты (тип А), астроцитоподобные стволовые клетки (тип В) и часть транзиторных клеток (тип С) – экспрессируют ГАМК<sub>A</sub>-рецептор, содержащий субъединицу  $\alpha 1$ . Количество этих типов прогениторных клеток поддерживается в течение неонатального периода на постоянном уровне. Присутствие ГАМК<sub>A</sub> $\alpha 1$ -рецепторов в подавляющем числе клеток СВЗ указывает на возможное вовлечение ГАМК и ГАМКергической передачи сигналов в регуляцию функционирования разных типов клеток СВЗ.

**Ключевые слова:** субвентрикулярная зона, нейрональные стволовые клетки, ГАМК, ГАМК<sub>A</sub> $\alpha 1$ , неонатальный период

DOI: 10.31857/S0041377121050072

Известно, что у млекопитающих и человека в субвентрикулярной зоне (СВЗ) взрослого мозга, одной из нейрогенных ниш, продолжительный период времени сохраняется генерация нейральных клеток. СВЗ содержит самый большой пул стволовых нейральных клеток, которые дают начало новым популяциям нервных и нейроглиальных клеток (Anderson, 2001; Sanai et al., 2004; Conover, Notti, 2008; Platel et al., 2010). Область субвентрикулярной зоны содержит несколько основных типов клеток, различающихся по своей морфологии и экспрессирующим различные маркерные белки. Юные нейробласты (тип А), имеющие отростки, образуют цепочки клеток и мигрируют из СВЗ к другим формациям головного мозга. Крупные малодифференцированные стволовые клетки (тип В), экспрессирующие глиальный фибриллярный белок (GFAP) и рассматриваемые как астроцитоподобные клетки СВЗ, часто окружают цепочки мигрирующих нейробластов и обладают некоторыми свойствами астроцитов. Транзиторные клетки-предшественники (тип С) – мелкие, округлой формы, рассеянные по территории СВЗ, облада-

ющие высокой способностью к пролиферации – могут располагаться группами рядом с нейробластами или одиночно. Наконец, еще один тип – это эпендимные клетки, несущие реснички на апикальной поверхности, выстилающие полость латерального желудочка (Peretto et al., 1997; Doetsch et al., 1997; Mercier et al., 2002; Platel et al., 2010).

Юные нейробласты мигрируют вдоль рострального миграционного пути в обонятельную луковицу, также установлена их миграция в неокортекс и стрiatum (Kreuzberg et al., 2010), где они дифференцируются в интернейроны и интегрируются в локальные тормозные сети (Luskin, 1993; Swarzenski et al., 1996). Установлено, что в СВЗ взрослого мозга процесс образования новых клеток происходит постоянно и приблизительные подсчеты показали, что только к обонятельной луковице каждый день мигрирует от 10000 до 30000 нейробластов (Lledo et al., 2006). Такой активный нейрогенез требует гомеостатического контроля, баланса интенсивности пролиферации стволовых клеток и миграции дифференцирующихся клеток.

СВЗ во взрослом мозге содержит множество молекулярных факторов, которые могут осуществлять контроль как пролиферации стволовых нейральных

**Принятые сокращения:** СВЗ – субвентрикулярная зона; GAD – глутаматдекарбоксилаза.

клеток, так и миграции нейробластов (Hagg, 2005). Одним из таких факторов является тормозный нейротрансмиттер гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), который, как показано, может осуществлять контроль пролиферации нейральных клеток, а также играть критическую роль на разных этапах созревания нейронов в период становления неокортекса (Schlett, 2006; Platel et al., 2010). Показано, что основным рецептором, участвующим в быстрой синаптической трансмиссии ГАМК во взрослом мозге, является ГАМК<sub>A</sub>-рецептор, содержащий  $\alpha 1$ -субъединицу. Было показано, что в условиях культивирования нейробласты и клетки-предшественники других типов в СВЗ экспрессируют ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы, содержащие различные субъединицы и могут активироваться самой ГАМК, высвобождаемой в окружающую среду (Stewart et al., 2002). В настоящее время большинство работ по исследованию экспрессии ГАМК и ГАМК<sub>A</sub>-рецептора в клетках СВЗ были проведены в условиях культуры клеток СВЗ взрослого мозга. Несмотря на большой интерес к механизмам самовосстановления численности популяций нейронов в зрелом мозге после повреждения, сопровождающегося утратой части нейронов, в настоящее время в литературе недостаточно данных об экспрессии ГАМК и ГАМК<sub>A</sub>-рецептора, содержащего  $\alpha 1$ -субъединицу в неонатальный период, когда имеет место развитие и становление как самого мозга, так и ГАМКергической тормозной системы.

