

## ЭКСПРЕССИЯ ПАРВАЛЬБУМИНА В КЛЕТКАХ СУБВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНЫ И ВЛИЯНИЕ НА НИХ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ В РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД У КРЫС

© 2020 г. Л. И. Хожай<sup>1,\*</sup>, В. А. Отеллин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

Поступила в редакцию 16.06.2020 г.

После доработки 10.07.2020 г.

Принята к публикации 10.07.2020 г.

Целью работы было выявить экспрессию парвальбумина в клетках субвентрикулярной зоны (СВЗ), определить их морфологический тип и оценить влияние острой гипоксии на численность этой популяции клеток в период новорожденности. Работа проведена на лабораторных крысах линии Wistar. Для выявления клеток, содержащих парвальбумин, проводили иммуногистохимическую реакцию с использованием кроличьих поликлональных антител к парвальбумину (Abscam, США). Воздействие гипоксии на мозг животных осуществляли в специальной камере с содержанием кислорода в дыхательной смеси, равным 7.8%. Мозг животных исследовали в период новорожденности на 5 и 10 постнатальные сутки. Показано, что в СВЗ как у контрольных, так и подопытных крыс присутствуют клетки, экспрессирующие парвальбумин, которые принадлежат к одному морфологическому типу, представляющему мигрирующие незрелые нейробласты (тип А). У животных в контроле на протяжении всего периода новорожденности численность этих клеток остается постоянной и составляет более 20% от общего числа клеток. Воздействие перинатальной гипоксии приводит к увеличению в СВЗ числа клеток, содержащих парвальбумин (до 33%), а также общего числа клеток. Таким образом, воздействие гипоксии вызывает в СВЗ активацию процессов нейрогенеза в период новорожденности. Часть нейробластов в этот период экспрессирует парвальбумин и, вероятно, достигает определенной степени дифференцировки по нейромедиаторному фенотипу.

*Ключевые слова:* субвентрикулярная зона, парвальбумин, перинатальная гипоксия, период новорожденности

DOI: 10.31857/S0044452920060042

### ВВЕДЕНИЕ

Воздействие неблагоприятных факторов среды (таких как гипоксия/ишемия), травмы, нейродегенеративные заболевания ЦНС приводят к утрате части нейронов в структурах головного мозга, поэтому понимание механизмов постнатального нейрогенеза и возможность пополнения уже сформированных формаций мозга вновь образованными популяциями нейронов и глии, а также поиск путей активации этих процессов в настоящее время имеют весьма актуальный характер.

У позвоночных животных и человека в постнатальном периоде в мозге остаются зоны, так называемые нейрогенные ниши, где в течение длительного периода времени сохраняется нейрогенез, в результате которого остаются клетки-предшественники дают начало новым популяциям нервных и нейроглиальных клеток [1–4]. У млекопитающих одной из нейрогенных ниш является субвентрикулярная зона, расположенная вдоль стенки

латеральных мозговых желудочков. В настоящее время организация субвентрикулярной зоны хорошо известна. Выявленная гетерогенность ее клеточного состава представлена несколькими хорошо описанными линиями прогениторных клеток [1–4]. Показано, что клетки каждой линии имеют определенный морфологический фенотип и экспрессируют разнообразные, свойственные этому фенотипу, ростовые, нейротрофические и транскрипционные факторы, которые наряду с влиянием факторов микроокружения могут направлять дифференцировку клеток-предшественников по тому или иному пути развития [1, 3]. Установлено несколько типов клеток: мигрирующие незрелые нейробласты (тип А), имеющие овальное или веретеновидное тело и два коротких отростка, образуют цепочки клеток, а также небольшие скопления возле эпендимы; нейральные прогениторные клетки (тип В), так называемые нейральные стволовые клетки, являющиеся потомками клеток радиальной глии, находятся в тесном контакте с эпенди-

