

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»  
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

ЖАРИКОВА ЕВА ИГОРЕВНА

**РЕГЕНЕРАТОРНО-АССОЦИИРОВАННЫЕ ФАКТОРЫ ПРИ  
ПЕРСИСТЕНТНОМ И РЕПАРАТИВНОМ НЕЙРОГЕНЕЗЕ В КОНЕЧНОМ  
МОЗГЕ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ**

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, профессор РАН  
Пущина Евгения Владиславовна

Владивосток – 2023

## Оглавление

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	14
1.1. Общая характеристика нейрогенеза позвоночных.....	14
1.2. Нейрональные стволовые клетки у взрослых немлекопитающих позвоночных.....	16
1.2.1. Выявление и определение НСК .....	17
1.2.2. Нейрональные клетки предшественники у рыб.....	19
1.2.3. Анализ нейросфер и самовозобновление нервных клеток .....	20
1.2.4. Области мозга с выраженной пролиферативной активностью .....	23
1.2.5. Пролиферация и дальнейшая судьба взрослых нейральных стволовых клеток .....	25
1.3. Миграция клеток во взрослом конечном мозге.....	26
1.4. Дифференцировка клеток-предшественников .....	27
1.5. Характеристики клеток-предшественников желудочков конечного мозга.....	29
1.6. Особенности виментина и глиального фибриллярного кислого белка в мозге рыб .....	31
1.7. Семейство генов Pax, их участие в развитии нервной системы и потенциальная роль в нейрорегенерации .....	33
1.7.1. Паттерн экспрессии генов Pax во время регионализации ЦНС .....	35
1.7.2. Участие генов Pax в миграции клеток.....	36
1.7.3. Влияние генов Pax на дифференцировку клеток .....	39
1.8. Функции глутаминсинтетазы в ЦНС .....	42
1.9. Цистатионин-β-синтаза и сероводород в ЦНС.....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	51
2.1. Объекты исследования .....	51

2.2. Экспериментальное повреждение конечного мозга .....	51
2.3. Методы исследования.....	52
2.4. Микроскопия.....	55
2.5. Денситометрический анализ .....	55
2.6. Статистический анализ.....	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	58
3.1. Распределение нейронального маркера NuCD в паллиальной части теленцефалона симы в норме и после повреждения.....	58
3.2. Локализация ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) в клетках дорсальной области в норме и после повреждения .....	65
3.3. Экспрессия BrdU в паллиуме молодежи симы в условиях нормы и после травматического повреждения .....	69
3.4. Иммуногистохимическое маркирование GFAP в интактном паллиуме молодежи симы и после травматического повреждения. ....	74
3.5. Иммуногистохимическое маркирование даблкортина в интактном паллиуме молодежи симы и после травматического повреждения .....	83
3.6. Иммуногистохимическое маркирование виментина в интактном паллиуме молодежи симы и после травматического повреждения.....	94
3.7. Глутаминсинтетаза в паллиуме интактной кеты и после травматического повреждения .....	102
3.8. Экспрессия CBS в паллиуме интактной кеты и после травматического повреждения .....	112
3.9. Экспрессия белкового продукта транскрипционного фактора Pax2 в паллиуме интактной кеты и после травматического повреждения.....	120
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....	129
4.1. Локализация PCNA в паллиальной ПВЗ симы в норме и после	

травматического повреждения .....	129
4.2. Локализация NuCD в пролиферативных зонах и паренхиме паллиальной перивентрикулярной зоны симы в норме и после травматического повреждения .....	136
4.3. Экспрессия BrdU в паллиуме молодежи симы в условиях нормы и после травматического повреждения .....	141
4.4. Экспрессия GFAP в конечном мозге симы в условиях нормы и после травматического повреждения .....	145
4.5. Экспрессия виментина в конечном мозге симы в условиях нормы и после травматического повреждения.....	151
4.6. Экспрессия даблкортина в конечном мозге симы в условиях нормы и после травматического повреждения.....	157
4.7. Локализация ГС в конечном мозге молодежи кеты в условиях интактности и после повреждения .....	164
4.8. Локализация CBS в конечном мозге молодежи кеты в условиях интактности и после повреждения.....	172
4.9. Локализация Рах2 в условиях интактности и после повреждения.....	177
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	182
ВЫВОДЫ .....	185
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	187

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

BLBP – липополисахарид-связывающий белок

BrdU – 2'-дезоксидезокси-5-бромдезоксидезоксиуридин

CBS – цистатионин-β-синтаза

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

HuCD – нейрональный протеин

NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат-диафороза

NOS – синтаза оксида азота

PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток

Vim – виментин

ВВ – вентральная зона вентральной области

ВД – дорсальная зона вентральной области

ВЛ – латеральная зона вентральной области

вНСК – взрослые нейральные стволовые клетки

вНСКП – взрослые нейрональные стволовые клетки-предшественники

ВЯ – вентральное ядро

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГС – глутамин синтетаза

ДД – дорсальная зона дорсальной области

ДК – даблкортин

ДЛ – латеральная зона дорсальной области

ДМ – медиальная зона дорсальной области

ДЯ – дорсальное ядро

ЕОП - единицы оптической плотности

ИГХ – иммуногистохимия

ип – иммунонегативные клетки

ип – иммунопозитивные клетки

КНН – конститутивная нейрогенная ниша

МЗ – метиловый зелёный

НКП – нейрональные клетки-предшественники

НМДА – ионотропный рецептор глутамата

НСК – нейрональные стволовые клетки

НЭ – нейроэпителий

ОЛ – обонятельная луковица

ОП – оптическая плотность

ПВЗ – перивентрикулярная зона

РГ – радиальная глия

РМП – ростральный миграционный поток

РНН – реактивная нейрогенная ниша

СВЗ – субвентрикулярная зона

СГЗ – субгранулярная зона

ТГ – тирозин гидроксилаза

ТФ – транскрипционный фактор

ЦНС – центральная нервная система

ЧМТ – черепно-мозговая травма

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Взрослый нейрогенез, генерация и интеграция новых нейронов в мозг взрослых организмов, представляет собой основной источник пластичности мозга (Mongiati, Schinder, 2011; Sailor et al., 2017; Toda, Gage, 2018). Возникновение нейрогенеза во взрослом мозге распространяется на все подтипы позвоночных, хотя его масштабы сильно различаются в зависимости от филогенетической принадлежности (Kaslin et al., 2008; Grandel, Brand, 2013; Alunni, Bally-Cuif, 2016; Zupanc, 2021). У взрослых млекопитающих нейрогенез ограничен в основном зубчатой извилиной гиппокампа и обонятельной луковицей и СВЗ (Lledo et al., 2006), тогда как у костистых рыб нейроны, рожденные взрослыми особями, генерируются по всему их мозгу (Kaslin et al., 2008).

Костистые рыбы служат исключительными моделями для изучения динамики клеточного цикла и функции нервных стволовых и прогениторных клеток взрослых животных (вНСКП) во всей центральной нервной системе (ЦНС). Пожизненное присутствие пролиферирующих вНСКП в различных нишах головного мозга (Zupanc et al., 2005; Grandel et al., 2006), наряду с их нейрорегенеративной способностью после повреждения головного и спинного мозга (Zupanc, Sirbulescu, 2012) делают костистых рыб чрезвычайно привлекательными для изучения. Эти характеристики позволили исследователям использовать модели рыб для изучения биологического значения нейрогенеза у взрослых особей (Lindsey, Tropere, 2006), а также процессов восстановления головного и спинного мозга (Becker, Becker, 2008).

Нейрогенез у взрослых животных определяется как процесс, направленный на развитие, который начинается с деления нейтральных стволовых клеток/предшественников взрослого типа (вНСКП), которые генерируют дочерние клетки, предназначенные для нейрональной специализации. Основное различие между конститутивным нейрогенезом взрослых позвоночных и регенеративным нейрогенезом, который происходит после повреждения ЦНС, заключается в том,

что последний в значительной степени зависит от активации покоящихся в обычном состоянии ВНСКП для повторного включения в клеточный цикл. Один из базовых вопросов заключается в том, какой набор факторов в условиях гомеостаза и после травмы отвечает за контроль активности ВНСКП.

В отличие от других позвоночных, конечный мозг лучепёрых рыб развивается путем эмбриональной эверсии, представляющей эвагинацию (выворачивание) нервной трубки в ходе эмбриогенеза (Folgueira et al., 2012). В результате этого процесса паллиальные полушария разделены и окружены Т-образным внешним желудочком. В этой структуре предшественники нейронов локализованы в перивентрикулярной зоне (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006).

Мозг лососёвых рыб характеризуется сохранением признаков эмбриональной структуры у взрослых животных, это явление носит название «фетализации». Данная особенность у молоди лососевых рыб характеризуется сохранением большого числа клеток нейроэпителиального (НЭ) типа у молоди первого года жизни и на более поздних стадиях онтогенеза (Пущина и др., 2017). Другой особенностью мозга лососевых является наличие большого числа конститутивных нейрогенных ниш, расположенных на территории конечного мозга, крыши среднего мозга, мозжечка и ствола (Pushchina et al., 2021; Pushchina et al., 2022). Их функциональная роль на сегодняшний день не ясна, однако имеются предположения, что входящие в их состав клетки, становятся активными игроками при травматическом повреждении мозга (Zupanc, 2021). Подобные конститутивные образования, содержащие интерстенальные стволовые клетки, были выявлены вдоль пищеварительного тракта форели (Verdile et al., 2022)

Анализ раннего постнатального развития и возрастных изменений в организации конститутивного и посттравматического процессов, а также участие различных регенераторно-ассоциированных факторов может восполнить пробелы в современных представлениях о развитии конечного мозга молоди лососевых рыб с учетом данных о фетализации.

**Степень разработанности темы исследования.** Нейрогенез взрослых животных рассматривается как гомеостатический механизм, сопровождающий



непрерывный рост костистых рыб. В качестве альтернативной, но не исключающей гипотезы, мы полагаем, что нейрогенез у взрослых может обеспечивать форму пластичности, необходимую для адаптации мозга к условиям окружающей среды.

В паллиуме рыбок *Danio rerio* существуют различные виды нервных предшественников. Некоторые из них, особенно радиальная глия (РГ), считаются вНСК, напоминающими паллиальные РГ в нейрогенных нишах взрослых мышей (Than-Trong, Bally-cuif, 2015). Эти НСК можно классифицировать в соответствии с их пролиферативной активностью, например, покоящиеся и активные НСК. В любое время активные НСК соответствуют примерно 5% общей РГ в перивентрикулярной зоне (März et al., 2010). В свою очередь, активные НСК могут подвергаться симметричным или асимметричным делениям, чтобы поддерживать пул НСК и давать потомство с нейрогенным потенциалом (Than-Trong et al., 2020). Более того, в паллиальной перивентрикулярной зоне имеется другая популяция предшественников нейронов. Эти клетки не содержат астроглиальных маркеров (виментин, GFAP) и проявляют интенсивную митотическую активность с нейрогенной направленностью последующей дифференцировки (Rothenaigner et al., 2011; Than-Trong et al., 2020). Ранее предполагалось, что эта популяция предшественников нейронов напоминает предшественники промежуточного типа описанных у грызунов (Wojtera et al., 2005).

В настоящее время, для характеристики повреждений мозга, посттрансляционных и нейрофармакологических исследований все большее значение приобретают данные, полученные на немодельных объектах. Согласно последним данным систематических обзоров (Zuranc, 2021) рыбы, как личинки, так и взрослые особи, является наиболее часто используемой моделью ЧМТ немлекопитающих в современной литературе (Zuranc, 2021). Модели ЧМТ на немлекопитающих имеют преимущества, для быстрого, экономичного и воспроизводимого скрининга эффективных стратегий лечения, а также углубленных исследования биологии вНСК.

**Целью данной работы** являлось исследование популяций клеток, участвующих в конститутивном и посттравматическом нейрогенезе конечного мозга молодежи лососевых рыб в ходе постнатального онтогенеза.

**Для достижения цели были поставлены следующие задачи:**

1. Исследовать пролиферативный потенциал клеток в условиях конститутивного нейрогенеза и при травматическом повреждении.
2. Охарактеризовать нейронспецифическую популяцию клеток в норме и после травмы.
3. Исследовать распределение даблкортин-продуцирующих нейробластов, образованных в постэмбриональный период и после травмы.
4. Охарактеризовать популяцию вНСКП в теленцефалоне молодежи лососевых рыб.
5. Исследовать пространственную локализацию  $H_2S$ -продуцирующих клеток и их взаимоотношение к матричным зонам.
6. Изучить паттерны экспрессии транскрипционного фактора Pax2 в паллиуме и субпаллиуме молодежи лососей в условиях нормы и через 3 суток после травмы.

**Научная новизна.** Данная работа представляет собой первое комплексное исследование, включающее идентификацию пролиферативных контуров в паллиальной и субпаллиальной областях теленцефалона молодежи лососевых рыб.

Впервые дана морфологическая характеристика продуцирования нейробластов и нейронспецифической популяции у молодежи лососевых рыб. В отличие от других видов, выявлена высокая продукция даблкортин-экспрессирующих клеток в паллиуме лососевых рыб.

Охарактеризована ненейрональная популяция клеток, продуцирующих виментин, GFAP, ГС, расположенная на территории паллиальной и субпаллиальной зон. Эти клеточные популяции рассматриваются нами как вНСКП, поскольку содержат молекулярные маркеры вНСКП и расположены на территории пролиферативных зон.

Впервые изучено распределение  $H_2S$ -продуцирующих клеток в паллиуме и субпаллиуме лососевых рыб. Установлено, что данные клетки расположены на территории пролиферативных зон у интактных животных, и продукция данных клеток возрастает вместе с числом пролиферирующих клеток после травмы.

Продемонстрирован характер изменения распределения Pax2-экспрессирующих клеточных групп, выявлено снижение экспрессии Pax2 в результате острого травматического повреждения.

Впервые проанализированы пространственные и морфофункциональные соотношения популяций клеток, экспрессирующих различные регенераторно-ассоциированные факторы в условиях конститутивного гомеостаза и при остром травматическом повреждении.

Охарактеризованы различные типы нейрональных и ненейрональных популяций, расположенных на территории перивентрикулярной и субвентрикулярной зон в условиях раннего постнатального (ювенильного) онтогенеза, а также исследованы их динамика и взаимосвязь в острый посттравматический период.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Получены новые данные о структурно-функциональных характеристиках популяций клеток перивентрикулярной и субвентрикулярных областей на ювенильных стадиях постэмбрионального онтогенеза и в условиях острого травматического повреждения. Полученные в ходе экспериментального исследования результаты расширяют имеющиеся представления о пролиферации, нейрональной дифференцировке, а также ненейрональной специализации клеток в условиях ювенильного онтогенеза молоди лососевых рыб. Получены новые данные о высокой продукции ДК<sup>+</sup> нейробластов у молоди лососей в условиях конститутивного и репаративного гомеостаза. Данные о пролиферативной динамике клеток перивентрикулярной зоны в совокупности с результатами иммуномаркирования клеток ненейрональной популяции (виментин, GFAP, ГС) позволяют заключить, что на территории пролиферативных зон паллиума и субпаллиума расположены ВНСКП.

Результаты исследований  $H_2S$ -продуцирующих клеток в конечном мозге молоди лососевых рыб позволяют предполагать их участие во взрослом и посттравматическом нейрогенезе в качестве нейромодуляторов/нейропротекторов. Данные по изменению распределения Pax2-экспрессирующих клеток в ходе посттравматического периода дает возможность предполагать их функциональную активность в регуляции генной экспрессии в ходе постэмбрионального онтогенеза и при острой травме. Полученные в результате работы сведения о взаимодействии пролиферирующих нейрональных и ненеурональных популяций в паллиуме и субпаллиуме лососевых рыб способствуют пониманию механизмов взрослого и посттравматического нейрогенеза.

**Методология и методы диссертационного исследования.** Материалы диссертационной работы были рассмотрены и одобрены этической комиссией ННЦМБ ДВО РАН (заключение комиссии No. 2-170920 и No. 2-101221). Диссертационная работа выполнена с применением различных методических подходов, включающих исследование пролиферативных особенностей при конститутивном и посттравматическом нейрогенезе, иммуногистохимическую оценку продукции нейробластов, а также иммуногистохимическую характеристику вНСКП, в частности маркирование структурных белков, виментина и GFAP, а также ГС, являющихся маркерами вНСКП. Для характеристики  $H_2S$ -продуцирующих клеток использовали иммуногистохимическую верификацию CBS с последующей идентификацией методами световой микроскопии. С целью верификации Pax2-экспрессирующих клеток были использованы антитела против транскрипционного фактора Pax2.

В работе использовали широкую панель антител, специфичных для иммуногистохимической верификации на *D. rerio*, представленных в таблице 1.

Для экспериментального моделирования нейротравмы колотое повреждение конечного мозга было проведено на годовалой молоди кеты или симы. Использование близкородственных видов тихоокеанских лососей обусловлено необходимостью проведения сравнительных исследований, так и особенностями

получения материала. Всего было использовано 60 особей молоди симы *Oncorhynchus masou* и 30 особей молоди кеты *Oncorhynchus keta*.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. В конечном мозге молоди симы и кеты гомеостатическая пролиферативная активность выявлена на территории паллиальной и субпаллиальной перивентрикулярных зон, неоднородно изменяющаяся в результате травматического воздействия.
2. Локализация и особенности биологии вНСКП связаны с локализацией этих клеток на территории пролиферативных зон теленцефалона и экспрессии виментина, GFAP и ГС, как в конститутивных условиях, так и при ЧМТ.
3. Травматическое повреждение мозга связано с увеличением экспрессии сероводорода клетками пролиферативной зоны и количества нейробластов, сопровождающимся снижением экспрессии фактора Pax2.

**Личный вклад** автора заключается в планировании, подготовке и непосредственном проведении экспериментов, включающих в себя: гистологическое и иммуногистохимическое маркирование, исследование препаратов с помощью микроскопии, получение микрофотографий препаратов мозга, проведение морфо- и денситометрического анализа материала, организацию и обработку статистических данных и их анализ, интерпретацию полученных результатов и их обсуждение, подготовку текста диссертации и автореферата.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (МД 4318.2015.4), программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» (проект № 15-I-6-010) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-90091).

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечена использованием современных иммуногистохимических методов и статистической обработкой данных, которые соответствуют целям и задачам. Использование одних и тех же алгоритмов для описания каждого процесса, анализ данных с помощью программного

обеспечения, а также воспроизводимость результатов при повторных экспериментах, подтверждают это. Результаты исследований, научные положения и выводы подкреплены данными, приведенными на рисунках и в таблицах.

**Апробация работы и публикации.** Материалы диссертации представлены на XIII Конгрессе Международной ассоциации морфологов (Петрозаводск, 2016), Международной конференции по гистохимии и клеточной биологии (Финикс, США, 2016), на VIII Съезде научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Воронеж, 2019), на Второй Всероссийской научной конференции с международным участием (Санкт-Петербург, 2020), на конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей» (Санкт-Петербург, 2021).

По теме диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных для публикации диссертационных исследований и входящих в международные реферативные базы данных Scopus и Web of Science. Среди опубликованных работ 2 главы в коллективных монографиях и 9 работ в других журналах и в сборниках материалов конференций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация написана в соответствии с ГОСТом 7.0.11-2011 и содержит главы введение, обзор литературы, материал и методы, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений и список литературы. Работа изложена на 210 страницах, содержит 16 таблиц и 30 иллюстраций. Список литературы включает 228 наименования, из них 9 на русском и 219 на английском языках.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Общая характеристика нейрогенеза позвоночных

Нейрогенез в постэмбриональном периоде наблюдается у большинства позвоночных. Однако, большинство данных из этой области в основном получены на двух моделях стволовых клеток млекопитающих: субвентрикулярной зоне (СВЗ) боковой стенки бокового желудочка и субгранулярной зоне (СГЗ) гиппокампа, где медленно пролиферирующие клетки-предшественники астроцитов дают начало новым нейронам (Doetsch, Hen, 2005; Lledo, Saghatelian, 2005). Процессу дифференцировки в СВЗ предшествует активная миграция клеток-предшественников в обонятельную луковицу (ОЛ) вдоль рострального миграционного потока (РМП). В ОЛ такие нейробласты дифференцируются в основном в ГАМК-эргические интернейроны (Lledo, Saghatelian, 2005).

Множество аспектов в биологии взрослых нейральных стволовых клеток (НСК) остаются неизученными. Например, происхождение так называемых нейрогенных «ниш» (Alvarez-Buylla, Lim, 2004), или влияние различных клеточных факторов на стволовые клетки, в результате которого они остаются стволовыми или уходят в дифференцировку. Одним из факторов транскрипции (Shi et al., 2004; Molofsky et al., 2005), который оказывает влияние на стволовые клетки, как в СВЗ, так и в СГЗ, является Sox2 (Ferri et al., 2004; Episkopou, 2005). Другой транскрипционный фактор Olig2 запускает детерминацию клеток в СВЗ и РМП, а Рахб - стимулирует нейробласты к дифференцировке в ТГ-позитивные нейроны в ОЛ (Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2005).

Нейрогенез у взрослых млекопитающих ограничен областями СВЗ и СГЗ, но значительно шире распространен у других позвоночных: рептилий (Garcia-Verdugo et al., 2002), птиц (Goldman, 1998), и рыб (Zupanc, 2001). Эти модели могут дать представление о механизмах дифференцировки других нейрональных подтипов, кроме нейронов ОЛ или интернейронов гиппокампа, во взрослом мозге. Это поможет выявить общие с млекопитающими черты взрослого нейрогенеза, и выявить главные факторы, поддерживающие стволовые клетки. У костистых рыб,

пролиферация и нейрогенез происходит на протяжении всей жизни, коррелируя с длительным ростом мозга и высокой способностью к регенерации (Zuranc, 2001). Ограниченные области пролиферации предполагают наличие нейрогенных ниш. Во взрослом мозге *D. rerio*, новые нейроны образуются в ОЛ, конечном мозге, гипоталамусе, преоптической области и оптическом тектуме, а также в мозжечке (Goldman et al., 2001; Zuranc et al., 2005). Тем не менее, расположение и молекулярные характеристики предшественников остаются неясными. Клетки-предшественники в конечном мозге *D. rerio* расположены как в дорсальной, так и в вентральной областях и продуцируют уникальное сочетание молекулярных маркеров. Доказано, что нейрогенез в ОЛ у *D. rerio* и у млекопитающих имеет множество общих черт, что позволяет рассматривать *D. rerio* в качестве хорошей модели для изучения нейрогенеза.

Нейрогенез у взрослых животных значительно больше выражен у птиц, рептилий, амфибий и рыб, чем у млекопитающих. Этот процесс, как правило, локализуется в нескольких перивентрикулярных областях мозга и выполняет адаптивные функции. Однако, области мозга, в которых расположены пролиферативные зоны, могут варьировать у разных видов в соответствии с необходимой функциональной специализацией (Lindsey et al., 2006). В настоящее время ощутима нехватка детальной информации для сравнительной оценки видоспецифических отличий и определения общего значения таких наблюдений для каждой систематической группы.

Впервые исследования взрослого нейрогенеза были проведены на певчих птицах (Alvarez-Buylla, Kirn, 1997; Absil et al., 2003). Некоторые из имеющихся результатов были получены на животных в их естественной среде обитания, тем самым, доказывая, что нейрогенез во взрослом мозге не является исключительно лабораторным наблюдением. Нейрогенез наблюдается также у взрослых рептилий – ящериц и черепах, и у амфибий (Polenov, Chetverukhin, 1993). Взрослый нейрогенез был изучен у нескольких костистых рыб: колюшки (Ekstrom et al., 2001), гуппи (Birise et al., 1980), золотой рыбки (Meyer, 1978; Sullivan et al., 1997), форели (Candal et al., 2005), оризии (Candal et al., 2005). Однако в этих работах пока



не были представлены данные о конкретных типах клеток (их фенотипах), участвующих во взрослом нейрогенезе. Результаты недавних исследований установили особенности данного процесса у *D. rerio*, имеющей существенные отличия от других видов рыб (Pellegrini et al., 2007; Zupanc et al., 2005). Эти исследования позволяют более полно представить сравнительную картину организации нейрогенных зон, а также исследовать выживание и интегрирование в нейрональные сети взросло-рожденных нейронов.

У всех исследованных на сегодняшний день видов животных, пролиферация нейронов происходит на протяжении всей жизни. У птиц зоны пролиферации чаще всего расположены вдоль стенок бокового желудочка конечного мозга, и продуцируют новые нейроны в дорсальных ядрах теленцефалона в области нидопалиума (являющимся высшим голосовым центром), гиппокампа и структурах стриатума (параольфакторная доля, содержащая ядро блуждающего нерва). Фундаментальное различие с другими видами наблюдается у костистых рыб, где взрослый нейрогенез проходит во всех подразделениях головного мозга, (Zupanc et al., 2005), как и у других позвоночных, однако, концентрируется в локальных точках, что свидетельствует о существовании каких-то местных событий, регулирующих процессы нейрогенеза.

## **1.2. Нейрональные стволовые клетки у взрослых немлекопитающих позвоночных**

Источниками новых нейронов у взрослых млекопитающих являются НСК, и важно выяснить: имеют ли эти клетки сходные характеристики с предшественниками нейронов у не млекопитающих. Зрелая НСК должна обладать двумя основными свойствами: мультипотентностью и способностью к самовозобновлению (Berninger et al., 2006). НСК обладает способностью продуцировать нейроны и глию, как в условиях организма, так и *in vitro*, хотя дифференцировка в нейрон или глиальную клетку может определяться условиями клеточного микроокружения и другими динамическими факторами (Hutton et al.,

2015). Второе свойство определяет, что клетка в ходе деления, либо даёт начало двум стволовым клеткам, либо порождает стволовую клетку и клетку, которая в последствие дифференцируется в нейрон или глиоцит (Zupanc et al., 2005). Теоретически, самовозобновление клеток не является предопределенным. Более того, одной из базовых характеристик стволовых клеток является нахождение в состоянии покоя, то есть процесс деления происходит сравнительно редко.

### 1.2.1. Выявление и определение НСК

Несмотря на то, что определение НСК является относительно простым, их свойства весьма трудно продемонстрировать на практике. В частности, способность к пролиферации и мультипотентность клеток могут быть проверены только путем выполнения повторяющихся последовательных трансплантаций одиночных клеток и последующего истощения всей популяции клеток, как было установлено для кроветворной системы. Следовательно, точная идентификация эндогенных взрослых НСК, и проверка этого существующими методами в настоящее время трудноосуществимы. На практике, как правило, выявляются «долгосрочные», «самовозобновляющиеся» или «медленно пролиферирующие» популяции клеток с помощью BrdU меток (Morrison et al., 1997).

Вслед за выявлением процесса нейрогенеза в мозге взрослых позвоночных животных, основной вопрос касается того, какие клетки могут рассматриваться в качестве НСК в соответствии с классическими критериями. Также актуален вопрос о том, какой из этих критериев на самом деле однозначно реализуется в НСК млекопитающих. С момента появления первых доказательств существования нейрогенеза в мозге взрослых грызунов, опубликованных около 40 лет назад, и вплоть до настоящего времени, набор инструментов для выявления и изучения НСК значительно расширился (Smart, Leblond, 1961; Altman, Das 1965).

При исследованиях на мышах были получены противоречивые результаты, которые позволяют предполагать, что эпендимоциты, выстилающие стенки бокового желудочка, являются стволовыми клетками (Johansson et al., 1999). В

настоящее время широко распространена гипотеза о том, что астроциты, экспрессирующие глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), являются основным источником новых нейронов. Однако в ходе дальнейших экспериментов эта гипотеза не подтвердилась, и было установлено, что астроциты формируют гетерогенную популяцию, и только некоторые из них являются стволовыми клетками. Одной из морфологических характеристик эпендимоцитов является наличие одной реснички, контактирующей с просветом мозгового желудочка (Doetsch et al., 1999). Существование медленно пролиферирующих астроцитов было установлено с помощью фармакологических препаратов, снижающих скорость пролиферации и маркирования бромдезоксисуридина. Например, вещество Ara-C убивает пролиферирующие клетки, при этом, не оказывая подобного влияния на покоящуюся популяцию клеток (Doetsch et al., 1999). Таким образом, маркирование BrdU в сочетании с Ara-C позволяет выявить медленно пролиферирующие клетки.

В субвентрикулярной зоне идентифицированы три популяции клеток. Медленно делящиеся В-клетки, выявленные с помощью электронного микроскопа, представляют собой астроциты, связанные с желудочком через эпендиму, и дают начало популяции из более быстро пролиферирующих С-клеток, которые затем производят А-клетки, представляющие собой мигрирующие нейробласты (Doetsch et al., 1999). На основе применения ретровирусных методик в субгранулярной зоне, с помощью Ara-C и данных электронной микроскопии, были выявлены первичные предшественники – клетки радиальной или горизонтальной популяции медленно делящихся астроцитов. Они приводят к пролиферации клеток D1, которые генерируют молодые нейроны (Seri et al., 2004).

Иммуномаркирование GFAP и другого маркера глиальных клеток – жиросвязывающего белка мозга (BLBP) позволило установить наличие клеток радиальной глии вдоль всего мозга *D. rerio*. Эта популяция медленно пролиферирующих клеток была обнаружена также *in vivo* с помощью маркирования BrdU и ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) (Adolf et al., 2006). Этот эксперимент проводился с целью разделить популяции быстро

пролиферирующих (BrdU<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup>) и медленно пролиферирующих (BrdU<sup>-</sup>/PCNA<sup>+</sup>) клеток. Суть эксперимента заключается в том, что PCNA должен присутствовать во всех фазах клеточного цикла, за исключением тех случаев, когда клетки в течение очень долгого периода остаются в G1 фазе, тогда ингибитор клеточного цикла p21 вызывает деградацию PCNA (Kippin et al., 2005), в то время как BrdU включается только в S-фазе. В целом, если клеточный цикл будет коротким, большое количество клеток будет оставаться в S-фазе, а если клеточный цикл будет длинным, количество BrdU-маркированных клеток будет меньше. Опираясь на эту парадигму, а также на факт сохранения BrdU-метки, у *D. rerio* были выявлены клетки с длинным клеточным циклом в конечном мозге, ножке шишковидного тела, гипоталамусе, мозжечке, крыше среднего мозга и районе перешейка (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006).

### 1.2.2. Нейрональные клетки предшественники у рыб

Результаты исследований на *D. rerio* свидетельствуют о существовании факторов, удерживающих стволовые клетки на территории желудочков. BrdU-меченые клетки в течение нескольких недель сохраняются в перивентрикулярной области. Так как подобные клетки были обнаружены у двухлетних особей, они, вероятно, сохраняются и в более позднем возрасте. Эти данные свидетельствуют о том, что часть клеток-предшественников во взрослом конечном мозге *D. rerio* является медленно пролиферирующей и самообновляющейся популяцией. Следует отметить, что эти, сохраняющие маркирование клетки, экспрессируют глиальные факторы, аналогичные НСК млекопитающих (Seri et al., 2001). В совокупности с некоторыми характеристиками молекулярной экспрессии (например, *sox2*), эти данные свидетельствуют о том, что желудочки конечного мозга *D. rerio* содержат клетки-предшественники, обладающие свойствами НСК. Важно, что такие клетки у *D. rerio* выстилают весь желудочек в дорсо-вентральном направлении, в отличие от млекопитающих.

Интересно, что клетки-предшественники у взрослых рыб значительно отличаются от их эмбриональных аналогов. Например, одной из отличительных черт является приобретение характеристик глиальных клеток, которые появляются только в конце эмбрионального периода (Marcus, Easter, 1995). Кроме того, установлено, что элементы, необходимые для экспрессии *ngn1*, у взрослых клеток-предшественников, отличаются от регулирующих экспрессию на эмбриональной стадии (Blader et al., 2004). Экспрессия генов в зрелом возрасте и эмбриональном периоде значительно отличаются. Например, *emx3* и *ngn1* экспрессируется у эмбрионов в дорсальной части, а *dlx*, *ash1* и *olig2* - в вентральной (Blader et al., 2004). Экспрессия транскрипционного фактора *Paxba* ограничена в вентральном теленцефалоне, а *Paxbb* вообще отсутствует в течение 24 ч после оплодотворения (Blader et al., 2004). Это существенно отличается от паттерна экспрессии данных транскрипционных факторов у взрослых рыб, где экспрессируется большинство из этих генов, и все - вдоль дорсовентральной оси. Пока не ясно вследствие чего происходят подобные изменения, из-за миграции клеток или дифференциальной регуляции транскрипции, но они указывают на уникальную совокупность клеток-предшественников в нейрогенных нишах у взрослых особей, как у *D. rerio*, так и у мышей. Дальнейшие исследования помогут лучше понять, какие отличительные черты существуют между эмбриональными и взрослыми клетками-предшественниками и помогут прояснить механизмы, регулирующие функциональную активность взрослых НСК.

### 1.2.3. Анализ нейросфер и самовозобновление нервных клеток

Доказательства процесса самовозобновления нервных клеток у млекопитающих основано на так называемом «анализе нейросфер» (Reynolds, Weiss, 1992). Диссоциированные клетки из субгранулярной или субвентрикулярной зоны культивируют *in vitro* в присутствии факторов роста, (как правило, эпидермального фактора роста или фактора роста фибробластов), в результате чего клетки начинают формировать кластеры сферической формы.

После этого анализируют клетки, полученные из вторичных нейросфер, которые, в свою очередь, получены из одиночных клеток первичной нейросферы. Хотя преимущество данного анализа составляет раскрытие потенциала выделенных клеток, тем не менее, данный подход не в полной мере отражает существо процессов самовозобновления. К примеру, не ясно, каким образом клетки в нейросфере формируют прогениторы переходного типа. Этот вопрос особенно актуален для субгранулярной зоны, где способность клеток генерировать вторичные нейросферы остается спорной (Seaberg, van der Kooy, 2002). Кроме того, все больше свидетельств того, что клетки в нейросферах ведут себя иначе, чем в условиях *in vivo*. Например, в исследованиях на культуре клеток были обнаружены такие комбинации клеточных маркёров, которые никогда не встречались *in vivo*. Кроме того, даже такие параметры, как плотность распределения клеток могут влиять на состояние пролиферации и/или жизнеспособность клеток. Наконец, культивирование *in vitro* может изменить генетические и эпигенетические свойства клеток (Morshead et al., 2002).

В условиях *in vivo*, неопределенное самовозобновление НСК у млекопитающих также может быть поставлено под сомнение. Снижение уровня пролиферации клеток, связанное с возрастом (как показывает маркирование BrdU), и выживание новорожденных нейронов наблюдается как в субгранулярной (Kempermann et al., 1998), так и в субвентрикулярной (Luo et al., 2006) зонах. Предположительно НСК фактически не самовозобновляются, в отличие, например, от гематопоэтических стволовых клеток. Является ли данный феномен результатом изменений внутренних свойств стволовых клеток или он возникает из-за отсутствия внешнего влияния, оказываемого нейрогенной нишей, предстоит выяснить в будущих исследованиях.

Потенциальные судьбы клеток-предшественников субгранулярной и субвентрикулярных зон часто прослеживаются *in vitro* с помощью нейросфер, поскольку они содержат не только сами «стволовые клетки», но и их уже дифференцированных потомков. Тем не менее, этот способ имеет значительные ограничения.

НСК в субгранулярной и в субвентрикулярной зонах в основном производят новые нейроны. Обновление глии несколько ограничено, хотя олигодендроциты могут происходить либо из клеток субвентрикулярной зоны, либо путем глиальной дифференцировки клеток-предшественников в составе роstralного миграционного потока (Menn et al., 2006). При исследованиях *in vivo* после инъекции ретровирусов в желудочки головного мозга наблюдали пролиферацию клеток (Morshead et al., 1998). Тем не менее, данный метод ограничен двумя факторами. Во-первых, из-за небольшого временного окна, аналогично с BrdU, вирус интегрируется в геном только быстро пролиферирующих клеточных популяций, и не затрагивает медленно пролиферирующие стволовые клетки. Во-вторых, по статистике, вирус интегрируется только в одну из двух дочерних клеток. Lentивирусы, напротив, могут включаться в покоящиеся клетки, и, следовательно, подходят для использования при отслеживании потомков субгранулярных и субвентрикулярных стволовых клеток (Consiglio et al., 2004). При этом, мультипотентность одиночной инфицированной клетки позволяет в более полной мере использовать нейросферный анализ во время диссоциации и выращивания культуры инфицированных лентивирусами прогениторных зон (Consiglio et al., 2004).

У костистых рыб, нейросферы, полученные из конечного мозга и мозжечка аптеронотуса, могут дифференцироваться в нейроны, а также GFAP- или виментин-позитивные клетки глии (Hinsch, Zupanc, 2006). Однако ограничения, существующие при интерпретации данных нейросферных исследований, в данном случае, также справедливы. Для того, чтобы определить мультипотентность клеток-предшественников *in vivo*, важно исследовать их без пересева в культуру. У *D. rerio*, как и у млекопитающих, из клеток-предшественников образуется в основном нейроны, а не глиальные клетки. В предыдущих экспериментах было описано несколько новых не-нейрональных клеток во внешнем слое обонятельной луковицы и в паренхиме конечного мозга (Adolf et al., 2006). Кроме того, небольшое число вновь-образованных клеток, экспрессирующих маркер астроцитов S100, было обнаружено вдоль желудочка конечного мозга, в

дорсальной части гипоталамуса и в мозжечке (Grandel et al., 2006). Каковы причины такого паттерна распределения нейронов и не-нейрональных клеток у *D. rerio* пока не ясно, однако, ограниченное продуцирование астроцитов во взрослом мозге находится в соответствии с их общим низким содержанием в мозге костистых рыб.

Все эти наблюдения указывают на сопоставимые свойства клеток-предшественников, которые дают начало большинству новых нейронов в мозге взрослых костистых рыб, и мозге млекопитающих. В связи с тем, что в исследовании вопросов идентификации НСК наблюдается видимый прогресс, имеющиеся определения НСК в обоих таксонах могут быть несколько расширены. Например, возможность к неограниченному самовозобновлению не поддерживается в экспериментах *in vivo*. Это также предполагает, что требуется дальнейший анализ мультипотентности единичной прогениторной клетки.

#### **1.2.4. Области мозга с выраженной пролиферативной активностью**

Участки с выраженной пролиферативной активностью были описаны во взрослом мозге костистых рыб (Zupanc, Horschke, 1995; Ekstrom et al., 2001), в сетчатке у *D. rerio* (Goldman et al., 2001), в обонятельной луковице (Byrd, Brunjes, 1998), в конечном мозге и мозжечке (Zupanc et al., 2005), а так же в заднем и спинном мозге (Goldman et al., 2001). Тем не менее, вопрос о том, какие именно из клеточных пулов дают начало нейронам и глии в разных отделах мозга, за исключением мозжечка, не было установлено (Zupanc et al., 2005). Для изучения этих вопросов использовали маркирование BrdU и осуществляли мониторинг за судьбой маркированных клеток.

В соответствии с ранее проведенными наблюдениями, в мозге взрослых *D. rerio* было обнаружено множество пролиферирующих клеток и выделено 16 участков с выраженной пролиферативной активностью (Zupanc et al., 2005). Конечный мозг *D. rerio* обычно делят на дорсально расположенный паллиум и базально расположенный субпаллиум. Паллиум, в свою очередь, подразделяется на дорсальную, вентральную, латеральную и медиальную области, а субпаллиум на



дорсальный и вентральный отделы, соответственно (Wullimann et al., 1998). В теленцефалоне, вентральный субпаллиум интенсивно маркируется и выглядит как продольная полоса BrdU-положительных клеток, соединяющих заднюю часть конечного мозга с обонятельной луковицей (ОЛ). Внутри самой ОЛ BrdU-маркирование не наблюдалось, но несколько положительных глиальных клеток были обнаружены в поверхностном слое обонятельного нерва (Byrd, Brunjes, 2001). Большинство пролиферирующих клеток находились рядом с желудочком. Такие клетки образуют протяженную область на дорсальной наружной поверхности теленцефалона, что соответствует эвертированному типу формирования конечного мозга у костистых рыб (Wullimann, Rink, 2002). Кроме того, зона с активной пролиферацией клеток была обнаружена на стыке между паллиумом и вентральной областью конечного мозга, перекрывающей оптический тракт. Несколько положительных клеток было выявлено также и в паренхиме.

Исследование особенностей распространения BrdU-меченых клеток показало, что, не смотря на их наличие на всех уровнях дорсо-вентральной области, численность таких клеток может варьировать. В вентральном субпаллиуме наблюдалась самая высокая плотность распределения BrdU-положительных клеток, в дорсальном субпаллиуме количество клеток было в 4 раза меньше, а в медиальном и дорсальном паллиуме - в 10 раз меньше. Данные наблюдения свидетельствуют о том, что в вентральном субпаллиуме расположен большой пул пролиферирующих клеток, или же скорость их деления в этой области выше, чем в дорсально расположенных районах. Чтобы решить эту проблему была проведена оценка индекса BrdU-маркирования каждого района путем вычисления количества BrdU-меченых клеток (количество клеток в S фазе) в пределах активно делящейся популяции, экспрессирующей PCNA (Bravo et al., 1987). В дополнение к данным о более высокой плотности PCNA-положительных клеток, расположенных вдоль желудочка в вентральном субпаллиуме, было установлено, что доля би-маркированных BrdU/PCNA клеток в этой области увеличивается в два раза. Таким образом, большинство клеток-предшественников в вентральном субпаллиуме быстро пролиферирует, тогда, как клетки-предшественники из других областей

пролиферируют медленнее. В соответствии с замедленным клеточным циклом в дорсальном субпаллиуме, медиальном, дорсальном и латеральном паллиуме, было установлено, что количество клеток с BrdU-включениями в этих областях постоянно увеличивалось в течение 10 суток эксперимента. Таким образом, очевидно, что пролиферирующие клетки конечного мозга представлены несколькими субпопуляциями, отличающимися по скорости деления.

### **1.2.5. Пролиферация и дальнейшая судьба взрослых нейральных стволовых клеток**

Пролиферативная активность и дальнейшая судьба взрослых нейральных стволовых клеток отличаются в зависимости от их локализации в различных областях мозга. В настоящее время механизмы этого остаются плохо изученными. Учитывая, что данные свойства имеют существенные межвидовые отличия, сравнение различных моделей помогает раскрытию конкретных механизмов, ответственных за пролиферацию и дифференцировку клеток. При рассмотрении отдельно взятого региона мозга, можно задать вопрос, что именно ограничивает судьбу определенных групп НСК в данных областях у разных видов. Например, субпаллиальная прогениторная зона у *D. rerio*, продуцирующая нейроны обонятельной луковицы, также продуцирует ГАМК и TH-позитивные клетки теленцефалона (Adolf et al., 2006). Это явление никогда не наблюдалось у мышей, где субвентрикулярная зона влияет только на нейроны обонятельной луковицы. Если рассматривать эту проблему более глобально, на уровне всего мозга, становится понятно, какие механизмы и молекулярные компоненты содействуют активному нейрогенезу у одних видов, и почему они не работают у других. Например, у *D. rerio*, долговечные клетки-предшественники, расположенные вдоль дорсальной поверхности желудочков конечного мозга, генерируют новые нейроны (Adolf et al., 2006). У мышей нейрогенез не происходит в коре головного мозга. Таким образом, выяснение механизмов нейрогенеза в конечном мозге у *D. rerio* поможет выявить то, что отсутствует, или, наоборот, то, что должно

присутствовать у млекопитающих во взрослом мозге для формирования новых нейронов. Это обоснование справедливо и для других областей, где был обнаружен взрослый нейрогенез у *D. rerio*, к примеру, в заднем мозге или гипоталамусе, и где нейрогенез не наблюдается в эквивалентных структурах мозга взрослых млекопитающих. Наконец, сравнивая модели животных с разными стилями жизни, особенностями поведения и обитающих в различных экологических условиях, мы можем достигнуть более глубокого понимания роли взрослого нейрогенеза.

### 1.3. Миграция клеток во взрослом конечном мозге

Исследования маркирования BrdU через различные промежутки времени (3 дня, а также 2, 3, 4 и 8 недель после инъекции) показало, что потомство пролиферирующих клеток располагается в непосредственной близости от желудочка мозга. Подобные эксперименты позволяют также отслеживать и миграцию клеток. Через трое суток после мечения BrdU, в конечном мозге не наблюдалось никаких серьезных изменений, но несколько BrdU-меченых клеток были обнаружены в ОЛ. Более заметные изменения наблюдались через 2 недели. В этот период многочисленные положительные клетки были обнаружены в ОЛ. Обонятельная луковица у *D. rerio* состоит из трех слоев (обонятельный нерв, клубочковый слой, внутренний слой) (Byrd, Brunjes, 1998). Через 2 недели BrdU-положительные клетки были преимущественно найдены в ВС, а через 4 и 8 недель они выявлялись также в КС. Таким образом, клетки, продуцируемые вне ОЛ, мигрируют туда в течение 2-х недель. Параллельно с этим, общее число положительных клеток в вентральном субпаллиуме уменьшилось, и большинство клеток, которые сохранили маркирование BrdU, формировали скопления вдоль желудочка. Кроме того, клетки, расположенные вдоль желудочка в дорсальном субпаллиуме и паллиуме, через 2 недели после мечения BrdU мигрировали в паренхиму. Миграция клеток продолжалась в течение длительного времени, и сохранялась также через 19 суток после мечения. Результаты исследования

указывают на то, что в течение 2-х недель пролиферирующие клетки из желудочков двигаются в переднюю область вентрального субпаллиума, ОЛ и паренхимы.

Происхождение клеток, мигрирующих в ОЛ, не было известно ранее (Zuranc et al., 2005). Было установлено, что BrdU-положительные клетки не обнаруживаются в ОЛ сразу после мечения, следовательно, новые нейроны должны появляться в другом месте. Кроме того, число BrdU-положительных клеток в вентральном субпаллиуме уменьшается с течением времени, параллельно с увеличением их количества в ОЛ. Эти наблюдения указывают на то, что нейроны ОЛ могут происходить от популяции пролиферирующих клеток, расположенных в стенке желудочка в вентральном субпаллиуме. Для того, чтобы подтвердить это предположение, были предприняты попытки выявить миграционный путь и характеристики клеток, движущихся по направлению к ОЛ. В отличие от млекопитающих, у взрослых *D. rerio* GFAP-позитивные клетки были выявлены в небольшом количестве, что согласуется с недавними исследованиями радиальных клеток во взрослом мозге этого вида с помощью маркера AroB (Menuet et al., 2005). Тем не менее, в мозге *D. rerio* было идентифицировано интенсивное PSA-NCAM окрашивание в субпаллиуме, примыкающем к ОЛ, что сходно с миграцией PSA-NCAM меченых нейробластов у млекопитающих (Doetsch et al., 1997; Peretto et al., 1997). Приведенные данные свидетельствуют в пользу того, что полоса в вентральном субпаллиуме *D. rerio* может соответствовать миграционному потоку нейронов и нейробластов, движущихся из конечного мозга в ОЛ, что соответствует ростральному миграционному потоку в мозге млекопитающих.

#### **1.4. Дифференцировка клеток-предшественников**

Для того, чтобы определить, способствует ли взрослый нейрогенез увеличению популяции ГАМК-ергических нейронов в ОЛ (Kim et al., 2004), как это происходит у млекопитающих, была проанализирована экспрессия ГАМК-синтезирующего фермента GAD67 у BrdU-положительных клеток (Edwards, Michel, 2002). Через 4 недели после мечения, большая доля BrdU-позитивных

клеток в ОЛ экспрессировала GAD67, что свидетельствует об увеличении количества ГАМК-ергических нейронов в ОЛ *D. rerio*. Показано, что небольшой процент BrdU-положительных клеток, экспрессирующих тирозин гидроксилазу (ТГ) через 4 или 8 недель после мечения BrdU (Edwards, Michel, 2002) составляет менее 5% от общего количества ТГ-позитивных нейронов, что подтверждает данные на млекопитающих (Hack et al., 2005). Вполне вероятно, что эти нейроны также относятся к GAD67 положительным, поскольку, как и у грызунов, у *D. rerio*, ТГ-позитивные нейроны могут продуцировать ГАМК в ОЛ (Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2005). В совокупности эти результаты показывают, что нейрогенез *de novo* у взрослых *D. rerio* способствует генерации нескольких типов нейронов ОЛ: ГАМК-ергических интернейронов во ВС и ТН-позитивных интернейронов в КС, что сравнимо с ситуацией у млекопитающих.

Последние результаты исследований на мышах показали увеличение экспрессии Рахб у взрослых особей в конечном мозге и, как следствие, увеличение численности ТГ-положительных нейронов в гранулярном слое ОЛ (Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2005). Таким образом, для дальнейшего сравнения нейрогенеза в ОЛ у *D. rerio* и млекопитающих, проводили сравнение соотношения между количеством новых ТГ-нейронов и экспрессии генов Рахб. У *D. rerio* были идентифицированы два гена Рахб, с перекрывающейся экспрессией у эмбрионов (Nornes et al., 1998), но ситуация у взрослых особей несколько отличалась от таковой в эмбриональном мозге. В то время как экспрессия Рахбб была незначительной в конечном мозге и отсутствовала в ОЛ, Рахба был обнаружен в близлежащих клетках, а также в многочисленных клетках в ОЛ. Ни одна из клеток, экспрессирующих Рахба, не была PCNA-положительной. В результате маркирования поликлональными мышинными антителами было установлено, что маркированные клетки отсутствовали в зоне желудочков. В ОЛ были обнаружены би-маркированные BrdU/Рахба клетки и небольшое количество ТГ/Рахба-положительных клеток. Таким образом, было установлено, что популяции Рахба- и ТГ-позитивных клеток является частично перекрывающейся.

Клетки-предшественники из перивентрикулярной зоны теленцефалона у взрослых *D. rerio* также способствуют пополнению нейронального пула конечного мозга. В субпаллиуме и медиальном паллиуме, через несколько недель, эти нейроны выстраиваются в виде дорсо-вентральных линий, примыкающих к вентрикулярной зоне. Некоторые нейрохимические маркеры (GAD67, ТГ), и транскрипционные факторы (Рахба) маркируют нейрогенные зоны мозга (Adolf et al., 2006). Маркируемые колонны клеток расположены рядом, эти клетки не мигрируют в ОЛ, а останутся в конечном мозге и дифференцируются во взрослые нейроны соответствующей нейрохимической специализации.

Сравнение нейронов из дорсального субпаллиума и медиального паллиума, в частности, маркирование BrdU и экспрессия вышеуказанных маркеров показало, что большая часть этих нейронов экспрессирует GAD67. Обнаружены также Рахба или ТГ позитивные нейроны. Однако ТГ-позитивные нейроны не экспрессируют Рахба или GAD67, в отличие от нейронов ОЛ. Таким образом, перивентрикулярная зона субпаллиума и вентрального паллиума дает начало ГАМК или ТГ-позитивным нейронам теленцефалона.

### **1.5. Характеристики клеток-предшественников желудочков конечного мозга**

НСК в головном мозге взрослых млекопитающих относятся к популяции медленно пролиферирующих клеток и обладают свойствами астроцитарной глии (Gotz et al., 2002; Goldman, 2003). Для проверки гипотезы о том, наблюдается ли подобное свойство в теленцефалоне у взрослых рыб, исследовали экспрессию жиросвязывающего белка мозга (BLBP), который экспрессируют глиальные клетки млекопитающих и птиц (Anthony et al., 2004). Из двух BLBP генов *fabp7a* и *fabp7b* у *D. rerio*, (Liu et al., 2003), *fabp7a* экспрессируется в перивентрикулярной зоне конечного мозга и функционально сходен с генами *sox2*, *sox9a*, *sox10* и другим маркерам клеток-предшественников мышей и рыб (Komitova, Eriksson, 2004; Revny, Placzek, 2005). *Fabp7a*-позитивные клетки наблюдались вдоль поверхности

желудочка, распространяя радиальные отростки вдоль мягкой мозговой оболочки. Через два часа после мечения BrdU 42% меченых клеток-предшественников также становились *fabp7a*-позитивными. Важно, однако, что процент *fabp7a* - положительных и BrdU-маркированных клеток со временем уменьшался, так как BrdU-меченые клетки мигрируют из желудочковой зоны, вследствие приобретения нейрональной дифференцировки. Таким образом, клетки-предшественники из перивентрикулярной зоны конечного мозга *D. rerio* обладают схожими характеристиками с НСК млекопитающих, в частности, это проявляется в экспрессии сходных клеточных и молекулярных глиальных факторов.

Недавние исследования показали, что некоторые молекулярные транскрипционные факторы: *emx3* (Morita et al., 1995), *dlx2a* (Akimenko et al., 1994), *Olig2* (Park et al., 2002), *Pax6b* (Nornes et al., 1998), *ash1a* (Allende, Weinberg, 1994) и *neurog1* (Blader et al., 1997) экспрессируются BrdU-позитивными клетками-предшественниками в конечном мозге взрослого *D. rerio*. Участки экспрессии данных маркеров в значительной степени перекрываются и охватывают всю перивентрикулярную зону в субпаллиуме и медиальном паллиуме. Тем не менее, дорсальная и латеральная эвертированные зоны паллиума экспрессируют *Pax6b* и *ash1a*, но не экспрессируют *emx3*, *dlx2*, *olig2* и *neurog1*. Эти данные указывают на то, что клетки-предшественники, расположенные вдоль перивентрикулярной зоны субпаллиума и медиального паллиума, у взрослых рыб экспрессируют сочетание факторов транскрипции, отличное от эмбриональных нейрональных клеток. Таким образом, комбинация факторов, экспрессируемых клетками-предшественниками у *D. rerio* в зрелом конечном мозге, не эквивалентна таковой при эмбриогенезе, и, вероятно, пространственно-временной паттерн данных факторов во взрослом мозге создается *de novo*.

## 1.6. Особенности виментина и глиального фибриллярного кислого белка в мозге рыб

Исследования, проведенные на костистых рыбах, выявили наличие белка промежуточных филаментов – виментина (Vim) и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в глиальных клетках спинного мозга и других областях мозга (Arochena et al., 2004). В исследованиях на кефали *Chelon Labrosus* были изучены особенности маркирования Vim и GFAP в мозге личинок, молоди и взрослых особей. Был показан различный уровень экспрессии этих белков в течение жизни. Так, согласно некоторым данным (Arochena et al., 2004), уровень виментина с возрастом уменьшается, в то время как экспрессия GFAP увеличивается. На более ранних этапах развития рыб маркирование обычно выражено в соме клеток, ножках астроцитов и таницитах, тогда как экспрессия в клетках радиальной глии определялась позже. У крупных личинок подобные паттерны экспрессии виментина и GFAP позволяли предполагать, что некоторые из клеток глии содержат оба белка. Иммунопозитивные, в отношении обоих белков, субвентрикулярные клетки наблюдались, в основном, в зрительном тектуме (Arochena et al., 2004). Также иммунопозитивные клетки с морфологией астроцитов были обнаружены в хиазме у взрослых особей кефали. Периваскулярные отростки глиальных клеток имели различную степень маркирования Vim и GFAP на разных стадиях развития. Некоторые циркумвентрикулярные органы (сосудистый орган гипоталамуса, сосудистый мешок и задняя бухта гипоталамуса) были окружены узкоспециализированными виментин- и /или GFAP-экспрессирующими глиальными клетками. Глиальные клетки срединной перегородки в некоторых областях мозга, также были Vim- и /или GFAP-положительными. Во взрослом мозге кефали, танициты сохраняют экспрессии виментина в нескольких областях мозга. Как и у других позвоночных, регионы с виментин-иммунопозитивными клетками, возможно, соответствуют участкам с высокой пластичностью и регенеративным потенциалом во взрослом мозге.



В центральной нервной системе выделяют следующие типы глиальных клеток: астроглия, олигодендроглия и микроглия. В ЦНС взрослых млекопитающих астроглия включает протоплазматические и фиброзные астроциты, расположенные в сером и белом веществе, соответственно; радиальные глиальные клетки; и эпендимные клетки (Privat et al., 1995). Исследования ультраструктуры этих клеток выявили наличие в них промежуточных филаментов (Hendon, 1964). Биохимический анализ и иммуноцитохимические исследования показали наличие GFAP в промежуточных филаментах астроцитов (Dahl et al., 1985). Недавно было доказано сходство между GFAP костистых рыб и млекопитающих (Nielsen, Jorgensen, 2003). Другой белок промежуточных филаментов – виментин – был также обнаружен в клетках астроглии (Dahl et al., 1981). В большом количестве он экспрессируется в незрелых астроцитах. Секвенирование виментина костистых рыб и анализ аминокислотной последовательности показали его высокую степень гомологии с белком человека (Cerda et al., 1998). Антитела против этих двух белков, в настоящее время используются в качестве маркеров астроглии.

Клетки радиальной глии, отростки которых тянутся от субвентрикулярной области к мягкой мозговой оболочке, в избытке присутствуют во время развития мозга у млекопитающих. Эти клетки считаются промежуточным этапом в созревании астроцитов. Радиальные глиальные клетки образуют каркас для миграции нейронов (Levitt, Rakic, 1980). У большинства видов эти клетки экспрессируют GFAP (Marcus, Easter, 1995). Новые данные показывают, что клетки радиальной глии играют достаточно разнообразную роль. Есть доказательства, что они являются клетками-предшественниками нейронов и глии (Malatesta et al., 2000; Gotz et al., 2002).

Астроциты были обнаружены у большинства позвоночных. У костистых рыб, однако, астроглия представлена в основном эпендимными таницитами и радиальной глией (Lara et al., 1995; Manso et al., 1997). Астроциты были описаны в головном мозге костистых рыб (Lara et al., 1995; Kalman, 1998), а ретикулярные

астроциты с характеристиками эпителиальных клеток распространены в зрительном нерве (Maggs, Scholes, 1990).

Большинство эпендимных клеток взрослых костистых рыб являются таницитами (Horstmann, 1954), то есть они обладают длинными базальными отростками, оканчивающимися на внешней поверхности мозга (Diaz-Regueira et al., 1993). Иммуноцитохимические исследования эпендимных клеток и радиальной глии костистых рыб доказали присутствие в них GFAP (Kawai et al., 2001; Kalman, Ari, 2002) и виментина (De Guevara et al., 1994; Cerda et al., 1998). С помощью НАДФН-диафоразы (Ma, 1993) было описано распределение таницитов во взрослом мозге рыбы-луны (*Lepomis* sp.). Эти глиальные популяции также были изучены с помощью S100 и кальбиндина у форели (Manso et al., 1997). На эмбрионах *D. rerio* изучали раннее развитие GFAP-иммунопозитивных клеток (Marcus, Easter, 1995). Но на сегодняшний день не существует исследований об изменениях паттерна GFAP- и Vim-иммунопозитивных клеток в мозге костистых рыб.

### **1.7. Семейство генов Рах, их участие в развитии нервной системы и потенциальная роль в нейрорегенерации**

Главная особенность органогенеза – пространственно-временная организация миграции клеток, что является необходимым условием для формирования клеток различных типов. Гены Рах кодируют семейство транскрипционных факторов, которые уже давно признаны обязательными участниками эмбрионального развития ЦНС, с доказательствами, полученными на различных моделях животных, иллюстрирующих филогенетически консервативные функции. Внутри ЦНС гены Рах играют существенную роль в клеточной и региональной спецификации, пролиферации, поддержании клеток-предшественников, антиапоптозе и нейрональной дифференциации.

Семейство генов Рах демонстрирует динамические пространственно-временные модели экспрессии и вместе с другими факторами участвует в

координации регионального развития ЦНС, определения нейральных подтипов и контроля их миграции и дифференциации (Thompson et al., 2008). На протяжении всей жизни в мозге сохраняется множество различных клеток-предшественников, экспрессирующих гены семейства *Rax*, до тех пор, пока экологические стимулы не запустят процессы пролиферации или дифференцировки (Yang et al., 2008). Поэтому семейство *Rax* имеет важное значение для организации и миграции клеток на протяжении всех этапов развития и созревания ЦНС.

Гены семейства *Rax* экспрессируются на самых ранних стадиях развития нервной системы: гаструляции и образовании нервной пластинки (Redies, Puelles, 2001). *Rax* гены являются ключевыми регуляторами процессов регионализации мозга, контролируя синтез сигнальных молекул и, таким образом, способствуют формированию специфического фенотипа клеток (Fedtsova et al., 2008). Дифференциальная экспрессия генов *Rax* зависит от пространственной локализации экспрессирующих клеток в сигнальных центрах; уровни экспрессии *Rax* очевидно детерминируют возникновение различных клеточных фенотипов, данный механизм, в частности, используется во время эмбрионального развития ЦНС.

*Rax3* и *Rax7* экспрессируются на дорсальных краях ранней нервной пластинки, предшествующей закрытию нервной трубки, где они направляют клетки вдоль всей нервной трубки. Клетки дорсальной части нервной трубки образуют сенсорные нейроны и интернейроны, а также клетки нервного гребня (Otto et al., 2006). Экспрессия *Rax6* происходит по всей средней вентральной области развивающейся нервной трубки, генерируя двигательные нейроны и интернейроны (Goulding et al., 1993). Экспрессия *Rax2* в нервной трубке происходит на промежуточной дорсовентральной границе ромбэнцефалона и спинного мозга (Nornes et al., 1990), производя интернейроны заднего и спинного мозга (Ponti et al., 2008).

### 1.7.1. Паттерн экспрессии генов *Rax* во время регионализации ЦНС

Исследования экспрессии различных генов *Rax* продемонстрировали высокоспецифичный передний-задний паттерн во время регионализации развивающейся ЦНС (Matsunaga et al., 2000). Изначально дифференциальная экспрессия *Rax6* и *Rax2* подразделяет нервную трубку на три первичных домена (проэнцефалон, мезэнцефалон и ромбоэнцефалон) (Matsunaga et al., 2000). После этого связь между генами *Rax* или между *Rax* и другими генами участвует в определении полярности, формирования границ и спецификации клеток-предшественников из желудочковых зон в этих областях, с образованием ядер и связанных структур. Способность генов *Rax* взаимно подавлять экспрессию генов альтернативной группы *Rax* приводит к зонам исключительности для каждого гена *Rax* или группы генов *Rax*. *Rax*-белки могут также взаимодействовать с другими факторами транскрипции (например, противоположные градиенты *Rax6* и *Emx2* или *Rax6* и *Dlx2* в коре головного мозга, а *Rax6* и *Olig2* в обонятельной луковице / *Rax6* с *cVax* и *Tbx5* в сетчатке) для достижения спецификации клеточных подтипов и образования границ (Brill et al., 2008).