В связи с этим целью работы являлось изучение экспрессии ГАМК и  $\alpha 1$ -субъединицы ГАМК<sub>A</sub>-рецептора в СВЗ в неонатальный период развития у крыс и попытка оценки роли ГАМК в регуляции пролиферации прогениторных клеток СВЗ.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

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

**Гистологические и иммуногистохимические методы исследования.** Головной мозг извлекали, фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (рН 7.4), заливали в парафин по общепринятой методике и готовили серийные фронтальные срезы мозга толщиной 6–7 мкм на уровне брегмы –1.80–1.68 мм (Paxinos, Watson, 1998). Затем срезы помещали на предметные стекла Super-Frost Plus Gold (Menzel-Glaser, Германия). У интактных животных исследовали СВЗ (рис. 1а, область исследования – выделенный фрагмент), на 5-е ( $n = 5$ ) и 10-е ( $n = 5$ ) сутки постнатального развития (П5 и П10).

Иммуногистохимическую реакцию на  $\beta$ -III-тубулин проводили с использованием первичных кроличьих моноклональных антител (anti-beta-III-tubulin, клон [EP1569Y], Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 50. После процедуры теплового демаскирования белков в цитратном буфере (рН 6.1) (Dako, Дания) в течение 25 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при 4°C в течение 18 ч. В качестве

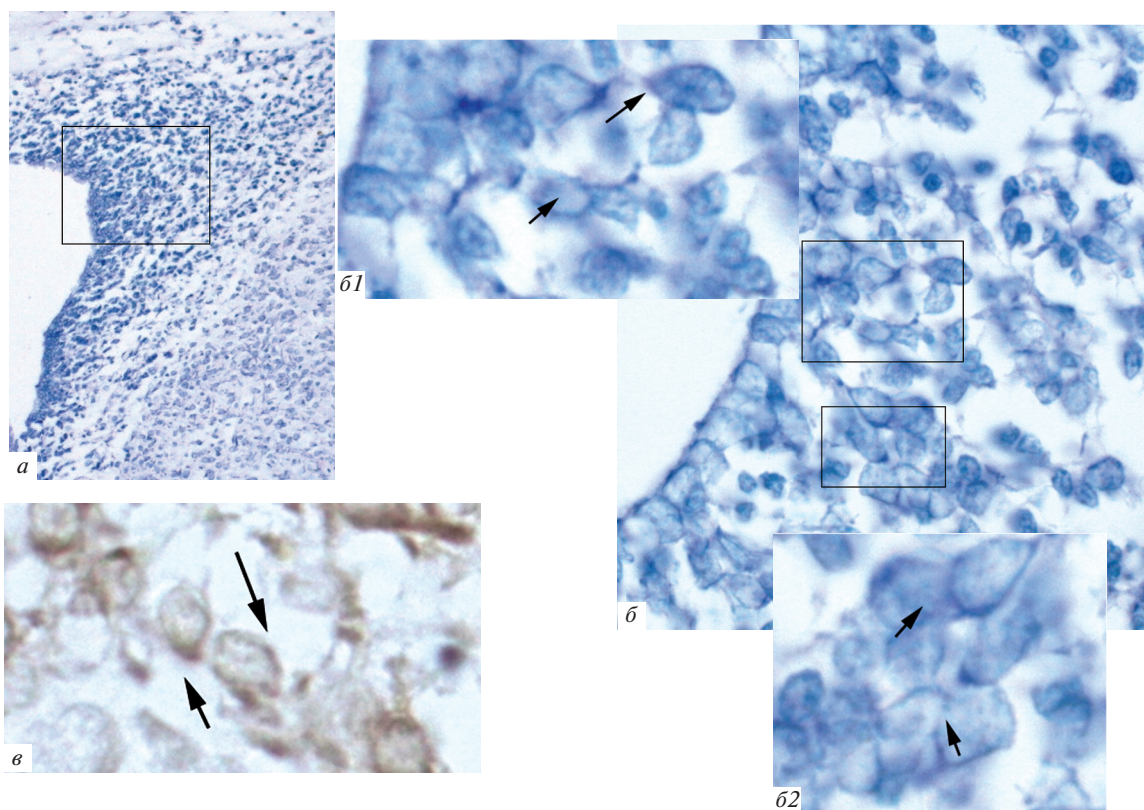
вторичных реагентов для антител к  $\beta$ -III-тубулину использовали реактивы из набора LSAB + System-HRP (Dako, Дания) (срезы помещали в биотинилированные антитела “Link” на 35 мин при комнатной температуре и после промывания в фосфатном буфере помещали в стрептовидин/HRP на 30 мин при комнатной температуре). Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). Специфичность иммунной реакции проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител).