мой, имеют довольно крупный размер и часто образуют небольшие скопления рядом с группами клеток типа А, самообновляющаяся популяция этих клеток, как полагают, сохраняется в постнатальном периоде длительное время и является источником клеток предшественников нейронов и глии как в эмбриональный, так и в постнатальный периоды; клетки — промежуточные посредники (тип С) находятся в тесном контакте с клетками типа А и рассматриваются как транзитная стадия дифференцировки клеток типов В и А; и, наконец, эндимные клетки (тип Е) выстилают полость латерального мозгового желудочка, имеют кубическую форму, несут на апикальной поверхности реснички и микроворсинки, эти клетки сохраняют способность к делению, и ряд авторов рассматривает их как клетки-предшественники нейронов [1–4].

Установлено, что в нейрогенных нишах клетки разных типов могут экспрессировать факторы различной природы, действующие на разные стадии нейро- и глиогенеза. Это транскрипционные факторы (Sox1, Sox2, Shh, Notch1, Wnt, Pax6 и т.д.), различные факторы роста (VEGF, TGF $\alpha$ , EGF, EGF и др.), а также нейромедиаторы [1]. Выявлены нейробласты, экспрессирующие глутамат, которые в дальнейшем мигрируют и дифференцируются в пирамидные нейроны обонятельной луковицы и неокортекса, также обнаружена популяция мигрирующих нейробластов, экспрессирующих ГАМК [5], что, как полагают, свидетельствует о ранней дифференцировке нейробластов по нейромедиаторному фенотипу [5, 6]. Известно, что в постнатальный период популяция ГАМКергических интернейронов неоднородна и включает разные подтипы нейронов, отдельные из которых экспрессируют кальций-связывающие белки, в том числе парвальбумин, обладающий способностью модулировать динамику внутриклеточного кальция в нейронах, влияя на процессы возбуждения и синхронную импульсную активность нейронов, более того, выявлена его колокализация с ГАМК в ГАМКергических интернейронах [7–10]. Однако практически нет сведений об экспрессии парвальбумина в клетках субвентрикулярной зоны в период новорожденности, когда в мозге идут процессы становления локальных тормозных сетей.

Установлено, что у грызунов в постнатальный период воздействие как острой, так и хронической гипоксии приводит к снижению численности нейронов в неокортексе, и, параллельно с этим, происходит увеличение плотности клеток в субвентрикулярной зоне [11].

Вопрос о том, оказывает ли повреждающее воздействие перинатальная гипоксия на клетки субвентрикулярной зоны, экспрессирующие парвальбумин, в настоящее время остается открытым. В связи с этим целью настоящей работы было вы-

явить морфологический тип клеток субвентрикулярной зоны, экспрессирующих парвальбумин, и оценить влияние острой гипоксии на численность этой популяции клеток в период новорожденности.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

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

Воздействие гипоксии на головной мозг новорожденных крысят осуществляли в специальной камере в течение 1 ч при содержании в дыхательной смеси: кислорода — 7.6–7.8%; углекислого газа — 0.15–0.21%; азота — 91.8%, при температуре 21.3–23.0°C и нормальном общем атмосферном давлении (760 мм рт. ст.). Воздействие гипоксии проводилось на 2-е постнатальные сутки.

В работе были использованы 4 группы животных: 2 группы контрольных крысят, мозг которых исследовали на 5-е и 10-е постнатальные сутки (П5, П10); и 2 группы животных, подвергавшихся в барокамере воздействию острой перинатальной гипоксии, мозг которых также исследовали на П5 и П10. Каждая группа содержала по 5–6 крысят, отобранных из разных пометов.