Комплексная активность *Rax* четко координируется для достижения дифференцированных механизмов регулирования в разное время и в разных местах. Например, кооперативная и избыточная активность *Rax6* и *Rax2* указывает на пигментный эпителий сетчатки на ранних стадиях развития (Baumer et al., 2003), в то время как они взаимно репрессивны на более поздних этапах (Baumer et al., 2002). Соответственно, взаимная координированная репрессия между *Rax6* и *Rax2/5/8* регулирует развитие интернейронов спинного мозга (Pillai et al., 2007). Таким образом, синхронная и высококоординированная экспрессия *Rax* имеет решающее значение для определения ранних процессов формирования паттернов при развитии ЦНС. Критическое значение генов *Rax* хорошо проиллюстрировано на моделях мутантных животных, где отсутствие факторов транскрипции *Rax* приводит к нарушениям гистогенетических паттернов и потере клеток и структур. Более того, условные мутантные модели (отсутствие/снижение/сверхэкспрессия)

позволили понять функции Рах на разных стадиях развития. Очевидно, что анализ таких ценных моделей животных обеспечит более глубокое понимание влияния генов Рах на разных стадиях развития (Tuoc et al., 2009).

Рах гены способствуют обширной клеточной миграции. Например, клетки нервного гребня, экспрессирующие Рах3, интенсивно мигрируют вдоль тела, и дефицит Рах3 приводит к изменению миграции или снижению числа клеток в необходимом месте (Nakazaki et al., 2008). Для правильной миграции некоторых клеточных популяций требуется Рах6, дефицит которого у мышей может привести к изменению миграции нейробластов в развивающейся коре головного мозга (Talamillo et al., 2003) и в мозжечке (Horie et al., 2003). Однако сокращение числа клеток в определённой области не всегда вызвано сбоями в клеточной миграции, но также может быть следствием недостаточного расширения прогениторного пула. Экспрессия Рах генов не только направляет клетки для новых органов и тканей, но также необходима для поддержания их в прогениторном состоянии во время миграции.

### **1.7.2. Участие генов Рах в миграции клеток**

Участие Рах белков в клеточной миграции подтверждается их взаимодействием (прямым или косвенным) с генами, кодирующими молекулы клеточной адгезии (Zhang et al., 2010). Рах парное поле ДНК связывающих участков было открыто в промоторах нескольких нейроно-специфичных молекул клеточной адгезии (N-CAM) и глио-специфичных молекул клеточной адгезии (Ng-CAM и L1). Эксперименты с трансфекцией генов различных клеточных линии показали связь Рах1, Рах3, Рах6 и Рах8 регулируют данные участки (Edelman, Jones, 1998). Также была показана колокализация экспрессии Рах6 и полисиалилированного N-CAM (PSA-NCAM) в клетках зубчатой извилины мозга постнатальной крысы (Maekawa et al., 2005). Рах3 также регулирует с-Met во время миграции мышечных предшественников, и из-за гиперэкспрессии Рах3 наблюдается увеличение

полисиалилированного N-CAM в клеточной линии медуллобластомы (Mayanil et al., 2000).

Отличия автономных и неавтономных клеточных взаимодействий с Рах генами, направленных на регуляцию миграции, достигаются путем трансплантации Рах-дефицитных клеток в организме (при нормальных/ненормальных условиях). Однозначное определение роли Рах в неавтономной клеточной миграции вытекает из исследований, в которых у крыс клетки мозга с дефицитом Рахб, полученные из нервного гребня (которые не экспрессируют Рахб), не мигрируют нужным образом к глазу и в черепно-лицевую область (Kanakubo et al., 2006). Трансплантация полученных мозговых клеток в условиях дефицита Рахб из нервного гребня диких крыс не нормализует миграцию, указывая, что нарушение происходит из-за неправильно заданного пути миграции, а не из-за нехватки мигрирующих клеток (Kanakubo et al., 2006). В поддержку этого вывода свидетельствует тот факт, что поздно родившиеся Рахб – дефицитные клетки-предшественники коры головного мозга, при трансплантации, показывают схожую миграционную способность у клеток этого типа. Было выявлено, что в этом случае Рахб не дает клеточной автономности миграционной способности клеток (Caric et al., 1997).

Рах гены также способствуют миграционным процессам в развивающихся тканях, таким как, направление аксонов (Osumi-Yamashita et al., 1997; Kanakubo et al., 2006). В процессе развития коры головного мозга предшественники из субвентрикулярной зоны мигрируют в свое соответствующее место назначения, используя PSA-NCAM и robo2, как направляющие молекулы. У Рахб-подопытных мышей были выявлены качественные изменения PSA-NCAM-путей в промежуточной зоне, выраженные нарушением (задержкой и подавлением) экспрессии robo2 и с последующим миграционным дефицитом (Jimenez et al., 2002). Более того, Рахб-экспрессирующие клетки продолговатого мозга эмбриона крысы связаны с молекулами клеточной адгезии TAG1 и мигрируют по аксонам, которые экспрессируют TAG1. В этой области у Рахб-дефицитных крыс,

экспрессия TAG1 приостанавливается и субпопуляции этих клеток мигрируют неправильно (Horie et al., 2003).

Несмотря на то, что Pax2-регуляция молекул клеточной адгезии N-CAM и N-кадгерина более связана с морфогенезом, чем с миграцией, исследования развития глаза цыпленка наглядно демонстрируют, что в результате нокдауна Pax2 наблюдается отсутствие молекул N-CAM и N-кадгерина, а результатом гиперэкспрессии Pax2 является регуляция этих молекул (Christophorou et al., 2010).

Этот анализ Pax-обеспечения миграционной способности указывает на большое влияние Pax-генов на направление клеточной миграции, как в эмбриональной, так и в постнатальной среде. Это свойство может быть использовано при миграции клеток к нужному месту назначения или к её блокировке у ранее трансплантированных клеток.

После завершения процессов первичной регионализации ЦНС, зоны, экспрессирующие Pax в мозге, становятся более ограниченными. Основной вклад генов Pax — это поддержание сложного баланса между пролиферацией клеток и поддержанием пролиферативного пула, и дифференциацией клеток-предшественников.

Например, Pax6 контролирует расширение пролиферативного пула в развивающихся областях, таких как глазной пузырек (Duparc et al., 2007), кора головного мозга (Tuoc et al., 2009) и гиппокамп (Nacher et al., 2005). Pax6 также способствует пролиферации стволовых клеток сетчатки, поддерживает пролиферативный пул на протяжении нескольких стадий ретиногенеза (*Xenopus*) (Zaghloul, Moody, 2007). Снижение уровня Pax6 приводит к снижению пролиферации и/или преждевременной дифференцировке нейрогенных предшественников при формировании глаз (Duparc et al., 2007), коры головного мозга (Tuoc et al., 2009), спинного мозга (Bel-Vialar et al., 2007) и гиппокампа (Maekawa et al., 2005). Эти результаты показывают, что уровни Pax6 опосредуют критическую пространственно-временную синхронизацию пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников для получения точных областей ЦНС.

Аналогичным образом, во взрослом нейрогенезе измененные уровни Рахб в гиппокампе крысы приводят к преждевременному прогрессированию ранних клеток-предшественников (Maekawa et al., 2005) или ранней дифференцировке в нейроны. Эта функция также существует в развивающемся спинном мозге, где переменные уровни Рахб отвечают за различные функциональные особенности. Первоначально Рахб способствует пролиферации, однако увеличение Рахб в клетках желудочковой зоны вызывает выход клеток из клеточного цикла и прекращение пролиферации. И наоборот, низкие уровни Рахб благоприятствуют поддержанию состояния предшественника. В развивающемся спинном мозге мышей потеря Рахб приводит к преждевременной дифференциации нейронных клеток-предшественников (Bel-Vialar et al., 2007) и аналогичным образом вызывает преждевременный олигодендрогенез и астрогенез (Sugimori et al., 2007). В этих условиях нейроны и глия могут образовываться не в том месте и не в то время (Philips et al., 2005; Sugimori et al., 2007), или может произойти потеря клеток из-за нарушения сложного баланса между пролиферацией и дифференцировкой (Kohwi et al., 2005), либо взаимосвязи между дифференцирующей клеткой и ее средой. Примером последнего является тот факт, что преждевременные нейроны, образовавшиеся в рудиментарной оптической везикуле у мышей Рахб-дефицитных мышей, не сохраняются (Philips et al., 2005), что указывает на ключевую взаимосвязь между клеткой, микроокружением и правильным временем дифференцировки.

### **1.7.3. Влияние генов Рах на дифференцировку клеток**

Способность влиять на дифференцировку клеток – также отличительная функция Рах белков. Рах3, например, на ранних стадиях поддерживает недифференцированный фенотип клеток нервного гребня, но на более поздних стадиях напрямую связывается с цис-регуляторными элементами в промоторе *Ngn2* и, таким образом, может инициировать дифференцировку нейрональной линии в нервной трубке (Nakazaki et al., 2008). Кроме того, экспрессия Рах3 в



дорсальном мезэнцефалоне поддерживается клетками-предшественниками и исчезает после дифференциации клеток (Thompson et al., 2008). В культуре клеток нейробластомы мыши снижение уровня Pax3 приводит к дифференцировке клеток в зрелые нейроны (Reeves et al., 1999). У мышей с дефицитом Pax3 клетки-предшественники, мигрирующие из нервного гребня, имеют ограниченный потенциал, что приводит к дефектам развития (Conway et al., 2000).

Дальнейшее усложнение процесса развития обеспечивается согласованной экспрессией множества Pax генов, которые могут требоваться для правильного развития и окончательной детерминации клеток. Например, совместная экспрессия Pax6 и Pax2 во время формирования границ ЦНС. Другой классический пример - согласованная экспрессия при развитии глаза. На ранней стадии развития глазного пузыря согласованная и избыточная активность Pax6 и Pax2 определяет пигментный эпителий сетчатки (Baumer et al., 2003). Дивергентный характер экспрессии на немного более поздних стадиях определяет границы между сетчаткой (Pax6-позитивная) и глазным нервом (Pax2-позитивный) (Baumer et al., 2002). Экспериментальное подавление Pax2 в глазном нерве эмбриона мыши объясняет причины регуляции эктопической Pax6 экспрессии и эктопической нейрональной дифференцировки (Soukkaieh et al., 2007). С развитием спинного мозга Pax2 обеспечивает Lhx1/Lhx5 и Pax5/8 экспрессию интернейронов дорсального рога для правильной нейрональной спецификации (Pillai et al., 2007). В вентральном спинном роге экспрессия Pax2 запускается, когда клетки становятся постмитотическими и позже мигрируют в мантийную зону. Но прежде этого (до появления постмитотических нейронов) Pax6 требуется для начальной спецификации нейрональных клеток-предшественников и, таким образом, регулирует экспрессию Pax2 и других нейрональных генов. Поэтому согласованная экспрессия Pax6 и Pax2 нужна для правильной спецификации идентичных вентральных интернейронов (Burrill et al., 1997).

Взяты вместе, Pax гены, обеспечивая нейтральные клеточные фенотипы, участвуют в определении времени выхода из клеточного цикла и, таким образом, регулируют дифференцировку соответствующих клеточных типов, основываясь на

подходящих пространственно-временных условиях. В некоторых случаях Рах гены сотрудничают между членами Рах семейства и/или другими кофакторами. Главная задача в расшифровке функций Рах и их восстанавливающих свойств – это определение механизмов, лежащих в основе изменений Рах функций от пролиферации к обеспечению дифференцировки. Таким образом, Рах гены - критический фактор, влияющий на все этапы развития: от начала прогениторного расширения до обеспечения и поддержки правильной нейрональной дифференцировки. Сообща, эти результаты также выявляют важное свойство Рах генов: их способность действовать как мощный пространственно-временной программирующий переключатель, который чувствителен к окружающим условиям. Это вынуждает рассматривать их в качестве важного фактора, обеспечивающего перестройку в ЦНС. Успехи в данных исследованиях существенно помогут в расшифровке генетических/эпигенетических факторов окружающей среды, вовлеченных в подавление функций Рах на различных временных и пространственных уровнях развития.

В исследованиях была продемонстрирована способность новорожденных Рах6-экспрессирующих нейрональных клеток-предшественников выживать в долгосрочной перспективе как в субгранулярной зоне гиппокампальной зубчатой извилины, так и в СВЗ (Tonchev, Yamashima, 2006). Аналогично, клетки, экспрессирующие Рах, выдерживают повреждение в различных тканях: Рах6- и Рах7-экспрессирующие клетки остаются в поврежденном спинном мозге взрослых крыс (Yamamoto et al., 2001), экспрессия Рах6 повышается в постнатальном обонятельном эпителии (Guo et al., 2010) и возобновляется в клетках сетчатки, включая клетки мюллеровской глии (Karl et al., 2008). Взятые вместе, эти результаты указывают на способность Рах-экспрессирующих клеток выживать и влиять на микроокружение в мозге после травмы.

Таким образом, Рах гены участвуют почти во всех аспектах развития ЦНС: от ранних до зрелых стадий. В то время как их функция во взрослых дифференцированных клетках до сих пор остается загадкой, есть многочисленные

свидетельства важной роли Рах генов в управлении и обеспечении согласованности многих аспектов созревания нейронов.

### 1.8. Функции глутаминсинтетазы в ЦНС

ГС является многофункциональным ферментом, который участвует в аминокислотном балансе, биосинтезе нуклеотидов, метаболизме нейротрансмиттеров, а также детоксикации аммиака (Walsh, Mommsen, 2001). Глутамин-синтетазный ген (*glul*) считается одним из старейших известных функциональных генов (Kumada et al., 1993), и его экспрессия отмечается у всех исследованных видов, во всех тканях. Активность ГС в головном мозге позвоночных животных, включая рыб, как правило, высока (Wright et al., 2007; Sanderson et al., 2010), поскольку этот фермент играет главную роль в метаболической регуляции нейротрансмиттера глутамата (Suarez et al., 2002), а также детоксикации аммиака (Wang, Walsh, 2000).

Мозг особенно восприимчив к токсичности аммиака по двум причинам: цикл мочевины не реализуется в мозге; аммиак может легко проникать через гематоэнцефалический барьер. В связи с этим ГС, главным образом, экспрессируется в астроцитах (*in vivo* и *in vitro*) (Hernández et al., 1999), которые выступают в качестве основного инструмента для удаления аммиака (Brusilow et al., 2010). Роль астроцитов в детоксикации аммиака еще больше подчеркивается их анатомической близостью с гематоэнцефалическим барьером (Brusilow et al., 2010).

Долгое время ГС считалась маркером астроглиальных клеток, но сейчас показано, что экспрессия ГС не ограничивается только астроцитами. ГС также присутствует в Мюллеровской глии сетчатки (Prada et al., 1998), в клетках радиальной глии и эпендимоглиальных клетках, которые выстилают желудочки у нижних позвоночных (Hernández et al., 1999). Кроме того, ГС можно обнаружить в олигодендроцитах *in vivo* и *in vitro* (Miyake, Kitamura, 1992). У рыб ГС-иммунопозитивные клетки расположены в эпендимальном слое (Bodega et al., 1993). Экспрессия ГС отмечена не во всех зонах клетки, что показывает

региональную специализированность радиальной глиии рыб. В исследованиях на форели было показано, что церебральная активность ГС у млекопитающих на порядок ниже, чем у рыб (Kosenko et al., 1997).

Принято считать, что активность ГС регулируется в процессе развития (Mearow et al., 1989). У крыс уровень экспрессии ГС увеличивается в процессе развития (Fages et al., 1988), что связано с дифференцировкой астроцитов (Caldani et al., 1982); а также наблюдаются заметные различия в паттерне ГС-активности в разных областях мозга (Patel et al., 1983). Экспрессия ГС и её активность также регулируется медиаторами и гормонами (инсулин, гормон щитовидной железы, кортикостероидные гормоны) (Suarez et al., 2002).

Помимо этого, одной из важнейших ролей астроцитов является защита нейронов от токсичности глутамата. ГС представляет собой фермент, имеющий решающее нейрхимическое значение, поскольку он превращает токсический L-глутамат в нейтральный L-глутамин. L-глутамат включается в везикулы в синаптической щели и высвобождается при стимуляции. После того как его функция завершена, глутамат поглощается астроцитами, в которых он превращается в L-глутамин и рециркулирует обратно в везикулы нейрона, где его можно повторно преобразовать обратно в глутамат (Schousboe et al., 2014). В этом цикле глутамат не метаболизируется, а только рециркулирует, для избежания токсического воздействия, наблюдаемого во многих заболеваниях (Mattson, Magnus, 2006), связанных с гиперстимуляцией нейронов из-за с чрезмерного накопления аминокислоты. ГС в мозге также играет главную роль в цикле глутамин-глутамат-ГАМК, поддерживая баланс возбуждающей и тормозной синаптической передачи через синтез, клеточное высвобождение и внеклеточное поглощение глутамата и ГАМК (Bak et al., 2006).

Поскольку активность ГС влияет не только на способность мозга удалять аммиак, но также и на цикл глутамата, вариации ГС-иммунореактивности отражают изменения функции астроцитов и могут влиять на функции нейронов. Глиальные клетки, экспрессирующие ГС, также могут оказывать влияние при патологических состояниях головного мозга. Были описаны изменения уровня ГС

в зависимости от типа травмы. Например, активность ГС снижается в коре головного мозга, пораженной болезнью Альцгеймера (Robinson, 2000), в процессе старения (Smith et al., 1991) и при недостатке глюкозы (Rosier et al., 1996). Однако экспрессия ГС возрастает при ишемии и гипоксии (Petito et al., 1992).

Роль ГС в головном мозге была подчеркнута в исследовании нейродегенеративных нарушений (Butterfield, Kanski, 2001). Из-за своей особой чувствительности к окислителям (Butterfield et al., 1997) активность ГС была признана индикатором вредного воздействия активных форм кислорода, что приводит к повреждению головного мозга. У млекопитающих микроглия аналогично астроцитам экспрессирует систему удаления глутамата, также известную как переносчик клеточного глутамата 1 (GLT-1) и ГС, как в физиологически нормальных, так и в патологических состояниях (Chrétien et al., 2004). Наличие этой системы ставит микроглию в один ряд с астроцитами в защите нейронов от токсического глутамата. Кроме того, поглощение глутамата из внеклеточных пространств может способствовать продуцированию глутатиона путем коэкспрессии GLT-1 (Palmieri, et al., 2016). В микроглиальных клетках превращение глутамата в глутамин может модулировать клеточный ответ на воспалительный стимул (Palmieri, et al., 2016). Микроглиоциты могут метаболически контролировать свой собственный ответ на провоспалительный стимул, превращая глутамат в глутамин (Palmieri, et al., 2016). Действительно, когда ГС фармакологически (*in vitro*) или генетически (*in vivo*) блокируется, микроглиальные клетки увеличивают продукцию и высвобождение воспалительных медиаторов и эффекторов, что, в конечном итоге, приводит к большему нейронному окислительному стрессу и травмам (Castegna, Menga, 2018).

Эти данные подтверждают, что чувствительность ГС к окислительно-восстановительному балансу может представлять собой стратегию, с помощью которой модулируются различные механизмы, связанные с воспалительным ответом (Palmieri, et al., 2016). Кроме того, это доказывает, что полезная роль ГС в головном мозге не ограничивается ее способностью удалять аммиак и глутамат, но

также способствует поддержанию микроглии в иммуносупрессивном состоянии (Castegna, Menga, 2018).

Принимая во внимание важную роль ГС в ЦНС при повреждении, особенно большое внимание привлекает повышение её уровня в мозжечке рыбы после механического повреждения (Pushchina et al., 2017). Вероятно, это связано со степенью гибели нервных клеток у разных таксонов. Экспериментально доказано, что повышение уровня ГС в глиальных клетках сетчатки млекопитающих, путем эндогенной индукции гена или экзогенного питания очищенного фермента, может защитить клетки от нейронной дегенерации (Gorovits et al., 1997).

### **1.9. Цистатионин-β-синтаза и сероводород в ЦНС**

В настоящее время появляется все больше свидетельств того, что пути передачи сигналов в процессе регуляции гомеостаза у позвоночных многочисленны и разнообразны. Существенную роль в данном аспекте играет сероводород ( $H_2S$ ), его относительно высокие концентрации были обнаружены в мозге, что позволило предположить физиологическую роль этого газа (Savage, Gould, 1990). В дальнейшем были обнаружены важнейшие биологические эффекты  $H_2S$ , включая: регуляцию кровяного давления, освобождения инсулина, вазорелаксатные свойства, модуляцию нейронной активности, цитопротекторное действие (Abe, Kimura, 1996; Wang, 2014). Все эти факты позволили отнести его к группе газотрансмиттеров, включающих также оксид азота (II) (NO) и монооксид углерода (CO) (Sitdikova, Zefirov, 2012; Wang, 2014).

CBS является главным источником  $H_2S$  в ЦНС. Субстратом синтеза эндогенного  $H_2S$  является серосодержащая аминокислота L-цистеин, извлекаемая из пищи или синтезируемая из L-метионина путем так называемой транссульфурации с образованием гомоцистеина в качестве промежуточного продукта. Основным механизмом образования  $H_2S$  с участием CBS связан с конденсацией гомоцистеина и цистеина, что приводит к образованию цистатионина; при этой реакции высвобождается  $H_2S$ .

Показано, что гомогенаты мозга *in vitro* способны продуцировать H<sub>2</sub>S (Abe, Kimura, 1996). В гиппокампе крыс и мозжечке рыб был обнаружен высокий уровень экспрессии CBS. Высокий уровень экспрессии в период эмбрионального и раннего постнатального развития, вероятно, необходим для созревания и роста нейрональных сетей (Robert, Vialard, 2003).

Показано, что H<sub>2</sub>S способен регулировать активность ГАМК-рецепторов, расположенных пре- и постсинаптически (Han et al., 2005). Стимуляция постсинаптических рецепторов ГАМК индуцирует долговременную депрессию постсинаптической передачи. Это связано с повышением уровня K<sup>+</sup> и является существенным фактором в тонкой настройке тормозной нейротрансмиссии. В нейронах дорсального ядра шва и в гиппокампе H<sub>2</sub>S участвует в индукции гиперполяризации, увеличивая приток K<sup>+</sup> через АТФ-зависимые калиевые каналы. H<sub>2</sub>S также участвует в регуляции кровяного давления посредством влияния на КАТР-каналы в нейронах гипоталамуса (Dawe et al., 2008).

Кроме участия в процессах нейромодуляции, H<sub>2</sub>S вовлечен в защиту нейронов от окислительного стресса. Известно, что восстановленный глутатион выполняет роль одного из основных антиоксидантных протекторов мозга. Эта протективная функция реализуется путем интенсивного захвата свободных радикалов и других реактивных групп, удаления пероксида водорода и липидных пероксидов; данные процессы предотвращают окисление других биомолекул (Wu et al., 2004).

H<sub>2</sub>S играет важную нейромодуляторную роль в глиальных клетках. Астроциты необходимы для поддержания нормальных физиологических свойств нейронов, поскольку эти глиальные элементы способны регулировать кислотно-щелочной гомеостаз и поглощать различные нейротрансмиттеры, включая L-глутамат (Koehler et al., 2006). В отличие от нейронов, передающих сигналы в основном путем генерации потенциалов действия, астроциты и другие глиальные клетки «общаются» друг с другом посредством кальциевой сигнализации. На данном феномене в значительной мере базируется модуляция состояний нейронов

и сосудов (Koehler et al., 2006). Показано, что экзогенный  $H_2S$  вызывает кальциевые волны в первичной культуре астроцитов и переживающих срезах гиппокампа.

Кроме того, высокое содержание  $H_2S$  и активность CBS играют важную роль в регуляции соотношения метионина и гомоцистеина в ЦНС, так как избыток гомоцистеина приводит к нарушениям развития нервной трубки (Rosenquist, Finnell, 2001). Повышенный уровень  $H_2S$  также необходим для «выживания» нейронов гиппокампа во взрослом мозге мыши (Bruintjes et al., 2014). У мышей с генетическим дефицитом CBS наблюдалось уменьшение размеров мозжечка, в частности, толщины молекулярного и внутреннего гранулярного слоев коры (Enokido et al., 2005). Исследования распределения CBS в мозге мыши в эмбриональном периоде показали, что высокий уровень CBS наблюдается в области зачатка конечностей, хвоста, мозгового пузыря, в развивающихся органах, таких, как печень, скелетная и нервная системы.

Сравнительный анализ показал, что в ЦНС максимальная экспрессия наблюдается в вентрикулярных областях с пролиферирующими клетками, в стриатуме, в 4 желудочке, в продолговатом мозге, а также слабый сигнал детектировался в среднем мозге, неокортексе и спинном мозге. Иммуногистохимически показано, что CBS локализуется не только в теле нейрона, но и в дендритах, аксонах и синаптических окончаниях (Bruintjes et al., 2014). Было установлено, что у симы *Oncorhynchus masou* CBS маркирует нейроны ретикулярной формации, сосуды, нейроны вентрального спинального столба и лиановидные волокна в мозжечке (Вараксин, Пущина, 2011).

Микроглиальные клетки, как известно, могут быть активированы многими внешними воздействиями (Farber, Kettenmann, 2005). Предполагается, что изменения состояния микроглии являются существенными патогенетическими факторами развития болезней Альцгеймера (Wojtera et al., 2005) и Паркинсона (Kim, Joh, 2006). Экзогенный  $H_2S$  обратимо увеличивает содержание внутриклеточного кальция в микроглиальных клетках за счет высвобождения его из внутриклеточных депо и поступления в клетку через плазматическую мембрану (Lee et al., 2006). Поскольку  $H_2S$ , как и другие газотрансмиттеры, способен к



быстрой диффузии, предполагается, что он может играть важную роль в активации обширных популяций микроглиоцитов, повышая в соседствующих клетках внутриклеточный уровень кальция.

В перивентрикулярной области продолговатого мозга, вентральной и латеральной зонах мозжечка карпа были выявлены CBS-иммунореактивные клетки. Размеры таких клеток, их местоположение в мозге и взаимоотношение с  $H_2S$ -продуцирующими нейронами указывают на то, что в перивентрикулярной зоне мозга присутствует  $H_2S$ -продуцирующая глия (Pushchina et al., 2011). Поскольку в настоящее время установлено (Platel et al., 2010), что некоторые нейротрансмиттеры, локализованные в клетках-предшественницах перивентрикулярной области мозга, могут выступать в качестве регуляторов процесса гомеостатического нейрогенеза, предположение о том, что  $H_2S$ , подобно  $NO$ , может также выступать в качестве регулятора постнатального нейрогенеза, представляется вполне уместным (Pushchina et al., 2011).

Результаты исследований показали, что нейроны вскоре после их образования из клеток-предшественниц и задолго до формирования межнейронных связей и начала синаптогенеза начинают секретировать характерные сигнальные молекулы (Ugrumov, 2010). В качестве таких молекул могут выступать нейропептиды, ферменты синтеза «классических» нейромедиаторов и  $NO$ , трансмембранные и везикулярные транспортеры. Большая часть сигнальных молекул участвуют в аутокринной и паракринной регуляции дифференцировки нейронов-мишеней, выступая в качестве морфогенетических или транскрипционных факторов (Ugrumov, 2010). Показано, что  $NO$  играет роль сигнального агента, регулирующего процессы направленного роста аксонов и дендритов, а также миграцию дифференцирующихся нейронов (Bicker, 2005). У млекопитающих время действия сигнальных молекул ограничивается определенными периодами онтогенеза, во время которых реализуется долгосрочное морфогенетическое влияние на дифференцировку нейронов-мишеней и экспрессию специфического фенотипа (Ugrumov, 2009). У рыб же процессы постнатального нейро- и глиогенеза в перивентрикулярной области идут

и во взрослом состоянии (Пущина и др., 2007). Результаты проведенных ранее исследований показали наличие NADPH-позитивных и NOS-иммунореактивных клеток в перивентрикулярных областях мозга тихоокеанского лосося (*Oncorhynchus masou*). У карпообразных в перивентрикулярной области активность NADPH-NOS не выявляется; по-видимому, в данной области мозга карпа в качестве сигнальной молекулы может выступать  $H_2S$  (Pushchina et al., 2008).

Показано, что выделение тиосульфата с мочой у пациентов с синдромом Дауна повышено. Поскольку тиосульфат является конечным продуктом метаболизма  $H_2S$ , предполагается, что у пациентов с синдромом Дауна увеличена продукция  $H_2S$  (Kamoun et al., 2003). Весьма вероятно, что избыток  $H_2S$  оказывает токсическое влияние на нейроны за счет либо угнетения синтеза цитохромоксидазы, либо усиления активации НМДА-рецепторов; оба данных эффекта входят в число факторов, обуславливающих задержку умственного развития у пациентов с трисомией по 21-й хромосоме (Kamoun, 2001).

Однако  $H_2S$  может проявлять и защитные свойства в отношении нейронов. В частности,  $H_2S$  в определенной степени защищает нейроны от нейротоксического действия глутамата. Повышенная продукция глутамата наблюдается при ишемии мозга, эпилептических припадках или травмах. Нейротоксический эффект избытка этого передатчика обычно проявляется в условиях длительной активации его рецепторов. Однако глутамат может вызывать и окситоз нейронов независимо от влияния на рецепторы данного трансммиттера. Этот механизм повреждения основывается на угнетении транспорта цистеина в нейроны. Внеклеточный глутамат блокирует обмен, что приводит к дефициту внутриклеточного цистеина и подавлению синтеза глутатиона; подобная ситуация делает клетку более чувствительной к окислительному стрессу. NaHS увеличивает внутриклеточную концентрацию восстановленного глутатиона и повышает концентрацию цистеина и  $\gamma$ -глутамилцистеина (предшественника глутатиона) в нейронах коры мозга крысы *in vitro* (Kimura, Kimura, 2004).

Стимуляция афферентных сенсорных нервов может вызывать воспалительные процессы, связанные с выделением субстанции P, нейрокина-А

и пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP). Эти медиаторы, выделяемые в сердечно-сосудистой и дыхательной системах, индуцируют развитие серии воспалительных ответов, которая включает в себя вазодилатацию, бронхоконстрикцию, секрецию слизи и выход белков плазмы, приводящий к отеку. NaHS, подобно капсаицину, интенсифицирует выделение субстанции P и CGRP из сенсорных нервов в воздухоносных путях морской свинки (Trevisani et al., 2005). Интересно, что интраперитонеальная инъекция NaHS здоровым мышам вызывает значительную воспалительную реакцию, сопровождающуюся увеличением концентрации субстанции P, противовоспалительных цитокинов, TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  (Bhatia et al., 2006). Указанные эффекты устранялись специфическими антагонистами рецепторов субстанции P (NK1, CP-96,345). Воспалительный эффект H<sub>2</sub>S снимался капсазерином и не выявлялся у мышей с дефицитом субстанции P и нейрокина-А (Bhatia et al., 2005). Эти данные указывают на то, что H<sub>2</sub>S может самостоятельно индуцировать нейрогенное воспаление даже при отсутствии других повреждающих воздействий.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объекты исследования

В работе было использовано 60 особей молоди симы *Oncorhynchus masou* с длиной тела 11–13.5 см и массой 35–50 г., и 30 особей молоди кеты *Oncorhynchus keta* с длиной тела - 15–22 см и массой тела животных 31–69 г, в возрасте 12–18 месяцев. Животные были получены с Рязановского экспериментального производственного рыбоводного завода в 2018, 2019 и 2020 годах. Животных содержали в аквариуме с аэрируемой пресной водой при температуре 16–17 °С, с одноразовым кормлением в течение суток. Соотношение освещенного и темного периодов в сутках составляло 14/10 ч. Содержание растворенного кислорода в воде составляло 7–10 мг/дм<sup>3</sup>, что соответствует нормальному насыщению. Все экспериментальные манипуляции с животными были проведены в соответствии с правилами, регулируемые уставом ННЦБМ ДВО РАН, и Этической комиссией, регламентирующей гуманное обращение с экспериментальными животными (заключение комиссии № 2-170920 от 11 сентября 2020, и заключение комиссии № 2-101221 от 10 декабря 2021).

### 2.2. Экспериментальное повреждение конечного мозга

Животных анестезировали в кювете с 0,1% раствором трикаин метансульфоната (MS222) (Sigma, St. Louis, MO, США, Cat. #WXBC9102V) в течение 10 мин. при комнатной температуре. Повреждение проводили согласно методике Кишимото с соавторами (Kishimoto et al., 2012). Тонкой стерильной иглой наносили механическое повреждение глубиной 1 мм в область дорсолатерального квадранта правой полусферы конечного мозга. После нанесения повреждения, животных выпускали в аквариум с пресной водой для восстановления и дальнейшего мониторинга.

После повреждающего воздействия в область конечного мозга в течение 1 ч. проводили мониторинг изменений двигательной и поведенческой активности у

рыб в экспериментальной группе. Существенных изменений у животных с травмой конечного мозга, по сравнению с контрольной группой, обнаружено не было. В области травмы отчетливо визуализировалась небольшая гематома размерами 1-2 мм.

### 2.3. Методы исследования

Исследование травматического воздействия было проведено в краткосрочный период: 3 и 7 суток. В данные сроки, согласно данным литературы, наблюдаются наиболее выраженные процессы глио- и нейрогенеза (Zupanc, Sorbulescu, 2013) и процессы нейрональной дифференциации (Zhang et al., 2018).

Через три или семь суток (для разных групп) животные были выведены из эксперимента. Всех подопытных рыб глубоко анестезировали в 0,01% растворе трикаин метансульфоната (MS222) (Sigma, St. Louis, MO, США, Cat. #WXBC9102V) в течение 5 мин. и подвергали эвтаназии методом быстрой декапитации.

Для удаления крови глубоко анестезированных животных перфузировали 4% раствором параформальдегида (PFA, BioChemica, Cambridge, MA, США; Cat. No A3813.1000; lot 31000997), приготовленном на 0,1 М фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.2) (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, США; Catalog No 5564, Batch No.: 5) для фиксации образца мозга.

Перед началом иммуноокрашивания ткани конечного мозга рыб проводили блокирование активности эндогенной пероксидазы и неспецифического окрашивания (фона). Активность эндогенной пероксидазы блокировали инкубацией с 1%-ной перекисью водорода в течение 20 минут при комнатной температуре. Для устранения неспецифического окрашивания срезы мозга инкубировали с неиммунной сывороткой лошади.

Для исследования пролиферативной активности в конечном мозге молодежи использовали иммунопероксидазное маркирование PCNA на замороженных свободно плавающих срезах конечного мозга. Срезы толщиной 50 мкм инкубировали с первичными моноклональными антителами мыши против PCNA

(PC10; Novus Biologicals, США) в разведении 1:300, при температуре 4°C в течении 48 ч. Для диагностики вновь образованных нейронов в пролиферативных зонах конечного мозга и нейронов в дефинитивных зонах дорсальной области (медиальной, дорсальной и латеральной) после повреждающего воздействия использовали моноклональные антитела против нейронального протеина NuCD (clone: AD2.38; Chemicon Billerica, MA, США) в разведении 1:400 при аналогичных условиях. Оценка активности белков была проведена через 3 суток после нанесения травматического повреждения.

В работе были использованы маркеры астроцитарной глии: глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) и виментин (Middeldorp et al., 2010). В качестве маркера нейрональной миграции использовали белок даблкортин, ассоциированный с микротрубочками и экспрессирующийся незрелыми нейронами (Ayanlaja et al., 2017). Были использованы моноклональные мышинные антитела к GFAP (Abcam, Cambridge, Великобритания; GF5 Catalog No. ab10062), виментину (Abcam, Cambridge, Великобритания; 3B4 Catalog No. ab28028) и даблкортину (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, США CO613 Catalog No. sc-271390). Все антитела были специфичны для *D. rerio*. Оценка активности белков была проведена через 7 суток после нанесения травматического повреждения в область конечного мозга.

Для исследования локализации транскрипционного фактора Pax2, цистатионин-β-синтазы (CBS) и глутамин синтетазы (ГС) в конечном мозге молоди кеты использовали первичные антитела кролика против Pax2 (Biolegend, San Diego, CA, США; Catalog No. 901001; 1:300), поликлональные антитела кролика против CBS (GeneTex, Irvine, CA, США; Catalog No. GTX124346; 1:300), моноклональные антителами мыши против ГС (Abcam, Cambridge, Великобритания; Catalog No. ab64613; 1:300). Все антитела были специфичны для *D. rerio*.

После инкубации, промывая 0,1М фосфатно-солевым буфером, замороженные срезы конечного мозга толщиной 50 мкм инкубировали с первичными антителами при температуре 4°C в течение 48 ч.

Для визуализации иммуногистохимического (ИГХ) маркирования использовали стандартный ABC комплекс Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, США) в соответствии с рекомендациями фирмы производителя. Для выявления продуктов реакции использовали субстрат красного цвета (VIP Substrate Kit, Vector Labs, Burlingame, США). Препараты монтировали на предметные стёкла с полилизинным покрытием (BioVitrum, Россия, Санкт-Петербург) и оставляли до полного высыхания. Далее для идентификации иммунонегативных клеток препараты докрашивали 0.1% раствором метилового зелёного (Bioenno, Lifescience, CA, США, Cat # 003027). Степень окрашивания контролировали под микроскопом, промывали дистиллированной водой в течение 10 сек, после чего дифференцировали 1-2 мин в растворе 70% спирта и далее 10 сек в 96% этиловом спирте. Препараты обезвоживали по стандартной методике: использовали две смены ксилола, по 15 минут в каждой и заключали под покровные стекла в среду Bio-optica (Италия).

Для оценки специфичности иммуногистохимической реакции использовали метод негативного контроля. Срезы мозга вместо первичных антител инкубировали с 1%-ым раствором неиммунной сыворотки лошади в течение 1 суток и обрабатывали как срезы с первичными антителами. Во всех контрольных экспериментах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

#### *Экспериментальное маркирование бромдезоксисуредина.*

Для оценки пролиферативной активности клеток с помощью маркирования BrdU в группах одновременно с нанесением механического повреждения конечного мозга животным вводили интраперитонеально инъекцию 10 мг/мл раствора BrdU (Sigma-Aldrich, США) в расчете 20 мкл/г массы тела. Животным из контрольной группы была введена только инъекция 10 мг/мл раствора BrdU (Sigma-Aldrich, США) в расчете 20 мкл/г массы тела. После извлечения мозг целиком заливали в парафин по общепринятой методике (Меркулов, 1969), после чего изготавливали серийные поперечные срезы мозга толщиной 7 мкм, которые монтировали на предметные стекла с полилизинным покрытием. После этого

срезы были депарафинированы по стандартному гистологическому протоколу (Пущина и др., 2019). На последнем этапе промывали в дистиллированной воде 3 мин. Далее срезы были обработаны в соответствии с протоколом по ИГХ маркированию BrdU (Dolbeare, 1995). Для раскручивания двуцепочечной структуры ДНК проводили кислотный гидролиз ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). Срезы мозга инкубировали в 1 М HCl в течение 10 мин. на льду. Далее инкубировали в 1 М HCl в течение 10 мин. при комнатной температуре, затем 20 мин. при температуре 37°C. Сразу после инкубации с кислотами срезы были нейтрализованы в 0.1 М боратном буфере в течение 10 мин. при комнатной температуре и трижды промыты в фосфатном буфере PBS (pH 7.4).

#### **2.4. Микроскопия**

Для визуализации ИГХ реакции в клетках конечного мозга и проведения морфологического анализа был использован моторизированный инвертированный микроскоп, исследовательского класса Axiovert 200M с модулем ApoTome (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии препаратов и анализ материала осуществляли с помощью программы Axio Vision.

#### **2.5. Денситометрический анализ**

Измерение оптической плотности (ОП) продуктов ИГХ маркирования в телах нейронов и иммунопозитивных гранулах, последующий морфометрический анализ параметров клеточных тел (измерение большого и малого диаметров сомы нейронов) проводили с помощью программного обеспечения микроскопа Axiovert 200M. Для этого в нескольких местах на препарате измеряли ОП в иммуномаркированных структурах. Далее с помощью программы Wizard вели стандартную оценку оптической плотности для интенсивно и умеренно маркированных и иммунонегативных клеток. Из среднего значения оптической плотности фона вычитали усреднённое значение оптической плотности для



каждого типа клеток, получая фактическое значение в относительных единицах оптической плотности (ЕОП).

**Таблица 1** – Антитела для иммуногистохимической реакции.

Антитела	Фирма производитель	Каталожный номер	Разведение
PCNA, моноклональные мышинные	Novus Biologicals, США	PCNA Antibody (PC10)	1:300
BrdU, моноклональные мышинные	Novus Biologicals, США	clone SPM166	1:200
HuCD, моноклональные мышинные	Chemicon Billerica, США	clone AD2.38	1:400
GFAP, моноклональные мышинные	Abcam, Великобритания	ab10062	1:300
ДК, моноклональные мышинные	Santa Cruz Biotechnology, США	sc-271390	1:300
Vim, моноклональные мышинные	Abcam, Великобритания	ab8978	1:300
CBS, поликлональные кроличьи	GeneTex, США	GTX124346	1:300
ГС, моноклональные мышинные	Abcam, Великобритания	ab64613	1:300
Pax2, поликлональные кроличьи	Biolegend, США	901001	1:300

## 2.6. Статистический анализ

Количественную оценку клеток проводили на отдельно взятое профильное поле при 10х увеличении объектива и 20х окуляра. Весь анализ данных проводился с использованием слепого теста, чтобы уменьшить погрешность экспериментатора. Подсчитывалось абсолютное количество клеток каждого типа. Все количественные результаты в настоящем исследовании были представлены как  $M \pm SD$ , где  $M$  – среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение среднего ( $SD$ ), и статистически

значимые различия рассматривались при  $P < 0,05$ . Данные были проанализированы с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием статистического пакета (SPSS, Чикаго, Иллинойс). Сравнение между группами интактных животных, и животными после травматического повреждения конечного мозга, проводилось с помощью U-критерия Манна-Уитни, и другое сравнение между 4 группами, остальные данные анализировались с помощью теста Крускала-Уоллиса с последующей коррекцией Бонферрони.

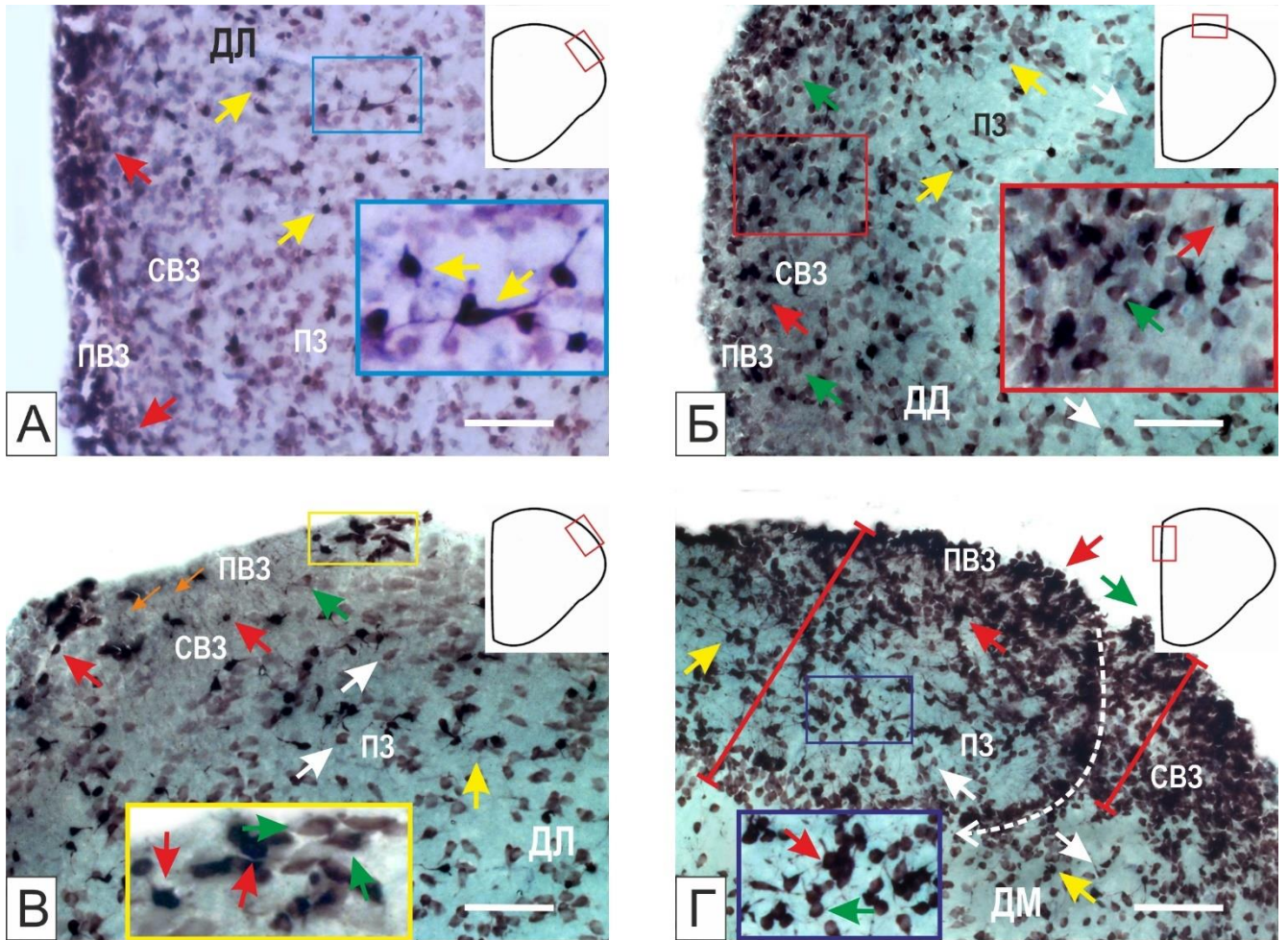
### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1. Распределение нейронального маркера NuCD в паллиальной части теленцефалона симы в норме и после повреждения

В дорсальной области интактного конечного мозга NuCD<sup>+</sup> клетки были идентифицированы как в составе внешних пролиферативных зон конечного мозга, так в глубоких слоях дорсальной (ДД), латеральной (ДЛ) и медиальной (ДМ) зон (рис.1а). Нейроноспецифичный Ca<sup>2+</sup>-связывающий протеин NuCD в паллиуме молоди симы определяется в клетках, находящихся на различной стадии нейрональной дифференцировки; на территории пролиферативных зон NuCD маркирует нейронально детерминированные клетки-предшественники (рис. 1а), в более глубоких слоях – дифференцированные нейроны различной степени зрелости (рис.1а, врезка).

В дорсальной зоне были выделены 4 типа NuCD<sup>+</sup> клеток, различающихся по морфологическим параметрам (большому и малому размерам сом) и ОП иммуномаркирования NuCD (табл. 2). Наиболее мелкие недифференцированные клетки с высоким значением ОП относили к 1-му типу; более крупные овальные клетки 2-го типа характеризовались высоким и средним значением ОП; мультиполярные клетки с высокой ОП представляли 3-ий тип; крупные биполярные нейроны с высокой ОП принадлежали к 4-му типу (рис. 1а; табл. 2).

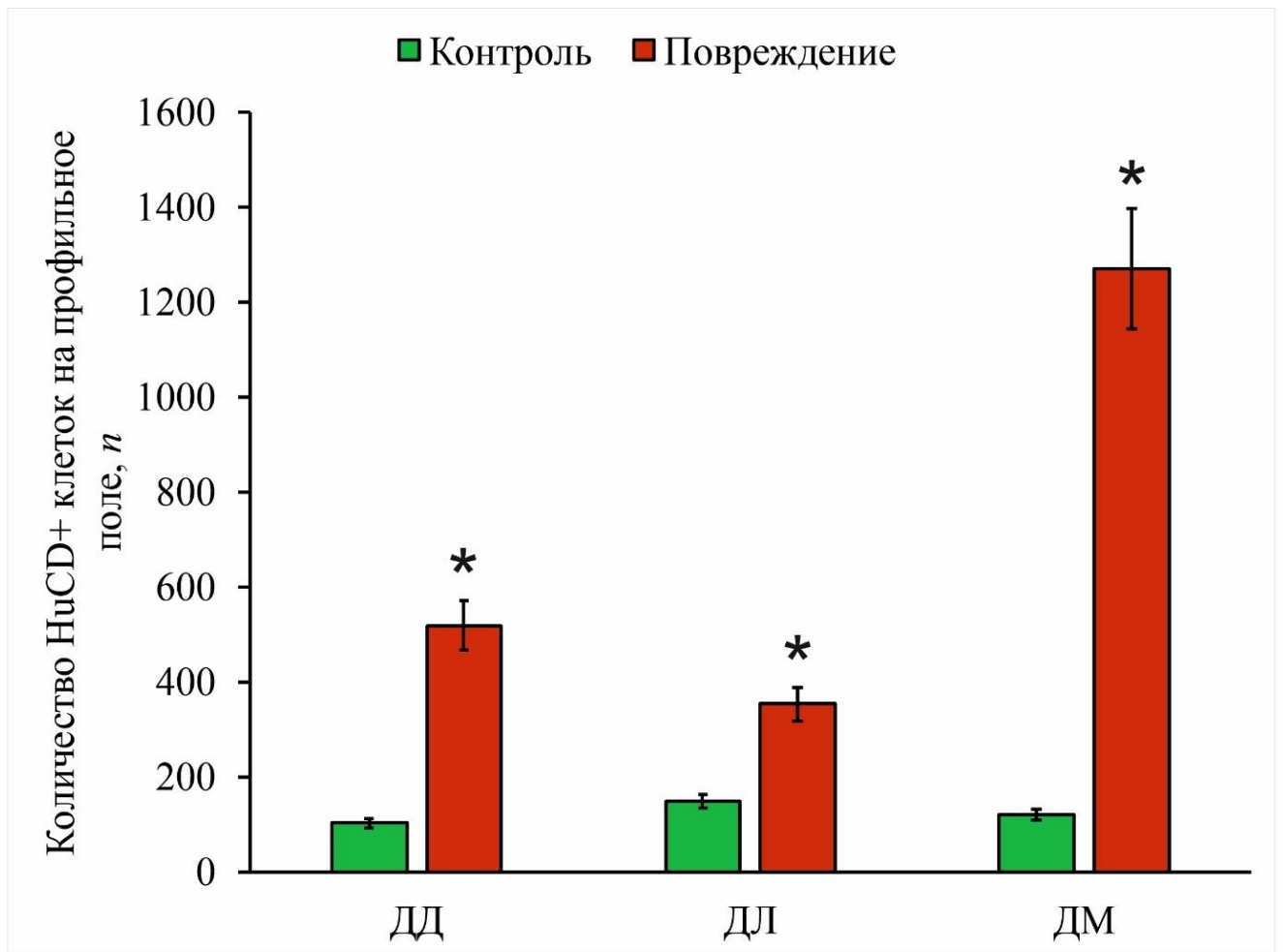
NuCD<sup>+</sup> недифференцированные клетки 1-го типа обнаружены в составе пролиферативной зоны, формировали плотные скопления, расположенные под слоем иммунонегативных клеток (табл. 2; рис. 1а). Маркированные NuCD клетки были окружены иммунонегативными, количество которых преобладало (рис. 1а). Иммунонегативные клетки не имели внешних признаков дифференцировки, содержали крупные ядра, окруженные узким ободком цитоплазмы, и были лишены отростков (рис. 1а).



**Рисунок 1** – Экспрессия нейронального протеина NuCD в паллиальной пролиферативной зоне и глубоких слоях дорсальной области молоди симы *Oncorhynchus masou* в норме (а) и после механической травмы (б, в, г); а, в – латеральная (ДЛ), б – дорсальная (ДД), г – медиальная (ДМ) зоны дорсального теленцефалона симы; прямоугольниками оконтурены врезки на рисунках, красными стрелками показаны интенсивно маркированные нейроны в ПВЗ и СВЗ, желтыми стрелками – интенсивно маркированные нейроны в ПЗ, зелеными – показаны слабо маркированные нейроны в ПВЗ и СВЗ, белыми – слабо маркированные в ПЗ, оранжевыми – волокна радиальной глиии, белым пунктиром обозначено направление миграции клеток, красные отрезки показывают различную толщину нейрогенного пласта. Масштабный отрезок 100 мкм.

В дорсальной зоне было характерно наличие большого количества недифференцированных иммунонегативных клеток, прилежащих к

пролиферативной зоне (рис. 1a). В медиальной зоне наблюдали сходную картину, однако в дорсальной зоне преобладали иммунонегативные клетки, плотность распределения которых увеличивалась по мере приближения к пролиферативной зоне (рис. 1a). Особенностью было наличие иммунопозитивных клеток с дифференцированным фенотипом рядом с пролиферативной зоной, возможно, свидетельствует о ранней нейрональной дифференцировке клеток в данной области.



**Рисунок 2** – Соотношение NeuN иммунопозитивных клеток в паллиуме теляцефалона *O. masou* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

Результаты денситометрического анализа клеток дорсальной области позволяют выделить 2 типа активности NuCD: интенсивный и умеренный. Интенсивное маркирование NuCD ( $104 \pm 13$  ЕОП) было выявлено в большинстве клеток всех морфологических типов (табл. 2). Другой тип активности NuCD ( $86 \pm 15$  ЕОП) был выявлен в умеренно маркированных клетках с отростками, расположенными одиночно, либо попарно (табл. 2, рис. 1а).

Через 3 суток после механического повреждения распределение NuCD+ клеток в дорсальной зоне конечного мозга симы изменялось (рис. 1б). Количество NuCD+ клеток значительно возрастало (рис. 2). В ДД зоне после травмы появлялись интенсивно и умеренно маркированные клетки, ОП интенсивно маркированных нейронов 1–4 типов составляла  $87.8 \pm 10.9$  ЕОП (табл. 2). Другой тип нейронов характеризовался низкой активностью NuCD ( $48 \pm 14$  ЕОП, табл. 1) и появлялся после травматического воздействия. Количественное соотношение клеток в контроле и при повреждении представлено на диаграмме (рис. 2). Результаты морфометрического анализа показывают, что среди интенсивно маркированных клеток преобладают клетки 2 и 3 типов. Среди слабо маркированных клетки 1-го типа выявлены не были (табл. 2).

В глубоких слоях дорсальной зоны в посттравматический период были выявлены многочисленные иммунопозитивные клетки, с разной интенсивностью иммуномаркирования (табл. 2), на ряду с которыми были выделены зрелые нейроны с низким уровнем активности NuCD (рис. 1б). В пролиферативной зоне изменялась топография NuCD+ клеток: над слоем иммунопозитивных клеток (СВЗ) располагается отчетливо визуализируемый слой NuCD– клеток в ПВЗ, что не выявлялось в контроле (рис. 1а, б). Наибольшее скопление NuCD – клеток было обнаружено в зоне миграции (ПЗ), прилежащей к пролиферативной зоне. Клетки располагались на близком расстоянии друг от друга (рис. 1б), но, в сравнении с контролем, крупных скоплений не формировали.

После повреждения среди дефинитивных нейронов дорсальной области (ПЗ) были выявлены слабо-иммунопозитивные/иммунонегативные нейроны мультиполярной морфологии с крупным центрально расположенным ядром. У

таких клеток часто визуализировались проксимальные участки дендритов, что позволяло нам причислять их к мультиполярному типу (рис. 1б).

**Таблица 2** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ )  $HuCD$  иммунопозитивных клеток в дорсальной, латеральной и медиальной зонах паллиума молодежи симы *Oncorhynchus masou* в контроле и после механической травмы.

		Интактные животные			Механическая травма		
		тип клеток	размеры клеток* (мкм)	оптическая плотность (ЕОП)	тип клеток	размеры клеток* (мкм)	оптическая плотность (ЕОП)
ДД	недифференцированные	1	$8.0 \pm 0.6/6 \pm 0.4$	$104 \pm 13$	1	$9.0 \pm 0.1/8.6 \pm 0.2$	$87.8 \pm 10.9$
	овальные	2	$13.8 \pm 1.0/9.0 \pm 2$	$104 \pm 13$	2	$12.5 \pm 1.5/8.5 \pm 1.6$	$87.8 \pm 10.9$
				$86 \pm 15$		$13.2 \pm 1.2/9.1 \pm 2.6$	$48 \pm 14$
	мультиполярные	3	$16.8 \pm 1.3/9.5 \pm 1.7$	$104 \pm 13$	3	$17.4 \pm 1.3/9.3 \pm 2.0$	$87.8 \pm 10.9$
						$16.5 \pm 0.9/7.2 \pm 1.2$	$48 \pm 14$
биполярные	4	$23.2 \pm 0.3/8.5 \pm 1.9$		4	$20.0 \pm 2.1/7.7 \pm 1.2$	$87.8 \pm 10.9$	
					$23.9 \pm 4.8/10.1 \pm 3.9$	$48 \pm 14$	
ДЛ	круглые/ униполярные	1	$9.6 \pm 0.4/8.4 \pm 0.5$	$95.4 \pm 11.8$ $83.9 \pm 15.1$	1	—	—
	овальные	2	$12.4 \pm 1.3/9.3 \pm 1.6$		2	$13.6 \pm 1.2/8.7 \pm 1.3$	$65.1 \pm 14.1$
						$14.2 \pm 0.9/11.2 \pm 0.6$	$34.5 \pm 12.5$
	биполярные	3	$17.1 \pm 1/8.6 \pm 1.3$		3	$16.7 \pm 1.4/9.0 \pm 2.0$	$65.1 \pm 14.1$
						$17.6 \pm 2.0/12.2 \pm 2.7$	$34.5 \pm 12.5$
биполярные/ грушевидные	4	$22.1 \pm 2.5/10.2 \pm 1$	4	$23.4 \pm 0.8/8.3 \pm 0.7$	$65.1 \pm 14.1$		
					$22.3 \pm 2.1/10.3 \pm 1.8$	$34.5 \pm 12.5$	
ДМ	недифференцированные	1	—	—	1	$8.6 \pm 1.2/6.5 \pm 0.8$	$86.8 \pm 12.2$
	овальные	2	$12.5 \pm 1.1/8.1 \pm 1.8$	$90.9 \pm 10.0$	2	$11.7 \pm 1.3/7.3 \pm 1.2$	$86.8 \pm 12.2$
						$12.3 \pm 1.3/8.3 \pm 1.4$	$46.4 \pm 19.6$
биполярные	4	$16.5 \pm 1.1/8.6 \pm 1.3$	$79.3 \pm 11.3$	4	$16.8 \pm 1.6/8.6 \pm 2.2$	$46.4 \pm 19.6$	

На территории пролиферативной зоны дорсальной области была зарегистрирована высокая плотность распределения  $HuCD$ -недифференцированных клеток (рис. 1б). Часто наблюдалось послойное распределение интенсивно маркированных клеток, чередующихся с

иммунонегативными участками. Иногда встречались одиночные, интенсивно маркированные, не дифференцированные клетки, однако у некоторых клеток, имеющих псевдо-униполярную морфологию, можно было идентифицировать проксимальный участок отростка (рис. 1б).

В латеральной зоне нами было выделено 4 типа NuCD<sup>+</sup> клеток, морфологически отличающихся от клеток дорсальной области (табл. 2). Иммунопозитивные клетки формировали плотные кластеры в ПВЗ и СВЗ, формируя непрерывный пласт. В клетках было определено 2 уровня оптической плотности: интенсивный, определяемый в большинстве клеток и умеренный (табл. 2).

Паттерны миграции клеток из ПВЗ не были выражены, но отчетливо представлен слой иммунопозитивных недифференцированных клеток, формирующих кластеры на территории ПВЗ (рис. 1б). На территории латеральной зоны были выявлены мелкие нейроны 1 типа, с выраженными отростками, не обнаруженные в составе других зон дорсальной области (табл. 2).

В посттравматический период для латеральной зоны, было характерно изменение паттернов распределения NuCD<sup>+</sup> клеток (рис. 1в). На территории пролиферативных зон были обнаружены отдельные плотные кластеры интенсивно маркированных клеток различной степени дифференцировки: от округлых до удлиненных с отростками (рис. 1в). Появление данных кластеров мы связываем с повышением пролиферативной активности в активированных нейрогенных нишах. Часть клеток в центральной части нейрогенной ниши была иммунонегативной; иммунопозитивные клетки локализовались на периферии (рис. 1в). Зона, прилегающая к нейрогенной нише, содержала волокна радиальной глии (рис. 1в). После повреждающего воздействия в глубоких слоях латеральной зоны не выявлены недифференцированные иммунонегативные клетки, наблюдаемые в контроле (рис. 1а, в). В области, прилегающей к нейрогенным нишам, были выявлены тангенциально мигрирующие слабо маркированные клетки (рис. 1в). В глубоких слоях латеральной зоны были обнаружены крупные умеренно маркированные клетки 4 типа, не выявляемые в контроле (рис. 1а, в).



Умеренное маркирование NuCD было выявлено в клетках 2–4 типов, ОП этих клеток составляла  $65.1 \pm 14.1$  ЕОП (табл. 2). Низкая активность NuCD была выявлена в другой популяции дефинитивных нейронов латеральной области (табл. 2). Среднее значение ОП в таких клетках составляла  $34.5 \pm 12.5$  ЕОП. Соотношение между умеренно и слабо маркированными клетками в дорсальной и латеральной зонах после повреждения показано на рисунке 2. Количество NuCD+ пролиферативной зоны обнаруживались в большом количестве среди иммуномаркированных клеток.

В медиальной зоне было определено три типа NuCD-иммунопозитивных клеток (рис. 1г, табл. 2). Клетки 1 типа были обнаружены интенсивно маркированные локализовывались в ПВЗ и СВЗ (рис. 1г, табл. 2). Интенсивно маркированные клетки 2-го типа с выраженными отростками преобладали над более крупными умеренно маркированными нейронами 3-го типа (табл. 2). Денситометрические отличия между интенсивно маркированными и умеренно маркированными клетками были статистически достоверными ( $p < 0.05$ ). В глубоких слоях медиальной зоны NuCD+ клетки располагались диффузно (рис. 1г).

В ПВЗ концентрация NuCD+ клеток была значительна, по сравнению с более глубокими слоями (СВЗ, ПЗ); клетки располагались в несколько слоев, непосредственно контактируя друг с другом (рис. 1г). Иммунонегативные, недифференцированные клетки на территории медиальной пролиферативной зоны обнаруживались в большом количестве среди иммуномаркированных клеток 1 типа. В медиальной зоне наблюдалось максимальное скопление тесно расположенных NuCD+ клеток. На территории ПВЗ NuCD+ клетки формировали протяженные прерывистые скопления, чередующиеся с одиночными клетками (рис. 1г).