Иммуногистохимическую реакцию на ГАМК проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA antibody, Abscam, Великобритания) в разведении 1 : 1000. После процедуры теплового демаскирования белков в цитратном буфере (рН 6.1) (Dako, Дания) в течение 25 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при 4°C в течение 16 ч. В качестве вторичных антител использовали Goat anti-rabbit IgG H&L(HRP) (Abscam, Великобритания). Срезы помещали во вторичные антитела на 40 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). Специфичность иммунной реакции проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител).

Иммуногистохимическую реакцию на выявление  $\alpha 1$ -субъединицы ГАМК<sub>A</sub>-рецептора осуществляли с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA<sub>A</sub> $\alpha 1$  receptor antibody, Abscam, Великобритания) в разведении 1 : 300. После процедуры теплового демаскирования белков в цитратном буфере (рН 6.1) (Dako, Дания) в течение 20 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при 4°C в течение 16 ч. В качестве вторичных реагентов для антител к GABA<sub>A</sub> $\alpha 1$  использовали реактивы из набора EnVision + System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США). Инкубацию срезов во вторичных антителах осуществляли в течение 40 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). После проведения иммуногистохимических реакций часть срезов докрашивали гематоксилином Джилла и заключали в синтетическую заливочную среду Permaunt (Termo, США). Специфичность иммунной реакции проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител).

**Статистическая обработка результатов исследования.** При проведении иммуногистохимических реакций все процедуры были стандартизированы и осуществлялись одновременно для гистологических срезов мозга, полученных от обеих возрастных групп. Материал анализировали на цифровых изображениях фронтальных серийных срезов, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия).

Количество иммуноположительных клеток оценивали на стандартной площади 0.1 мм<sup>2</sup> (условной



**Рис. 1.** Субвентрикулярная зона мозга крысы на П10. *a* – Область исследования (выделенный фрагмент), окраска по методу Ниссля; *б* – нейробласты, имеющие отростки и образующие цепочки (тип А) (*б1*, стрелки) и астроцитоподобные стволовые клетки (тип В) (*б2*, стрелки), окраска по методу Ниссля. *в* – Иммуногистохимическая реакция на  $\beta$ -III-tubulin, иммуноположительные клетки с отростками, образующие цепочки (тип А) (стрелки). Увел. об.: *a* – 10 $\times$ , *б*, *в* – 100 $\times$ .

единице площади) при увеличении объектива 100 $\times$ . Подсчитывали число иммуноположительных клеток и общее количество всех типов клеток. Соотношение между ними выражали в процентах. Численный анализ данных осуществляли на изображениях, полученных с 10–12 гистологических срезов мозга, взятого от 4 животных каждой исследуемой возрастной группы при помощи пакетов компьютерных программ ImageJ (NIH, США), Origin 5.0. Статистически обработанные данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $m \pm SEM$ ). Для анализа и сравнения полученных результатов между разными группами животных использовали *t*-критерий Стьюдента и *oneway* ANOVA (Statistica 8.0, Statsoft Inc., USA), различия считали достоверными при  $P < 0.05$ .

**Использованные реактивы:** первичные кроличьи моноклональные антитела anti-beta-III-tubulin, клон [EP1569Y], первичные кроличьи поликлональные антитела anti-GABA antibody, anti-GABA $\alpha 1$ -receptor antibody, вторичные антитела козы к иммуноглобулину кролика IgG H&L(HRP) (Abscam, Великобритания); вторичные антитела из набора LSAB + + System-HRP, хромоген DAB+ (Dako, Дания); вторичные антитела из набора реактивов EnVision + + System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Dako-

Cytomation, США); метиленовый синий (Bio-Optica, Италия); синтетическая среда для заключения гистологических срезов Permaunt (Termo, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Иммуногистохимическая реакция на  $\beta$ -III-тубулин.** В неонатальный период (П5 и П10) в субвентрикулярной зоне мозга крыс присутствуют все типы клеток-предшественников, описанные ранее в СВЗ взрослого мозга (Platel et al., 2010): тип А – мигрирующие юные нейробласты (рис. 1*б1*, стрелки); тип В – малодифференцированные астроцитоподобные стволовые клетки (рис. 1*б2*, стрелки); тип С – транзиторные клетки малого размера, имеющие округлую форму тела; тип Е – эпендимные клетки, выстилающие полость латерального желудочка.

