

На правах рукописи

СТУКАНЁВА

Мария Евгеньевна

**КОНСТИТУТИВНЫЙ И РЕПАРАТИВНЫЙ НЕЙРОГЕНЕЗ В МОЗЖЕЧКЕ МОЛОДИ
СИМЫ *ONCORHYNCHUS MASOU***

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор РАН Пушина Евгения Владиславовна

Официальные оппоненты:

Черток Виктор Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой анатомии

Глазова Маргарита Владимировна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, заведующая лабораторией сравнительной биохимии клеточных функций

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

Защита диссертации состоится 11 декабря 2019 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

Факс: (423) 2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук:

<http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/49-stukanjova-mariya-evgenevna>

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан «____» октября 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук

Ващенко

Ващенко Марина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одним из перспективных подходов концептуализации знаний о нейрональных стволовых клетках (НСК) является исследование организмов, способных к восстановлению нервной ткани (Stocum, 2006). Понимание базовых процессов, лежащих в основе управления нейрогенезом, как развиваются или утрачиваются в ходе эволюции области, содержащие НСК, позволит понять потенциальные возможности активации «покоящихся» НСК в не нейрогенных областях мозга человека. Наиболее изученным и удобным модельным объектом для исследований нейрогенетических процессов являются костистые рыбы, поскольку в период их постэмбрионального развития формирование мозга, рост и дифференциация интегративных центров активно продолжают (Zupanc, 2006). Основой этого является конститутивный нейрогенез – процесс, начинающийся с деления клеток-предшественников, их последующей миграции, дифференциации вновь созданных клеток и заканчивающийся интеграцией новых нейронов в нервную сеть (Kempermann, 2008). Способность к созданию новых нейронов во взрослом мозге обнаружена у всех отрядов позвоночных, но у более эволюционно продвинутых отрядов, как млекопитающие наблюдается тенденция к уменьшению числа пролиферативных зон и количества новых нейронов (Ghosh, Hui, 2016).

Среди всех позвоночных наиболее интенсивный и широко распространенный нейрогенный потенциал во многих областях взрослого мозга демонстрируют костистые рыбы (Olivera-Pasilio et al., 2017). Нейрогенные ниши паллиума и субпаллиума костистых рыб были идентифицированы, как гомологи субгранулярной зоны гиппокампа и субвентрикулярной зоны млекопитающих (Adolf et al., 2006; Mueller, Wullimann, 2009). Для филогенетически древней группы лососевых рыб (Salmonidae) характерна высокая концентрация недифференцированных элементов как в матричных зонах мозга, так и в паренхиме (Puschina et al., 2016). Их эволюция осуществлялась путем фетализации с замедлением темпов онтогенеза отдельных органов или их систем, в результате чего у взрослого организма сохраняется эмбриональное состояние соответствующих признаков. Процессы фетализации накладываются на стадию активного роста, когда процессы морфогенеза наиболее ярко и полно выражены.

Сима является удобной моделью для морфогенетических исследований, поскольку её медленное эмбриональное развитие позволяет лучше оценить скорость пролиферации и гибели клеток, чем у видов с быстрым развитием, таких как *D. rerio*. Создание травматической модели мозжечка молоди сими *Oncorhynchus masou* (Brevoort, 1856) – дальневосточного вида-эндемика позволяет изучить динамику конститутивного и репаративного нейрогенеза.

Сокращения, используемые в тексте: НСК – нейрональные стволовые клетки, НКП – нейрональные клетки-предшественники, ДМЗ – дорсальная матричная зона, GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок, РГ – радиальная глия, ИГХ – иммуногистохимия, ГС – глутаминсинтетаза, ЭДК – эвридендронидные клетки, PCNA – пролиферативный ядерный антиген, CBS – цистатион β-синтаза, BrdU – 2'-дезоксидезокси-5-бромдезоксимуридин, NuCD – нейронспецифичный маркер, TdT-энзим – диоксинуклеотид трансфераза.

Мозжечок является общепринятой зоной мозга для исследования морфогенетических процессов, поскольку имеет повышенную пролиферативную активность, как в условиях нормы, так и при травматическом воздействии (Zupanс, Sîrbulescu, 2013).

Степень разработанности темы. Интерес к изучению процессов, способствующих восстановлению головного мозга, нашёл свое отражение в многочисленных работах российских и зарубежных авторов, а объём знаний, накопившийся за последние десятилетия, показал более ясное направление дальнейших исследований. Центральная задача изучения конститутивного нейрогенеза заключается в исследовании клеточного состава нейрогенных ниш и понимания того, как эти клетки образуют новые нейроны. В настоящее время известно, что клеточный состав, организация нейрогенных ниш может различаться в регионах мозга и между видами. Распределение пролиферативных центров в мозге костистых рыб поражает высоким сходством, несмотря на существенные различия в экологической специализации и филогенетической удаленности исследованных видов (Пушина, Обухов, 2011). На начало работы по теме диссертации было опубликовано только несколько исследований, проведенных на молоди симы *O. masou*, которая находится в стадии активного роста. Исследования совокупности процессов репаративного нейрогенеза у молоди симы в краткосрочный период после нанесения травмы, таких как: апоптоз, пролиферация, нейропротекция и нейродифференциация, до настоящего времени не проводились.

Цель работы – исследование процессов конститутивного и репаративного нейрогенеза в мозжечке молоди симы *O. masou*

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Проанализировать интенсивность процессов апоптоза в матричных зонах и в области травмы в мозжечке молоди симы.
2. Установить влияние глутаминсинтетазы (ГС) и цистатионин-β-синтазы (CBS) на конститутивный и репаративный нейрогенез. Охарактеризовать участие сероводорода (H₂S) в процессах апоптоза и в регуляции пролиферативной активности клеток-предшественников.
3. Проанализировать пролиферативную активность в матричных зонах интактного мозжечка молоди симы и установить изменения, происходящие после нанесения повреждения.
4. Установить фенотип НСК в мозжечке молоди симы.
5. Выявить различия в интенсивности пролиферативной активности в мозжечке молоди симы при разных видах травмы: при прямом повреждении мозжечка и при травме конечного мозга.
6. Установить особенности влияния травмы мозжечка на изменения в конститутивных нейрогенных нишах и их клеточного состава в ходе репаративного нейрогенеза.

Научная новизна. Получены новые данные о процессах конститутивного и репаративного нейрогенеза дальневосточного эндемика – симы *O. masou*. Дан

подробный анализ процессов апоптоза, нейропротекции, пролиферации, миграции, нейродифференциации, участия глии и НСК в рамках конститутивного и репаративного нейрогенеза в мозжечке молоди симы *O. masou*. Показано, что ГС и H₂S обладают нейропротекторными свойствами, нейтрализуя глутамат и снижая интенсивность процессов апоптоза в ходе конститутивного и репаративного нейрогенеза и защищая нейроны от окислительного стресса. Установлено, что пролиферативная активность клеток-предшественников в мозжечке симы регулируется при участии H₂S. Выявлено, что дорсальная матричная зона (ДМЗ) мозжечка симы состоит из гетерогенной популяции НСК, большая часть которых имеет нейроэпителиальный, а не глиальный фенотип. Обнаружено, что процессы репаративного нейрогенеза у молоди лососевых реализуются в более ранние сроки по сравнению с теми, что обычно приводятся в литературе (Zupanc, 2006; Zupanc, Sîrbulescu, 2013). Впервые проведено сравнение пролиферативной активности в мозжечке молоди симы при его прямом повреждении и при повреждении конечного мозга. Установлено, что повреждение мозжечка усиливает процессы образования нейронов в реактивных церебеллярных нейрогенных нишах и ускоряет нейрональную дифференциацию клеток, которые впоследствии интегрируются в зрелые нейронные сети мозжечка.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты настоящей работы дополняют существующие представления об активации нейрогенных ниш с пулом НСК и последующей миграции этих клеток к зоне травмы и вносят существенный вклад в понимание механизмов, регулирующих пролиферацию, миграцию, дифференциацию и выживание новых клеток в мозге взрослых костистых рыб. Результаты диссертационной работы расширяют знания о возможности реактивации потенциала НСК после инвазивного повреждения мозга. Произведена оценка вклада конститутивных и активированных нейрогенных ниш в процессы восстановления мозжечка и роли различных факторов, влияющих на этот процесс. Проведённая работа подтвердила и расширила представления о том, что регенеративный потенциал рыб представляет совокупность хорошо организованных процессов.

Методология и методы диссертационного исследования. В данной диссертационной работе были применены современные методические подходы, связанные с выявлением иммуногистохимической активности, с помощью которых можно верифицировать НСК и нейрональные клетки-предшественники, а также дифференцированные типы клеток во взрослом мозге. Экспериментальное повреждение мозжечка проводили согласно методике Зупанка и Отта (Zupanc, Ott, 1999). Для сравнительной оценки воздействия травмы другого отдела мозга на процессы нейрогенеза в мозжечке исследовали травму конечного мозга по методу Кишимото с соавторами (Kishimoto et al., 2012). Для морфологических исследований материал окрашивали по стандартной методике Ниссля 1% водным раствором толуидинового синего (Меркулов, 1969). Для характеристики процессов пролиферации были выбраны молекулярные маркёры – пролиферативный ядерный антиген (PCNA) и 2'-дезоксидезокси-5-бромдезоксипуридин (BrdU); глиогенеза и выявления радиальной глии – GFAP и ГС;

нейродифференциации – нейронспецифичный маркер (HuCD), фермент CBS применяли для выявления сероводорода.