У животных исследовали субвентрикулярную зону, расположенную вдоль стенки латеральных желудочков мозга. 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 [12]. Часть гистологических срезов окрашивали по Нисслю по общепринятой методике. Иммуногистохимическую реакцию на выявление парвальбумина проводили с использованием кроличьих поликлональных антител к парвальбумину (Anti-Parvalbumin antibody rabbit polyclonal, Abcam, США) в разведении 1:100. После процедуры теплового демаскирования белков с цитратным буфером рН 6.1 (Dako, Дания) в течение 25 мин срезы инкубировали в первичных антителах в течение 16 ч при 4°C. В качестве вторичных реагентов применяли 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 иммуногистохимической реакции часть срезов докрашивали гематоксилином Джилла и заключали в синтетическую заливочную среду Permaunt (Termo, США). При проведении иммуногистохимической реакции все процедуры были стандартизированы и осуществлялись одновременно для гистологиче-

ских срезов мозга, полученных как от контрольных, так и экспериментальных групп животных.

Подсчет иммуноположительных клеток проводили на изображениях, полученных с гистологических препаратов поперечных срезов мозга на условной единице площади, равной 0.1 мм<sup>2</sup> при увеличении об. 100×. Статистически обработанные данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего ( $m \pm SEM$ ). Измерения размеров клеточных тел проводили на изображениях, полученных также при увеличении об. 100×. Подсчеты и измерения проводили на 10–12 срезах мозга, взятого от 4–5 животных каждой исследуемой группы. Для статистической обработки данных использовали компьютерные программы Statistica 8.0. Для анализа и сравнения результатов между группами животных использовали *t*-критерий Стьюдента и *oneway* ANOVA. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Морфологическое исследование субвентрикулярной зоны на 5-е постнатальные сутки*

У животных в контроле в СВЗ на П5 выявляются все ранее установленные типы клеток. Просвет латерального желудочка выстлан 1 слоем эпендимных клеток (тип Е), имеющих кубическую форму, небольшое светлое ядро и малый объем цитоплазмы (площадь клеточного тела составляет  $4201.3 \pm 1782.9$  мкм<sup>2</sup>).

Клетки крупного размера (площадь клеточного тела равны  $5125.3 \pm 192.3$  мкм<sup>2</sup>), светлые малодифференцированные с большим ядром и очень узким ободком цитоплазмы (тип В), которые образуют группы, прилежащие к эпендиме (рис. 1а), или цепочки клеток, а также могут располагаться одиночно.

Клетки малого размера (площадь клеточного тела  $3589.4 \pm 213.2$  мкм<sup>2</sup>), овальной или веретеновидной формы, с небольшим объемом цитоплазмы и двумя тонкими отростками (тип А), образующие цепочки клеток (рис. 1а, 1д), или окружающие группы крупных клеток (тип В), или одиночные.

Клетки малого размера (площадь клеточного тела в среднем  $1891.8 \pm 201.2$  мкм<sup>2</sup>) овальной или округлой формы с темным ядром (тип С) образуют небольшие скопления или диффузно рассеяны по территории СВЗ.

У животных в СВЗ на П5 после воздействия перинатальной гипоксии морфологическая картина сходна с таковой в контроле. Идентифицируются те же типы клеток: клетки эпендимы (тип Е) выстилают просвет желудочка (площадь клеточного тела  $4096.4 \pm 186.6$  мкм<sup>2</sup>), имеют кубическую форму, небольшое светлое ядро и малый объем цито-

плазмы; прогениторные клетки-предшественники (тип В) (площадь клеточного тела  $5470.6 \pm 273.6$  мкм<sup>2</sup>), группы, которых прилежат к эпендиме, либо образуют цепочки; незрелые мигрирующие нейробласты (тип А) (площадь клеточного тела  $3692.8 \pm 265.1$  мкм<sup>2</sup>), образуют цепочки клеток, окружают скопления крупных клеток, либо диффузно рассеяны по СВЗ; клетки малого размера (тип С) (площадь клеточного тела  $1952.4 \pm 190.1$  мкм<sup>2</sup>) овальной или округлой формы, собраны в мелкие группы, либо диффузно рассеяны.

### *Иммуногистохимическое исследование на выявление парвальбумина в клетках СВЗ на 5-е постнатальные сутки*

У контрольных животных в СВЗ на П5 иммуноотрицательными были клетки эпендимы (тип Е), крупные (прогениторные, нейральные стволовые, тип В), клетки малого размера овальной или округлой формы (тип С).