Для верификации дифференциации стволовых клеток СВЗ по нейрональному типу использовали иммуногистохимическое выявление  $\beta$ -III-тубулина (маркера ранней нейрональной дифференцировки). Картина распределения  $\beta$ -III-тубулина в клетках СВЗ на П5 и П10 имела сходный характер. Клетки эпендимы (тип Е), крупные малодифференцированные астроцитоподобные клетки (тип В), транзиторные клетки малого размера округлой или овальной формы (тип С) были иммунонегативны. Клетки,

имеющие веретеновидную или овальную форму, небольшой объем цитоплазмы и биполярные отростки, т.е. нейробласты (тип А) были иммунопозитивными при использовании антител к  $\beta$ -III-тубулину (рис. 1в, *длинные стрелки*). Они локализируются вблизи эпендимы, где образуют цепочки клеток, группы или располагаются одиночно, и встречаются по всей территории СВЗ. Анализ количества этих клеток на П5 и П10 показал, что на условной единице площади их число равно  $46.2 \pm 3.8$  и  $52.4 \pm 3.3$  клеток (соответственно), что составляет 31.1 и 33.3% от общего числа всех типов клеток ( $148.7 \pm 4.3$  и  $157.5 \pm 4.8$  соответственно), расположенных на этой площади.

Таким образом, у крыс в неонатальный период (на П5 и П10) более 30% клеток СВЗ дифференцируются по нейрональному типу и представляют собой юные нейробласты.

**Иммуногистохимическая реакция на ГАМК.** На П5 в СВЗ присутствуют клетки иммуноположительные при использовании антител к ГАМК. Они имеют веретеновидную или округлую форму, светлое ядро, интенсивно иммуноокрашенную цитоплазму и два отростка, отходящих от противоположных сторон клетки. По морфологической характеристике они относятся к клеткам типа А, т.е. юным нейробластам. В дорсолатеральной части СВЗ отростки клеток имеют большую длину и варикозные расширения. Эти клетки локализируются вблизи эпендимных клеток, образуют цепочки или небольшие группы. Встречаются крупные астроцитоподобные клетки (тип В) с большим ядром и цитоплазмой в виде узкого ободка, которая иногда является иммунопозитивной. Клетки малого размера (тип С) и эпендимные клетки (тип Е) не окрашиваются при проведении иммуногистохимической реакции на ГАМК. Число иммуноположительных на ГАМК клеток равно  $58.3 \pm 6.5$  клеток (на условной единице площади), что составляет 37.7% от общего числа клеток ( $154.7 \pm 8.3$ ) всех типов на этой площади.

На П10 в СВЗ также в большом количестве присутствуют клетки иммуноположительные на ГАМК. Среди них основную массу составляют клетки с отростками, т.е. нейробласты (тип А), в которых продукт иммуногистохимической реакции выявляется в цитоплазме в виде кольца, окружающего ядро, и в биполярных отростках (рис. 2, *длинные стрелки*). Также встречаются клетки типа В с иммуноокрашенной цитоплазмой (рис. 2, *короткая стрелка*). Число иммуноположительных на ГАМК клеток на условной единице площади составляет  $71.4 \pm 8.6$  (различия этих показателей на П5 и П10 незначимо при  $p < 0.05$ ), что составляет 44.0% от общего числа ( $162.2 \pm 10.1$ ) клеток всех типов на этой площади. Таким образом, у крыс во время неонатального периода (П5 и П10) около 40% клеток СВЗ содержат ГАМК.

**Иммуногистохимическая реакция на ГАМК $\alpha$ 1.** На П5 и П10 результаты иммуногистохимического выявления ГАМК $\alpha$ 1 в клетках СВЗ оказались идентичными. Подавляющее большинство клеток разных типов (тип А, тип В, тип С) СВЗ иммунополо-