Анализ распределения маркера астроцитарной глии и белка промежуточных филаментов – виментина осуществляли с использованием молекулярного маркера виментина. Для идентификации апоптозных элементов применялся TUNEL-анализ, который позволяет идентифицировать апоптозные клетки с помощью маркирования терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазы. Анализ количества клеток-предшественников осуществляли с использованием молекулярного маркера нестина. Исследование травматического воздействия было проведено в краткосрочный период: 1, 2 и 3 сут. В указанные временные промежутки, согласно данным литературы, наблюдаются наиболее выраженные эффекты: апоптотические и пролиферативные (Zuranc, Sîrbulescu, 2013), нейрогенные и нейрональной дифференциации (Zuranc, Ott, 1999). Для различных маркеров сроки наступления подобных изменений отличаются (Clint, Zuranc, 2001). Анализ полученных данных реализован с помощью специализированного программного обеспечения AxioVision. Для визуализации и проведения морфологического, морфометрического и денситометрического анализа параметров клеточных тел (измерение большого и малого диаметров сомы) был использован моторизированный инвертированный микроскоп исследовательского класса с приставкой улучшенного контрастирования при работе с люминесценцией Axiovert 200-M с флюоресцентным модулем ApoTome и цифровыми камерами AxioCam MRM и AxioCam HRC (Carl Zeiss, Германия). Обработку полученных данных проводили с использованием программы Axioimager и в графическом редакторе Corel Photo-Paint 12.

Положения, выносимые на защиту:

1. Между процессами пролиферации и апоптоза в матричных зонах мозжечка молодежи симы существует связь. В ходе репаративного нейрогенеза участие процессов апоптоза необходимо для утилизации поврежденных клеток и для нейтрализации возрастающей глутаматной эксайтотоксичности.
2. Фермент глутаминсинтетаза и газовый медиатор H₂S снижают нейродегенеративные последствия механического повреждения в мозжечке молодежи симы.
3. Нейрональные стволовые клетки представляют собой гетерогенную популяцию в мозжечке молодежи симы; большая их часть имеет нейроэпителиальный, а не глиальный фенотип.
4. Прямое повреждение мозжечка сопровождается значительным усилением пролиферативной активности в реактивных нейрогенных нишах, содержащих нейрональные стволовые клетки, и ускорением нейрональной дифференциации нейрональных стволовых клеток.
5. Повреждение конечного мозга вызывает менее выраженный пролиферативный ответ в мозжечке по сравнению с прямой травмой мозжечка.

Степень достоверности результатов. О достоверности полученных результатов свидетельствуют использование современных иммуногистохимических методов и статистическая обработка полученных данных, которые соответствуют целям и задачам,

поставленным в работе, а также публикации результатов работы в рецензируемых журналах. Фактические материалы, представленные в диссертации, находятся в полном соответствии с первичной документацией – протоколами исследований. Применение метода негативного контроля позволило оценить специфичность иммуногистохимических реакций. Использование одних и тех же алгоритмов для описания каждого процесса, анализ данных с помощью разного программного обеспечения, а также воспроизводимость результатов при повторных экспериментах позволили определить динамику процессов, происходящих в мозге молодых симы в ходе репаративного нейрогенеза. Результаты исследований, научные положения и выводы подкреплены данными, приведенными на рисунках и в таблицах.

Апробация результатов работы. Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на 25 «Нейрофармакологической конференции» (Чикаго, 2015); 24 Всероссийской научной конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей», посвященной 150-летию со дня основания кафедры гистологии с курсом эмбриологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова (Санкт-Петербург, 2018); III Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» к 110-летию со дня рождения академика А.В. Иванова (Санкт-Петербург, 2016); ежегодной научной конференции Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (г. Владивосток, 2016, 2017, 2018, 2019).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 14 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах из списка, рекомендованного ВАК. В этих работах опубликованы основные результаты исследований.

Объём и структура работы. Диссертация изложена на 195 страницах, содержит 9 таблиц и 26 рисунков. Материалы работы представлены в виде введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», а также «Выводов» и «Списка литературы». Список литературы содержит 386 источников, из них 373 на иностранном языке.

Благодарности. Выражаю глубокую признательность своему научному руководителю профессору, д.б.н. Евгении Владиславовне Пущиной за всестороннюю помощь, квалифицированное руководство и поддержку на протяжении всех лет работы в лаборатории клеточной дифференциации. Благодарю профессора, д.б.н. Анатолия Алексеевича Вараксина за помощь в сборе материала, освоении новых методик и обсуждении результатов. Особую благодарность выражаю к.б.н., ст.н.с. Игорю Викторовичу Манжуло за ознакомление с текстом рукописи, рекомендации и справедливые замечания. Глубокую признательность выражаю своим родным и близким за всестороннюю и неоценимую поддержку.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» (проект № 15-I-6-010) и гранта Президента РФ (МД 4318.2015.4).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

В данной диссертационной работе были применены современные методические подходы, связанные с выявлением иммуногистохимической (ИГХ) активности НСК и НКП, дифференцированных типов клеток. Животные были получены с Рязановского экспериментального производственного рыбоводного завода с 2015 по 2018 г. Все экспериментальные манипуляции были проведены в соответствии с правилами, регулируемые уставом Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН и Этической комиссией, регламентирующей гуманное обращение с экспериментальными животными (разрешение по.4-031018 от 03.10.2018 года). Согласно методике Зупанка и Отта (Zupanc, Ott, 1999) прокалывали череп рыбы тонкой стерильной иглой и наносили рану глубиной в 1 мм в область тела мозжечка. Сразу после механического повреждения животных выпускали в аквариум с пресной водой для их восстановления и дальнейшего мониторинга. У животных в результате травматического повреждения мозжечка существенно повышалась двигательная активность по сравнению с контрольной группой: они выпрыгивали из воды и совершали вращательные движения. Данные наблюдения свидетельствуют о нарушении структуры мозжечка и нижерасположенных двигательных центров ретикулярной формации.

Сравнительную оценку воздействия травмы конечного мозга на эффекты в мозжечке исследовали по методу Кишимото с соавторами (Kishimoto et al., 2012). Тонкой стерильной иглой наносили рану глубиной в 1 мм в правое полушарие конечного мозга. Для оценки пролиферативной активности клеток с помощью маркирования BrdU в обеих экспериментальных группах одновременно с повреждением мозжечка или конечного мозга вводили интраперитонеально инъекцию 10 мг/мл раствора BrdU (Sigma-Aldrich, USA) в расчёте 20 мкл/г массы тела. Животным из контрольной группы ($n = 5$) была введена только интраперитонеально инъекция 10 мг/мл раствора BrdU (Sigma-Aldrich, USA) в расчёте 20 мкл/г массы тела.

Для характеристики процессов пролиферации были выбраны молекулярные маркёры – PCNA и BrdU; глиогенеза и выявления радиальной глии – GFAP и ГС; нейродифференциации – NuCD, фермент CBS применяли для выявления сероводорода. Нестин и виментин использовали для анализа распределения НКП. TUNEL-анализ применялся для идентификации апоптотических элементов с помощью маркирования терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазы. Исследование травматического воздействия было проведено в краткосрочный период: 1, 2 и 3 сут, соответственно. В указанные временные промежутки, согласно данным литературы, наблюдаются наиболее выраженные эффекты: апоптотические и пролиферативные (Zupanc, Sîrbulescu, 2013), нейрогенные и нейрональной дифференциации (Zupanc, Ott, 1999).

Таблица 1. Антитела для иммуногистохимической реакции.

по	Антитела	Производитель, разведение
1	PCNA	Моноклональные мышинные антитела (Santa Cruz Biotech, США; 1:300)
2	BrdU	Моноклональные мышинные антитела (клон SPM166; Novus Biologicals, Littleton, США; 1:200)
3	CBS	Поликлональные мышинные антитела (Abcam, Великобритания; 1:300)
4	Глутаминсинтетаза	Моноклональные мышинные антитела (Vector Laboratories Burlingame, США; 1:300)
5	Нестин	Моноклональные мышинные антитела (Abcam, Великобритания; 1:300)
6	Виментин	Моноклональные мышинные антитела (Abcam, Великобритания; 1:300)
7	GFAP	Моноклональные мышинные антитела (Abcam, Великобритания; 1:300)
8	HuCD	Моноклональные мышинные антитела (ICN, Biomedicals, США; 1:300)

Методы исследования. Для морфологических исследований материал окрашивали по стандартной методике Ниссля 1% водным раствором толуидинового синего (Меркулов, 1969), быстро обезвоживали в спиртах и заключали под покровные стёкла в среду Bio-optica (Италия).

Анестезия, префиксация. После повреждения животные выводились из эксперимента и подвергались эвтаназии методом быстрой декапитации. Рыбы были анестезированы в растворе трикаин метансульфоната MS-222 (Sigma-Aldrich, USA) в течение 10–15 мин при комнатной температуре. После анестезии внутричерепную полость обездвиженного животного перфузировали с помощью шприца 4%-ым раствором параформальдегида, приготовленным на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2). После префиксации мозг извлекали из полости черепа и фиксировали в 4%-ом растворе параформальдегида в течение двух часов при 4°C. Затем в течение двух сут выдерживали в 30%-ом растворе сахарозы при 4°C (с семикратной сменой раствора). Серийные фронтальные срезы мозга толщиной 50 мкм изготавливали на замораживающем микротоме Cryo-star HM 560 MB (Carl Zeiss, Оберкохен, Германия). Для проведения реакции был взят каждый третий фронтальный срез мозжечка.

Для исследования процессов апоптоза через 2 сут после экспериментального повреждения использовали метод **TUNEL-маркирования**. Для идентификации TUNEL-позитивных структур использовали стандартную иммунопероксидазную систему идентификации ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon International Inc., USA). Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали

в 1% растворе перекиси водорода в течение 3 мин, далее материал промывали в 2 сменах фосфатного солевого буфера в течение 5 мин. На срезы наносили 75 мкл выравнивающего буфера и выдерживали в течение 10 с при комнатной температуре. Далее наносили раствор диоксинуклеотид трансферазы (TdТ-энзим) (55 мкл/5 см²) и инкубировали в термостате в течение 1 ч при температуре 37°C. После этого срезы мозга погружали в стоп-буфер на 10 мин, после чего троекратно промывали фосфатным буфером по 1 мин в каждой смене раствора. На срезы наносили конъюгат антидиоксигенина (65 мкл/5 см²) и инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. Срезы промывали при комнатной температуре. Для выявления продуктов реакции срезы мозга инкубировали в субстрате для выявления пероксидазы (VIP Substrate Kit, «Vector Laboratories», Burlingame, USA), контролируя процесс развития окраски под микроскопом, затем промывали в 3 сменах фосфатного буфера и монтировали на предметные стёкла. Для идентификации иммунонегативных нервных клеток полученные препараты выдерживали в течение 15 мин в водном растворе ядерного красителя метилового зеленого (Меркулов, 1969), затем промывали дистиллированной водой в течение 10 с. Обезжовывали по стандартной методике: дифференцировали в течение 10 с в 96% этиловом спирте, затем в течение 10 с в растворе изобутанола. Затем выдерживали в 2 порциях ксилола, по 15 мин в каждой, и заключали в среду Bio-optica (Италия).