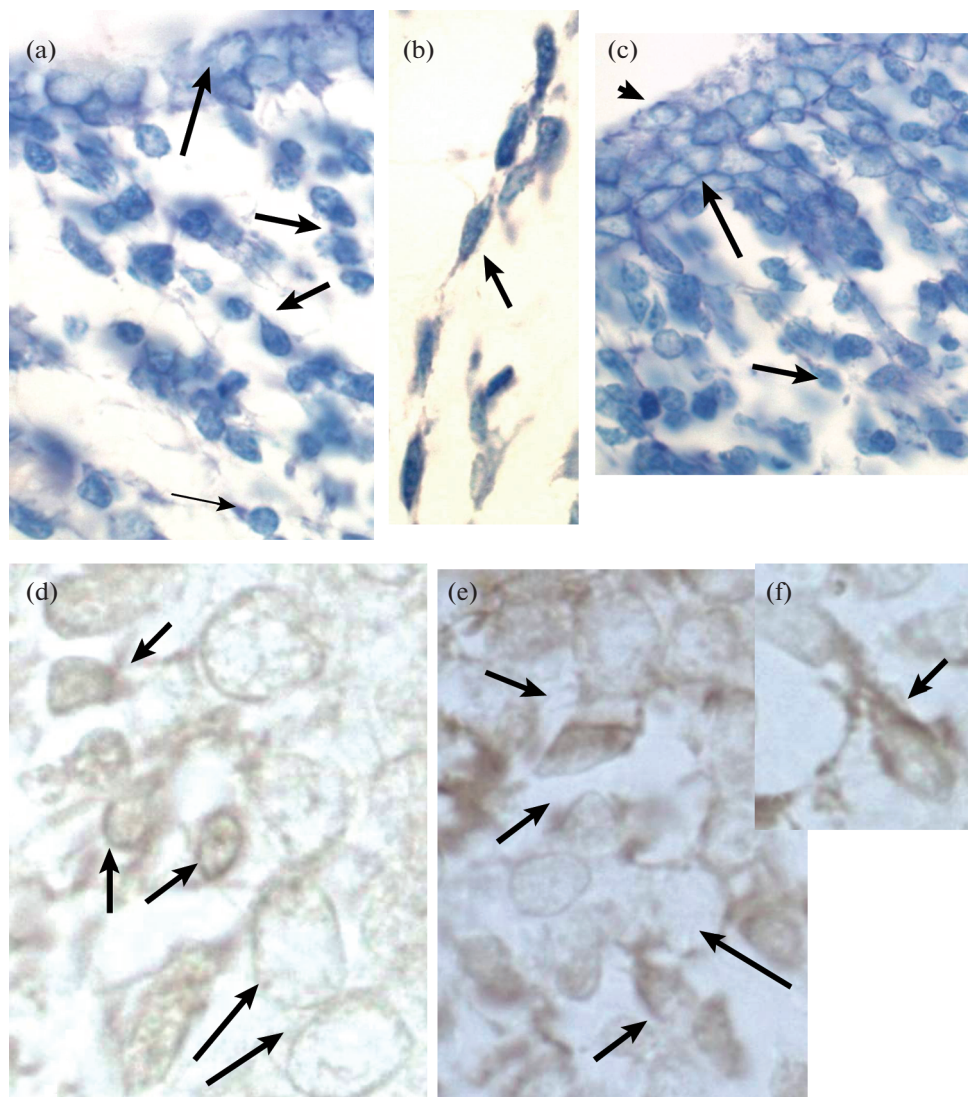
Иммуноположительными на выявление парвальбумина оказались клетки одного морфологического типа (типа А), соответствующего мигрирующим нейробластам (рис. 1д) численностью  $21.3 \pm 2.1$  клетки на условной единице площади, что составляет 24.1% от общего числа клеток ( $88.5 \pm 6.2$  клеток на условной единице площади).