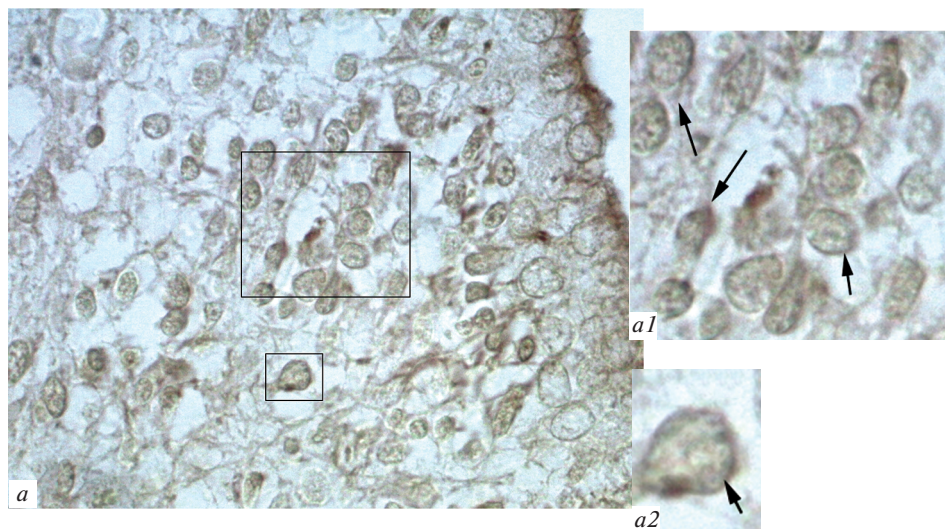
жительны на ГАМК $\alpha$ 1. В межклеточном пространстве выявляется большое количество иммуноокрашенных отростков, имеющих разную длину и варикозные расширения. Интенсивность иммуноокрашивания клеток разных типов различна. Более интенсивно окрашены клетки с отростками, располагающиеся группами или образующие цепочки, т.е. юные нейробласты (тип А) (рис. 3, *длинные стрелки*). На П5 и П10 на условной единице площади число таких клеток составляет  $56.5 \pm 5.2$  и  $54.6 \pm 5.6$ , т.е. 36.7 и 39.9% соответственно от общего числа ( $153.2 \pm 6.3$  и  $136.8 \pm 7.6$ ) всех клеток. Менее интенсивную иммунную реакцию на ГАМК $\alpha$ 1 имели клетки большего размера, с крупным ядром, т.е. стволые астроцитоподобные клетки (тип В) и часть мелких, округлой формы, транзиторных клеток (тип С) (рис. 3, *короткие стрелки*). Их общее количество составило  $81.1 \pm 6.8$  и  $71.0 \pm 8.3$  (соответственно) клеток на условной единице площади ( $52.9$  и  $51.8\%$  соответственно от общего числа клеток на этой площади). Число иммунонегативных клеток (тип В и тип С), как на П5, так и на П10, была небольшой и составляла  $15.6 \pm 1.3$  и  $11.2 \pm 1.9$  (соответственно) клеток на условной единице площади ( $10.2$  и  $8.2\%$  соответственно от общего числа клеток).

Таким образом, на П5 и П10 в СВЗ подавляющее число клеток (89.8 и 91.8%) иммуноположительны на ГАМК $\alpha$ 1, среди них выявляются клетки трех установленных типов: интенсивно иммуноокрашенные юные нейробласты, имеющие отростки (тип А), менее интенсивно иммуноокрашенные астроцитоподобные стволые клетки (тип В) и транзиторные клетки (тип С). На протяжении неонатального периода количество этих клеток поддерживается на постоянном уровне.

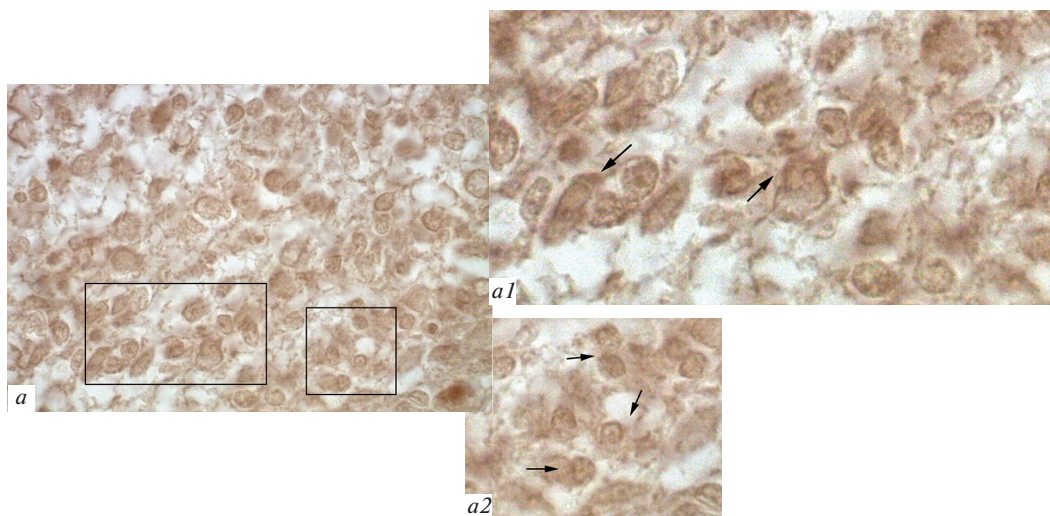
## ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что в неонатальный период в СВЗ у крыс присутствуют все типы клеток-предшественников, ранее установленные в СВЗ взрослого мозга (Conover, Notti, 2008; Platel et al., 2010), при этом около 30% клеток дифференцируется по нейрональному типу и представляют собой мигрирующие юные нейробласты (тип А). На протяжении всего неонатального периода численность этих клеток остается постоянной.