Для исследования процессов пролиферации в норме и через 3 сут после повреждения мозжечка и конечного мозга использовали *ИГХ маркирование BrdU*, маркирующего клетки, находящиеся в S-фазе клеточного цикла. Рыб анестезировали в кювете с 0.1% раствором трикаин метан сульфоната MS-222 в течение 5 мин, вскрывали череп и извлекали головной мозг. Далее мозг целиком заливали в парафин по общепринятой методике (Меркулов, 1969), после чего изготавливали серийные поперечные срезы мозга толщиной 7 мкм, которые монтировали на желатинизированные предметные стёкла и оставляли до полного высыхания. После этого срезы были депарафинированы по стандартному гистологическому протоколу (Меркулов, 1969) и отмыты в дистиллированной воде в течение 3 мин. Далее срезы были обработаны в соответствии с протоколом по ИГХ маркированию BrdU (Dolbeare, 1995). Для раскручивания двухцепочечной структуры ДНК проводили кислотный гидролиз (www.thermofisher.com). Срезы мозга инкубировали в 1 М HCl в течение 10 мин на льду, затем в 1 М HCl в течение 10 мин при комнатной температуре и в течение 20 мин при температуре 37°C. Затем срезы были нейтрализованы в 0.1 М боратном буфере в течение 10 мин при комнатной температуре, промыты в фосфатном буфере PBS (pH 7.4) и трижды промыты (по 5 мин) 0.1% тритоном X-100. Далее на срезы наносили 1% раствор перекиси водорода, разведённый 0.1 М фосфатным буфером (pH 7.2), после чего их инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре и трижды промывали (по 5 мин) в 0.1 М фосфатном буфере. Затем срезы инкубировали с моноклональными BrdU антителами мыши (1:200; клон SPM166; Novus Biologicals, Littleton, USA) при комнатной температуре в течение 30 мин и промывали в 3 сменах 0.1 М фосфатного буфера в течение 5 мин. Затем срезы инкубировали с вторичными

биотилинированными антителами лошади против иммуноглобулинов мыши (Vector Laboratories Burlingame, USA). ИГХ реакцию проявляли с помощью стандартного ABC-комплекса (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Для выявления продуктов реакции применялся субстрат красного цвета (VIP Substrate Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Развитие ИГХ окраски контролировали под микроскопом, промывали в трёх сменах дистиллированной воды для удаления солей. Обезвоживание и заключение препаратов проводили по вышеприведенной схеме.

ИГХ выявление цистатионин β -синтазы (CBS НФ 4.2.1.22) – фермента, синтезирующего H_2S в ЦНС. Проводили ИГХ реакцию с помощью стандартного стрептовидин-биотинового маркирования на замороженных свободно плавающих срезах мозга, инкубируя с поликлональными антителами мыши против CBS (Abcam, Великобритания), (табл. 1). Затем срезы инкубировали с вторичными биотилинированными антителами лошади против иммуноглобулинов мыши (Vector Laboratories, Burlingame, USA). ИГХ реакцию проявляли с помощью стрептовидин-биотиновой системой визуализации поликлональных антител. Для выявления продуктов реакции применялся субстрат синего цвета (VIP Substrate Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Развитие ИГХ окраски контролировали под микроскопом, промывали в трёх сменах дистиллированной воды для удаления солей. Обезвоживание и заключение препаратов проводили по вышеприведенной схеме.

Оценку конститутивного и репаративного нейрогенеза проводили с помощью ИГХ PCNA, GC, GFAP, нестина, виментина и NuCD-маркирования на замороженных свободно плавающих срезах мозга методом непрямого авидин-биотинового пероксидазного (ABC метод) с использованием моноклональных мышинных антител против данных маркёров (табл. 1). Для устранения неспецифической активности эндогенной пероксидазы срезы в течение 20 мин при комнатной температуре инкубировали с 1% раствором перекиси водорода на 0.1 М фосфатном буфере, после чего трижды промывали в 0.1 М фосфатном буфере. Для устранения неспецифического окрашивания (фона) срезы инкубировали с 1% неиммунной сывороткой лошади на 0.1 М фосфатном буфере при комнатной температуре в течение 1 ч. Срезы инкубировали с первичными моноклональными антителами мыши при температуре 4°C в течение 1 сут, после чего промывали в 3 сменах 0.1 М фосфатного буфера. Для ИГХ маркирования срезы инкубировали с вторичными биотилинированными антителами лошади против иммуноглобулинов мыши при комнатной температуре в течение 2 ч, затем промывали в 3 сменах 0.1 М фосфатного буфера (pH 7.2). Для визуализации ИГХ маркирования была использована стандартная авидин-биотиновая система визуализации ABC-комплекса (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Для выявления продуктов реакции применяли субстрат красного цвета (VIP Substrate Kit, «Vector Laboratories», Burlingame, USA) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Развитие ИГХ окраски контролировали под микроскопом, срезы промывали в 3 сменах дистиллированной воды для удаления солей, обезвоживали в

соответствии со стандартной вышеприведенной процедурой и заключали в среду Bio-optica (Италия).

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

Обработка данных. Микроскопия. Анализ ИГХ препаратов был проведен на микроскопе Axiovert 200-M (Carl Zeiss, Германия) с помощью программы AxioVision. Измерения проводили в 5 случайно выбранных микроскопических полях для каждой области исследования. Микрофотографии препаратов получали с помощью цифровой камеры Axiovert 200. Обработку полученных данных проводили с использованием программы Axioimager и в графическом редакторе Corel Photo-Paint 12.

Статистическая обработка материала. Количественную обработку морфометрических данных ИГХ маркирования выполняли с использованием программных пакетов Statistica 12 и Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При окраске мозжечка молодежи симы толуидиновым синим по Нисслю были визуализированы молекулярный, гранулярный и ганглионарный слои клеток. В соответствии с классификацией Пуэлиса (Pouwels, 1978b) в мозжечке молодежи симы было выделено 5 клеточных типов нейронов. В молекулярном слое мы идентифицировали клетки округлой/овальной формы, относящиеся к 1 типу клеток (звездчатые нейроны, импрегнированные по Кахалу) и находящиеся на разных стадиях роста – 1a, 1b и 1c. Округлые, небольшие клетки 1a и 1b типа представляют собой формы, находящиеся на более ранней стадии дифференциации, крупные овальные клетки 1c типа – на более поздней. Клетки, имеющие удлиненную либо и/или палочковидную форму были отнесены нами к клеткам 2 типа, которые находились в состоянии миграции. В ганглионарном слое были выявлены грушевидные клетки Пуркинье 3 типа и удлиненные биполярные эвридендронидные клетки 4 типа. Округлые клетки, лишенные отростков, располагающиеся в гранулярном слое, мы отнесли к 5 типу (гранулярные клетки и клетки Гольджи). Для характеристики тела мозжечка рассматривали дорсальную, латеральную и базальную зоны.

Физиологическая гибель клеток в мозжечке молодежи симы *O. masou* после механического повреждения. Апоптоз, нейровоспаление, пролиферацию клеток, клеточную дифференциацию в поврежденном мозжечке симы мы рассматривали как совокупность взаимосвязанных функциональных феноменов. В результате травматического воздействия было выявлено значительное количество клеток, подверженных апоптотическим изменениям, которые идентифицировались практически повсеместно. Они были диагностированы с помощью TUNEL-маркирования фрагментов ДНК, длиной около 130 пар оснований, что характерно для поздних стадий апоптоза.

Наибольшее количество TUNEL-позитивных элементов было обнаружено в областях, прилежащих к морфогенетическим зонам мозжечка. Крупные TUNEL-позитивные тельца размерами 8–10 мкм соответствовали поздним стадиям деградации апоптозных клеток. Другой вариант TUNEL-позитивных элементов – мелкие слабо конденсированные частицы, представляющие собой продукты дегрануляции клеток, которые элиминируются с помощью апоптоза (Калиниченко, Матвеева, 2007). Дорсальная зона, содержащая дорсальную матричную зону (ДМЗ), соответствующую зоне вторичного нейрогенеза, содержала большое число TUNEL-позитивных структур. Полученные нами результаты при маркировании PCNA, BrdU, виментина и нестина подтверждают наличие высокого уровня пролиферирующих клеток в зонах с высоким уровнем апоптоза. Этот факт свидетельствует о том, что часть вновь образованных клеток элиминируются уже на стадии их присутствия в пределах матричных зон (Zupanc, Ott, 1999). Наибольшее количество TUNEL-позитивных элементов после травматического воздействия было обнаружено в молекулярном слое. Возможно, это связано с тем, что часть клеток, образованных в результате как репаративного, так и конститутивного нейрогенеза в ходе миграции элиминируются. Другой зоной, где концентрация как единичных TUNEL-позитивных структур, так и кластеров, состоящих из нескольких элементов, значительно превышала фоновый уровень, были область травмы и непосредственно окружающие ее участки. Это, несомненно, указывает на необходимость участия апоптоза в процессе утилизации большого количества повреждённых из-за травмы клеток и для нейтрализации возрастающей глутаматной эксайтотоксичности (Zupanc, Sirbulesku, 2013). В области повреждения наблюдались морфологические проявления тангенциальной и радиальной миграции клеток.