У животных после воздействия острой перинатальной гипоксии в СВЗ на П5 иммуноположительными на парвальбумин также были клетки одного морфологического типа (А типа), соответствующего мигрирующим нейробластам, их число в среднем равно  $29.3 \pm 3.1$  клеток на условной единице площади, что составляет 31.9% от общего числа клеток ( $91.8 \pm 4.6$  клеток на условной единице площади).

### *Морфологическое исследование субвентрикулярной зоны на 10-е постнатальные сутки*

У животных в контроле в СВЗ на П10 также выявляются все установленные клеточные типы. Это клетки эпендимы (тип Е) кубической формы, небольшим светлым ядром и малым объемом цитоплазмы (площадь клеточного тела  $4318.1 \pm 193.1$  мкм<sup>2</sup>). Также возле эпендимы присутствуют крупные (площадь тела  $5389.8 \pm 184.7$  мкм<sup>2</sup>) малодифференцированные клетки (тип В), собранные в группы или одиночные.

Клетки малого размера (площадь клеточного тела  $3675.8 \pm 259.4$  мкм<sup>2</sup>), веретеновидной или овальной формы с небольшим объемом цитоплазмы и двумя тонкими отростками (тип А), образующие цепочки клеток, или одиночные.



**Рис. 1.** Субвентрикулярная зона мозга крысы на П5 (а, б, д) и П10 (с, е, ф) в контроле (а, б, д) и у животных, переживших перинатальную гипоксию (с, е, ф). Окраска по методу Ниссля (а, б, с); иммуногистохимическая реакция на выявление парвальбумина (д, е, ф); эпендимные клетки (тип Е) (короткая стрелка); прогениторные стволовые нейральные клетки (тип В) (длинные стрелки); мигрирующие нейробласты (тип А) (средние стрелки); увеличение плотности распределения клеток в СВЗ после воздействия гипоксии (с) по сравнению с контролем (а); мигрирующие нейробласты, образующие цепочки клеток (б); д, е, ф – нейробласты, экспрессирующие парвальбумин. Увел. × 100.

**Fig. 1.** The subventricular zone (SVZ) in the rat brain on P5 (a, b, d) and P10 (c, e, f) in control rats (a, b, d) and rats that endured perinatal hypoxia (c, e, f). Nissl staining (a, b, c); immunohistochemical reaction for parvalbumine (PVA) (d, e, f); ependymal cells (type E) (short arrow); neural progenitor cells (type B) (long arrows); migrating neuroblasts (type A) (medium arrows); an increase in the cell distribution density in the SVZ after hypoxic exposure (c), as compared to control (a); migrating neuroblasts that form cell chains (the neural crest) (b); d, e, f – PVA-expressing neuroblasts. Magnification, × 100.

Клетки малого размера (площадь клеточного тела  $2686.4 \pm 175.2 \text{ мкм}^2$ ) овальной или округлой формы с темным ядром (тип С) образуют небольшие скопления или диффузно рассеяны по территории СВЗ.

У животных в СВЗ на П10 после воздействия перинатальной гипоксии морфологическая картина сходна с таковой в контроле. Клетки эпендимы (тип Е) (площадь клеточного тела  $4284.2 \pm 201.3 \text{ мкм}^2$ ) (рис. 1в). Возле слоя эпендимных клеток присут-

ствуют крупные (площадь клеточного тела  $5061.0 \pm 184.6 \text{ мкм}^2$ ) малодифференцированные клетки (тип В), образующие большие группы (рис. 1в) либо рассеянные по СВЗ. Клетки малого размера (площадь клеточного тела  $3634.5 \pm 222.3 \text{ мкм}^2$ ) веретеновидные с двумя тонкими отростками (тип А) (рис. 1с). Клетки малого размера (площадь  $2198.6 \pm 209.7 \text{ мкм}^2$ ) овальной или округлой формы (тип С).