После повреждения в медиальной зоне было отмечено общее увеличение количества NuCD+ нейронов, как на территории ПВЗ, так и в более глубоких паренхиматозных слоях (рис. 1г). Интенсивно маркированные нейроны 1-го и 2-го типов ( $86.8 \pm 12.2$  ЕОП, табл. 2) преобладали на территории ПВЗ и СВЗ, а также вглубь на расстояние около 200 мкм (рис. 1г). На глубине более 300 мкм наряду с интенсивно маркированными были выявлены умеренно маркированные клетки 2-

го и 3-го типов ( $46.4 \pm 19.6$  ЕОП, табл. 2, рис. 1г, 2), превалирующие в глубоких слоях медиальной зоны.

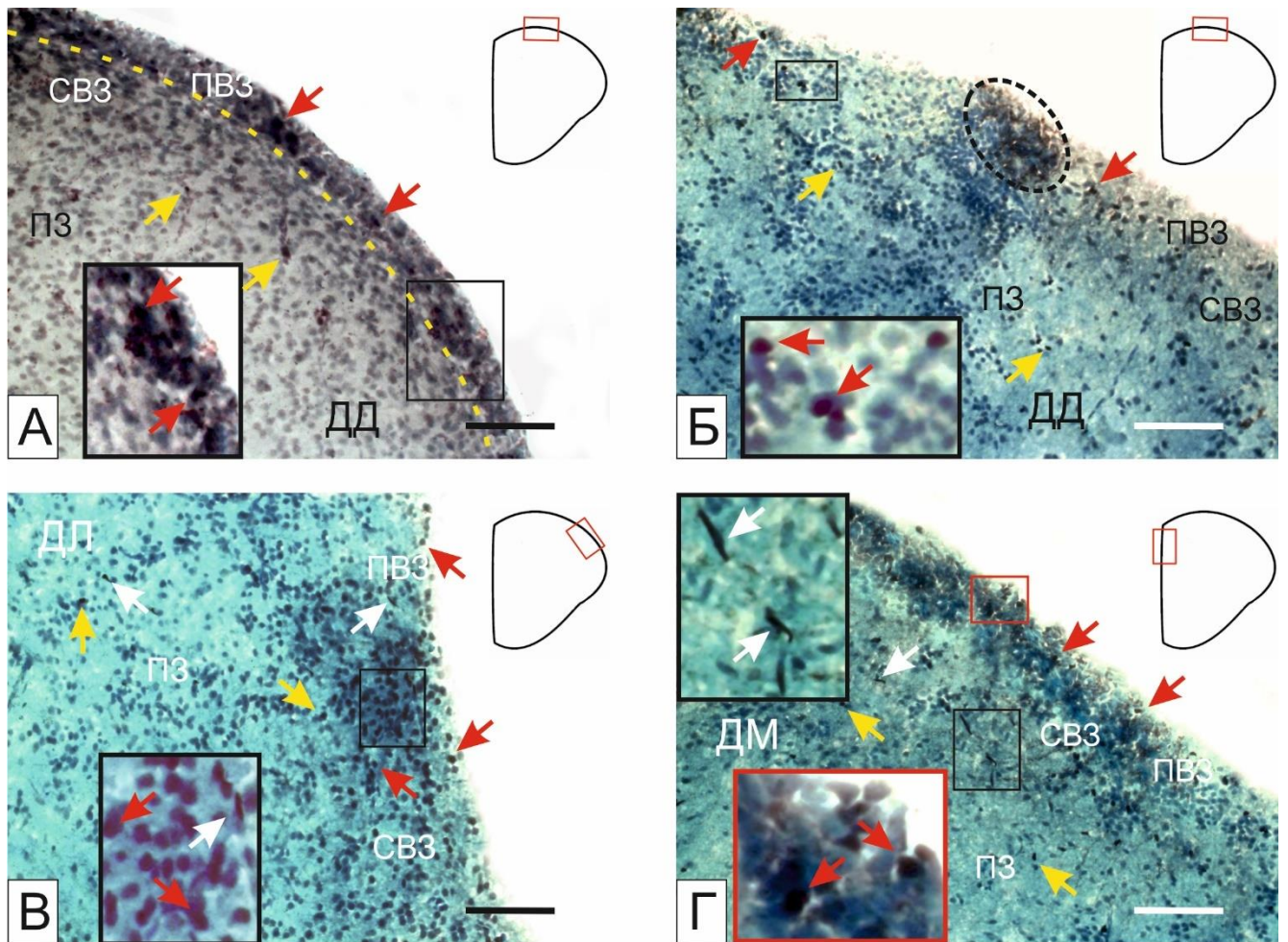
Таким образом, в медиальной зоне после травматического повреждения было зарегистрировано значительное повышение плотности распределения интенсивно маркированных NuCD+ клеток в ПВЗ и СВЗ по сравнению с контролем (рис. 1г). Увеличение плотности распределения NuCD+ клеток в медиальной зоне по сравнению с дорсальной и латеральной зонами было максимальным (рис. 2).

### **3.2. Локализация ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) в клетках дорсальной области в норме и после повреждения**

При иммуномаркировании PCNA в дорсальной пролиферативной зоне теленцефалона были выявлены как единичные PCNA+ клетки 1-го типа, так и небольшие, поверхностно расположенные кластеры, образованные клетками 2-го типа (табл. 3, рис. 3а). Одиночные PCNA+ клетки также определялись в более глубоких паренхиматозных слоях дорсальной зоны, но встречались сравнительно редко.

После травматического повреждения в ДД наблюдалось значительное увеличение плотности распределения клеток на территории ПВЗ и СВЗ (рис. 3б). Такое увеличение количества клеток 1 и 2 типа мы связываем с реактивацией в конечном мозге симы нейрогенных ниш, включающих небольшое количество интенсивно маркированных PCNA клеток, расположенных на территории ПВЗ, и единичных иммуномаркированных клеток в СВЗ (рис. 3б, табл. 3). В более глубоких слоях дорсальной зоны были идентифицированы многочисленные мелкие PCNA+ клетки 1 типа, составляющие основную часть нейрогенной ниши, с умеренным ( $39.2 \pm 16.7$  ЕОП) уровнем активности PCNA (рис. 3б, табл. 3).

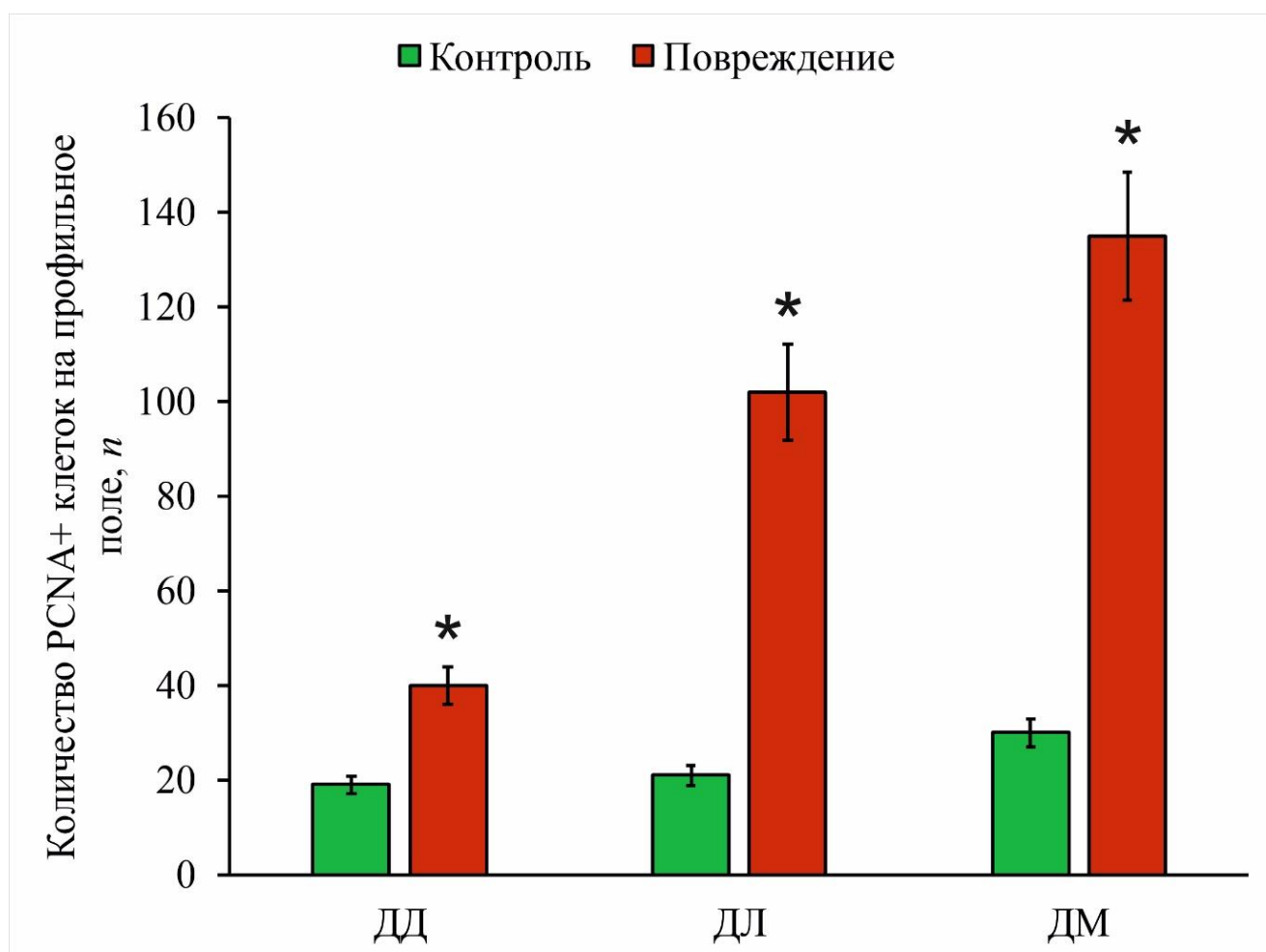
В латеральной зоне паттерн распределения пролиферирующих клеток был аналогичен таковому в дорсальной (рис. 3а). Большинство PCNA+ клеток были расположены в составе ПВЗ (рис. 3а). PCNA+ клетки в паренхиме латеральной зоны были одиночными и не формировали скоплений.



**Рисунок 3** – Распределение ядерного антигена пролиферирующих клеток PCNA в паллиальной пролиферативной зоне и глубоких слоях дорсальной области молодого симы *Oncorhynchus masou* в норме (а) и после механической травмы (б, в, г); а, б – дорсальная (ДД), в – латеральная (ДЛ), г – медиальная (ДМ) области дорсального теленцефалона симы, прямоугольниками околнурены врезки на рисунках, желтым пунктиром показаны границы пролиферативной зоны, красными стрелками показаны PCNA<sup>+</sup> клетки в ПВЗ и СВЗ, желтыми – PCNA<sup>+</sup> клетки в ПЗ; и белыми – мигрирующие клетки, черным пунктиром обозначена нейрогенная ниша. Масштабный отрезок 100 мкм.

После повреждения в латеральной зоне было обнаружено большое скопление иммунонегативных клеток с высокой степенью базофилии цитоплазмы и высокими ядерно-цитоплазматическими отношениями (рис. 3в). Такие клетки интенсивно окрашивались метиловым зеленым и формировали тангенциально и радиально

ориентированные ряды мигрирующих клеток из области их максимального скопления, расположенной в поверхностных слоях латеральной зоны, в более глубокие слои (рис. 3в). Базовый уровень активности PCNA, наблюдаемый в клетках в составе нейрогенных ниш латеральной зоны, составлял  $33.5 \pm 8.1$  ЕОП (табл. 3).



**Рисунок 4** – Соотношение PCNA иммунопозитивных клеток в паллиуме теленцефалона *O. tatoi* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

В медиальной зоне PCNA+ клетки 1 и 2 типа в ПВЗ были расположены намного плотнее, чем в дорсальной и латеральной зонах (рис. 3а, табл. 3), что

согласуется с результатами иммуномаркирования NuCD. В ДМ многочисленными были единичные PCNA+ клетки, часто они формировали локальные скопления, окруженные иммунонегативной зоной (рис. 3а). В более глубоких слоях медиальной зоны идентифицированы многочисленные, по сравнению с другими зонами, иммунопозитивные паренхиматозные клетки (рис. 3а). Параметры PCNA+ клеток и ОП иммуномаркирования соответствовали таковым других областей (табл. 3).

В медиальной зоне после повреждения PCNA+ клетки 1 и 2 типа были выявлены в составе ПВЗ и СВЗ (рис. 3г, табл. 3). Среди иммунопозитивных клеток определялось множество клеток с базофильной цитоплазмой (рис. 3г). Плотность распределения таких клеток была высока, они формировали непрерывный клеточный слой толщиной до 80 мкм (рис. 3г). В СВЗ непосредственно под слоем базофильных клеток, локализовались тонкие, удлиненные, палочковидные PCNA+ клетки 3 типа (табл. 3), относящиеся к мигрирующей популяции, наряду с которыми присутствовали иммунопозитивные клетки 1-го и 2-го типов (табл. 3, рис. 3г). В составе нейрогенной ниши медиальной зоны также определялись волокна радиальной глии, направленные из поверхностных слоев в более глубокие (рис. 3г).

Наряду с нейрогенными нишами в медиальной зоне были идентифицированы центры вторичного нейрогенеза (рис. 3г). Такие образования включали в себя интенсивно маркированные PCNA клетки, окруженные иммунонегативными нейробластами формирующими, по нашему мнению, единый морфогенетический комплекс (рис. 3г).

Таким образом, в результате механической травмы конечного мозга симы была выявлена интенсификация пролиферативной активности и миграции клеток, а также формирование локальных зон, продуцирующих новые клетки – реактивных нейрогенных ниш. Это свидетельствует, что после нанесения травмы к процессам гомеостатического нейрогенеза, наблюдаемого у интактных животных, добавляются процессы индуцированного нейрогенеза, связанные с появлением нейрогенных ниш с повышенной клеточной продукцией.

**Таблица 3** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ ) PCNA иммунопозитивных клеток в дорсальной, латеральной и медиальной зонах паллиума молодежи симы *Oncorhynchus masou* в контроле и после механической травмы.

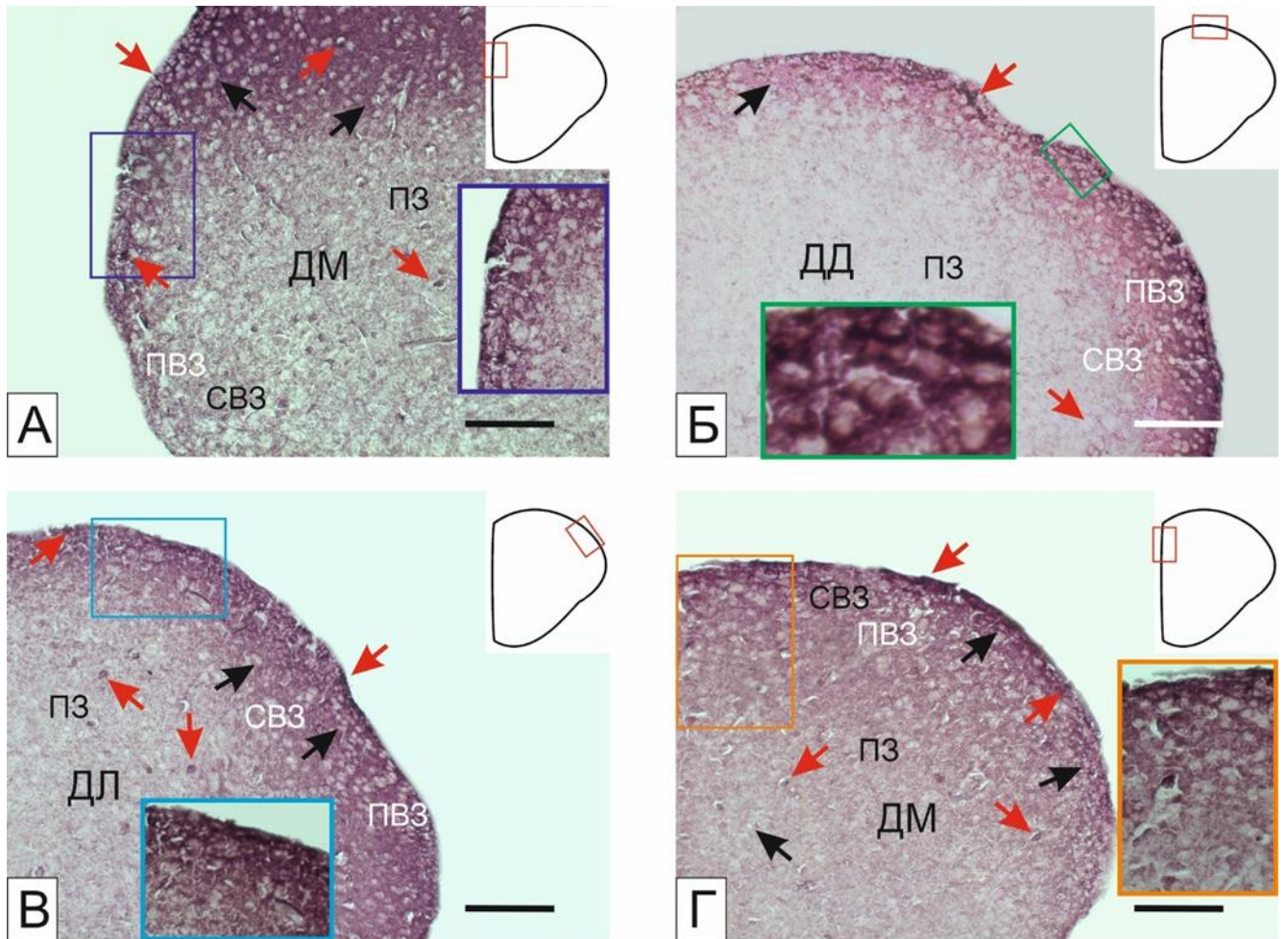
	Интактные животные			Механическая травма		
	тип клеток	размеры клеток*(мкм)	оптическая плотность (ЕОП)	тип клеток	размеры клеток*(мкм)	оптическая плотность (ЕОП)
ДД	1	$8.1 \pm 1.2/4.9 \pm 0.8$	$32.5 \pm 13.4$	1	$6.5 \pm 1.6/3.9 \pm 1$	$39.2 \pm 16.7$
	2	$12.3 \pm 3/7.2 \pm 1.5$	$32.5 \pm 13.4$	2	—	—
ДЛ	1	$8.1 \pm 1.2/4.9 \pm 0.8$	$43.3 \pm 7.0$	1	$6.5 \pm 1.6/3.9 \pm 1$	$33.5 \pm 8.1$
	2	$12.3 \pm 3.0/7.2 \pm 1.5$	$43.3 \pm 7.0$	2	—	—
ДМ	1	$7.7 \pm 1.3/5.1 \pm 1.1$	$33.3 \pm 13.5$	1	$7.4 \pm 1.3/4.2 \pm 1.0$	$66.2 \pm 22.8$
	2	$11.7 \pm 2.1/6.9 \pm 1.7$	$33.3 \pm 13.5$	2	$11.8 \pm 1.7/4.1 \pm 1.3$	$66.2 \pm 22.8$
		—	—	Мигрир.	$19.4 \pm 6.0/3.1 \pm 0.7$	$66.2 \pm 22.8$

### 3.3. Экспрессия BrdU в паллиуме молодежи симы в условиях нормы и после травматического повреждения

В результате исследования в паллиуме молодежи симы была выявлена гетерогенная популяция BrdU<sup>+</sup> клеток и ядер (табл. 4). Проведенные исследования позволили установить, что иммунолокализация BrdU была выявлена в ДД, ДЛ и ДМ паллиальных зонах теленцефалона молодежи симы *O. Masou* (рис. 5).

Среди BrdU-иммуномаркированных элементов, были выделены интенсивно маркированные клетки и ядра. Размеры ядер составляли до 3.5 мкм (рис. 5; табл. 4). В паллиуме интактной молодежи симы во всех зонах были выявлены однотипные интенсивно BrdU<sup>+</sup> ядра подобного размера (рис. 5а; табл. 4). Наибольшее количество мелких интенсивно BrdU-маркированных клеток было выявлено в ДД, а наименьшее – в ДМ (рис. 6), что предполагает наибольший вклад в гомеостатический нейрогенез дорсальной и наименьший – медиальной паллиальных областей. Результаты иммуномаркирования BrdU согласуются с ранее полученными данными иммуномаркирования PCNA в паллиуме молодежи симы. Иммуномаркирование BrdU позволяет диагностировать клетки и ядра,

находящиеся в S-фазе клеточного цикла, тогда как при маркировании PCNA можно визуализировать более обширную популяцию клеток, находящихся как в состоянии пролиферации, так и недавно вышедшие из клеточного цикла (Bravo et al., 1987).



**Рисунок 5** – BrdU-иммуномечение в паллиуме *Oncorhynchus masou*, в норме (а) и после механической травмы (б, в, г); а, г – медиальная (ДМ), б – дорсальная (ДД), в – латеральная (ДЛ) области дорсального теленцефалона. Прямоугольниками оконтурены врезки на рисунках, красными стрелками показаны BrdU+ клетки, черными – иммунонегативные клетки. Масштабный отрезок 100 мкм.

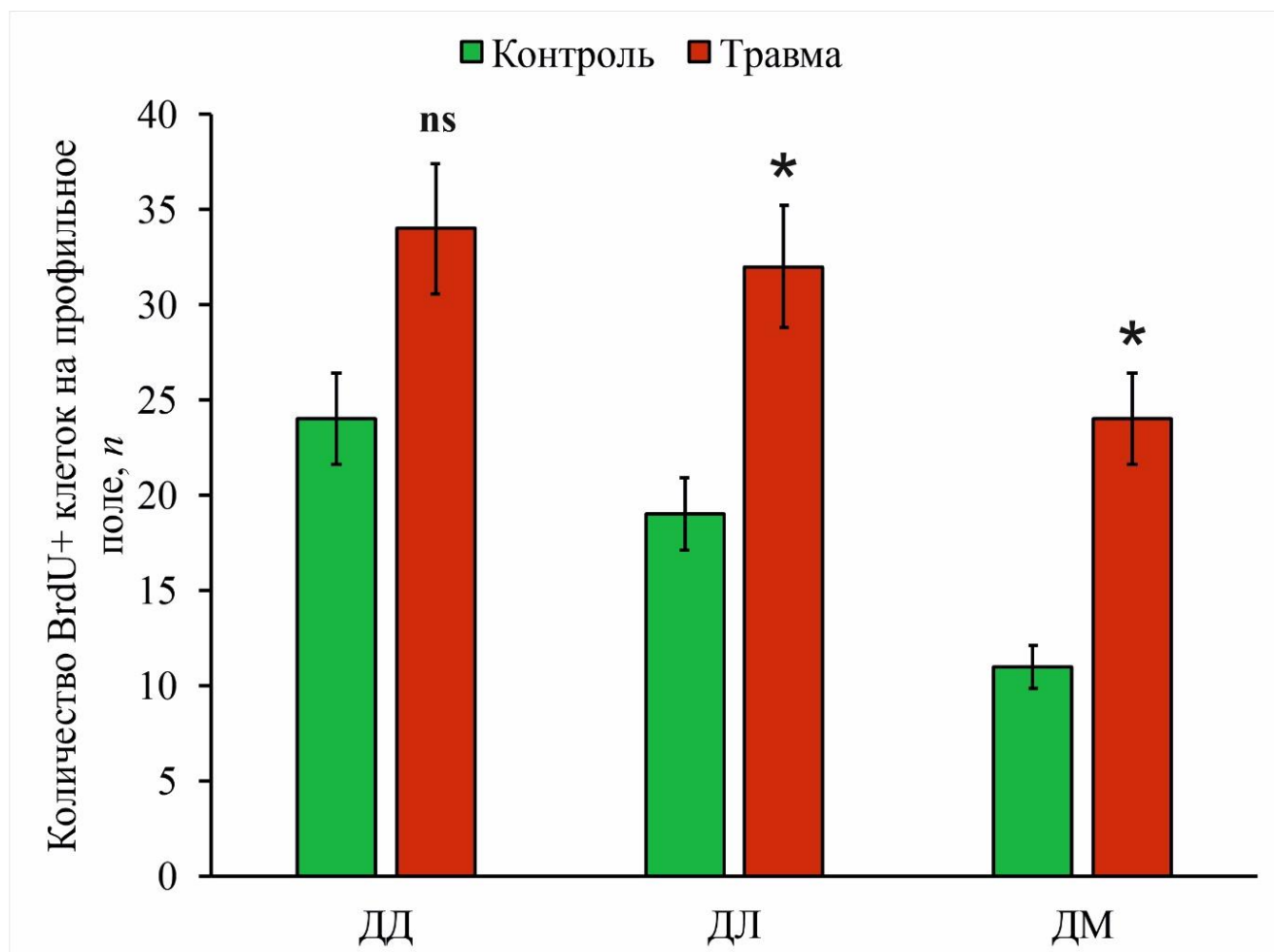
При маркировании BrdU в ДЛ и ДМ интактного паллиума молоди симы были выявлены гетерогенные популяции BrdU+ клеток, в отличие от ДД (рис. 5а). В ДЛ были обнаружены паттерны тангенциальной поверхностной миграции удлиненных BrdU+ клеток, а в ДМ зарегистрирована радиальная миграция BrdU+ клеток из ПВЗ

в СВЗ (рис. 5а). Однако, результаты настоящего исследования показывают, что среди пролиферирующей популяции клеток паллиума симы в S-фазе находятся в основном клетки ДД, а на других стадиях митотического цикла, в т.ч. и в состоянии миграции – в ДМ (рис. 5а). Как при маркировании PCNA, так и при экспериментальном введении BrdU в ДМ молодёжи симы были выявлены иммунопозитивные клетки и ядра в составе СВЗ и ПЗ (рис. 5а). Однако, если маркирование BrdU выявляло отдельные немногочисленные клетки в ПЗ и СВЗ, то при PCNA-иммуномаркировании паттерны клеток с пролиферативной активностью были более многочисленными.

Особенности распределения BrdU<sup>+</sup> клеток у интактной молодёжи симы свидетельствуют о высокой интенсивности процессов гомеостатического нейрогенеза, происходящих не только на территории матричных пролиферативных зон паллиума, расположенных в составе ПВЗ, но также и в более глубоких субвентрикулярных и паренхиматозных слоях теленцефалона.

В результате травматического повреждения паттерны маркирования BrdU<sup>+</sup> клеток как в составе матричных ПВЗ, так и в более глубоких субвентрикулярных и паренхиматозных слоях паллиума молодёжи симы изменялись (рис. 5). Было выявлено появление небольших кластеров BrdU<sup>+</sup> клеток в ПВЗ ДД и ДЛ (рис. 5б, в), а также отдельных BrdU<sup>+</sup> клеток в более глубоких субвентрикулярных и паренхиматозных слоях ДМ (рис. 5г). Наряду с этим было выявлено увеличение числа маркированных клеток в ПВЗ и появлении дополнительных, типов BrdU<sup>+</sup> ядер, не выявленных у интактных животных (рис. 6, табл. 4). Появление кластеров BrdU<sup>+</sup> клеток свидетельствует о синхронизации пролиферативной активности в клетках, которые, вероятно, являются потомками ВНСК глиального типа. Полученные результаты согласуются с данными на *D. rerio*, у которого были выявлены ВНСК глиального типа в дорсальном теленцефалоне (Lam et al., 2009). Источником таких клеток являются эмбриональные радиальные глиальные клетки (Xu et al., 2015), которые не производят непосредственно нейроны, а сначала продуцируют промежуточные клетки-предшественники (Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009).





**Рисунок 6** – Соотношение BrdU иммунопозитивных клеток в паллиуме теленцефалона *O. masou* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп, ns – достоверных отличий не выявлено). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

Исследования на молодежи симы показали, что BrdU+ кластеры клеток и ядер в результате травмы появляются не только в составе первичной пролиферативной зоны (ПВЗ), но также и в глубоких субвентрикулярных и паренхиматозных областях мозга (рис. 5), что свидетельствует о высоком репаративном потенциале паллиума молодежи симы. В результате травмы индуцируется появление дополнительной пролиферативной активности в клетках и ядрах, у которых не

выявлялось BrdU-маркирование у контрольных животных (рис. 5а; табл. 4).

**Таблица 4** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ ) BrdU-иммунопозитивных клеток и ядер в дорсальной, латеральной и медиальной зонах паллиума молодежи симы *Oncorhynchus masou* в контроле и после механической травмы

	тип клеток	Интактные животные		Механическая травма	
		размеры клеток* (мкм)	оптическая плотность (ЕОП)	размеры клеток* (мкм)	оптическая плотность (ЕОП)
ДД	недифференцированные	$4.5 \pm 0.5/2.8 \pm 1.0$	$151.7 \pm 6.2$	$4.3 \pm 0.3/2.8 \pm 0.4$	$177.1 \pm 5.4$
				$5.6 \pm 0.2/2.8 \pm 1.0$	$177.1 \pm 3.6$
	ядра	$3.7 \pm 0.2/2.3 \pm 0.1$	$145.4 \pm 2.3$	$3.6 \pm 0.3/2.5 \pm 0.5$	$169.2 \pm 5.1$
				$2.8 \pm 0.2/2.0 \pm 0.3$	$168.4 \pm 3.5$
ДЛ	недифференцированные	$4.6 \pm 0.3/3.4 \pm 0.5$	$147.8 \pm 1.9$	$4.4 \pm 0.3/2.7 \pm 0.4$	$174.4 \pm 5.1$
	овальные	$5.6 \pm 0.4/3.9 \pm 0.4$	$151.9 \pm 4.5$	$5.9 \pm 0.5/4.3 \pm 0.8$	$180.5 \pm 3.0$
		$7.6 \pm 0.5/5.3 \pm 0.9$	$144.2 \pm 3.3$		
	ядра	$3.4 \pm 0.4/2.7 \pm 0.2$	$145.8 \pm 4.6$	$3.5 \pm 0.3/2.4 \pm 0.2$	$169.5 \pm 1.2$
$2.4 \pm 0.3/1.9 \pm 0.4$				$165.7 \pm 3.1$	
ДМ	недифференцированные	$4.2 \pm 0.3/2.8 \pm 0.2$	$135.4 \pm 2.0$	$4.4 \pm 0.2/3.1 \pm 0.1$	$152.6 \pm 1.8$
	овальные	$5.2 \pm 0.2/3.1 \pm 0.6$	$152.2 \pm 3.6$	—	—
		$7.2 \pm 0.6/3.4 \pm 0.5$	$153.7 \pm 1.1$		
	ядра	$3.4 \pm 0.3/2.5 \pm 0.6$	$144.9 \pm 8.6$	$3.4 \pm 0.2/2.5 \pm 0.3$	$155.3 \pm 3.7$
$2.7 \pm 0.1/2.3 \pm 0.3$				$151.7 \pm 4.8$	

Различная интенсивность BrdU-маркирования у интактных животных и ее увеличение до 15% в различных областях паллиума после травмы (табл. 4) свидетельствует о том, что пролиферация клеток может быть не синхронизирована во времени. Морфологическая гетерогенность BrdU+ клеток и ядер в различных областях паллиума после травмы, может свидетельствовать о различных источниках происхождения пролиферирующих клеток (рис. 5б, в, г). Мы полагаем, что после травмы теленцефалона симы также происходят процессы активации ВНСК, в результате которых наблюдается локальное повышение пролиферативной активности в клетках разного типа и возможно различного происхождения. Маркирование BrdU в более крупных клетках (рис. 5б, в, г), не выявленных в ПВЗ

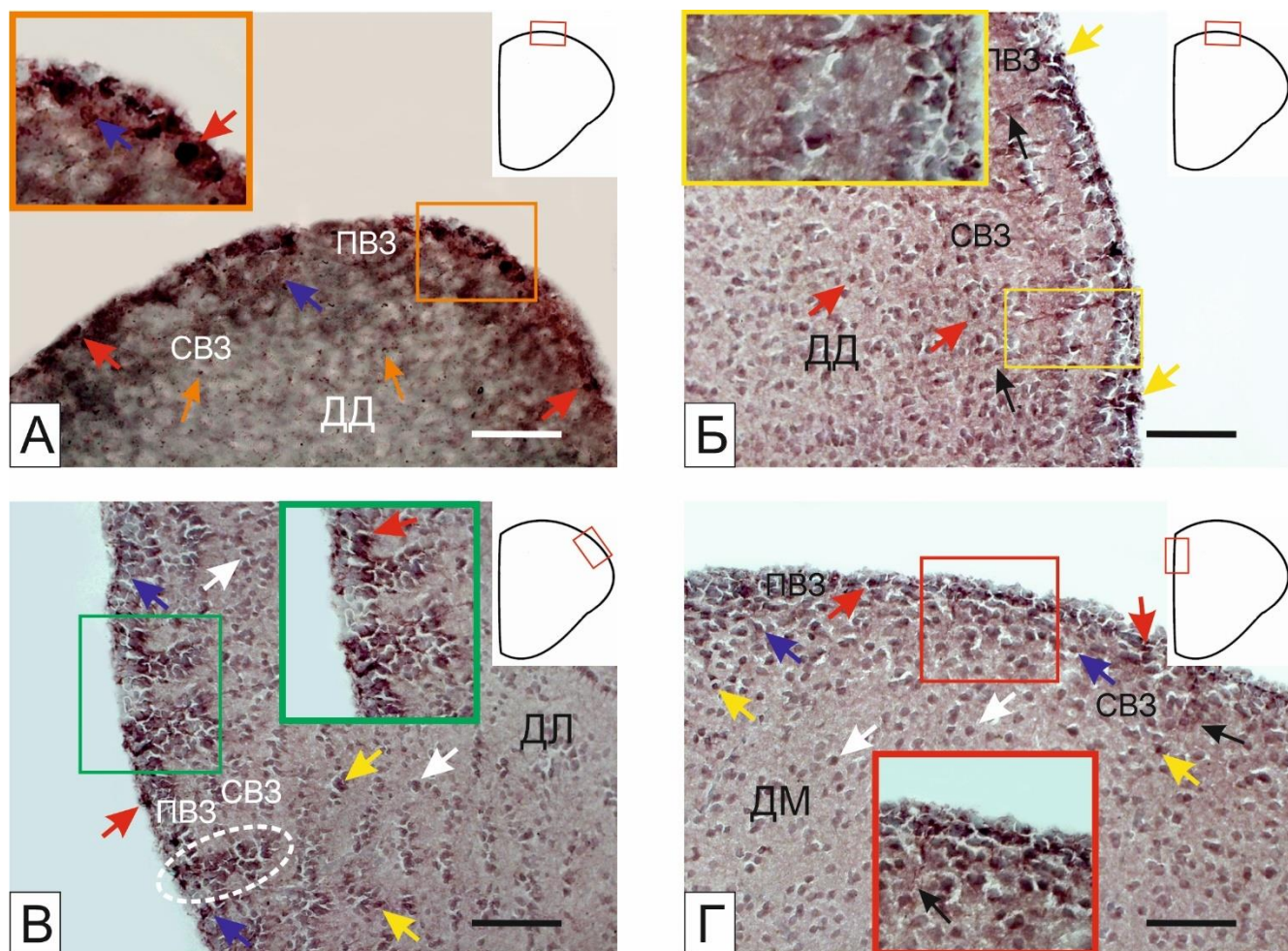
у интактной симы, может свидетельствовать о репрограммировании и трансдифференцировке таких клеток в результате травмы.

#### **3.4. Иммуногистохимическое маркирование GFAP в интактном паллиуме молодежи симы и после травматического повреждения.**

При маркировании GFAP у интактных животных во всех областях паллиума было идентифицировано несколько типов иммунопозитивных клеток, отличающихся по морфологическим характеристикам и характеру иммуномаркирования (табл. 5). Среди интенсивно маркированных клеток (первого типа) различали несколько размерных групп (табл. 5), представляющих, очевидно, различные стадии роста GFAP+ глиальных предшественников. Среди таких клеток встречались единичные интенсивно маркированные клетки (рис. 7а). К другой группе были причислены умеренно GFAP-маркированные клетки, морфологически гетерогенные (рис. 7а; табл. 5) с центрально расположенным негативным ядром, окруженным ободком маркированной цитоплазмы (рис. 7а). Такие клетки обычно формировали небольшие конгломераты из 3-5 плотно расположенных элементов. В отдельных случаях можно было проследить слабо маркированные радиальные волокна и мелкие слабо либо умеренно маркированные гранулы, расположенные в ПВЗ и СВЗ (рис. 7а). В глубоких паренхиматозных слоях GFAP+ клеток и волокон выявлено не было, но встречались отдельные слабо маркированные позитивные гранулы (рис. 7а).

После повреждающего воздействия в ДД конечного мозга симы были выявлены интенсивно маркированные GFAP, удлинённые либо округлые клетки (рис. 7б). Наиболее интенсивное маркирование было отмечено в конгломератах клеток продолговатой формы, расположенных в ПВЗ под слоем негативных клеток нейроэпителлия (рис. 7б; табл. 5). В СВЗ, непосредственно под интенсивно маркированными, располагались единичные умеренно маркированные клетки с центрально расположенным негативным ядром (рис. 7б; табл. 5). Скопления

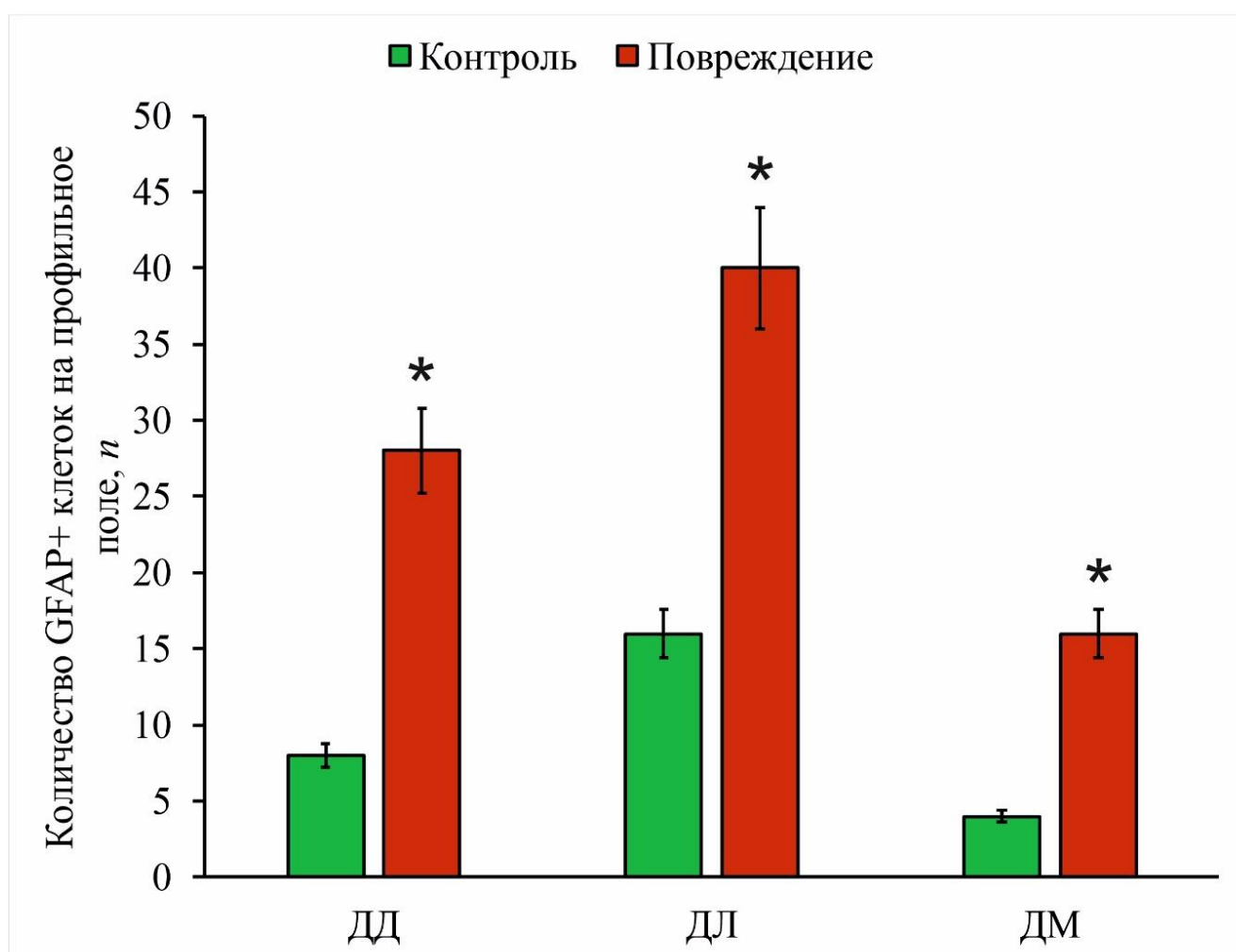
GFAP+ клеток часто ограничивались пучками или одиночными радиальными волокнами протяженностью до 200 мкм (рис. 76).



**Рисунок 7** – Иммуногистохимическое маркирование GFAP в паллиуме молодежи симы *Oncorhynchus masou* в норме (а) и после механической травмы (б, в, г); а, б – дорсальная (ДД), в – латеральная (ДЛ), д – медиальная (ДМ) зоны дорсального теленцефалона симы; прямоугольниками околтурены врезки на рисунках, красными стрелками показаны интенсивно маркированные клетки в ПВ3 и СВ3, желтыми стрелками – интенсивно маркированные клетки в ПЗ, синими показаны слабо маркированные клетки в ПВ3 и СВ3, белыми – слабо маркированные в ПЗ, черными – волокна радиальной глии, оранжевыми – маркированные гранулы в ПЗ. Масштабный отрезок 100 мкм.

Параметры GFAP+ клеток у контрольных животных и в посттравматический период в ДД отличались (табл. 5), в результате повреждения появлялись более

крупные интенсивно и умеренно маркированные клетки (рис. 7а, б; табл. 5). В ПВЗ были выявлены клетки, содержащие субклеточные иммунопозитивные включения и волокна радиальной глии, проникающие в более глубокие паренхиматозные слои (рис. 7б). В паренхиматозных слоях прослеживались отдельные GFAP+ мелкие, интенсивно маркированные клетки и гранулы (рис. 3б). В результате повреждающего воздействия количество GFAP+ клеток на профильное поле в ДД увеличилось в 4 раза (рис. 8).



**Рисунок 8** – Соотношение GFAP иммунопозитивных клеток в паллиуме теляцефалона *O. masou* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

В ДМ после травмы были выявлены аналогичные структурные изменения, но менее выраженные чем в ДД и ДЛ (рис. 7г). В ПВЗ были выявлены немногочисленные интенсивно и умеренно маркированные крупные клетки (рис. 7г; табл. 5). По сравнению с контрольной группой (\* $p < 0.1$ ), в ДМ наблюдалось трехкратное увеличение количества GFAP+ клеток (рис. 8).

**Таблица 5** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ ) GFAP-иммунопозитивных клеток в дорсальной, латеральной и медиальной зонах паллиума молодежи симы *Oncorhynchus masou* в контроле и после механической травмы

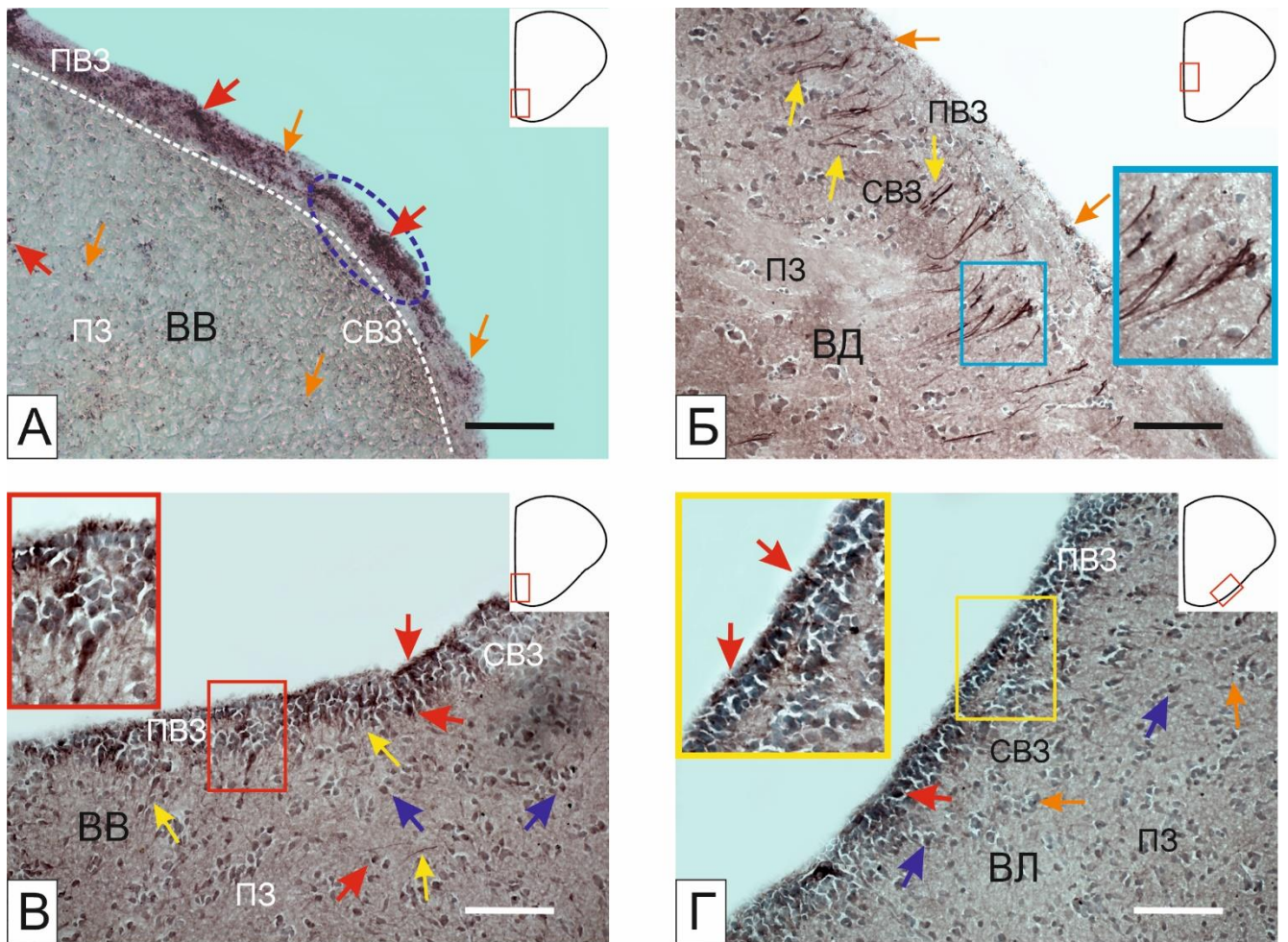
Интактные животные			Травма								
			ДД			ДЛ			ДМ		
Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП
10.3±1.3/6.6±1.0	ПВЗ	+++	14.2±1.1/9.3±0.2	ПВЗ	+++	5.1±0.8/4.5±1.0	ПЗ	+++	9.7±0.2/6.6±0.6	ПВЗ	+++
12.3±0.3/7.9±0.9	ПВЗ	+++				9.7±0.2/6.5±0.2	ПВЗ	+++	11.7±1.0/7.1±1.7	ПВЗ	+++
13.4±0.3/9.7±1.0	ПВЗ	+++	16.4±0.8/8.5±1.3	ПВЗ	+++	11.4±0.3/6.1±1.2	ПВЗ	+++	14.8±0.3/9.2±1.1	ПВЗ	+++
						12.9±0.6/7.1±0.8	ПВЗ	+++			
10.8±1.3/6.9±0.2	ПВЗ	++	11.9±0.5/9.5±0.3	ПВЗ	++	7.4±0.4/5.8±0.3	ПВЗ	++	12.5±0.4/8.5±1.4	ПВЗ	++
12.8±0.2/8.5±1.3	ПВЗ	++	16.3±0.2/9.7±1.1	СВЗ	++	8.1±0.2/5.7±0.5	СВЗ	++	13.5±0.3/8.3±1.9	ПВЗ	++
14.5±0.2/10.1±1.4	ПВЗ	++	18.8±2.4/10.7±2.1	СВЗ	++	9.8±0.6/5.8±0.5	ПВЗ	++	14.7±0.7/9.6±1.8	ПВЗ	++
						13.0±2.4/6.2±0.4	ПВЗ	++			

Таким образом, в результате травмы в ДЛ были обнаружены структурные перестройки в ПВЗ и СВЗ (рис. 7в), следствием которых является появление

реактивных структурных комплексов, включающих гетерогенную популяцию GFAP+ клеток и радиальной глии (рис. 7в). Выраженный топологический характер таких комплексов, дифференцированная организация различных типов клеток в них и высокая иерархичность в соотношении отдельных элементов позволят предполагать, что данные комплексы соответствуют реактивным нейрогенным нишам, содержащим глиальные предшественники, специфичные для постэмбрионального нейрогенеза, реактивизирующиеся в результате травматического процесса.

В субпаллиуме конечного мозга интактной молодежи симы были идентифицированы GFAP иммунопозитивные клетки небольших размеров округлой или овальной формы (рис. 9а; табл. 6). Помимо этого, отчетливо визуализируются многочисленные иммунопозитивные гранулы размером менее 3 мкм (рис. 9а). GFAP+ клетки и гранулы формировали гомеостатические скопления расположенные вдоль базальной мембраны ПВЗ, некоторые маркированные элементы были расположены ближе к апикальной части (рис. 9а). Иммунопозитивные клетки более крупных размеров образовывали плотный конгломерат, расположенный в СВЗ (рис. 9а; табл. 6). В глубоких слоях паренхимы были выявлены единичные иммунопозитивные клетки (рис. 9а).

В результате травматического повреждения в ВД субпаллиальной области индукция GFAP была выявлена в клетках радиальной глии (рис. 9б). Посттравматическая экспрессия GFAP в клетках РГ была не характерна для интактных животных (рис. 9а). Волокна радиальной глии, чаще всего регистрировались в СВЗ и в меньшей степени в ПЗ (рис. 9б). Как правило, встречались единичные и организованные в небольшие пучки волокна, плотность распределения которых изменялась в дорсо-вентральном направлении (рис. 9б). Интенсивность иммуномаркирования GFAP изменялась от умеренной до сильной (табл. 6), толщина волокон РГ также варьировала (рис. 9б). В некоторых случаях вдоль маркированных волокон РГ были выявлены паттерны клеточной миграции (рис. 9б). В ПВЗ определялись мелкие гранулоподобные отложения GFAP окружающие скопления иммунонегативных клеток (рис. 9б).



**Рисунок 9** – Иммуногистохимическое маркирование GFAP в субпаллиуме молоди симы *Oncorhynchus masou* в норме (а) и после механической травмы (б, в, г); а, в – вентральная (ВВ), б – дорсальная (ВД), г – латеральна (ВЛ) зоны вентрального теленцефалона симы; прямоугольниками околтурены врезки на рисунках, белым пунктиром обозначена ПВЗ, синим – конститутивные скопления в ПВЗ, красными стрелками показаны интенсивно маркированные клетки, синими – слабо маркированные, желтыми – волокна радиальной глии, оранжевыми – маркированные гранулы. Масштабный отрезок 100 мкм.

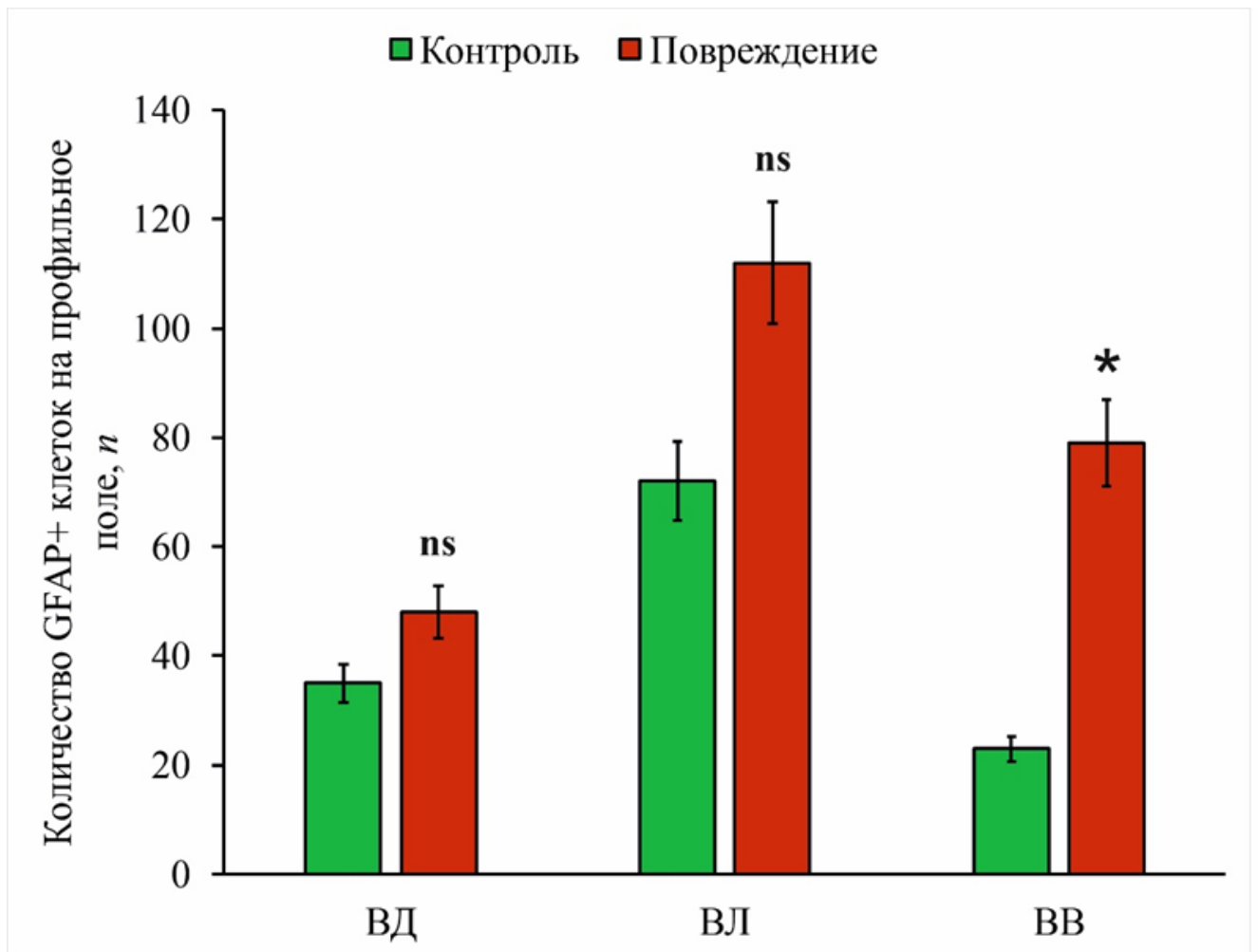
В вентральной части субпаллиума (ВВ) в посттравматический период большинство GFAP+ элементов, было сосредоточено в ПВЗ (рис. 9в). В этой области были идентифицированы реактивные GFAP+ кластеры, включающие клетки содержащие интенсивно маркированные гранулы в апикальной зоне (рис. 9в). В базальной части ПВЗ определялись скопления овальных клеток, содержащих



интенсивно маркированные GFAP включения и в отдельных случаях GFAP+ отростки (рис. 9в; табл. 6). Такие скопления чередовались с участками лишенными GFAP иммунопозитивности, содержащих плотные конгломераты иммунонегативных клеток (рис. 9в). Сочетание GFAP иммунопозитивных областей с негативными участками соответствует распределению реактивных нейрогенных зон, содержащих GFAP+ предшественники в ПВЗ. В других участках ВВ были выявлены зоны более плотной локализации РГ, распространяющиеся из базальной части ПВЗ в СВЗ (рис. 9в). Отдельные участки ПВЗ содержали интенсивно маркированный нейропил в апикальной части, включающий отдельные GFAP+ гранулы во внеклеточной и внутриклеточной зонах (рис. 9в). В СВЗ были выявленные отдельные умеренно GFAP+ клетки овальной формы (рис. 9в; табл. 6).

В ПЗ определялись скопления дифференцированных клеток, содержащих локальные гранулярные участки GFAP иммунопозитивности, интенсивность которой изменялась от умеренной до сильной (рис. 9в; табл. 6). В ПЗ определялись отдельные разнонаправленные умеренно или интенсивно маркированные волокна (рис. 9в).

После травматического повреждения в латеральной зоне субпаллиума (ВЛ) в ПВЗ выявлены GFAP+ клетки нейроэпителиального типа, формирующие локальные реактивные скопления, содержащие по 3-4 клетки (рис. 9в). В СВЗ выявлены отдельные GFAP+ с умеренной иммунопозитивностью (рис. 9в; табл. 6), в более глубоких паренхиматозных слоях, определялся слабо маркированный GFAP нейропил, заполняющий межклеточное пространство среди иммунонегативных клеток (рис. 9в). В более глубоких слоях ПЗ были выявлены многочисленные иммунопозитивные клетки, с гранулярным характером иммуномаркирования (рис. 9в).



**Рисунок 10** – Соотношение GFAP иммунопозитивных клеток в субпаллиуме теляцефалона *O. masou* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп, ns – достоверных отличий не выявлено). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

Таким образом, исследование посттравматического процесса в остром периоде показало наличие интенсивно маркированных GFAP клеток нейроэпителиального типа формирующие реактивные нейрогенные зоны во всех областях субпаллиальной зоны молодости симы. Для данного посттравматического этапа в ВД была характерна индукция GFAP в клетках радиальной глии, отсутствующая у интактных животных (рис. 9а). Сравнительный анализ распределения клеток РГ в дорсальной, вентральной и латеральной зонах

субпаллиума показал максимальную концентрацию клеток в ВЛ и минимальную в Д (рис. 10). Существенной особенностью посттравматического иммуномаркирования в субпаллиуме симы является гранулярный внутриклеточный в апикальной ПВЗ и фибриллярный экстраклеточный в СВЗ и ПЗ паттерны распределения GFAP (рис. 9б, в, г). В отличие у интактных животных большинство GFAP+ гранул и гомеостатических нейрогенных ниш локализовались в базальной части ПВЗ (рис. 9а).

Данные количественного анализа показали посттравматическое снижение GFAP иммунопозитивности в ВД и незначительное увеличение в ВВ по сравнению с контролем (рис. 10). Достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение числа GFAP+ клеток было выявлено только в ВД (рис. 10).

**Таблица 6** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ ) GFAP-иммунопозитивных клеток в дорсальной, вентральной и латеральной зонах субпаллиума молодежи симы *Oncorhynchus masou* в контроле и после механической травмы

Интактные животные			Травма								
			ВД			ВВ			ВЛ		
Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП
9.7±1.0/6.2±1.3	СВЗ	+++	10.8±0.3/8.1±0.7	ПЗ	+++	8.9±0.5/5.7±0.5*	ПВЗ	+++	9.6±0.4/7.2±0.7	ПЗ	+++
			9.8±0.2/6.4±0.2*	ПВЗ	+++	7.8±0.2/6.6±0.3	ПВЗ	+++	7.5±0.8/5.5±0.3	ПВЗ	+++
7.4±0.4/4.8±0.5	ПВЗ	+++	6.0±0.6/3.2±0.5	ПВЗ	+++	7.4±0.5/5.0±0.3	ПЗ	+++	6.2±0.4/4.5±0.7	СВЗ	+++
			4.0±0.2/2.4±0.3	ПВЗ	+++				5.3±0.4/3.3±0.4	ПВЗ	+++
6.5±0.3/4.6±0.6	СВЗ	++	11.4±0.8/6.4±1.3	ПВЗ	++	10.2±0.6/7.3±0.7	СВЗ	++	10.2±0.6/8.4±0.7	СВЗ	++
5.0±0.5/3.8±0.6	ПВЗ	++	8.6±0.5/7.2±0.5*	ПВЗ	++	8.4±0.2/6.1±0.2*	ПВЗ	++	7.1±0.5/5.0±0.4	ПВЗ	++
11.5±0.5/7.7±1.5	ПВЗ	+	8.4±1.0/5.3±0.4	ПЗ	+	8.3±0.5/5.1±0.6	СВЗ	+	8.8±0.3/6.7±0.7*	ПВЗ	+

### **3.5. Иммуногистохимическое маркирование даблкортина в интактном паллиуме молодежи симы и после травматического повреждения**

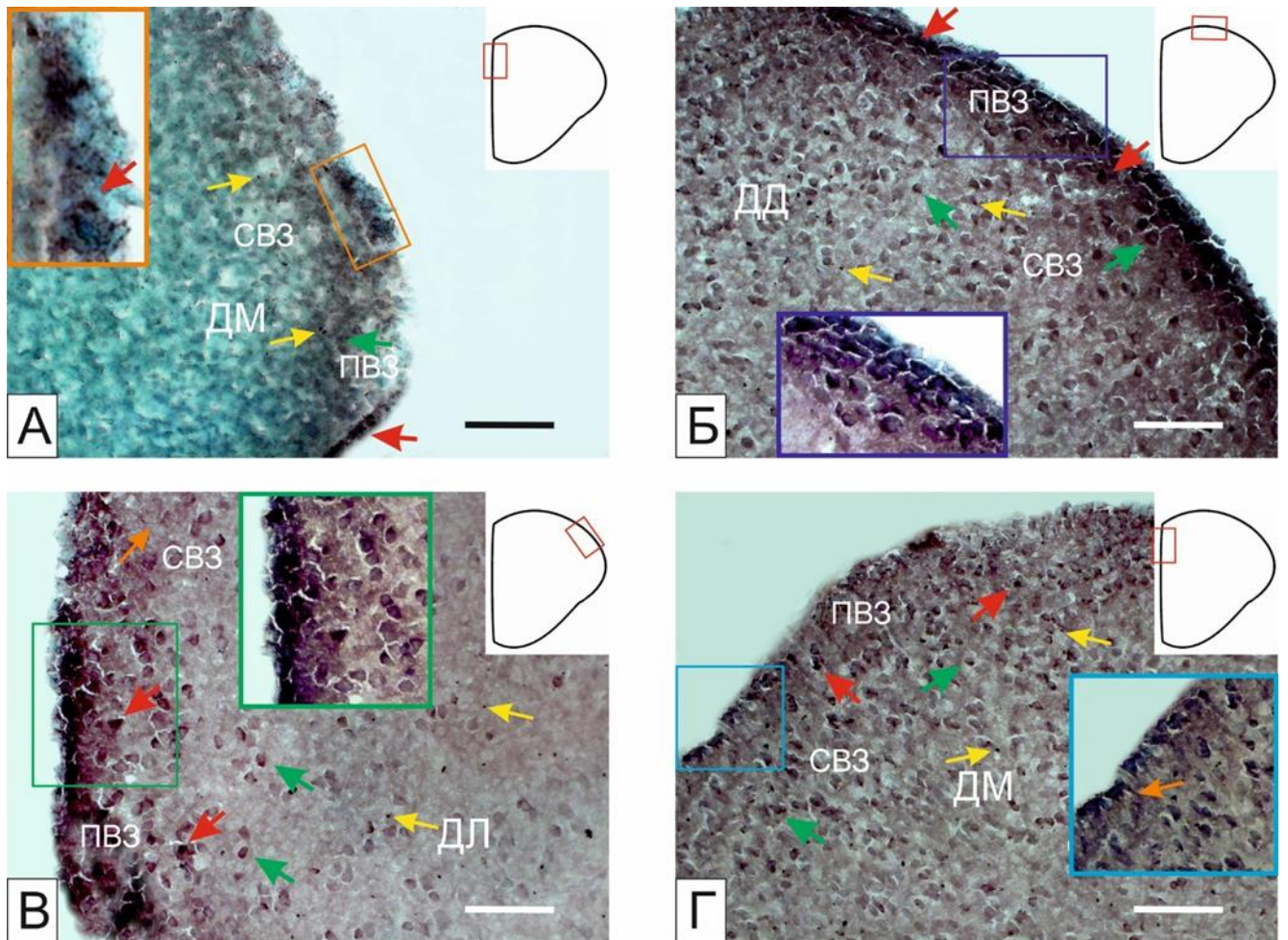
У интактной молодежи симы в паллиальной области теленцефалона наблюдается незначительная экспрессия даблкортина (ДК) в клетках (рис. 11а; табл. 7). Были выявлены единичные интенсивно маркированные ДК<sup>+</sup> клетки, расположенные в ПВЗ (рис. 11а; табл. 7). Другой тип иммуномаркированных структур представлен радиальными волокнами, распространяющимися от ПВЗ вглубь паренхимы мозга (рис. 11а). В отличие от клеток, радиальные волокна были слабо маркированы. В ПВЗ идентифицированы слабо, либо умеренно ДК<sup>+</sup> клетки, расположенные среди ДК<sup>-</sup> клеток (рис. 11 а, в, д; табл. 7).