Факторы нейропротекции в интактном и повреждённом мозжечке молодых *O. masou*. На основании полученных нами данных ГС и H₂S рассматривались как факторы нейропротекции, способствующие и облегчающие процессы регенерации. Экспрессия CBS в ЦНС важна как первичный источник газообразного медиатора H₂S. Предполагают, что H₂S действует, как связующий элемент, который легко проникает через мембрану и регулирует ферментативную активность клеток. У контрольных животных и после повреждения мозжечка активность ГС и CBS была идентифицирована в гетерогенной популяции клеток и в волокнах. Высокая плотность распределения ГС-позитивных и CBS-позитивных клеток у интактных животных свидетельствует о высоком уровне активности этих ферментов и их участии в морфогенезе в ходе конститутивного нейрогенеза (рис. 1). Нами была установлена высокая активность ГС и CBS в дорсальной части, которая содержит ДМЗ. Основываясь на морфометрических характеристиках CBS-позитивных клеток, их локализации в матричных зонах мозжечка и взаимодействии друг с другом мы предполагаем, что H₂S участвует в регуляции пролиферативной активности клеток-предшественников в ходе конститутивного и репаративного нейрогенеза.

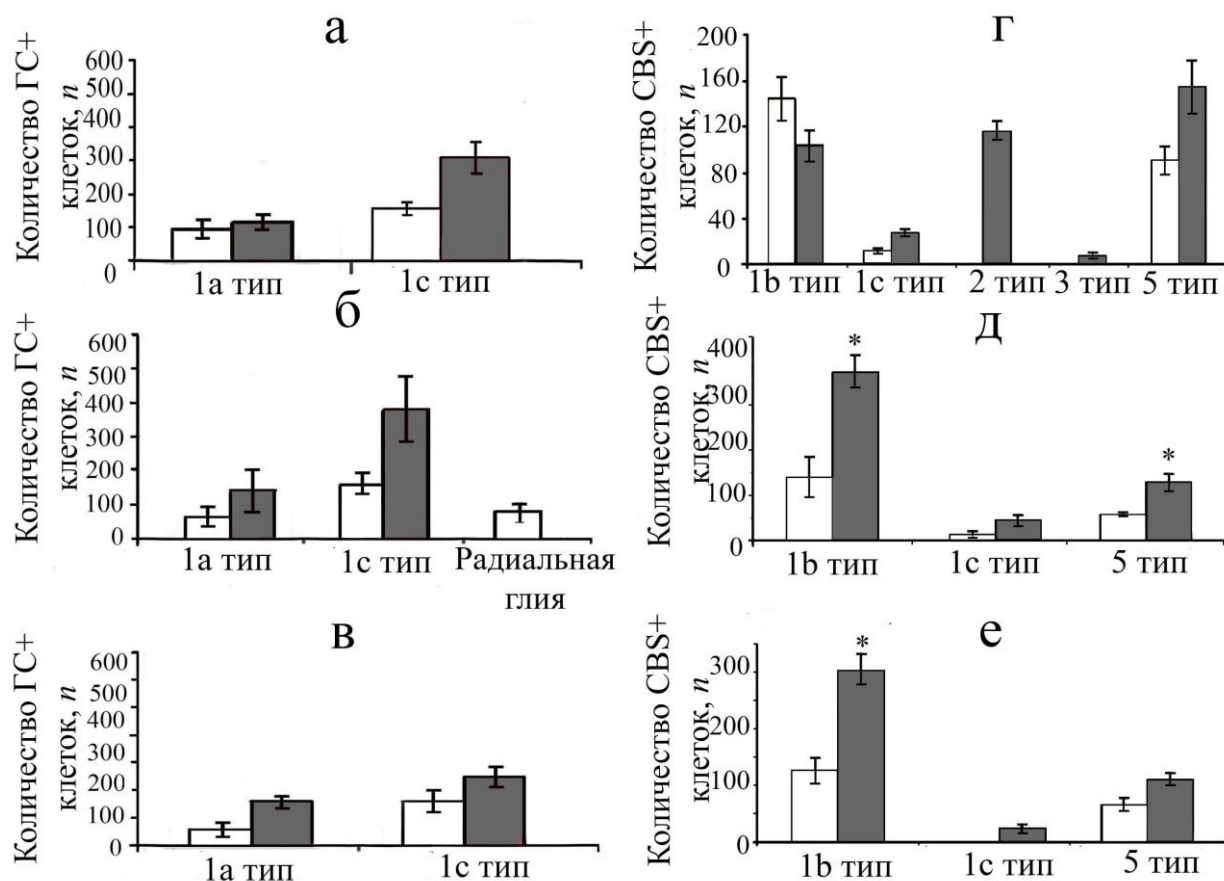


Рисунок 1. Распределение GS-позитивных клеток (а, б, в) и CBS-позитивных клеток (г, д, е) в мозжечке молодежи симы *O. masou* в норме и после повреждения. а, г – дорсальная зона, б, д – латеральная зона, в, е – базальная зона. Белые столбики – контроль, серые – повреждение ($n = 5$ в каждой группе, звёздочкой обозначено $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

В интактном мозжечке были выявлены GS-позитивные волокна радиальной глии (РГ), свидетельствующие о конститутивном нейрогенезе и о том, что GS является одним из морфогенетических маркёров РГ. Их число составляло 78 ± 25 элементов на профильное поле (рис. 1 б). Увеличение количества GS-позитивных клеток, формирование ими конгломератов и усиление активности фермента после повреждения можно отнести к реакции со стороны астроцитоподобных клеток (рис. 1, б, в). Показано, что содержащие GS клетки представляют собой популяции астроцитоподобных клеток (Revett et al., 2013). Мы считаем, что GS в мозжечке молодежи симы может маркировать как глутамат-эргические нейроны, так и астроцитоподобные клетки, содержащие GS и осуществляющие обратный захват глутамата из межклеточного пространства. Однако концентрация таких клеток недостаточно высока для того, чтобы связать подобный ответ со стороны GS-позитивных клеток с образованием астроцитарного ответа, который возникает после травмы в ЦНС млекопитающих. На территории гранулярного слоя идентифицировались гломерулоподобные комплексы, содержащие большое количество GS-позитивных и CBS-позитивных пресинаптических терминалей. Увеличение числа GS-позитивных клеток после травмы вероятнее всего означает, что

GS маркирует как глутамат-эргические нейроны, содержащие GS в качестве фермента, метаболизирующего глутамат, так и астроцитоподобные клетки, осуществляющие детоксикацию глутамата, захваченного из межклеточного пространства. H_2S регулирует клеточную пролиферацию и ингибирует апоптоз (Wang, 2012), снижая негативное влияние нейродегенеративных последствий (Tiong, Bian, 2010). После повреждения мы наблюдали изменение клеточного состава ГС-позитивных элементов и общее увеличение количества ГС-позитивных и CBS-позитивных клеток разных типов (рис. 1). Возрастало количество скоплений CBS-позитивных клеток, которые из-за перехода к гликолизу и транссульфурации нейтрализуют, таким образом, токсические эффекты, возникающие вследствие окислительного стресса и накопления реактивных форм кислорода (Wang, 2012). Для области травмы в дорсальной зоне было характерно максимальное число пролиферирующих клеток, TUNEL-позитивных элементов, ГС-позитивных и CBS-позитивных клеток по сравнению с другими зонами интактного и повреждённого мозжечка. Мы предполагаем, что H_2S также участвует в нейтрализации глутамата, поскольку в дорсальной зоне интактного мозжечка было выявлено большое число ГС-позитивных и CBS-позитивных клеток, количество которых после нанесения повреждения значительно не изменялось (рис. 1 а, г). Такая сложная картина перераспределения активности ГС и CBS после травмы свидетельствует о значительной реорганизации ферментативной активности и подтверждает, что повышенная продукция этих ферментов в мозжечке молодежи симы связана с обеспечением нейропротекторных свойств.

Пролиферация в интактном и поврежденном мозжечке молодежи симы *O. masou* при маркировании PCNA и BrdU. Оценку пролиферативной активности осуществляли при помощи ИГХ маркирования PCNA и BrdU. BrdU-маркирование выявляло два типа элементов: мелкие округлые клетки диаметром 5 мкм и ядра клеток диаметром 3.5 мкм. Экспериментальное маркирование BrdU позволяет диагностировать лишь те клетки, которые находятся S-фазе клеточного цикла, что объясняет их меньшее количество по сравнению с маркированием PCNA. Тот факт, что большинство BrdU-позитивных клеток в мозжечке молодежи симы формировало кластеры, свидетельствует о синхронности и симметричности их митозов и позволяет предположить, что они имеют нейрональный, а не глиальный фенотип. Это подтверждается данными NuCD маркирования, при котором большая часть клеток на территории молекулярного слоя мозжечка молодежи симы была NuCD-позитивна. Кроме этого нами было выявлено небольшое количество GFAP-позитивных клеток относительно NuCD-позитивных клеток. При маркировании PCNA захватывается более объёмная картина пролиферации, поскольку оно осуществляется в течение 24 часов после окончания S-фазы и маркирует клетки в разных фазах клеточного цикла, которые представляют собой как пролиферирующую популяцию, так и к популяции, находящиеся на начальных стадиях дифференциации и/или миграции.

При маркировании BrdU нами было установлено градиентное распределение в ростральной и в каудальной частях тела мозжечка. Наибольшее количество BrdU-позитивных клеток у интактных животных было обнаружено в ростральной части, что,

вероятно, указывает на интенсивный конститутивный нейрогенез в этой области (рис. 2). Наибольшее число BrdU-положительных клеток было выявлено в нижней части молекулярного слоя дорсальной зоны и в гранулярном слое, наименьшее – в его толще (рис. 2 а). В каудальной части количество BrdU-положительных клеток было значительно ниже, чем в ростральной: у поверхности, в нижней части молекулярного слоя дорсальной зоны и в гранулярном слое (рис. 2 г, д, е). Такие значительные отличия демонстрируют градиентное распределение в различных частях мозжечка.