*Иммуногистохимическое исследование на выявление парвальбумина в субвентрикулярной зоне на 10-е постнатальные сутки*

У контрольных животных в СВЗ на П10 иммуноотрицательными были клетки эпендимы (тип E), крупные (прогениторные, нейральные стволовые, тип B), клетки малого размера овальной или округлой формы (тип C). Как и на предыдущем сроке, исследования иммуноположительными на парвальбумин оказались клетки одного морфологического типа (типа A), соответствующего мигрирующим нейробластам численностью  $24.1 \pm 2.4$  клетки на условной единице площади, что составляет 20.8% от общего числа клеток ( $115.7 \pm 3.2$  клеток на условной единице площади).

У животных после воздействия острой перинатальной гипоксии в СВЗ на П10, т.е. к концу периода новорожденности, иммуноположительными на парвальбумин также были клетки одного морфологического типа A, соответствующего мигрирующим нейробластам (рис. 1e, 1f). Их число в среднем равно  $48.6 \pm 3.5$  клеток на условной единице площади, что составляет 33.5% от общего числа клеток ( $144.8 \pm 5.2$  клеток на условной единице площади, т.е. плотность распределения клеток увеличивается по сравнению с контролем на П5 и П10).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что у млекопитающих в неокортексе зрелого мозга значительная часть (20–25%) популяции ГАМКергических интернейронов экспрессирует парвальбумин [9, 13]. Также известно, что СВЗ является источником нейробластов, экспрессирующих ГАМК, которые мигрируют в обонятельную луковицу, неокортекс, стриатум и ядро accumbens [6, 14–16], как полагают, через субкортикальное белое вещество в нижние слои неокортекса, где они интегрируются в локальные тормозные сети [11]. При нормальных условиях в зрелом мозге грызунов нейрогенез в СВЗ незначителен. Однако воздействие ишемии вызывает в СВЗ активацию нейрогенетических процессов и пополнение популяций нейронов в таких областях конечного мозга, как неокортекс и стриатум [17]. Исследования показали, что на ранних постнатальных сроках воздействие гипоксии приводит к утрате приблизительно 30% нейронов в неокортексе и это также сопровождается активацией нейрогенеза в СВЗ [11, 17].

Проведенное исследование показало, что в СВЗ в период новорожденности у животных в контроле и у крыс, переживших острую перинатальную гипоксию, присутствуют установленные морфологические типы клеток. На исследованных сроках размеры клеток каждого типа не отличаются и сохраняются до конца периода новорожденности как у

контрольных, так и подопытных животных. В СВЗ выявлены клетки, иммуноположительные на парвальбумин, которые принадлежат к одному морфологическому типу, представляющему мигрирующие незрелые нейробласты (тип A). У животных в контроле на П5 и П10 их численность достаточно высокая и примерно одинаковая (24.1 и 20.8% соответственно; различия недостоверны при  $p < 0.05$ ), т.е. на протяжении периода новорожденности не изменяется. После воздействия перинатальной гипоксии число иммуноположительных клеток на П5 и П10 возрастает (до 31.9 и 33.5% соответственно) и становится выше, чем у животных в контроле (различия достоверны при  $p < 0.05$ ), увеличивается и общее количество клеток на условную единицу площади (в 1.3 раза).

Таким образом, наблюдения показали, что в период новорожденности значительная часть мигрирующих нейробластов содержит парвальбумин. После воздействия гипоксии увеличивается как общее число клеток в СВЗ, так и численность клеток, экспрессирующих парвальбумин. Это дает основание предполагать, что имеет место активация нейрогенеза в СВЗ в период новорожденности и что кортикальный нейрогенез может играть важную роль в восстановлении численности популяции нейронов, экспрессирующих парвальбумин, частично утраченной при повреждении в неонатальный период.

Показано, что в СВЗ взрослых млекопитающих, мигрирующие в обонятельную луковицу нейробласты, экспрессируют ГАМК [5], что может свидетельствовать о том, что незрелые нейробласты в СВЗ способны приобретать определенный нейромедиаторный фенотип. Однако, недавние результаты показали, что в субвентрикулярной зоне большинство нейробластов, иммунореактивных на ГАМК, не обеспечены механизмом синтеза ГАМК типичным для дифференцированных интернейронов [18]. Авторы идентифицировали альтернативный механизм синтеза ГАМК, который заключается в преобразовании частей разрушенных глутаматных ферментных систем в ГАМК, поэтому принадлежность незрелых нейробластов к ГАМКергическому фенотипу может быть обратимой [18]. С другой стороны результаты данного исследования показали, что нейробласты способны экспрессировать кальцийсвязывающий белок парвальбумин. Его вероятная колокализация с ГАМК, как у дифференцированных интернейронов, дает основание предполагать, что нейробласты в субвентрикулярной зоне в ранний постнатальный период могут достигать определенной степени дифференцировки по нейромедиаторному фенотипу.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В периоды ранней и поздней новорожденности (P5 и P10) у крыс в субвентрикулярной зоне присутствуют все установленные ранее типы малодифференцированных клеток, при этом размеры клеток не изменяются. Показано, что часть мигрирующих нейробластов (клеточный тип А) экспрессирует кальцийсвязывающий белок парвальбумин, что дает основание сделать предположение о возможной ранней дифференцировке нейробластов СВЗ по нейромедиаторному фенотипу. Воздействие перинатальной гипоксии вызывает увеличение как численности популяции нейробластов, экспрессирующих парвальбумин, так и общего числа клеток в СВЗ, что свидетельствует об активации процессов нейрогенеза. Вероятно, это может иметь важное значение в восстановлении численности популяции тормозных интернейронов, экспрессирующих парвальбумин, частично утраченной после воздействия гипоксии.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-015-00052.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и при соблюдении требований Директив Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных животных. Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

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

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Platel J.-C., Stamboulia S., Nguyen I., Bordey A.* Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: the first leg. *Brain Res. Rev.* 63 (1–2): 60–71. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.02.004>
2. *Conover J.R., Notti Q.* The neural stem cell niche. *Cell Tissue Res.* 331 (1): 211–224. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0503-6>
3. *Anderson D.J.* Stem cells and pattern formation in the nervous system: The possible versus the actual. *Neuron.* 30: 19–35. 2001. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00260-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00260-4)
4. *Обухов Д.К., Цехмистренко Т.А., Пущина Е.В., Вараксин А.А.* Формирование популяций нейронов и нейронглии в про- и постнатальном развитии ЦНС позвоночных животных. *Морфология.* 156 (6): 57–63. 2019. [*Obukhov D.K., Tsehmistrenko T.A., Puschhina E.V., Varaksin A.A.* The formation of population of neurons and glia in the pre- and postnatal development of the CNS of vertebrates. *Morphology.* 156 (6): 57–63. 2019. (In Russ)].
5. *Bolteus A.J., Bordey A.* GABA Release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J. Neurosci.* 24 (35): 7623–7631. 2004. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1999-04>
6. *Schuurmans C., Armant O., Nieto M., Stenman J.M., Britz O., Klenin N., Brown C., Langevin L.-M., Steibt J., Tang H. et al.* Sequential phases of cortical specification involve neurogenin-dependent and – independent pathways. *EMBO J.* 23 (14): 2892–2902. 2004. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600278>
7. *Scheffler B., Walton N.M., Lin D.D., Goetz A.K., Enkolopov G., Roper S.N., Steindler D.A.* Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102 (26): 9353–9358. 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503965102>
8. *Зинченко В.П., Туровская М.В., Теплов И.Ю., Березнов А.В., Туровский Е.А.* Роль парвальбумин-содержащих интернейронов в регуляции спонтанной синхронной активности нейронов мозга в культуре. *Биофизика.* 61 (1): 102–111. 2016. [*Zinchenko V.P., Turovskaya M.V., Teplov I.Yu., Bereznov A.V., Turovsky E.A.* A role of parvalbumin-containing interneurons in regulation of spontaneous synchronous activity of the brain neurons in culture. *Biophysics.* 61 (1): 102–111. 2016. (In Russ)].
9. *Zaitsev A.V., Gonzales-Burgos G., Povysheva N.V., Kroner S., Lewis D.A., Krimer L.S.* Localization of calcium-binding proteins in physiologically and morphologically characterized interneurons in monkey prefrontal cortex. *Cerebral Cortex.* 15: 1178–1186. 2005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070553>
10. *Mu Y., Lee S.W., Gate F.* Signaling in adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20 (4): 416–423. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.04.010>
11. *Fagel D.M., Ganat Y., Silbereis J., Ebbitt T., Stewart W., Zhang H., Ment L.R., Vaccarino F.M.* Cortical neurogenesis enhanced by chronic perinatal hypoxia. *Exp. Neurol.* 199 (1): 77–91. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.04.006>
12. *Paxinos G., Watson C.* *The Rat Brain in stereotaxic coordinates.* London: Press. 1998.
13. *Gabbott P.L., Bacon S.J.* Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: II. Quantitative areal and laminar distributions. *J. Comp. Neurol.* 364 (4): 609–636. 1996. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960122\)364](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960122)364)
14. *Inta I.D., Alfonso J., von Engelhardt J., Kreuzberg M.M., Meyer A.H., van Hooff J.A., Monyer H.* Neurogenesis and widespread forebrain migration of distinct GABAergic neurons from the postnatal subventricular zone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105 (52): 20994–20999. 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807059105>
15. *Merkle F.T., Mirzadeh Z., Alvarez-Buylla A.* Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science.*

- 317 (5836): 381–384. 2007.  
<https://doi.org/10.1126/science.1144914>
16. Kay R.B., P.C. Brunjes R.B. Diversity among principal and GABAergic neurons of the anterior olfactory nucleus. *Front. Cell Neurosci.* 8: 111–124. 2014.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00111>
17. Kreuzberg M., Kanov E., Timofeev O., Schwaninger M., Monyer H, Khodosevich K. Increased subventricular zone-derived cortical neurogenesis after ischemic lesion. *Exp. Neurol.* 226 (1): 90–99. 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.08.006>
18. Sequerra E.B., Gardino P., Hedin-Pereira C., de Mello F.G. Putrescine as an important source of GABA in the postnatal rat subventricular zone. *Neuroscience.* 146 (2): 489–493. 2007.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.062>

## PARVALBUMIN EXPRESSION IN CELLS OF THE SUBVENTRICULAR ZONE AND THE EFFECT OF ACUTE HYPOXIA ON THESE CELLS IN EARLY POSTNATAL ONTOGENESIS OF RATS

L. I. Khozhai<sup>a,#</sup> and V. A. Otellin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>#</sup> e-mail: [astarta0505@mail.ru](mailto:astarta0505@mail.ru)

This study aimed to reveal parvalbumin (PVA) expression in cells of the subventricular zone (SVZ), identify the morphological type of these cells, and estimate the effect of acute hypoxia on the size of this cell population in the Wistar rat neonatal period. PVA-expressing cells were revealed immunohistochemically using Abcam rabbit polyclonal antibodies to this calcium-binding protein. Rats were exposed to hypoxia in a special chamber with 7.8% oxygen in a breathing gas mixture. The brain was examined in the neonatal period on postnatal days 5 and 10. It was found that the SVZ, both in control and experimental rats, contains PVA-expressing cells of the same morphological type, which represent migrating immature neuroblasts (type A). In control animals, throughout the entire neonatal period, the number of these cells remains constant, accounting for more than 20% of the total cell population. Perinatal hypoxic exposure leads to increase the number of PVA-expressing cells, as well as the total number of cells, in the SVZ (to 33%). Thus, perinatal hypoxia activates neurogenesis in the SVZ during the neonatal period. In the same period, some neuroblasts express PVA and may reach a certain degree of differentiation of their neurotransmitter phenotype.

*Keywords:* subventricular zone, parvalbumin, perinatal hypoxia, neonatal period