Клетки маркировались неоднородно, у плотно маркированных клеток ядро на фоне окрашенной цитоплазмы не визуализируется (рис. 11а). При менее плотном маркировании ДК, отчетливо прослеживается иммунонегативное ядро, а продукты ИГХ маркирования обычно сконцентрированы в периферических слоях цитоплазмы клеток (рис. 11а). При ИГХ маркировании ДК в клетках ПВЗ и СВЗ, а также в более глубоких слоях ПЗ были выявлены интенсивно маркированные гранулы, имеющие субклеточную локализацию (рис. 11а).

Морфологический анализ клеток, маркированных ДК, показал, что большинство клеток паллиальной области теленцефалона представлены гетерогенными клетками, параметры которых приведены в таблице 4. Иммуномаркирование ДК было выявлено в составе ПВЗ теленцефалона и не было обнаружено в глубоких паренхиматозных областях паллиума симы (рис. 11а). Результаты денситометрического исследования показали значительные отличия в значениях оптической плотности у интенсивно и умеренно ДК<sup>+</sup> клеток (табл. 7).

Таким образом, экспрессия ДК в паллиуме молодежи симы была выявлена в клетках и волокнах зон с гомеостатическим нейрогенезом, и не идентифицирована в участках, содержащих дифференцированные клетки (рис. 11а). Тем не менее, в областях, содержащих зрелые нейроны, были идентифицированы отдельные интенсивно ДК-маркированные гранулы, которые в большинстве случаев имели

внутриклеточную локализацию (рис. 11а).



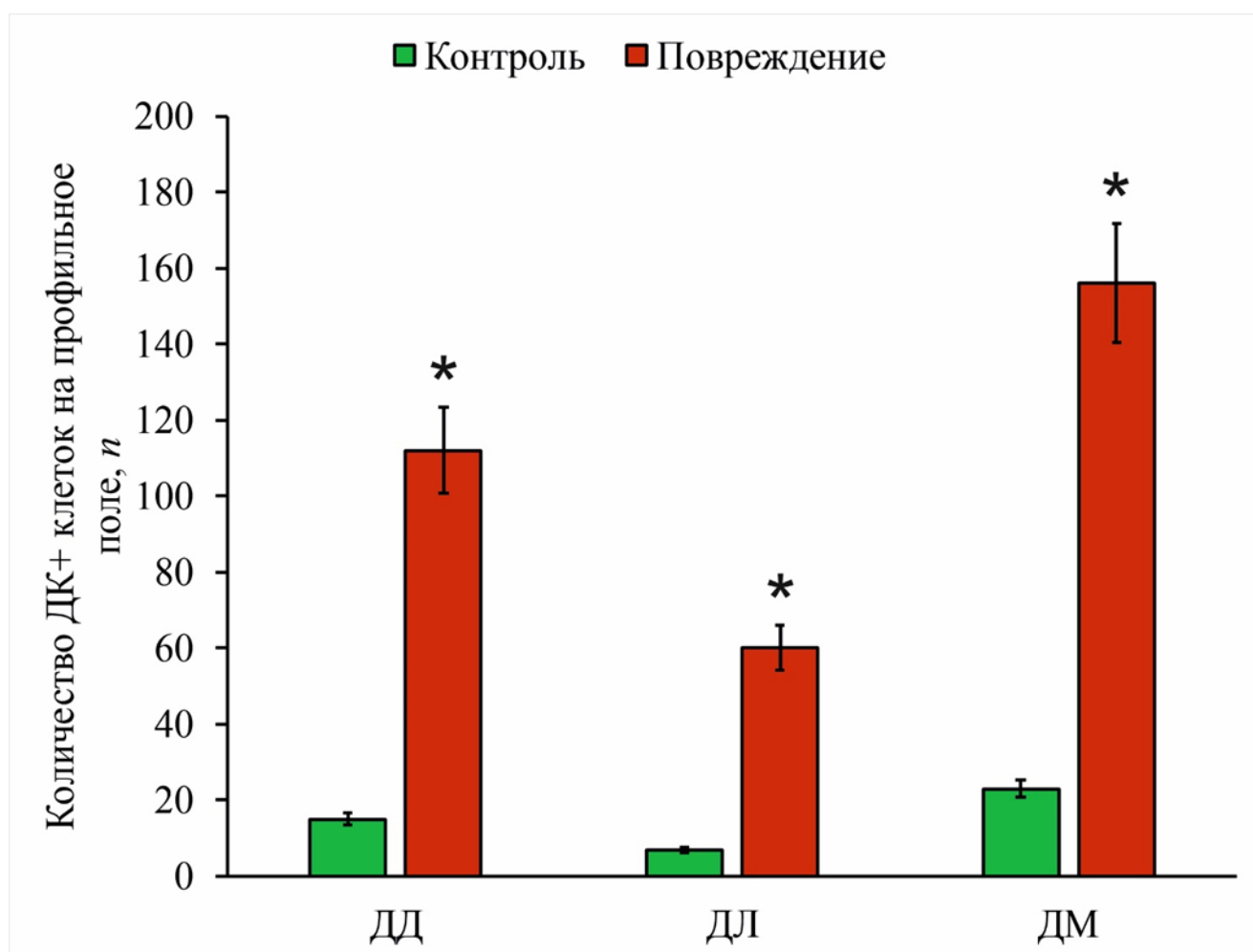
**Рисунок 11** – Распределение даблкортина в паллиальной пролиферативной зоне и глубоких слоях дорсальной области молодки симы *Oncorhynchus masou* в норме (а) и после механической травмы (б, в, г); а, г – медиальная (ДМ), б – дорсальная (ДД), в – латеральная (ДЛ) зоны дорсального теленцефалона симы; прямоугольниками оконтурены врезки на рисунках, красными стрелками показаны интенсивно маркированные клетки, зелеными стрелками – умеренно маркированные, желтыми – иммуномаркированные внеклеточные гранулы, оранжевыми – волокна радиальной глии. Масштабный отрезок 100 мкм.

Через неделю после нанесения механической травмы в мозге молодки симы наблюдались значительные изменения. Во всех областях паллиальной зоны теленцефалона было выявлено значительное увеличение количества ДК+ клеток и

интенсивности их маркирования (рис. 11б, в, г, 10). После повреждения ДК+ клетки, расположенные у интактных рыб только в ПВЗ, наблюдались в ПВЗ, СВЗ и неглубоких паренхиматозных слоях (рис. 11б, в, г). В ДД, ДЛ и ДМ было выделено 3 типа клеток: интенсивно ДК-маркированные, умеренно ДК-маркированные и ДК- клетки (табл. 7). У интенсивно маркированных ДК+ клеток однородно окрашивалась цитоплазма, ядро не визуализировалось или слабо выявлялось (рис. 11б, в, г; табл. 7). У умеренно маркированных ДК+ клеток продукты ИГХ реакции концентрировались на одном или обоих полюсах клетки, иммунонегативное ядро у таких клеток отчетливо визуализировалось (рис. 11б, в, г; табл. 7).

В ДД ДК+ клетки плотным слоем выстилали пролиферативную зону (рис. 11б). В ПВЗ были выявлены интенсивно маркированные ДК+ полигональные и удлинённые клетки (табл. 7). В ПВЗ были идентифицированы интенсивно маркированные ДК+ овальные клетки, как единичные, так и формирующие непрерывные пласты протяженностью до 250 мкм (рис. 11б, табл. 7).

Участки, содержащие интенсивно ДК+ маркированные клетки, чередовались с участками, включающими умеренно ДК+ маркированные клетки с крупными эксцентрично расположенными иммунонегативными ядрами (рис. 11б, табл. 7). В таких клетках экспрессия ДК была менее интенсивной, чем в клетках ПВЗ (рис. 11б). Другой тип был представлен отдельными интенсивно ДК+ маркированные наиболее мелкими клетками округлой формы (рис. 11б; табл. 7). Над слоем ДК+ клеток располагался плотный однородный пласт ДК- клеток, соответствующих нейроэпителию (рис. 11б). Такие клетки были организованы в виде однорядного пласта, некоторые клетки содержали апикально расположенные реснички (рис. 11б). Отдельные умеренно иммунопозитивные клетки были локализованы в ПЗ (рис. 11б).



**Рисунок 12** – Соотношение даблкортин иммунопозитивных клеток в паллиуме теленцефалона *O. masou* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

За пределами ПВЗ ДК+ клетки располагались на значительном удалении друг от друга и не формировали скопления, такие клетки имели овальную форму и средние размеры (рис. 11б; табл. 7). У клеток была маркирована цитоплазма, ядро хорошо визуализировалось (рис. 11б). В глубоких паренхиматозных слоях ДД были выявлены отдельные мелкие интенсивно маркированные клетки (рис. 11б; табл. 7), морфологически сходные с элементами ПВЗ. В некоторых случаях визуализировались эктопированные ДК+ элементы в форме полулуний (рис. 11б).

В большинстве случаев маркированные гранулы располагались на одном из полюсов клетки, в некоторых - отмечались множественные гранулы (рис. 11б). Если у интактных животных среднее количество ДК+ клеток составляло  $7 \pm 1$ , то через 7 суток после повреждения число клеток в ДД возросло до  $112 \pm 11$  клеток. Таким образом, в результате механической травмы количество ДК + клеток в ДД увеличилось в 16 раз (рис. 10).

**Таблица 7** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ ) ДК-иммунопозитивных клеток в дорсальной, латеральной и медиальной зонах паллиума молодежи симы *Oncorhynchus masou* в контроле и после механической травмы

Интактные животные			Травма								
			ДД			ДЛ			ДМ		
Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП
$8.6 \pm 1.4 / 5.0 \pm 0.9$	ПВЗ	+++	$4.6 \pm 0.7 / 3.5 \pm 1.1$	ПЗ	+++	$5.4 \pm 1.3 / 4.2 \pm 1.0$	ПЗ	+++	$5.2 \pm 0.8 / 3.7 \pm 0.6$	ПЗ	+++
			$14.3 \pm 0.2 / 9.9 \pm 0.9$	ПВЗ	+++	$13.9 \pm 1.2 / 10.1 \pm 0.9$	ПВЗ	+++	$9.4 \pm 0.6 / 6.6 \pm 0.8$	СВЗ	+++
			$16.8 \pm 0.5 / 10.9 \pm 1.5$	ПВЗ	+++	$16.2 \pm 0.8 / 11.4 \pm 0.8$	ПВЗ	+++	$11.6 \pm 0.8 / 6.7 \pm 0.9$	ПВЗ	+++
			$21.6 \pm 1.4 / 11.7 \pm 2.2$	ПВЗ	+++						
$10.8 \pm 0.5 / 6.3 \pm 0.4$	ПВЗ	++	$12.0 \pm 0.7 / 9.8 \pm 1.8$	ПВЗ	++	$14.3 \pm 0.3 / 13.1 \pm 2.0$	ПВЗ	++	$10.3 \pm 0.8 / 8.7 \pm 1.5$	СВЗ	++
$13.0 \pm 0.6 / 6.9 \pm 2.4$	ПВЗ	++	$13.9 \pm 0.4 / 10.1 \pm 2.2$	СВЗ	++	$16.5 \pm 0.5 / 11.8 \pm 0.9$	СВЗ	++	$12.1 \pm 0.4 / 8.1 \pm 1.2$	СВЗ	++
$9.1 \pm 1.2 / 6.9 \pm 1.0^*$	СВЗ	++	$15.5 \pm 0.3 / 11.7 \pm 1.8$	СВЗ	++	$19.0 \pm 1.0 / 12.0 \pm 0.6$	СВЗ	++	$15.3 \pm 0.9 / 8.1 \pm 1.5$	ПВЗ	++

В ДЛ у молодежи симы также был выявлен пласт интенсивно маркированных ДК клеток в ПВЗ (рис. 11в). ДК+ клетки формировали в ДЛ участки



протяженностью до 400 мкм. Интенсивно маркированные клетки были представлены двумя размерными группами клеток (табл. 7). В СВЗ выделялись единичные умеренно маркированные клетки трех типов (рис. 11в; табл. 7). В ПЗ идентифицировались мелкие интенсивно маркированные ДК клетки и множество интенсивно иммуномаркированных гранул субклеточной и экстраклеточной локализации (рис. 11в, табл. 7).

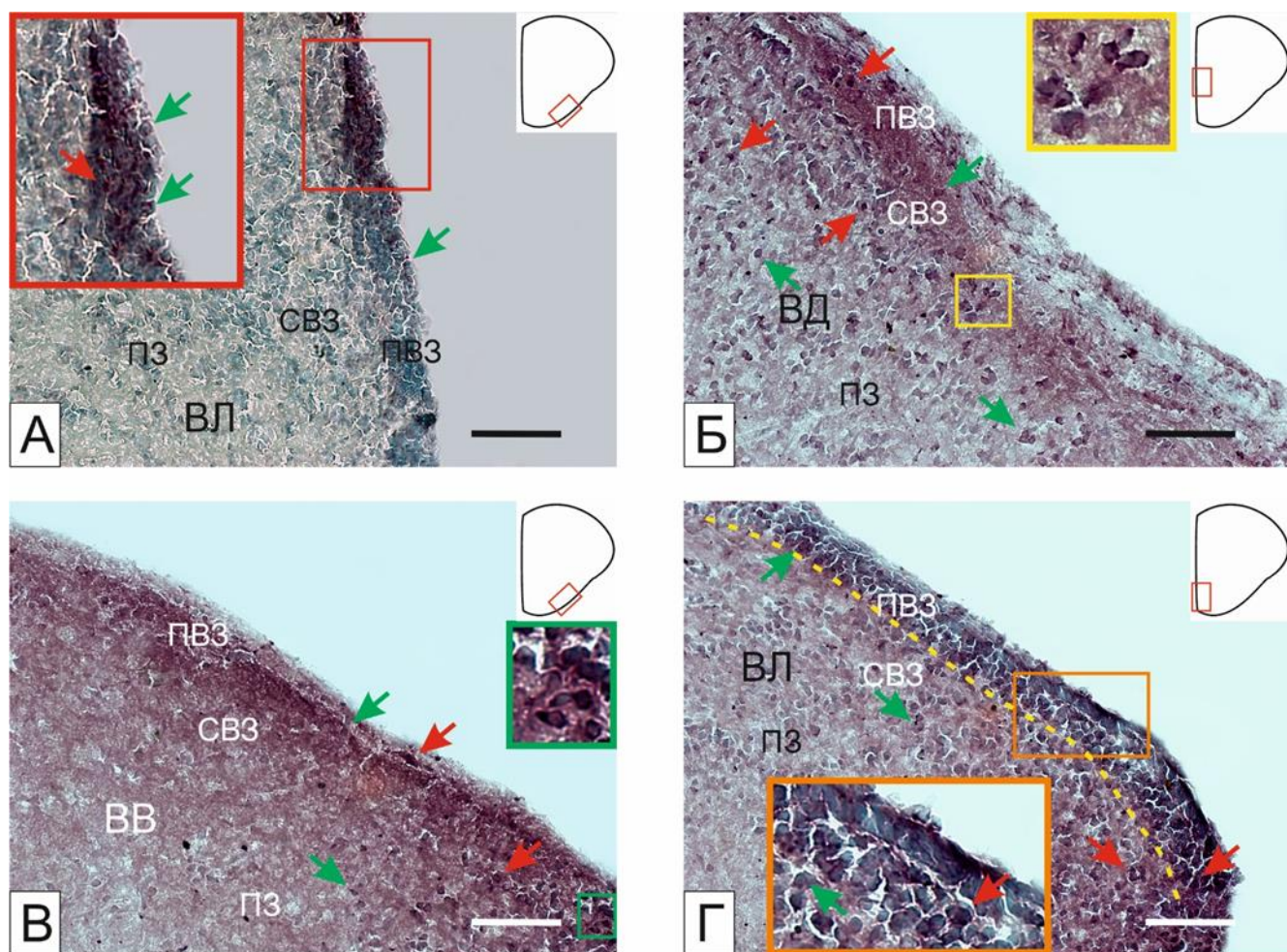
ДК<sup>+</sup> клетки в ДМ, в отличие от ДД и ДЛ, не формировали пласт в перивентрикулярной области (рис. 11г). В ДМ преобладали умеренно маркированные клетки двух размерных типов (табл. 7), цитоплазма которых маркировалась на полюсах, а ядра хорошо визуализировались. В ПВЗ были выявлены единичные интенсивно маркированные клетки двух типов (рис. 11г; табл. 7), расположенные у внешней границы теленцефалона и мягкой мозговой оболочки (рис. 11г). Другой тип клеток был представлен удлинёнными умеренно ДК-маркированными клетками с крупным центрально расположенным негативным ядром (табл. 7). У некоторых подобных клеток отчётливо визуализировался длинный радиально ориентированный ДК- отросток (рис. 11г). В СВЗ также были идентифицированы мелкие интенсивно маркированные ДК клетки, изредка встречались одиночные или парные маркированные гранулы (рис. 11г; табл. 7). ДК<sup>+</sup> внутриклеточные включения часто имели неправильную форму, при которой визуализировались не только центрально расположенные гранулы, но и отростки неправильной формы (рис. 11г).

Другой паттерн иммунолокализации ДК был выявлен в переходной зоне, между ДД и ДМ (рис. 11б, г). Здесь были идентифицированы удлинённые мигрирующие в тангенциальном направлении клетки с интенсивно маркированными цитоплазматическими включениями (рис. 11г). Более крупные клетки содержали множественные маркированные гранулы на одном из полюсов и единичные - на противоположном (рис. 11г). В переходной ДД/ДМ зоне были идентифицированы плотные скопления тангенциально мигрирующих интенсивно маркированных клеток, протяжённостью 220 мкм (рис. 11г).

В ДМ прослеживалась топологическая организация ДК<sup>+</sup> и ДК<sup>-</sup> нейронов

(рис. 11г). Можно было проследить пространственную упорядоченность клеточных масс, при которой отчетливо проявлялась радиальная направленность клеточной миграции, удлинённая морфология большинства клеток и отсутствие признаков дифференцировки (рис. 11г). Всё это в совокупности позволяет нам относить ДК<sup>+</sup> клетки к мигрирующей популяции. Таким образом, после механической травмы количество клеток в ДМ увеличилось в 20 раз (рис. 12). Увеличение количества ДК<sup>+</sup> клеток достигалось как за счёт увеличения числа мелких одиночных интенсивно маркированных клеток, так и вследствие увеличения умеренно маркированных клеток, содержащих ДК<sup>+</sup> гранулы (рис. 11г).

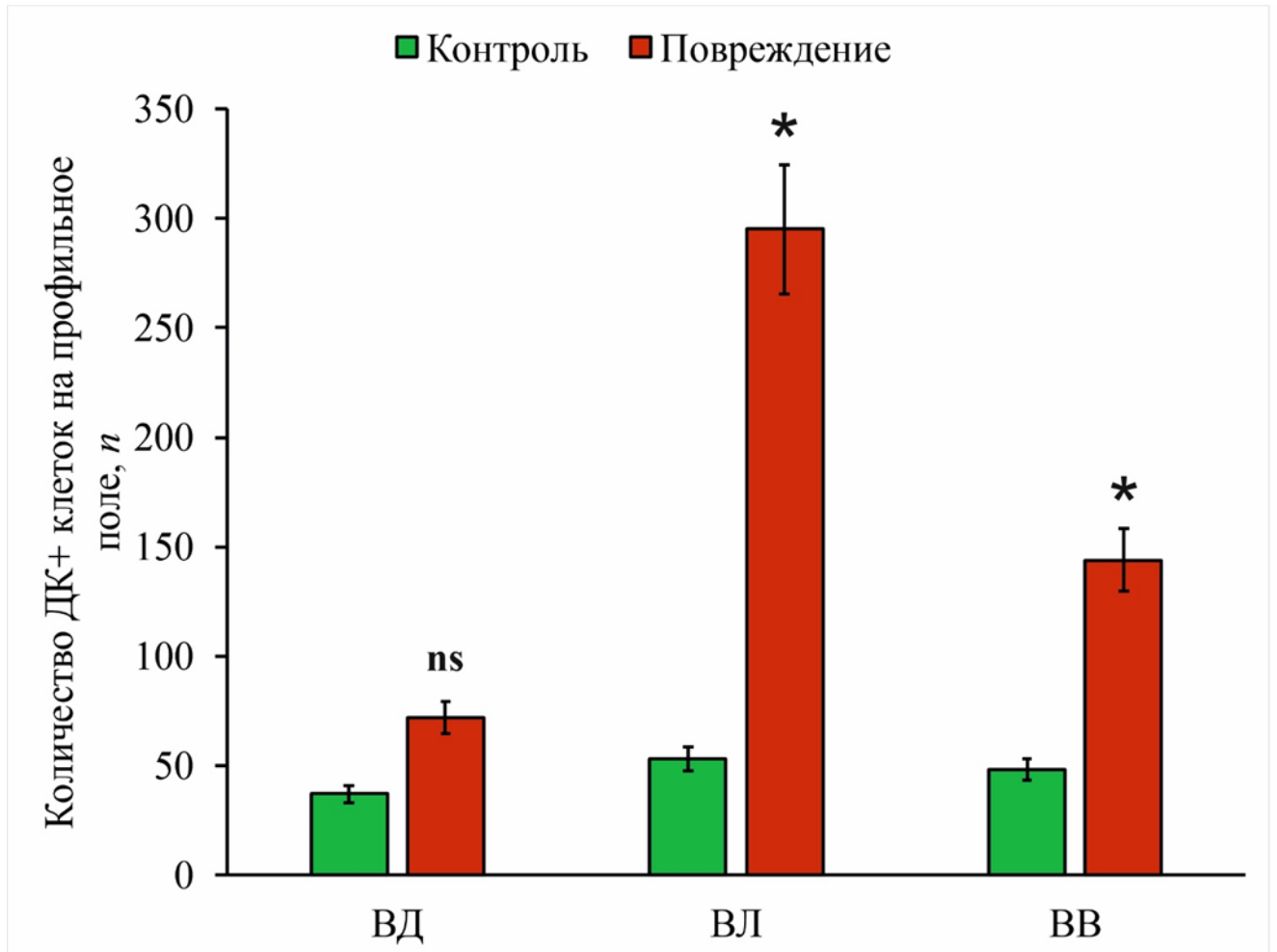
При иммуномаркировании даблкортина у интактных животных во всех областях субпаллиума позитивные клетки определялись преимущественно в перивентрикулярной и субвентрикулярной зонах, в более глубоких паренхиматозных слоях иммунопозитивные клетки были единичными (рис. 13а). Клетки были выявлены в составе диффузных скоплений средних размеров или плотных конгломератов, состоящих из нескольких клеток (рис. 13а). В диффузных конгломератах преобладали умеренно маркированные клетки удлинённой формы (рис. 13а; табл. 8). В более плотных конгломератах интенсивно маркированные клетки располагались в апикальной части ПВЗ, а менее интенсивно маркированные распространялись в базальную (рис. 13а). Клеточные скопления сходной морфологии были выявлены в СВЗ (рис. 13а). В результате микроскопического анализа, было идентифицировано несколько типов иммуномаркированных клеток, находящихся на разной стадии роста и дифференцировки, различающихся размерами и топографией (табл. 8). Первый тип клеток – небольшие округлые клетки размерами  $3,1 \pm 0,6 / 2,4 \pm 0,3$  находящиеся в непосредственной близости от более крупных вытянутых клеток размерами  $5,3 \pm 0,9 / 3,9 \pm 0,5$  (рис. 13а; табл. 8). Плотные скопления ДК<sup>+</sup> клеток разной степени дифференцировки, находящиеся непосредственно в ПВЗ и СВЗ соответствуют гомеостатическим нейрогенным нишам (рис. 13а).



**Рисунок 13** – Распределение даблкортина в субпаллиальной пролиферативной зоне и глубоких слоях вентральной области молодого симона *Oncorhynchus masou* в норме (а) и после механической травмы (б, в, г); а, г – латеральная (ВЛ) б – дорсальная (ВД), в – вентральная (ВВ) зоны вентрального теленцефалона симона; прямоугольниками оконтурены врезки на рисунках, красными стрелками показаны интенсивно маркированные клетки, зелеными стрелками – умеренно маркированные, желтым пунктиром обозначен пласт маркированных клеток в пролиферативной зоне. Масштабный отрезок 100 мкм.

После повреждения во всех зонах субпаллиума наблюдается значительное увеличение количества даблкортин иммунопозитивных клеток (рис. 14). Количество клеток возросло как в перивентрикулярной зоне (ПВЗ) и в субвентрикулярной зоне (СВЗ), так и более глубоких паренхиматозных слоях (ПЗ) (рис. 13б, в, г). Наиболее значительно количество клеток возрастает в вентролатеральной зоне ( $p \leq 0,01$ ; рис. 14). Помимо количества клеток после

механической травмы в субпаллиуме конечного мозга симы изменяется характер иммуномаркирования даблкортина, появляется два типа позитивных клеток интенсивно и умеренно маркированные (рис. 13б, в, г, табл. 8).



**Рисунок 14** – Соотношение даблкортин иммунопозитивных клеток в субпаллиуме теленцефалона *O. masou* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп, ns – достоверных отличий не выявлено). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

В вентродорсальной зоне (ВД) в посттравматический период появлялись интенсивно маркированные ДК+ мелкие округлые, либо овальные клетки размерами 4-5 мкм (рис. 13б; табл. 8). Количество таких клеток превышало таковое

у контрольных животных, тем не менее по сравнению с другими зонами в ВД было выявлено наименьшее увеличение числа ДК+ клеток (рис. 14.) Интенсивно маркированные одиночные ДК+ клетки более крупных размеров были выявлены в СВЗ и ПЗ (рис. 13б). В целом по сравнению с контролем в ВД после травмы ДК иммунопозитивность была выявлена в более крупных интенсивно и умеренно маркированных клетках (рис. 13б).

**Таблица 8** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ ) ДК-иммунопозитивных клеток в дорсальной, вентральной и латеральной зонах субпаллиума молодежи симы *Oncorhynchus masou* в контроле и после механической травмы

Интактные животные			Травма								
			ВД			ВВ			ВЛ		
Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП
11.4±1.0/ 7.2±1.3	ПЗ	+++	9.0±0.5/ 6.0±0.3	СВЗ	+++	8.6±0.5/ 6.1±0.5	ПВЗ	+++	8.6±0.7/ 6.1±0.7	ПЗ	+++
9.0±0.4/ 5.9±0.4	СВЗ	+++	8.2±0.3/ 6.7±0.5	ПЗ	+++	7.3±0.3/ 5.3±0.7	ПВЗ	+++	7.5±0.3/ 4.5±0.5	СВЗ	+++
7.4±0.2/ 4.2±1.0	ПВЗ	+++	6.2±0.3/ 5.1±0.2	СВЗ	+++	5.9±0.5/ 4.6±0.5	ПВЗ	+++	6.7±0.4/ 4.9±0.6	ПВЗ	+++
6.1±0.5/ 3.7±0.7	ПЗ	+++	4.9±0.2/ 3.0±0.2	ПВЗ	+++				5.8±0.4/ 4.4±0.4	ПВЗ	+++
3.1±0.6/ 2.4±0.3	ПВЗ	++	11.2±0.6 / 8.1±1.0	ПВЗ	++	8.5±1.0/ 5.6±0.6	ПВЗ	++	9.3±0.9/ 6.0±1.1	ПВЗ	++
						7.9±0.3/ 6.2±0.5	ПВЗ	++	7.8±0.1/ 5.7±0.6	СВЗ	++
5.3±0.9/ 3.9±0.5	ПВЗ	++	9.3±0.5/ 6.9±0.8	СВЗ	++	7.1±0.3/ 4.5±0.4	ПВЗ	++	7.0±0.2/ 5.0±0.4	ПВЗ	++
						7.0±0.3/ 5.5±0.6	ПВЗ	++	6.1±0.5/ 5.1±0.6	ПВЗ	++
						5.9±0.5/ 4.4±0.4	ПВЗ	++			
7.4±0.2/ 4.2±1.0	СВЗ	+	—			—			—		

В вентровентральной зоне (ВВ) после травмы были выявлены одиночные ДК+ интенсивно маркированные клетки в апикальной части ПВЗ (рис. 13в). Количественный анализ показал существенное увеличение числа ДК+ клеток ( $p \leq 0.05$ ) по сравнению с контролем (рис. 14). В базальной зоне ПВЗ иногда идентифицировали ДК+ клетки атипичной морфологии, псевдоуниполярной формы, у которых расширенная часть располагалась в базальной части ПВЗ, а суженная распространялась в апикальную зону ПВЗ (рис. 13в). В этой же области у клеток с умеренным маркированием ДК визуализировались крупные иммунонегативные ядра, а характер иммуноокаршивания был крупно гранулярный (рис. 13в). В СВЗ были идентифицированы единичные клетки подобного типа, в более глубоки паренхиматозных слоях были выявлены единичные ДК+ иммунопозитивные клетки (рис. 13в).

В вентролатеральной зоне (ВЛ) выявлен гетерогенный многорядный протяженный пласт ДК иммунопозитивных клеток в ПВЗ, включающий как клетки разной интенсивности ДК иммуномаркирования, так и иммунонегативных клеток (рис. 13г; табл. 8). Характер иммуномаркирования клеток, как правило, позволял идентифицировать центрально расположенное иммунонегативное ядро, окрашенное метиловым зеленым, окруженное ДК+ ободком цитоплазмы (рис. 13г). В большинстве случаев иммуномаркирование цитоплазмы носило крупнозернистый характер (рис. 13г). В отдельных случаях целостность цитоплазмы клеток нарушалась, при этом визуализировались иммунопозитивные гранулы субклеточного размера (рис. 13г). Тем не менее, паттерны гранулярного отложения ДК иногда были визуализированы в межклеточном пространстве, размеры таких гранул составляли 0.5-1.5 мкм. В ВЛ было выявлено два типа ДК+ клеток (табл. 8). В ПВЗ помимо горизонтально ориентированных клеток располагается скопление интенсивно маркированных ДК+ клеток, представляющее реактивную нейрогенную нишу, возникающую в ответ на механическое повреждение дорсальной зоны конечного мозга симы (рис. 13г). Размеры даблкортин позитивных клеток после повреждения так же отличаются от таковых у клеток контрольного варианта (табл. 8). В частности, были

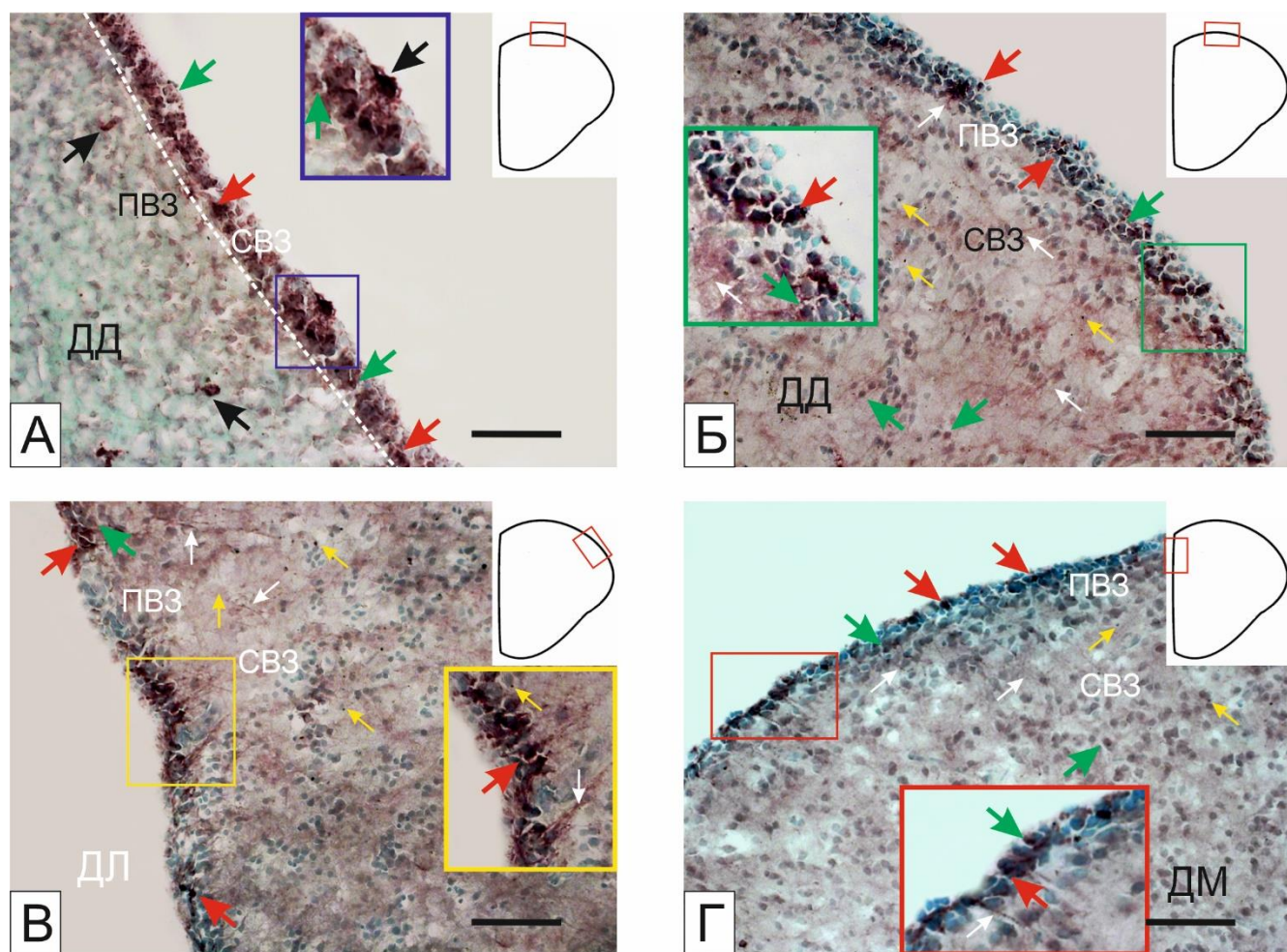
идентифицированы ДК<sup>+</sup> более крупные умеренно иммуномаркированные клетки в ПВЗ и СВЗ. В составе РНН были выявлены интенсивно маркированные крупные ДК<sup>+</sup> клетки отсутствующие в контроле (рис. 13г, табл. 8). Количество позитивных клеток возрастает не только в ПВЗ, но и более глубоких паренхиматозных слоях, однако так же сохраняется их диффузный характер распределения (рис. 13г).

### **3.6. Иммуногистохимическое маркирование виментина в интактном паллиуме молодежи симы и после травматического повреждения.**

При маркировании виментина в паллиуме в норме продукты ИГХ реакции выявлялись в клетках перивентрикулярной области в виде небольших гранул, расположенных в различных частях тел иммунопозитивных клеток (рис. 15а). Характер иммуномаркирования клеток изменялся от мелко- до крупнозернистого. Интенсивность иммуномаркирования виментина в клетках ПВЗ была слабой либо умеренной (табл. 9). Отдельные интенсивно маркированные клетки, как правило, формировали небольшие плотные скопления (рис. 15а, врезка), либо располагались в виде многорядного пласта в ПВЗ (рис. 15а). Наряду с маркированными внутриклеточными гранулами в ПВЗ были идентифицированы отдельные интенсивно маркированные удлиненные клетки (рис. 15а; табл. 9). В паренхиматозной зоне мозга были идентифицированы немногочисленные Vim<sup>+</sup> гранулы, расположенные, как в межклеточном пространстве, так и внутри клеток (рис. 15а).

После травматического повреждения в паллиальной области в отдельных клетках и небольших кластерах ПВЗ было выявлено увеличение экспрессии виментина (рис. 15б, в, г; рис. 16). В интенсивно маркированных клетках ДД, как правило, ядро не визуализировалось (рис. 15б, в, г). Отдельно расположенные Vim<sup>+</sup> клетки часто имели длинные, радиально ориентированные тонкие отростки (рис. 15в). В умеренно маркированных клетках идентифицировали Vim<sup>+</sup> гранулы, сконцентрированные на одном из полюсов клетки (рис. 15г). Иногда определялись более протяженные Vim<sup>+</sup> цитоплазматические включения (рис. 15б).

Поверхностно расположенные нейроэпителиальные клетки были Vim-иммунонегативными (рис. 15б). В паренхиме мозга отмечали единичные Vim+ мелкие клетки (рис. 15б), а также немногочисленные диффузно расположенные Vim+ гранулы (рис. 15б).

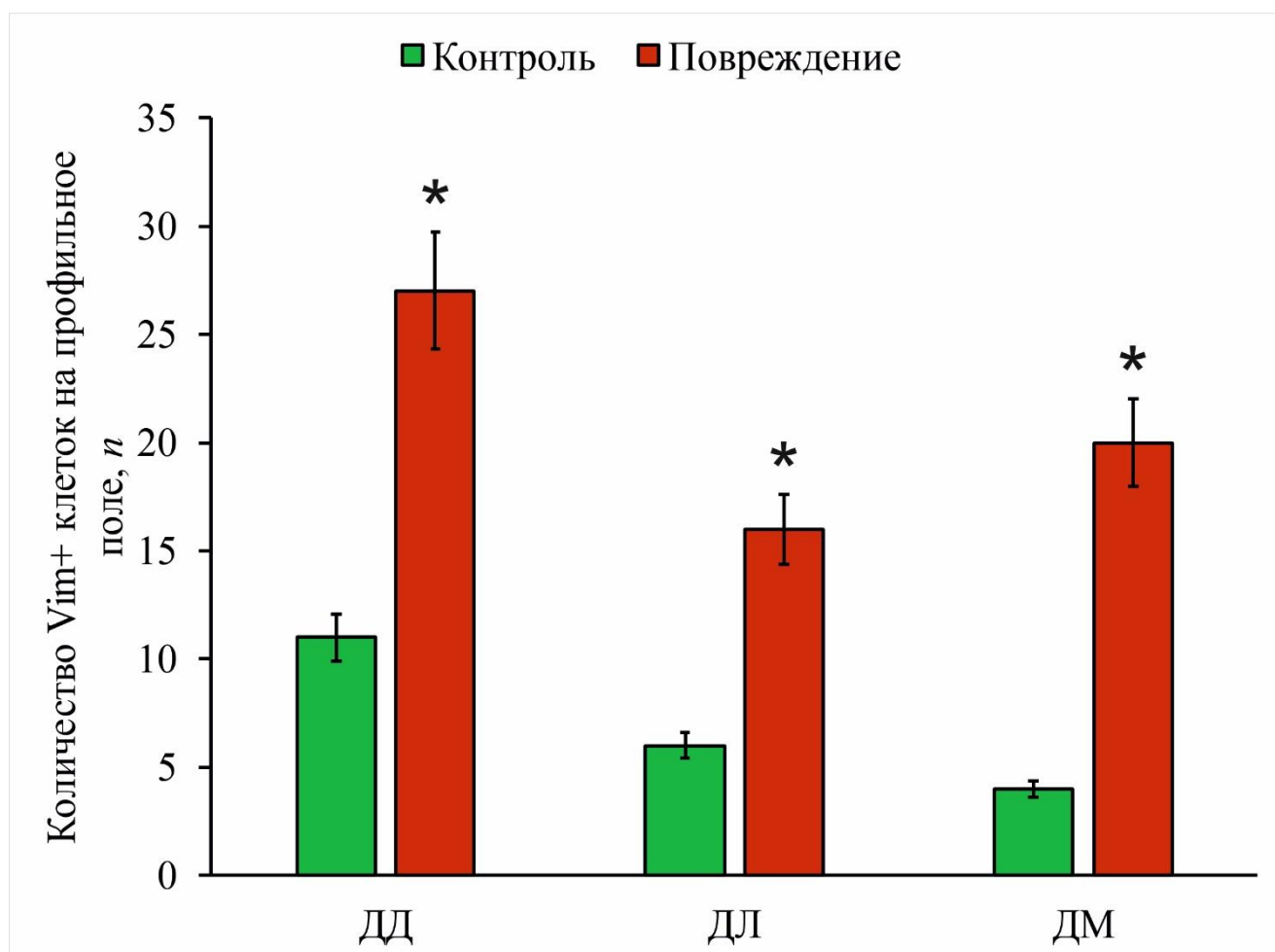


**Рисунок 15** – Локализация виментина в паллиуме молоди симы *Oncorhynchus masou* в норме (а) и после механической травмы (б, в, г); а, б – дорсальная (ДД), в – латеральная (ДЛ), г – медиальная (ДМ) зоны дорсального теленцефалона симы; прямоугольниками оконтурены врезки на рисунках, красными стрелками показаны интенсивно маркированные клетки, черными – интенсивно маркированные удлиненные клетки, зелеными стрелками – умеренно маркированные, желтыми – иммуномаркированные внеклеточные гранулы, белыми – волокна радиальной глии, пунктиром обозначена ПВЗ. Масштабный отрезок 100 мкм.

В ДЛ были идентифицированы скопления Vim+ клеток распространяющиеся



на расстояние до 130 мкм (рис. 15в, врезка). В составе скоплений различали интенсивно Vim<sup>+</sup> мелкие гранулы, Vim<sup>+</sup> клетки радиальной глии и негативные клетки (рис. 15в). В СВЗ можно было проследить фокусы схождения волокон Vim<sup>+</sup> РГ и разнонаправленные, организованные в виде пучков, отростки (рис. 15в). Иммунопозитивные скопления были разделены небольшими участками, содержащими негативные клетки (рис. 15в).



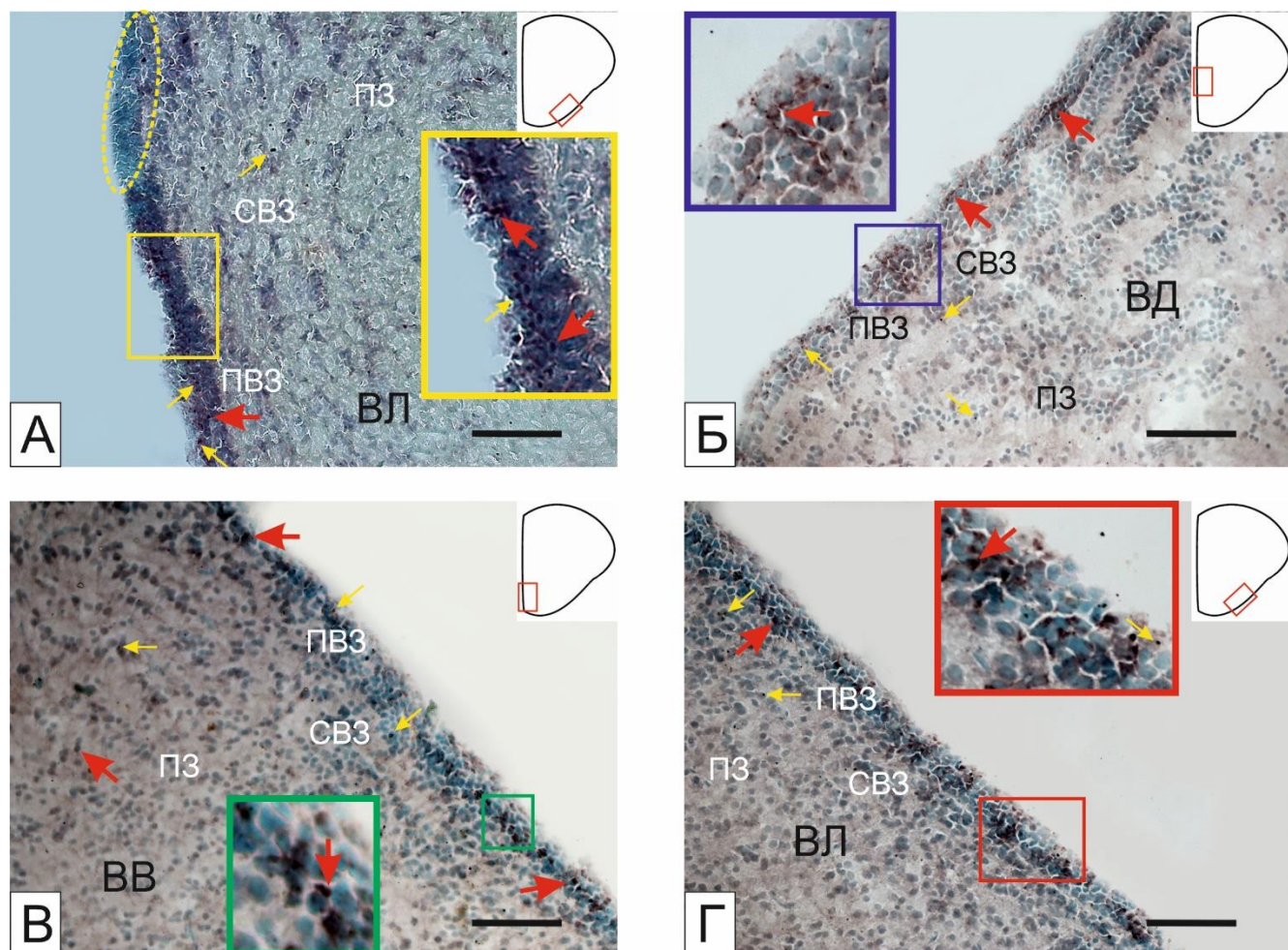
**Рисунок 16** – Соотношение виментин иммунопозитивных клеток в паллиуме теленцефалона *O. masou* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

**Таблица 9** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ ) виментин-иммунопозитивных клеток в дорсальной, латеральной и медиальной зонах паллиума молодежи симы *Oncorhynchus masou* в контроле и после механической травмы

Интактные животные			Травма											
			ДД			ДЛ			ДМ					
Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП			
9.2±0.5/ 8.6±0.4	ПВЗ	+++	3.2±0.6/ 2.1±0.3	ПЗ	+++	5.5±1.6/ 3.9±1	ПЗ	+++	—					
			8.6±1.3/ 5.9±0.9	ПВЗ	+++	11.2±0.4/ 8.0±0.3	ПВЗ	+++						
13.2±0.7/ 7.5±1.7	ПВЗ	+++	10.5±0.7/ 6.8±1.3	ПВЗ	+++	12.3±0.3/ 8.2±0.6	СВЗ	+++						
						17.3±0.3/ 8.4±1.0	ПВЗ	+++						
10.8±0.6/ 7.4±1.3	ПВЗ	++	9.0±0.7/ 6.5±0.9	ПВЗ	++	9.0±0.2/ 6.6±1.7	СВЗ	++				6.5±0.5/ 4.0±0.8	ПВЗ	++
9.1±0.4/ 7.8±0.5	ПВЗ	++	11.7±1.0/ 8.0±0.5	ПВЗ	++	11.2±0.6/ 7.3±0.3	ПВЗ	++				9.3±0.3/ 5.2±1.1	ПВЗ	++
						13.1±0.2/ 8.8±1.1	ПВЗ	++						
10.6±0.2/ 7.4±0.7	ПВЗ	+	—			—			5.9±0.4/ 3.7±0.4	СВЗ	+			
11.5±0.5/ 7.7±1.5	ПВЗ	+							7.7±0.5/ 6.0±0.7	ПВЗ	+			
									10.1±0.8/ 6.5±0.9	СВЗ	+			

В других случаях мы наблюдали мелкие интенсивно маркированные Vim<sup>+</sup> клетки, содержащие отростки (рис. 15в; табл. 9). Мы отнесли данный тип клеток к постэмбриональной популяции тканеспецифических стволовых клеток, имеющих фенотип радиальной глии (рис. 15в). Наблюдались Vim маркированные кластеры клеток в ПВЗ (рис. 15в, врезка). Такие кластеры содержали Vim<sup>+</sup> РГ, чьи волокна распространялись вглубь от СВЗ в более глубокие слои ПЗ (рис. 15в). Вдоль волокон РГ и в области их окончаний можно наблюдать отдельные высоко Vim-

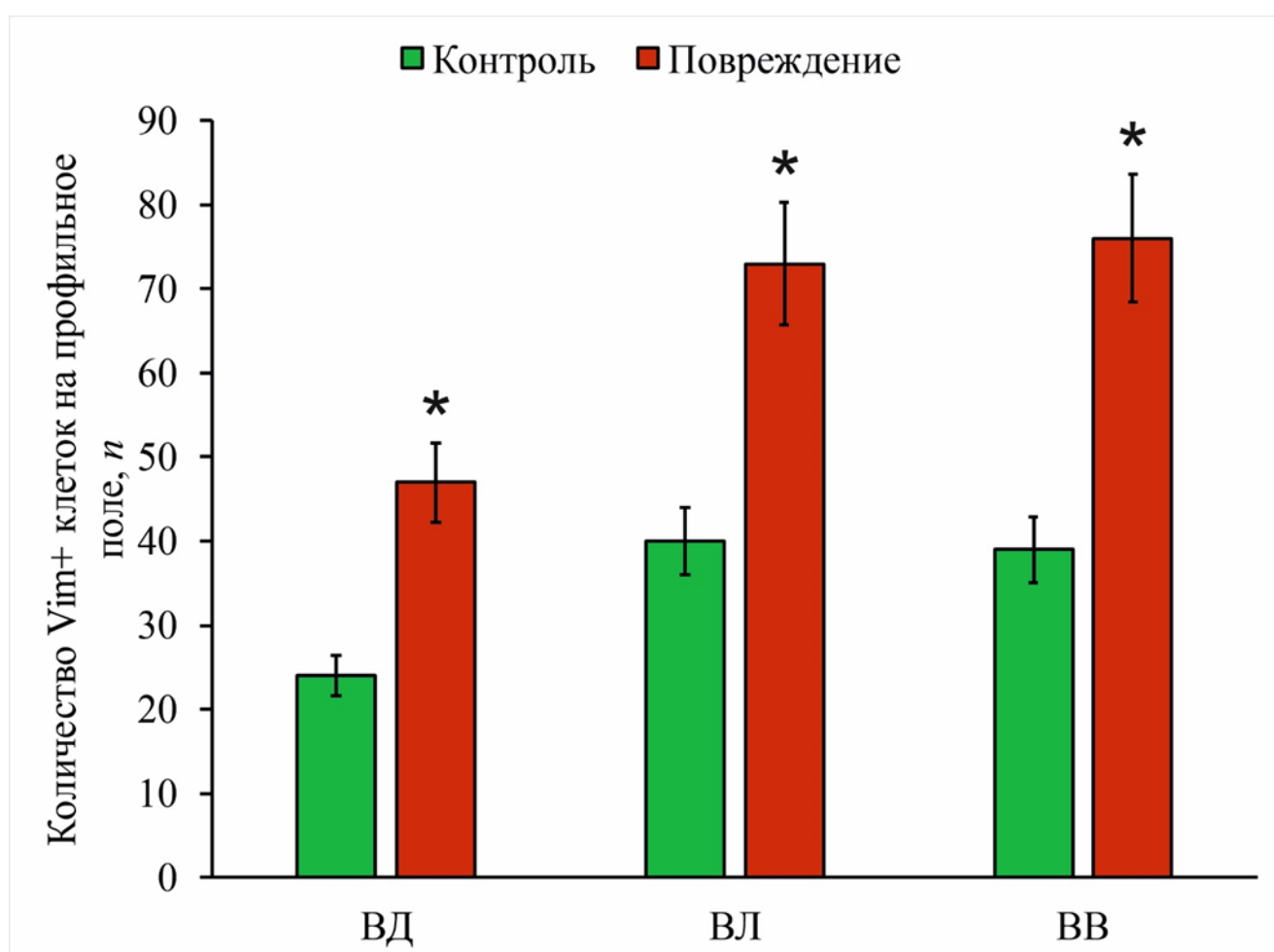
иммунопозитивные гранулы (рис. 15в). В ПЗ идентифицировали отдельные мелкие интенсивно Vim-маркированные клетки и многочисленные иммунопозитивные гранулы, имеющие внутриклеточную локализацию (рис. 15в).



**Рисунок 18** – Соотношение виментин иммунопозитивных клеток в субпаллиуме теленцефалона *O. masou* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

В ДМ после травмы выявлялись отдельные интенсивно либо умеренно Vim+ немногочисленные клетки, расположенные в ПВЗ (табл. 9). Клетки имеют иммунопозитивные включения, разрозненно расположенные в цитоплазме (рис. 15г). Также были выявлены небольшие Vim маркированные волокна ПГ,

распространяющиеся в ПЗ (рис. 15г). Vim+ клетки имеют округлую либо овальную форму (табл. 9). Оптическая плотность иммунопозитивных включений была слабой (табл. 9). В ДМ по сравнению с ДД и ДЛ количество Vim+ клеток и интенсивность иммунопозитивных включений после травмы была минимальна (рис. 15г, 16).



**Рисунок 18** – Соотношение виментин иммунопозитивных клеток в субпаллиуме теленцефалона *O. masou* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

В субпаллиальной области иммуномаркирование виментина у интактных животных было выявлено в ПВЗ (рис. 17а). Были идентифицированы интенсивно

маркированные внутриклеточные гранулоподобные включения виментина формирующие протяженные участки, чередующиеся с зонами иммунонегативности (рис. 17а). Наряду с групповыми паттернами распределения виментина в ПВЗ были выявлены отдельные гранулы (рис. 17а), в СВЗ определялись единичные Vim<sup>+</sup> клетки и гранулы (рис. 17а). В ПЗ были выявлены более обширные зоны, содержащие Vim<sup>+</sup> клетки и гранулы паренхиматозной локализации, расположенные в составе локальных скоплений иммунонегативных клеток (рис. 17а). Участки ПЗ не содержащие скопления мигрирующих клеток, как правило, содержали одиночные Vim<sup>+</sup> клетки и гранулы (рис. 17а).

**Таблица 10** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ ) CBS-иммунопозитивных клеток в дорсальной, вентральной и латеральной зонах субпаллиума молодежи симы *Oncorhynchus masou* в контроле и после механической травмы

Интактные животные			Травма								
			ВД			ВВ			ВЛ		
Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП
9.7±0.5/ 6.8±0.4	ПВЗ	+++	8.0±0.7/ 5.6±0.6	ПЗ	+++	6.4±0.3/ 4.2±0.4	ПЗ	+++	10.6±0.3/ 7.3±0.8	ПЗ	+++
			6.6±0.4/ 5.3±0.7	ПВЗ	+++	5.6±0.2/ 4.0±0.6	СВЗ	+++	8.6±0.2/ 5.3±0.2	ПВЗ	+++
			6.3±0.5/ 3.9±0.5	ПВЗ	+++				7.0±0.5/ 5.3±0.9	ПВЗ	+++
8.3±0.3/ 5.6±0.4	ПВЗ	++	9.3±0.6/ 6.5±0.6	ПВЗ	++	10.0±0.8/ 6.7±0.8	СВЗ	++	7.6±0.7/ 5.0±0.5	ПВЗ	++
7.3±0.3/ 5.3±0.7	СВЗ	++	7.9±0.2/ 5.7±0.8	СВЗ	++	8.1±0.5/ 4.9±0.5	СВЗ	++	5.9±0.5/ 4.3±0.3	СВЗ	++
			6.9±0.5/ 5.2±0.9	СВЗ	++	5.9±0.7/ 4.5±0.6	СВЗ	++			
6.3±0.5/ 4.6±0.8	ПВЗ	+	—			7.9±0.7/ 6.6±0.6	ПВЗ	+	—		

После травматического повреждения в ВД в составе ПВЗ были выявлены скопления умеренно маркированных Vim<sup>+</sup> клеток и тангенциально

ориентированных волокон, формирующих локальные реактивные кластеры, чередующиеся с иммунонегативными участками (рис. 17б). В ПВЗ в посттравматический период были выявлены паттерны тангенциальной миграции клеток (рис. 17б). В некоторых кластерах определялись фрагменты умеренно маркированных радиальных волокон в ПВЗ и разнонаправленный слабо маркированный нейропилль в СВЗ (рис. 17б). Для ВД в посттравматический период характерно псевдостратифицированное распространение клеточных слоев в СВЗ и ПЗ (рис. 17б). Пространство между клеточными слоями, как правило, содержало разнонаправленный слабо маркированный нейропилль (рис. 17б). В некоторых областях в межклеточном и внутриклеточном пространстве определялись интенсивно маркированные гранулы виментина (рис. 17б).

В вентральной субпаллиальной области в посттравматический период были выявлены локальные реактивные скопления интенсивно маркированных Vim<sup>+</sup> клеток в базальной части ПВЗ (рис. 17в). В апикальной и медиальной частях ПВЗ встречались одиночные либо организованные в небольшие кластеры скопления Vim<sup>+</sup> клеток (рис. 17в). В СВЗ были идентифицированы отдельные интенсивно и/или умеренно маркированные Vim<sup>+</sup> гранулы, маркирующие субвентрикулярные клетки разнонаправленный слабый маркированный нейропилль и волокна РГ (рис. 17в; табл. 10). В ПЗ встречались отдельные Vim<sup>+</sup> экстра и внутри клеточные гранулы (рис. 17в).

В ВЛ в ПВЗ были выявлены скопления и одиночные клетки содержащие интенсивно маркированные гранулы виментина организованные в виде реактивных клеточных групп (рис. 17г). На ряду с нейроэпителиальными были выявлены паттерны локализации виментина в клетках радиальной глии, отсутствующие у интактных животных (рис. 17а, г). В некоторых областях Vim<sup>+</sup> позитивные гранулы локализовались в базальной части ПВЗ (рис. 17г). В отдельных случаях в базальной части ПВЗ были идентифицированы реактивные Vim<sup>+</sup> скопления клеток (рис. 17г). Плотность распределения иммунонегативных клеток в таких участках, была повышенной по сравнению с областями гранулярной экспрессии (рис. 17г). Умеренно и слабо маркированные волокна радиальной глии

были выявлены на территории СВЗ и более глубоких паренхиматозных слоях (рис. 17г). В СВЗ и ПЗ были выявлены скопления слабо и умеренно иммуномаркированных клеток с цитоплазматической локализацией виментина (рис. 17г; табл. 10). Тем не менее, в СВЗ и ПВЗ были идентифицированы одиночные интенсивно маркированные гранулы экстраклеточной локализации (рис. 17г).

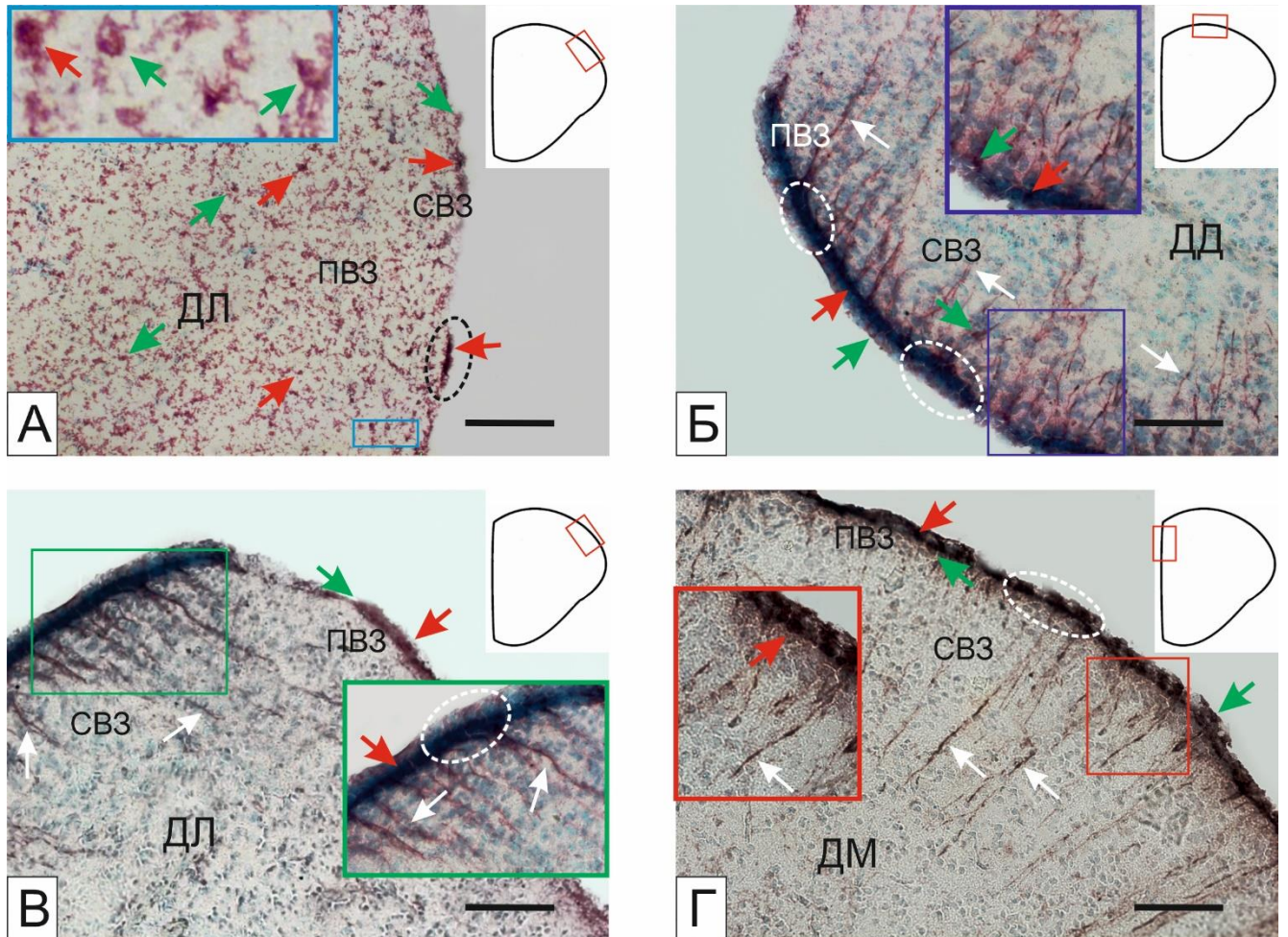
Таким образом, в результате травматического повреждения в субпаллиуме достоверно изменилось число Vim<sup>+</sup> клеток в латеральной и вентральной областях ( $P < 0,05$ ) (рис. 18). В ВД количество Vim<sup>+</sup> в посттравматическом периоде несколько повышалось, однако достоверного отличия выявлено не было (рис. 18). Во всех областях субпаллиума через одну неделю травматического повреждения тотальное иммуномаркирование виментина клеток в ПВЗ заменялось на гранулярный паттерн Vim иммунораспределения распространяющийся из ПВЗ в СВЗ и более глубокие паренхиматозные слои мозга.

### **3.7. Глутаминсинтетаза в паллиуме интактной кеты и после травматического повреждения**

В паллиуме молодежи кеты маркирование ГС у интактных животных было выявлено в отдельных клетках ПВЗ, формирующих участки протяженностью до 300 мкм в виде прерывающегося монослоя, либо включающие небольшие скопления иммунопозитивных клеток (рис. 19а). Маркирование ГС было обнаружено в мелких нейроэпителиальных интенсивно маркированных клетках округлой либо овальной формы лишенных отростков (рис. 19а; табл. 11). В СВЗ были выявлены единичные ГС маркированные клетки, а в более глубоких паренхиматозных слоях (ПЗ) были обнаружены отдельные интенсивно и умеренно маркированные ГС клетки (рис. 19а; табл. 11). Немногочисленные интенсивно маркированные клетки более крупных размеров были выявлены в паренхиме (рис. 19а).

В ДД мелкие, интенсивно маркированные ГС<sup>+</sup> клетки нейроэпителиального типа располагались над слоем иммунонегативных клеток в ПВЗ (табл. 11). В СВЗ

встречались отдельные мелкие клетки с умеренным маркированием ГС, изредка формирующие небольшие скопления (табл. 11). В более глубоких слоях (ПЗ) выявлялись гетерогенные клеточные комплексы, включающие иммунонегативные клетки, контактирующие с кластерами мелких умеренно маркированных ГС+ клеток и/или нервных окончаний (рис. 19а). В ДД число ГС+ клеток было сравнительно высоким (рис. 20).



**Рисунок 19** – Локализация глутаминсинтетазы в паллиуме молоди кеты *Oncorhynchus keta* в норме (а) и после механической травмы (б, в, г); а, в – латеральная (ДЛ), б – дорсальная (ДД), г – медиальная (ДМ) зоны дорсального теленцефалона симы; прямоугольниками околнурены врезки на рисунках, красными стрелками показаны интенсивно маркированные клетки, зелеными – умеренно маркированные, белыми – волокна радиальной глии. Черным пунктиром обозначено скопление иммунопозитивных клеток в ПВЗ, белым – реактивные нейрогенные ниши. Масштабный отрезок 100 мкм.

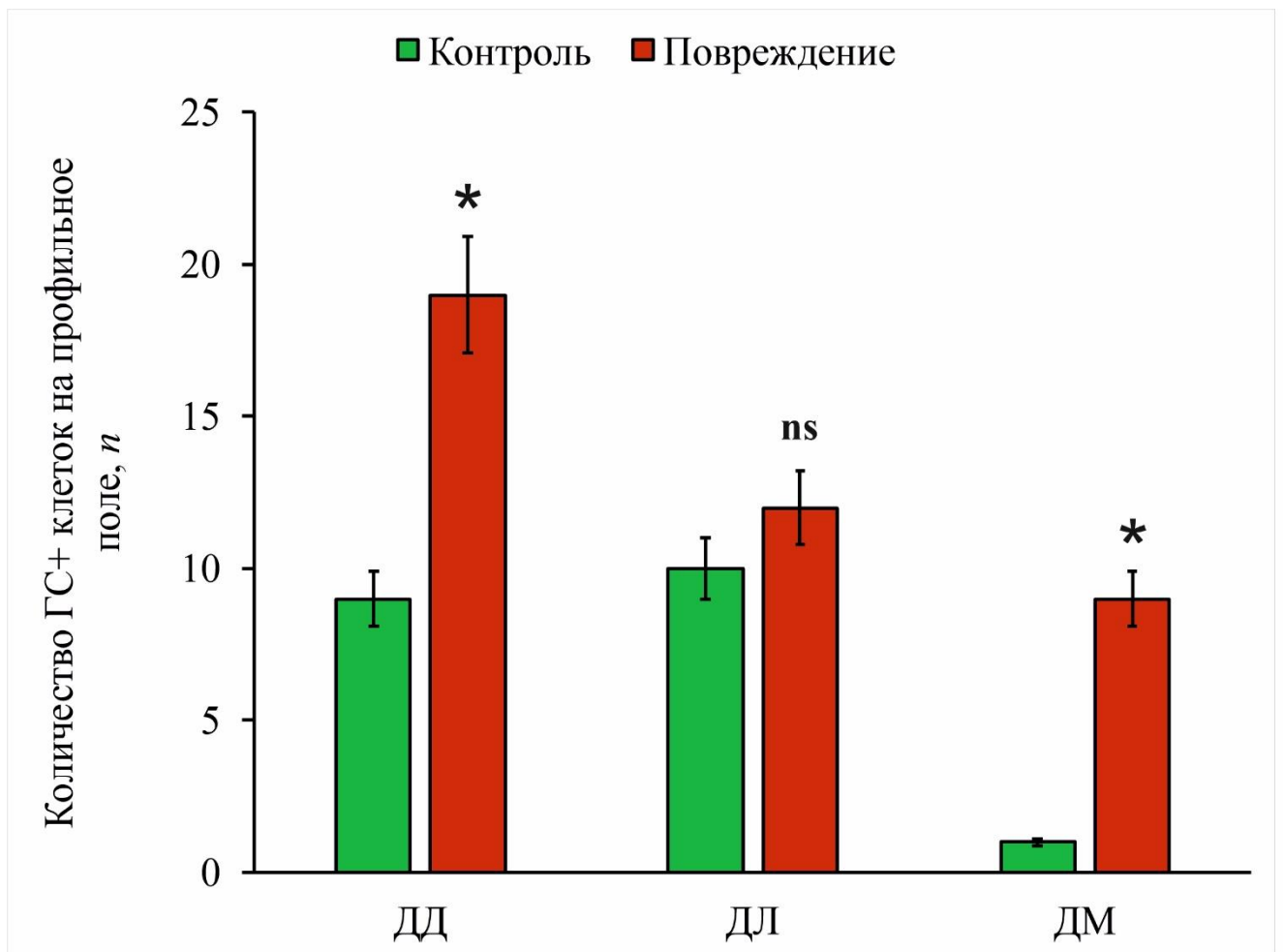


В ДЛ были обнаружены единичные мелкие клетки, расположенные в базальной части ПВЗ (рис. 19а, табл. 11). В ПВЗ часто преобладали паттерны распределения мелких умеренно маркированных ГС клеток и цитоплазмы нейроэпителиальных клеток окружающей иммунонегативные ядра (рис. 19а, врезка). В глубоких слоях ПЗ были найдены овальные и мелкие умеренно маркированные ГС клетки и многочисленные локальные скопления ГС-негативных клеток, формировавших конститутивные нейрогенные ниши паренхиматозной локализации (рис. 19а). В ДЛ было выявлено максимальное количество ГС+ клеток (рис. 20).

В ДМ было характерно наличие иммунопозитивных гранул и более интенсивно маркированных нейроэпителиальных клеток, организованных в виде небольших групп, чередующихся с менее протяженными, чем в ДД иммунонегативными участками (рис. 19а, табл. 11), часть клеток проникала в СВЗ (рис. 19а). В ПВЗ были выявлены небольшие кластеры клеток, маркированные ГС, формирующие плотные поверхностные образования в составе нейроэпителия (рис. 19а). В более глубоких (ПЗ) слоях ДМ мы также выявляли отдельные интенсивно маркированные клетки округлой формы (рис. 19а, табл. 11). В ДМ количество ГС+ клеток было минимальным среди всех паллиальных зон (рис. 20).

После травматического повреждения в конечном мозге молодежи кеты было зарегистрировано появление ГС+ клеток с фенотипом радиальной глии (рис. 19б, в, г; табл. 11). У интактных особей преобладающим типом ГС+ клеток были клетки нейроэпителиального типа (рис. 19а; табл. 11). Мы полагаем, что в результате травматического повреждения произошла активация ГС+ радиальной глии, что следует рассматривать как посттравматический ответ у животных данной возрастной группы молодежи кеты и возможно носит видоспецифический характер. Через 3 суток после травмы паттерны распределения радиальной глии в паллиуме молодежи кеты дополнялись интенсивной миграцией клеток и возникновением дополнительных реактивных нейрогенных ниш (рис. 19б, в, г). Радиальная глия после травмы была выявлена на различном расстоянии от ПВЗ, и была представлена как отдельными волокнами, так и пучками ГС+ волокон (рис. 19б, в,

г).



**Рисунок 20** – Соотношение ГС иммунопозитивных клеток в паллиуме теленцефалона *O. keta* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звёздочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп, ns – достоверных отличий не выявлено). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

В области ДД, расположенной рядом с ДМ после травмы, было выявлено появление реактивных нейрогенных ниш гетерогенного клеточного состава (рис. 19б). В некоторых случаях в ПВЗ регистрировали дискретные ГС-маркированные области, содержащие небольшие реактивные интенсивно маркированные ГС+ кластеры либо отдельные клетки (рис. 19б, табл. 11). Популяции ГС+ клеток в таких областях отличались морфологической гетерогенностью и различной

интенсивностью маркирования ГС (рис. 19б, табл. 11). Клетки без радиальных отростков умеренно либо интенсивно маркированные ГС располагались в базальной части ПВЗ (рис. 19б, табл. 11). Тонкие ГС+ волокна имели преимущественно диффузный паттерн распределения (рис. 19б).

**Таблица 11** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ ) ГС-иммунопозитивных клеток в дорсальной, латеральной и медиальной зонах паллиума молодежи кеты *Oncorhynchus keta* в контроле и после механической травмы

Интактные животные			Травма								
			ДД			ДЛ			ДМ		
Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП
7.9±0.6/ 4.2±0.6	ПВЗ, ПЗ	+++	4.5±0.5/ 4.3±0.3	ПВЗ	+++	7.0±0.2/ 4.2±0.2	СВЗ, ПВЗ	+++	4.6±0.5/ 4.2±0.4	ПВЗ	+++
7.7±0.8/ 6.3±0.6	ПВЗ, ПЗ, СВЗ	+++	7.8±0.9/ 5.5±0.9*	ПВЗ	+++				7.8±0.9/ 5.5±0.9*	ПВЗ	+++
4.4±0.5/ 4.2±0.3	ПВЗ, СВЗ	+++	8.1±0.6/ 6.2±0.5	ПВЗ	+++	8.1±0.7/ 5.7±0.6*	ПВЗ	+++	8.3±0.5/ 5.8±0.8	ПВЗ	+++
1.5±0.2/ 1.2±0.1	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	+++	7.8±0.8/ 6.3±0.4*	ПВЗ	+++				8.3±0.5/ 5.8±0.8	ПВЗ	+++
1.3±0.2/ 1.1±0.1	СВЗ, ПЗ	++	7.3±0.9/ 5.7±0.9	ПВЗ, СВЗ	++	4.7±0.3/ 4.4±0.2	ПВЗ	++	4.5±0.5/ 4.3±0.3	ПВЗ	++
4.6±0.6/ 4.1±0.4	СВЗ, ПВЗ, ПЗ	++	7.8±0.6/ 5.9±0.5	СВЗ	++	6.8±0.3/ 4.3±0.2	СВЗ	++	7.2±0.8/ 5.5 ±0.7*	ПВЗ, СВЗ	++

В ДД, интенсивно маркированные клетки РГ, включали базальные и апикальные отростки, оканчивающиеся в ПВЗ концевой ножкой (рис. 19б). Такие клетки формировали плотные кластеры в ПВЗ, причем тела ГС+ клеток часто контактировали с отростками близлежащих клеток (рис. 19б). В СВЗ и ПЗ были выявлены кластеры ГС- нейробластов (рис. 19б, табл. 11). Радиальные отростки ГС+ клеток в большинстве случаев проникали на значительное расстояние в глубокие слои ДД (рис. 19б). Были выявлены очень крупные скопления ГС-

нейробластов в ПЗ, к которым подходили радиальные волокна из СВЗ (рис. 19б). Очевидно, паттерны миграции нейробластов вдоль отростков РГ были направлены в область травмы. Наши наблюдения показали наличие корреляций между объёмом РНН и паттерном распределения волокон РГ: из более крупных РНН отходили более объёмные пучки волокон РГ (рис. 19б). Вдоль некоторых пучков отростков РГ были идентифицированы отдельные умеренно маркированные ГС+ клетки (рис. 19б, табл. 11).

Наряду с вновь появившейся ГС+ радиальной глией во всех субрегионах ДД мы идентифицировали гетерогенную популяцию плотно окрашенных клеток без отростков, локализованных в базальной части ПВЗ (рис. 19б, табл. 11). Мы полагаем, что такие клетки являлись нейроэпителиальными, либо они представляли популяцию клеток, образованных в результате ассиметричного митоза, втянувших отросток путём сомальной транслокации.

После травмы интенсивность иммуномаркирования ГС значительно возрастала как в интенсивно маркированных, так и умеренно маркированных клеток ( $p < 0.05$ ), по сравнению с контрольными животными (рис. 20). В посттравматический период в ДД наблюдалась значительная гипертрофия ГС-нейроэпителиа в ПВЗ и СВЗ, такие клетки интенсивно окрашивались метиловым зеленым и имели высокий индекс ядерно-цитоплазматических отношений (рис. 19б, 20; табл. 11). Цитоплазма клеток отличалась высокой базофилией (рис. 19б).

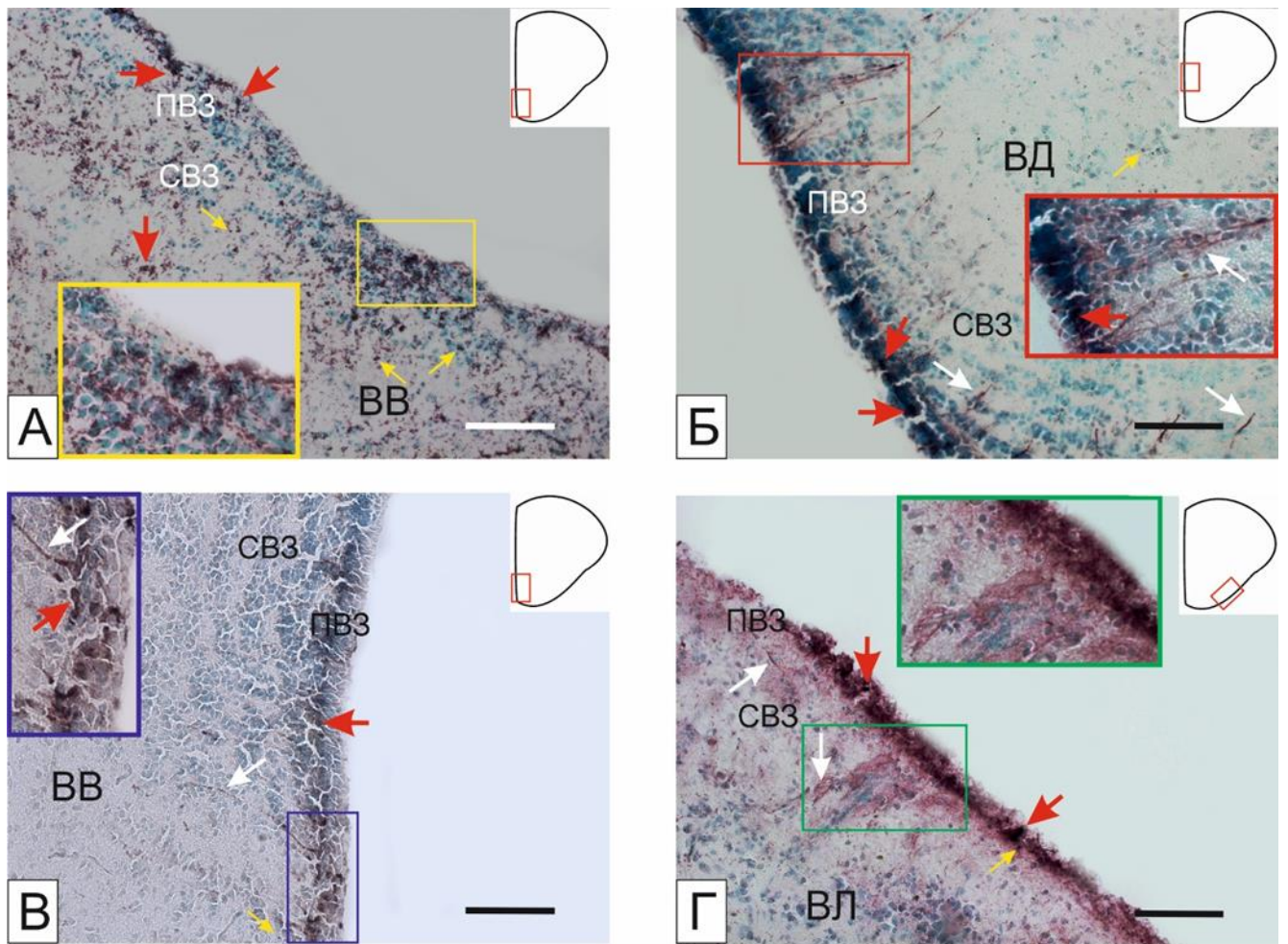
В ДЛ ГС+ клетки формировали монослой, сходный по структурной организации с таковым в ДД (рис. 19б, в). В ряде случаев в ДЛ отчетливо визуализировались ГС+ радиальная глия, но типичная структура РНН выявлена не была (рис. 19в). Были выявлены наиболее крупные и протяженные волокна РГ, организованные в пучки (рис. 19в). В посттравматический период в плотность распределения ГС+ клеток в СВЗ и более глубоких ПЗ значительно возрастала (рис. 19в). Наряду с радиально ориентированными паттернами, в ДЛ встречались паттерны тангенциально ориентированных ГС+ волокон, вдоль которых наблюдалась обширная миграция гетерогенной популяции клеток (рис. 19в). Для ДЛ зоны было характерно наличие ГС+ нейроэпителиальных клеток (рис. 19в, табл.

11). Также была выявлена плотная популяция ГС+ РГ с длинными отростками, глубоко распространяющимися в ПЗ (рис. 19в).

В ДМ сохранялся диффузный паттерн распределения ГС+ радиальной глии (рис. 19г, табл. 11). В ПВЗ встречались плотно либо умеренно маркированные ГС+ клетки нейроэпителиального типа (рис. 19г, табл. 11). В ПВЗ были определены небольшие ГС+ РНН нейроэпителиального типа, разделенные иммунонегативными участками (рис. 19г). В отдельных участках ДМ типичная структура РНН была не ясно выражена, и была представлена отдельными, либо парными ГС+ клетками, формирующими прерывистый слой (рис. 19г). В отдельных областях СВЗ можно было проследить ГС+ нейропил и мигрирующие вдоль волокон РГ ГС+ клетки (рис. 19г). Наиболее отчетливо прослеживались паттерны миграции вдоль ГС+ РГ (рис. 19г).

В субпаллиальной области теленцефалона молодежи в норме ГС была выявлена в составе интенсивно маркированных клеточных групп в ВД (рис. 21а, табл. 12), а также в апикальной части ПВЗ в одиночно расположенных клетках, чередующихся с ГС-негативными нейронами (рис. 21а, табл. 12). Небольшие умеренно и интенсивно ГС+ клетки были распределены в составе клеточных масс ВД (рис. 21а, табл. 12).

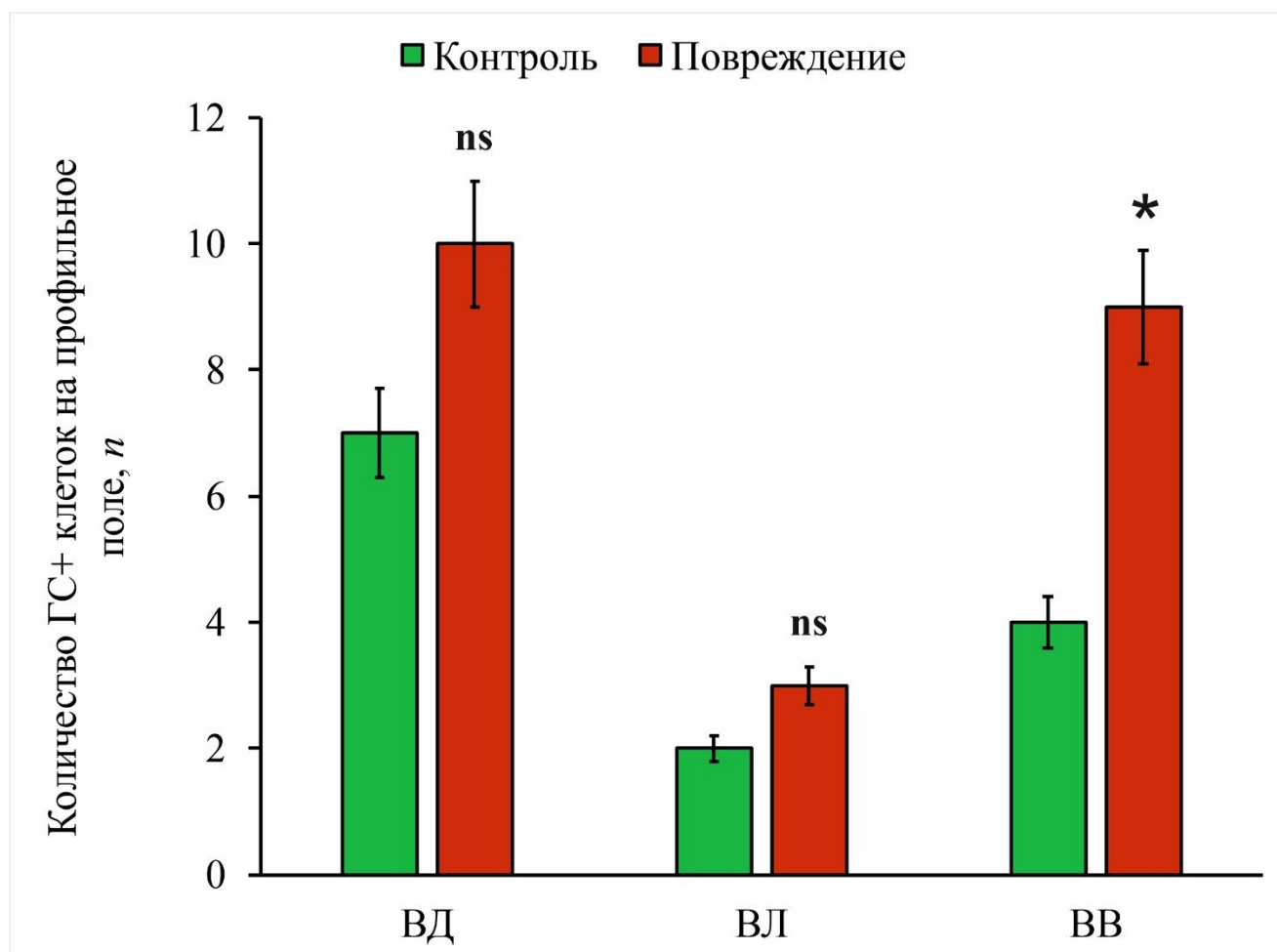
Паттерны распределения ГС+ РНН в ВД, содержащие иммунопозитивную РГ, несколько напоминают таковой в ДД (рис. 19а, 21а). В частности, были выявлены многочисленные нейроэпителиальные скопления клеток в ПВЗ и СВЗ (рис. 21а), количество РГ было снижено по сравнению с ДД. В вентральной части дорсального ядра (ВД) вдоль ГС+ волокон РГ были найдены мигрирующие иммунопозитивные клетки (рис. 21а, табл. 12). В некоторых случаях в ПВЗ отмечались участки, содержащие удлиненные ГС+ клетки, над которыми выявлялся слой ГС-нейроэпителиальных клеток (рис. 21а, табл. 12).



**Рисунок 21** – Локализация глутаминсинтетазы в субпаллиуме молоди кеты *Oncorhynchus keta* в норме (а) и после механической травмы (б, в, г); а, в – вентральная (ВВ), б – дорсальная (ВД), г – латеральная (ВЛ) зоны вентрального теленцефалона симы; прямоугольниками околочены врезки на рисунках, красными стрелками показаны интенсивно маркированные клетки, желтыми – иммуномаркированные внеклеточные гранулы, белыми – волокна радиальной глии. Масштабный отрезок 100 мкм.

В ВВ были выявлены одиночные либо парные умеренно маркированные клетки в апикальной части ПВЗ (рис. 21а, табл. 12). Одиночные интенсивно маркированные удлиненные клетки имели слабо развитые отростки (рис. 21а, табл. 12). Другой тип клеток псевдоуниполярной формы с иммунонегативным ядром встречался в СВЗ и проникал в более глубокие слои ПЗ, очевидно также принадлежал к мигрирующей популяции (рис. 21а, табл. 12). Парные, умеренно

маркированные ГС клетки овальной формы были локализованы в поверхностной части ПВЗ (рис. 21а, табл. 12). В СВЗ были выявлены скопления интенсивно маркированных гранулоподобных субклеточных элементов, размерами от 8,5 до 18 мкм (рис. 21а, табл. 12).



**Рисунок 22** – Соотношение ГС иммунопозитивных клеток в субпаллиуме теленцефалона *O. keta* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп, ns – достоверных отличий не выявлено). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

В ВЛ визуализировались отдельные мелкие интенсивно маркированные клетки в ПВЗ; в более глубоких слоях ПЗ определялись интенсивно маркированные скопления и отдельные более крупные клетки (рис. 21а, табл. 12). Во всех зонах

были представлены умеренно маркированные гранулы и клетки двух типов (табл. 12).

Анализ денситометрической активности ГС показали, что между группами интенсивно, умеренно маркированных клеток и иммунонегативными клетками в теленцефалоне молоди кеты существуют достоверные ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) межгрупповые отличия (рис. 22).

В ВЛ преобладали скопления ГС+ нейроэпителиальных клеток в ПВЗ (рис. 21а), число РГ было очень незначительно. Помимо этого, были выявлены единичные ГС+ клетки нейроэпителиального типа в ПВЗ (рис. 21а).

**Таблица 12** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ ) ГС-иммунопозитивных клеток в дорсальной, вентральной и латеральной зонах субпаллиума молоди кеты *Oncorhynchus keta* в контроле и после механической травмы

Интактные животные			Травма								
			ВД			ВВ			ВЛ		
Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП
1.3±0.3/ 1.2±0.3	СВЗ	+++	4.5±0.5/ 3.7±0.3	ПВЗ	+++	4.4±0.6/ 3.8±0.3	ПВЗ	+++	5.1±0.5/ 3.9±1.1	ПЗ	+++
5.2±0.6/ 3.5±0.5	ПВЗ	+++	9.3±0.7/ 3.8±0.3	ПВЗ	+++	8.3±0.5/ 5.8±0.6	ПВЗ	+++			
7.4±0.4/ 6.6±0.3	ПВЗ, ПЗ	+++	7.8±0.5/ 5.8±0.5*	ПВЗ	+++	7.8±0.5/ 5.8±0.5*	ПВЗ	+++			
1.2±0.2/ 0.9±0.3	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	++	4.6±0.4/ 3.7±0.4	ПВЗ	++	7.8±0.6/ 6.1±0.6	СВЗ, ПЗ	++	4.5±0.3/ 3.7±0.2	СВЗ	++
5.1±0.3/ 4.5±0.4	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	++	8.7±0.7/ 4.1±0.3	СВЗ	++				6.5±0.3/ 4.4±0.4	СВЗ	++
7.6±0.4/ 6.6±0.4	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	++							8.1±0.5/ 5.4±0.5*	ПВЗ	++

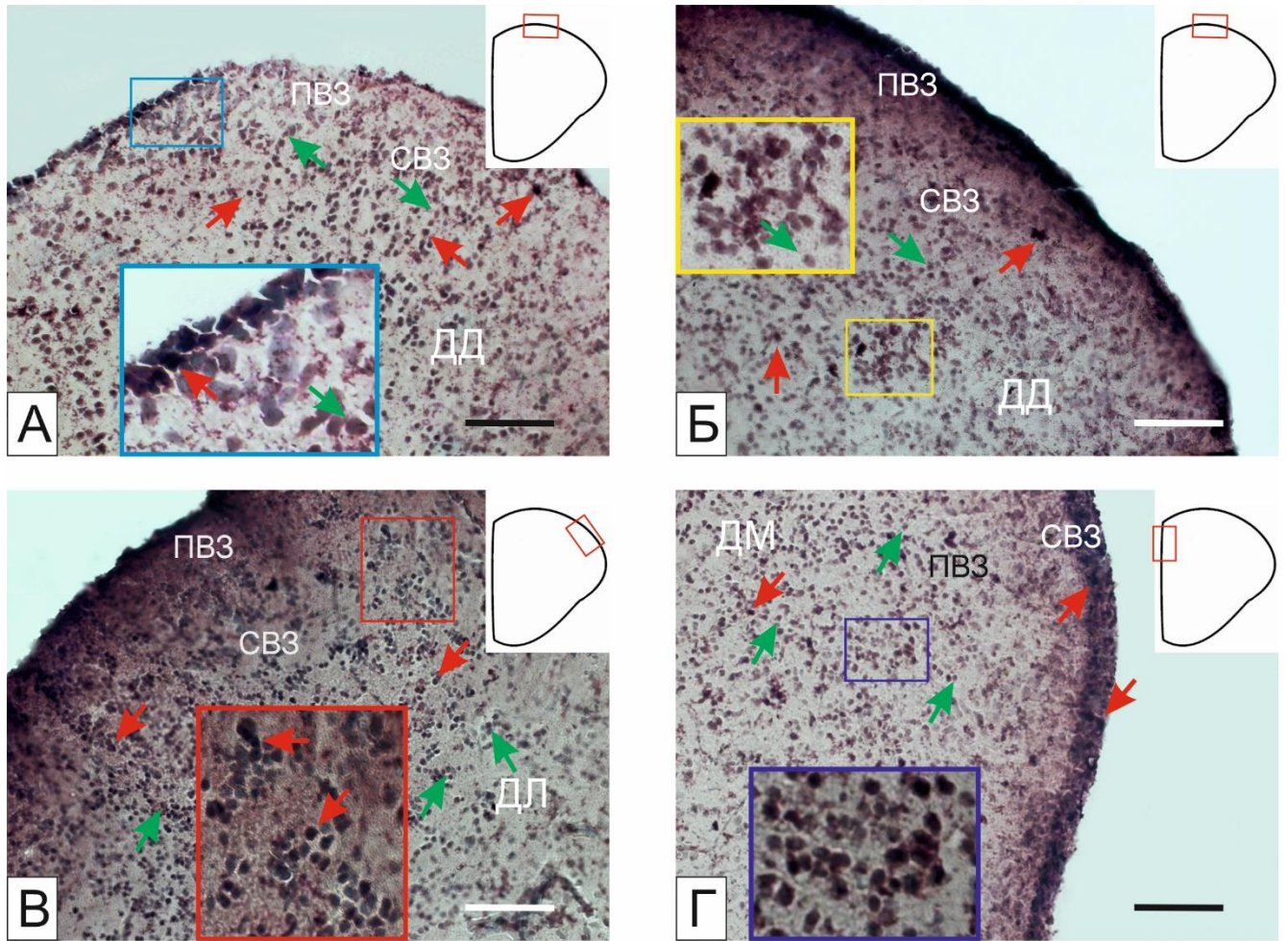


В вентральном ядре субпаллиума были обнаружены РНН смешанного типа, содержащие крупные плотно окрашенные ГС+ группы нейроэпителиальных клеток, волокна РГ и отдельные умеренно маркированные клетки паренхиматозной локализации (рис. 21а, табл. 12). В ВВ обнаруживались крупные скопления иммунонегативных клеток в СВЗ (рис. 21а, табл. 12). Также были выявлены немногочисленные иммуномаркированные волокна РГ, отдельные ГС+ скопления нейроэпителиальных клеток в ПВЗ и высокая концентрация иммунонегативных клеток в ПЗ (рис. 21а, табл. 12).

Анализ количественного распределения ГС+ клеток в контроле и после травмы показал, что в ДД, ДМ, ВВ и ВЛ существуют достоверные отличия ( $p < 0.05$ , что в ДД, ВВ и ВЛ и ДМ,  $p < 0.01$ ) от контрольных (интактных) животных (рис. 22). Соотношение между ГС-иммунопозитивными и негативными клетками во всех областях паллиума и субпаллиума после травмы представлены на рисунке 22.

### **3.8. Экспрессия CBS в паллиуме интактной кеты и после травматического повреждения**

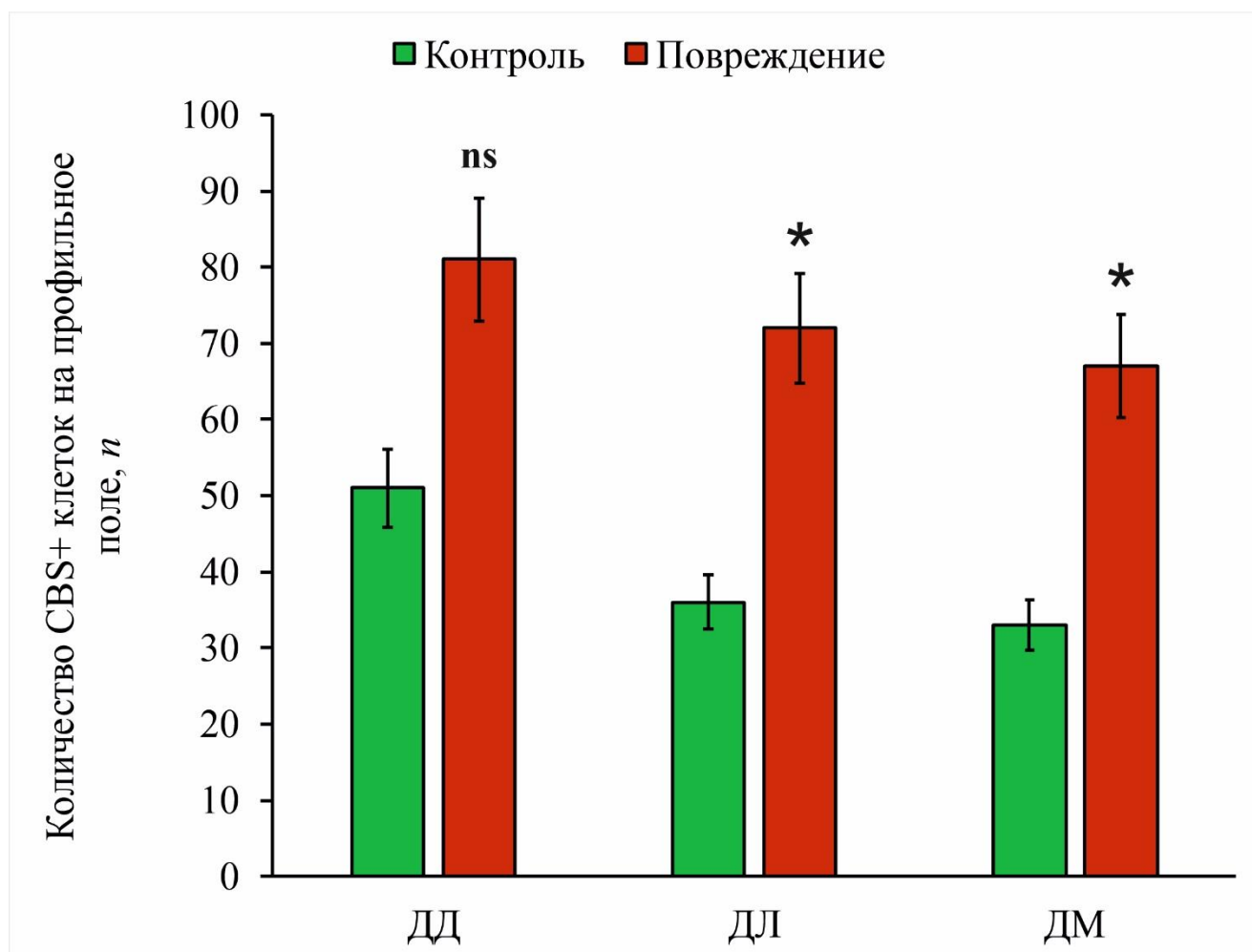
В паллиуме интактной кеты маркирование CBS было выявлено в ДД, ДЛ, ДМ зонах (рис. 23а). Интенсивность иммуномаркирования в клетках отличалась, было выделено два уровня иммуноокрашивания: высокий, при котором интенсивно окрашивались ядро и цитоплазма клетки, и умеренный, когда наблюдалось менее интенсивное маркирование цитоплазмы клеток (рис. 23а, табл. 13). Часть клеток, ядра которых окрашивались метиловым зеленым, была CBS-иммунонегативной. В дорсальной зоне (ДД) в ПВЗ маркирование CBS было выявлено в овальных и/или мелких округлых клетках (рис. 23а; табл. 13). В ДМ у некоторых иммунопозитивных клеток прослеживались проксимальные участки радиально направленных отростков (рис. 23а). Отличия в размерах и морфологии CBS+ клеток были выявлены в ДД (табл. 13), в ДЛ и ДМ иммунопозитивные клетки были морфологически сходными (табл. 13).



**Рисунок 23** – Локализация цистатионин- $\beta$ -синтазы в паллиуме молодежи кеты *Oncorhynchus keta* в норме (а) и после механической травмы (б, в, г); а, б – дорсальная (ДД), в – латеральная (ДЛ), г – медиальная (ДМ) зоны дорсального теленцефалона симы; прямоугольниками околнурены врезки на рисунках, красными стрелками показаны интенсивно маркированные клетки, зелеными – умеренно маркированные. Масштабный отрезок 100 мкм.

Особенности маркирования клеток во всех зонах дорсальной области позволили выделить, как единичные иммуномаркированные клетки, так и небольшие CBS+ скопления в ПВЗ, чередующиеся с протяженными участками лишенными CBS-иммунопозитивности (рис. 23а). Такой паттерн распределения иммунопозитивных/иммунонегативных клеток был характерен для ДД и ДМ (рис. 23а). В ДЛ был выявлен диффузный паттерн CBS-иммуномаркирования, при котором в ПВЗ встречались отдельные скопления CBS+ клеток, в СВЗ количество

иммунопозитивных клеток было ограничено и в ПЗ распределение умеренно маркированных CBS было однородным (рис. 23а). В целом у контрольных животных в ПВЗ в дорсальной зоне CBS+ клетки формировали монослой (рис. 23а). Максимальная плотность распределения интенсивно и умеренно маркированных клеток была выявлена в ДД, в ДЛ и ДМ показатели были несколько ниже (рис. 23а). Максимальное количество CBS+ клеток было выявлено в ДД (рис. 23а).



**Рисунок 24** – Соотношение CBS иммунопозитивных клеток в паллиуме теленцефалона *O. keta* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп, ns – достоверных отличий не выявлено). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

**Таблица 13** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ ) CBS-иммунопозитивных клеток в дорсальной, латеральной и медиальной зонах паллиума молодежи кеты *Oncorhynchus keta* в контроле и после механической травмы

Интактные животные			Травма								
			ДД			ДЛ			ДМ		
Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП
4.5±0.5/ 4.3±0.2	ПВЗ, СВЗ	+++	6.7±0.3/ 5.1±0.6	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	+++	5.6±0.7/ 5.1±0.4	ПВЗ	+++	5.9±0.9/ 4.8±0.5	ПВЗ, СВЗ	+++
7.5±0.9/ 6,6±0.8	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	+++				7.8±0.7/ 5.5±0.4			ПЗ		
1.4±0.2/ 1.1±0.2	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	++	7.3±0.9/ 5.7±0.9	СВЗ, ПЗ	++	5.7±0.8/ 4.4±0.3	СВЗ, ПЗ	++		5.5±0.5/ 4.7±0.3	ПВЗ, СВЗ
4.5±0.5/ 4.3±0.5	СВЗ ПВЗ	++							8.0±0.4/ 5.9±0.4	ПЗ	
8.1±0.3/ 6.1±0.7	ПЗ	++									
9.4±1.2/ 7.1±0.8,	СВЗ ПВЗ ПЗ	++									

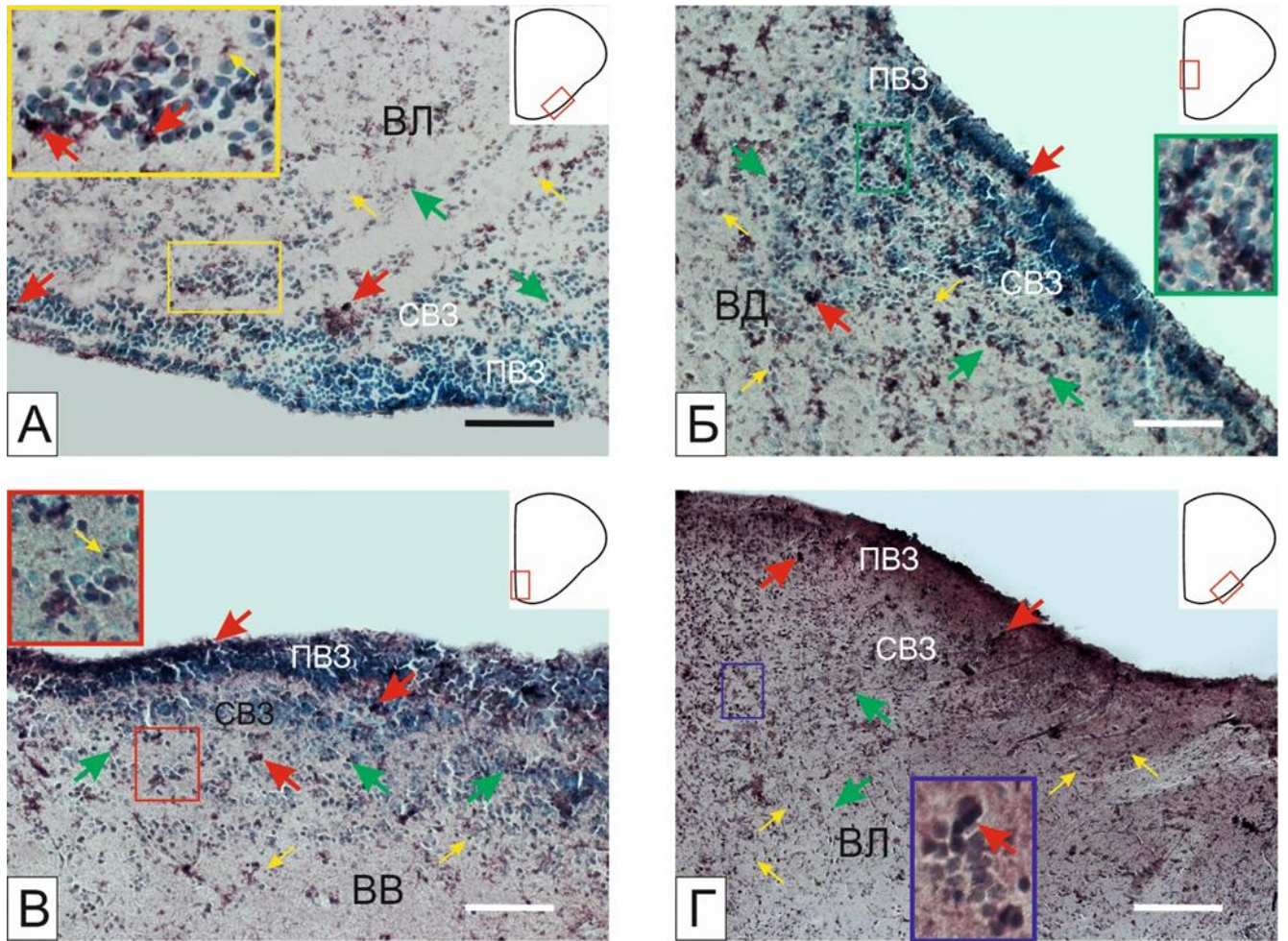
После повреждения конечного мозга, количество CBS маркированных клеток в ПВЗ паллиума и субпаллиума значительно возросло по сравнению с контрольными животными (рис. 23). Количественная оценка CBS+ клеток во всех областях паллиума и субпаллиума через 3 суток после травмы теленцефалона показала достоверное увеличение числа иммунопозитивных клеток во всех зонах паллиума ( $p < 0.05$ ) (рис. 23). В соотношении числа CBS+ интенсивно/умеренно маркированных клеток у интактных животных преобладали умеренно маркированные клетки (рис. 23а, 24). Однако, в остром периоде после травмы, это соотношение значительно изменилось, за счет увеличения количества интенсивно маркированных клеток (рис. 23б, в, г, 24; табл. 13). Сравнительное исследование уровня оптической плотности интенсивно/умеренно маркированных клеток у

контрольных животных и после травмы показало достоверные межгрупповые отличия ( $p < 0.05$ ) в популяциях интенсивно/умеренно маркированных клеток (рис. 23).

Паттерн распределения CBS+ клеток в ДД, ДМ и ДЛ был представлен многорядным пластом интенсивно маркированных клеток значительной протяженности, прерывающимся на границе паллиальных зон (рис. 23б, в, г). CBS+ клетки в паллиальных областях встречались обособленно, либо в составе гетерогенно маркированного пласта, содержащего клетки различного размера и морфологии (рис. 23б, в, г; табл. 13).

В ДМ регистрировались небольшие скопления CBS+ клеток в составе ПВЗ и СВЗ (рис. 23г); возрастало количество маркированных клеток паренхиматозной локализации, расположенных дискретно либо формирующих небольшие кластеры (рис. 23г). В ДД увеличивалось число CBS+ клеток в СВЗ (рис. 23б), возрастала морфологическая гетерогенность клеток этой области (рис. 23б; табл. 13). В ДЛ увеличилось количество кластеров, содержащих интенсивно маркированные клетки в ПВЗ, в СВЗ появлялись скопления CBS- клеток, включающие умеренно CBS+ клетки (рис. 23в; табл. 13). В ПЗ регистрировались небольшие кластеры, содержащие интенсивно маркированные клетки (рис. 23в).

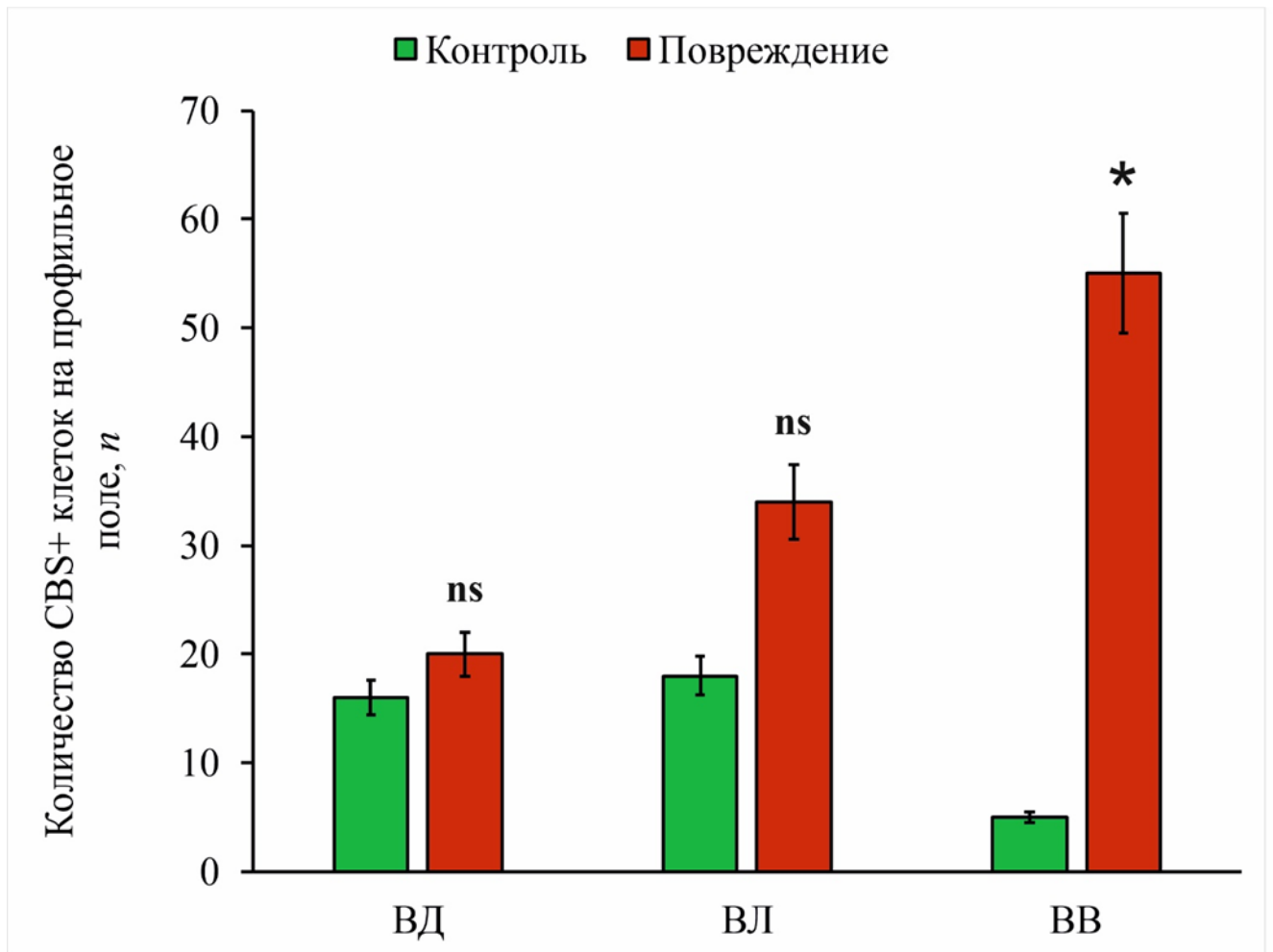
В субпаллиальной области интактной молодежи кеты CBS-иммунопозитивность была выявлена в дорсальной (ВД), вентральной (ВВ) и латеральной зонах (ВЛ) (рис. 25а). Уровень активности CBS в клетках был умеренным и интенсивным (табл. 14). В ПВЗ ВД количество иммунопозитивных клеток было ограничено, но иммунонегативные клетки часто содержали CBS+ гранулы (рис. 25а; табл. 14). В СВЗ преобладали CBS- клетки, среди которых были выявлены небольшие скопления мелких удлиненных базофильных клеток (рис. 25а; табл. 14). Однако, в более глубокой ПЗ встречались скопления умеренно и интенсивно гомогенно маркированных CBS клеток, организованных в небольшие кластеры или одиночных, а также CBS- мелких базофильных клеток (рис. 25а; табл. 14).



**Рисунок 25** – Локализация цистатионин- $\beta$ -синтазы в субпаллиуме молоди кеты *Oncorhynchus keta* в норме (а) и после механической травмы (б, в, г); а, г – латеральная (ВЛ), б – дорсальная (ВД), в – вентральная (ВВ) зоны вентрального теленцефалона симы; прямоугольниками околнурены врезки на рисунках, красными стрелками показаны интенсивно маркированные клетки, зелеными – умеренно маркированные, желтыми – иммуномаркированные внеклеточные гранулы. Масштабный отрезок 100 мкм.

В ВВ СВЗ-иммунопозитивные гранулы на апикальной поверхности нейроэпителиальных клеток ПВЗ формировали тонкий умеренно маркированный пласт (рис. 25а; табл. 14). СВЗ+ гранулы встречались также в отдельных клетках ПВЗ, распространяясь вглубь СВЗ (рис. 25а). СВЗ+ мелкие клетки в ПВЗ формировали немногочисленные локальные скопления, в СВЗ встречались парные умеренно маркированные мелкие удлиненные клетки, но более характерными

были паттерны CBS+ гранулярной локализации в клетках (рис. 25а; табл. 14).



**Рисунок 26** – Соотношение CBS иммунопозитивных клеток в субпаллиуме теленцефалона *O. keta* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, ns – достоверных отличий не выявлено). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

В плотных клеточных скоплениях СВЗ часто встречались отдельные удлиненные умеренно маркированные CBS клетки и гранулы внутри и на поверхности клеток, окрашенных МЗ (рис. 25а). На территории ВВ встречались отдельные фигуры митозов (рис. 25а). В ВЛ CBS+ гранулы также были выявлены на поверхности иммунонегативных нейроэпителиальных клеток (рис. 25а; табл. 14). Другим типом CBS+ структур в ВЛ были скопления мелких интенсивно

маркированных клеток, отличающихся по плотности распределения и количеству (рис. 25а). В одних случаях наблюдались скопления клеток диффузного типа, встречающиеся в ПВЗ и ПЗ (рис. 25а). Другие скопления были более плотными и встречались в ПВЗ и СВЗ (рис. 25а).

В более глубоких слоях ПЗ на поверхности CBS- клеток располагались множественные CBS+ гранулы (рис. 25а). Данные одностороннего дисперсионного анализа свидетельствуют о межгрупповых отличиях оптической плотности при сравнении в группах интенсивно и умеренно маркированных клеток, а также иммунонегативных клеток (рис. 23). Сравнительная оценка числа интенсивно, умеренно иммуномаркированных и негативных клеток показала значимые межгрупповые отличия ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) в данных группах (рис. 23).

**Таблица 14** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ ) CBS-иммунопозитивных клеток в дорсальной, вентральной и латеральной зонах субпаллиума молоди кеты *Oncorhynchus keta* в контроле и после механической травмы

Интактные животные			Травма								
			ВД			ВВ			ВЛ		
Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП
1.2±0.1/ 1.0±0.3	ПВЗ	+++	6.6±0.6/ 5.6±0.5	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	+++	4.7±0.2/ 3.4±0.4	ПВЗ	+++	5.8±0.7/ 6.3±0.7	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	+++
4.6±0.8/ 3.9±0.6	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	+++				8.3±0.5/ 3.8±0.6	ПВЗ	+++			
6.6±0.3/ 3.6±0.4	ПВЗ	+++				7.3±0.4/ 6.3±0.3	ПЗ	+++			
7.7±0.7/ 6.6±0.6	ПВЗ, ПЗ	+++									
9.0±0.3/ 7.3±0.7	ПЗ	+++									
1.2±0.2/ 1.0±0.3	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	++	6.4±0.8/ 5.8±0.5	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	++	6.2±0.6/ 5.7±0.3	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	++	5.8±0.4/ 5.7±0.4	ПВЗ, СВЗ	++

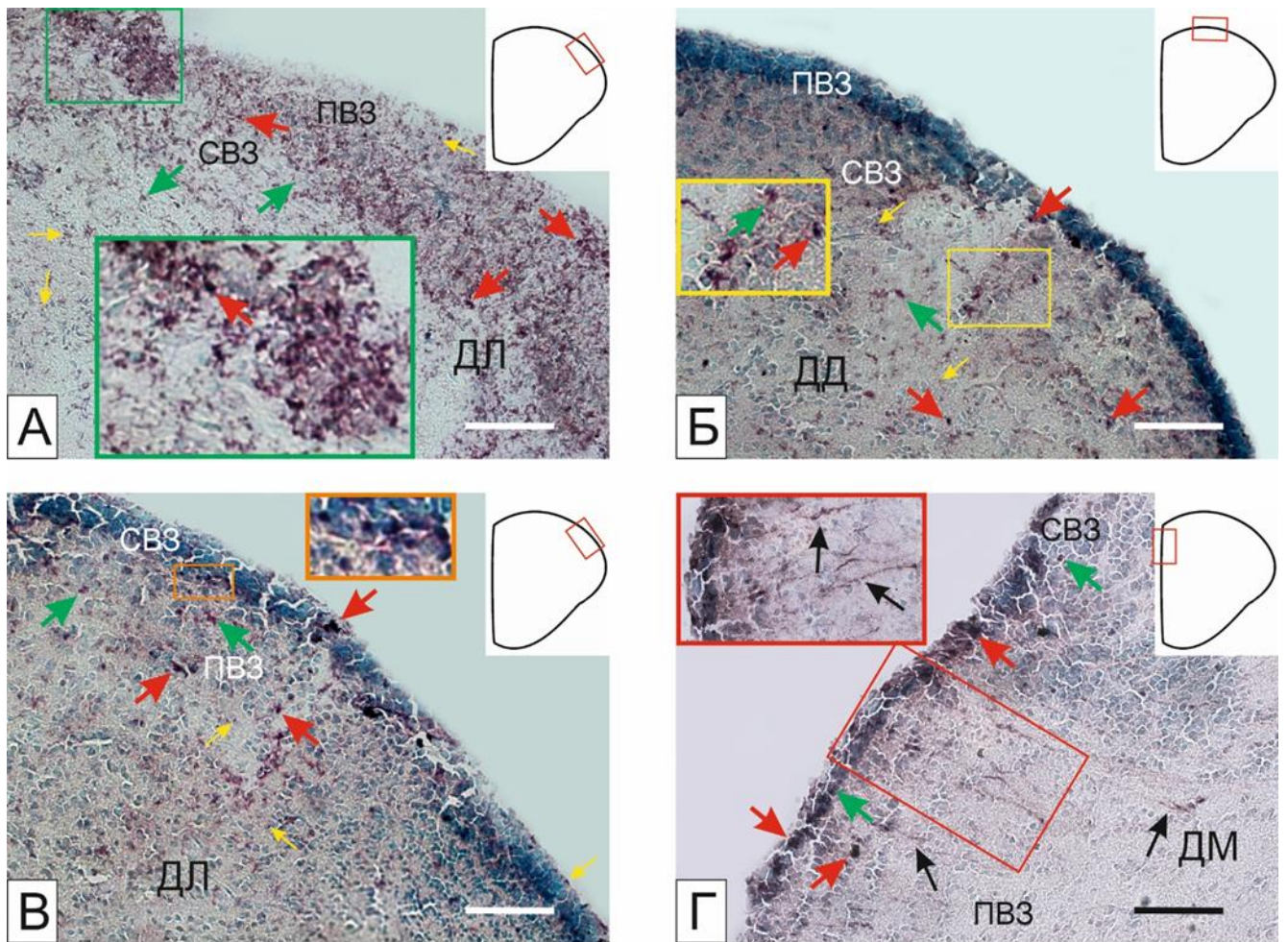


После повреждения конечного мозга, количество CBS маркированных клеток в ПВЗ субпаллиума значительно возросло по сравнению с контрольными животными (рис. 25б, в, г, 26). Морфометрические параметры клеток перивентрикулярной зоны маркированных CBS несколько отличались от параметров контрольных животных (табл. 14). В целом во всех зонах после травмы преобладали клетки более мелких размеров (табл. 14).

В субпаллиальной области аналогичные таковым в паллиальной перестройки возникали в дорсальном (ВД) и вентральном (ВВ) ядрах (рис. 25б, г; табл. 14). В ПЗ субпаллиума возросло число отдельных и парных CBS+ клеток, а также их небольших кластеров (25б, в, г). Морфометрические параметры клеток перивентрикулярной зоны маркированных CBS несколько отличались от параметров контрольных животных (табл. 14). В целом во всех зонах после травмы преобладали клетки более мелких размеров (табл. 14).

### **3.9. Экспрессия белкового продукта транскрипционного фактора Pax2 в паллиуме интактной кеты и после травматического повреждения**

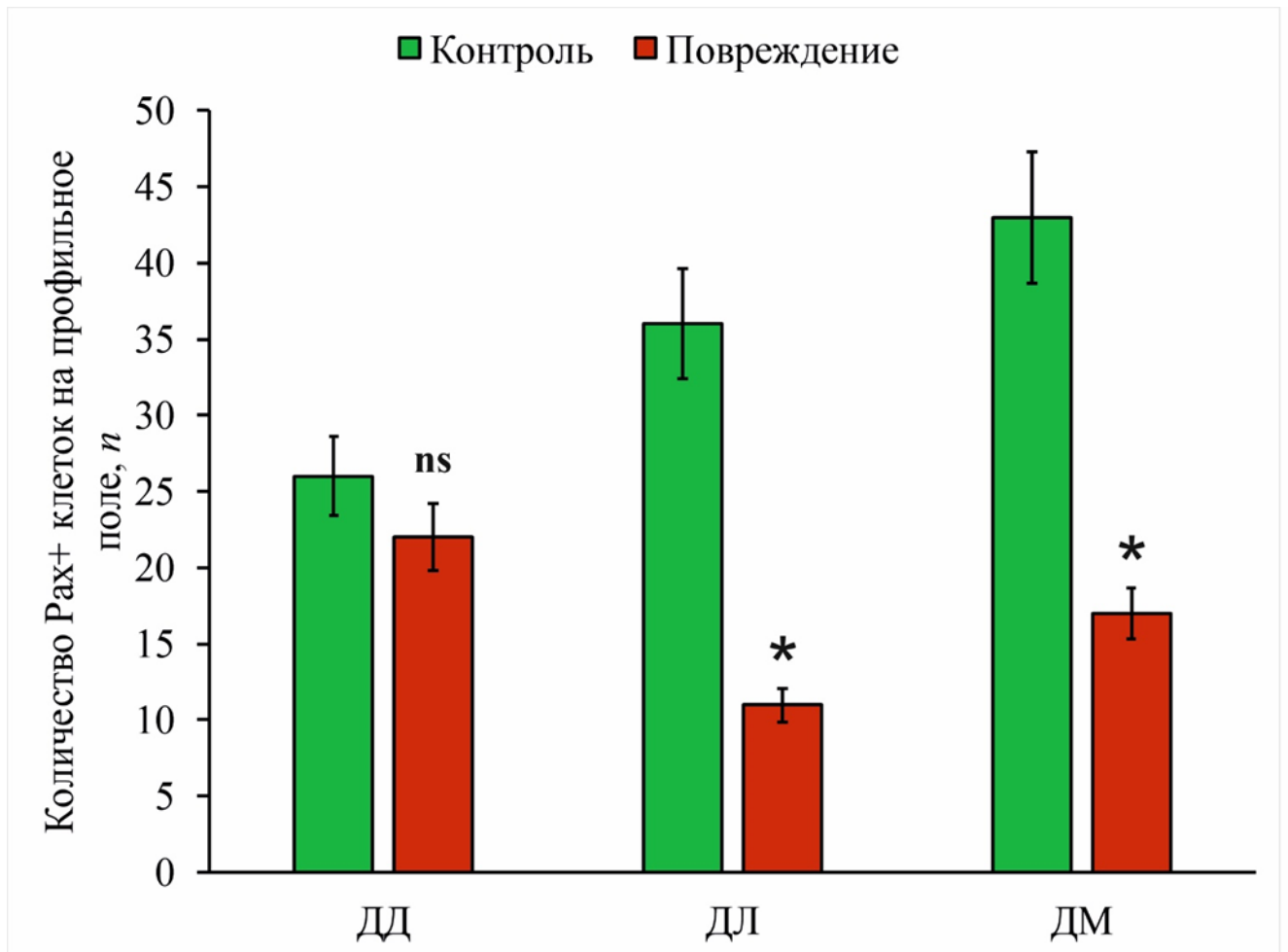
Паттерны экспрессии транскрипционного фактора (ТФ) Pax2 у интактных животных в паллиуме конечного мозга не были напрямую связаны с матричными зонами эвертированного теленцефалона молодежи кеты, и формировали морфогенетические поля, в которых экспрессия ТФ была представлена в ядрах и клетках (рис. 27а, табл. 15). В паллиуме паттерны экспрессии Pax2 соответствовали локализации дорсальных областей: дорсальной (ДД), медиальной (ДМ), латеральной (ДЛ) (рис. рис. 27а). На границе паллиальной и субпаллиальной зон выявлялась область повышенной экспрессии Pax2, отделяя дорсальную область от вентральной. Оценка оптической плотности иммуномаркирования Pax2 в паллиуме и субпаллиуме молодежи кеты позволял выделять интенсивно, умеренно и слабо маркированные клетки (рис. 27а, табл. 15).



**Рисунок 27** – Локализация транскрипционного фактора Pax2 в паллиуме молодки кеты *Oncorhynchus keta* в норме (а) и после механической травмы (б, в, г); а, в – латеральная (ДЛ), б – дорсальная (ДД), г – медиальная (ДМ) зоны дорсального теленцефалона симы; прямоугольниками околнурены врезки на рисунках, красными стрелками показаны интенсивно маркированные клетки, зелеными – умеренно маркированные, желтыми – иммуномаркированные внеклеточные гранулы, черными – волокна радиальной глии. Масштабный отрезок 100 мкм.

В ДД экспрессия Pax2<sup>+</sup> в ПВЗ была ограниченной. Интенсивно маркированные клетки имели поверхностную локализацию и формировали небольшие кластеры, разделенные небольшими иммунонегативными участками (рис. 27а). Экспрессия Pax2 в клетках ДД была выявлена как в ядрах, так и в цитоплазме клеток (табл. 15). В ПВЗ в составе КНН были выявлены обе формы локализации Pax2 (рис. 27а). В СВЗ умеренно маркировались отдельные ядра Pax2<sup>+</sup>

клеток (рис. 27а, табл. 15). В ПЗ экспрессия Рах2 была выявлена в ядрах, формирующих небольшие морфогенетические поля (рис. 27а, табл. 15). Наряду с Рах2+ ядрами, в ПЗ встречались скопления Рах2- клеток, а также разнонаправленные иммунонегативные базофильные популяции клеток (рис. 27а, табл. 15).



**Рисунок 28** – Соотношение Рах2 иммунопозитивных клеток в паллиуме теленцефалона *O. keta* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп, ns – достоверных отличий не выявлено). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

В ДЛ на территории ПВЗ и СВЗ количество и морфологическая гетерогенность Рах2+ клеток было намного больше, чем в ДМ и ДД (рис. 27а, табл.

15). Большинство клеток в поверхностной части ПВЗ имели маркированные Pax2 ядра, в базальной части ПВЗ и СВЗ встречались Pax2+ клетки, формирующие обширные зоны экспрессии TF (рис. 27а, табл. 15). В паренхиматозной части ДЛ встречалась как клеточная, так и ядерная экспрессия Pax2 (рис. 27а, табл. 15).

Через 3 суток после повреждения в дорсальной части паллиума (ДД) были выявлены интенсивно маркированные Pax2 клетки и ядра, локализованные в ПВЗ и СВЗ (рис. 27б). В области травмы (рис. 27б), клетки, расположенные в поверхностной части ПВЗ, мы рассматривали как популяцию клеток, мигрирующих к зоне травмы. Другая популяция маркированных Pax2 клеток формировала локальные плотные кластеры в базальной части ПВЗ и СВЗ (рис. 27б, табл. 15). Мы находили ядра Pax2 маркированных клеток расположенные в толще ПВЗ (рис. 27б). В базальной части ПВЗ также встречались отдельные, либо парные, маркированные клетки (рис. 27б). В зоне травмы, вдоль травматического канала в ДД были выявлены скопления Pax2+ клеток, тангенциально мигрирующие интенсивно маркированные Pax2 клетки и ядра (рис. 27б, табл. 15). В паренхиматозных областях теленцефалона прилежащей к зоне травмы отмечалась повышенная плотность распределения Pax2+ интенсивно маркированных клеток, по сравнению с контрольными животными (рис. 27б, табл. 15).

В ДМ очевидно, сходная популяция Pax2+ клеток, расположенных в поверхностных областях ПВЗ, представляет собой мигрирующую к области травмы реактивную популяцию клеток (рис. 27г, табл. 15). Другая популяция Pax2+ клеток формировала локальные плотные кластеры в базальной части ПВЗ и СВЗ (рис. 27г). Мы также находили ядра Pax2 маркированных клеток расположенные в толще ПВЗ (рис. 27г, табл. 15). В ДЛ паттерн экспрессии Pax2+ клеток во многом соответствовал таковому в ДД (рис. 27б, в, табл. 15). В частности, обнаруживались тангенциально мигрирующие клетки в апикальной и базальной частях ПВЗ (рис. 27б). Вокруг плотных Pax2- кластеров в ПЗ располагались отдельные Pax2+ клетки, иногда встречались отдельные плотно/умеренно маркированные клетки в СВЗ (рис. 27б). Плотность распределения Pax2-негативных клеток в паренхиматозных областях в ДЛ после травмы значительно повышалась по сравнению с контролем

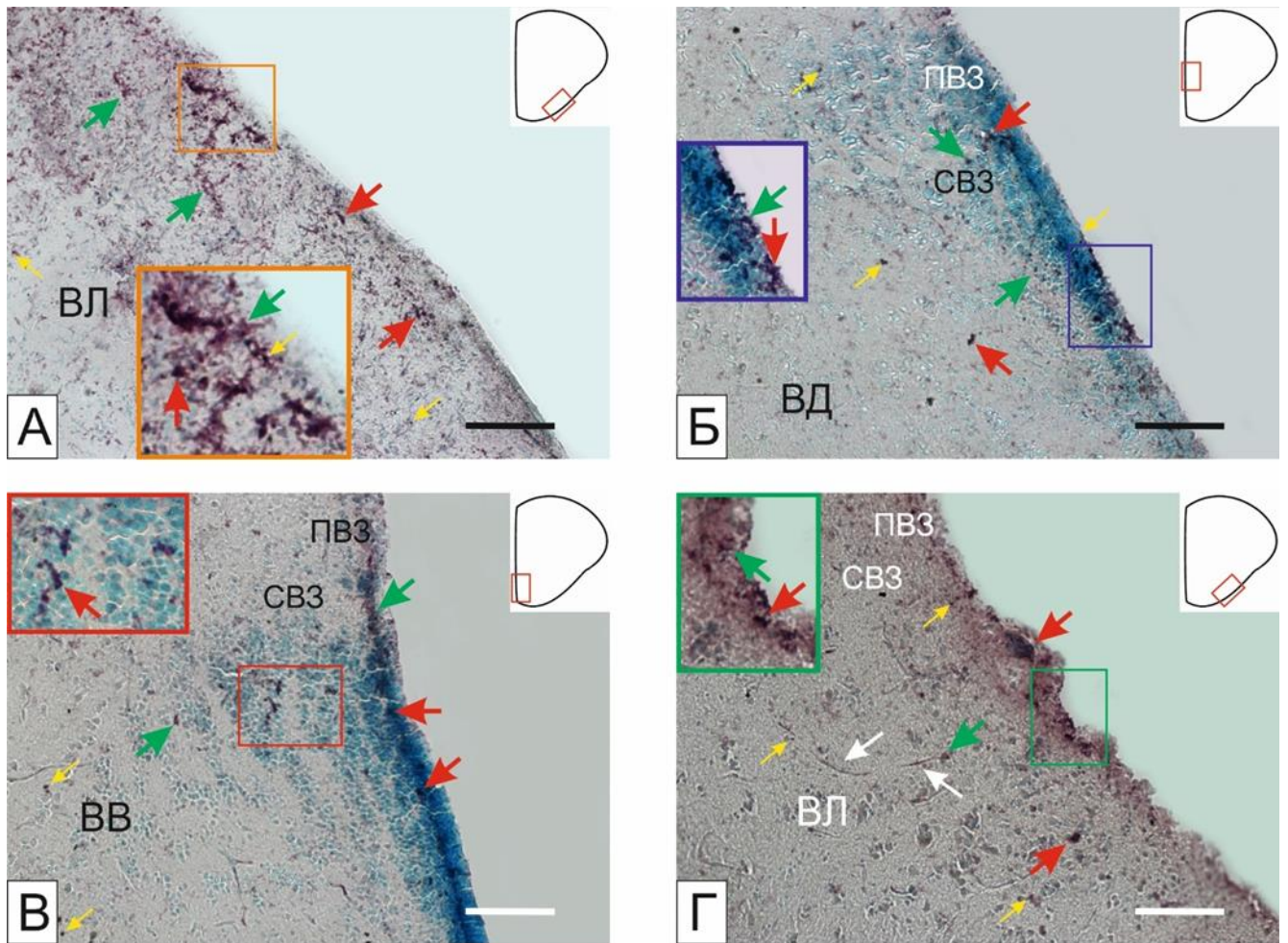
(рис. 28).

**Таблица 15** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ ) Рах2-экспрессирующих клеток в дорсальной, латеральной и медиальной зонах паллиума молодежи кеты *Oncorhynchus keta* в контроле и после механической травмы

Интактные животные			Травма								
			ДД			ДЛ			ДМ		
Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП
3.5±0.5/ 2.7±0.4	ПВЗ, СВЗ	+++	3.3±0.5/ 3.1±0.3	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	+++	4.1±0.3/ 6.1±0.6	ПВЗ, СВЗ	+++	3.1±0.3/ 2.9±0.2	ПВЗ, СВЗ	+++
4.5±0.8/ 3.3±0.4	ПВЗ, СВЗ	+++	6.5±0.4/ 2.8±0.4	ПВЗ	+++				6.5±0.4/ 2.8±0.3	ПВЗ	+++
5.7±0.7/ 5.3±0.7	ПВЗ, СВЗ	+++	5.5±1.4/ 6.1±0.4	ПВЗ, ПЗ	+++				5.4±0.6/ 5.2±0.6	ПВЗ, СВЗ	+++
8.3±0.7/ 6.7±0.8	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	+++							3.1±0.3/ 2.9±0.3	ПВЗ, СВЗ	++
1.4±0.2/ 1.1±0.1	СВЗ, ПЗ	++	3.2±0.4/ 2.9±0.3	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	++	3.2±0.3/ 3.0±0.3	ПВЗ, СВЗ	++	3.1±0.3/ 2.9±0.3	ПВЗ, СВЗ	++

В посттравматический период в субпаллиуме в ВД маркировались Рах2+ ядра и нейроэпителиальные клетки поверхностной локализации, часть которых проникала в более глубокие слои ПВЗ и СВЗ (рис. 29б, табл. 16). Наиболее крупные скопления Рах2+ клеток было выявлено в поверхностной зоне вентральной части ядра и СВЗ центральной части ядра (рис. 29б). Остальная масса Рах2+ клеток равномерно распределялась в ПЗ между двумя этими кластерами. В ВВ паттерн экспрессии Рах2+ клеток был сходный с другими субпаллиальными областями, в апикальной и базальной частях ПВЗ количество иммунопозитивных клеток и ядер было повышенным (рис. 29в). В СВЗ и ПЗ преобладали отдельные умеренно и слабо маркированные Рах2 клетки и ядра (рис. 29в, табл. 16). В вентральной части ядра плотность распределения Рах2+ клеток после травмы была незначительно

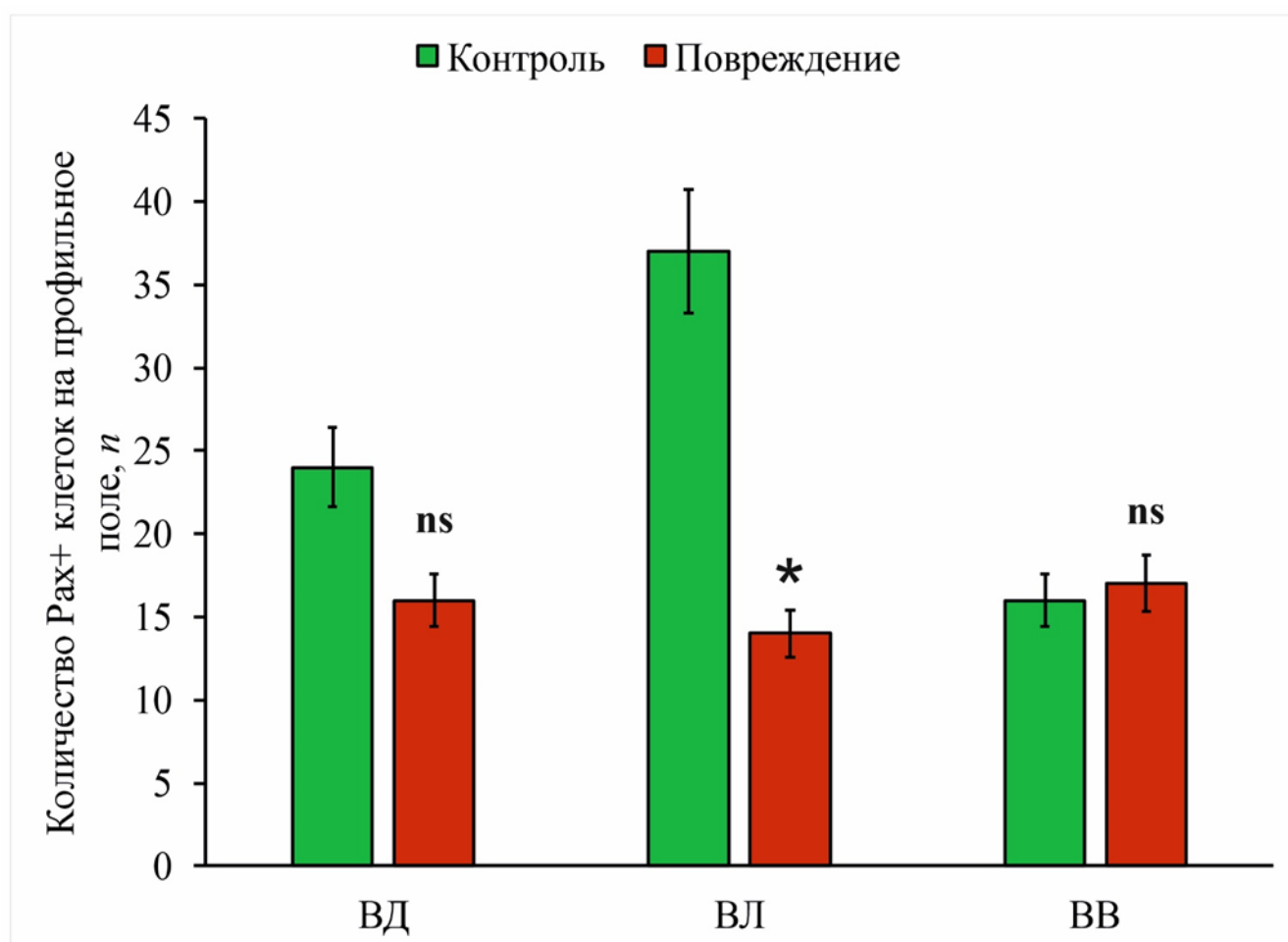
повышена (рис. 30).



**Рисунок 29** – Локализация транскрипционного фактора Pax2 в субпаллиуме молоди кеты *Oncorhynchus keta* в норме (а) и после механической травмы (б, в, г); а, г – латеральная (ВЛ), б – дорсальная (ВД), в – вентральная (ВВ) зоны вентрального теленцефалона симы; прямоугольниками околтурены врезки на рисунках, красными стрелками показаны интенсивно маркированные клетки, зелеными – умеренно маркированные, желтыми – иммуномаркированные внеклеточные гранулы. Масштабный отрезок 100 мкм.

В ВЛ распределение Pax2<sup>+</sup> клеток и их скоплений в поверхностной и базальной частях ПВЗ была повышенной по сравнению с контролем (рис. 29г). Подобное распределение клеток было характерно и для других вентральных областей, однако в ВЛ в толще ПВЗ были выявлены локальные участки, содержащие многочисленные Pax2<sup>+</sup> ядра (рис. 29г, табл. 16). В СВЗ сравнительно

часто встречались небольшие скопления Pax2+ клеток, в ПЗ преобладали отдельные умеренно маркированные Pax2 клетки (рис. 29г, табл. 16).



**Рисунок 30** – Соотношение Pax2 иммунопозитивных клеток в субпаллиуме теленцефалона *O. keta* в контроле (зеленые столбцы) и после повреждения (красные столбцы). ( $n = 5$  в каждой группе; звездочкой обозначено  $P < 0.05$  – достоверные отличия от контрольных групп, ns – достоверных отличий не выявлено). Для определения значимых различий между группами использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Келса.

Данные количественного анализа показали, что после травмы в медиальной и латеральной областях паллиума (ДМ, ДЛ) и латеральной области субпаллиума (ВЛ) у молодежи кеты достоверно снижалось количество Pax2+ клеток ( $p < 0.05$ ) (рис. 30) по сравнению с контролем. В области травмы (ДД) также было выявлено некоторое снижение числа Pax2+ клеток (рис. 30), однако достоверных отличий с

контрольными группами выявлено не было. Интенсивность иммуномаркирования Рах2 также проявляла тенденцию к снижению, но достоверных отличий оптической плотности с контрольными группами не обнаружено (рис. 30). Таким образом, в результате травмы было выявлено снижение экспрессии Рах2 ( $p < 0.05$ ) в паллиальных и субпаллиальных областях, не прилежащих к области повреждения.

В ВД иммуномаркированные клетки в ПВЗ имели поверхностную тангенциальную ориентацию (рис. 29б, табл. 16). Интенсивно маркированные Рах2 клетки были немногочисленны и обычно формировали небольшие группы (рис. 29б). В СВЗ и паренхиматозной части ВД встречались умеренно и слабо маркированные Рах2 единичные клетки и ядра, формирующие морфогенетические поля различной протяженности (рис. 29б, табл. 16). В ВЛ встречались разреженно расположенные Рах2+ ядра в ПВЗ (рис. 29б, табл. 16). В СВЗ были выявлены отдельные интенсивно маркированные клетки, а также локальные маркированные паренхиматозные скопления Рах2+ клеток (рис. 29б). В ПЗ были обнаружены локальные Рах2-негативные скопления клеток высокой плотности распределения, к которым прилежали плотные кластеры интенсивно маркированных Рах2+ клеток (рис. 29б, табл. 16).

В ВВ были выявлены интенсивно маркированные кластеры Рах2+ клеток в ПВЗ различного объема и протяженности (рис. 29в, табл. 16). В составе кластера, как правило, было идентифицировано несколько морфологически типов Рах2+ клеток (рис. 29в, табл. 16). Часть клеток, в составе крупных кластеров, из ПВЗ проникала в СВЗ. В паренхиматозной части ВВ были идентифицированы разнонаправленные иммунонегативные потоки клеток и их скопления, а также немногочисленные умеренно маркированные Рах2 клетки и ядра (рис. 29в, табл. 16). На территории ПЗ определялись скопление иммунонегативных базофильных клеток, среди которых встречались отдельные Рах2+ клетки (рис. 29в).

Соотношение количества Рах2+/ Рах2- клеток в зонах паллиума и субпаллиума интактной кеты показано на рисунке 30. Методом однофакторного дисперсионного анализа были установлены межгрупповые отличия между ДД/ДМ



и ДМ/ДЛ в зонах паллиума и ВД/ВВ и ВВ/ВЛ субпаллиума ( $p < 0.05$ ). Достоверные отличия между паллиальными (ДД, ДМ, ДЛ) и субпаллиальными (ВД, ВВ, ВЛ) клеточными группами ( $p < 0.05$ ) были выявлены. Денситометрическое исследование оптической плотности иммуномаркирования Рах2+ в паллиуме и субпаллиуме интактной молодежи кеты показал наличие достоверных отличий между интенсивно, умеренно, слабо маркированными клетками и иммунонегативными клетками (рис. 30).

**Таблица 16** – Морфометрические и денситометрические характеристики ( $M \pm SD$ ) Рах2-экспрессирующих клеток в дорсальной, вентральной и латеральной зонах субпаллиума молодежи кеты *Oncorhynchus keta* в контроле и после механической травмы

Интактные животные			Травма								
			ВД			ВВ			ВЛ		
Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП	Размер клеток	Локализация	ОП
4.4±0.8/ 3.0±0.4	ПВЗ	+++	3.1±0.3/ 3.1±0.3	ПВЗ	+++	3.1±0.2/ 2.9±0.3	ПВЗ	+++	3.2±0.3/ 3.0±0.2	ПВЗ	+++
5.0±0.9/ 3.8±0.6	ПВЗ, СВЗ	+++				6.6±1.0/ 5.6±0.6					
3.5±0.3/ 2.7±0.3	ПВЗ, СВЗ	+++	4.1±0.4/ 5.5±1.1	ПВЗ, СВЗ	+++	7.2±0.4/ 6.3±0.3	ПЗ	+++	6.1±0.4/ 4.5±0.6	ПВЗ, СВЗ	+++
6.2±0.5/ 4.1±0.5	ПЗ	+++									
3.5±0.3/ 2.7±0.3	ПВЗ, СВЗ, ПЗ	++	3.2±0.2/ 2.9±0.3	ПВЗ, СВЗ,	++	3.1±0.2/ 2.9±0.3	ПВЗ	++	3.1±0.2/ 3.0±0.2	ПВЗ, СВЗ	++

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Локализация PCNA в паллиальной ПВЗ симы в норме и после травматического повреждения

Иммунолокализация PCNA была выявлена в дорсальной, латеральной и медиальной зонах конечного мозга молодежи симы *O. masou*. Топография распределения PCNA+ клеток в каждой зоне имела черты определенного сходства: в поверхностном и субвентрикулярном слоях, определялись одиночные или формирующие небольшие кластеры, пролиферирующие клетки. Основная особенность распределения иммунопозитивных клеток у контрольных животных заключалась в формировании выраженного поверхностного перивентрикулярного слоя, содержащего PCNA+ клетки, распространяющегося на все зоны дорсальной области. Другая особенность заключалась в наличии единичных PCNA+ клеток в глубоких паренхиматозных слоях, вне пределов поверхностной пролиферативной зоны (Пущина и др., 2016б). Подобные паттерны распределения PCNA ранее были выявлены у других видов рыб (Lindsey et al., 2007; Пущина и др., 2007; Zupanc, Sirbulescu, 2013).

В дорсальной и латеральной зонах симы встречались единичные PCNA+ клетки, тогда как на срезах медиальной зоны визуализировалось больше клеток (Пущина и др., 2016б). Ранее проведенные исследования свидетельствуют, что у взрослых представителей *D. rerio* пролиферативная активность в конечном мозге обычно сосредоточена на территории дорсальной пролиферативной зоны, соответствующей паллиальной ПВЗ и вентральной, соответствующей субпаллиальной ПВЗ (Lindsey et al., 2007; Adolf et al., 2007). Данные различных авторов указывают на важность филогенетических исследований паллиальной и субпаллиальной пролиферативных зон в переднем мозге *D. rerio*, и других видов рыб (Lindsey et al., 2007; Zupanc, Sirbulescu, 2013). Проведенные исследования показали наличие глиального фенотипа у НСК, участвующих во взрослом нейрогенезе (Adolf et al., 2007; Kempermann, 2011). В этих исследованиях, в частности, было показано, что в ПВЗ присутствуют медленно и быстро

пролиферирующие клетки, возникающие из взрослых НСК/клеток-предшественников, имеющих фенотип радиальной глии (Adolf et al., 2007). Недавно классификация, основанная на детальном ИГХ маркировании (März et al., 2010) и клональном анализе (Rothenaigner et al., 2011), представила три типа митотически активных клеток: II, IIIa, IIIb, а также неделящиеся клетки I типа. Исследование паллиально-субпаллиальной зоны переднемозговой ПВЗ *D. rerio* показало, что клетки-предшественники экспрессируют и возможно регулируются различными транскрипционными и ростовыми факторами, такими как Pax6 и фактор роста фибробластов (Adolf et al., 2007; Ganz et al., 2010). Однако, не смотря на возрастающее количество исследований переднемозговых паллиальной и субпаллиальной ПВЗ у рыб, некоторые фундаментальные аспекты, включающие анатомические границы этих зон, их ультраструктурный состав, а также особенностей клеточной и молекулярной организации, изучены недостаточно.

Поскольку годовалая молодь симы находится в состоянии активного роста, процессы персистентного образования новых клеток, согласно по полученным нами данным, довольно интенсивны и встречаются как на территории пролиферативных зон мозга, так и вне их (Пущина и др., 2016б). Мы полагаем, что немаловажную роль могут играть и филогенетические факторы, свидетельствующие о принадлежности лососевых рыб к эволюционно древней группе телеостей, у которых процесс эверсии конечного мозга не завершен и сохранены черты эмбриональной структуры мозга в постэмбриональном онтогенезе (Wullimann, Muller, 2004). Подобное свойство, определяемое в литературе как фетализация, характерно для филогенетически древних групп позвоночных животных, мозг которых содержит большое количество морфогенетических зон, имеющих повышенный пролиферативный потенциал (Артюхин, 2008; Zupanc, Sirbulescu, 2013).

Проведенные исследования позволяют заключить, что пролиферативный потенциал клеток медиальной зоны значительно выше такового в других зонах паллиума. Другая особенность медиальной зоны симы проявляется в наличии выраженных паттернов клеточной миграции из поверхностных в более глубокие

слои паллиума. В отдельных случаях можно было проследить стратификацию клеточных пластов в данной области. Таким образом, среди всех зон дорсальной области медиальная зона по нашим данным вносит наибольший вклад в персистентный морфогенез конечного мозга симы, по сравнению с другими зонами (Пущина и др., 2016б).

В настоящее время данные об эмбриональном происхождении и связанной с ним неоднородности НСК взрослого мозга рыб немногочисленны. В исследованиях на *D. rerio* было установлено, что пролиферативная зона дефинитивного паллиума возникает из двух отдельных подтипов эмбриональных предшественников и включает два типа НСК участвующих во взрослом нейрогенезе (Dirian et al., 2014). Дорсомедиальные НСК возникают в результате активной амплификации нейрогенной радиальной глии в эмбриональном теленцефалоне. Популяция НСК латеральной зоны образована в результате постепенного дополнения паллиальной кромки из пула дискретных НЭ прогениторов задней крыши теленцефалона, активируемого в постэмбриональный период и сохраняющегося в течение всей жизни. Такое двойственное происхождение паллиальной пролиферативной зоны *D. rerio* предполагает организованное во времени построение паллиальных областей как мозаичных и смежных компартментов. Принимая во внимание результаты исследований на *D. rerio*, а также учитывая данные о неоднородном распределении пролиферирующих и NuCD-ип клеток в перивентрикулярных пролиферативных зонах симы и соотношение мигрирующих и пролиферирующих клеток в паренхиме мозга мы считаем, что паллиальная ПВЗ симы имеет сложную многокомпонентную мозаичную структуру, и возможно образована несколькими формациями, содержащими НСК.

После травматического повреждения конечного мозга молодежи симы мы наблюдали значительные изменения пролиферативной активности клеток, как на территории пролиферативных зон, так и в паренхиме конечного мозга. Наиболее выраженные изменения топографии пролиферирующих клеток были связаны с перестройкой структуры единого пролиферативного поверхностно

расположенного перивентрикулярного пласта и формированием локальных зон индуцированного нейрогенеза. При этом перивентрикулярная пролиферативная зона, как правило, не верифицировалась. Наблюдалось образование локальных небольших скоплений клеток, содержащих как элементы PCNA+, так и многочисленные PCNA- клетки в составе нейрогенных ниш, а также обширные популяции мигрирующих клеток и слабо маркированные волокна радиальной глии. Подобные изменения возникали после травматического процесса, что позволяет нам относить их к разряду репаративных перестроек (Пущина и др., 2016б).

Другой особенностью посттравматического морфогенеза конечного мозга симы было формирование центров вторичного нейрогенеза на территории медиальной зоны, обладающей повышенным пролиферативным потенциалом в норме. После повреждения в данной зоне были выявлены многочисленные PCNA-клетки, окруженные недифференцированными иммунонегативными клетками. Плотность распределения в таких скоплениях значительно превышала таковую в прилежащих областях, что позволяет рассматривать данные образования, как единые функциональные комплексы с повышенной пролиферативной активностью (Пущина и др., 2016б). Согласно данным Савельева (Савельев, 2001), формирование центров вторичной пролиферации в мозге позвоночных возникает в тех случаях, когда клетки из первичной перивентрикулярной пролиферативной области, сохраняя повышенный пролиферативный потенциал, мигрируют в более глубокие слои мозга. Такие клетки продолжают пролиферировать и вне обычных условий клеточного микроокружения пролиферативной зоны, формируя центры вторичной пролиферации. При этом часть клеток продолжает пролиферировать, а часть выходит в дифференцировку. Такое скопление клеток вне матричной зоны обычно характеризуется повышенной плотностью распределения, гетерогенным клеточным составом и наличием клеток, находящихся на различной стадии дифференцировки. Именно такие клеточные скопления были нами обнаружены на территории медиальной зоны конечного мозга симы после повреждения (Пущина и др., 2016б).

Исследования на *D. rerio* показали, что повреждение конечного мозга вызывает быструю пролиферацию нейрональных клеток-предшественников в ПВЗ поврежденной полусферы теленцефалона, по сравнению с интактной. Распределение НСК, выявленное с помощью BrdU и нейрогенина, показывает, что эти клетки мигрируют латерально и достигают зоны повреждения через субпаллиум и паллиум (Kishimoto et al., 2011, 2012). В последнее время исследования НСК *D. rerio* позволило установить новые аспекты физиологии радиальной глии. В частности, было показано наличие радиальной глии в пролиферативных зонах мозга рыб (Grandel et al., 2006). Часть популяции клеток радиальной глии обладает свойствами НСК, что и определяет высокий уровень репаративного нейрогенеза (Zupanc, 2001; Grandel et al., 2006). Клетки радиальной глии рыб расположены во всех регионах мозга вдоль просвета желудочка и, после мозговых травм способствуют успешному восстановлению поврежденного мозга (Tozzini et al., 2012). Известно, что регенеративный потенциал соматических стволовых клеток, как правило, с возрастом ослабевает и таким образом, интенсивность персистентного нейрогенеза у молодежи симы различных возрастов (Пущина и др., 2012) может свидетельствовать о пролиферативном потенциале НСК в различные возрастные периоды. Результаты исследований на *D. rerio* показали, что нейрогенез и олигодендрогенез в желудочковой зоне, в обонятельной луковице, и в паренхиме конечного мозга с возрастом ослабевают (Edelmann et al., 2013). У молодежи симы, согласно результатам настоящего исследования, в конечном мозге был выявлен высокий уровень персистентного нейрогенеза. Ранее нами было установлено, что у различных возрастных групп симы в перивентрикулярной области присутствует большое количество радиальной глии, маркируемой тирозингидроксилазой, NADPH-диафоразой и ГАМК (Пущина и др., 2012). В перивентрикулярной зоне популяция клеток радиальной глии остается в значительной степени неизменной, но результаты ИГХ анализа свидетельствуют, что такие клетки у более взрослых животных реже вступают в митоз, и, следовательно, производят меньше нейробластов. Активность нейробластов согласно данным (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006) с возрастом не претерпевает

существенных изменений, в результате чего нейробласты производят такое же количество постмитотических нейронов. Снижение уровня нейрогенеза физиологически коррелирует с увеличением покоя в клетках радиальной глии (Edelmann et al., 2013). Травматический процесс приводит к активизации радиальной глии и ее вступлению в пролиферацию. Однако участие радиальной глии в нейрогенезе у взрослых животных значительно менее выражено, чем у молодых, что может свидетельствовать о необратимых изменениях в клетках радиальной глии при старении мозга.

Как показано в исследованиях Мюллера и Вулемана, маркирование пролиферативных областей PCNA отражает нейромерную организацию мозга, что подтверждается в исследованиях с применением радиоавтографии, а также с помощью иммуноцитохимического маркирования BrdU (Muller, Wullimann, 2003). Экспрессия PCNA в клетках сохраняется в течение 24 ч после окончания митоза, однако уровень его активности снижается на 30% (Wullimann, Puelles, 1999). PCNA экспрессируется в митотических клетках в течение всего пролиферативного цикла и имеет преимущественно ядерную локализацию (Waseem, Lane, 1990), однако в некоторых случаях (Vriz et al., 1992) встречается и цитоплазматическая локализация PCNA. Методические особенности использования PCNA в качестве маркера клеточной пролиферации при исследовании различных стадий нейрогенеза мозга рыб показали, что на ранних стадиях развития *D. rerio*, 1–4 суток с момента оплодотворения, маркируются НЭ клетки, у которых в этот период продолжительность клеточного цикла не велика (Muller, Wullimann, 2003). Тем не менее, PCNA является удобным маркером клеточной пролиферации для исследования более позднего постэмбрионального нейрогенеза рыб (Candal et al., 2005), поскольку на дальнейших стадиях развития продолжительность клеточного цикла многократно превышает таковую раннего нейрогенеза.

Для исследования процессов регенерации нервной ткани мозга рыб и функционального восстановления после повреждения ЦНС, были разработаны различные парадигмы повреждения. Многие исследования повреждений конечного мозга связаны с повреждением обонятельных луковиц или дорсальной

области одной из полусфер теленцефалона (Zupanc, 2001; Zupanc, Sirbulescu, 2013). В некоторых случаях повреждения осуществляли в областях латеральной и дорсолатеральной частей конечного мозга (Ayari et al., 2010). Для лучшего понимания регенераторных способностей мозга костистых рыб важно установление источников регенерации нейронов в поврежденном мозге. Генетические исследования в комбинации с повреждением дорсальной части конечного мозга показывают, что большинство регенерирующих нейронов являются производными прогениторных клеток, имеющих фенотип радиальной глии, а дедифференцировка не-нейрогенных клеток играет крайне незначительную роль при регенерации (Kroehne et al., 2011). Систематические нейроанатомические исследования на *D. rerio* показали наличие 16 нейрогенных зон, расположенных вдоль оси мозга (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Kaslin et al., 2008). Установлено, что у рыб взрослые НСК в основном связаны с желудочковой системой (Tozzini et al., 2012). В конечном мозге рыб НСК имеют морфологию радиальной глии и экспрессируют некоторые молекулярные маркеры (виментин, нестин), характерные также для НСК млекопитающих (März et al., 2010; Ganz et al., 2010). Паллиальные и субпаллиальные нейрогенные ниши, идентифицированные у рыб, в настоящее время рассматриваются в качестве гомологов субгранулярной и субвентрикулярной пролиферативных зон мозга млекопитающих (Adolf et al., 2006; Mueller, Wullmann, 2009).

Таким образом, результаты иммуномаркирования PCNA в конечном мозге молодых симы свидетельствуют о наличии поверхностно расположенного пролиферативного пласта и отдельных пролиферирующих клеток, количество и локализация которых характеризуется пространственной специфичностью. В целом паттерн распределения PCNA<sup>+</sup> клеток в дорсальном конечном мозге соответствует таковому для других видов рыб, при этом важная особенность заключена в организации медиальной зоны, характеризующейся повышенным пролиферативным потенциалом (Пущина и др., 2016б). Учитывая данные о неполной эверсии конечного мозга лососевых рыб, мы склонны полагать, что именно в медиальной части конечного мозга сосредоточено большинство



пролиферативных и миграционных процессов клеток, оказывающих решающее воздействие на формообразование конечного мозга в процессе персистентного нейрогенеза.

#### **4.2. Локализация NuCD в пролиферативных зонах и паренхиме паллиальной перивентрикулярной зоны симы в норме и после травматического повреждения**

Клетки PCNA областей мозга большинство авторов определяет, как стимулированные к дифференцировке (Candal et al., 2005), поскольку в таких клетках обнаружены маркеры нейродетерминации: Pax6, Zash1a, Zash1b, нейрогенин, neuroD и маркер нейродифференцировки NuCD (Mueller, Wullimann, 2009).

Результаты маркирования NuCD в конечном мозге молодежи симы подтверждают эти данные. Сравнение результатов о распределении NuCD+ нейронов в дорсальной, латеральной и медиальной зонах конечного мозга симы показало, что дефинитивные клетки, обладающие фенотипом зрелых нейронов, и, по всей видимости, участвующие в формировании нейронных сетей. NuCD является кальций-связывающим протеином, одним из семейства NuECD. Белки Nu являются РНК, связывающими также подобными ELAV, поскольку они имеют большое сходство с ELAV белком дрозофилы, у которой они были обнаружены впервые. У человека обнаружены 4 типа NuC, NuB, NuD, NuR с молекулярной массой около 40 кД. Три из них NuC, NuB, NuD экспрессируются в нейронах (Kazashiva et al 2002). Наиболее доказанная роль NuCD доказанна в нейрогенезе, при котором эти протеины влияют на процессы нейрональной дифференцировке в конститутивном и репаративном нейрогенезе. Выживание вновь образованных нервных клочков необходимо для заживления тканей мозга (Rangan et al 2020). Адаптация новообразованных клеток, в частности, аксонов и дендритов, как в процессе эмбрионального развития, так и при регенерации травм, обеспечивается белками ELAV (Agava et al 2018). Немаловажную роль в нейрональной

пластичности играют мРНК кодирующие синаптические белки нацеленные на Nu белки, что вовлекает эту группу белков в контроль обучения и образования памяти (Bronichke, Zhasmin 2013; Tiruchinopalli 2008). Результаты на молоди симы отличаются от ранее полученных результатов иммунолокализации NuCD при механической травме глаза взрослой форели (Пущина и др., 2016а). В паллиальной пролиферативной зоне форели также был выявлен высокий уровень активности NuCD, по сравнению с дефинитивными нейронами дорсальных областей (Пущина и др., 2016а), однако при повреждении зрительного нерва у взрослой форели в конечном мозге не были выявлены типичные нейрогенные ниши и изменения структуры дорсальной паллиальной зоны, которые были обнаружены при повреждении конечного мозга у молоди симы.

Другим важным наблюдением является гетерогенное иммуномаркирование NuCD в различных частях паллиума, в частности в медиальной зоне, где умеренное маркирование недифференцированных клеток поверхностных паренхиматозных областей было связано, как мы полагаем с участием  $Ca^{2+}$ -связывающих белков, в частности в процессах конститутивного нейрогенез. При травматическом повреждении напротив, в этой области умеренное маркирование было характерно для нейронов, расположенных в паренхиматозных участках мозга с признаком нейрональной дифференцировки. Мы полагаем, что такие изменения паттернов иммунолокализации NuCD связано с изменением посттравматического  $Ca^{2+}$  гомеостаза и с последующей интенсификацией  $Ca^{2+}$  каскада в нейронах в нейронах. Чем объясняется увеличение общего количества NuCD+ клеток после травматического повреждения.

Таким образом, мы полагаем, что область нанесения травмы мозга, а также возраст животного оказывают влияние на характер посттравматического репаративного процесса. Так, при повреждении глаза и зрительного нерва форели, наблюдалась реактивация нейрогенных ниш в зрительном тектуме и мозжечке, но в конечном мозге типичные нейрогенные ниши обнаружены не были (Пущина и др., 2016а). У контрольных животных молоди симы мы наблюдали довольно интенсивный персистентный нейрогенез в различных областях паллиума.

Поверхностно расположенные NuCD<sup>+</sup> клетки формируют скопления или, в отдельных случаях, поверхностно расположенный клеточный пласт. В латеральной зоне плотность распределения иммунопозитивных клеток выше, чем в дорсальной, при этом наиболее поверхностный слой представлен иммунонегативными клетками. В медиальной зоне выявлена высокая плотность распределения, как NuCD-позитивных, так и негативных клеток, клетки в пролиферативной области имеют умеренную плотность распределения.

Данные денситометрического анализа после нанесения травмы позволяют выделять два уровня активности протеина NuCD в конечном мозге симы: интенсивный и умеренный. При этом у контрольных животных во всех зонах преобладали интенсивно маркированные дефинитивные нейроны. NuCD<sup>+</sup> нейроны были окружены недифференцированными иммунонегативными клетками, количество которых варьировало в различных зонах. Такие клетки, согласно классификации Эдельмана с соавторами (Edelmann et al., 2013) мы относили к популяции клеток, стимулированных к нейродифференцировке, но пока не экспрессирующих маркеры нейродетерминации. Проведенные исследования позволили выделить нам 4 типа NuCD<sup>+</sup> клеток, характеризующихся отличающейся морфологией, а также различной плотностью иммуномаркирования NuCD. Мы полагаем, что отличия в денситометрических характеристиках NuCD<sup>+</sup> клеток могут соответствовать различной плотности распределения данного протеина в цитоплазме нейронов, а также соответствовать различной степени нейрональной дифференцировки клеток, образованных в результате репаративного нейрогенеза. Тем не менее, необходимо подчеркнуть, что наряду с описанными типами нейронов в мозге симы имеются нейроны с разной степенью иммуномаркирования NuCD, не зависимо от степени их дифференцировки. Мы также предполагаем, что различные денситометрические характеристики NuCD<sup>+</sup> клеток могут быть связаны с методологическими аспектами, в частности способностью антител проникать на различную глубину в срезы мозга. Но наиболее вероятным и обоснованным предположением, объясняющим отличающуюся интенсивность маркирования

HuCD в нейронах при репаративном нейрогенезе, мы считаем возникновение клеток, находящихся в различной стадии нейрональной дифференцировки.

Экспрессия протеина HuCD на территории паллиальных пролиферативных зон у годовалой молодежи симы достаточно выражена, что соответствует данным на *D. rerio* (Mueller et al., 2011). В исследованиях на *D. rerio* при повреждении конечного мозга в дорсальном теленцефалоне, вновь образованные клетки начинают экспрессировать нейрональный протеин HuCD через 3–4 суток после повреждения (Ayari et al., 2010; Kishimoto et al., 2011). Вновь образованные нейроны появляются как рядом с зоной травмы, так и в удаленных от поврежденной зоны областях. Было показано, что небольшая популяция клеток *D. rerio*, образованная за 2 суток до нанесения повреждения, участвует в восстановлении поврежденной части мозга (Kroehne et al., 2011). В последующие сутки количество HuCD-экспрессирующих клеток градуально возрастало, особенно в зоне повреждения. Изучение пространственно-временного паттерна распределения таких клеток у *D. rerio* позволило заключить, что вновь образованные клетки приобретают фенотипические свойства, характерные для нейронов во время миграции к зоне повреждения (Lam et al., 2009; Edelmann et al., 2013). Эти данные свидетельствуют о изменяющихся взаимоотношениях между пролиферирующими клетками в интактном мозге рыбы и после нанесения травмы.

Через 3 суток после повреждения у симы в дорсальной зоне наблюдались, как интенсивно, так и умеренно HuCD-иммунопозитивные клетки в глубоких слоях, что существенно отличалось от иммуномаркирования в контроле. Снижение интенсивности иммуномаркирования HuCD в большинстве дефинитивных нейронов при сохранении интенсивного маркирования в 25% клеток, по нашему мнению, является проявлением адаптивной реакции на механическую травму конечного мозга. В пролиферативной области дорсальной зоны наблюдалось перераспределение HuCD<sup>+</sup> клеток, образующих пласт у контрольных животных в виде нерегулярных скоплений с сохранением иммунонегативного поверхностного слоя.

В латеральной зоне соотношение интенсивно и умеренно маркированных NuCD дефинитивных нейронов составляло 1:2.5, что отличается от показателей в дорсальной зоне. После повреждающего воздействия пролиферативная зона претерпела значительные изменения. Были обнаружены зоны индуцированного нейрогенеза, представляющие собой нейрогенные ниши различной морфологии и, возможно, этиологии. У взрослой форели после повреждения глаза в латеральной ПЗ были обнаружены локальные скопления NuCD-иммунопозитивных клеток (Пущина и др., 2016а). У молодых симы нейрогенные ниши в латеральной зоне были окружены слабо иммуномаркированными волокнами радиальной глии. Возникновение таких структурных комплексов, продуцирующих новые нейроны, является следствием активизации пролиферативной активности в НСК вследствие травматического воздействия (Lam et al., 2009; Edelmann et al., 2013). НСК обладает способностью продуцировать нейроны и глию, как в условиях организма, так и *in vitro*, хотя нейрональная или глиальная специализация определяется условиями клеточного микроокружения и другими динамическими факторами (Adolf et al., 2006; März et al., 2010; Kishimoto et al., 2011).

У *D. rerio*, как и у млекопитающих, из клеток предшественников образуются в основном нейроны, а не глиальные клетки (Hinsch, Zupanc, 2006; Mueller et al., 2011). Каковы причины такого явления у *D. rerio*, пока не ясно, однако, ограниченное продуцирование астроцитов во взрослом мозге находится в соответствии с их общим низким содержанием в мозге костистых рыб.

Согласно данным Кисимото с соавторами НСК, появившиеся в результате повреждения теленцефалона *D. rerio* дифференцируются в зрелые нейроны в течение 1 недели с момента повреждения (Kishimoto et al., 2012). Большинство таких клеток экспрессирует Tbr1, что свидетельствует о нормальной адаптации нейронов в данной области. Таким образом, вентрикулярные зоны теленцефалона *D. rerio* участвуют в восстановлении нервной ткани при повреждении конечного мозга у взрослой рыбы.

В медиальной зоне конечного мозга симы в результате травмы было обнаружено значительное увеличение количества интенсивно маркированных

HuCD клеток, расположенных на территории пролиферативной зоны, и формирующих потоки мигрирующих клеток нейрональной специализации. Подобная гиперпродукция нейронов в медиальной зоне после травмы, в целом соответствует повышенному пролиферативному потенциалу данной зоны, установленному нами при маркировании PCNA. У взрослой форели, после травмы глаза мы обнаруживали повышенную плотность распределения HuCD+ клеток в дорсальной зоне теленцефалона (Пущина и др., 2016а). Мы полагаем, что повышенное продуцирование нейронов в посттравматический период в различных зонах конечного мозга является видоспецифической особенностью лососевых рыб и возможно отражает филогенетические особенности репаративного процесса, характерные для данной группы рыб.

#### **4.3. Экспрессия BrdU в паллиуме молодежи симы в условиях нормы и после травматического повреждения**

Исследование взрослого нейрогенеза на рыбах началось сравнительно недавно (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). BrdU представляет собой модифицированный нуклеозид, легко встраивающийся в структуру пролиферирующих клеток. В настоящее время имеются немногочисленные экспериментальные данные с введением BrdU на нескольких видах рыб (Pellegrini et al., 2007; Kishimoto et al., 2012). Показано, что в конечном мозге *Austrolebias* пролиферирующие клетки заменяются новорожденными нейронами в течение 24 часов после введения BrdU (Fernández et al., 2011; Rosillo et al., 2016), что, вероятно, связано с короткой продолжительностью жизненного цикла этой рыбы. У других видов рыб установлены более длительные сроки нейрогенеза: 3 суток в паллиуме и 15 суток в обонятельных луковицах *D. rerio* (Adolf et al., 2006), 7 суток в теленцефалоне *Nothobranchius furzeri* (Terzibasi et al., 2012). Высокое, но изменяющееся количество клеток во взрослом мозге, было обнаружено у тилляпии *Oreochromis mossambicus* через 100 суток после введения BrdU (Teles et al., 2012).

В результате исследования в паллиуме молодежи симы была выявлена гетерогенная популяция BrdU<sup>+</sup> клеток и ядер. Проведенные исследования позволили установить, что иммунолокализация BrdU была выявлена в ДД, ДЛ и ДМ паллиальных зонах теленцефалона молодежи симы *O. masou*. Среди BrdU-иммуномаркированных элементов, согласно классификации Траниелло были выделены интенсивно маркированные клетки и ядра (Traniello et al., 2014). Размеры ядер, в соответствии с классификацией Кандаля с соавторами (Candal et al., 2005) составляли до 3.5 мкм. В паллиуме интактной молодежи симы во всех зонах были выявлены однотипные интенсивно BrdU<sup>+</sup> ядра подобного размера. Наибольшее количество мелких интенсивно BrdU-маркированных клеток было выявлено в ДД, а наименьшее в ДМ, что предполагает наибольший вклад в конститутивный нейрогенез дорсальной и наименьший – медиальной паллиальных областей. Результаты иммуномаркирования BrdU согласуются с ранее полученными данными иммуномаркирования PCNA в паллиуме молодежи симы (Пущина и др., 2017). Согласно данным литературы, PCNA маркирует дополнительную ДНК-полимеразу дельта, сохраняющуюся в клетке в течение 24 ч после окончания митоза (Wullimann, Puellas, 1999), однако уровень активности PCNA снижается на 30% (Bravo, et al., 1987). Иммуномаркирование BrdU позволяет диагностировать клетки и ядра, находящиеся в S-фазе клеточного цикла, тогда как при маркировании PCNA можно визуализировать более обширную популяцию клеток, находящихся как в состоянии пролиферации, так и недавно вышедшие из клеточного цикла (Bravo et al., 1987).

При маркировании BrdU в ДЛ и ДМ интактного паллиума молодежи симы были выявлены гетерогенные популяции BrdU<sup>+</sup> клеток, в отличие от ДД. В ДЛ были обнаружены паттерны тангенциальной поверхностной миграции удлиненных BrdU<sup>+</sup> клеток, а в ДМ зарегистрирована радиальная миграция BrdU<sup>+</sup> клеток из ПВЗ в СВЗ. При маркировании PCNA у молодежи симы было установлено, что в медиальной зоне сосредоточено больше PCNA<sup>+</sup> клеток, чем в дорсальной и латеральной зонах (Пущина и др., 2017). Однако, результаты настоящего исследования показывают, что среди пролиферирующей популяции клеток

паллиума симы в S-фазе находятся в основном клетки ДД, а на других стадиях митотического цикла, в т.ч. и в состоянии миграции в ДМ. Как при маркировании PCNA, так и при экспериментальном введении BrdU в ДМ молоди симы были выявлены иммунопозитивные клетки и ядра в составе СВЗ и ПЗ. Однако, если маркирование BrdU выявляло отдельные немногочисленные клетки в ПЗ и СВЗ, то при PCNA-иммуномаркировании паттерны клеток с пролиферативной активностью были более многочисленными (Пущина и др., 2017).

Особенности распределения BrdU<sup>+</sup> клеток у интактной молоди симы свидетельствуют о высокой интенсивности процессов конститутивного нейрогенеза, происходящих не только на территории матричных пролиферативных зон паллиума, расположенных в составе ПВЗ, но также и в более глубоких субвентрикулярных и паренхиматозных слоях теленцефалона. Наличие BrdU<sup>+</sup> клеток в СВЗ и паренхиме паллиума симы подтверждает данные, полученные на аптеронотусе (Zuranc, Sirbulescu, 2011), согласно которым, у этого вида рыб также были обнаружены единичные пролиферирующие клетки в паренхиме теленцефалона. Данные, полученные на молоди симы, могут быть интерпретированы, учитывая особенности онтогенетического развития молоди лососёвых рыб путём фетализации, при которой характерно замедление темпов онтогенеза отдельных органов или их систем, в результате чего у взрослого организма сохраняется эмбриональное состояние соответствующих признаков (Pushchina et al., 2017). Процессы фетализации накладываются на стадию активного роста, при которой процессы морфогенеза наиболее ярко и полно выражены. Группа лососёвых рыб представляет собой филогенетически древнюю ветвь позвоночных, для которых характерна высокая концентрация недифференцированных элементов не только в матричных зонах, но и в паренхиме мозга. Обнаружение нами BrdU<sup>+</sup> клеток в ПВЗ, СВЗ и ПЗ паллиума интактной молоди симы подтверждает данное мнение, и свидетельствует в пользу высокого пролиферативного потенциала паллиальных клеток теленцефалона растущей молоди симы.



В результате травматического повреждения паттерны маркирования BrdU+ клеток как в составе матричных ПВЗ, так и в более глубоких субвентрикулярных и паренхиматозных слоях паллиума молодежи симы изменялись. Было выявлено появление небольших кластеров BrdU+ клеток в ПВЗ ДД и ДЛ, а также отдельных BrdU+ клеток в более глубоких субвентрикулярных и паренхиматозных слоях ДМ. Наряду с этим было выявлено увеличение числа маркированных клеток в ПВЗ и появлении дополнительных, типов BrdU+ ядер, не выявленных у интактных животных. Появление кластеров BrdU+ клеток свидетельствует о синхронизации пролиферативной активности в клетках, которые, вероятно, являются потомками ВНСК глиального типа. Полученные результаты согласуются с данными на *D. rerio*, у которого были выявлены ВНСК глиального типа в дорсальном теленцефалоне (Lam et al., 2009). Источником таких клеток являются эмбриональные радиальные глиальные клетки (Xu et al., 2015), которые не производят непосредственно нейроны, а сначала продуцируют промежуточные клетки-предшественники (Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009). В исследованиях на *D. rerio* установлено, что в результате травмы глиальные клетки предшественники начинают синхронно делиться, расширяя пул вновь образованных клеток-предшественников, участвующих в процессе репарации, часть из которых обладает способностью мигрировать на значительные расстояния (Barbosa et al., 2015). Тем не менее, изучение паттернов репаративного нейрогенеза у других взрослых животных, и участие в них глиальных предшественников, представление о которых сформировались в результате предыдущих исследований, нуждаются в дальнейшем развитии и разработке, поскольку не отражают всю потенциальную гетерогенность ВНСК позвоночных.

Исследования на молодежи симы показали, что BrdU+ кластеры клеток и ядер в результате травмы появляются не только в составе первичной пролиферативной зоны, но также и в глубоких субвентрикулярных и паренхиматозных областях мозга, что свидетельствует о высоком репаративном потенциале паллиума молодежи симы. В результате травмы индуцируется появление дополнительной пролиферативной активности в клетках и ядрах, у которых не выявлялось BrdU-

маркирование у контрольных животных. Различная интенсивность BrdU-маркирования у интактных животных и ее увеличение до 15% в различных областях паллиума после травмы свидетельствует о том, что пролиферирующие клетки могут быть не синхронизированы по времени. Морфологическая гетерогенность BrdU<sup>+</sup> клеток и ядер в различных областях паллиума после травмы, может свидетельствовать о различных источниках происхождения пролиферирующих клеток. В исследованиях на *D. rerio* установлено, что в результате травмы происходит реактивация специфических генетических программ в резидентных vНСК, приводящих к активации пролиферативных процессов (Barbosa et al., 2015). Мы полагаем, что после травмы теленцефалона симы также происходят процессы активации vНСК, в результате которых наблюдается локальное повышение пролиферативной активности в клетках разного типа и возможно различного происхождения. Маркирование BrdU в более крупных клетках, не выявленных в ПВЗ у интактной симы, может свидетельствовать о репрограммировании и трансдифференцировке таких клеток в результате травмы. В подтверждение данной гипотезы свидетельствуют результаты недавних исследований на *D. rerio*, согласно которым зрелые нейроны при повреждении теленцефалона способны трансдифференцироваться и сформировать пул пролиферирующих клеток (Dong et al., 2012). Подобное прямое преобразование или трансдифференцировка не было ранее выявлено во взрослом мозге других видов рыб, что свидетельствует либо о его видоспецифичном характере, либо прямая трансформация еще не была обнаружена в мозге других видов из-за отсутствия подходящей методологии, в частности, прижизненной визуализации.

#### **4.4. Экспрессия GFAP в конечном мозге симы в условиях нормы и после травматического повреждения**

Использование молекулярных маркеров, с помощью которых верифицируются НСК, нейрональные предшественники, а также

дифференцированные формы нейронов в мозге взрослых млекопитающих и других позвоночных, имеет некоторые противоречия. Так GFAP и виментин рассматриваются в качестве универсальных маркеров астроцитарной глиии в мозге позвоночных (Arochena et al., 2004). Тем не менее, типичные астроциты в мозге рыб не выявляются, в то время как верифицируется ограниченная популяция клеток, не имеющих отростков, либо имеющих слабовыраженные апикальные отростки (Kalman, 1998), а также выявляются широко распространённые клетки радиальной глиии (Cuoghi, Mola, 2009). Согласно некоторым данным (Couillard-Despres et al., 2005), GFAP наряду с нестином маркирует ограниченную популяцию НСК в мозге млекопитающих. Таким образом, в настоящее время нет ясности в том, являются ли маркеры нейральных стволовых клеток универсальными для млекопитающих и других позвоночных.

Исследования на кефали *Chelon labrosus* показали, что уровень экспрессии виментина и GFAP изменяется в течение жизни. В частности, было установлено, что у этого вида экспрессия GFAP с возрастом увеличивается, а экспрессия виментина ослабевает (Arochena et al., 2004). Иммуномаркирование GFAP на ранних стадиях развития кефали *C. labrosus* выявляло тела клеток, ножки астроцитов и танициты, тогда как экспрессия в клетках радиальной глиии определялась на более поздних стадиях развития (Arochena et al., 2004). В исследованиях паллиальной зоны теленцефалона молодежи симы клетки с таницитоподобной морфологией и/или типичные отростчатые астроциты на территории пролиферативных зон выявлены не были. Однако, были идентифицированы единичные интенсивно маркированные GFAP клетки, без признаков дифференцировки. В связи с этим, мы полагаем, что участки паллиума содержащие виментин и GFAP иммунопозитивные клетки, соответствуют зонам с высокой нейрональной пластичностью, содержащей взрослые тканеспецифичные нейрональные предшественники, определяющие высокий нейрогенный потенциал в постэмбриональном периоде развития молодежи симы. Это соответствует данным исследований в ЦНС млекопитающих, где было показано, что определённая популяция астроглиальных клеток, в частности, радиальная глиия эпендимы и

субвентрикулярных регионов, могут продуцировать нейроны, а также астроциты и олигодендроциты, что свидетельствует о специализации таких клеток в качестве вНСК (Lam et al., 2009; Grandel, Brand, 2013). У млекопитающих РГ сохраняется в переднем мозге (Ninkovic, Götz, 2013). Однако в нейрогенных нишах, активируемых травмой, РГ отсутствует. У рыб не развивается реактивный астроглиоз, поскольку большинство областей, окружающих травму, вместо астроцитов содержат РГ (Kroehne et al., 2011; Dong et al., 2012). При этом в конечном мозге взрослого *D. rerio* РГ, подобно астроглии млекопитающих, демонстрирует характерные признаки реактивного глиоза сразу после травмы (Baumgart et al., 2012; Vitalo et al., 2016).

На основании того, что часть гетерогенной популяции презумптивных вентрикулярных НКП молодежи симы экспрессирует маркеры РГ, а другая нет, уместно предположить, что новые нейроны в паллиуме молодежи симы могут возникать из нейрональной и ненейрональной популяции клеток-предшественников. Такое предположение согласуется с данными, полученными на взрослом *D. rerio* (Ganz et al., 2010), в ЦНС, которого сохраняется экспрессия эмбриональных генов: GFAP, S100b, BLBP, GLAST, виментина (Fishell, Goldman, 2010). РГ присутствует в теленцефалоне молодежи симы, выстилая эвертированную вентрикулярную поверхность паллиума и образуя новые нейроны в течение различных периодов онтогенеза (Pushchina et al., 2013), что соответствует ранее проведенным мониторинговым наблюдениям постэмбрионального развития *D. rerio* (Rothenaigner et al., 2011).

Паттерн иммуномаркирования GFAP в паллиуме молодежи симы после повреждения значительно отличался от маркирования GFAP у интактных животных. Вместо единичных GFAP<sup>+</sup> клеток, в ДД и ДЛ появляются гетерогенные клеточные скопления, дополнительные волокна радиальной глии, и единичные мелкие интенсивно GFAP-маркированные клетки в паренхиме. Все эти GFAP<sup>+</sup> элементы, появляются *de novo* в результате активации резидентных вНСК глиального типа и их последующей медленной пролиферации, в ответ на травму. В наибольшей степени у молодежи симы это проявлено в ДЛ, где нами были

обнаружены гетерогенные кластеры, включающие как GFAP-позитивные, так и GFAP-негативные клетки, волокна радиальной глии, а также GFAP-позитивные гранулы. Мы полагаем, что данные GFAP-иммунопозитивные структуры представляют собой реактивные нейрогенные ниши, содержащие ВНСК глиального типа, возникающие в ответ на повреждение. В исследованиях на паллиуме *D. rerio* были выявлены радиальные глиальные ВНСК и промежуточные предшественники (Kroehne et al., 2011). Источником ВНСК является эмбриональная радиальная глия (Xu et al., 2015), которая продуцирует промежуточные клетки-предшественники (Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009), характеризующиеся высокой гетерогенностью с точки зрения активной цикличности или покоя (Codega et al., 2014) и экспрессируемых молекулярных маркеров (Giachino et al., 2014; Rothenaigner et al., 2011).

В настоящее время GFAP рассматривается в качестве маркера астроцитарной глии в мозге позвоночных (Arochena et al., 2004). Тем не менее, типичные астроциты в мозге рыб часто не выявляются, однако, верифицируется популяция клеток, не имеющих отростков либо слабо выраженные апикальные отростки (Kalman, 1998), а также популяция клеток радиальной глии (Cuoghi, Mola, 2009). Астроглиальные клетки конечного мозга *A. burtoni* имеют преимущественно радиальную морфологию (Mack et al., 2021), а их клеточные тела образуют поверхность желудочка. Форма и расположение радиальных глиальных GFAP-иммунопозитивных клеток у *A. burtoni*, четко очерчивают переход от желудочковой поверхности дорсального паллиума к менингеальной поверхности (Mack et al., 2021). Согласно некоторым сведениям GFAP маркирует популяцию НСК в мозге млекопитающих (Couillard-Despres et al., 2005), таким образом, в настоящее время вопрос об универсальности маркирования НСК в мозге млекопитающих и других позвоночных окончательно не прояснен.

Исследования на кефали *Chelon Labrosus* показали, что экспрессия GFAP в мозге меняется в течение всей жизни, увеличиваясь с возрастом (Arochena et al., 2004). На ранних стадиях развития кефали *C. labrosus* были выявлены GFAP+ тела клеток, ножки астроцитов и танициты, а типичная экспрессия в клетках РГ обычно

определяли на более поздних стадиях развития. В исследованиях субпаллиальной зоны теленцефалона симы GFAP+ клетки с таницито-подобной морфологией и/или типичные отростчатые астроциты на территории пролиферативных матричных зон выявлены не были. Ранее такие клетки также не выявлялись при маркировании GFAP в области паллиума (Pushchina et al., 2020). У интактных животных в базальной части ПВЗ идентифицировались единичные конститутивные скопления однородно маркированных клеток, соответствующие конститутивным нейрогенным нишам, а также более протяженные зоны с гранулярной экспрессией GFAP как внутри-, так и экстраклеточной локализации. Мы полагаем, что участки субпаллиума, содержащие GFAP иммунопозитивные клетки соответствуют областям с высокой нейрональной пластичностью содержащие взрослые тканеспецифичные нейрональные предшественники, наличие которых определяет высокий нейрогенный потенциал в постэмбриональном развитии молодежи симы. Это соответствует данным исследования ЦНС млекопитающих, для которых было установлено участие популяции астроглиальных клеток, в частности, эпендимальной радиальной глии и субвентрикулярных областей в продуцировании нейронов, а также астроцитов и олигодендроцитов, что свидетельствует о плюрипотентности таких клеток соответствующих вНСК (Lam et al., 2009; Grandel, Brand, 2013). Наличие гранулоподобной экстраклеточной иммунопозитивности GFAP в ПВЗ возможно указывает на нейротрофическое участие GFAP в процессе конститутивного нейрогенеза. У млекопитающих РГ сохраняется в переднем мозге во взрослом периоде (Ninkovic, Götz, 2013), однако в нейрогенных нишах симы, активированных в результате травмы GFAP+ радиальная глия выявлена не была. В исследованиях на *D. rerio* были описаны признаки реактивного глиоза, появляющиеся в остром посттравматическом периоде (Vitalo et al., 2016), но быстро прекращающимся и не развивающимся в таких масштабах как у млекопитающих. Для рыб, типичный реактивный астроглиоз, развивающийся в мозге млекопитающих не характерен, поскольку большинство областей окружающих травму вместо астроцитов содержат РГ (Dong et al., 2012). Принимая во внимание, что часть гетерогенной популяции GFAP+ нейрональных клеток

предшественников (НКП) экспрессируют маркеры РГ, а другая не экспрессирует, весьма вероятно, что новые нейроны в субпаллиуме молодши симы, как и паллиальной зоне (Pushchina et al., 2020) могут возникать из нейрональных и ненеурональных клеток предшественников. Эти предположения согласуются с результатами исследований на *D. rerio*, в теленцефалоне которого сохраняется экспрессия нейрональных генов: GFAP, GLAST, BLBP, S100b (Fishell, Goldman, 2006).

В остром посттравматическом периоде паттерн иммунолокализации GFAP в субпаллиуме молодши симы, существенно отличался от паттерна маркирования у интактных животных. На ряду с НЭ клетками и паттернами гранулярной иммунолокализации во всех исследованных зонах субпаллиума индукция GFAP была выявлена в клетках РГ. Сравнительные исследования и количественный анализ распределения РГ в субпаллиальных областях показал наибольшее число волокон РГ в ВД. В этой области также была характерна наибольшая интенсивность маркирования GFAP в клетках РГ. GFAP+ элементы появляются в результате активации резидентных вНСК глиально типа и их последующей медленной пролиферации в ответ на травматическое воздействие. У молодши симы это наиболее проявлено в ВД, где была выявлена максимальная плотность распределения волокон РГ, а также небольшое количество гранул. Мы полагаем, что в остром посттравматическом периоде GFAP+ структуры представляют собой реактивные нейрогенные ниши, содержащие вНСК глиального типа, возникающие в ответ на повреждение. В паллиальной области аналогичные изменения, связанные с индукцией радиальной глии, были выявлены в латеральной области. В исследованиях на *D. rerio* были выявлены РГ вНСК и промежуточные предшественники (Kroehne et al., 2011). Источником вНСК (согласно данным (Xu et al., 2015) у *D. rerio* является эмбриональная радиальная глиа, продуцирующая промежуточные клетки-предшественники высоко гетерогенные промежуточные клетки предшественники способные к активной пролиферации или состоянию покоя (Codega et al., 2014) и экспрессирующие различные молекулярные маркеры (Rothenaigner, 2011).

Обнаруженные структурные изменения экспрессии GFAP в субпаллиуме молодёжи симы во много соответствуют таковым в паллиуме (Pushchina et al., 2020) и напоминают проявления острого глиоза в мозге млекопитающих. Тем не менее, формирование глиального рубца в субпаллиуме симы не выражено, что соответствует данным на *D. rerio* (März et al., 2010). Согласно данным Токедо и его коллег GFAP+ отростки РГ учувствуют в восстановлении аксонов в большей степени, чем в формировании глиально рубца (Takeda et al., 2015). Детальное исследование клеточного состава и паттернов субклеточной и внеклеточной иммунолокализации GFAP в субпаллиуме молодёжи симы свидетельствует о многократном усилении пластического метаболизма в остром посттравматическом периоде. Многократное увеличение пула GFAP+ НКП является другим важным следствием посттравматического процесса, наличие локальных реактивных кластеров, содержащие интенсивно маркированные клетки свидетельствует о пролиферации клеток предшественников увеличивающих общее количество клеток, задействованных в репаративном процессе. В результате наших исследований после травмы в субпаллиуме в ВВ и ВЛ были идентифицированы GFAP+ клетки с нейроэпителиальной морфологией, а ВД с глиальной, таким образом, посттравматический паттерн экспрессии GFAP связан с увеличением экспрессии белков промежуточных филаментов.

#### **4.5. Экспрессия виментина в конечном мозге симы в условиях нормы и после травматического повреждения**

Виментин является белком промежуточных филаментов, и наиболее часто встречается в клетках астроглии и незрелых астроцитах (Dahl et al., 1981). В иммуногистохимических исследованиях эпендимных клеток и радиальной глии, присутствующей в большом количестве в мозге костистых рыб, было установлено наличие в них GFAP (Kalman, Ari, 2002) и виментина (Cerdea et al., 1998). Секвенирование виментина костистых рыб и анализ аминокислотной последовательности показали его высокую степень гомологии с белком человека



(Herrmann et al., 1996; Cerda et al., 1998). Соотношение нейрно и глиоспецифических белков, маркирующих популяции пролиферирующих клеток предшественников в составе матричных зон конечного мозга и мозжечка у различных видов рыб неодинаково (Kroehne et al., 2011; Zupanc, Sirbulesku, 2013). виментин-позитивные клетки были выявлены в теленцефалоне разных костистых рыб. В паллиуме *D. rerio* выявляются клетки глиального фенотипа, маркируемые виментином, (Cerda et al., 1998). Однако, у молодежи интактной симы в паллиуме виментин-позитивные клетки соответствовали нейроэпителиальному фенотипу. У ранних личинок кефали была выявлена слабая иммунопозитивность к виментину в РГ вентральной области конечного мозга. У более поздних личинок *Chelon Labrosus* экспрессия виментина выражена сильнее, а у крупных личинок, достигает самого высокого уровня активности (Arochena, 2004). В паллиуме молодежи симы экспрессия виментина невысокая, что соответствует данным о снижающейся с возрастом экспрессия виментина в теленцефалоне *C. labrosus* (Arochena, 2004). Однако, у взрослых особей кефали слабо виментин-иммунопозитивные клетки локализуются в основном не в паллиальной, а в субпаллиальной зоне теленцефалона вокруг кровеносных сосудов.

После повреждающего воздействия в ДД паллиума молодежи симы было выявлено усиление экспрессии виментина в клетках ПВЗ, что соответствует данным на *D. rerio* (Adolf et al., 2006; März et al., 2010). Как и при маркировании GFAP, после травматического повреждения, у молодежи симы были выявлены кластеры высоко виментин-позитивных клеток и многочисленные менее интенсивно виментин-маркированные клетки ДД, а также единичные маркированные клетки в паренхиме мозга. В ДЛ обнаружены протяженные участки, содержащие интенсивно виментин-маркированные клетки и радиальную глию, а также пары маркированных клеток в различных слоях паренхимы. Как и в случае с GFAP, маркирование виментином в ДМ молодежи симы характеризовалось наименее выраженными структурными изменениями и количественными изменениями численности иммунопозитивных клеток.

После нанесения травматического повреждения маркирование виментином характеризовалось достоверным ( $p < 0.05$ ) увеличением численности иммунопозитивных элементов: клеток и гранул по сравнению с интактной экспрессией виментина в паллиуме симы. Увеличение численности виментин+ клеток было характерно для ПВЗ ДД и ДЛ паллиума, в ДД возникали кластеры виментин+ клеток без отростков, а в ДЛ появлялись паттерны виментин+ кластеров РГ. Мы полагаем, что в результате травматического процесса в паллиуме симы был активирован дополнительный пул виментин+ НСК глиального фенотипа и их потомки НКП, направленный на устранение последствий травмы. Также увеличивалось количество виментин+ гранул в ПВЗ и СВЗ, плотность распределения которых значительно возрастала по сравнению с контролем. Усиление экспрессии виментина на внутриклеточном уровне сопровождалось маркированием виментин+ гранул в составе плотных реактивных клеточных конгломератов, нейроэпителиального типа в ДД и ДМ, и радиально-глиального в ДЛ. В ПВЗ наблюдались значительные перестройки нейроэпителиального пласта, выражающиеся в локальной гипертрофии участков с НЭ клетками, внутри которых также определялось внутриклеточное присутствие виментин+ гранул. Результаты, полученные нами на паллиуме молодежи симы, соответствуют результатам повреждения на паллиуме *D. rerio* (März et al., 2010; Baumgart et al., 2012), у которого было установлено, что травматическое повреждение сопровождается развитием реактивного глиоза, в ходе которого астроциты демонстрируют повышенную экспрессию белков промежуточных филаментов, таких как GFAP и виментин, а также изменяют экспрессию некоторых генов (März et al., 2010; Baumgart et al., 2012). При повреждении паллиума *D. rerio* усиливается экспрессия GFAP, виментина, нестина и кальций-связывающего белка S100b в клетках радиальной глии, отростки которой гипертрофируются (Baumgart et al., 2012). Подобные структурные изменения клеток радиальной глии были выявлены нами при маркировании GFAP тегмента молодежи кеты после травмы (Пушина и др., 2019).

Выявленные структурные изменения в экспрессии GFAP и виментина в паллиуме молодёжи симы, напоминают проявление глиоза у млекопитающих, однако, формирование рубца в паллиуме симы не выражено, что соответствует данным на *D. rerio* (März et al., 2010; Baumgart et al., 2012). Согласно данным Такеда и его коллег, GFAP<sup>+</sup> отростки радиальной глии рыб восстанавливают повреждённые аксоны в большей степени, чем формируют рубец (Takeda et al., 2015). Детальное исследование клеточного состава и паттернов внеклеточной иммунолокализации виментина в паллиуме молодёжи симы после повреждения свидетельствует о многократном усилении процессов пластического метаболизма. Другим важным следствием является многократное увеличение пула виментин<sup>+</sup> НКП, образованного в результате травмы. Наличие локальных кластеров интенсивно маркированных клеток, сходных размеров и формы свидетельствует о пролиферации клеток предшественников, увеличивающих общее количество клеток, участвующих в репаративном процессе. Таким образом, посттравматические паттерны экспрессии виментина во многом напоминают экспрессию GFAP, что свидетельствует о сходном усилении экспрессии белков промежуточных филаментов в повреждённом паллиуме молодёжи симы. В результате наших исследований в после травмы в ДД и ДМ были идентифицированы виментин<sup>+</sup> клетки с нейроэпителиальной морфологией, а в ДЛ – с глиальной.

Виментин – молекулярный маркер промежуточных филаментов, который часто встречается в незрелых астроцитах и их дифференцированных формах (Schnitzer et al., 1981). Иммуногистохимические исследования эпендимоцитов и радиальной глии в мозге костистых рыб показали наличие в них виментина (Cerdea et al., 1998). Анализ аминокислотной последовательности при секвенировании виментина костистых рыб показали его гомологичность с виментином человека (Cerdea et al., 1998). Соотношение нейроно и глиоспецифических белков маркирующих популяции клеток предшественников в матричных зонах конечного мозга и мозжечка имеет видоспецифические особенности (Kroehne et al., 2011; Zupanc, Sirbulescu, 2013). Виментин-экспрессирующие клетки были обнаружены в конечном мозге у разных видов рыб: в паллиуме и субпаллиуме *D. rerio*, были

выявлены клетки глиального типа, маркированные виментином (Cerda et al., 1998). Однако в паллиуме у молодежи интактной симы большинство Вим<sup>+</sup> клеток имели нейроэпителиальный фенотип (Pushchina et al., 2020). У ранних личинок кефали в субпаллиуме, были выявлены слабо иммунопозитивные клетки радиальной глии. У более поздних личинок *C. labrosus* экспрессия виментина выражена сильнее, а у крупных личинок достигает максимального значения (Arochena et al., 2004). В паллиуме молодежи симы экспрессия виментина сравнительно не высокая (Pushchina et al., 2020), а в субпаллиальной области интактной молодежи симы наряду с кластерами иммунопозитивных клеток в ПВЗ были выявлены виментин<sup>+</sup> клетки в СВЗ и ПЗ. Полученные данные соответствуют результатам иммуномаркирования виментина в субпаллиуме кефали, у которой, однако, большинство виментин<sup>+</sup> клеток было идентифицировано вокруг кровеносных сосудов в вентральной зоне теленцефалона (Arochena et al., 2004).

После травматического повреждения дорсальной зоны паллиума молодежи симы во всех областях субпаллиума наблюдалось усиление экспрессии виментина в клетках ПВЗ, что соответствует данным на *D. rerio* (Adolf et al., 2003).

Через 1 неделю после повреждения в субпаллиуме молодежи симы были выявлены кластеры виментин<sup>+</sup> клеток и многочисленные виментин маркированные клетки, а также единичные маркированные клетки в паренхиме мозга. В отличие от паллиума после повреждения в субпаллиальной области наиболее характерны скопления клеток нейроэпителиального типа в ПВЗ. Типичных паттернов локализации РГ в субпаллиальной области, в отличие от паллиума (Pushchina et al., 2020), в посттравматическом периоде выявлено не было. В паренхиматозной зоне, напротив, преобладали умеренные либо интенсивно Вим маркированные клетки. Результаты количественного анализа, показали существенное увеличение Вим<sup>+</sup> клеток в ВЛ и ВВ ( $p \leq 0,05$ ). В ВД достоверное увеличение числа Вим<sup>+</sup> клеток выявлено не было. Наряду с увеличением числа иммунопозитивных клеток в посттравматическом периоде, повышалось количество виментин<sup>+</sup> гранул в ПВЗ и СВЗ, плотность их распределения в ВД и ВЛ значительно возрастала по сравнению с контролем. Усиление экспрессии

виментина на внутриклеточном уровне часто сопровождалось увеличением виментин<sup>+</sup> гранул в составе плотных реактивных конгломератов нейроэпителиального типа в латеральной и вентральной областях. Результаты, полученные нами на субпаллиуме молодежи симы, соответствуют результатам повреждения в теленцефалоне *D. rerio* (März et al., 2010; Baumgart et al., 2012) у которого было установлено развитие посттравматического реактивного глиоза, в процессе которого определяется повышение экспрессии белков промежуточных филаментов, в частности виментина, а также изменение экспрессии некоторых генов (März et al., 2010, Baumgart et al., 2012). В результате повреждения в теленцефалоне *D. rerio* усиливается экспрессия виментина, нестина и кальций-связывающего белка S100b в клетках радиальной глии (Baumgart et al., 2012). Ранее проведенные исследования на паллиуме показали сходные структурные изменения в клетках радиальной глии, а также при маркировании GFAP в посттравматическом периоде при повреждении тегмента молодежи кеты (Пущина и др., 2019). Тем не менее, в субпаллиальной области конечного мозга молодежи симы, посттравматическая экспрессия виментина появлялась главным образом в НЭ клетках и их кластерах, соответствующими НСК/НКП эмбрионального типа и не выявляется в клетках РГ. Увеличение пула Вим-ип клеток в латеральной и вентральной областях субпаллиума, отличается от данных полученных на паллиуме (Pushchina et al., 2020). Наличие локальных кластеров интенсивно маркированных клеток и гранул сходных размеров и формы, свидетельствуют о посттравматической пролиферации клеток предшественников нейроэпителиального типа, увеличивающих общее число клеток, участвующих в репаративном процессе. Таким образом, посттравматические паттерны экспрессии виментина в субпаллиуме симы, отличаются от паттерна экспрессии GFAP, тем не менее усиление экспрессии белков наблюдается в обоих случаях. Однако важное отличие заключается в том, что экспрессии GFAP выявлена как в предшественниках взрослого типа (РГ), так и нейроэпителиального типа (НЭК), причем внутриклеточная экспрессия виментина характерна в основном для клеток нейроэпителиального типа. Другим важным отличием посттравматической

экспрессии виментина является экстраклеточные гранулярные паттерны распределения, преобладающие в ПВЗ.

#### **4.6. Экспрессия даблкортина в конечном мозге симы в условиях нормы и после травматического повреждения**

В настоящее время даблкортин используется как общепринятый маркер мигрирующей популяции нейробластов и представляет собой микротубулин-ассоциированный протеин, необходимый для миграции молодых нейронов в мозге позвоночных (Schaar et al., 2004). Иммуногистохимические исследования, проведенные более чем на 70 видах млекопитающих, показали наличие ДК в качестве маркера гиппокампального нейрогенеза у взрослых животных (Manger, 2015). Взрослый нейрогенез исследовали также в конечном мозге птиц: *Gallus gallus*, *Columbia livia* и *Streptopelia risoria*, у которых PCNA и ДК-иммунопозитивные клетки были обнаружены у просвета мозгового желудочка, маркируя вновь образованные нейроны в конечном мозге взрослых животных (Mazengenya et al., 2015).

Даблкортин представляет экспрессирующийся незрелыми нейронами белок, ассоциированный с микротрубочками и (Ayanlaja et al., 2017). Миграция нейронов является критическим процессом в развитии нервной системы. Уникальный паттерн экспрессии даблкортина позволяет его использовать в качестве маркера нейрогенеза у взрослых животных и мутации в этом белке нарушает миграцию нейронов, приводящую к развитию патологических изменений (Couillard-Despres et al., 2005). Хотя ДК способен модулировать и стабилизировать микротрубочки для обеспечения эффективной миграции нейробластов, механизмы, участвующие в выполнении эти функций, остаются плохо понятыми. Нестабильное взаимодействие между ДК и микротрубочками дестабилизирует цитоскелетную организацию, приводящая к нарушению миграции клеток (Ayanlaja et al., 2017). Экспрессия даблкортина, (но не экспрессия

митотических маркеров) сохраняется некоторое время в молодых терминально дифференцированных нейронах (Brown et al., 2003).

Даблкортин экспрессируется вновь-созданными и мигрирующими нейронами в интактном паллиуме симы, локализуясь, как в цитоплазме, так и в ядрах клеток; его наличие обеспечивает многие внутриклеточные процессы. Экспрессия ДК может быть важна при росте аксонов и/или синаптогенезе во взрослом организме (Ambrogini et al., 2004), а также в конусе роста дендритов (Schaar et al., 2004). Экспрессия даблкортина сохраняется в постмитотических нейронах и совпадает с экспрессией кальретинина (Brandt et al., 2003).

В наших исследованиях в паллиальной области теленцефалона молодежи интактной симы были обнаружены отдельные интенсивно ДК+ клетки, содержащие, либо не содержащие радиальные отростки, а также ДК+ гранулы. Исследование локализации ДК в паллиуме симы показало низкую экспрессию белка в клетках первичных нейрогенных зон, с преобладанием радиального фенотипа предшественников в ДД. По сравнению с другими белками промежуточных филаментов: виментином и GFAP, число ДК+ клеток снижено в ПВЗ паллиума, что вероятно свидетельствует о сравнительно невысоком содержании постмитотических нейробластов в ПВЗ. Тем не менее, в различных областях интактного паллиума выявлено различное содержание ДК+ гранул. Мы предполагаем, что экспрессия ДК в виде гранул в паллиуме симы может быть необходима для обеспечения нейрональной пластичности взрослых нейронов.

Даблкортин необходим для нейрогенеза у взрослых млекопитающих (Ambrogini et al., 2004) и является маркером вновь генерируемых нейронов (Brown et al., 2003). У *Nothobranchius furzeri* ДК маркирует недавно образованные нейроны в паллиуме, что указывает на сходные функции ДК у млекопитающих и рыб. В исследовании на млекопитающих было показано, что нейроны, генерируемые в зрелом возрасте, функционально-активны и интегрируются в существующие нейрональные сети, и, предположительно, принимают участие в некоторых аспектах поведенческой пластичности (van Praag et al., 2002). В исследованиях на птицах ДК-экспрессирующие клетки имеют униполярную, биполярными или

мультиполярную морфологию с длинными отростками (Mazengenya et al., 2015). Особо высокая концентрация ДК<sup>+</sup> клеток была характерна для паллиальных регионов мозга позвоночных, причем каудальные регионы паллиума более интенсивно маркированы по сравнению с ростральными (Brown et al., 2004; Mazengenya et al., 2015).

Результаты наших исследований на молоди симы, в целом, соответствуют данным, полученным на птицах и других позвоночных. Таким образом, наличие ДК-позитивных клеток в паллиальной области мы связываем с процессами конститутивного постэмбрионального нейрогенеза и нейрональной пластичностью, что согласуется с результатами исследований на паллиуме *D. rerio* (Grandel et al., 2006) и *N. furzeri* (Terzibasi et al., 2012). Результаты исследований на паллиуме молоди симы также подтверждают одновременный процесс радиальной миграции новорожденных клеток из зоны пролиферации к окружающим субпаллиальным клеточным массам, что соответствует ранее полученным данным на других видах рыб (Grandel et al., 2006; Terzibasi et al., 2012).

В результате повреждения иммуномаркирование ДК претерпело существенные изменения. В настоящее время существуют немногочисленные работы, связанные с использованием ДК в качестве маркера репаративного нейрогенеза в мозге млекопитающих при травме ЦНС (Ayanlaja et al., 2017). В паллиальной части мозга симы, по сравнению с контролем, наблюдалось интенсивное ДК-маркирование клеток в перивентрикулярных отделах мозга.

Характерной особенностью, которая выявляется при маркировании ДК после травмы, является выраженный паттерн миграции клеток из нейрогенной зоны паллиума вглубь паренхимы мозга. Это подтверждает одновременный процесс радиальной миграции вновь образованных в результате травматического процесса многочисленных нейробластов. Обширная популяция клеток паллиума симы, содержащих даблкортин после травмы включала умеренно ДК-маркированные нейробласты, содержащие цитоплазматические ДК<sup>+</sup> включения, а также мелкие интенсивно ДК-маркированные элементы.



Появление интенсивно ДК-маркированных клеток в паренхиме мозга, по нашему мнению, может свидетельствовать об активизации пулов резидентных НСК, активированных в результате травматического процесса, что соответствует данным на млекопитающих (Ayanlaja et al., 2017). В паренхиматозной зоне паллиума после травмы характерно возникновение паттернов завершенных митозов, представляющих собой пару близко расположенных, интенсивно ДК-маркированных клеток, расположенных в глубоких слоях паренхимы вне пролиферативных зон. Подобные структуры отсутствуют в паллиуме интактной молодежи симы. Мелкие ДК<sup>+</sup> клетки паренхиматозной локализации могут соответствовать популяции вНСК, активизирующейся в результате травматического процесса.

Это соответствует данным, полученным на мезенхимальных стволовых клетках млекопитающих, где показано, что наибольшей пролиферативной активностью обладают очень мелкие клетки, размер которых не превышает 5 мкм, обладающие высоким пролиферативным потенциалом (Kimbrel et al., 2014). Мы полагаем, что возникновение таких клеточных форм в мозге молодежи симы является одним из следствий получения травмы. В ДМ, в отличие от ДД и ДЛ, мы наблюдали высоко иммуногенные клетки, как в составе паллиальной паренхимы, так и на территории ПВЗ. В ДМ были выявлены наиболее многочисленные ДК-маркированные мигрирующие клетки, с умеренной ДК-иммунореактивностью.

Таким образом, мы полагаем, что в результате травматического процесса, в паллиуме симы формируется дополнительный пул высокоактивных вНСК, а также паттерны массовой миграции вновь образованных ДК<sup>+</sup> нейробластов, мигрирующих из нейрогенных зон в глубокие слои паренхимы.

Даблкортин является микротубулин-ассоциированным протеином, используемым в качестве молекулярного маркера нейробластов, необходимого для миграции незрелых форм нейронов в мозге позвоночных (Schaar et al., 2004). Исследования на млекопитающих показали эффективное использование даблкортина в качестве маркера гиппокампального нейрогенеза позвоночных (Campbell, Götz, 2002; Zhao et al., 2008; Manger, 2015). Аналогичные исследования

были проведены также для конечного мозга птиц: курицы и голубя, у которых пролиферирующие PCNA и даблкортин позитивные клетки были выявлены у просвета латеральных желудочков, маркирующих вновь образованные нейроны в конечном мозге взрослых животных (Mazengenya et al., 2015).

Даблкортин экспрессируется незрелыми нейронами, его синтез в нейронах ассоциирован с микротрубочками (Ayanlaja et al., 2017). Миграция нейронов является критическим процессом в развитии нервной системы. Уникальный паттерн экспрессии даблкортина позволяет его использовать в качестве маркера нейрогенеза у взрослых животных и мутации в этом белке, нарушают процесс нейрональной миграции, приводящей к патологическим изменениям (Couillard-Despres et al., 2005). Не смотря на способность даблкортина модулировать и стабилизировать микротрубочки для обеспечения эффективной миграции, механизмы, регулирующие этот процесс плохо изучены. Нарушения взаимодействия между даблкортином и микротрубочками, дестабилизируют скелетную организацию, что приводит к нарушению миграции клеток (Ayanlaja et al., 2017).

В отличие от других митотических маркеров, экспрессия даблкортина долгое время сохраняется в молодых терминально-дифференцированных нейронах (Brown et al., 2003). Экспрессия даблкортина играет решающую роль в процессе роста аксонов и синаптогенеза у взрослых животных (Ambrogini et al., 2004). Даблкортин экспрессируется вновь созданными и мигрирующими нейронами в интактном субпаллиуме симы локализуясь как в цитоплазме, так и в ядрах клеток, его наличие обеспечивает процессы внутриклеточной подвижности. Согласно некоторым данным, экспрессия даблкортина сохраняется в постмитотических нейробластах и может совпадать с экспрессией кальретинина (Brandt et al., 2003).

В наших исследованиях в субпаллиальной области интактной симы были обнаружены интенсивно ДК маркированные клетки и гранулы. Исследование локализации даблкортина в паллиуме симы, показало низкую экспрессию белка в клетках первичных нейрогенных зон, с преобладанием радиального типа предшественников в ДД зоне паллиума (Pushchina et al., 2020). По сравнению с

GFAP содержание виментина и даблкортина практически вдвое снижено в ПВЗ субпаллиума, что свидетельствует о сравнительно невысоком содержании постмитотических нейробластов в ПВЗ. Тем не менее, в различных областях как интактного субпаллиума, так и паллиума, выявлено различное количественное содержание ДК<sup>+</sup> гранул. Мы полагаем, что экспрессия ДК в виде гранул в паллиуме и субпаллиуме необходима для обеспечения нейрональной пластичности.

В исследованиях на млекопитающих установлено, что ДК необходим для формирования нейронов во взрослом мозге (Brown et al., 2003). У *Nothobranchius furzeri* (Terzibasi et al., 2012) и *Astatotilapia burtoni* (Mack et al., 2021) ДК позитивные клетки были выявлены в теленцефалоне взрослого животного, что очевидно указывает на сходные функции ДК у рыб и млекопитающих. В исследованиях на млекопитающих установлено, что нейроны, образующиеся во взрослом возрасте способны эффективно интегрироваться в существующие нейрональные сети, принимая участие в некоторых аспектах поведенческой пластичности (van Praag et al., 2002). Исследования на птицах показали, что ДК-экспрессирующие клетки характеризуются различной морфологией (Mazengenya et al., 2015). Высокая концентрация ДК<sup>+</sup> клеток характерна для паллиальных регионов мозга позвоночных, каудальные регионы паллиума как правило маркируются более интенсивно по сравнению с ростральными (Mazengenya et al., 2015, Brown et al., 2003).

Результаты исследований на субпаллиуме мозга молодежи симы отличаются от данных, полученных на птицах и других позвоночных, тем не менее, наличие ДК<sup>+</sup> клеток в субпаллиальной области мы связываем с процессами нейрогенеза и нейрональной пластичностью, что согласуется с результатами исследований на *Astatotilapia burtoni* Mack et al., 2021), *N. furzeri* (Terzibasi et al., 2012) и *D. rerio* (Grandel et al., 2009). Данные полученные на субпаллиуме молодежи симы также в целом подтверждают одновременный процесс радиальной миграции вновь образованных клеток зоны миграции к окружающим субпаллиальным клеточным

массам, что соответствует ранее полученным данным на других видах рыб (Terzibasi et al., 2012, Grandel et al., 2009).

В исследованиях на цихлиде *Astatotilapia burtoni* проанализировали рост радиальной глиии с помощью маркеров стволовых клеток (ядерного антигена пролиферирующих клеток PCNA и Sox2), а также даблкортина в качестве маркера нейродифференцировки и обнаружили, что эти маркеры экспрессируются на поверхности желудочков в соответствии с паттерном роста стэкинга (Mask et al., 2021). У *Astatotilapia burtoni*, даблкортин и Sox2-экспрессирующие клетки были обнаружены в более глубоких слоях паллиума. Эти данные позволяют предполагать, что радиальные глиальные клетки дают начало мигрирующим клеткам, доставляющим новые нейроны и глию в более глубокие области теленцефалона, что приводит к расширению центральных участков и смещению паттернов радиальной глиии. Таким образом, результаты некоторых исследований (Mask et al., 2021) показывают, что радиальные глиальные клетки могут адаптироваться к морфологическим процессам роста в мозгу взрослых рыб и вносить свой вклад в этот рост.

В результате повреждения паллиума, иммуномаркирование ДК в субпаллиуме молодежи симы существенно изменяется. В настоящее время есть лишь отдельные работы, связанные с использованием ДК в качестве маркера репаративного нейрогенеза при травме мозга млекопитающих (Ayanlaja et al., 2017). Например, экспрессия ДК в паллиальной части мозга симы в посттравматическом периоде наблюдалось в ПВЗ (Pushchina et al., 2020). Характерной особенностью, которая выявляется при маркировании ДК, является выраженный паттерн радиальной миграции клеток из ПВЗ в более глубокие паренхиматозные слои мозга. Такая одновременная миграция характерна для нейробластов, образованных в посттравматическом периоде. Наиболее выражено увеличение нейробластов в латеральной зоне ( $p < 0,05$ ), несколько меньше в вентральной ( $p < 0,05$ ), по сравнению с контрольными животными. В дорсальной области достоверного увеличения числа ДК<sup>+</sup> клеток не было выявлено. Появление интенсивно ДК<sup>+</sup> маркированных клеток в паренхиме мозга, по нашему мнению,

свидетельствует об активации резидентных пулов НСК в результате травматического процесса, что соответствует данным на млекопитающих (Ayanlaja et al., 2017). В паренхиматозной зоне паллиума характерно возникновение паттернов завершённых митозов, представляющих собой пару близкорасположенных ДК<sup>+</sup> клеток в глубоких слоях паренхимы, вне пролиферативных зон (Pushchina et al., 2020). Подобные единичные структуры были выявлены в ВД зоне субпаллиума.

Мелкие ДК<sup>+</sup> клетки паренхиматозной локализации могут соответствовать популяции резидентных вНСК, активизирующихся в результате травматического процесса. Наличие таких клеток соответствует локализации вНСК мезенхимального типа у млекопитающих; такие мелкие клетки обладают наибольшей пролиферативной активностью, и их размер, как правило, не превышает 5 мкм (Kimbrel et al., 2014). Наличие большого количества таких клеточных форм характерно для паллиума молодежи (Pushchina et al., 2020) и в меньшей степени определяется в субпаллиуме. Таким образом, в результате травматического процесса в субпаллиальной зоне теленцефалона вероятно дополнительно активизируется пул вНСК, а также паттерны массовой миграции вновь образованных ДК<sup>+</sup> нейробластов мигрирующих из нейрогенных зон в глубокие слои паренхимы.

#### **4.7. Локализация ГС в конечном мозге молодежи кеты условиях интактности и после повреждения**

В интактном мозге молодежи кеты ГС маркирует гетерогенную популяцию нейрональных клеток-предшественников, локализованную в ПВЗ, а также ограниченное количество вНСКП в паренхиме. Как в паллиальной, так и в субпаллиальной областях интенсивность маркирования ГС варьировала от умеренной до высокой. В медиальной паллиальной зоне и всех субпаллиальных зонах маркирование ГС было выявлено в гранулах, расположенных в ПВЗ. В паллиуме интактной кеты ГС наиболее часто маркирует в ПВЗ клетки

нейроэпителиального типа, имеющие недифференцированный фенотип и лишённые отростков. Подобные ГС+ НЭ клетки были также обнаружены в дорсолатеральном паллиуме *D. rerio* (Suarez et al., 2002). Однако, исследования показали, что в теленцефалоне *D. rerio* нейрональные предшественники характеризуются пространственной гетерогенностью (Ogino et al., 2016). Ранее проведенные исследования на *D. rerio* показали гранулярный паттерн экспрессии глиального нейротрофического фактора (GDNF), участвующего, как полагают, в нейрогенезе и нейрональной регенерации (Wong et al., 2020). Анализ морфометрических и денситометрических параметров ГС+ клеток в паллиуме молодых кеты подтверждает гетерогенный характер популяции маркируемых вНСКП. В наших исследованиях маркирование ГС было выявлено во всех паллиальных зонах теленцефалона кеты. Характер маркирования позволял выделять как довольно протяженные нейрогенные области, содержащие ГС+ клетки, так и отдельные скопления, морфологически соответствующие локальным нейрогенным нишам конститутивного типа.

Нейрогенная активность вНСКП существенно зависит от микросреды, в которой они локализованы, так называемая конститутивная нейрогенная ниша, в которой размещаются НСК/вНСКП, регулирует выживание этих клеток и конечный баланс между поддержанием в состоянии покоя и производством расширяющегося и продифференцированного потомства (Bonfanti, Peretto, 2011). Наличие конститутивных нейрогенных ниш были продемонстрированы на *D. rerio* (Ekstrom et al., 2001; Zupanc, 2001; Grandel et al., 2006; Grandel, Brand, 2013). В составе нейрогенной ниши выделяют внеклеточный матрикс, астроциты, микроглия и нейрональные предшественники, базальная пластинка и эпителиальные клетки, такие как эндотелиальные клетки (Grandel et al., 2006). Глиальные клетки, эндотелий и внеклеточный матрикс имеют существенное значение для правильного функционирования нейрогенной ниши, поскольку они секретируют растворимые факторы или экспрессируют мембранные молекулы, в частности морфогены, цитокины и митогенные факторы, которые регулируют процесс нейрогенеза (Lim et al., 2000; Ma et al., 2005; Kazanis, 2012; Wong et al.,

2020). Исследования на *D. rerio* показали, что одни и те же вНСКП участвуют в создании и поддержании микросреды нейрогенных ниш (Ortega-Perez et al., 2007; Kazanis, 2012).

Для характеристики скорости распространения вНСКП и судьбы новых нейронов в настоящее время паллиальную и субпаллиальную нейрогенные зоны рыб рассматривают в сравнительном аспекте субгранулярной и субвентрикулярной нейрогенных зон млекопитающих (Grandel et al., 2006). Так, в исследованиях на *D. rerio* была установлена низкая скорость распространения и генерации нейронов в паллиальной области, что позволяет сопоставлять эту область с зубчатой гранулярной зоной гиппокампа млекопитающих (Ceci et al., 2019). Дополнительно у *D. rerio* были идентифицированы короткие миграционные дистанции клеток паллиальной области из ПВЗ в паренхиму (Grandel et al., 2006). Исследования на паллиуме молоди Тихоокеанской симы показали, что при маркировании PCNA в медиальной зоне сосредоточено больше PCNA+ клеток, чем в дорсальной и латеральной зонах (Пущина и др., 2017). Результаты маркирования BrdU показали, что среди пролиферирующей популяции клеток паллиума симы в S-фазе находятся в основном клетки ДД, а на других стадиях митотического цикла, в т.ч. и в состоянии миграции в ДМ. Как при маркировании PCNA, так и при экспериментальном введении BrdU через 1 неделю в ДМ молоди симы были выявлены иммунопозитивные клетки и ядра в составе СВЗ и ПЗ (Pushchina et al., 2020).

В паллиуме *D. rerio* был выявлен чередующийся паттерн делящихся клеток, положительных для пролиферативного ядерного антигена (PCNA +) и покоящиеся клетки (PCNA-) (Kroehne et al., 2011; Grandel, Brand, 2013). Около двух третей PCNA+ клеток были фенотипированы как радиальная глия, как по морфологическим признакам, так и по положительности к маркерам радиальной глии, таким как глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), виментин, белок S100B, мишень гена Notch и HER4, глутаминсинтетаза, специфический переносчик глутамата астроцитов и белок, связывающий жирные кислоты (Götz, Huttner, 2005; Grandel et al., 2006; Kroehne et al., 2011; Schmidt et al., 2013). Одна треть PCNA+

клеток была охарактеризована как нейробласты, поскольку они экспрессировали нейтральный белок межклеточной адгезии (PSA-NCAM) (März et al., 2010, 2011; Kroehne et al., 2011; Grandel, Brand, 2013). В паллиуме молодежи интактной симы клетки радиальной глии выявлены не были, маркеры пролиферации (PCNA и BrdU), а также GFAP и виментин выявлялись в клетках нейроэпителиального типа (Пущина и др., 2017, Pushchina et al., 2020). Данные настоящего исследования также свидетельствуют исключительно о наличии ГС+ клеток нейроэпителиального типа в составе конститутивных нейрогенных ниш интактного паллиума молодежи кеты.

В субпаллиальной области молодежи кеты распределение ГС+ клеток в большей степени соответствует локализации КНН. Таким образом, мы можем заключить, что в конечном мозге интактной кеты ГС маркирует популяцию нейрональных клеток-предшественников, имеющих нейроэпителиальный фенотип. В исследованиях на *D. rerio* идентифицировано около шести областей мозга, имеющих свойства нейрогенных ниш, две из которых локализуются вдоль желудочковой стороны мантии и вдоль дорсально-боковой поверхности субпаллиума (Grandel et al., 2006; Grandel, Brand, 2013; Schmidt et al., 2013). В этих областях было выявлено около 10 регионов, включая теленцефалон, характеризующихся активным распространением ВНСКП (Ekstrom et al., 2001; Grandel et al., 2006; Hinsch, Zupanc, 2006).

Субпаллиальную зону теленцефалона рыб в настоящее время рассматривают в качестве функционального аналога субвентрикулярной зоны (SVZ) млекопитающих (Grandel et al., 2006; Ganz et al., 2010; Kroehne et al., 2011; Schmidt et al., 2013). Для субпаллиальной области *D. rerio* в целом характерен более высокий уровень пролиферации по отношению к паллиальной зоне и наличия нестин-экспрессирующих пролиферирующих клеток (Grandel et al., 2006; Ganz et al., 2010; Kizil et al., 2012). Эти клетки имеют нейроэпителиальный фенотип, а также интеркинетическую миграцию ядра, экспрессию апикальных маркеров ZO1 и белков PAR (Götz, Huttner, 2005). У молодежи кеты во всех областях субпаллиальной зоны были выявлены ГС+ гранулы, которые очевидно свидетельствуют об интенсивной нейрохимической сигнализации между ВНСКП в



составе КНН и за их пределами. Гранулярный паттерн распределения ГС, не только в ПВЗ, но и в СВЗ, а также различная интенсивность иммуномаркирования указывают на широкую и гетерогенную структуру субпаллиальной нейрогенной зоны. В субпаллиальной области *D. rerio* не были выявлены покоящиеся клетки, в этой области генерируются нейроны, которые мигрируют в обонятельную луковицу и дифференцируются на ГАМК-ергические и TH+ интернейроны в зернистом и перигломерулярном слое (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). В СВЗ взрослой мыши характеризуется высоким уровнем нейрогенеза продуцирующего популяции астроцитов (клетки типа В), которые действуют как стволовые клетки ЦНС (Doetsch et al., 1997).

Через 3 суток после повреждения мы наблюдали значительные изменения в локализации ГС в конечном мозге молодых кеты. Также нами установлено появление дополнительного типа ГС+ нейрональных предшественников, имеющих фенотип радиальной глии и отсутствующих у интактных животных. Травматическое повреждение теленцефалона приводило к значительному повышению числа ГС+ клеток в ПВЗ, многократно превышающему число иммунопозитивных клеток в норме. В результате травмы интенсивность маркирования ГС также была разделена на две аналогичные группы (интенсивные и умеренные), однако уровень оптической плотности после травмы достоверно ( $p < 0.05$ ) повышался в обеих группах против контроля.

Гетерогенная популяция ГС+ клеток в условиях повреждения включала два типа нейрональных предшественников. Первые, НЭ, ранее присутствующие в составе КНН и участвующие, как мы полагаем, в процессе реактивации и формирования РНН. Другой тип нейрональных предшественников, отсутствующий у интактных животных, представляет собой гетерогенную популяцию радиальной глии выявляемую в составе РНН в различных комбинациях. Плотность распределения реактивной РГ в паллиальной области теленцефалона после травмы была оценена в ДД, ДМ и ДЛ, и как мы полагаем, находилась в соответствии с количеством нейрональных предшественников. Результаты сравнительного анализа показали, что в паллиуме максимальная

плотность распределения РГ в ДД и минимальная в ДЛ. Результаты сравнительного анализа свидетельствуют о преобладании РГ в паллиальной области (ДД, ДМ и ДЛ) по сравнению с субпаллиальной (ВД, ВВ).

Наряду с появлением реактивных ГС+ вНСК глиального типа в паллиуме и субпаллиуме молодые кеты были выявлены значительные паттерны клеточной миграции. Траектории движения клеток включали радиальные (вдоль волокон РГ) и тангенциальные паттерны и формирование многочисленных РНН различного объема, локализации и протяженности в паллиуме. В ДМ паттерны посттравматической миграции ГС+ клеток формировали псевдостратифицированную структуру в СВЗ и ПЗ, в ПВЗ преобладали многочисленные мелкие РНН, включающие НЭ и радиально глиальные ГС+ популяции клеток. В ДЛ были выявлены паттерны тангенциальной миграции ГС+ НЭ клеток, а также участки, содержащие наиболее протяженные волокна РГ. Доля ГС+ в паллиальных и субпаллиальных областях теленцефалона через 3 суток после травмы значительно возросла по сравнению с ГС+ клетками.

Согласно данным литературы, существует быстро и медленно пролиферирующие популяции РГ в мозге *D. rerio*, клетки которой делятся путём ассиметричных митозов (Adolf et al., 2006). В результате такого деления одна из дочерних клеток оказывается без отростка, а другая получает отросток, который впоследствии может втягиваться путём сомальной транслокации (Adolf et al., 2006). В наших исследованиях, после травматического повреждения конечного мозга кеты, были найдены ГС+ клетки обоих типов в составе РНН. Таким образом, в результате травмы конечного мозга, мы наблюдали паттерны реактивации КНН, с появлением дополнительного типа радиально-глиальных предшественников маркируемых ГС. Наряду с ГС-маркируемыми радиально направленными волокнами, после травмы нами был идентифицирован дополнительный тип ГС+ волокон в ДЛ, направленных тангенциально и распространяющихся на уровне ПВЗ и СВЗ. Такие волокна отсутствовали у контрольных животных.

В исследованиях на *D. rerio*, после экспериментально индуцированного повреждения наблюдались процессы интенсивной регенерации (März et al., 2010;

Kroehne et al., 2011; Kishimoto et al., 2012). Протокол, использованный в наших исследованиях, был аналогичен ранее опубликованному протоколу на *D. rerio* (Kishimoto et al., 2012), характеризующемуся введением иглы в одну из двух полушарий теленцефалона. В исследованиях на *D. rerio* другое полушарие теленцефалона оставалось неповрежденным, что позволяло одновременно оценивать интенсивность конститутивного нейрогенеза и регенеративный ответ (Kroehne et al., 2011; Kishimoto et al., 2012; Grandel, Brand, 2013). В исследованиях на молоди кеты, согласно ранее полученным данным на молоди симы (Пущина и др., 2017; Pushchina et al., 2020), для оценки конститутивного нейрогенеза мы использовали интактных животных. Результаты показали, что травма головного мозга молоди кеты вызывает серию каскадных событий, характеризующихся отеком, смертью поврежденных нейронов, глиальную гипертрофию и острый воспалительный ответ.

В исследованиях на *D. rerio* было показано, что интенсивность воспалительной реакции достигает своего пика через 4 суток после поражения (Kroehne et al., 2011). Через 3 суток после поражения конечного мозга кеты мы наблюдали интенсивное разрастание клеток, как в нейрогенных областях, так и в паренхиме, что соответствует данным на *D. rerio* (März et al., 2010; Kroehne et al., 2011; Kishimoto et al., 2012). У *D. rerio* в этот период была выявлена высокая экспрессия митотических маркеров, такие как PCNA в зоне СВЗ (Kishimoto et al., 2012) и в дорсальной области с GFAP+ / S100B + /her4.1 + радиальные глиальные клетки (März et al., 2010; Kroehne et al., 2011). Кроме того, разрастание паренхимы микроглия и лейкоциты (L-пластин +), эндотелиальные клетки (FLI +) и предшественники олигодендроцитов (OLIG2 +) (Kroehne et al., 2011). В исследованиях на молоди симы через 1 неделю после травмы была выявлена реактивация GFAP+ и виментин+ РГ в ДД и ДЛ и выявляли единичные мелкие интенсивно GFAP+ и виментин+ клетки в паренхиме. Эти элементы, возникали *de novo* в результате активации резидентных ВНСК глиального типа и их последующей медленной пролиферации, в ответ на травму. В наибольшей степени у молоди симы это проявлено в ДЛ, в наименьшей – в ДМ (Pushchina et al., 2020).

В вентральной зоне в результате повреждающего воздействия также происходили изменения в локализации и морфологической структуры клеток. Также, как и в дорсальной области, в вентральном и дорсальном ядрах появлялась популяция клеток с фенотипом РГ, однако число таких клеток было значительно меньше, чем в дорсальной области. В ВЛ зоне после травмы клеток радиальной глии обнаружено не было, но возрастала интенсивность иммуномаркирования ГС по сравнению с контролем.

Таким образом, в результате травматического повреждения в конечном мозге молодых кеты уровень экспрессии ГС в предшественниках различных типов многократно возрастал. Полученные нами данные находятся в соответствии с результатами исследований на поврежденном мозжечке *Apteronotus albifrons* (Zupanec, Serbulesku, 2013), у которого в результате травмы отмечали значительное увеличение содержания ГС в мозге. Согласно предположению Зупанка, повышенная продукция ГС является ответной реакцией на увеличение количества экстраклеточного глутамата, возникающего в результате травмы. У млекопитающих травматическое повреждение мозга сопровождается феноменами эксайтотоксичности, выбросом провоспалительных медиаторов, и развитием ярко выраженных эффектов вторичного воспаления (Ceci et al., 2019). Эти эффекты наблюдаются на фоне снижения продукции ГС (Ceci et al., 2019). В мозге рыб, в ответ на травматическое повреждение, напротив, продукция ГС, конвертирующей токсический глутамат в нейтральный глютамин, увеличивается (Suarez et al., 2002). В результате наших исследований, мы наблюдали аналогичные эффекты, связанные с повышенной продукцией ГС среди клеток ПВЗ, содержащих нейрональные предшественники. Мы полагаем, что ГС является маркером не только НЭ и радиально-глиальных предшественников, активирующихся в результате травмы, но также может вырабатываться отдельно взятыми клетками, расположенными в паренхиме с целью нейтрализации глутамата. В этом смысле, ГС рассматривается нами в качестве нейропротекторного, регенераторно-ассоциированного фактора, способствующего эффективному репаративному нейрогенезу после травмы.

#### **4.8. Локализация CBS в конечном мозге молодежи кеты в условиях интактности и после повреждения**

В настоящее время исследуется участие  $H_2S$  в процессе ишемического повреждения мозга, травмы головного мозга и участия данного газотрансмиттера в контроле окислительного стресса и увеличение реактивного форм кислорода при  $H_2S$ -зависимой сигнализации. (Kalogeris et al., 2012; Che et al., 2018; Gopalakrishnan et al., 2019). Известны реакции  $H_2S$  со многими сигнальными медиаторами, факторами транскрипции и канальными белками в нейронах и глиальных клетках как *in vivo*, так и *in vitro* (Che et al., 2018; Kimura, 2019). Однако сведения о межклеточной взаимодействии и участии  $H_2S$  в регенеративных процессах, в частности взрослом нейрогенезе и при травматическом повреждении мозга все еще ограничены.

Проведенные нами исследования показали, что в дорсальной и вентральной частях конечного мозга молодежи кеты CBS маркирует гетерогенную популяцию перивентрикулярно и паренхиматозно расположенных клеток. Уровень оптической плотности иммуномаркирования CBS позволил выделить интенсивно и умеренно иммунопозитивные клетки в паллиуме и субпаллиуме. Несмотря на региональные отличия, были выявлены общие черты локализации CBS: протяженные зоны распространения интенсивно маркированных клеток, чередовались с участками лишенными иммунопозитивности, что соответствует паттернам распространения ГС в клетках нейроэпителиального типа в интактном теленцефалоне. Проведенные ранее исследования локализации маркера пролиферирующих клеток PCNA в конечном мозге молодежи симы показали, что на территории паллиума паттерны конститутивной пролиферации представлены локальными небольшими по размеру конститутивными нишами, занимающими ПВЗ (Пушина и др., 2017).

Паттерны нейрогенеза выявляемые с помощью маркера нейрональной дифференциации NuCD показали, что у интактной молодежи симы маркированные

HuCD клетки формируют достаточно протяженные группы, чередующиеся с иммунонегативными участками (Пущина и др., 2017). Результаты иммуномаркирования CBS у молодежи интактной кеты во многом соответствуют паттерну распределения HuCD у молодежи симы, что позволяет нам предполагать возможное участие сероводорода в регуляции процессов взрослого нейрогенеза. В подтверждение этого предположения свидетельствует также наличие большого количества HuCD<sup>+</sup> нейронов, находящихся на различных стадиях дифференцировки, в паренхиме дорсальной области, в окружении CBS позитивных нейронов, локализованных в тех же областях (Пущина и др., 2017).

В условиях отсутствия дифференцированной клеточной структуры в конечном мозге молодежи, H<sub>2</sub>S-продуцирующие клетки в паренхиме мозга выделяют сероводород в межклеточное пространство, в котором осуществляется дифференцировка молодых нейронов, создавая тем самым особое микроокружение, способствующее нейрональной дифференциации. Таким образом, выделяемый клетками сероводород может рассматриваться в качестве фактора участвующего в конститутивном нейрогенезе. Это подтверждается результатами исследований на млекопитающих, у которых установлен высокий уровень экспрессии CBS в гиппокампе, для которого характерен нейрогенез во взрослом состоянии (Abe, Kimura, 1996). Согласно данным, высокий уровень CBS необходим для раннего созревания и роста нейрональных сетей, что также подтверждает роль сероводорода в нейрональной дифференцировке (Robert, Vialard, 2003).

Результаты ИГХ маркирования CBS в конечном мозге молодежи кеты показали наличие интенсивно и умеренно маркированных клеток в паллиальной и субпаллиальной областях теленцефалона, что соответствует ранее полученным данным на форели (Pushchina et al., 2020). Интенсивно маркированные клетки у кеты, как и у форели располагались в поверхностном перивентрикулярном и субвентрикулярном слоях паллиума. В глубоких паллиальных паренхиматозных областях, содержание интенсивно маркированных клеток у молодежи кеты, как и у форели, было повышенным. Кроме клеточной локализации CBS у молодежи кеты в

паллиуме (ДД и ДМ) и всех областях субпаллиума были выявлены иммунопозитивные гранулы.

Наличие  $H_2S$ -продуцирующего энзима в клетках мозга и вероятно в гранулах связано с обеспечением процесса нейрхимической передачи сигналов, и в частности, с активацией НМДА рецепторов (Kimura, 2013; Kimura, 2019). Активация нейронов в мозге приводит к высвобождению нейромедиаторов, в том числе глутамата, который активирует НМДА-рецепторы, что, в свою очередь, приводит к повышению астроцитарного внутриклеточного кальция и долговременной потенциации (Kimura, 2013; Kumar et al., 2018). Таким образом, наличие двух уровней активности CBS в клетках и гранулах теленцефалона молодой кеты свидетельствует о медиаторно-модуляторных межклеточных взаимодействиях, что соответствует ранее полученным данным на рыбах (Pushchina et al., 2011, Pushchina et al., 2020).

Через 3 суток после травматического повреждения количество  $H_2S$ -продуцирующих клеток в паллиальной и субпаллиальной областях конечного мозга молодой кеты многократно возрастало по сравнению с контролем. В паллиуме CBS+ клетки формировали многорядный иммунопозитивный пласт, занимающий всю ПВЗ и частично СВЗ. В паренхиматозной части паллиума увеличилось количество CBS иммуномаркированных клеток. Соотношение интенсивно и умеренно маркированных клеток у интактных животных и после травмы изменяются в сторону увеличения числа интенсивно маркированных клеток. Параметры оптической плотности иммуномаркирования CBS+ клеток паллиума и субпаллиума достоверно ( $p < 0.05$ ) увеличивались после травмы.

Таким образом, в результате травмы конечного мозга, количество  $H_2S$  продуцирующих клеток резко возрастает, что приводит к увеличению общей продукции сероводорода в мозге молодой кеты. Учитывая, что в ПВЗ после травматического повреждения многократно усиливаются процессы пролиферации, клеточной миграции, нейрональной дифференцировки, мы можем рассматривать сероводород как фактор, способствующий репаративным процессам, что согласуется с ранее полученными результатами при односторонней травме глаза у

форели (Pushchina et al., 2020). Учитывая высокую эффективность регенеративного процесса в мозге рыб, можно с уверенностью заключить, что повышенная продукция  $H_2S$  в НЭ клетках мозга молодежи кеты после травмы напрямую связана с процессами репаративного нейрогенеза. В отличие от форели, в паллиуме молодежи кеты не были выявлены НКП глиального типа. Мы связываем это с более взрослой стадией онтогенеза форели, в паллиуме которой очевидно присутствовало большее количество нейрональных предшественников глиального типа вНСК, имеющих морфологию радиальной глии.

Результаты экспериментальных исследований показали, что токсичность глутамата во время травматического повреждения ослабляется действием  $H_2S$  на КАТР и CFTR Cl-каналы (Kimura, et al., 2006) и активацией транспортеров GLT1 (Xiao et al., 2012). Однако, в настоящее время не выработано единого мнения относительно двойственной роли  $H_2S$  на токсические эффекты глутамата. Образующиеся в матричных перивентрикулярных зонах теленцефалона молодежи кеты нейробласты являются незрелыми клеточными формами, которые могут экспрессировать неполный набор глутаматных НМДА рецепторов, мигрирующие из перивентрикулярной в субвентрикулярные слои мозга. В таких недифференцированных клетках, каскадные процессы, приводящие к апоптозу в зрелых нейронах, могут тормозиться, в результате чего, незрелые клетки могут избегать гибели и успешно участвовать в процессах нейрональной регенерации.

Посттравматические нарушения энергетического метаболизма, возникающие в конечном мозге молодежи кеты после травмы вызывают ряд изменений, появляющихся в результате истощения пула АТФ. Одним из основных метаболических сдвигов является гликолиз, выступающий в качестве основного фактора восстановления при АТФ-генерирующем окислительном фосфорилировании (Mergenthaler et al., 2004). Потеря АТФ приводит к дисбалансу ионного гомеостаза в клетках конечного мозга из-за сбоя АТФаз или переносчиков АТФ-зависимых ионов (Kalogeris et al., 2012), регулирующих приток кальция и натрия. Возникшие изменения приводят к оттоку калия из-за последующего истощения АТФ и накопления кальция (Katsura et al., 1994; Mark et al., 2001).



Увеличение внутриклеточного кальция приводит к появлению глутамата, который усиливает перегрузку кальцием и активирует кальций-зависимые липазы и протеазы (Mark et al., 2001).

Существенные сдвиги в ионном гомеостазе приводят к увеличению продукции реактивных форм кислорода, открытию переходных пор митохондриальной проницаемости, воспалению и гибели нейронов (White et al., 2000; Kalogeris et al., 2012). У млекопитающих в нормальных условиях астроциты, окружающие нейроны, поглощают экстраклеточный глутамат и спасают нейроны от эксайтотоксичности (Mergenthaler et al., 2004; Wang et al., 2014). Однако, в условиях травмы, данные, полученные на рыбах, существенно отличаются от результатов биохимического анализа определения сероводорода в мозге млекопитающих (Chen et al., 2007), у которых после травматического повреждения наблюдается снижения продукции  $H_2S$ .

Учитывая, что репаративный нейрогенез в мозге млекопитающих значительно затруднён процессами вторичного воспаления, возникающего вследствие токсических эффектов глутамата и эксайтотоксичности, а в мозге рыб напротив, подобные эффекты не развиваются в том числе из-за повышенной продукции ГС, мы предполагаем, что повышенная продукция сероводорода после травматического повреждения облегчает процесс репарации. И, в этом смысле, сероводород, продуцируемый в конечном мозге кеты, можно рассматривать в качестве пронейрогенного фактора.

Таким образом, увеличение продукции  $H_2S$  в мозге молодежи кеты через 3 суток после травмы следует рассматривать с точки зрения поддержания цереброваскулярного гомеостаза, подразумевающего антиапоптотическое, противовоспалительное и антиоксидантное влияние, снижающее уровень вторичного повреждения нейронов, возникающего в результате окислительного стресса.

#### 4.9. Локализация Pax2 в условиях интактности и после повреждения

Конститутивный нейрогенез у взрослых животных и регенерация нейронов при травме управляются путем активации определенных молекулярных путей, включая факторы транскрипции, факторы роста, нейротрофины и цитокины, экспрессируемые на уровне отдельных нейрогенных ниш и, в конечном итоге, на поврежденном участке ЦНС. Сигнализация Sonic Hedgehog (SHH) играет важную роль как в нейрогенезе ЦНС, так и в регенерации (Ingham, McMahon, 2001). Одним из факторов, регулируемых с помощью SHH-сигнального пути, являются транскрипционные факторы семейства Pax, однако механизмы, регулирующие паттерны и уровни экспрессии Pax2 практически не изучены (Soukkaieh et al., 2007).

Pax2 принадлежит к семейству транскрипционных факторов Pax2/5/8, для которых характерно наличие парного домена, ДНК-связывающих доменов формирующих октапептид, взаимодействующий с другими пептидами и ингибиторного домена (Stanke et al., 2010). Во время эмбрионального развития Pax2 участвует в репарации сосудистой оболочки, дифференцировке глиальных предшественников и регулирует направление роста аксонов ганглиозных клеток сетчатки через головку зрительного нерва и оптическую хиазму (Soukkaieh, 2007). Pax2 обеспечивает астроцитарный фенотип клеток у взрослых позвоночных, а также регулирует рост аксонов у различных видов рыб (Stanke et al., 2010; Parrilla et al., 2012).

В конечном мозге молодых кеты белковый продукт ТФ Pax2 имеет как цитоплазматическую, так и ядерную локализацию, вследствие чего нами была выделена гетерогенная популяция Pax2+ клеток и гранул. У интактных животных Pax2+ клетки были выявлены в составе маркированных клеточных кластеров в ПВЗ паллиальной (ДД) и субпаллиальной (ВВ) областей, в менее плотных субвентрикулярных группах в ДЛ и ВЛ, а также прослеживались одиночные поверхностно локализованные клетки. Однако в большинстве зон паллиальной области белковый продукт Pax2 маркировался в ядрах клеток. Области,

содержащие маркированные Pax2 ядра, имели протяженную в пространстве структуру, формируя морфогенетические поля с различной интенсивностью иммуномаркирования, а паттерн распределения клеток был диффузным.

Известно, что экспрессия транскрипционных факторов Pax2 регулируется с помощью SHH сигнального пути (Dakubo et al., 2003). Однако, было установлено, что в процессе развития глазного стебля экспрессия Pax2 регулируется взаимоотношениями между сигнальным путем SHH и костными морфогенетическими белками (bone morphogenetic protein, BMP) (Sehgal et al., 2009). Сегал и его коллеги (2009) показали, что вторичные мессенджеры путей BMP и SHH экспрессируются в развивающемся оптическом стебле и вместе ингибируют Pax2-подавляющее влияние.

Нарушения передачи сигналов SHH вентральной средней линии приводят к снижению экспрессии Pax2 и увеличению экспрессии Pax6 в сетчатке и в области презумптивного оптического стебля (Wang et al., 2002; Dakubo et al., 2003). Взаимное ингибирование Pax2 и Pax6 в вентральной области развивающегося глаза разделяют клетки-предшественники на глиогенные (Pax2-позитивные) и нейрогенные (Pax6-позитивные) популяции (Pichaud, Desplan, 2002). Учитывая эти результаты, можно предполагать, что ТФ Pax2 обеспечивает глиальный фенотип клеток и подавляет нейрогенный потенциал НКП в конечном мозге кеты. Полученные нами результаты согласуются с данными ИФ-маркирования Pax2 в сетчатке взрослых морских свинок, цыплят и мышей (Stanke et al., 2010). У мышей и собак экспрессия Pax2 выявлена в SOX2+ и/или GFAP+ астроцитах сетчатки (Stanke et al., 2010).

В результате проведенного исследования на молодежи кеты, было показано, что Pax2 маркирует популяцию НЭ клеток в различных областях конечного мозга. Экспрессия Pax2 у молодежи кеты была выявлена как в цитоплазме клеток, так и в ядрах. Таким образом, у интактной молодежи кеты белковый продукт Pax2 маркирует ограниченную популяцию НЭ клеток и ядра клеток неизвестной функциональной специализации, участвующих, как мы полагаем в процессах конститутивного нейрогенеза. Учитывая данные литературы, об участии генов семейства Pax в

построении пространственной структуры ЦНС в эмбриогенезе и в постнатальном развитии (Thompson, Ziman, 2011), мы полагаем, что экспрессия Pax2 в ядрах клеток в глубоких паренхиматозных слоях, отражает паттернизацию мозга у растущей молодой кеты. Это предположение находится в соответствии с данными об участии Pax2 в процессе регионализации ЦНС в эмбриональный и постэмбриональный периоды развития позвоночных (Thompson, Ziman, 2011).

После повреждения мозга мы обнаружили популяцию тангенциально мигрирующих интенсивно маркированных Pax2 клеток в поверхностной и базальной части ПВЗ. Такой паттерн локализации Pax2+ клеток был характерен почти для всех областей теленцефалона, что свидетельствует о генерализованном характере экспрессии данного ТФ. Нами были идентифицированы паттерны Pax2+ мигрирующих клеток в области травмы – конечного пункта миграции клеток. Таким образом, после повреждения конечного мозга мы выявили, что функция пространственной паттернизации ЦНС в Pax2-экспрессирующих клетках сохраняется, но меняется её вектор, в частности, вместо популяции резидентных НЭ клеток интенсивная экспрессия Pax2 обнаруживалась в популяции мигрирующих клеток, участвующих в репаративной реорганизации ЦНС. Тем не менее, количественный анализ показал достоверное снижение числа Pax2+ клеток почти во всех областях паллиальной (ДМ, ДЛ  $p < 0.05$ ) и субпаллиальной (ВЛ  $p < 0.05$ ) областей теленцефалона молодой кеты. Полученные данные могут быть интерпретированы, учитывая установленные ранее взаимоингибирующие свойства экспрессии ТФ Pax2 и Pax6 (Pichaud, Desplan, 2002, Stanke et al., 2010). Ранее были исследованы паттерны экспрессии ТФ Pax6 в теленцефалоне форели после одностороннего повреждения зрительного нерва показали значительное увеличение экспрессии Pax6 в предшественниках нейроэпителиального и глиального типов (Pushchina et al., 2018). После повреждения ОН интенсивное маркирование Pax6 было выявлено в реактивных нейрогенных нишах, расположенных в составе паллиальных пролиферативных зон (ДД). В этой области конечного мозга форели мы не выявили Pax6+ РГ, однако иммуномаркирование перивентрикулярных клеток паллиальной зоны указывает на значительное

увеличение продукции НЭ Рах6+ клеток в составе НЭ нейрогенных ниш с ядерной иммунолокализацией Рах6. В ДЛ после повреждения ОН были выявлены реактивные Рах6+ нейрогенные ниши перивентрикулярной и субвентрикулярной локализации, а также волокна РГ, вдоль которых осуществлялась миграция Рах6+ и Рах6клеток. Подобные паттерны локализации Рах6+ реактивных нейрогенных ниш были также характерны и для субпаллиальных областей (Pushchina et al., 2018). Данные иммуноблотинга также свидетельствуют, что количество белкового продукта Рах6 у форели после повреждения ОН значительно возрастает по сравнению с уровнем экспрессии интактных животных (Pushchina et al., 2018).

Различные функции Рах2 могут частично проявляться за счет альтернативного сплайсинга (Heller, Brändli, 1997; Busse et al., 2009). На сегодняшний день несколько вариантов сплайсинга Рах2 были идентифицированы, хотя их функциональное значение пока не определено. У *Xenopus*, Рах2 имеет как минимум девять вариантов сплайсинга (Heller, Brändli, 1997), а у человека было идентифицировано 5 вариантов (Busse et al., 2009; Dressler, Douglass, 1992). Таким образом, вероятно, что разные комбинации связывания-партнеры, состояния фосфорилирования, ДНК / промотор метилирование и, возможно, варианты сплайсинга определяют, происходит ли реципрокное ингибирование Рах6 и Рах2. Мы предполагаем, что различные комбинации партнеров по связыванию, состояний фосфорилирования, метилирования ДНК/промотора и, возможно, вариантов сплайсинга определяют, происходит ли реципрокное ингибирование Рах6 и Рах2. Исследование коэкспрессии Рах2 и Рах6 в сетчатке взрослой курицы, тем не менее, свидетельствуют, что изоформы Рах2, экспрессируемые в клетках Мюллеровской глии не обладают способностью ингибировать экспрессию Рах6 (Stanke et al., 2010).

Учитывая полученные результаты, мы полагаем, что паттерны экспрессии Рах2 в конечном мозге молодички кеты через 3 суток после травмы соответствуют нейроэпителиальным НКП как резидентным, так и реактивированным травмой, снижаются по сравнению с интактными животными. Необходимы дальнейшие исследования для детального прояснения механизма полученных результатов,

однако мы полагаем, что снижение экспрессии Рах2 может быть связано с ингибирующим влиянием Рах6, экспрессия которого после травматического повреждения, напротив, значительно усиливается (Pushchina, Varaksin, 2019).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании представлены результаты сравнительного онтогенетического анализа субпопуляций клеток перивентрикулярной, субвентрикулярной и глубоких паренхиматозных слоев конечного мозга молодежи тихоокеанских лососей. Получены новые сведения о характеристиках клеток различных областей теленцефалона молодежи симы и кеты в ходе постэмбрионального онтогенеза.

Результаты ИГХ маркирования BrdU и PCNA позволили идентифицировать популяции быстро и медленно пролиферирующих клеток. Маркирование BrdU идентифицировало быстро пролиферирующие клетки нейроэпителиального типа, расположенные в нейрогенных нишах паллиума. Такие клетки, как правило, делятся с помощью симметричных митозов и дают начало новым нейронам. Маркирование PCNA выявило более обширную популяцию клеток, поскольку дополнительная ДНК-полимераза-сигма, маркируемая PCNA экспрессируется не только во время митоза, но и в течение 24 часов после его завершения.

Другим важным наблюдением является гетерогенное иммуномаркирование NuCD в различных частях паллиума, в частности, в медиальной зоне, где умеренное маркирование недифференцированных клеток поверхностных паренхиматозных областей было связано, как мы полагаем, с участием  $Ca^{+}$ -связывающих белков, в частности в процессах конститутивного нейрогенеза. При травматическом повреждении, напротив, в этой области умеренное маркирование было характерно для нейронов, расположенных в паренхиматозных участках мозга с признаком нейрональной дифференцировки. Мы полагаем, что такие изменения паттернов иммунолокализации NuCD связано с изменением посттравматического  $Ca^{2+}$  гомеостаза и с последующей интенсификацией  $Ca^{2+}$  каскада в нейронах, чем объясняется увеличение общего количества NuCD<sup>+</sup> клеток после травматического повреждения.

Клетки перивентрикулярной зоны паллиума и субпаллиума способны к пролиферации, нейрональной дифференцировке и формированию нейробластов

как в условиях гомеостатического роста, так и в результате острого травматического повреждения. В перивентрикулярной зоне преобладают недифференцированные клетки нейроэпителиального типа, экспрессирующие виментин, GFAP и ГС. Экспрессия данных маркеров в ВНСКП обладает цитохимической и функциональной специфичностью, в частности, если при конститутивном процессе большинство маркеров экспрессируется в клетках нейроэпителиального типа, то в результате травмы появляются паттерны экспрессии в РГ и изменяется характер кластеризации иммунопозитивных групп, отличающихся функциональной специализацией. В различных топографических областях паллиума и субпаллиума характер экспрессии GFAP, виментина и ГС имеет отличия. Тем не менее, выявлена общая тенденция к увеличению числа ВНСКП в острый посттравматический период, характерная как для паллиальных областей, так и для субпаллиума.

Выявление CBS-продуцирующих клеток как на территории перивентрикулярной зоны, так и в паренхиме свидетельствует об участии сероводорода в пластических процессах и конститутивном росте теленцефалона. Увеличение количества CBS-ип клеток во всех областях конечного мозга в посттравматический период способствует осуществлению нейропротекторных функций, снижая эксайтотоксические эффекты глутамата и/или модулируя активность глутамат-синтезирующих нейронов.

Одним из важных аспектов нейробиологических исследований является поиск факторов, влияющих на способность клетки выживать при нейротравме или нейродегенерации. Хотя в этом отношении имеется мало информации о генах Рах. В нескольких исследованиях продемонстрирована способность Рах-экспрессирующих клеток реагировать на нейротравму и обеспечивать благоприятную окружающую среду после инсульта (Tonchev, Yamashima, 2006).

Паттерны экспрессии Рах2 не связаны напрямую с зонами пролиферативной активности, выявленной у кеты. Тем не менее мы полагаем, что кластерное распределение Рах2-экспрессирующих областей в паллиуме и субпаллиуме, а также выборочное снижение экспрессии в нескольких областях мозга в



посттравматический период свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения данного ТФ и его участия в механизмах конститутивного и посттравматического нейрогенеза.

Во-первых, гены Рах направляют органогенез, обеспечивая достаточное число прогениторных клеток для развивающихся тканей; это свойство может быть использовано для терапии стволовыми клетками, обеспечивающими начальный рост клеток (если культура развивается *in vitro*). Во-вторых, гены Рах имеют свойство поддерживать клетки с недифференцированным состоянием перед их выходом в дифференцировку и обеспечивать пространственно-временное управление способностью к созданию зрелых клеточных типов в изменяющихся развивающихся нишах. Это характеризует гены Рах как мультипотентные переключатели, направляющие клетки по путям дифференцировки, которые зависят от позиционной информации клетки в пространстве. Так же Рах-экспрессирующими клетками, которые отвечают на пространственно-временные сигналы внешней среды, обеспечиваются условия для развития предварительно заложенных Рах-функций и способность связывать сигналы внешней (окружающей среды) и внутренней (клеточной) среды.

## ВЫВОДЫ

1. Интенсивная пролиферативная активность, выявляемая при маркировании PCNA и BrdU в перивентрикулярной зоне, и миграция клеток в более глубокие слои мозга, а также формирование локальных индуцированных нейрогенных ниш были выявлены в результате острой механической травмы конечного мозга *Oncorhynchus masou*. Процессы гомеостатического постэмбрионального нейрогенеза, наблюдаемого у интактных животных, и репаративного нейрогенеза у животных при травме, сопровождаются дополнительной нейрогенной индукцией и повышенной клеточной продукцией.
2. Нейроносцифичный Ca<sup>2+</sup>-связывающий протеин NuCD в паллиуме молодежи локализован в клетках, находящихся в различной стадии нейрональной дифференцировки; на территории пролиферативных зон NuCD маркирует нейродетерминированные клетки-предшественники, в более глубоких слоях – дифференцированные нейроны различной степени зрелости. В посттравматический период во всех зонах паллиума происходит изменение паттернов распределения NuCD<sup>+</sup> клеток, появляются интенсивно и умеренно маркированные клетки и значительно возрастает их общая продукция.
3. У интактной молодежи симы в теленцефалоне наблюдается незначительная экспрессия даблкортина в клетках перивентрикулярной зоны с гомеостатическим нейрогенезом, что не выявлено в участках, содержащих дифференцированные клетки. В посттравматический период в теленцефалоне симы наблюдается изменение паттернов экспрессии даблкортина в клетках перивентрикулярных и субвентрикулярных областей, связанное с появлением диффузных скоплений или плотных конгломератов, отличающихся по клеточному составу и характеру иммуномаркирования в паллиуме и субпаллиуме, увеличивается их количество и интенсивность маркирования.

4. В теленцефалоне молоди обоих видов рыб идентифицирована популяция вНСКП с нейроэпителиальной морфологией, экспрессирующая GFAP, виментин и ГС в перивентрикулярной области. В результате травматического повреждения значительно увеличивается количество вНСКП, и дополнительно выявляются паттерны экспрессии РГ, имеющие регионально-специфичный характер.
5. У интактных животных CBS-продуцирующие клетки преобладают в паллиальной зоне, преимущественно располагаясь в перивентрикулярных слоях. В результате травматического повреждения значительно увеличивается экспрессия  $H_2S$  во всех зонах паллиума и субпаллиума. Экспрессия сероводорода в конечном мозге лососевых рыб, очевидно, связана с модуляцией глутаматергической системы, обеспечивая защиту нейронов от эксайтотоксичности.
6. Паттерны экспрессии Pax2 у интактных животных напрямую не связаны с матричными зонами теленцефалона молоди *Oncorhynchus keta*, и формируют морфогенетические поля, в которых экспрессия данного ТФ представлена в ядрах и цитоплазме. В результате травмы количество Pax2-экспрессирующих клеток достоверно снижалось в дорсальной и медиальной паллиальных зонах и латеральной зоне субпаллиума.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артюхин Е.Н. Осетровые (экология, географическое распространение и филогения) / Спб.: Изд-во СПбГУ – 2008 – 137 с.
2. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники / Л.: Медицина – 1969. – 154 с.
3. Пущина Е.В., Флейшман М.Ю., Тимошин С.С. Проллиферативные зоны мозга молоди амурского осетра *Acipenser sherenkii*. Взаимоотношение с нейромерами и миграцией вторичных матричных зон // Онтогенез. 2007. Т. 38, № 5. С. 345–354.
4. Пущина Е.В., Обухов Д.К., Вараксин А.А. Нейрохимические маркеры клеток перивентрикулярной зоны мозга симы *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) // Онтогенез. 2012. Т. 43, № 1. С. 35–48.
5. Пущина Е.В., Вараксин А.А., Обухов Д.К. Репаративный нейрогенез в мозге и изменения в зрительном нерве взрослой форели *Oncorhynchus mykiss* после механического повреждения глаза // Онтогенез. 2016а. Т. 47, № 1. С. 15-39.
6. Пущина Е.В., Жарикова Е.И., Вараксин А.А. Нейрогенез у взрослых позвоночных животных: вопросы адаптации, эволюции и функциональной специализации // Тихоокеанский медицинский журнал. 2016б. № 2. С. 55–61.
7. Пущина Е.В., Жарикова Е.И., Вараксин А.А. Персистентный и репаративный нейрогенез в теленцефалоне молоди симы *Oncorhynchus masou* при механической травме // Онтогенез. 2017. Т. 48, № 5. С. 359–374.
8. Пущина Е.В., Капустянов И. А. Вараксин А.А., Проллиферация, нейро- и глиогенез в норме и при механическом повреждении мезенцефалического тегмента молоди кеты *Oncorhynchus keta* // Онтогенез. 2019. Т. 50, № 2. С. 106-126.
9. Савельев С.В. Сравнительная анатомия нервной системы позвоночных / М.: ГЕОТАР-МЕД, 2001. 271 с.
10. Abe K., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator // J. Neurosci. 1996. Vol. 16. P. 1066–1071.

11. Absil P., Pinxten R., Balthazart J., Eens M. Effect of age and testosterone on autumnal neurogenesis in male European starlings (*Sturnus vulgaris*) // *Behav. Brain. Res.* 2003. Vol. 143. P. 15–30.
12. Adolf B., Chapouton P., Lam C.S., Topp S., Tannhauser B., Strahle U., Gotz M., Bally-Cuif L. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon // *Dev. Biol.* 2006. Vol. 295. P. 278–293.
13. Akimenko M.A. Ekker M., Wegner J., Lin W., Westerfield M. Combinatorial expression of three zebrafish genes related to *distal-less*: part of a homeobox gene code for the head // *J. Neurosci.* 1994. Vol. 14. P. 3475–3486.
14. Allende M.L. Weinberg E.S. The expression pattern of two zebrafish achaete-scute homolog (*ash*) genes is altered in the embryonic brain of the cyclops mutant // *Dev. Biol.* 1994. Vol. 166. P. 509–530.
15. Altman J., Das G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats // *J. Comp. Neurol.* 1965. Vol. 124. P. 319–335.
16. Alvarez-Buylla A., Kim J.R. Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds // *J. Neurobiol.* 1997. Vol. 33. P. 585–601.
17. Alvarez-Buylla A., Lim D. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain // *Neuron.* 2004. Vol. 41. P. 683–686.
18. Anthony T.E. Klein C., Fishell G., Heintz N. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system // *Neuron.* 2004. Vol. 41. P. 881–890.
19. Arochena M., Anadon R., Diaz-Regueira S.M. Development of Vimentin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivities in the brain of gray mullet (*Chelon Labrosus*), an advanced teleost // *J. Comp. Neurol.* 2004. Vol. 469. P. 413–436.
20. Ayanlaja A.A., Xiong Y., Gao Y., Ji G., Tang C., Abdikani Abdullah Z., Gao D. Distinct features of doublecortin as a marker of neuronal migration and its implications in cancer cell mobility // *Front. Mol. Neurosci.* 2017. Vol. 10. P. 199.
21. Ayari B., Hachimi K.H., Yanicostas C., Landoulsi A., Soussi-Yanicostas N. Prokineticin 2 expression is associated with neural repair of injured adult zebrafish telencephalon // *J. of Neurotrauma.* 2010. Vol. 27. P. 959–972.

22. Bak L.K., Schousboe A., Waagepetersen H.S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer // *J. Neurochem.* 2006. Vol. 98. P. 641–653.
23. Baumer N., Marquardt T., Stoykova A., Ashery-Padan R., Chowdhury K., Gruss P. Pax6 is required for establishing naso-temporal and dorsal characteristics of the optic vesicle // *Development.* 2002. Vol. 129. P. 4535–4545.
24. Baumer N., Marquardt T., Stoykova A., Spieler D., Treichel D., Ashery-Padan R., Gruss P. Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6 // *Development.* 2003. Vol. 130. P. 2903–2915.
25. Bel-Vialar S., Medevielle F., Pituello F. The on/off of Pax6 controls the tempo of neuronal differentiation in the developing spinal cord // *Dev. Biol.* 2007. Vol. 305. P. 659–673.
26. Berninger B., Hack M.A., Gotz M. Neural stem cells: on where they hide, in which disguise, and how we may lure them out // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2006. Vol. 174 P. 319–360.
27. Bhatia M., Zhi L., Zhang H. Role of substance P in hydrogen sulfide-induced pulmonary inflammation in mice // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2006. Vol. 291. P. 896–904.
28. Bicker G. STOP and GO with NO: nitric oxide as a regulator of cell motility in simple brains // *BioEssays.* Vol. 27. P. 495–505.
29. Birse S.C., Leonard R.B., Coggeshall R.E. Neuronal increase in various areas of the nervous system of the guppy, *Lebistes* // *J. Comp. Neurol.* 1980. Vol. 194. P. 291–301.
30. Blader P., Lam C.S., Rastegar S., Scardigli R., Nicod J.C., Simplicio N., Plessy C., Fischer N., Schuurmans C., Guillemot F., Strahle U. Conserved and acquired features of neurogenin1 regulation // *Development.* 2004. Vol. 131. P. 5627–5637.
31. Blader P., Fischer N., Gradwohl G., Guillemont F., Strahle U. The activity of neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo // *Development.* – 1997. Vol. 124. P. 4557–4569.

32. Bodega G., Suárez I., Rubio M., Villalba R.M., Fernandez B. Astroglial pattern in the spinal cord of the adult barbel (*Barbus comiza*) // *Anatomy Embryol.* 1993. Vol. 187. P. 385–395.
33. Bonfanti L., Peretto P. Adult neurogenesis in mammals – a theme with many variations // *Eu. J. Neurosci.* 2011. Vol. 34. № 6. P. 930–50.
34. Bravo R. Frank R., Blundell P. A., Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta // *Nature.* 1987. Vol. 326. P. 515–517.
35. Brill M.S. Snapyan M., Wohlfrom H., Ninkovic J., Jawerka M., Mastick G. S., Ashery-Padan R., Saghatelian A., Berninger B., Gotz M. A *dlx2*- and *Pax6*-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb // *J. Neurosci.* 2008. Vol. 28. P. 6439–6452.
36. Brusilow S.W. Koehler R.C., Traystman R.J., Cooper A.J.L. Astrocyte glutamine synthetase: Importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy // *Neurotherapeutics.* 2010. Vol. 7. P. 452–470.
37. Butterfield D.A., Hensley K., Cole P., Subramaniam R., Aksenov M., Aksenova M., Bummer P.M., Haley B.E., Carney J.M. Oxidatively induced structural alteration of glutamine synthetase assessed by analysis of spin label incorporation kinetics: Relevance to Alzheimer's disease // *J. Neurochem.* 1997. Vol. 68. P. 2451–2457.
38. Butterfield D.A., Kanski J. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins *Mech. Ageing Dev.* 2001. Vol. 122. P. 945–962.
39. Byrd C.A., Brunjes P.C. Addition of new cells to the olfactory bulb of adult zebrafish // *C. A. Byrd, // Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1998. Vol. 855. P. 274–276.
40. Byrd C.A., Brunjes P.C. Neurogenesis in the olfactory bulb of adult zebrafish // *Neuroscience.* 2001. Vol. 105. P. 793–801.
41. Caldani M., Rolland B., Fages C., Tardy M. Glutamine synthetase during mouse brain development // *Experientia.* 1982. Vol. 38. P. 1199–1202.

42. Candal E., Anadon R., Bourrat F., Rodriguez-Moldes I. Cell proliferation in the developing and adult hindbrain and midbrain of trout and medaka (teleosts): a segmental approach // *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 2005. Vol. 160. P. 157–175.
43. Cerda J., Conrad M., Markl J., Brand M., Herrmann H. Zebrafish Vimentin: molecular characterization, assembly properties and developmental expression // *Eur. J. Cell. Biol.* 1998. Vol. 77. P. 175–187.
44. Chretien F., Le Pavec G., Vallat-Decouvelaere A., Delisle M., Uro-Coste E., Ironside J.W., Gambetti P., Parchi P., Creminon C., Dormont D. Expression of excitatory amino acid transporter-1 (EAAT-1) in brain macrophages and microglia of patients with prion diseases / F. Chretien, // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004. Vol. 63. P. 1058–1071.
45. Christophorou N.A., Mende M., Lleras-Forero L., Grocott T., Streit A. Pax2 coordinates epithelial morphogenesis and cell fate in the inner ear // *Dev. Biol.* 2010. Vol. 345. P. 180–190.
46. Consiglio A., Gritti A., Dolcetta D., Follenzi A., Bordignon C. Robust in vivo gene transfer into adult mammalian neural stem cells by lentiviral vectors // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. Vol. 101. P. 14835–14840.
47. Conway S.J., Bundy J., Chen J., Dickman E., Rogers R., Will B.M. Decreased neural crest stem cell expansion is responsible for the conotruncal heart defects within the *spotch (Sp(2H))/Pax3* mouse mutant // *Cardiovasc. Res.* 2000. Vol. 47. P. 314–328.
48. Couillard-Despres S., Winner B., Schaubeck S., Aigner R., Vroemen M., Weidner N., Bogdahn U., Winkler J., Kuhn H., Aigner L. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis // *J. Neurosci.* 2005. Vol. 21. P. 1–14.
49. Dahl D., Crosby C.J., Sethi J.S., Bignami A. Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies // *J. Comp. Neurol.* 1985. Vol. 239. P. 75–88.
50. Dahl D., Rueger D.C., Bignami A., Weber K., Osborn M. Vimentin, the 57,000 molecular weight protein of fibroblasts filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia // *Eur. J. Cell Biol.* 1981. Vol. 24. P. 191–196.



51. Dawe S.P., Han S.P., Bian J.S., Moore P.K. Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats // *Neuroscience*. 2008. Vol. 152. P. 169–177.
52. De Guevara R., Pairault C., Pinganaud G. Expression of Vimentin and GFAP and development of the retina in the trout // *C. R. Acad. Sci.* 1994. Vol. 317. P. 737–741.
53. Diaz-Regueira S.M., Alvarez-Otero R., Anadon R. An immunocytochemical and ultrastructural study of a specialized glial region of the medulla oblongata in a teleost, *Chelon Labrosus* // *Tissue Cell*. 1993. Vol. 25. P. 657–668.
54. Dirian L., Galant S., Coolen M., Chen W., Bedu S., Houart C., Bally-Cuif L., Foucher I. Spatial regionalization and heterochrony in the formation of adult pallial neural stem cells // *Dev. Cell*. 2014. Vol. 30. P. 123–136.
55. Doetsch F., Caille I., Lim D.A., Garcia-Verdugo G.M. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain // *Cell*. 1999. Vol. 97. P. 703–716.
56. Doetsch F., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain // *J. Neurosci.* 1997. Vol. 17. P. 5046–5061.
57. Doetsch F., Hen R. Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2005. Vol. 15. P. 121–128.
58. Dolbeare F. Bromodeoxyuridine: Diagnostic toll in biology and medicine. Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics // *Histochem. J.* 1995. Vol. 27. P. 339–369.
59. Duparc R.H., Abdouh M., David J., Lepine M., Tetreault N., Bernier G. Pax6 controls the proliferation rate of neuroepithelial progenitors from the mouse optic vesicle // *Dev. Biol.* 2007. Vol. 301. P. 374–387.
60. Edelman G.M., Jones F.S. Gene regulation of cell adhesion: a key step in neural morphogenesis // *Brain Res. Rev.* 1998. Vol. 26. P. 337–352.
61. Edelmann K., Glashauser L., Sprungala S., Hesl B., Fritschle M., Ninkovic J., Godinho L., Chapouton P. Increased radial glia quiescence, decreased reactivation

- upon injury and unaltered neuroblast behavior underlie decreased neurogenesis in the aging zebrafish telencephalon // *J. Comp. Neurol.* 2013. Vol. 521. P. 3099–3115.
62. Edwards J.G., Michel W.C. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb // *J. Comp. Neurol.* 2002. Vol. 454. P. 294–309.
63. Ekstrom P., Johnsson C.M., Ohlin, L.M. Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones // *J. Comp. Neurol.* 2001. Vol. 436. P. 92–110.
64. Episkopou V. SOX2 functions in adult neural stem cells // *Trends Neurosci.* 2005. Vol. 28. P. 219–221.
65. Fages C., Khelil M., Rolland B., Bridoux A.M., Tardy M. Glutamine synthetase: a marker of an astroglial subpopulation in primary cultures of defined brain areas // *Dev. Neurosci.* 1988. Vol. 10. P. 47–56.
66. Farber K., Kettenmann H. Physiology of microglial cells // *Brain Res.* 2005. Vol. 48. P. 133–143.
67. Fedtsova N., Quina L.A., Wang S., Turner E.E. Regulation of the development of tectal neurons and their projections by transcription factors Brn3a and Pax7 // *Dev. Biol.* 2008. Vol. 316. P. 6–20.
68. Fernández A.S., Rosillo J.C., Casanova, G., Olivera-Bravo, S. Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): A comparative study // *Neuroscience.* 2011, Vol. 189. P. 12–24.
69. Ferri A.L., Cavallaro M., Braidà D., Di Cristofano A., Canta A., Vezzani A., Ottolenghi S., Pandolfi P.P., Sala M., DeBiasi S., Nicolis S.K. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain // *Develop.* 2004. Vol. 131. P. 3805–3819.
70. Ganz J., Kaslin J., Hochmann S., Freudenreich D., Brand M. Heterogeneity and Fgf dependence of adult neural progenitors in the zebrafish telencephalon // *Glia.* 2010. Vol. 58. P. 1345–1363.

71. Garcia-Verdugo J.M., Ferron S., Flames N., Collado L., Desfilis E., Font E. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals // *Brain Res. Bull.* 2002. Vol. 57. P. 765–775.
72. Goldman D., Hankin M., Li Z., Dai X., Ding J. Transgenic zebrafish for studying nervous system development and regeneration // *Transgenic Res.* 2001. Vol. 10. P. 21–33.
73. Goldman S. Adult neurogenesis: from canaries to the clinic // *J. Neurobiol.* 1998. Vol. 36. P. 267–286.
74. Goldman S. Glia as neural progenitor cells // *Trends Neurosci.* 2003. Vol. 26. P. 590–596.
75. Gorovits R., Avidan N., Avisar N., Shaked I., Vardimon L. Glutamine synthetase protects against neuronal degeneration in injured retinal tissue // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997. Vol. 94. P. 7024–7029.
76. Gotz M., Hartfuss E., Malatesta P. Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice // *Brain Res. Bull.* 2002. Vol. 57. P. 777–788.
77. Goulding M.D., Lumsden A., Gruss P. Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord // *Development.* 1993. Vol. 117. P. 1001–1016.
78. Grandel H., Brand M. Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates // *Dev. Genes. Evol.* 2013. Vol. 223. P. 131–147.
79. Grandel H., Kaslin J., Ganz J., Wenzel I., Brand M. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate // *Dev. Biol.* 2006. Vol. 295. P. 263–277.
80. Guo Z., Packard A., Krolewski R.C., Harris M.T., Manglapus G.L., Schwob J.E. Expression of Pax6 and sox2 in adult olfactory epithelium // *J. Comp. Neurol.* 2010. Vol. 518. P. 4395–4418.
81. Hack M.A., Saghatelian A., de Chevigny A., Pfeifer A., Ashery-Padan R., Lledo P.M., Gotz M. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis // *Nat. Neurosci.* 2005. Vol. 8. P. 865–872.

- 82.Han Y., Qin J., Chang X. Modulating effect of hydrogen sulfide on gamma-aminobutyric acid B receptor in recurrent febrile seizures in rats // *Neurosci. Res.* 2005. Vol. 53. P. 216-219.
- 83.Heller N., Brändli A.W. Xenopus Pax-2/5/8 orthologues: novel insights into Pax gene evolution and identification of Pax-8 as the earliest marker for otic and pronephric cell lineages // *Dev. Genet.* 1999. Vol. 24. P. 208–219.
- 84.Hendon R. M. The fine structure of the rat cerebellum. II. The stellate neurons, granule cells and glia // *J. Cell. Biol.* 1964. Vol. 23. P. 277–293.
- 85.Hernández C., Martín M., Bodega G., Suárez I., Pérez J., Fernández B. Response of carp central nervous system to hyperammonemic conditions: an immunocytochemical study of glutamine synthetase (GS), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and 70 kDa heat-shock protein (HSP70) // *Aquat. Toxicol.* 1999. Vol. 45. P. 195–207.
- 86.Hinsch K., Zupanc G.K. Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem cells from adult fish brain // *J. Neurosci. Methods.* 2006. Vol. 158. P. 75–88.
- 87.Horie M., Sango K., Takeuchi K., Honma S., Osumi N., Kawamura K., Kawano H. Subpial neuronal migration in the medulla oblongata of Pax-6-deficient rats // *Eur. J. Neurosci.* 2003. Vol. 17. P. 49–57.
- 88.Horstmann E. Die Faserglia des Selachiergehirns // *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 1954.Vol. 39. P. 588–617.
- 89.Hutton C., Dery N., Rosa E., Lemon J., Rollo C.D., Fahnestock M., deCatanzaro D., Wojtowicz J.M., Becker S. Mitigating the effects of stress on the hippocampus with diet and exercise // *Adult Neurogenesis: Evolution, Regulation and Function.* Dresden, Germany, May 6-8, 2015. Abstr. 23
- 90.Jimenez D., Lopez-Mascaraque L., de Carlos J.A., Valverde F. Further studies on cortical tangential migration in wild type and Pax-6 mutant mice // *J. Neurocytol.* 2002. Vol. 31. P. 719–728.
- 91.Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L., Risling M., Lendahl U. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system // *Cell.* 1999. Vol. 96. P. 25–34.

92. Kalman M. Astroglial architecture of the carp (*Cyprinus carpio*) brain as revealed by immunohistochemical staining against glial fibrillary acidic protein (GFAP) // *Anat. Embryol.* 1998. Vol. 198. P. 409–433.
93. Kalman M., Ari C. Distribution of GFAP immunoreactive structures in the rhombencephalon of the sterlet (*Acipenser ruthenus*) and its evolutionary implication // *J. Exp. Zool.* 2002. Vol. 293. P. 395–406.
94. Kamoun P. Mental retardation in Down syndrome: a hydrogen sulfide hypothesis // *Med. Hypoth.* 2001. Vol. 57. P. 389–392.
95. Kamoun P., Belardinelli M.C., Chabli A. Endogenous hydrogen sulfide overproduction in Down syndrome // *Am. J. Med. Genet.* 2003. Vol. 116. P. 310–311.
96. Kanakubo S., Nomura T., Yamamura K., Miyazaki J., Tamai M., Osumi N. Abnormal migration and distribution of neural crest cells in Pax6 heterozygous mutant eye, a model for human eye diseases // *Genes Cells.* 2006. Vol. 11. P. 919–933.
97. Karl M.O., Hayes S., Nelson B.R., Tan K., Buckingham B., Reh T.A. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Vol. 105. P. 19508–19513.
98. Kaslin J., Ganz J., Brand M. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2008. Vol. 363. P. 101–122.
99. Kawai H., Arata N., Nakayasu H. Three-dimensional distribution of astrocytes in zebrafish spinal cord // *Glia.* 2001. Vol. 36. P. 406–413.
100. Kazanis I. Can adult neural stem cells create new brains? Plasticity in the adult mammalian neurogenic niches: realities and expectations in the era of regenerative biology // *Neuroscientist.* 2012 Vol.18. P.15–27.
101. Kempermann G. *Adult Neurogenesis 2 – Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain* // Oxford. Univ. Press. 2011.
102. Kempermann G., Kuhn H.G., Gage F.H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus // *J. Neurosci.* 1998. Vol. 18. P. 3206–3212.

103. Kim Y.J., Nam R.H., Yoo Y.M., Lee C.J. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*) // *Neurosci. Lett.* 2004. Vol. 355. P. 29–32.
104. Kim Y.S., Joh T.H. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease // *Exp. Mol. Med.* 2006. Vol. 38. P. 333–347.
105. Kimbrel E.A., Kouris N.A., Yavanian G.J., Chu J., Qin Y., Chan A., Singh R.P., McCurdy D., Gordon L., Levinson R.D., Lanzal R. Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties // *Stem Cells and Dev.* 2014. Vol. 23. P. 1611–1624.
106. Kimura Y., Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress // *FASEB J.* 2004. Vol. 18. P. 1165–1167.
107. Kippin T.E., Martens D.J., van der Kooy D. p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity // *Genes Dev.* 2005. Vol. 19. P. 756–767.
108. Kishimoto N., Alfaro-Cervello C., Shimizu K., Asakawa K., Urasaki A., Nonaka S., Kawakami K., Garcia-Verdugo J.M., Sawamoto K. Migration of neuronal precursors from the telencephalic ventricular zone into the olfactory bulb in adult zebrafish // *J. Comp. Neurol.* 2011. Vol. 519. P. 3549–3565.
109. Kishimoto N., Shimizu K., Sawamoto K. Neuronal regeneration in a zebrafish model of adult brain injury // *Dis. Model. Mech.* 2012. Vol. 5. P. 200–209.
110. Kizil C., Kaslin J., Kroehne V., Brand M. Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish // *Dev. Neurobiol.* 2012. Vol. 72. P. 429–461.
111. Koehler R.C., Gebremedhin D., Harder D.R. Role of astrocytes in cerebrovascular regulation // *J. Appl. Physiol.* 2006. Vol. 100. P. 307–317.
112. Kohwi M., Osumi N., Rubenstein J.L., Alvarez-Buylla A. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb // *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25. P. 6997–7003.

113. Komitova M., Eriksson P. S. Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain // *Neurosci. Lett.* 2004. Vol. 369. P. 24–27.
114. Kosenko E., Felipo V., Montoliu C., Grisolia S., Kaminsky Y. Effects of acute hyperammonemia in vivo and oxidative metabolism in nonsynaptic rat brain mitochondria // *Metab. Brain Dis.* 1997. Vol. 12. P. 69–82.
115. Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells // *Ann. Rev. Neurosci.* 2009. Vol. 32. P. 149–184.
116. Kroehne V., Freudenreich D., Hans S., Kaslin J., Brand M. Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors // *Develop.* 2011. Vol. 138. P. 4831–4841.
117. Kumada Y., Benson D.R., Hillemann D., Hosted T.J., Rochefort D.A., Thompson C.J., Wohlleben W., Tateno Y. Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993. Vol. 90. P. 3009–3013.
118. Kyritsis N., Kizil C., Zoicher S., Kroehne V., Kaslin J., Freudenreich D., Iltzsche A., Brand M. Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain // *Science.* 2012. Vol. 338. P. 1353–1358.
119. Lam C.S., Marz M., Strahle U. GFAP and nestin reporter lines reveal characteristics of neural progenitors in the adult zebrafish brain // *Dev. Dyn.* 2009. Vol. 238. P. 475–486.
120. Lara, J.M. Neuroglia in the CNS of teleosts / J. M. Lara, A. Velasco, J. R. Alonso, J. Aijon – eds. Vernadakis A., Roots B. in: *Neuron–glia interrelations during phylogeny: I. Phylogeny and ontogeny of glial cells.* Totowa, NJ: Humana Press. 1995. 156 p.
121. Lee S.W., Hu Y.S., Hu L.F. Hydrogen sulphide regulates calcium homeostasis in microglial cells // *Glia.* 2006. Vol. 54. P. 116–124
122. Levitt P., Rakic P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain // *J. Comp. Neurol.* 1980. Vol. 193. P. 815–840.

123. Lindsey B.W., Darabie A., Tropepe V. The cellular composition of neurogenic periventricular zones in the adult zebrafish forebrain // *J. Comp. Neurol.* 2007. Vol. 520. P. 2275–2316.
124. Lindsey B.W., Tropepe V. A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis // *Prog. Neurobiol.* 2006. Vol. 80. P. 281–307.
125. Liu R.Z., Denovan-Wright E.M., Wright J.M. Structure, mRNA expression and linkage mapping of the brain-type fatty acid-binding protein gene (FABP7) from zebrafish (*Danio rerio*) // *Eur. J. Biochem.* 2003. Vol. 270. P. 715–725.
126. Lledo P.M., Saghatelian A. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience // *Trends Neurosci.* 2005. Vol. 28. P. 248–254.
127. Luo J., Daniels S.B., Lenington J.B., Notti R.Q., Conover J.C. The aging neurogenic subventricular zone // *Aging Cell.* 2006. Vol. 5. P. 139–152.
128. Ma P.M. Tanycytes in the sunfish brain: NADPH-diaphorase histochemistry and regional distribution // *J. Comp. Neurol.* 1993. Vol. 336. P. 77–95.
129. Maekawa M., Takashima N., Arai Y., Nomura T., Inokuchi K., Yuasa S., Osumi N. Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis // *Genes Cells.* 2005. Vol. 10. P. 1001–1014.
130. Maggs A., Scholes J. Reticular astrocytes in the fish optic nerve: macroglia with epithelial characteristics form an axially repeated lacework pattern, to which nodes of Ranvier are apposed // *J. Neurosci.* 1990. Vol. 10. P. 1600–1614.
131. Malatesta P., Hartfuss E., Gotz M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage // *Develop.* 2000. Vol. 127. P. 5253–5263.
132. Manger P. Presence and absence of adult hippocampal neurogenesis in mammals and the effect of the environment // *Adult Neurogenesis: Evolution, Regulation and Function.* Dresden, Germany, May 6-8, 2015. Abstr. 3



133. Manso M. J., Becerra M., Becerra M., Anadon R. Expression of a low-molecular-weight (10 kDa) calcium binding protein in glial cells of the brain of the trout (Teleostei) // *Anat. Embryol.* 1997. Vol. 196. P. 403–416.
134. Marcus R., Easter S. J. Expression of glial fibrillary acidic protein and its relation to tract formation in embryonic zebrafish (*Danio rerio*) // *J. Comp. Neurol.* 1995. Vol. 359. P. 365–381.
135. März M., Chapouton P., Diotel N., Vaillant C., Hesel B., Takamiya M., Lam C.S., Kah O., Bally-Cuif L., Strähle U. Heterogeneity in Progenitor Cell Subtypes in the Ventricular Zone of the Zebrafish Adult Telencephalon // *Glia.* 2010. Vol. 58. P.870–888.
136. Matsunaga E., Araki I., Nakamura H. Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2 // *Develop.* 2000. Vol. 127. P. 2357–2365.
137. Mattson M.P., Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability // *Nat. Rev. Neurosci.* 2006. Vol. 7. P. 278–294.
138. Mayanil C.S., George D., Mania-Farnell B., Bremer C.L., McLone D.G., Bremer E.G. Overexpression of murine Pax3 increases NCAM polysialylation in a human medulloblastoma cell line // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 23259–23266.
139. Mazenganya P., Manger P., Ihunwo A. Adult neurogenesis in the subspecies of domestic pigeons *Columba Livia domesticus*: the racing Homer and Utility Carneau Pigeons // *Adult Neurogenesis: Evolution, Regulation and Function.* Dresden, Germany, May 6-8, 2015. Poster 44.
140. Mearow K.M., Mill J.F., Vitkovic L. The ontogeny and localization of glutamine synthetase gene expression in rat brain // *Mol. Brain Res.* 1989. Vol. 6. P. 223–232.
141. Menn B., Garcia-Verdugo J.M., Yaschine C., Gonzalez-Perez O., Rowitch D. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26. P. 7907–7918.
142. Menuet A., Pellegrini E., Brion F., Gueguen M. M., Anglade I., Pakdel F., Kah O. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene // *J. Comp. Neurol.* 2005. Vol. 485. P. 304–320.

143. Meyer R.L. Evidence from thymidine labeling for continuing growth of retina and tectum in juvenile goldfish // *Exp. Neurol.* 1978. Vol. 59. P. 99–111.
144. Miyake T., Kitamura T. Glutamine synthetase immunoreactivity in two types of mouse brain glial cells // *Brain Res.* 1992. Vol. 586. P. 53–60
145. Molofsky A. V., He S., Bydon M., Morrison S. J., Pardal R. Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways // *Genes Dev.* 2005. Vol. 19. P. 1432–1437.
146. Morita T., Nitta H., Kiyama Y., Mori H., Mishina M. Differential expression of two zebrafish *emx* homeoprotein mRNAs in the developing brain // *Neurosci. Lett.* 1995. Vol. 198. P. 131–134.
147. Morrison S.J., Wandycz A.M., Hemmati H.D., Wright D.E., Weissman I.L. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors // *Develop.* 1997. Vol. 124. P. 1929–1939.
148. Morshead C.M., Benveniste P., Iscove N.N., van der Kooy D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations // *Nat. Med.* 2002. Vol. 8. P. 268–273.
149. Morshead C.M., Craig C.G., van der Kooy D. In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain // *Dev.* 1998. Vol. 125. P. 2251–2261.
150. Muller T., Wullimann M. Anatomy of neurogenesis in the early zebrafish brain // *Dev. Brain Res.* 2003. Vol. 140. P. 137–155.
151. Nacher J., Varea E., Blasco-Ibanez J.M., Castillo-Gomez E., Crespo C., Martinez-Guijarro F.J., McEwen B.S. Expression of the transcription factor Pax6 in the adult rat dentate gyrus // *J. Neurosci. Res.* 2005. Vol. 81. P. 753–761.
152. Nakazaki H., Reddy A.C., Mania-Farnell B.L., Shen Y.W., Ichi S., McCabe C., George D., McLone D.G., Tomita T., Mayanil C.S. Key basic helix–loop–helix transcription factor genes *Hes1* and *Ngn2* are regulated by *Pax3* during mouse embryonic development // *Dev. Biol.* 2008. Vol. 316. P. 510–523.

153. Nielsen A. L., Jorgensen A. L. Structural and functional characterization of the zebrafish gene for glial fibrillary acidic protein, GFAP // *Gene*. 2003. Vol. 310. P. 123–132.
154. Nornes H.O., Dressler G.R., Knapik E.W., Deutsch U., Gruss P. Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis // *Develop*. 1990. Vol. 109. P. 797–809.
155. Nornes S., Clarkson M., Mikkola I., Pedersen M., Bardsley A., Martinez J. P., Krauss S., Johansen T. Zebrafish contains two Pax6 genes involved in eye development // *Mech. Dev*. 1998. Vol. 77. P. 185–196.
156. Osumi-Yamashita N., Kuratani S., Ninomiya Y., Aoki S., Iseki K., Chareonvit S., Doi H., Fujiwara M., Watanabe T., Eto K. Cranial anomaly of homozygous rSey rat is associated with a defect in the migration pathway of midbrain crest cells // *Dev. Growth Differ*. 1997. Vol. 39. P. 53–67.
157. Otto A., Schmidt C., Patel K. Pax3 and Pax7 expression and regulation in the avian embryo // *Anat. Embryol*. 2006. Vol. 211. P. 293–310.
158. Palmieri E.M., Menga A., Lebrun A., Hooper D.C., Butterfield D.A., Mazzone M., Castegna A. Blockade of Glutamine Synthetase Enhances Inflammatory Response in Microglial Cells // *Antioxid. Redox Signal*. 2016. Vol. 26. P. 351–363.
159. Park H. C. *olig2* is required for zebrafish primary motor neuron and oligodendrocyte development / H. C. Park, A. Mehta, J. S. Richardson, B. Appel // *Dev. Biol*. 2002. Vol. 248. P. 356–368.
160. Pellegrini E., Mouriec K., Anglade I., Menuet A., Le Page Y. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish // *J. Comp. Neurol*. 2007. Vol. 501. P. 150–167.
161. Peretto P., Merighi A., Fasolo A., Bonfanti L. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat // *Brain Res. Bull*. 1997. Vol. 42. P. 9–21.
162. Petit C.K., Chung M.H., Verkhovsky L.M., Cooper A.J.L. Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat // *Brain Res*. 1992. Vol. 569. P. 275–280.

163. Pevny L., Placzek M. Sox genes and neural progenitor identity // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2005. Vol. 15. P. 7–13.
164. Philips G.T., Stair C.N., Lee H.Y., Wroblewski E., Berberoglu M.A., Brown N.L., Mastick G.S. Precocious retinal neurons: Pax6 controls timing of differentiation and determination of cell type // *Dev. Biol.* 2005. Vol. 279. P. 308–321.
165. Pillai A., Mansouri A., Behringer R., Westphal H., Goulding M. Lhx1 and Lhx5 maintain the inhibitory-neurotransmitter status of interneurons in the dorsal spinal cord // *Development.* 2007. Vol. 134. P. 357–366.
166. Platel J. C., Stambouliau S., Nguyen I., Bordey A. Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: the first leg // *Brain. Res. Rev.* 2010. Vol. 63. P. 60–71.
167. Polenov A.L., Chetverukhin V.K. Ultrastructural radioautographic analysis of neurogenesis in the hypothalamus of the adult frog, *Rana temporaria*, with special reference to physiological regeneration of the preoptic nucleus. II. Types of neuronal cells produced // *Cell Tissue Res.* 1993. Vol. 271. P. 351–362.
168. Ponti G., Peretto P., Bonfanti L. Genesis of neuronal and glial progenitors in the cerebellar cortex of peripuberal and adult rabbits // *PLoS One.* 2008. Vol. 3. e2366.
169. Prada F.A., Quesada A., Dorado M., Chmielewski C., Prada C. Glutamine synthetase (GS) activity and spatial and temporal patterns of GS expression in the developing chick retina: Relationship with synaptogenesis in the outer plexiform layer // *Glia.* 1998. Vol. 22. P. 221–236.
170. Privat A. Morphology of astrocytes. / A. Privat, M. Gimenez-Ribota, J.L. Ridet – eds. Kettenmann, H., Ramson, B.R. - Neuroglia. Oxford University Press: New York. 1995. – 173 p.
171. Pushchina E.V., Varaksin A.A., Obukhov D.K. Cystathionine  $\beta$ -synthase in the CNS of masu salmon *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) and carp *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) // *Neurochem. J.* 2011. Vol. 5. P. 24–34.
172. Pushchina E.V., Obukhov D.K., Varaksin A.A. Features of adult neurogenesis and neurochemical signaling in the Cherry salmon *Oncorhynchus masou* brain // *Neural Regen. Res.* 2013. Vol. 8. P. 13–23.

173. Pushchina E.V., Varaksin A.A., Stukaneva M.E., Zharikova E.I. Adult and Reparative Neurogenesis in Fish Brain // *Peripheral nerve regeneration – from surgery to new therapeutic approaches including biomaterials and cell-based therapies development* / Ed. A.C. Mauricio. Rijeka: Intech. 2017. P. 175–195.
174. Pushchina E.V., Zharikova E.I., Varaksin A.A. The ratio of constitutive and reparative neurogenesis in the pallium of juvenile masu salmon (*Oncorhynchus masou*) // *Teleosts. Physiology, Evolution and Classification* / Ed. M. Herleif. New York: Nova Science Publishers, Inc. 2018. P. 45–71.
175. Pushchina E.V., Zharikova E.I., Varaksin A.A., Prudnikov I.M., Tsyvkin V.N. Proliferation, adult neuronal stem cells and cells migration in pallium during constitutive neurogenesis and after traumatic injury of telencephalon of juvenile masu salmon, *Oncorhynchus masou* // *Brain Sci.* 2020. Vol. 10, № 4. Article no. 222. doi:10.3390/brainsci10040222
176. Pushchina E.V., Zharikova E.I., Varaksin A.A. Mechanical brain injury increases cells' production of cystathionine  $\beta$ -synthase and glutamine synthetase, but reduces Pax2 expression in the telencephalon of juvenile chum salmon, *Oncorhynchus keta* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 3. Article no. 1279. doi.org/10.3390/ijms22031279
177. Pushchina E.V., Zharikova E.I., Varaksin A.A. Expression of doublecortin, glial fibrillar acidic protein, and vimentin in the intact subpallium and after traumatic injury to the pallium in juvenile salmon, *Oncorhynchus masou* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 3. Article no. 1334. doi.org/10.3390/ijms23031334
178. Redies C., Puelles L. Modularity in vertebrate brain development and evolution // *Bioessays.* 2001. Vol. 23. P. 1100–1111.
179. Reeves F.C., Burdge G.C., Fredericks W.J., Rauscher F.J.I., Lillycrop K.A. Induction of antisense Pax-3 expression leads to the rapid morphological differentiation of neuronal cells and an altered response to the mitogenic growth factor Bfgf // *J. Cell Sci.* 1999. Vol. 112. P. 253–261.

180. Reynolds B.A., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system // *Science*. 1992. Vol. 255. P. 1707–1710.
181. Robinson S.R. Neuronal expression of glutamine synthetase in Alzheimer's disease indicates a profound impairment of metabolic interactions with astrocytes // *Neurochem. Int.* 2000. Vol. 36. P. 471–482.
182. Rosier F., Lambert D., Mertens-Strijthagen J. Effect of glucose on rat glutamine synthetase in cultured astrocytes // *Biochem. J.* 1996. Vol. 315. P. 607–612.
183. Rosillo J., Torres C.M., Olivera-Bravo S., Casanova G., García-Verdugo J.M., Fernández A.S. Telencephalic-olfactory bulb ventricle wall organization in *Austrolebias charrua*: Cytoarchitecture, proliferation dynamics, neurogenesis and migration // *Neuroscience*. 2016. Vol. 12. P. 63–80.
184. Rothenaigner I., Krecsmarik M., Hayes J.A. Clonal analysis by distinct viral vectors identifies bona fide neural stem cells in the adult zebrafish telencephalon and characterizes their division properties and fate // *Develop.* 2011. Vol. 138. P.1459–1469.
185. Schaar B. T., Kinoshita K., McConnell S. K. Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons // *Neuron*. 2004. Vol. 41. P. 203–213.
186. Schousboe A., Scafidi S., Bak L.K., Waagepetersen H.S., McKenna M.C. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes // *Adv. Neurobiol.* 2014. Vol. 11. P. 13–30.
187. Seaberg R.M., van der Kooy D. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. P. 1784–1793.
188. Seri B., Garcia-Verdugo J. M., McEwen B. S., Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus // *J. Neurosci.* 2001. Vol. 21. P. 7153–7160.

189. Seri B., Garcia-Verdugo J.M., Collado-Morente L., McEwen B.S., Alvarez-Buylla A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus // *J. Comp. Neurol.* 2004. Vol. 478. P. 359–378.
190. Shi Y., Chichung Lie D., Taupin P., Nakashima K., Ray J., Yu R. T., Gage F. H., Evans R. M. Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells // *Nature.* 2004. Vol. 427. P. 78–83.
191. Smart I., Leblond C.P. Evidence for division and transformations of neuroglia cells in the mouse brain, as derived from autoradiography after injection of thymidine<sup>3</sup>H // *J. Comp. Neurol.* 1961. Vol. 116. P. 349–367.
192. Smith C.D., Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Stadtman E.R., Floyd R.A., Markesbery W.R. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991. Vol. 88. P. 10540–10543.
193. Soukkarieh C., Agius E., Soula C., Cochard P. Pax2 regulates neuronal-glial cell fate choice in the embryonic optic nerve // *Dev. Biol.* 2007. Vol. 303. P. 800–813.
194. Sugimori M., Nagao M., Bertrand N., Parras C.M., Guillemot F., Nakafuku M. Combinatorial actions of patterning and HLH transcription factors in the spatiotemporal control of neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord // *Develop.* 2007. Vol. 134. P. 1617–1629.
195. Sullivan S.A., Barthel L.K., Largent B.L., Raymond P.A. A goldfish Notch-3 homologue is expressed in neurogenic regions of embryonic, adult, and regenerating brain and retina // *Dev. Genet.* 1997. Vol. 20. P. 208–223.
196. Talamillo A., Quinn J.C., Collinson J.M., Caric D., Price D.J., West J.D., Hill R.E. Pax6 regulates regional development and neuronal migration in the cerebral cortex // *Dev. Biol.* 2003. Vol. 255. P. 151–163.
197. Terzibasi E.T., Baumgart M., Battistoni G., Cellerino A. Adult neurogenesis in the short-lived teleost *Nothobranchius furzeri*: Localization of neurogenic niches, molecular characterization and effects of aging // *Aging Cell.* 2012. Vol. 11. P. 241–251.

198. Than-Trong E., Bally-Cuif L. Radial glia and neural progenitors in the adult zebrafish central nervous system // *Glia*. 2015. Vol. 63. P. 1406–1428.
199. Thompson J.A., Zembrzycki A., Mansouri A., Ziman M. Pax7 is requisite for maintenance of a subpopulation of superior collicular neurons and shows a diverging expression pattern to Pax3 during superior collicular development // *Dev. Biol.* 2008. Vol. 8. P. 62–67.
200. Thompson J.A., Ziman M. Pax genes during neural development and their potential role in neuroregeneration // *Prog. Neuro.* 2011. Vol. 95. P. 334–351.
201. Tonchev A.B., Yamashima T. Differential neurogenic potential of progenitor cells in dentate gyrus and CA1 sector of the postischemic adult monkey hippocampus // *Exp. Neurol.* 2006. Vol. 198. P. 101–113.
202. Trevisani M., Patacchini R., Nicoletti P. Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways // *Br. J. Pharmacol.* – 2005. Vol. 145. P. 1123–1131.
203. Tuoc T.C., Radyushkin K., Tonchev A.B., Pinon M.C., Ashery-Padan R., Molnar Z., Davidoff M.S., Stoykova A. Selective cortical layering abnormalities and behavioral deficits in cortex-specific Pax6 knock-out mice // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. P. 8335–8349.
204. Ugrumov M.V. Developing brain as an endocrine organ: a paradoxical reality // *Neurochem. Res.* 2010. Vol. 35. P. 837–850.
205. Ugrumov M.V. Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: distribution in the brain, development and functional significance // *J. Chem. Neuroanat.* 2009. Vol. 38. P. 241–256.
206. Vríz S., Lemaitre J.M., Leibovici M. Comparative analysis of the intracellular localization of c-Myc, c-Fos, and replicative proteins during cell cycle progression // *Mol. Cell. Biol.* 1992. Vol. 12. P. 3548–3555.
207. Wang J.F., Li, Y., Song J.N., Pang H.G. Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury // *Neurochem. Int.* 2014. Vol. 64. P. 37–47.



208. Wang Q., Kumar S., Slevin M., Kumar P. Functional analysis of alternative isoforms of the transcription factor PAX3 in melanocytes in vitro // *Cancer Res.* 2006. Vol. 66. P. 8574–8580.
209. Waseem N.H., Lane D.P. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form // *J. Cell Sci.* 1990. Vol. 96. P. 121–129.
210. Wojtera M., Sikorska B., Sobow T., Liberski P.P. Microglial cells in neurodegenerative disorders // *Folia Neuropathol.* 2005. Vol. 43. P. 311–321.
211. Wu G., Fang Y. Z., Yang S. Glutathione metabolism and its implications for health // *J. Nutr.* 2004. Vol. 134. P. 489–492.
212. Wullimann M., Puelles L. Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains // *Anatomy and Embryology.* 1999. Vol. 329. P. 329–348.
213. Wullimann M., Rink E. The teleostean forebrain: a comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization // *Brain Res. Bull.* 2002. Vol. 57. P. 363–370.
214. Wullimann M., Rupp B., Reichert H. *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas*—eds. Wullimann, M. – Birkhäuser Verlag: Basel, 1998. – 144p.
215. Wullimann M.F., Muller T. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behavior // *J. Comp. Neurol.* 2004. Vol. 475. P. 143–162.
216. Xu L., Tang X., Wang Y., Xu H., Fan X. Radial glia, the keystone of the development of the hippocampal dentate gyrus // *Mol. Neurobiol.* 2015. Vol. 51. P. 131–141.
217. Yamamoto S., Nagao M., Sugimori M., Kosako H., Nakatomi H., Yamamoto N., Takebayashi H., Nabeshima Y., Kitamura T., Weinmaster G., Nakamura K., Nakafuku M. Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord // *J. Neurosci.* 2001. Vol. 21. P. 9814–9823.

218. Yang G., Li Y., Nishimura E.K., Xin H., Zhou A., Guo Y., Dong L., Denning M.F., Nickoloff B.J., Cui R. Inhibition of PAX3 by TGF-beta modulates melanocyte viability // *Mol. Cell*. 2008. Vol. 32. P. 554–563.
219. Zaghloul N.A., Moody S.A. Alterations of rx1 and Pax6 expression levels at neural plate stages differentially affect the production of retinal cell types and maintenance of retinal stem cell qualities // *Dev. Biol*. 2007. Vol. 306. P. 222–240.
220. Zhang J., Lu J.P., Suter D.M., Krause K.H., Fini M.E., Chen B., Lu Q. Isoform- and dose-sensitive feedback interactions between paired box 6 gene and delta-catenin in cell differentiation and death // *Exp. Cell Res*. 2010. Vol. 316. P. 1070–1081.
221. Zhang Y., Xu D., Qi H., Yuan Y., Liu H., Yao S., Yuan S., Zhang J. Enriched environment promotes post-stroke neurogenesis through NF- $\kappa$ B-mediated secretion of IL-17A from astrocytes // *Brain Res*. 2018. Vol. 1687. P. 20–31.
222. Zharikova E.I. Role of stem cells and astrocytic glial cells in reparative histogenesis in telencephalon of masu salmon *Oncorhynchus masou* // International Conference on Histochemistry and Cell Biology, Phoenix, USA, September 14–15, 2016. *Journal of Cytology and Histology*. 2016. Vol. 7, № 4 (Suppl). P. 8.
223. Zharikova E.I., Pushchina E.V. Proliferation and migration of neuronal progenitor cells in telencephalon during constitutive neurogenesis and after traumatic injury of juvenile masu salmon, *Oncorhynchus masou* // *Marine Biology in the 21st Century: Achievements and Development Outlook (in Commemoration of the 100th Anniversary of the Birth of Academician Alexey V. Zhirmunsky): ABSTRACTS of the International Conference, Vladivostok, 06–08 октября 2021 года.* – Vladivostok: Far Eastern Federal University, 2021. P. 227–229.
224. Zupanc G., Hinsch K., Gage F.H. Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain // *J. Comp. Neurol*. 2005. Vol. 488. P. 290–319.
225. Zupanc G., Sirbulescu R. Teleost fish as a model system to study successful regeneration of the central nervous system // *Curr. Top. Microbio. Immun*. 2013. Vol. 367. P. 193–233.

226. Zupanc G.K. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish // *Brain Behav. Evol.* 2001. Vol. 58. P. 250–275.
227. Zupanc G.K., Hinsch K., Gage F.H. Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain // *J. Comp. Neurol.* 2005. Vol. 488. P. 290–319.
228. Zupanc G.K., Horschke I. Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study // *J. Comp. Neurol.* 1995. Vol. 353. P. 213–233.