После повреждения мозжечка, напротив, количество BrdU-положительных клеток значительно увеличивалось в каудальной части. В дорсальной зоне каудальной части мозжечка количество BrdU-положительных клеток в молекулярном и гранулярном слоях было существенно выше, чем в ростральной части (рис. 2 г) и существенно превышало соответствующие показатели у контрольных животных ($P < 0.05$). Мы считаем, что низкая пролиферативная активность клеток в каудальной части интактного мозжечка имеет более выраженный пролиферативный потенциал после травмы по сравнению с ростральной частью. Нанесение травмы стимулировало реактивацию конститутивных ниш, которые располагались как в ростральной, так и в каудальной частях мозжечка.

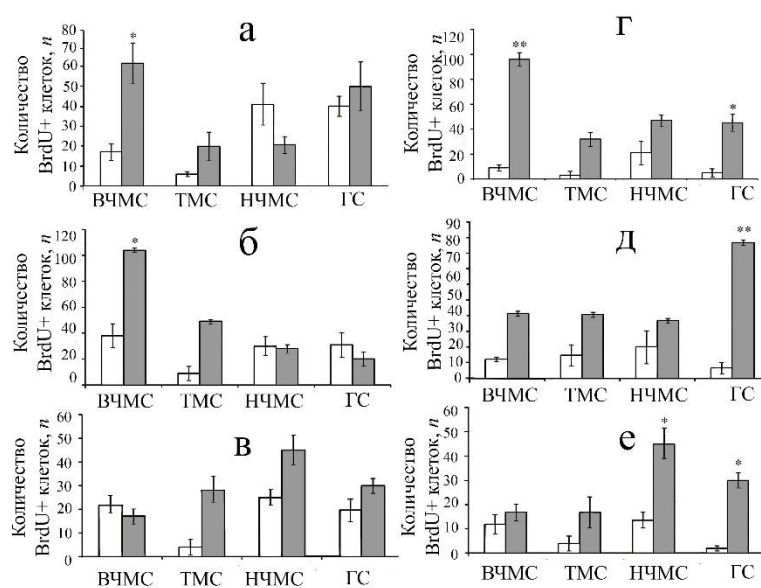


Рисунок 2. Распределение BrdU-положительных клеток в ростральной (а, б, в) и каудальной (г, д, е) частях мозжечка молодежи *O. masou* в условиях нормы и после повреждения. Белые столбики – контроль, серые – повреждение ($n = 5$ в каждой группе, звездочкой обозначено $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса). ВЧМС – внешняя часть молекулярного слоя, ТМС – толщина молекулярного слоя, НЧМС – нижняя часть молекулярного слоя, ГС – гранулярный слой.

Наибольшее число BrdU-положительных клеток ($P < 0.05$) по сравнению с нормой было выявлено в гранулярном слое (рис. 2 г, д, е). У поверхности молекулярного слоя были обнаружены плотные кластеры интенсивно маркированных PCNA-положительных и BrdU-положительных клеток. Такие скопления мы идентифицировали, как нейрогенные

ниши. Нейроэпителиальные конститутивные ниши в головном мозге *D. rerio* имеют поверхностную локализацию (Than-Trong, Bally-Cuif, 2015). Результаты маркирования BrdU соответствуют данным, полученным при HuCD, виментин и нестин иммуномаркировании нейрогенных ниш и ДМЗ мозжечка.

Увеличение числа BrdU-позитивных и PCNA-позитивных клеток в дорсальной зоне после повреждения указывает на то, что в результате травмы происходит реактивация данной конститутивной зоны с интенсификацией генетических пролиферативных программ в НСК и последующей трансформацией в реактивные нейрогенные ниши (рис. 2, 3). В нейрогенных зонах начинается активная пролиферация и дифференциация новых клеток, они в большом количестве мигрируют радиально и тангенциально к месту нанесения травмы, восстанавливая повреждённую ткань. Наибольший вклад в процессы миграции вносят базальная и латеральная зоны (рис. 3).

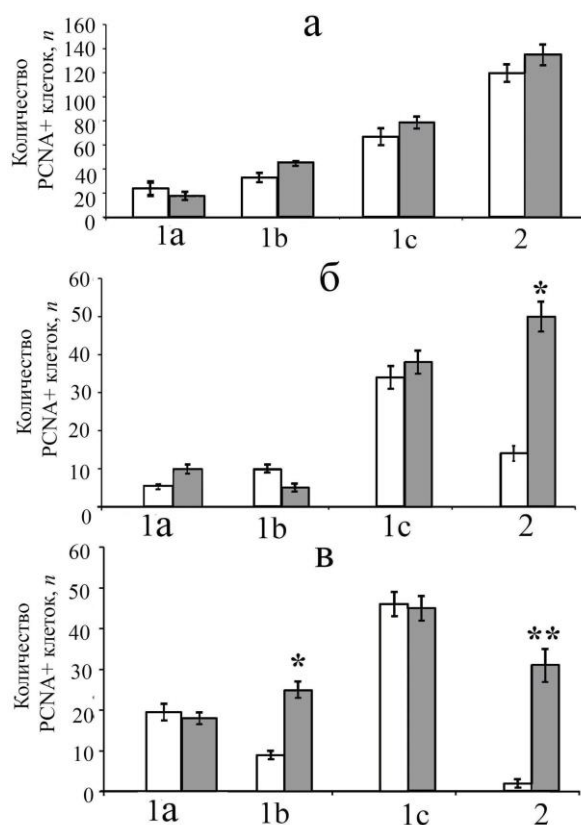


Рисунок 3. Распределение PCNA-позитивных клеток в мозжечке молоди симы *O. masou* в норме и после повреждения. а – дорсальная зона; б – латеральная зона; в – базальная зона. По оси x указан клеточный тип. Белые столбики – контроль, серые – повреждение ($n = 5$ в каждой группе, звёздочкой обозначено $P < 0.05$, двумя звёздочками – $P < 0.01$ – достоверные отличия от контрольных групп, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

В конечном мозге *D. rerio* наличие или отсутствие глиоза зависит от того, каким образом был повреждён мозг (März et al., 2011; Baumgart et al., 2012). Сильную реактивность глиальных клеток наблюдали после прямого повреждения мозга через череп (März et al., 2011, Kishimoto et al., 2012), но отсутствовала в мозге *D. rerio* после

повреждения головного мозга через ноздри (Kroehne et al., 2011; Baumgart et al., 2012). После повреждения конечного мозга молодёжи количество BrdU-позитивных клеток было схоже с таковым в интактном мозжечке (рис. 4). Но общее количество пролиферирующих клеток при прямом повреждении мозжечка выше, чем при травме конечного мозга ($P < 0.05$, рис. 4 а, в)

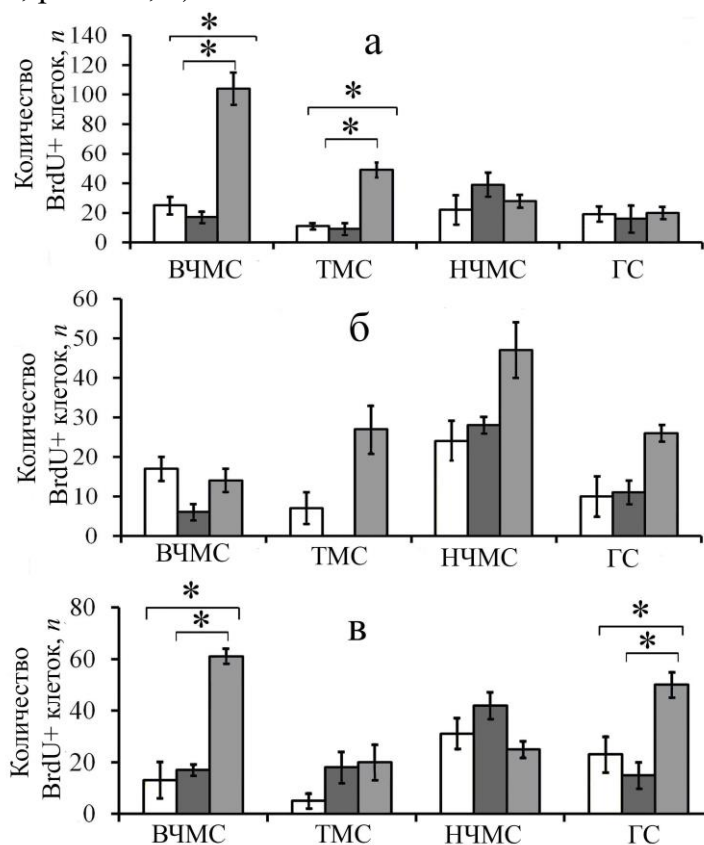


Рисунок 4. Соотношение BrdU-позитивных клеток в мозжечке *O. masou* в контроле (белые столбики), после повреждения конечного мозга (тёмно-серые столбики) и повреждения мозжечка (светло-серые столбики). ($n = 5$ в каждой группе, звёздочкой обозначено $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Кейлса). ВЧМС – внешняя часть молекулярного слоя; ТМС – толщина молекулярного слоя; НЧМС – нижняя часть молекулярного слоя, ГС – гранулярный слой.

Нестин-позитивные и виментин-позитивные клетки-предшественники в интактном и повреждённом мозжечке молодёжи симы *O. masou*. В работе было применено ИГХ маркирование нестина и виментина – белков промежуточных филаментов, входящих в состав цитоскелета НСК и НКП. Нестин экспрессируется НСК и НКП в субвентрикулярной зоне, в субгранулярной зоне гиппокампа и в нейрогенных нишах мозжечка. Виментин классически рассматривается в качестве универсального маркера астроцитарной глии в мозге позвоночных (Arochena et al., 2004). При маркировании нестина идентифицировали небольшие клетки округлой формы, без отростков, размером от 3.5 до 5 мкм. Виментин-маркирование выявило два типа клеток: округлые клетки 1а типа и округлые виментин-позитивные клетки 5 типа. В интактном

мозге наибольшее число виметин-позитивных клеток и нестин-позитивных НКП было выявлено в молекулярном слое (рис. 5).