Было установлено, что в неонатальный период значительная часть клеток СВЗ (около 40%) экспрессирует ГАМК, и численность этой популяции клеток-предшественников также является постоянной, как на более раннем сроке неонатального периода (П5), так и более позднем (П10). Полученные результаты согласуются с наблюдениями, сделанными ранее на культуре клеток СВЗ взрослого мозга, согласно которым клетками-предшественниками СВЗ, являющиеся нейробластами (тип А), синтезируют ГАМК и высвобождают ее в межклеточное пространство; при этом каждая клетка, содержащая ГАМК, иммуноположительна на глутаматдекарбок-



**Рис. 2.** Иммуногистохимическое выявление ГАМК в субвентрикулярной зоне мозга крысы на П10. Представлены ГАМК-позитивные нейробласты с отростками (тип А) (*a*, верхний фрагмент; *a1*, длинные стрелки) и ГАМК-позитивные астроцитоподобные стволовые клетки (тип В) (*a*, нижний фрагмент; *a2*, короткие стрелки). Увел. об. 100 $\times$ .



**Рис. 3.** Иммуногистохимическое выявление ГАМК $_{\alpha}1$  в субвентрикулярной зоне мозга крысы на П10. Представлены ГАМК $_{\alpha}1$ -позитивные клетки с отростками (тип А) (*a*, левый фрагмент; *a1*, длинные стрелки) и ГАМК $_{\alpha}1$ -позитивные транзиторные клетки (тип С) (*a*, правый фрагмент; *a2*, короткие стрелки). Увел. об. 100 $\times$ .

силазу (GAD), фермент, участвующий в синтезе ГАМК (Stewart et al., 2002). Таким образом, эти клетки-предшественники содержат и ГАМК и GAD, что может свидетельствовать о присутствии в нейробластах ГАМК-синтезирующей ферментной системы.

Имеются данные о том, что клетки СВЗ экспрессируют высоко аффинные к ГАМК транспортные белки – GAT1 и GAT4, при этом последний экспрессируется астроцитоподобными клетками-предшественниками, которые могут осуществлять обратный захват ГАМК из межклеточного пространства (Volteus, Bordey, 2004; Platel et al., 2007). Вероятно, поэтому в СВЗ иммуноположительными на ГАМК могут быть не только нейробласты, но и астроцитоподобные клетки-предшественники, чем, по-види-

мому, можно объяснить повышенное число ГАМК-содержащих клеток (более 40%) по сравнению с числом дифференцирующихся нейробластов (30%).

Установлено, что в СВЗ взрослого мозга процесс возникновения нейробластов является постоянным и значительное количество нейробластов каждый день мигрируют из СВЗ в обонятельную луковицу (Lledo et al., 2006). Существует мнение (Platel et al., 2007), что при интенсивном производстве клеток необходим механизм контроля пролиферации нейральных стволовых клеток, миграции и выживаемости как стволовых клеток, так и самих нейробластов в микроокружении СВЗ. Так как в СВЗ постоянно генерируется значительная популяция нейробластов, то, как предполагается, в межклеточное про-

странство высвобождается большое количество ГАМК, синтезируемой нейробластами, которая, в свою очередь, является локальным фактором, служащим сигналом к активации ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов на нейрональных клетках-предшественниках (Nguyen et al., 2003). Следует отметить, что на электронно-микроскопическом и иммуногистохимическом уровнях было показано, что в СВЗ отсутствуют синапсы, и был сделан вывод, что передача сигналов ГАМК является паракринной (Platel et al., 2007, 2010).

Предполагается, что ГАМК высвобождается в межклеточное пространство и обеспечивает несинаптическую (паракринную) передачу сигналов как между нейробластами (Stewart et al., 2002; Wang et al., 2003; Nguyen et al., 2003; Bolteus, Bordey, 2004), так и от нейробластов к стволовым клеткам (Liu et al., 2005). При этом основой для передачи аутокринно/паракринного сигнала между нейрональными клетками-предшественниками является возбуждающее деполяризующее действие высвобождаемой ГАМК на клетки СВЗ (Liu et al., 2005). Известно, что действие ГАМК опосредуется рецепторами, и один из них – ГАМК<sub>A</sub> – представлен 16 различными субъединицами, разные комбинации которых могут придавать рецептору различные свойства (Henschel et al., 2008). Во взрослом мозге быстрая ГАМКергическая синаптическая передача осуществляется при участии ГАМК<sub>A</sub>-рецептора, включающего  $\alpha 1$ -субъединицу. В исследованиях, проведенных на органных и клеточных культурах клеток СВЗ взрослого мозга, была выявлена экспрессия мРНК  $\alpha 2$ -, 3-, 4-, 5-,  $\beta 1$ -, 2-, 3-,  $\gamma 2S$ -,  $\gamma 1$ -, 2- и  $\delta$ -субъединиц ГАМК<sub>A</sub>-рецептора (Stewart et al., 2002; Nguyen et al., 2003). Однако в СВЗ в неонатальный период экспрессия  $\alpha 1$  субъединицы ранее не изучалась.

Результаты нашего исследования показали, что в неонатальный период в СВЗ подавляющее число клеток (около 90%) оказались иммуноположительными на ГАМК<sub>A</sub> $\alpha 1$ , т.е. рецептор, включающий  $\alpha 1$ -субъединицу экспрессируется как юными нейробластами (тип А), так и стволовыми астроцитоподобными клетками (тип В) и частично транзиторными клетками (тип С). Отмечено, что на протяжении всего неонатального периода сохраняется определенное количество клеток иммуноположительных на ГАМК и ГАМК<sub>A</sub> $\alpha 1$ , а также в СВЗ поддерживается общее количество всех типов клеток. Присутствие ГАМК<sub>A</sub>- $\alpha 1$ -рецепторов в подавляющем числе клеток СВЗ дает основание полагать, что в неонатальный период ГАМК может оказывать влияние на поведение клеток разных типов.

Существует мнение, что при увеличении числа нейробластов, которое обеспечивается делением стволовых (тип В) и транзиторных клеток (тип С), в межклеточное пространство высвобождается значительное количество ГАМК, которая активирует ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы на самих нейробластах и нейрональных клетках-предшественниках. Результатом поступления нейротрансмиттера в клетки является

снижение пролиферативной активности стволовых клеток, т.е. контроль пролиферации стволовых клеток осуществляется по принципу обратной связи: увеличение уровня ГАМК в межклеточном пространстве приводит к снижению темпа пролиферации стволовых клеток, таким образом, ГАМК может оказывать негативное действие на образование нейробластов. Такая обратная связь согласуется с постоянной миграцией клеток из СВЗ в обонятельную луковицу и другие формации мозга. После миграции очередной популяции нейробластов снижается количество ГАМК в межклеточном пространстве, что способствует повышению пролиферативной активности стволовых нейрональных клеток (Doetsch et al., 1999; Nguyen et al., 2003; Bolteus, Bordey, 2004; Liu et al., 2005; Platel et al., 2010). Вероятно, такая система может обеспечить численное постоянство разных популяций клеток в СВЗ, что подтверждают полученные нами результаты.

Таким образом, наше исследование показало, что у крыс в СВЗ в неонатальный период, также как и в СВЗ взрослого мозга, присутствуют прогениторные клетки всех типов. Значительная их часть представлена юными нейробластами (тип А), которые дифференцируются по нейрональному типу; количество этих клеток остается постоянным на протяжении всего неонатального периода. В СВЗ юные нейробласты и часть астроцитоподобных стволовых клеток содержат ГАМК; число таких клеток также сохраняется постоянным на протяжении всего неонатального периода. В этот ранний период развития подавляющее большинство клеток СВЗ также содержат ГАМК<sub>A</sub>- $\alpha 1$ -рецептор, количество ГАМК<sub>A</sub> $\alpha 1$ -иммунопозитивных клеток также поддерживается примерно на одном уровне во время неонатального периода.

Предположение о существовании в СВЗ механизма, регулирующего темпы пролиферации и миграции нейрогенных клеток с участием ГАМК, косвенно подтверждается полученными данными, свидетельствующими о том, что в СВЗ поддерживается постоянное количество нейробластов, клеток, содержащих ГАМК, ГАМК<sub>A</sub> $\alpha 1$  и общее число клеток. Присутствие ГАМК<sub>A</sub>- $\alpha 1$ -рецепторов в подавляющем числе клеток СВЗ, дает основание предполагать, что в неонатальный период возможна ГАМКергическая несинаптическая передача сигналов между клетками СВЗ.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00052/21).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводили в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и при соблюдении требований Директив Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных живот-

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор сообщает об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Anderson D.J.* 2001. Stem cells and pattern formation in the nervous system: The possible versus the actual. *Neuron*. V. 30. P. 19.  
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00260-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00260-4)
- Bolteus A.J., Bordey A.* 2004. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J. Neurosci.* V. 24. P. 7623.
- Conover J.R., Notti Q.* 2008. The neural stem cell niche. *Cell Tissue Res.* V. 331. P. 211.  
<https://doi.org/10.1007/s00441-007-0503-6>
- Doetsch F., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A.* 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* V. 17. P. 5046.
- Doetsch F., Caille I., Lim D., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A.* 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* V. 97. P. 703.
- Hagg T.* 2005. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci.* V. 28. P. 589.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.08.009>
- Kreuzberg M., Kanov E., Timofeev O., Schwaninger M., Monyer H, Khodosevich K.* 2010. Increased subventricular zone-derived cortical neurogenesis after ischemic lesion. *Exp. Neurol.* V. 226. P. 90.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.08.00617>
- Liu X., Wang Q., Haydar T.F., Bordey A.* 2005. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat. Neurosci.* V. 8. P. 1179.
- Lledo P.M., Alonso M., Grubb M.S.* 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 7. P. 179.
- Luskin M.B.* 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron.* V. 11. P. 173.
- Mercier F., Kitasako J.T., Hatton G.I.* 2002. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J. Comp. Neurol.* V. 451. P. 170.
- Nguyen L., Malgrange B., Breuskin I., Bettendorff L., Moonen G., Belachew S., Rigo J.M.* 2003. Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J. Neurosci.* V. 23. P. 3278.
- Paxinos G., Watson C.* 1998. The Rat brain in stereotaxic coordinates. London: Press.
- Peretto P., Merighi A., Fasolo A., Bonfanti L.* 1997. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res. Bull.* V. 42. P. 9.
- Platel J.-C., Lacar B., Bordey A.J.* 2007. GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis. *J. Mol. Histol.* V. 38. P. 303.  
<https://doi.org/10.1007/s10735-007-9103-8>
- Platel J.-C., Stamboulian S., Nguyen I., Bordey A.* 2010. Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: The first leg. *Brain Res. Rev.* V. 63. P. 60.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.02.004>
- Sanai N., Tramontin A.D., Quinones-Hinojosa A., Barbaro N.M., Gupta N., Kunwar S., Lawton M.T., McDermott M.W., Parsa A.T., Manuel-Garcia V.J., Berger M.S., Alvarez-Buylla A.* 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature.* V. 427. P. 740.
- Schlett K.* 2006. Glutamate as a modulator of embryonic and adult neurogenesis. *Curr. Top. Med. Chem.* V. 6. P. 949.
- Stewart R.R., Hoge G.J., Zigova T., Luskin M.B.* 2002. Neural progenitor cells of the neonatal rat anterior subventricular zone express functional GABA(A) receptors. *J. Neurobiol.* V. 50. P. 305.
- Swarzenski B.C., O'Malley K.L., Todd R.D.* 1996. PTX-sensitive regulation of neurite outgrowth by the dopamine D3 receptor. *Neuroreport.* V. 7. P. 573.  
<https://doi.org/10.1097/00001756-199601310-00047>
- Wang D.D., Krueger D.D., Bordey A.* 2003. GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABA<sub>A</sub> receptor activation. *J. Physiol. (Lond).* V. 550. P. 785.

## Immunohistochemical Detection of GABA and $\alpha 1$ Subunits of the GABA<sub>A</sub> Receptor in Cells of the Subventricular Zone of the Rat's Brain in the Neonatal Period

L. I. Khozhai\*

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

\*e-mail: [astarta0505@mail.ru](mailto:astarta0505@mail.ru)

The aim of this work was to identify by immunocytochemical methods GABA and the  $\alpha 1$  subunit of the GABA<sub>A</sub> receptor in the neonatal period of development (5 and 10 postnatal days) in rats. The study showed that in rats in the subventricular zone (SVZ) in the neonatal period, as well as in the SVZ of the adult brain, all types of progenitor cells are present. A significant part of them (30%) differentiate according to the neuronal type, representing migrating adolescent neuroblasts (type A), the number of which remains constant throughout the neonatal period. Young neuroblasts and some astrocyte-like stem cells are immunopositive for GABA; the number of such cells is about 40% and remains constant throughout the neonatal period. It was revealed that the overwhelming majority of the SVZ cells, which are represented by young neuroblasts (type A), astrocyte-like stem cells (type B) and part of transient cells (type C) express GABA<sub>A</sub>, a receptor containing the  $\alpha 1$  subunit, the amount of which is maintained during the neonatal period. The presence of GABA $\alpha 1$  receptors in the overwhelming number of SVZ cells may indicate that GABAergic signaling is possible and that GABA can affect the behavior of different type SVZ cells.

**Keywords:** subventricular zone, neuronal stem cells, GABA, GABA<sub>A</sub> $\alpha 1$ , neonatal period