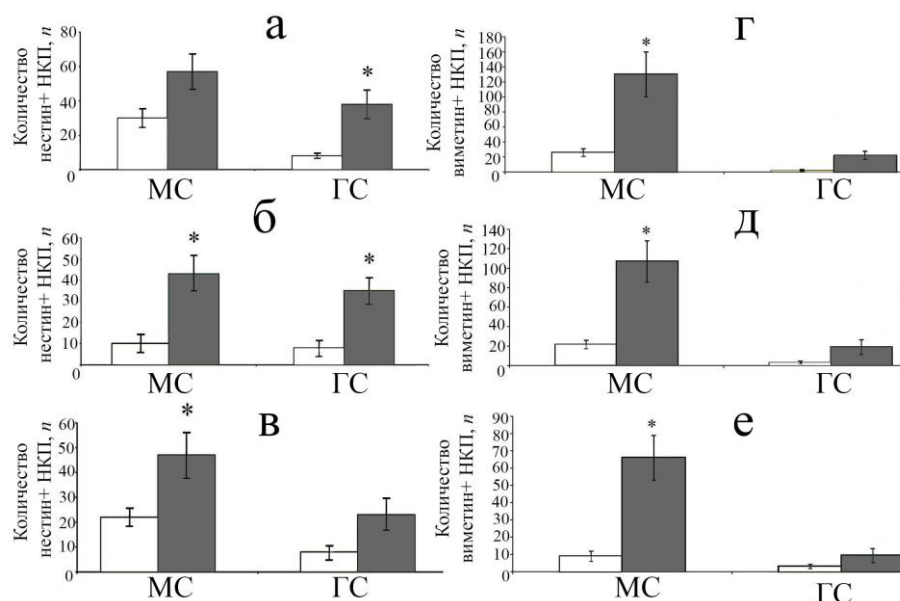


Рисунок 5. Распределение нестин-позитивных (а, б, в) и виментин-позитивных (г, д, е) клеток в мозжечке молодежи симы *O. tascio* в условиях нормы и после повреждения. а, г – дорсальная зона; б, д – латеральная зона; в, е – базальная зона. Белые столбики – контроль, серые – повреждение. МС – молекулярный слой, ГС – гранулярный слой. ($n = 5$ в каждой группе, звёздочкой обозначено $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

Выявленные скопления нестин-позитивных НКП в районе ДМЗ интактного мозжечка мы рассматриваем как конститутивные нейрогенные ниши, в состав которых входили виментин-позитивные клетки. За её пределами единичные нестин-позитивные и виментин-позитивные НКП располагались на значительном удалении друг от друга в молекулярном и гранулярном слоях, что свидетельствует об интенсивных процессах конститутивного нейрогенеза (рис. 5). Проллиферативная активность в этой зоне, по-видимому, поддерживается двумя процессами: митотической деятельностью резидентных НСК и продолжающейся пролиферативной активностью потомства этих клеток, которое мигрировало из ДМЗ или молекулярного слоя в гранулярный слой. На основании данных полученных на симе, а также *D. rerio* (Zupanc, 2006) и *A. leptorhynchus* (Sîrbulescu et al., 2015) мы предполагаем, что молекулярный слой функционирует как переходная зона при радиальной миграции НКП из нейрогенной ниши в ДМЗ в конечную область в гранулярном слое, где они дифференцируются в гранулярные клетки.

Через 2 сут после повреждения возрастало количество нестин-позитивных и виментин-позитивных НКП (рис. 5). После повреждения в ДМЗ отсутствовали скопления нестин-позитивных НКП, но при этом в 3 раза увеличивалось число равномерно распределенных на небольшом расстоянии друг от друга НКП. Вероятно, это связано с тем, что повреждение вызывает интенсификацию генетических

пролиферативных программ во взрослых НСК (Barbosa et al., 2015; Kroehne et al., 2011) и НКП, которые образуют новые нейроны, необходимые для регенерации (Kizil et al., 2015).

В процессе репаративного нейрогенеза происходит реактивация ДМЗ: перераспределяется интенсивность процессов пролиферации, клетки из этой зоны начинают мигрировать к области травмы и активируются покоящиеся НСК. В поверхностных нейрогенных нишах увеличивается число виментин-позитивных клеток, чья плотность распределения постепенно снижалась по мере удаления от ДМЗ. Мы предполагаем, что виментин входит в состав цитоскелета делящихся НКП (Chen et al., 2018) и популяции НСК, активизирующейся в результате травматического процесса. Наибольшая доля виментин-позитивных элементов в повреждённом мозжечке была представлена виментин-позитивными гранулами различного размера и плотности распределения, которые в большом количестве идентифицировались в молекулярном слое. Они входили как в состав цитоплазмы клеток, так и во внеклеточный матрикс. Поскольку молекулярный слой содержит покоящиеся НСК, небольшое число виментин-позитивных гранул может входить в состав их цитоскелета. У рыб отсутствуют типичные астроциты (Privat et al., 1995; Kalman, 1998) как у млекопитающих и мы предполагаем, что усиление экспрессии виментина при повреждении отражает интенсификацию пластических процессов в НКП, играя важную роль в защите от последствий травмы. Кримбел и его коллеги на мезенхимальных стволовых клетках млекопитающих установили, что мелкие клетки аналогичного размера обладают высоким пролиферативным потенциалом (Kimbrel et al., 2014). Клетки-предшественники, выделенные из зон пролиферации в мозжечке взрослого *A. leptorhynchus*, проявляют способность к самообновлению и мультипотентности, демонстрируя тем самым характеристики НСК (Hinsch, Zupanc, 2006). Мы предполагаем, что в мозжечке молоди симы нестин-позитивных и виментин-позитивных НКП являются конститутивными нейрональными и/или глиальными предшественниками, присутствующими в молекулярном слое. В мозге *A. leptorhynchus* и *D. rerio* виментин маркирует волокна РГ (Zupanc et al., 2012; Zupanc, Clint, 2003). На мальках и взрослых особях кефали было установлено, что с возрастом уровень виментина уменьшается, в то время как экспрессия GFAP увеличивается (Arochena et al., 2004). Это соответствует нашим данным, согласно которым в мозжечке молоди симы GFAP позитивность была более выражена по сравнению с экспрессией виментина. Мы предполагаем, что в отличие от других видов рыб, виментин-позитивные, нестин-позитивные НКП в матричных зонах мозжечка молоди симы симметрично делятся и образуют нейроны. Данное предположение подтверждается результатами маркирования нейронального протеина NuCD, когда в районе матричных зон интактного и повреждённого мозжечка было установлено наибольшее число NuCD-позитивных клеток и по мере удаления от этих зон концентрация клеток уменьшалась. Именно с симметричным делением и нейрогенезом мы связываем отсутствие отростков у виментин-позитивных клеток на территории мозжечка молоди симы. В отличие от молоди у взрослой особи форели в мозжечке были выявлены виментин-позитивные

волокна, что подтверждает наше предположение о том, что в ходе активного морфогенеза нестин-позитивные, виментин-позитивные НКП генерируют нейроны, но по мере роста симы переключаются на глиогенный режим путём ассиметричных делений. Далее эти вновь-созданные нейроны мигрируют вдоль увеличившихся в количестве GFAP-позитивных волокон РГ к месту повреждения.

После повреждения основной объём клеточной пролиферации приходится на область травмы. В отличие от интактного мозга новые нейроны мигрируют на большие расстояния для того, чтобы заселить поврежденные участки мозга (Barbosa et al., 2015; Kroehne et al., 2011). Они формируются из двух источников эндогенных НСК, расположенных рядом с зоной повреждения. Первый представляет собой пролиферативную зону, в которой находятся нейроны, образовавшиеся в ходе конститутивного нейрогенеза, уровень клеточной пролиферации в которой несколько увеличивается после повреждения. Второй источник – реактивные нейрогенные ниши, возникающие после травмы. На основании наших данных мы предполагаем, что НСК не могут активно участвовать в нейрогенезе в интактном мозге, но в случае травмы их пролиферативная активность значительно увеличивается. С этим явлением мы связываем многократное увеличение после нанесения повреждения количества нестин-позитивных и виментин-позитивных НКП в гранулярном слое, которые формировали обширные скопления (рис. 5).

Особенности глиогенеза и GFAP-негативных нейрональных стволовых клеток в интактном и поврежденном мозжечке молоди симы *O. masou*. В мозге млекопитающих GFAP является классическим маркёром астроцитов (Doetsch, Scharff, 2001). В настоящее время показано, что GFAP является одним из маркёров НСК (Ahmed et al., 2012). В развивающемся конечном мозге млекопитающих клетки РГ действуют как НСК, поскольку они являются источником всех нейронов и различных подтипов дифференцированных глиальных клеток либо напрямую, либо через другие типы НКП, впоследствии полученные из них (Harwell, 2017). В мозге костистых рыб типичные астроциты не выявляются (Kalman, 1998; Arochena et al., 2004), за исключением зрительного нерва (Koke et al., 2010), но присутствует ограниченная популяция клеток со слабовыраженными апикальными отростками, либо без отростков (Privat et al., 1995). Иммуноцитохимические исследования эпендимных клеток и РГ, присутствующей в большом количестве в мозге костистых рыб, показали наличие в них GFAP (Kalman, Ari, 2002) и виментина (Cerdea' et al., 1998). При маркировании GFAP и виментина типичная астроцитарная глия в мозжечке симы не была выявлена, но установлено большое количество GFAP-позитивных клеток РГ. Наши данные подтверждают результаты, полученные на *Austrolebias affinis*, *A. charrua* и *A. reicherti* (Fernandez et al., 2011) и *A. leptorhynchus* (Clint, Zupanc, 2001) о наличии GFAP-позитивных РГ в мозжечке костистых рыб. Наличие виментин-позитивных волокон у *A. leptorhynchus* (Zupanc et al., 2012) и GFAP-позитивных у молоди *O. masou* предполагает, что промежуточные филаменты могут участвовать в выживании и дифференциации новых клеток. Интенсивно иммуномаркированные GFAP клеток 1с типа, находящиеся на поздней стадии дифференциации, располагались в один ряд у внешней границы молекулярного

слоя непосредственно под слоем GFAP-негативных клеток нейроэпителлия. От их тел отходили длинные радиально ориентированные GFAP-позитивные отростки, которые формировали густую, равномерно распределённую сеть, которая ограничивала мелкие, округлые слабо маркированные клетки 1а типа, находящиеся на ранней стадии дифференциации. Вдоль GFAP-позитивных волокон РГ эти клетки мигрируют из поверхностного слоя в более глубокие. Таким образом, GFAP-позитивные клетки и волокна РГ являются как структурными, так и морфогенетическими компонентами в составе мозжечка молоди симы, отражая процессы конститутивного нейрогенеза.

После нанесения травмы количество GFAP-позитивных клеток и волокон значительно увеличивалось (рис. 6). Как мы предполагаем, это связано с процессами реактивного глиоза и появлением активированных астроцитоподобных клеток. В молекулярном слое повреждённого мозжечка были выявлены мелкие локальные плотные скопления GFAP-негативных клеток. Такие клеточные конгломераты мы рассматриваем, как реактивные нейрогенные ниши, возникающие в ответ на повреждающее воздействие, содержащие PCNA-позитивные, нестин-позитивные, BrdU-позитивные, виментин-позитивные клетки, а также гетерогенную популяцию GFAP-негативных клеток, не содержащую маркёры пролиферации. В районе нейрогенных ниш выявлялись волокна РГ и единично расположенные мелкие, интенсивно и умеренно маркированные клетки, фенотипически соответствующие НСК, описанным в мозжечке других костистых рыб (Hinsch, Zupanc, 2006; Kaslin et al., 2013; Sîrbulescu et al., 2015). После повреждения мозжечка молоди симы нами не было выявлено формирования глиального рубца. Согласно данным, полученным после повреждения конечного мозга взрослого *D. rerio*, глиальный рубец также не образуется (Baumgart et al., 2011). Было предположено, что в мозге *Carassius auratus* GFAP-позитивные отростки с большей вероятностью восстанавливают аксоны, чем образуют какой-либо глиальный рубец (Takeda et al., 2015). Возрастание количества GFAP-позитивных клеток и волокон, увеличение длины GFAP-позитивных волокон и отсутствие глиального рубца после повреждения мозжечка молоди симы подтверждают это предположение.

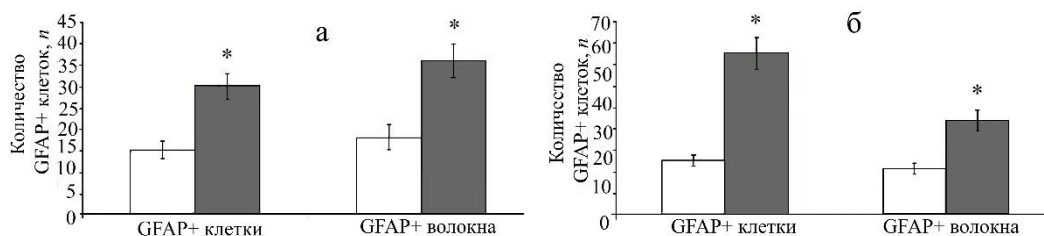


Рисунок 6. Соотношение GFAP-позитивных клеток и волокон в мозжечке молоди симы *O. masou* в условиях нормы и после повреждения. а – дорсальная зона, б – базальная зона. Белые столбики – контроль, серые – повреждение ($n = 5$ в каждой группе, звёздочкой обозначено $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

После травмы в ДМЗ осуществляется структурная перестройка, связанная с двукратным увеличением дополнительных GFAP-позитивных волокон, формирующих разнонаправлено ориентированные пучки. Подобные структурные образования нами не были выявлены у интактных животных. Данные эффекты мы связываем как с интенсификацией пространственной переориентации волокон РГ, так и с формированием специфических направляющих для клеток, образованных в ДМЗ. Результаты наших наблюдений позволяют предполагать, что выявленные структурные изменения имеют непосредственное отношение к процессам репаративного нейрогенеза. Наличие GFAP-позитивных волокон у молодежи симы предполагает, что промежуточные филаменты могут участвовать в выживании и дифференциации новых клеток.

В наших исследованиях на молодежи симы подавляющее большинство клеток ДМЗ были позитивны для нестина, PCNA, BrdU и были негативны для таких маркёров, как GFAP и виментин. Мы предполагаем, что ДМЗ мозжечка симы состоит из гетерогенной популяции НСК и НКП, большая часть которых имеет нейроэпителиальный фенотип, как у *D. rerio* (но не глиальный фенотип, как клетки в ДМЗ *A. leptorhynchus*). В ДМЗ мозжечка молодежи симы было выявлено ограниченное количество интенсивно маркированных GFAP-позитивных клеток. Учитывая тот факт, что значительная часть клеток ДМЗ нестин-позитивна, BrdU-позитивна, PCNA-позитивна мы предполагаем, что идентифицированные немногочисленные GFAP-позитивные клетки относятся к НСК. Такое предположение основано на сочетании морфологических и топографических свойств НСК, их взаимосвязи с нейрогенными зонами и взаимоотношениях с волокнами РГ.

Ранняя нейрональная дифференциация в интактном и поврежденном мозжечке молодежи симы *O. masou*. В дорсальной зоне после травмы увеличивалось количество NuCD-позитивных клеток (рис. 7).

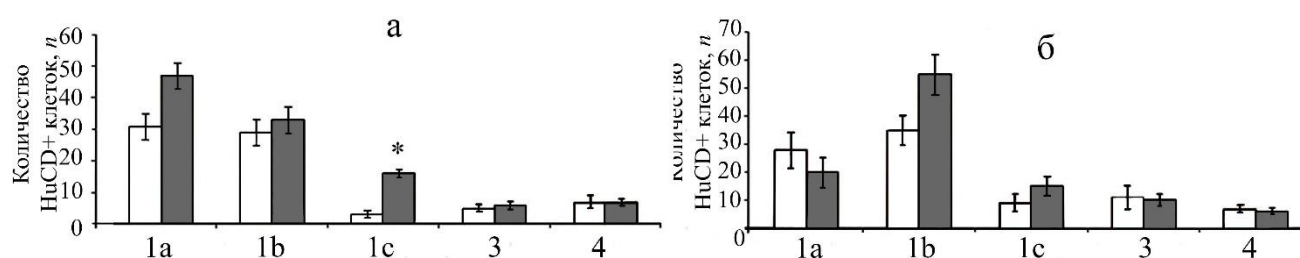


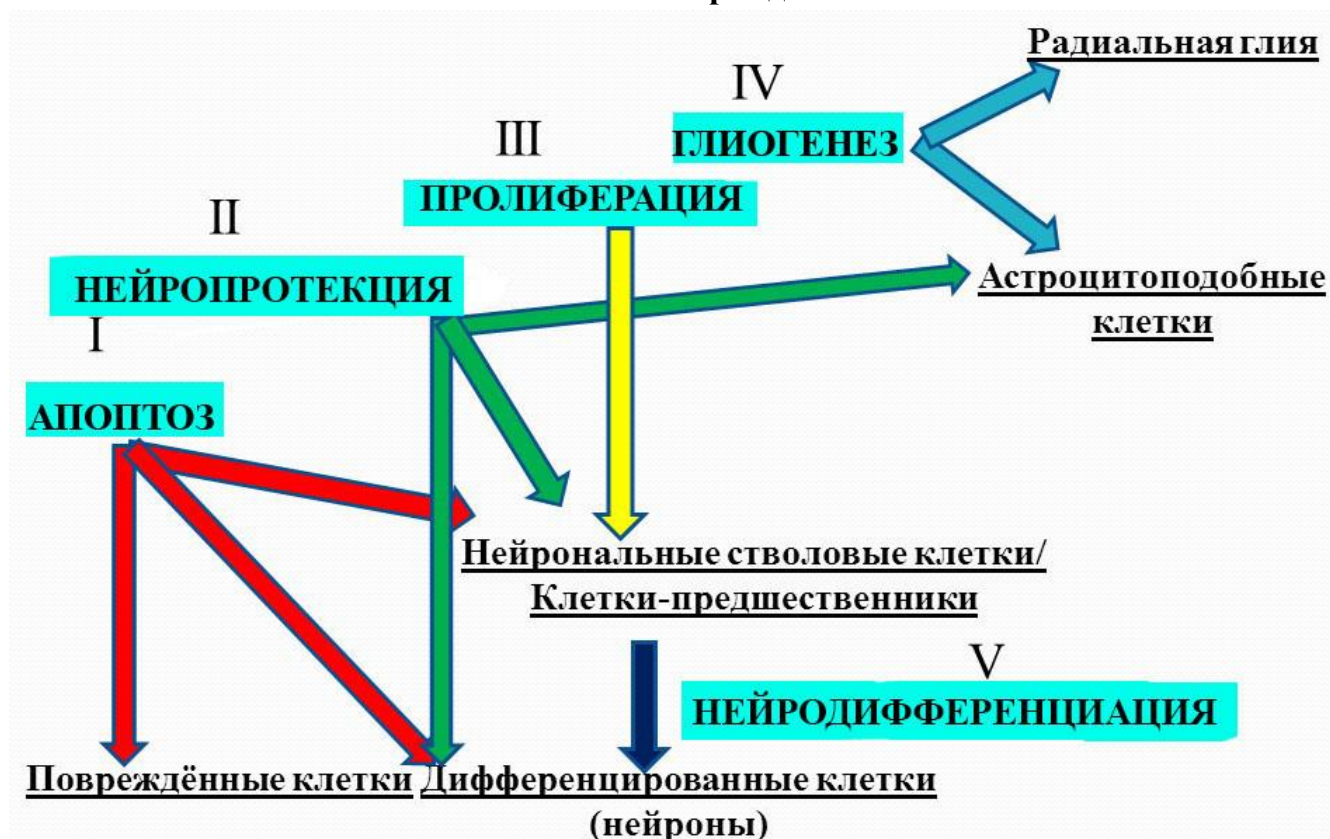
Рисунок 7. Соотношение NuCD-позитивных клеток в дорсальной (а) и базальной (б) зонах мозжечка молодежи симы *O. masou* в условиях нормы и после повреждения. Белые столбики – контроль, серые – повреждение ($n = 5$ в каждой группе, звёздочкой обозначено $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса). По оси x указан клеточный тип.

В базальной зоне наряду с небольшими недифференцированными NuCD-негативными клетками число дифференцированных NuCD-позитивных клеток с

отростками и ганглиозных клеток (клетки Пуркинье 3 типа и ЭДК 4 типа) также увеличивалось. Согласно данным Каслина у молодежи *D. rerio* в возрасте до 1 месяца клетки Пуркинье способны восстанавливаться после нанесения механической травмы. У взрослого *D. rerio* способность к регенерации интернейронов или клеток Пуркинье и ЭДК очень низка или вовсе отсутствует после травмы (Kaslin et al., 2017). Мы предполагаем, что в мозжечке молодежи симы в ходе репаративного нейрогенеза способность к восстановлению таких клеток выше, чем у *D. rerio*.

В интактном мозжечке молодежи симы округлые клетки 1 типа образовывали конститутивные нейроэпителиальные нейрогенные ниши. После травмы NuCD-позитивные клетки были обнаружены в реактивных нейрогенных доменах, содержащих гетерогенные клеточные популяции всех типов, включая крупные, интенсивно маркированные, удлиненные клетки. Рядом с данными нишами были выявлены слабо маркированные NuCD-позитивных клеток, которые находились в состоянии радиальной миграции. Таким образом, возможно, что повреждение мозжечка не только усиливает нейрогенез в реактивных нейрогенных нишах, но может ускорять и нейрональную дифференциацию клеток, которые интегрируются в зрелые нейронные сети. В мозжечке молодежи симы большая часть BrdU-позитивных, PCNA-позитивных, нестин-позитивных, виментин-позитивных клеток выходили из зон пролиферации и дифференцировались в NuCD-позитивные нейроны, доказывая, что зоны пролиферации производят, в основном, нейроны.

Этапы репаративного нейрогенеза в мозжечке молодежи симы *O. masou* после нанесения повреждения



Проведенные нами исследования позволяют заключить, что после нанесения травмы к процессам конститутивного нейрогенеза добавляются процессы репаративного: для нейтрализации эффектов нейровоспаления поврежденные клетки элиминировались путем апоптоза, начиналась активная пролиферация, миграция и ускоренная дифференциация новых клеток, которые мигрировали к месту повреждения, восстанавливая ткань.

ВЫВОДЫ

1. Поверхностные участки молекулярного слоя и ДМЗ – области мозжечка молодил симы, в которых преобладают процессы конститутивного нейрогенеза - имеют также высокую интенсивность апоптоза. Связь между высоким уровнем пролиферации и апоптоза детерминирована тем, что часть вновь образованных клеток элиминируются уже на стадии их присутствия в пределах матричных зон и в ходе дальнейшей миграции. Участие процессов апоптоза необходимо для утилизации большого количества поврежденных вследствие травмы клеток и для нейтрализации возрастающей глутаматной эксайтотоксичности.

2. Глутаминсинтетаза и H_2S в мозжечке симы обладают нейропротекторными свойствами, способствуя нейтрализации глутамата и снижая интенсивность процессов апоптоза в ходе конститутивного и репаративного нейрогенеза и защищая нейроны от окислительного стресса. Проллиферативная активность клеток-предшественников в мозжечке симы регулируется при участии H_2S . Реактивные ГС-позитивные астроциты, осуществляющие детоксикацию глутамата, способствуют снижению нейротоксических эффектов после травмы в ходе репаративного периода.

3. После травматического воздействия на мозжечок происходит реактивация конститутивных матричных зон с последующей трансформацией в реактивные нейрогенные ниши. Их возникновение связано с интенсификацией генетических пролиферативных программ в резидентных нейрональных стволовых клетках, сопровождающейся структурной перестройкой, связанной с двукратным увеличением количества маркированных волокон радиальной глии и формированием специфических направляющих для клеток, образованных в матричных зонах.

4. Нейрональные стволовые клетки в мозжечке молодил симы имеют нейроэпителиальный фенотип, поскольку большая часть клеток дорсальной матричной зоны позитивна для маркёров стволовых клеток и не содержит маркёры радиальной глии.

5. Прямое повреждение мозжечка сопровождается значительным усилением пролиферативной активности в церебеллярных нейрогенных зонах. Повреждение конечного мозга вызывает менее выраженный пролиферативный ответ в мозжечке, показывая тем самым, что у молодил симы существуют некоторые ограничения в способности мозга к регенерации.

6. Травматическое воздействие на мозжечок усиливает процессы образования нейронов в реактивных церебеллярных нейрогенных нишах и ускоряет нейрональную дифференциацию клеток, которые впоследствии интегрируются в зрелые нейронные сети мозжечка.

Публикации по теме диссертации

Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. **Stukaneva M.E.**, Puschina E.V. Processes of proliferation and apoptosis in the cerebellum of the parr (*Oncorhynchus masou*) after mechanical injury // *Neurophysiology*. 2015. V. 47, № 5. P. 376–385.

2. **Стуканёва М.Е.**, Пущина Е.В., Вараксин А.А. GFAP и PCNA маркирование в мозжечке молоди симы *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) при механической травме // *Онтогенез*. 2017. Т. 48, № 5. С. 375–385.

Работы в материалах конференций и в других изданиях:

3. Pushchina E.V., **Stukaneva M.E.**, Varaksin A.A. Damage-related changes in the cerebellum of juvenile *Oncorhynchus masou*: reactivation of neurogenic niches and astrocytic response // *Journal of Royal Science*. 2019. Vol. 1, № 2. P. 36–54.

4. Обухов Д.К., Пущина Е.В., Вараксин А.А., **Стуканёва М.Е.**, Цехмистренко Т.А. Особенности нейрогенеза в ЦНС позвоночных животных и человека: от теории к эксперименту // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2019. № 1. С. 130–134.

5. Pushchina E.V., **Stukaneva M.E.**, Varaksin A.A. Neural stem cells in the cerebellum of masu salmon *Oncorhynchus masou* juvenile after mechanical injury // *Teleosts: physiology, evolution and classification* / Ed. Herleif M. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2018. P. 73–95.

6. Обухов Д.К., Пущина Е.В., Вараксин А.А., **Стуканёва М.Е.** Современные представления о механизмах регуляции процессов пре- и постэмбрионального нейрогенеза в ЦНС позвоночных животных и человека // *Вопросы морфологии XXI века. Вып. 5: Гистогенез, реактивность и регенерация тканей* / Под ред. Одинцовой И.А. и Костюкевича С.В. СПб.: Изд-во ДЕАН, 2018. С. 68–81.

7. **Стуканёва М.Е.**, Соколов А.В., Пущина Е.В. Пролиферативная активность в области дорсальной матричной зоны мозжечка молоди симы *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) при механической травме // *Единство науки, образования и практики медицине будущего. Посвящается 110-летию со дня рождения академика АМН СССР, профессора Д.А. Жданова и 260-летию Первого МГМУ имени И.М. Сеченова: сб. статей*. М.: Изд-во Первого МГМУ имени И.М. Сеченова, 2018. С. 225–228.

8. **Стуканёва М.Е.**, Пущина Е.В. Реактивация нейрогенных ниш в мозжечке молоди симы *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) в норме и после механического повреждения // *Асимметрия*. 2018. Т. 12, № 4. С. 489–493.

9. **Стуканёва М.Е.**, Пущина Е.В., Соколов А.В. Нейрональная регенерация в мозжечке молоди симы *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) при механической травме // *Гены и клетки*. Т. 12, № 3. 2017. С. 235–236.

10. 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. Mauricio A.C. Rijeka: Intech, 2017. P. 175–195.

11. **Стуканёва М.Е.**, Пущина Е.В., Вараксин А.А. Нейрональная регенерация при механическом повреждении мозжечка молоди симы *Oncorhynchus masou* // Современные проблемы эволюционной морфологии животных: Материалы школы для молодых специалистов и студентов к 110-летию рождения академика А.В. Иванова (Санкт-Петербург, 29 сентября – 1 октября 2016 г.). СПб: ЗИН РАН, 2016. С. 66–67.

12. **Stukaneva M.E.**, Pushchina E.V., Varaksin A.A., Shukla S. Monitoring of cell migration and apoptosis in cerebellum of juvenile masu salmon *Oncorhynchus masou* after injury // American Journal of BioScience. 2015. Vol. 3, № 2–3. P. 19–27.

13. Пущина Е.В., Вараксин А.А., Shukla S., Обухов Д.К., **Стуканёва М.Е.**, Булыгин Д.А. Молекулярные и нейрохимические аспекты в развитии клеточного ответа при репаративной нейрогенезе ЦНС лососевых рыб // Нейронаука для медицины и психологии: X Международный междисциплинарный конгресс, Судак, Крым, Россия, 2–12 июня 2014 г. М.: МАКС Пресс, 2014. С. 274–275.

14. Пущина Е.В., Обухов Д.К., **Стуканёва М.Е.**, Вараксин А.А., Shukla S. Новые модели в исследовании механизмов репаративного нейрогенеза и пластичности мозга // Материалы Международной конференции «Фундаментальные науки медицине». Минск, 17 мая 2013 г. Минск: РИВШ, 2013. С. 178–182.

Стуканёва Мария Евгеньевна

Конститутивный и репаративный нейрогенез в мозжечке молоди симы
Oncorhynchus masou

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук