

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

На правах рукописи

СТУКАНЁВА МАРИЯ ЕВГЕНЬЕВНА

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

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

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

Владивосток – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.1. Актуальность исследования конститутивного нейрогенеза в различных группах позвоночных.....	16
1.2. Радиальная глия в мозге взрослых позвоночных	21
1.2.1. Общие сведения.....	21
1.2.2. Участие глиальных клеток.....	24
1.2.3. Реакция глиальных клеток после повреждения головного мозга.....	26
1.3. Исследование процессов восстановления нервной ткани после травмы	29
1.4. Современные представления о роли апоптоза в нервной системе	31
1.5. Процессы нейровоспаления в мозге.....	33
1.6. Регуляторы конститутивного нейрогенеза.....	35
1.6.1. Онтогенетические и поведенческие факторы, регулирующие нейрогенез .	35
1.6.2. Другие факторы, влияющие на нейрогенез	37
1.6.3. Влияние размера мозга	43
1.7. Маркёры нейрогенеза	45
1.7.1. Маркёры клеточной пролиферации и стволовых клеток.....	45
1.7.2. Молекулярная идентификация белков, связанных с регенерацией.....	49
1.7.3. Выявление пролиферирующих клеток <i>in vivo</i>	50
1.7.4. Иммунокрашивание молекулярными маркёрами апоптоза	52
1.7.5. Специфические маркёры нейрональной дифференциации.....	54
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	55
2.1. Объекты исследования	55
2.2. Экспериментальное повреждение мозжечка.....	56
2.3. Методы исследования	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	64
3.1. Морфологическая структура мозжечка молодежи симы <i>O. masou</i>	64
3.2. TUNEL-маркированные структуры в мозжечке молодежи симы <i>O. masou</i> в норме и после повреждения	68
3.3. Радиальная глия в интактном мозжечке молодежи симы <i>O. masou</i>	72
3.3.1. Выявление комплексов астроцитоподобных клеток в мозжечке молодежи симы <i>O. masou</i> в норме и после повреждения	75
3.3.2. Инфраганглионарное сплетение в повреждённом мозжечке молодежи симы <i>O. masou</i>	76

3.4. Локализация сероводородпродуцирующей системы в мозжечке молодежи сими <i>O. masou</i> в норме и после повреждения	77
3.5. Экспериментальное маркирование BrdU в интактном мозжечке, в мозжечке <i>O. masou</i> при прямом повреждении и травме конечного мозга	82
3.5.1. BrdU-позитивные клетки в ростральной части интактного мозжечка молодежи сими <i>O. masou</i>	83
3.5.2. BrdU-позитивные клетки в каудальной части интактного мозжечка молодежи сими <i>O. masou</i>	88
3.5.3. BrdU-позитивные клетки в мозжечке молодежи сими <i>O. masou</i> после повреждения.....	89
3.5.4. BrdU-позитивные клетки в мозжечке молодежи сими <i>O. masou</i> после повреждения конечного мозга.....	93
3.5.5. Распределение BrdU-позитивных клеток в области гранулярных эминенций у молодежи сими <i>O. masou</i>	95
3.6. Проллиферативный ядерный антиген клетки в мозжечке молодежи сими <i>O. masou</i> в норме и после повреждения	96
3.7. Маркирование нейрональных предшественников с помощью нестина в мозжечке молодежи сими <i>O. masou</i> в норме и после повреждения	99
3.8. Виментин, как маркер нейрональной пластичности в мозжечке молодежи сими <i>O. masou</i> в норме и после повреждения	103
3.9. GFAP-маркирование глиогенеза и нейрональных стволовых клеток в мозжечке молодежи сими <i>O. masou</i> в норме и после повреждения	108
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	117
4.1. Сима <i>Oncorhynchus masou</i>	117
4.2. Физиологическая гибель клеток в мозжечке молодежи сими <i>O. masou</i> после механического повреждения	118
4.3. Глутаминсинтетаза – маркер радиальной глии и фактор нейропротекции в интактном и повреждённом мозжечке молодежи <i>O. masou</i>	122
4.4. Участие сероводорода в модуляции процессов пролиферации и апоптоза в интактном и повреждённом мозжечке молодежи сими <i>O. masou</i>	127
4.5. Проллиферация в интактном и повреждённом мозжечке молодежи сими <i>O. masou</i> при маркировании PCNA и BrdU	133
PCNA в интактном и повреждённом мозжечке молодежи сими <i>O. masou</i>	138
4.6. Нестин-позитивные клетки-предшественники в интактном и повреждённом мозжечке молодежи сими <i>O. masou</i>	141
4.7. Виментин-иммунопозитивность и изменения пластического синтеза в интактном и повреждённом мозжечке молодежи сими <i>O. masou</i>	148

4.8. Особенности глиогенеза и GFAP-негативных нейрональных стволовых клеток в интактном и повреждённом мозжечке молодежи симы <i>O. masou</i>	152
4.9. Терминальная дифференциация и ранняя нейрональная дифференциация в интактном и повреждённом мозжечке молодежи симы <i>O. masou</i>	156
ВЫВОДЫ.....	159
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	161

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- Aro-B – ароматаза B;
- BDNF – нейротрофический фактор мозга;
- BLBP – липополисахарид-связывающий белок;
- BrdU – 2'-дезоксидезокси-5-бромдезоксидезоксиуридин;
- CBS – цистатион β-синтаза;
- CNTF – цилиарный нейротрофический фактор;
- dUTP – дезоксиуридинтрифосфат;
- EGF – эпидермальный фактор роста;
- FGF – фактор роста фибробластов;
- GABA – гамма-аминомасляная кислота;
- GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок;
- GFP – зелёный флюоресцентный белок;
- GLAST – транспортер глутамата;
- HuCD – нейронспецифичный маркер;
- IdU – 5-йододезоксиуридин;
- IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста;
- NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат-диафараза;
- NAMDA – ионотропный рецептор глутамата;
- NGF – фактор роста нервов;
- PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток;
- TdT – диоксинуклеотид трансфераза;
- TUNEL – терминальное дезоксиуридиновое мечение концов ДНК;
- UBC – униполярные кисточковые нейроны;
- VEGF – фактор роста эндотелия сосудов;
- Vim – виментин;
- ВЧМС – внешняя часть молекулярного слоя;
- ВНСК – взрослые нейрональные стволовые клетки;
- ГАМК – гамма-аминомасляная кислота;
- ГС – глутаминсинтетаза;
- ГЭ – гранулярные эминенции;
- ДМЗ – дорсальная матричная зона;

ЕОП – единицы оптической плотности;
ИА – индекс апоптоза;
ИГХ – иммуногистохимическое маркирование;
НКП – нейрональные клетки-предшественники;
НСК – нейрональные стволовые клетки;
НЧМС – нижняя часть молекулярного слоя;
РГ – радиальная глия;
РМП – ростральный миграционный поток;
СВЗ – субветрикулярная зона;
СК – стволовые клетки;
ТМС – толщина молекулярного слоя;
ЧМТ – черепно-мозговая травма;
ЭДК – эвридендроидные клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Рыбы относятся к наиболее многочисленному классу позвоночных животных, численность которых составляет более 30000 тысяч видов. Они являются удобным модельным объектом для исследований нейрогенетических процессов, поскольку в период их постэмбрионального развития формирование мозга, рост и дифференциация интегративных центров активно продолжаются (Zupan, 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). Изучение процессов конститутивного нейрогенеза у молоди симы также интересно её особенностью – она является видом-эндемиком. Конститутивный нейрогенез – древняя черта гнатостомных позвоночных, которые существовали до расхождения хрящевых рыб (акул и скатов) и костистых рыб, включая тетрапод. 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). При сравнении тетрапод пришли к выводу, что конститутивный нейрогенез в течение жизни становится все более и более пространственно и временно ограничен при эволюционировании анамний до амниот (Grandel, Brand, 2013).

Конститутивный нейрогенез у млекопитающих хорошо исследован в обонятельной луковице и зубчатой извилине гиппокампа (Kempermann, 2008). Одним из перспективных подходов для концептуализации знаний о НСК является исследование способных к восстановлению нервной ткани организмов, среди которых наиболее изученными являются костистые рыбы (Stocum, 2006). В последние годы рыбы стали широко использоваться в качестве модельных организмов при изучении эволюционной биологии (Kocher, 2004), взаимодействий иммунной системы и стресса (Shimon-Norphy, Avtalion, 2017), болезней человека (Oosterhof et al., 2015).

Среди всех позвоночных наиболее интенсивный и широко распространенный нейрогенный потенциал во многих областях взрослого мозга демонстрируют костистые

рыбы (Olivera-Pasilio et al., 2017). Особенно это касается филогенетически древних групп, к которым относятся лососевые рыбы (Salmonidae) и для которых характерна высокая концентрация недифференцированных элементов как в матричных зонах мозга, так и в паренхиме (Puschina et al., 2016). Также одной из наиболее ярких особенностей нейрогенеза костистых рыб является эмбриональная эверсия конечного мозга, не встречающаяся больше ни в одной группе филогенетического дерева (Андреева, Обухов, 1999). Их эволюция осуществлялась путем фетализации, для которой характерно замедление 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. Мало изучены процессы конститутивного нейрогенеза на ранней стадии симы. Создание травматической модели мозжечка в кратковременном периоде позволяет изучить динамику конститутивного и репаративного нейрогенеза.

Феноменологические проявления нейрогенеза у взрослых рыб схожи с таковыми в эмбриональном мозге птиц и млекопитающих (Levine et al., 1994). Нейрогенез в конечном мозге взрослого *Danio rerio* демонстрирует черты сходные с нейрогенезом в мозге млекопитающих: транскрипционные факторы (Adolf et al., 2006), дорсо-вентральное паттернирование (Ganz et al., 2014), типы клеток-предшественников (Grandel, Brand, 2013) и поддержание НСК (Calzolari et al., 2015). У костистых рыб образованные нейроны остаются непосредственно под пролиферативной зоной конечного мозга, обеспечивая его непрерывный рост и, таким образом, напоминая нейрогенез в гиппокампе млекопитающих (Grandel et al., 2006). По этим причинам костистые рыбы являются удобным модельным объектом для изучения конститутивного нейрогенеза, влияния на эти процессы различных факторов. Схожие черты конститутивного нейрогенеза у высших и низших позвоночных позволяют задать вопрос насколько гомологичен этот процесс? Или же, наоборот, существуют значительные отличия в создании новых нейронов и функциях, которые они в дальнейшем выполняют? Является ли это следствием различий внутренних свойствах НСК, нейрогенных ниш? Ведь нейрогенные зоны у млекопитающих, такие как СГЗ и СВЗ, появляются в эволюции значительно позже. Нейрогенные ниши паллиума и субпаллиума костистых рыб были идентифицированы, как гомологи СГЗ и СВЗ

млекопитающих (Adolf et al., 2006; Mueller, Wullmann, 2009). В связи с этим важно определить степень отличия пулов НСК различных отрядов позвоночных и механизмов, которые регулируют их активность. Возможно, это может стать эффективным механизмом активации «покоящихся» НСК. Понимание механизмов базовых процессов, лежащих в основе управления нейрогенезом, как развиваются или утрачиваются в ходе эволюции области, содержащие НСК, позволит понять потенциальные возможности активации НСК в не нейрогенных областях мозга человека.

Несмотря на технические возможности, множество проводимых экспериментов и большой интерес к проблеме нейрогенеза, мы только начинаем понимать сложнейшие процессы, происходящие в ЦНС на клеточном и молекулярном уровне. Необходимо учитывать тот факт, что клеточная организация человека радикально отличается от архитектуры мозга других млекопитающих, в том числе не человекообразных приматов (Kornack, Rakic 2001b). И хотя многие факторы, влияющие на создание новых клеток, можно предсказать, механизм их воздействия требуют изучения. Решение этих проблем крайне важно как при поиске новых нейропротекторных и терапевтических воздействий, так и для нахождения эффективных способов регуляции нейрогенеза. Сейчас стало очевидным, что мозг гораздо менее пассивен в ответ на повреждение и мы находимся только в начале понимания пластичности здорового мозга (Kempermann, 2008). Изучение динамики констиитивного и репаративного нейрогенеза на мозжечке молодых симы дает возможность понять фундаментальные механизмы развития НСК. Мозжечок является общепринятой зоной мозга для исследования морфогенетических процессов, поскольку имеет повышенную пролиферативную активность как в условиях нормы, так и при травматическом воздействии (Zupanc, Sîrbulescu, 2013). Среди пойкилотермных позвоночных только у взрослых костистых рыб мозжечок сохраняет эмбриональные свойства (Margotta et al., 2004).

Степень разработанности темы. Процессы репаративного нейрогенеза в настоящее время интенсивно исследуются. Объем знаний, накопившийся за последние десятилетия, показал более ясное направление дальнейших исследований: если нейрогенез изначально присутствует во взрослом мозге на базовом уровне, то можно попытаться усилить его и тем самым восполнить недостаток нейронов, вызванный нейродегенеративными заболеваниями, травмой, старением и т.д. Интерес к изучению

процессов, способствующих восстановлению головного мозга, нашел свое отражение в исследованиях российских и зарубежных авторов.

Центральная задача изучения конститутивного нейрогенеза заключается в исследовании клеточного состава нейрогенных ниш и понимании того, как их клетки образуют новые нейроны. В настоящее время известно, что клеточный состав, организация нейрогенных ниш различается в регионах мозга и между видами. Большое количество работ, посвященных изучению конститутивного нейрогенеза, позволяет составить представление об особенностях конститутивного и репаративного нейрогенеза характерных для хорошо изученных видов рыб. Распределение пролиферативных центров в мозге костистых рыб поражает высоким сходством, несмотря на существенные различия в экологической специализации и филогенетической удаленности исследованных видов (Пущина, Обухов, 2011). На начало работы по теме диссертации было опубликовано только несколько исследований, проведенных на молоди симы *O. masou*. Объект исследования был выбран исходя из того, что молодь симы 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. До сих пор неизвестно, какие факторы контролируют пролиферацию клеток-предшественников, их миграцию и как они могут восстанавливать нервную ткань. По имеющимся на сегодня данным существуют противоречивые мнения о судьбе нейрональных стволовых клеток НСК и нейрональных клеток-предшественников (НКП) у различных видов рыб, и дальнейшее использование молекулярных маркёров для верификации НСК и НКП в мозжечке молоди симы даст более чёткий ответ на этот вопрос.

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 и CBS на конститутивный и репаративный нейрогенез. Охарактеризовать участие H_2S в процессах апоптоза и

в регуляции пролиферативной активности клеток-предшественников. Проанализировать пролиферативную активность в матричных зонах интактного мозжечка молодежи симы и установить изменения, происходящие после нанесения повреждения.

3. Установить фенотип НСК в мозжечке молодежи симы.
4. Выявить различия в интенсивности пролиферативной активности в мозжечке молодежи симы при разных видах травмы: при прямом повреждении мозжечка и при травме конечного мозга.
5. 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 *Oncorhynchus masou*. Дан подробный анализ процессов апоптоза, нейропротекции, пролиферации, миграции, нейродифференциации, участия глии и НСК в конститутивном и репаративном нейрогенезе в мозжечке молодежи симы *O. masou*. Показано, что глутаминсинтетаза и H_2S обладают нейропротекторными свойствами, нейтрализуя глутамат и снижая интенсивность процессов апоптоза в ходе конститутивного и репаративного нейрогенеза и защищая нейроны от окислительного стресса. Показано, что пролиферативная активность клеток-предшественников в мозжечке симы регулируется при участии H_2S . Впервые было установлено, что ДМЗ мозжечка симы состоит из гетерогенной популяции НСК, большая часть которых имеет нейроэпителиальный, а не глиальный фенотип. Обнаружено, что процессы репаративного нейрогенеза у молодежи лососевых реализуются в более ранние сроки по сравнению с теми, что обычно упоминаются в литературе (Zupanc, 2006; Zupanc, Sîrbulescu, 2013). Впервые проведено сравнение пролиферативной активности в мозжечке молодежи 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. Проведенная 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 – PCNA и BrdU; глиогенеза и выявления радиальной глии – GFAP и ГС; нейродифференциации – NuCD, фермент CBS применяли для выявления сероводорода.

Анализ распределения маркёра астроцитарной глии и белка промежуточных филаментов – виментина осуществляли с использованием молекулярного маркёра 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 маркёра 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

(Zupanc, Sîrbulescu, 2013), нейрогенные и нейрональной дифференциации (Zupanc, Ott, 1999). Для различных маркёров сроки наступления подобных изменений отличаются (Clint, Zupanc, 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.

Личный вклад автора. Диссертационная работа является результатом исследований автора, выполненных согласно планам исследовательских работ лаборатории клеточной дифференциации ННЦМБ ДВО РАН и программе фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» (проект № 15-I-6-010) и гранта Президента РФ (МД 4318.2015.4). Экспериментальная часть ИГХ исследований и обработка полученных данных были выполнены автором в полном объёме. Программа для измерения оптической плотности была освоена в рамках исследования. Автор принимал участие в представлении результатов исследования на конференциях, в анализе и интерпретации полученных результатов и в подготовке материалов для написания научных публикаций.

Основные 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 H_2S 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 модели 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 ННЦМБ ДВО РАН. Благодарю Анатолия Алексеевича Вараксина за помощь в сборе материала, освоении новых методик и обсуждения результатов. Особую благодарность выражаю к.б.н., ст.н.с. Игорю Викторовичу Манжуло за ознакомление с текстом рукописи, рекомендации и справедливые замечания. Хочу поблагодарить профессора, д.б.н. Дмитрия Константиновича Обухова за совместные работы и поддержку. Выражаю искреннюю благодарность коллективу лаборатории клеточной дифференциации ННЦМБ ДВО РАН за постоянную помощь и обсуждение полученных результатов, признательность инженерам центра коллективного пользования ННЦМБ ДВО РАН Денису Владимировичу Фомину и Кириллу Александровичу Шефер. Глубокую признательность выражаю своим родным и близким за всестороннюю и неоценимую поддержку.

Финансовая поддержка работы. 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).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Актуальность исследования конститутивного нейрогенеза в различных группах позвоночных

Конститутивный нейрогенез является одним из механизмов пластичности мозга, увеличивая количество нейронов, осуществляя структурную перестройку нейрональных сетей, образуя новые синапсы и изменяя механизмы синаптической передачи (Lledo, 2006). Центральной задачей изучения нейрогенеза является описание клеточного состава нейрогенных ниш и понимание того, как они образуют новые нейроны и какие условия необходимы для их функционирования. Клеточный состав и активность нейрогенных ниш могут отличаться у разных видов животных, иметь топографические отличия в различных областях мозга (Lindsey et al., 2014). Характерной чертой конститутивного нейрогенеза является наличие активно делящегося пула НСК (нейрональных стволовых клеток) и клеток-предшественников, которые могут образовывать нейроны *de novo* (Lindsey et al., 2014). Клетки-предшественники (НКП) различаются по месту локализации в мозге, образуя клеточные линии нейрональной и глиальной направленности, а также дифференцируясь в различные типы дефинитивных нейронов. В настоящее время неизвестно насколько широко распространены клетки-предшественники, присутствующие в паренхиме взрослого мозга (Arochena et al., 2004; Traniello et al., 2014). Интенсивно исследуется клеточная иерархия, включающая различные типы клеток-предшественников и значительный вклад РГ (радиальной глии) в конститутивный нейрогенез (Ninkovic, Götz, 2015).

В 1928 году испанский клеточный биолог Сантьяго Рамон-и-Кахаль постулировал, что в нервной системе после рождения ничего не может образовываться, но только разрушается (Ramón y Cajal, 1928). На тот момент еще не были изобретены инструменты, с помощью которых при исследовании мозга можно было наблюдать мало интенсивные процессы конститутивного нейрогенеза. Авторитет Кахалья в научном мире был огромен, кроме того, было известно, что масса мозга с возрастом уменьшается. Под влиянием этих фактов утвердилась парадигма, что в нервной системе взрослого организма не могут быть сформированы новые клетки. Несмотря на то, что зрелые нейроны действительно не способны к пролиферации, клетки могут возникать в нервной ткани взрослого организма из недифференцированных предшественников (Kempermann, 2008). Открытие явления конститутивного нейрогенеза – процесса создания новых

клеток у взрослой особи, дало возможность дальнейшего поиска различных вариантов лечения нервной системы. Объем знаний, накопившийся за последние десятилетия показал направление дальнейших исследований: если нейрогенез изначально присутствует во взрослом мозге на базовом уровне, то можно попытаться усилить его и тем самым восполнить недостаток нейронов, вызванный нейродегенеративными заболеваниями, травмой, старением и т.д. (Geraerts et al., 2009).

Большой интерес к изучению конститутивного нейрогенеза связан со значительным ущербом для здоровья и экономики от черепно-мозговой травмы (ЧМТ), который по прогнозам вырастет еще в следующем десятилетии. По данным эпидемиологических исследований в России зафиксирована крайне высокая частота ЧМТ — около 600 тыс. человек в год. На 1000 людей приходится до четырех и больше случаев ЧМТ. Из них около 50 тыс. погибают и еще столько же становятся официальными инвалидами (Сергеев, 2016). В развитых странах на долю ЧМТ приходится около 30–40% случаев получения травмы, что приводит к инвалидности и потере трудоспособности (Коновалов, 2002). Среди причин смерти людей активного возраста ЧМТ даже опережает онкологические и сердечно-сосудистые заболевания. Более трети от числа всех травм приходится на ЧМТ (Lippert-Grüner et al., 2007) по данным ВОЗ каждый год возрастая не менее чем на 2% (Сергеев, 2016). В связи с такими пессимистическими данными возникает вопрос, как можно предотвратить столь разрушительное воздействие травмы на нервную ткань или хотя бы ускорить процессы её восстановления, если таковое возможно. Известно, что на клеточном уровне одной из характерных особенностей повреждения нервной системы является массовая утрата нескольких типов клеток (Zuranc, 2006). Одним из перспективных подходов для того, чтобы больше узнать о регенеративном потенциале человека является исследование способных к восстановлению нервной ткани организмов, среди которых наиболее изученными являются костистые рыбы (Stocum, 2006).

После накопления достаточно большого объема информации о взрослом нейрогенезе стал очевиден следующий шаг – сравнение нейрогенных способностей представителей всех отрядов позвоночных. Сравнительный анализ взрослого головного мозга различных видов позволил сделать вывод, что для всех позвоночных существует основной нейрональный план строения (Wullimann, 1997). Феномен нейрогенеза связан с особенностью, которая отличает костистых рыб от позвоночных амниот. Для их

взрослого мозга характерны широко распространенная клеточная пролиферация, способность к созданию большого числа новых клеток в ЦНС и её регенерации (Olivera-Pasilio et al., 2017). Эта способность, называемая нейрональной регенерацией, была особенно хорошо изучена в трёх нейронных системах: в сетчатке и в её первичной проекции – тектуме, в спинном мозге и в мозжечке (Zuranc, 2006). В мозге взрослого *Gymnotus omaroru* конечный мозг, средний мозг, промежуточный мозг, ромбовидный мозг и мозжечок являются областями с высоким уровнем пролиферации (Olivera-Pasilio et al., 2017). Среди всех позвоночных костистые рыбы демонстрируют наиболее интенсивный и широко распространенный конститутивный нейрогенез. У рыбок *D. rerio* 16 различных нейрогенных ниш были идентифицированы по всей оси, включая спинной мозг (Kizil et al., 2012). По сравнению с костистыми рыбами число клеток, создающихся в пролиферативных зонах у млекопитающих, в 2–3 раза меньше и с возрастом резко снижается конститутивный нейрогенез (Lee et al., 2012). Если у млекопитающих и птиц гранулярные клетки мозжечка образуются всего несколько недель после рождения, то у рыб всю жизнь (Grandel et al., 2006). Также в ЦНС высших позвоночных развиваются возрастные изменения, такие как увеличение количества астроцитов и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), что свидетельствует о процессах глиоза (Kohama et al., 1995), утрата нейронов (Baskerville et al., 2006), увеличение экспрессии белков, участвующих в регуляции апоптотической гибели клеток (Paneda et al., 2003).

Конститутивный нейрогенез происходит в желудочке конечного мозга у птиц, рептилий (Solis, 2000), костистых рыб (Ganz et al., 2010). У амфибий области конститутивного нейрогенеза: конечный мозг, преоптическая область гипоталамуса, таламус, средний мозг, мозжечок у хвостатых и бесхвостых амфибий (Bernocchi et al., 1990; Margotta et al., 2005; Raucci et al., 2006). Удивительный пример способности к восстановлению нервной ткани – ящерица аксолотль (*Ambystoma mexicanum*). В её спинном мозге находятся пролиферирующие нейрональные клетки-предшественники (Grandel, Brand, 2013). Показано, что полученные при культивировании НКП из взрослого спинного мозга восстанавливают все типы клеток, включая мотонейроны после ампутации хвоста. Млекопитающие не могут столь эффективно восстанавливать нервную систему (Zuranc et al., 1996). Но до конца не ясно: достаточно ли пластичны

активированные травмой взрослые НСК (вНСК) аксолотля при создании необходимых типов нейронов для полного восстановления ЦНС (Shimazaki, 2016).

У рептилий (змеи, ящерицы, черепахи) конститутивный нейрогенез происходит в коре, переднем дорзовентральном мосту, стриатуме, перегородке (González-Granero et al., 2011). Предполагают, что некоторые низшие позвоночные, такие как хвостатые амфибии и костистые рыбы, обладают высоким регенеративным потенциалом ЦНС из-за более широкого распространения нейрогенеза (Ferretti, 2011; Grandel, Brand, 2013).

У млекопитающих конститутивный нейрогенез выражен только в двух областях мозга:

- 1) передней части СВЗ бокового желудочка (Curtis et al., 2007);
- 2) области, расположенной в СГЗ зубчатой извилины гиппокампа (Seri et al., 2001).

Многочисленные исследования показывают, что у млекопитающих, возможно, существуют и другие области мозга, в которых могут образовываться нейроны, кроме вышеуказанных. Существуют сведения о клетках-предшественниках, обнаруженных в субпаллиальной области неокортекса взрослой крысы и о небольшом числе делящихся клеток, активированных после ишемии (Ohira et al., 2010). Транзиторная ишемическая атака индуцирует пролиферацию клеток-предшественников интернейронов в субпаллиальной области, которые затем мигрируют в нижний слой коры, превращаясь в ГАМК-ергические нейроны и экспрессируют GAD67 у взрослых крыс (Fishell, Goldman, 2010). В коре приматов делящиеся клетки рассматриваются как клетки-предшественники с длинной G1 фазой (Lukaszewicz et al., 2005). Поскольку изменение в длине клеточного цикла связано с детерминацией клеточной судьбы, и нейрогенезом и удлинением G1-фазы, что характерно для НКП (Calegari et al., 2005). Интересно, что клетка-предшественник может образовывать нейроны *in vitro* или при прививании в нейрогенную область взрослого мозга, как было показано в зубчатой извилине взрослой крысы (Shihabuddin et al., 2000).

Огромную разницу в нейрогенных способностях у высших и низших позвоночных пытаются объяснить тем, что помимо участия в поведенческой пластичности и в замене поврежденных нейронов, нейрогенез играет важную роль в численном согласовании нейронов сенсорной и моторной частей ЦНС (Zupanc, 2001). У млекопитающих рост тела происходит за счет увеличения размеров мышечного волокна,

при этом их число не изменяется (Koumas, Aksten, 1995). У рыб число мышечных волокон увеличивается на протяжении всей жизни и, возможно, для контроля над мышечной активностью и обработки сенсорной информации необходимо соответствующее увеличение числа нейронов. Благодаря постоянному созданию новых клеток, в сочетании с достаточно долговременным выживанием их значительной части, мозг рыб и его структуры постоянно растут. У млекопитающих центральные отделы сенсорных систем к моменту рождения и/или вскоре после него уже полностью сформированы и находятся в соответствии с количеством сенсорных рецепторов (Ruben, 1967). В мозге рыб из-за необходимости адаптироваться к постоянному значительному увеличению размеров тела и повышению объёма входящей сенсорной информации, рост и развитие сенсорных проекций мозга может продолжаться всю жизнь (Bell et al., 1997). При изменении роста мышечных волокон в ходе эволюции от гиперплазии к гипертрофии у млекопитающих нейрогенный потенциал структур мозга, формирующих моторные части ЦНС, редуцируется. Аналогичное снижение числа нейрогенных областей мозга и скорости нейрогенеза возникло, когда новые клетки сенсорной части все больше и больше оставались без контроля. Согласно этой гипотезе, нейрогенез должен продолжаться только в обонятельной луковице и гиппокампе как следствие продолжающейся митотической активности в обонятельном эпителии (Zupanc, 2011). У пресноводной рыбки *D. rerio* только за 30-минутный период образуются до 6.000 клеток, что составляет примерно 0.06% от всех клеток головного мозга (Hinsch, Zupanc, 2006). Скорость нейрогенеза у человека составляет до 700 нейронов ежедневно, а в год обновляется не менее 1.75% клеток всего гиппокампа или же 0.004% нейронов его зубчатой фасции (Spalding et al., 2013).

Удивителен тот факт, что у тропических летучих мышей (социальных животных, живущих в сложных природных условиях), не был выявлен или ничтожно мал конститутивный нейрогенез в гиппокампе, в то время как СВЗ бокового желудочка создает обонятельные нейроны, как и у грызунов (Amrein et al., 2007). При этом они точно запоминают, где находятся источники пищи (Thiele, Winter, 2005). Более того нет доказательств нейрогенеза в гиппокампе взрослых китов, совершающих обширные миграции на большие расстояния через океан (Patzke et al., 2013). Таким образом, в некоторых случаях связь между взрослым нейрогенезом и предполагаемой биологической ролью отсутствует (Amrein, Lipp, 2009). У запасающих пищу (Barnea,

Pravosudov, 2011) и мигрирующих птиц (LaDage et al., 2011) усиливаются процессы нейрогенеза в гиппокампе и обонятельной луковице, облегчая процесс запоминания миграционных путей и местонахождения тайников с запасами пищи. В мозге взрослых млекопитающих ниши, содержащие НСК (субэпендима, гиппокамп, гипоталамус) располагаются на большом расстоянии от поверхности мозга. Данная особенность делает их недоступными для неинвазивной визуализации с использованием современных методов световой микроскопии (Barbosa et al., 2016). У рыб вНСК располагаются на поверхности эвертированного конечного мозга, поэтому более доступны для неинвазивных процедур визуализации (Barbosa et al., 2016).

1.2. Радиальная глия в мозге взрослых позвоночных

1.2.1. Общие сведения

РГ образуется из НСК матричного слоя развивающейся нервной трубки, дифференцируясь, в основном, в астроциты, а также в эпендимные клетки (Malatesta et al., 2008). Из этих же клеток развиваются и первые популяции нейронов и глиальных клеток (Обухов, Пущина, 2011). Клетки РГ имеют биполярную морфологию: длинные отростки направлены в мягкую мозговую оболочку, а короткий апикальный отросток идет от стенок желудочка до пиальной поверхности развивающейся нервной трубки (Bentivoglio, Mazzarello, 1999). Маркёры РГ – виментин, нестин, Aro-B, BLBP, GLAST (Обухов, Пущина, 2011). Также РГ позитивна для маркёров нейрональной линии: тирозингидроксилазы, ГАМК, NADPH-диафоразы (Обухов, Пущина, 2011). Из-за длинных отростков РГ было трудно представить, что эти клетки могут еще и делиться, несмотря на показанные процессы синтеза ДНК при маркировании ³H-тимидином (Misson et al., 1988). Во время М-фазы клетки втягивают свои отростки и все синаптические и/или другие контакты, образованные глиальными клетками и нейронами, должны быть созданы снова. Но если при делении клетки сохраняют свои отростки, в том числе образующие синаптические контакты, то все функции могут выполняться одновременно (Kukley et al., 2008). Открытие того, что клетки РГ являются клетками-предшественниками во время развития ЦНС (Malatesta et al., 2008) радикально расходилось с устоявшимся мнением об их функциях (Sánchez-Farías, Candal, 2016). Раньше предполагали, что вдоль их волокон другие клетки мигрируют к своей цели. Однако в настоящее время они исследуются, как главный источник нейронов, астроцитов, олигодендроцитов, эпендимоцитов и даже взрослых НСК в ЦНС, как в

физиологических, так и в условиях травмы (Malatesta et al., 2008; Malatesta, Götz, 2013). Этот факт привёл к ошибочному мнению, что все клетки РГ являются НСК, даже если меньшая их часть может самообновляться неопределенное число раз и сохраняться на протяжении всей жизни (Götz et al., 2015). У млекопитающих РГ сохраняется в нескольких регионах взрослого мозга: переднем мозге (Grandel, Brand, 2013; Ninkovic, Götz, 2013) сетчатке и в мозжечке (Grupp et al., 2010). Однако в нейрогенных нишах, активируемых травмой, отсутствует РГ. У не млекопитающих не развивается реактивный астроглиоз, поскольку большинство областей, окружающих травму, вместо астроцитов содержат РГ (Reimer et al., 2010). При этом в конечном мозге взрослого *D. rerio* РГ, подобно астроглии млекопитающих, демонстрирует характерные признаки реактивного глиоза сразу после травмы (Vitalo et al., 2016).

В ЦНС взрослого *D. rerio* сохраняется экспрессия генов, схожих с эмбриональными: GFAP, S100b, BLBP, GLAST, виментин (Fishell, Goldman, 2010). РГ сохраняется во взрослом мозге *D. rerio*, выстилая эвертированные боковые желудочки и образуя новые нейроны на протяжении всей жизни (Rothenaigner et al., 2011). Она обладает свойствами самообновления и плюрипотентности, тем самым доказывая свою идентичность НСК, как показал анализ трассирования (Rothenaigner et al., 2011). На основании того, что часть гетерогенной популяции презумптивных вентрикулярных НКП взрослого *D. rerio* экспрессирует маркёры РГ, а другая нет, предположили, что новые нейроны могут возникать из нейрональной и не нейрональной популяции клеток-предшественников (Ganz et al., 2010). ВНСК в оптическом тектуме (Ito et al., 2010) и в мозжечке *D. rerio* (Kaslin et al., 2009) не имели глиальной природы и экспрессировали нейроэпителиальные маркёры. Полагают, что РГ может быть эквивалентна нейроэпителиальным клеткам (Ghosh, Hui, 2016).

В ходе деления для РГ существуют 3 критических этапа:

- 1) останется ли в покое или войдет в клеточный цикл;
- 2) активированная РГ может пройти один из трёх режимов самообновления: а) симметричное, расширяя пул клеток-предшественников РГ б) нейрогенное, в) астроглиогенное асимметричное самообновление, образуя различное дифференцированное потомство и поддерживая пул клеток-предшественников РГ;
- 3) РГ остается в покое и поддерживает свойства стволовости или дифференцируется в астроциты при помощи транзитной астроглии.

Возможно, что покоящиеся радиальные глиядобные клетки могут напрямую дифференцироваться в астроциты без деления. Выбор может быть сделан на уровне клеток-предшественников радиальных глиядобных клеток (Bonaguidi et al., 2011). После активации значительная доля радиальных глиядобных клеток у молодежи мыши самообновлялась и мультипотентно дифференцировалась в течение 1 месяца. Некоторые радиальные глиядобные клетки прошли через три клеточных деления и три различных режима самообновления в течение 2 месяцев (Bonaguidi et al., 2011). Хотя потенциал многих радиальных глиядобных клеток был истощен за столь длительное время, значительная доля активированных радиальных глиядобных клеток сохранялась в течение 12 месяцев. В более чем 300 исследованных клонах не наблюдалось маркированных клеток из линии олигодендроцитов. Таким образом, линии нейронов, астроглии и олигодендроцитов в нормальных условиях образуются из отдельных пулов предшественников во взрослом гиппокампе (Bonaguidi et al., 2011). Эти данные подтверждают сложившееся мнение о значительной гетерогенности НСК и их НКП даже в пределах одной ткани и о возможности расширения их пула за счет симметричного деления радиальных глиядобных клеток (Bonaguidi et al., 2011). Также они не вписываются в модель «одноразовой НСК», когда нестин-позитивные радиальные глиядобные клетки необратимо выходят из состояния покоя, быстро образуют несколько нейрогенных потомков через асимметричные деления и дифференцируются в зрелые астроциты.

У человека РГ трансформируется в фенотип клеток-предшественников, способных образовывать астроциты (Duan et al., 2015). Предполагают, что в отличие от мыши дорсальные клетки РГ в человеческом мозге могут образовывать различные подтипы неокортикальных интернейронов. Большое число пролиферативных зон и предшественников кортикальных интернейронов у человека может быть связано с эволюционной адаптацией, лежащей в основе увеличения объема мозга и повышенной сложности корковых структур (Yu, Zecsevici, 2011). В желудочке потомство активно делящихся клеток РГ настолько многочисленно, что они образуют отдельный слой ниже уровня эпендимы, выстилающей желудочек (Mirzadeh et al., 2008). РГ действует, как медленно делящиеся НСК, которые встраиваются в дифференцированный эпендимный слой. У большинства видов млекопитающих, включая человека, клетки, утрачивающие контакт с желудочком и полярность эпителиальных клеток подобно радиальным

астроцитам в зубчатой извилине, действуют как vНСК (Knoth et al., 2010; Spalding et al., 2013). В паренхиме здорового мозга астроциты не пролиферируют и не показывают при диссоциации и культивировании какой-либо потенциал НСК, судя по анализу нейросфер НСК (Sirko et al., 2013). При трансплантации нейронов из спинного мозга или чёрной субстанции в область их происхождения они образовывали NG2-позитивную глию, но при трансплантации в нейрогенные ниши зубчатой извилины образовывали нейроны. При трансплантации в нейрогенную субэпендимную зону РГ формировала нейроны. Отсутствие каких-либо других клеток-предшественников позволяет предполагать, что они могут быть не чувствительны к нейрогенным сигналам, по крайней мере, к тем, что производит среда субэпендимной зоны *in vitro* (Shimada et al., 2012). Эти данные свидетельствуют о большом количестве клеток-предшественников в ЦНС взрослого организма и о возможности создания различных типов клеток в зависимости от свойств нейрогенных ниш (нейрогенных/глиогенных) и сигналов, выходящих из этой среды (Shihabuddin et al., 2000).

GFAP выявляется в зрелых астроцитах и всё чаще используется для маркирования клеток-предшественников РГ в ЦНС (Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009; Than-Trong, Bally-Cuif, 2015). Также его экспрессируют клетки в нейрогенных нишах взрослого мозга млекопитающих: СВЗ (субвентрикулярной зоне) боковых желудочков конечного мозга (Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009) и зубчатой извилины гиппокампа (Seri et al., 2001; Steiner et al., 2006). Клетки, экспрессирующие GFAP и нестин *in vivo*, оказывают регуляторное влияние на нейрогенез (Filippov et al., 2003).

1.2.2. Участие глиальных клеток

Глиальный рубец важен при репаративном нейрогенезе, поскольку он ограждает место травмы, предотвращает избыточное накопление глутамата и ионов калия, обеспечивает трофическую и метаболическую поддержку для выживания нейронов и даже регулирует последующий иммунный ответ. Глиальный рубец сохраняется долгое время у млекопитающих и продолжает посылать сигналы для привлечения новых нейронов даже спустя несколько месяцев после инсульта. Прилегающая нейрогенная субэпендимальная зона создаёт большое количество нейробластов, мигрирующих к области травмы (Thored et al., 2006). Однако эти клетки часто не выживают, либо не способны интегрироваться в нейронные сети даже после того, как острая реакция после травмы исчезла. Следовательно, преимущества реактивного глиоза на пике травмы на

более поздних стадиях противостоят ограничению регенеративного потенциала (Pekny et al., 2014). Воздействие глиального рубца и факторов внеклеточного матрикса создаёт неблагоприятные условия для процессов миелинизации и регенерации аксонов (Dimou, Götz, 2014). Астроциты, продуцируя ингибиторные молекулы в пределах глиального рубца, осложняют регенерацию у млекопитающих (Fitch, Silver, 2008). Исследования *in vitro* показали, что астроциты не экспрессирующие GFAP и виментин (белков промежуточных филаментов) подвергаются кислородно-глюкозному голоданию и реперфузии, вследствие чего наблюдается увеличение числа погибших клеток. Таким образом, в условиях *in vitro* нейроны менее защищены, чем астроциты «диких» мышей (De Pablo et al., 2014). На основании этого предполагают, что реактивные астроциты защищены во время ишемии в мозге (Liu et al., 2014). У GFAP/Vim-негативных (GFAP-/Vim-) мышей образование глиального рубца менее выражено, заживление после травмы занимает больше времени, а посттравматическая синаптическая потеря более существенна, чем у GFAP/Vim-экспрессирующих (Wilhelmsson et al., 2004). У таких мышей улучшаются процессы восстановления после травмы спинного мозга (Menet et al., 2003), усиливается нейрогенез во взрослом гиппокампе (Wilhelmsson et al., 2012) в том числе у более старых мышей (Larsson et al., 2004). Функциональные данные показали, что ослабление глиального рубца не способствует восстановлению после инсульта кортикоспинального тракта, в отличие от более успешных процессов регенерации у GFAP-/Vim- мышей с поврежденным спинным мозгом (Menet et al., 2003). Таким образом, в отличие от повреждения спинного мозга образование глиального рубца не является основным препятствием для неврологического восстановления после церебрального инсульта. Снижение функционального восстановления и пластичности кортикоспинального тракта у GFAP-/Vim- мышей после инсульта по сравнению с «дикими» мышами, может отчасти объясняться увеличением экспрессии хондроитин сульфат протеогликана в контралатеральных и отдаленных ипсилатеральных полушариях.

NG2-позитивная глия – наиболее распространенный тип предшественников в мозге млекопитающих (Dimou, Götz, 2014). Она отвечает за активное взаимодействие, создание/поддержание новых олигодендроцитов, миелинизацию аксонов, восстановление длинных отростков нейронов (Dimou, Götz, 2014). Кроме того NG2-позитивная глия способствует образованию астроцитов *in vivo* (Tatsumi et al., 2008). При

травме головного мозга NG2-позитивная глия и пролиферирующие реактивные астроциты не образуют новые нейроны эндогенно, оставаясь в основном, в пределах своих клеточных линий (Robel et al., 2011). Селективные сигналы, регулирующие пролиферацию NG2-позитивной глии, при некоторых заболеваниях позволяют разработать инновационные терапевтические подходы. С другой стороны, такой подход может нанести вред, поскольку эти клетки образуют новые олигодендроциты, что может негативно влиять на реминерализацию ткани. Принимая во внимание обе стороны этой медали, лучшим вариантом было бы выборочное ингибирование пролиферации при накоплении NG2-позитивных глиальных клеток вокруг места повреждения, что могло бы способствовать её дифференциации (Dimou, Götz, 2014).

1.2.3. Реакция глиальных клеток после повреждения головного мозга

За несколько часов происходит инфильтрация активированных макрофагов в место травмы и пролиферация микроглии по её краям вслед за активацией NG2-позитивной глии (Simon et al., 2011; Götz, 2014). Примечательно, что к участку травмы может мигрировать только NG2-позитивная глия в течение 24–48 часов (Dimou, Götz, 2014). Увеличение её количества и плотности в месте травмы (Simon et al., 2011) особенно интересно, поскольку в здоровом мозге количество NG2-позитивной глии поддерживается на постоянном уровне с помощью апоптоза (Hughes et al., 2013). По-видимому, после повреждения мозга и гематоэнцефалического барьера происходит значительное усиление пролиферации NG2-позитивной глии и астроцитов, их гипертрофия (отёк тела клетки и отростков), поляризация (удлинение отростков) (Dimou, Götz, 2014). NG2-позитивная глия играет важную роль в реминерализации поврежденных аксонов. При повреждении дистальный сегмент аксона подвергается демиелинизации, проксимальный сегмент элиминируется путем апоптоза или подвергается хроматолизису (Kerschensteiner et al., 2005).

После травмы NG2-позитивная глия в первые три сут демонстрирует быстрое увеличение пролиферации в 100 раз (Simon et al., 2011) в отличие от астроцитов, которые медленно реагируют и в ограниченном количестве (Dimou, Götz, 2014). Активированная NG2-позитивная глия очень быстро покрывает отростками поврежденный участок коры головного мозга мыши, число клеток РГ возрастает за 2–4 сут при помощи быстрой перестройки и повторного включения в клеточный цикл (Simon et al., 2011; Hughes et al., 2013). Накопление NG2-позитивной глии, окружающей

глиальный рубец при травме спинного мозга, вовлекает глиальные клетки в функции, ранее определенные для реактивных астроцитов: закрытие раны, торможение роста нейритов ингибирующим хондроитином, экспрессию протеогликанов и рубцевание за счет повышенной плотности глиальных клеток (Dimou, Götz, 2014). На некоторую степень гетерогенности NG2-позитивной глиии при травме мозга указывает то, что небольшая её доля дифференцируется в зрелые астроциты, а большая часть остается прежней NG2-позитивной глиией (Bardehle et al., 2013; Dimou, Götz, 2014). Это означает, что при определенных условиях NG2-позитивная глия создает GFAP-позитивные астроциты (Dimou, Götz, 2014).

Во время эмбрионального развития мезодермальные клетки (из линии макрофагов), проникая в ЦНС, превращаются в клетки микроглии, которые впоследствии активно поглощают нейроны, подвергшиеся апоптозу (Cuadros, Navascules, 1998). Фагоцитоз апоптотических элементов представляет собой процесс удаления остатков разрушенных нейронов и предотвращения дальнейшего распространения цитотоксических и/или антигенных веществ. В зоне травмы головного мозга и некроза нейронов микроглия и моноциты образуют популяцию макрофагов. Накопление клеток микроглии после инсульта может способствовать нейрогенезу и последующему выживанию нейронов (Thored et al., 2009). Микроглия пролиферирует фактически во всех условиях травмы, изученных на данный момент. Изначально численность макрофагов и микроглии очень мала в повреждённом мозге, но примерно через трое суток после нанесения травмы их количество начинает увеличиваться в области травмы и прилежащих областях у *D. rerio* (Zuranc et al., 2003). Приблизительно на десятые сутки достигается наибольшая концентрация, но уже через месяц их число возвращается к контрольному уровню. Аналогичное увеличение количества микроглии/макрофагов в ответ на травму ЦНС одновременно с увеличением фагоцитарной активности было обнаружено у других видов (Streit et al., 1999; Nagamoto-Combs et al., 2007). У крыс в случае ишемии активированная микроглия появляется уже через 20 минут после повреждения и активно в течение 24 часов фагоцитирует остатки нейронов (Ekdahl et al., 2003). Микроглия активируется с помощью интерлейкина-4 или гамма-интерферона, которые могут индуцировать образование нейронов или глиии из взрослых клеток-предшественников (Butovsky et al., 2006). В каждой модели повреждения индукция нейрогенеза сопровождается ответом микроглии, являясь

источником нейрогенных, нейропротекторных факторов, активации фагоцитов и сигнальных путей, индукции клеточной смерти, формирования аксонов и мониторинга синапсов (Shechter, Schwartz, 2013). Таким образом, всего лишь несколько процессов обеспечивают поступление регуляторных молекул к новым нейронам в критический посттравматический момент (Thored et al., 2009).

Астроциты – наиболее распространенный подтип глиальных клеток, в несколько раз превышающий число нейронов в ЦНС. Тем не менее, астроциты почти не рассматривались при разработке терапии для лечения инсульта, поскольку основное внимание уделялось нейронам. Функции астроцитов: структурная поддержка, метаболизм нейронов, поддержание внеклеточной среды, регулирование мозгового кровотока, стабилизация межклеточных коммуникаций, синтез нейротрансмиттеров и защита нейронов от процессов окисления (Ransom, Ransom, 2012). Для развития нейронов из клеток-предшественников в гиппокампе необходимо присутствие астроцитов (Song et al., 2005). Одной из первых реакций астроцитов на повреждение являются клеточная гипертрофия и изменение экспрессии генов (Zamanian et al., 2012). Важно отметить, что наиболее выраженной и хорошо изученной функцией реактивных астроцитов является апрегуляция промежуточных филаментов, способствующая передвижению белков к поверхности клетки (Lundkvist et al., 2008, Robel et al., 2011). Генетический анализ показал, что вНСК, изолированные из различных областей переднего мозга мыши, имеют больше сходства с взрослыми астроцитами и эпендимными клетками из соседних областей, чем с нейрональной РГ из развивающегося мозга (Beckervordersandforth et al., 2010). Таким образом, клетки с астроглиальными характеристиками могут образовывать НСК (Dimou, Götz, 2014). Глиальные клетки и клетки-предшественники в месте повреждения не только принимают участие в процессах нейрогенеза, замещая утраченные нейроны, но и образуют благоприятную среду для выживания нейронов и их успешной интеграции в нервные сети (Sabelström et al., 2013). Предполагают, что существует гетерогенность в реакции астроцитов после травмы коры мозжечка. Юкстраваскулярные астроциты, которые составляют лишь треть всех астроцитов, после повреждения с помощью иглы коры головного мозга становятся наиболее распространенным подтипом (Bardehle et al., 2013). Существуют подтипы астроцитов, не реагирующие вообще, даже если они находятся рядом с областью травмы (Bardehle et al., 2013). Так называемые палисадные

астроциты формируют длинные поляризованные отростки по направлению к области травмы (Wanner et al., 2013).

1.3. Исследование процессов восстановления нервной ткани после травмы

Детальное исследование процессов нейрогенеза, происходящих в интактном мозге, дало ответ на многие вопросы, но еще более захватывающим оказалось изучение нейрогенеза при создании модели повреждения мозга. Одной из первых реакций в ответ на травму ЦНС как у млекопитающих, так и у *D. rerio* является активация иммунных клеток (Ransohoff, Brown, 2012), клеток РГ, значительное усиление пролиферации, создание новых нейронов для замены утраченных (Kroehne et al., 2011; Kizil et al., 2012). Характерной чертой является диффузный характер гибели клеток. Повреждения гематоэнцефалического барьера сопровождаются интенсивной воспалительной реакцией как со стороны микроглии, так и в результате инвазии в область травмы моноцитов, макрофагов, Т-клеток и нейтрофилов (Raivich et al., 1999). В конечном мозге костистых рыб сразу развивается сильная воспалительная реакция, инфильтрация и активация микроглии, пролиферирующей в большом количестве. Хроническое воспаление и формирование глиального рубца (не дающего прорасти аксонам в зону повреждения) долгое время считались основными препятствиями для восстановления ЦНС млекопитающих (Rasmussen et al., 2011; Sofroniew, 2009). В отличие от травмы периферической нервной системы повреждение ЦНС не сопровождается экстенсивной регенерацией (Palmer et al., 1997). Если во время развития новые нейроны способны вырастить аксон, то зрелые нейроны после травмы ЦНС млекопитающих не способны к самовосстановлению и регенерации. Повреждение нейрогенного участка у млекопитающих приводит к эмиграции клеток-предшественников и созданию новых нейронов, но они не выживают (Baumgart et al., 2012).

В настоящее время доказано, что существуют факторы, которые предотвращают смерть неограниченного числа клеток после травмы мозга *D. rerio* (Zupanc, Zupanc, 2006). В 1998 Зупанком была разработана методика по нанесению механической травмы в различных зонах мозга электрической гимнотифорной рыбки *Apteronotus leptorhynchus* для изучения процессов регенерации нейронов в мозжечке (Zupanc et al., 1998). Использование «парадигмы повреждения» позволило установить связь между процессами нейрогенеза в интактном мозге и высоким регенеративным потенциалом у костистых рыб при формировании новых нейронов после повреждения мозга (Zupanc,

Ott, 1999). От характера травмы и объема поврежденной нервной ткани зависит интенсивность деления клеток. ЦНС костистой рыбы успешно восстанавливалась после серьезной травмы: абляции (физического удаления значительных объемов ЦНС вдоль ростро-каудальной оси) (Zuranc, Sîrbulescu, 2013). После абляции половины нейронов в коре мозжечка взрослой мыши начинает экспрессироваться белок P25 в нейронах, которые не смогли вызвать пролиферативный ответ от астроцитов или NG2-позитивной глии (Sirko et al., 2013). Это происходит, несмотря на активацию и пролиферацию микроглии, астроглии, повышение уровня экспрессии GFAP, виментина, нестина и многих других признаков реактивных астроцитов, а также гипертрофии NG2-позитивной глии (Sirko et al., 2013).

В период постэмбрионального развития процессы формирования мозга, роста и дифференциации интегративных центров у рыб активно продолжают благодаря процессам нейрогенеза (Zuranc, 2006). При травмировании мозга к естественным постэмбриональным процессам роста и пролиферации добавляются процессы репаративного нейрогенеза, которые обеспечиваются за счет формирования дополнительных центров нейрогенеза (в основном зон вторичного нейрогенеза и паренхимных клеток, активации нейрогенных ниш). Как было показано в исследованиях на НСК при повреждении в процессах роста аксонов, реактивного синаптогенеза и ремиелинизации участвуют различные восстановительные механизмы, характерные для нормального развития (Vaccarino et al., 2001). В процессе онтогенеза скорость пролиферативных процессов в нервной системе неодинакова. Наиболее высокий уровень наблюдается в периоды раннего развития и замедляется у взрослых особей. Несмотря на то, что реактивные астроциты не проявляют нейрогенные свойства в мозге взрослых млекопитающих, они могут дать начало мультипотентным нейросферам и нейронам *in vitro*, подчеркивая важную роль «ограничивающей среды» *in vivo* (Robel et al., 2011). В конечном мозге *D. rerio* (Ganz et al., 2010; Grupp et al., 2010), у карпа *Cyprinus carpio* (Kalman, 1998) и кефали *Chelon labrosus* (Arochena et al., 2004) не обнаружили звездчатых астроцитов типичных для млекопитающих. Напротив, реактивная РГ *D. rerio* функционирует как эндогенные нейрогенные клетки-предшественники после травмы. Она создает нейробласты, которые мигрируют как в конститутивную, перивентрикулярную область, так и в глубокие слои паренхимы к месту поражения, что обычно не наблюдается в норме (Vitalo et al., 2016).

1.4. Современные представления о роли апоптоза в нервной системе

Апоптоз представляет собой запрограммированную клеточную гибель, регулируемую генами и играющую главную роль в некоторых нормальных и патологических состояниях. В отличие от некроза апоптоз характеризуется сжатием клетки, конденсацией ядра и образованием везикул, которые уничтожаются другими клетками. Благодаря этому, побочные эффекты, свойственные некрозу, такие как воспаление прилежащих тканей не характерны для апоптоза, являющегося «чистой» формой клеточной гибели (Zuranc, 2012). У млекопитающих некротическая гибель клеток – основной процесс в зоне травмы, апоптоз же затрагивает незначительное число клеток только в прилегающих областях. В области травмы развивается воспаление и постепенно образуются большие полости, лишенные клеток. На границе с глиальным рубцом эти полости действуют как биохимические барьеры, предотвращающие рост нервных волокон и миграцию клеток в место повреждения.

Современные представления о структуре нервной ткани взрослого организма свидетельствуют о том, что она построена в основном из постмитотических, не пролиферирующих клеток. Именно с помощью апоптоза осуществляется регуляция избыточного числа нейробластов, образованных, в том числе и в постэмбриональный период (Пушина, Обухов, 2011). Большинство вновь созданных клеток подвергаются апоптозу в течение первых недель после окончания митоза (Dayer et al., 2003). У млекопитающих активные процессы апоптоза происходят во время закрытия нервной трубки и в процессе отбора ненужных клеток. Было показано, что в головном мозге грызунов примерно 70% новых клеток зубчатой извилины и около 50% клеток обонятельной луковицы подвергаются апоптозу в течение 30 сут с момента их формирования (Viebl et al., 2000). Чтобы выжить, новые нейроны нуждаются в поддержке со стороны соседних глиальных клеток, также им необходимы питательные вещества из крови, чтобы интегрироваться в мозг. Отсутствие у них трофического фактора часто приводит к апоптозу, что говорит о наличии связи между процессами апоптоза и сигнальной межклеточной трансдукцией (Yao, Cooper, 1995). При этом важно отметить, что они должны установить связь и с другими нейронами (Luiz, Beatriz, 2010). Результаты исследований на *A. leptorhynchus*, показали, что примерно 50% вновь созданных клеток элиминируются по апоптозному сценарию в течение нескольких недель с момента их образования и миграции в глубокие слои мозга (Zuranc, 1999).

Оставшиеся 50% клеток могут находиться в состоянии покоя в течение всей последующей жизни животного либо дифференцироваться в нейроны или глиоциты (Zuranc, 1999). Баланс между пролиферацией и гибелью клеток лежит в основе многих морфогенетических процессов. Именно этим соотношением обусловлены процессы роста, развития и структурно-функциональной организации различных тканей и органов, формирующих тело животного (Wyllie, 1980).

Процессы нейрогенеза рыб тесно связаны со способностью регенерировать нервную ткань после повреждения (Zuranc, 2012). После травмы мозжечка *A. leptorhynchus* первые апоптозные клетки возникают уже через 5 минут после нанесения колотой травмы (TUNEL-маркирование). Максимальное же количество деградировавших элементов достигалось через полчаса (Zuranc et al., 1998). Через двое суток количество апоптозных клеток начинало постепенно уменьшаться и на двадцатый сут достигалось значения фонового уровня в повреждённой области мозга. За этот период времени отмечались лишь единичные случаи некроза (Zuranc, 2012). В этой особенности и заключается способность ЦНС взрослых рыб к выраженным регенеративным процессам, в отличие от млекопитающих. Методом иммуноферментного анализа ELISA в мозжечке взрослой крысы было показано 2.5–кратное снижение уровня апоптоза и 1.5–3–кратное снижение уровня активности каспазы 3 и каспазы 9 (индуцирующих процессы апоптоза) по сравнению с молодым животным. У *A. leptorhynchus* с возрастом в 2.5 раза уменьшается количество каспаза 3-позитивных клеток во всем мозге. Неизвестно почему их число не превышает несколько сотен во всем мозге даже у взрослых животных. Возможно, вместе с высоким уровнем пролиферации столь низкий уровень апоптоза необходим для обеспечения продолжения роста мозга *A. leptorhynchus* на протяжении всей жизни. Предполагается, что апоптоз регулирует клеточную плотность в постмитотических дифференцированных областях (Ampatzis, Dermon, 2007). У *A. leptorhynchus* в различных зонах мозжечка их количество уменьшается в два раза через несколько недель после того, как они достигли гранулярного слоя (Zuranc et al., 1996). На форели было показано, что во время эмбрионального развития апоптозные клетки выявляются в пролиферативных зонах, а на более поздних стадиях развития апоптоз характерен для зон, содержащих в себе постмитотические дифференцированные нейроны. Например, в тех зонах, где новые клетки дифференцируются и интегрируются в зрительные сети (Candal et al., 2005).

Согласно современным представлениям пролиферацию клеток, клеточную дифференциацию и апоптоз в мозге рыб в ходе постэмбрионального периода развития и у взрослых особей следует рассматривать как совокупность взаимосвязанных функциональных феноменов (Zupanc, 2012).

Существует предположение, что нейроны, образованные *de novo* у взрослых животных, отличаются более высокой пластичностью по сравнению с предсуществующими (Song et al, 2005; Lledo et al., 2006). Другой интересной особенностью «взросло-рожденных» клеток является то, что подавляющее их большинство (до 80%) является анеуплоидными (Rajendran et al., 2007). Несмотря на то, что уровень апоптоза среди анеуплоидных клеток незначительно повышен (по сравнению с эуплоидными клетками) большинство из них существуют долгое время и способны к дальнейшей дифференциации (Rajendran et al., 2007). Количественный анализ при исследовании *A. leptorhynchus* показал, что выживание нейронов на протяжении длительного времени вместе с непрерывным созданием новых клеток приводит к постоянному росту всего мозга.

1.5. Процессы нейровоспаления в мозге

У млекопитающих острое воспаление препятствует конститутивному нейрогенезу и процессам регенерации (Iosif et al., 2006), а в мозге взрослого *D. rerio* оно может способствовать восстановлению ЦНС (Kyritsis et al., 2012). Недавнее исследование на взрослых *D. rerio* свидетельствует о том, что воспалительный ответ необходим для инициирования нейрогенной пролиферации в вентрикулярной зоне. Он представляет молекулярные сигналы, предшествующие активации клеток РГ, а также необходимые для усиления процессов пролиферации и регенеративного нейрогенеза (Kyritsis et al., 2012). В повреждённом конечном мозге взрослого *D. rerio* воспаление широко не распространяется и глиальный рубец не образуется (Baumgart et al., 2012).

Глутамат – возбуждающий нейротрансмиттер, чьё взаимодействие с мембранными рецепторами важно для многочисленных неврологических функций, таких как познание, память, движение, ощущения (McEntee, Crook, 1993). Его чрезмерный внеклеточный уровень, накапливающийся в результате повреждения нейронов, приводит к развитию многих нейродегенеративных заболеваний. Глутаминсинтетаза (ГС) – специфичный белок глии, осуществляющий превращение нейротоксичного глутамата в нетоксичную аминокислоту – глутамин. В нормальных

условиях это защищает нейроны от клеточной смерти (Benarroch, 2010). Травма мозга, фокальная ишемия и ряд неврологических заболеваний часто сопровождаются понижением синтеза ГС, усугубляя нейродегенеративный эффект, вызванный глутаматной нейротоксичностью (Grosche et al., 1995). Учитывая снижение ГС при повреждении ЦНС млекопитающих её значительное увеличение в мозжечке рыбы после механического поражения особенно примечательно (Zupanc et al., 2006). ГС превращает аммоний и глутамат в глутамин и играет важную роль в метаболизме азота у рыб (Dhanasiri et al., 2012). Возможно, у рыб повышение ГС обеспечивает важный механизм для уменьшения нейродегенеративных эффектов, вызванных глутаматной нейротоксичностью. Данное предположение указывает на наличие механизмов, которые и определяют значительные различия в регенеративном потенциале между двумя таксонами позвоночных животных (Zupanc et al., 2007). После воздействия метионином активность ГС в головном мозге *D. rerio* не изменялась (Vuaden et al., 2012). Возможно, снижение поглощения глутамата не было связано со снижением его количества и обработка метионином не приводила к изменениям в глутаматергической передаче в головном мозге *D. rerio* (Vuaden et al., 2016).

ГС не экспрессируется в пролиферативных зонах оптического тектума и дорсолатерального конечного мозга в мозге взрослого *D. rerio* (Schmidt et al., 2013). В этих областях глиальные клетки окрашиваются BLBP – маркером ранней дифференциации глиальных клеток (Campbell, Götz, 2002; Raymond et al., 2006). Самое простое объяснение негативности на ГС в зародышевых зонах мозга заключается в отсутствии в них синтеза глутамата и поэтому ГС отсутствует на ранней стадии дифференциации астроглиальных клеток. НСК в нишах вышеуказанных областей лишены радиальных отростков и, как предполагают, образуют нейроны и глию. Это указывает на функционально скорректированную экспрессию белка в этих клетках. Напротив, пролиферирующие PCNA-позитивные клетки, выстилающие желудочек, были положительны для ГС (Grupp et al., 2010). Поскольку эти клетки имеют длинные отростки, вероятно, они соответствуют клеткам РГ, способным образовывать нейроны и глию, как во время развития ЦНС млекопитающих (Campbell, Götz, 2002). Таким образом, пролиферирующие глиальные клетки в зоне желудочка отличаются от пролиферирующих клеток в пролиферативных зонах (Grupp et al., 2010).

1.6. Регуляторы конститутивного нейрогенеза

1.6.1. Онтогенетические и поведенческие факторы, регулирующие нейрогенез

Наличие отдельных генов само по себе мало объясняет вариативность процессов нейрогенеза, в частности, явление изменчивости и формирование большого количества морфологических признаков. Длительность постнатального онтогенеза влияет на изменения в процессах нейрогенеза, показано, что снижение интенсивности нейрогенеза – стабильный процесс в течение всей жизни позвоночных (Kempermann, 2008). Предполагают, что старение может являться причиной истощения популяции НСК и/или увеличения числа НСК, входящих в состояние покоя (Lugert et al., 2010), а также способности нейронов мигрировать (Heine et al., 2004; Rao et al., 2005). Наибольшее снижение клеточной пролиферации приходится на средний возраст (Rao et al., 2006). У приматов (*common marmoset* и *cinomolgus monkeys*) в течение жизни скорость клеточной пролиферации снижается в 3–5 раз, а нейрональной дифференциации в 35 раз (Aizawa et al., 2011). Нейрогенез в СГЗ экспоненциально снижается с возрастом у грызунов (Knoth et al., 2010; Ben Abdallah et al., 2010), собак (Рексес et al., 2008) и людей (Knoth et al., 2010). У грызунов: мыши, крысы, полевки за первую половину жизни в зубчатой извилине гиппокампа в 5–10 раз снижается клеточная пролиферация из-за повышения количества покоящихся НСК (Rao et al., 2005, 2006; Ben Abdallah et al., 2010), а скорость нейрональной дифференциации понижается в 6–40 раз (Rao et al., 2005, 2006; Aizawa et al., 2011). В СГЗ старых крыс снижается клеточная пролиферация из-за повышения количества покоящихся НСК, но число Sox2-позитивных клеток (маркер НСК) не уменьшается (Hattiangady, Shetty, 2008). Уровень экспрессии Sox2 относительно общего количества белка в мозге *A. leptorhynchus* с возрастом понижается в 2.4 раза (Traniello et al., 2014). Вес мозга удваивается примерно в таком же диапазоне при этом без каких-либо доказательств, что у взрослой рыбки процесс роста замедляется (Zupanc, Horschke, 1995). Предполагают, что окончательное число взрослых НСК/клеток-предшественников формируется до начала полового созревания и старение рыбы не влияет на соотношение митотически активных и покоящихся клеток. Уменьшение числа НСК и клеток-предшественников может быть связано с продолжающимся ростом мозга: на фоне всех его клеток абсолютное количество НСК/предшественников рассеивается (Traniello et al., 2014).

Факторы, связанные с кровью, такие как циркулирующие хемокины могут подавлять или стимулировать нейрогенез в зависимости от возраста. Факторы роста, играющие важную роль в нейрогенезе, такие как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), основной фактор роста фибробластов (FGF2), Bdnf и Wnt сигналинг снижаются с возрастом (Hattiangady et al., 2005). Показано, что введение старым крысам пептида с нейропротекторными свойствами восстанавливает нейрогенез, синаптическую пластичность и память (Bolognin et al., 2014). Это предполагает, что индукция нейрогенеза оказывает благотворное влияние на когнитивные процессы во время старения. Насколько известно *A. leptorhynchus* – первый вид среди позвоночных, у которого было продемонстрировано на клеточном уровне отсутствие каких-либо значительных признаков старения (Traniello et al., 2014). Однако у других видов наблюдается быстрое или постепенное старение. Например, *Cynolebias viarius* (*Cyprinodontiformes*), которая откладывает яйца в прудах и поймах, выживающая во время засухи. Типичная продолжительность жизни этих рыб составляет менее года в естественной среде обитания. К моменту смерти наблюдается ряд дегенеративных изменений тела, глаз и чешуи (Walford, Liu, 1965). У короткоживущей рыбки *Nothobranchius furzeri* значительное влияние возраста на процессы нейрогенеза наблюдается уже на ранних постэмбриональных стадиях, как и у млекопитающих и не коррелирует напрямую с ростом особи (Ben Abdallah et al., 2010; Knoth et al., 2010). За период развития от молодости до состояния взрослой особи в оптическом тектуме почти в 5 раз снижается число митотически активных клеток (Tozzini et al., 2012). Мозг *N. furzeri* повторяет две типичные для млекопитающих черты: глиоз и конститутивный нейрогенез, снижающийся с возрастом (Tozzini et al., 2012). Аналогичные наблюдения отмечались в вентрикулярной зоне конечного мозга и в обонятельной луковице *D. Rerio*, вместе с увеличением числа радиальных глиядобных клеток-предшественников, которые входят в покоящийся статус (Edelmann et al., 2013). Снижение нейрогенеза происходит одновременно с нарушением познавательной способности у рыбок *D. rerio* во время старения (Yu et al., 2006). Сравнительный анализ клеточных механизмов, определяющих степень проявления старения между различными видами костистых рыб, необходим для дальнейшего понимания биологии старения.

Наиболее известным негативным регулятором нейрогенеза, активно изучающимся в гиппокампе, является стресс. Исследование взаимосвязей между

стрессом и нейрогенезом нашло свое выражение в гипотезе, связывающей патогенез развития депрессивных состояний с явлением нейрогенеза. В частности, как физическая, так и когнитивная активность стимулируют нейрогенез во взрослом гиппокампе, обеспечивая определенный уровень стресса. Интересно, что обе парадигмы влияют на различные аспекты регуляции нейрогенеза. Физическая активность способствует пролиферации клеток-предшественников, а когнитивные стимулы в обогащенных средах или процессы обучения повышают уровень выживаемости нейронов и включения в нейронные сети. Эти два механизма во многом дополняют друг друга. Предполагают, что неспецифичные стимулы, такие как физическая активность, могут повысить нейрогенный потенциал, что в свою очередь может повлиять на направленность действия специфичного когнитивного потенциала. В результате этого возникает определенный синергетический эффект данных факторов в процессе регуляции нейрогенеза в функционирующем мозге. Теория нейрогенеза постулирует, что передвижения и физическая активность обеспечиваются внутренним механизмом, который сигнализирует в мозг, что могут возникнуть изменения в способности к восприятию и переработки внешней информации. В обонятельной луковице не выявлено влияния физической активности на интенсивность нейрогенеза, но установлено, что высокая скорость входящих стимулов в этой области способствует усилению нейрогенеза (Kempermann, 2011).

1.6.2. Другие факторы, влияющие на нейрогенез

У самок грызунов большое влияние на конститутивный нейрогенез оказывают гормоны, поддерживая общий уровень пролиферации популяции НКП намного выше, чем у самцов (Abrous et al., 2005). Действие эстрадиола сочетается с индукцией пролиферации эмбриональных клеток-предшественников (Ormerod et al., 2003), со снижением митогенных эффектов эпидермального фактора роста (EGF). Нейроактивный аллопрегнанолаон (метаболит прогестерона) вызывает значительное увеличение количества пролиферирующих НКП в гиппокампе крыс и НСК в коре головного мозга человека (Wang et al., 2005).

Внеклеточные сигнальные молекулы, факторы роста оказывают различные эффекты на нейрогенез, пролиферацию и поддержание жизнеспособности новых нейронов. Молекулы распознавания поверхностной клеточной адгезии являются посредниками при взаимодействии между отдельными клетками, а также между

клетками и внеклеточным матриксом. В развивающейся ЦНС было выявлено несколько трофических факторов необходимых для создания новых нейронов во взрослом мозге, их жизнеспособности и дальнейшего роста. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), эритропоэтин, EGF и основной фактор роста фибробластов (FGF2) поддерживают образование нейрональных клеток. EGF играет важную роль в процессах пролиферации и при поддержании эмбриональных и взрослых НСК (Doetsch et al., 1999). Рецептор EGF участвует в радиальной миграции и при созревании НКП во время эмбрионального развития коры (Caric et al., 2001). Он оказывает сильный митогенный эффект на НСК в культуре, при удалении отдельных клеток может индуцировать процесс дифференциации остальных клеток. После ишемии EGF улучшает процессы нейрогенеза в зоне травмы (Nakatomi et al., 2002). Основные и кислотные формы фактора роста фибробластов (FGF) стимулируют разрастание аксонов, ослабляют последствия травмы, усиливают процессы регенерации в мозге взрослых грызунов (Jin et al., 2003) и у животных, получивших ЧМТ (Yoshimura et al., 2001). Без данного фактора невозможен нормальный сигналинг во время нейрогенеза в гиппокампе (Cheng et al., 2002). После добавления FGF в СВЗ число клеточных делений в этой зоне увеличивается и индуцируется образование нервных сетей в обонятельной луковице (Kuhn et al., 1997). В гиппокампе FGF подавляет последствия очаговой ишемии головного мозга и эпилептических припадков, вызванных каиновой кислотой. В подобных случаях процессы нейрогенеза у мышей, лишенных данного белка, значительно снижены (Yoshimura et al., 2001). В обонятельном эпителии стимулирующие и ингибирующие факторы влияют на скорость пролиферации клеток. Стимулирующие факторы, действующие *in vitro*, включают главным образом факторы роста фибробластов (FGFs). Они увеличивают число клеточных делений и обеспечивают пролиферацию и выживание редких клеток-предшественников.

Фактор роста нервов (NGF) необходим для развития холинергических нейронов базальных ганглиев переднего мозга и роста их аксонов, симпатических постганглионарных нейронов и сенсорных клеток ганглия, образованных из нервного гребня. В развивающихся и восстанавливающихся периферических нервах данный фактор экспрессируется швановскими клетками и макрофагами. Самый высокий уровень экспрессии был отмечен в гиппокампе и в коре головного мозга, которые являются мишенями для холинергических нейронов базальных отделов переднего мозга.

Представитель того же семейства BDNF – основной белок массой 12.3 кДа, как и фактор роста, проявляет свой максимальный эффект во время установления связей между эмбриональными нейронами в ЦНС. Он способствует синаптической пластичности мозга, выживанию клеток, влияет на процессы нейрогенеза и старения (Mattson et al., 2004). BDNF поддерживает базальную активность в пролиферативных зонах мозга (Lee et al., 2002), может усиливать нейрогенез в гиппокампе (Sairanen et al., 2005). Экспрессия BDNF ослабляет ответ на ишемический инсульт (Larsson et al., 2002) и блокирует эндогенный нейротрофический фактор, тем самым усиливая последствия ишемии (Gustafsson et al., 2003). Некоторые исследования показывают, что экспрессия нейротрофического фактора снижает пролиферацию нервных клеток-предшественников и способствует дифференциации нейронов (Cheng et al., 2003). При его длительной экспрессии баланс между процессами пролиферации и дифференциации нарушается из-за уменьшения общей нейрогенной реакции. Увеличение количества клеток, образованных в СВЗ из-за модуляторов, как полагают, связано с повышением уровня выживаемости клеток и увеличением количества рецепторов EGF и нейротрофина-3 (Lee et al., 2002). Цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) – кислый белок, участвующий в дифференциации астроцитов 2 типа. Экспрессируется GFAP-позитивными клетками СВЗ (Emsley, Hagg, 2003). При введении в мозг мыши CNTF стимулирует пролиферацию клеток-предшественников с α -рецептором этого фактора.

IGF-1 опосредует действие рецепторов фактора роста нервов. При введении в желудочек активирует пролиферацию клеток и развитие нейрональных сетей (Aberg et al., 2000). Данный фактор экспрессируется нейронами во время физической нагрузки (Lichtenwalner et al., 2001).

Конститутивный нейрогенез характерен для представителей всех отрядов позвоночных, но его интенсивность снижается во время развития и в ходе эволюции (Olivera-Pasilio et al., 2017). Регуляция нейрогенеза представляет сложный и многоступенчатый процесс, в результате которого обрабатываются новые нейроны. Предполагается, что конститутивный нейрогенез чувствителен к широкому диапазону стимулов и факторов, которые влияют на его конечный результат (Olivera-Pasilio et al., 2017). В ходе дифференциации нейронов предыдущие этапы нейрогенеза ограничивают возможные варианты развития на более поздних стадиях. Рецепторно-трансмиссивное созревание клетки и усложнение её дендритного аппарата является конечной целью

большинства регуляторных событий. Уровень пролиферации клеток-предшественников определяет количество новых нейронов, а от уровня выживаемости новых клеток зависит, смогут ли они интегрироваться в нейронные сети. Популяция клеток-предшественников гетерогенна как морфологически, так и функционально: РГ и её потомки, НКП, эпендима, субвентрикулярные астроциты. На них действует большое число разнообразных сигнальных молекул и факторов: от транскрипционных до нейромедиаторов и газообразных субстанций (Обухов и др., 2013). Несмотря на то, что изучение нейрогенеза не только интереснейшая, но и сложнейшая задача, точно установлено, что на него можно оказывать как положительное, так и отрицательное влияние. К первым относятся как стандартные (нахождение в обогащенной среде, прием антидепрессантов или мелатонина, физическая нагрузка, социальные взаимодействия), так и специфические, например, прием каннабиноидов или бессонная ночь. Наибольший эффект оказывает обогащенная среда, в том числе и физические упражнения. Даже недолгое нахождение (примерно от недели до месяца) в такой среде значимо и стабильно повышает уровень нейрогенеза до пяти раз (в зависимости от возраста, состояния здоровья и других параметров) (Van Praag et al., 2000). Отрицательное воздействие оказывают: радиация, хроническое недосыпание, стресс, злоупотребление алкоголем, опиатами и т.д. Конститутивный нейрогенез подавляют различными способами, в частности фармакологическими методами с применением цитостатических препаратов, облучением и абляцией, генетической инженерией вновь созданных нейронов и т.д. Полученные данные довольно сложны для понимания и до сих пор не разработана теория, последовательно объясняющая все имеющиеся факты (Deng et al., 2010).

Наличие питания рассматривают как важный компонент психического здоровья (Zainuddin, Thuret, 2012). При голодании все органы прекращают расти, что может привести к недоразвитым взрослым особям. Способность видов адаптироваться к доступности питательных веществ имеет решающее значение при развитии и функционировании ЦНС и сенсорной системы (Benitez-Santana et al., 2017). Из-за высоких метаболических потребностей мозг сильно страдает при нехватке питания (Rao et al., 2008; Rafalski, Brunet, 2011). Уменьшается его размер и число нейрональных, дендритных, синаптических связей, снижаются процессы миелинизации (Zainuddin, Thuret, 2012), задерживается когнитивное развитие (Liu et al., 2014; Zhu et al., 2015),

нарушаются двигательные функции, развиваются нейродегенеративные заболевания и дефицит внимания, понижается способность запоминания (Akitake et al, 2015). Один из способов регуляции метаболизма в ответ на голодание – ограничение пролиферации при сохранении гомеостаза тканей (McLeod et al., 2010). У насекомых и млекопитающих при голодании происходит перестройка в энергетическом метаболизме: изменяется поведение НСК и их потомков (Speder et al., 2011), что влияет на нейрогенез и физиологию мозга (Lau et al., 2011). Согласование поведения НСК с доступностью питания может влиять на создание новых клеток для дальнейшего роста, учитывая ограничения, налагаемые голоданием и физиологические требования организма (Benitez-Santana et al., 2017). Голодание замедляет пролиферацию (McLeod et al., 2010) и влияет на размер НКП (Lanet et al., 2013). В цилиарной маргинальной зоне *D. rerio*, *Xenopus laevis* блокируется пролиферация и дифференциация клеток-предшественников (Love et al., 2014).

На основании того, что при голодании в оптическом тектуме *D. rerio* не были выявлены PCNA-позитивные клетки, обнаруженные в интактном мозге, было сделано заключение, что активная пролиферация прекращается (Benitez-Santana et al., 2017). Однако нейроэпителильные/эпендимальные клетки-предшественники во внешнем маргинальном слое оптического тектума относительно невосприимчивы к отсутствию пищи (Benitez-Santana et al., 2017). Возможно, нейрогенез поддерживается во время голодания и уровень пролиферации восстанавливается после возобновления питания. Оптический тектум позвоночных продолжит расти, как только появится еда (Benitez-Santana et al., 2017). Известно, что НСК становятся PCNA-негативными после длительного времени без митоза, но они сохраняют способность пролиферировать (Alunni et al., 2010; Cheung, Rando, 2013). При голодании пролиферация на периферии тектума взрослых животных массово подавляется. Неожиданное прекращение пролиферации PCNA-позитивных клеток после голодания указывает на то, что нейроэпителильные/эпендимальные клетки-предшественники переходят в «покоящийся» статус с медленным циклом, как было показано у рыбок *D. rerio* (Ito et al., 2010) и у медаки *Oryzias latipes* (Alunni et al., 2010). Развивается адаптивный физиологический ответ: ограничение пролиферации клеток для сохранения здоровья и функционирования ключевых органов, таких как мозг, путем перераспределения ресурсов на основные биологические функции (Benitez-Santana et al., 2017).

У многих позвоночных социальные стимулы могут влиять на создание, миграцию, дифференциацию новых клеток в областях мозга, контролирующих поведение (Castilla-Ortega et al., 2011). Например, в гиппокампе доминантных самцов крыс уровень пролиферации клеток выше, чем у подчиненных животных (Hoshaw et al., 2006). Аналогичная ситуация в гиппокампе доминирующих самцов горной гаички Гамбела *Poecile gambeli*, которые лучше справлялись с тестами на пространственную память (Pravosudov, Omanska, 2005). Социальное поражение снижает пролиферацию клеток в зубчатой извилине мышей (Yap et al., 2006) и взаимодействия между особями, включая спаривание, восприятие противоположного пола и материнское поведение, изменяя скорость клеточной пролиферации в мозге (Lau et al., 2011). Социальная изоляция и не обогащенная среда негативно воздействуют на клеточную пролиферацию у многих видов позвоночных (Rizzi et al., 2007), выживание нейронов у птиц и млекопитающих (Barnea, 2009; Ming, Song, 2011) и снижают нейрогенез, способствуя развитию депрессии (Snyder et al., 2011). Когда подчиненный самец получает возможность подняться в социальном ранге и стать доминирующим, он изменяет территориальное и репродуктивное поведение за несколько минут (Maruska, Fernald, 2010) и быстро (от нескольких минут до часа) усиливает всю репродуктивную ось (от мозга до тестикул) (Maruska, Fernald, 2011a; Maruska et al., 2011b). За это время происходят радикальные физиологические изменения для подготовки животного к его новому статусу в качестве репродуктивно активной особи и доминирующего владельца территории. Неизвестно, связано ли это с изменениями в клеточной пролиферации в мозге. У подчиненного самца *Astatotilapia burtoni* уровень клеточной пролиферации в мозге самый низкий. На основании этого предположили, что, как и у высших позвоночных, хронический социальный стресс у рыб замедляет клеточную пролиферацию (Yap et al., 2006; Barnea, 2009). Снижение нейрогенеза при этом, как полагают, развивалось как часть поведенческого и физиологического ответа на подчинение. Такое снижение демонстрирует доминирующему животному, что подчиненный больше не является угрозой, что увеличивает шансы на выживание и возможность размножения для особи с более низким статусом (Matsumura, Hayden, 2006). У *A. leptorhynchus* социальные взаимодействия увеличивали плотность волокон РГ в перивентрикулярных областях промежуточного мозга, облегчая миграцию вновь

созданных клеток в соседние нейронные сети, используемые для воспроизведения (Dunlap et al., 2006).

1.6.3. Влияние размера мозга

Интеграция новых нейронов в нервные сети требует координации процессов клеточного деления, миграции и их созревания. Клетки-предшественники должны сохраняться в течение продолжительного периода после эмбриогенеза во взрослом состоянии, образуя нейроны. Этот процесс должен контролироваться, так как наличие делящихся НСК во взрослом состоянии, как предполагают, является причиной возникновения мозговых опухолей (Cuddapah et al., 2014). Далее молодые нейробласты используя сигналы, направляющие их к конечной цели, должны мигрировать на различные расстояния (Volteus, Bordey, 2004). Это расстояние и плотность дендритов зрелых нейронов, аксонов и синапсов значительно больше во взрослом мозге по сравнению с относительно маленьким эмбриональным. При достижении вновь созданными нейронами зоны окончательной дифференциации, должен начаться процесс их интеграции в функциональные сети без негативных эффектов (Lazarini, Lledo, 2011). Учитывая тот факт, что НСК во время развития рано приобретают региональную специфичность, изменения в архитектуре нейрогенных зон может привести к сильным осложнениям при миграции нейронов к месту своего назначения в более крупном мозге. Эти структурные ограничения могут приводить к изменчивости во взрослом нейрогенезе между видами (Paredes et al., 2016). Конститутивный нейрогенез в вентрикулярной-субвентрикулярной зоне конечного мозга описан у животных с маленьким размером мозга: грызуны, птицы, рептилии. Это затрудняет оценку влияния размера мозга на данный процесс и констатацию наличия нейрогенеза в крупном мозге (особенно человеческом) из-за технических сложностей (Paredes et al., 2016). У большинства птиц нейроны мигрируют не более чем на сантиметр из места их рождения в ВЗ до зоны окончательной дифференциации в конечном мозге. ³H-тимидиновое маркирование показало, что у вновь созданных клеток канареек этот процесс занимает приблизительно 2–3 недели (Alvarez-Buylla, Nottebohm, 1988). У взрослых млекопитающих нейрогенез происходит в боковом желудочке, как у ящериц и птиц и миграционные пути молодых нейронов в основном ограничены ростральным миграционным потоком (РМП), направленным в обонятельную луковицу. Причиной

этого может являться не только включение новых нейронов в цепи РМП, но и более сложная структура взрослого мозга (Paredes et al., 2016).

Нейробласты в РМП направляясь к обонятельной луковице, созревают, прежде всего, в гранулярные клетки и небольшая часть в перигломерулярные интернейроны. В зависимости от места своего рождения они проходят расстояние от 3 до 8 мм (Doetsch, Alvarez-Buylla, 1996) за период от 3 до 7 сут (Petreanu, Alvarez-Buylla, 2002). У домашних кошек размер мозга, длина и ширина РМП поддерживаются на постоянном уровне, тогда как у разных пород собак более изменчив размер мозга и длина, и ширина РМП более разнообразна. Маллик и коллеги оценили длину РМП как 10–15 мм у кошек и 20–30 мм у собак (Malik et al., 2012). У взрослой овцы клетки мигрируют из СВЗ в обонятельную луковицу примерно в течение одного месяца (Brus et al., 2013a, 2013b). Это сопоставимо с 3–7 сут, за которые молодые нейроны у мышей проходят расстояние от вентрикулярной-субвентрикулярной зоны до обонятельной луковицы (Petreanu, Alvarez-Buylla, 2002). У мышей длина РМП составляет приблизительно 4 мм, у овец примерно 20 мм. Если предположить, что клетки мигрируют с одинаковой скоростью у двух видов, то для преодоления расстояния от проксимальной вентрикулярной-субвентрикулярной зоны до обонятельной луковицы клеткам овцы потребуется примерно в 5 раз больше времени по сравнению с мышинными (Brus et al., 2013b).

Мозг взрослых приматов, включая людей, представляет собой драматический пример того, как размер мозга может влиять на наличие процессов нейрогенеза. Миграционные пути молодых нейронов к обонятельной луковице значительно расширяются от периода младенчества до взрослой жизни (Paredes et al., 2016). Минимальное расстояние от передней вентральной В-СВЗ до обонятельного тракта в мозге человека при рождении составляет около 12–15 мм. Как только клетки попадают в обонятельный тракт, они должны снова переместиться почти на такое же расстояние достичь в большинстве своём дистальных участков обонятельной луковицы. Следовательно, предполагаемая длина РМП у новорожденного составляет около 30 мм. Кроме того, клетки могут образовываться более каудально в латеральном желудочке, что удваивает или утраивает длину их миграции (Paredes et al., 2016). Во взрослом человеческом мозге эти размеры еще больше: расстояние от передней вентральной В-СВЗ до обонятельного тракта составляя приблизительно 25–30 мм (Mikula et al., 2007). Таким образом, если предположить, что РМП сохраняется у взрослых людей, то он

должен иметь длину 50–60 мм. В соответствии с этой гипотезой, столь большие расстояния из-за увеличения мозга могут образовывать уникальные препятствия для молодых нейронов и в конечном итоге ограничивать возможность их присутствия во взрослом мозге.

Было высказано предположение при сравнении родственных видов, что изменения в органах чувств и структурах мозга могут отражать различную реакцию на окружающую среду и экологические условия для проведения дивергентных эволюционных изменений (Kotrschal et al., 1998). Например, если потеря обоняния не влияет на пролиферацию, миграцию и интеграцию нейронов, то обонятельная депривация увеличивает число погибших клеток (Petreanu, Alvarez-Buylla, 2002) и уменьшает общее количество новых нейронов в обонятельной луковице (Bastien-Dionne et al., 2010). И наоборот, нахождение в обогащенной запахом среде увеличивает число новых нейронов (Bovetti et al., 2009). Высокая митотическая активность в оптическом тектуме может иметь функциональную значимость для рыб, так как визуальная информация играет важную роль в процессе брачного поведения (Loureiro et al., 2008). Например, у *Austrolebias affinis* по сравнению с *Austrolebias reichert*, отмечался индекс пролиферации в два раза выше в зонах, связанных с визуализацией (оптический тектум и продольный торус). Но у *A. reichert* индекс пролиферации в обонятельной луковице был выше, чем у *A. affinis*. Предполагают, что у *A. reichert*, как у более эволюционно продвинутого вида сильнее развито обоняние (Loureiro et al., 2008).

1.7. Маркёры нейрогенеза

1.7.1. Маркёры клеточной пролиферации и стволовых клеток

Предполагают, что огромное количество молекулярных сигналов должны действовать сообща, участвуя в процессе клеточной регенерации. В настоящее время ведутся поиски ответов на следующие вопросы:

- 1) какие факторы контролируют пролиферацию клеток-предшественников и их миграцию;
- 2) какие сигнальные молекулы способствуют усилению пролиферации и миграции покоящихся клеток-предшественников.
- 3) Какие астроглиальные сигналы действуют на НСК, радиальные глиальные клетки-предшественники или на дифференциацию астроцитов?
- 4) Какие клеточные линии могут взаимодействовать в ЦНС и насколько они пластичны?

5) Что влияет на то выйдут ли НСК из состояния покоя, будут ли самообновляться или дифференцируются?

Открытие маркёров глиальных, нейрональных и делящихся клеточных типов и дальнейшее использование новых методов способствовало более детальному выявлению вновь созданных нейронов. Исследования данных вопросов проводятся с использованием ретровирусов и маркирования 5-бромдезоксисуридина (BrdU). В настоящее время активно развиваются дополнительные методы верификации отслеживания судьбы новых клеток. Флюоресцентные маркёры интегрируют с ретровирусами для установления точного времени образования и дальнейшего отслеживания развития клеток (Van Praag et al., 2002). Данные методы изучают динамику трансгенных векторов, коротких-шпилек РНК и сайт-специфических рекомбиназ. Однако исследования с помощью нейронов, помеченных ретровирусами, осложнены процедурой трансфекции, требующей инъекции вирусных частиц с помощью нейрохирургических методов.

Даблкортин – ассоциированный с микротрубочками белок, экспрессирующийся вновь-созданными нейронами и мигрирующими нейронами, что связывают с процессами нейрогенеза. Также его экспрессия может быть важна при росте аксонов или синаптогенезе: явлениях, продолжающихся у взрослых нейронов. Даблкортин локализуется как в цитоплазме, так и в ядре клетки, его наличие характерно для большинства внутриклеточных процессов (Schaar et al., 2004), и обнаружен в конусе роста дендритов. Он экспрессируется во время нейрогенеза у взрослых животных и выявлен при миграции некоторых типов клеток (Ambrogini et al., 2004). Экспрессия даблкортина сохраняется в постмитотических нейронах и совпадает с экспрессией кальретинина (Brandt et al., 2003). Предполагают, что экспрессия даблкортина может быть необходима для нейрональной пластичности взрослых нейронов. Его экспрессия была показана в униполярных кисточковых нейронах (UBC) в дорсальном кохлеарном ядре и в вестибуло-латеральной области мозжечка старых крыс. Возможно, экспрессия даблкортина во взрослых UBC, свидетельствует об уникальной роли в пластичности этих нейронов (Paolone et al., 2014). У *Nothobranchius furzeri* экспрессия даблкортина крайне сильно снижается с возрастом, как и у всех видов млекопитающих, изученных на данный момент (Ben Abdallah et al., 2010; Knoth et al., 2010). Предполагают, что

снижение митотической активности идет параллельно со снижением маркирования даблкортина (Tozzini et al., 2012).

Нестин – белок промежуточных филаментов, экспрессируется НКП во взрослом мозге в СВЗ бокового желудочка и СГЗ зубчатой извилины. В дифференцированных клетках заменяется на экспрессию белков, специфичных для нейронов или глии. Хотя значительное внимание уделяется изучению НКП СВЗ и СГЗ во взрослом мозге, относительно мало сведений о том существуют ли нестин-экспрессирующие нейронные клетки вне СВЗ и СГЗ (Hendrickson et al., 2011). Нестин-позитивные клетки могут образовывать нейроны и глию во время дифференциации (Mahler, Driever, 2007). Влияет на движение везикул в клетке, обеспечивая структурную и функциональную поддержку во время клеточной пролиферации (Carmona et al., 2011). Может контролировать локализацию и расхождение промежуточных белков в цитоскелете, воздействуя, таким образом, на клеточные компоненты во время митоза (Chen et al., 2010). Нестин экспрессируют клетки-предшественники нейроэпителиальных клеток в нейрогенных нишах мозжечка *D. rerio*, сохраняющие контакт с апикальной стороной желудочков, как клетки-предшественники субпаллиума (Kaslin et al., 2009; Grandel, Brand, 2013). Нестин и Sox2 – два наиболее хорошо описанных нейрональных маркера НКП, которые не экспрессируются зрелыми нейронами, что делает их хорошими кандидатами для изучения клеток-предшественников допаминэргических нейронов (Albright et al., 2016). Экспрессия Sox2 выявлена в НКП у эмбрионов, а также в нервных стволовых клетках в мозге взрослого *D. rerio* (Kaslin et al., 2009; März et al., 2010). После травмы мозга в зонах повреждения обнаружены как нестин, так и даблкортин-иммунопозитивные клетки, однако экспрессия данных факторов может не выявляться во время нейрогенеза. Это связано с ограниченной специфичностью данных маркеров.

Возможность иммуномаркирования клеток нейронспецифичными маркерами (NuCD, нейрогенин) свидетельствует о последующей дифференциации клеток данного типа в нейроны. Нейрогенин 2, представляет собой трансмембранный белок, содержащий внеклеточные домены с ламинин-подобными белками. Его экспрессируют популяции клеток-предшественников в постнатальный период онтогенеза мозга. Среди этих клеток различают две субпопуляции: с высокой пролиферативной активностью и способностью к миграции и медленно пролиферирующую, не способную к дальнейшей миграции (Aguirre et al., 2004). В постмитотических нейронах экспрессия нейрогенина

ограничена. Данный белок обычно локализован в ядре, цитоплазма клеток нейрогенином не маркируется, в некоторых случаях маркируются нейриты. Нейрогенин, связываясь с ДНК, может выступать в качестве транскрипционного фактора, экспрессируемого во время терминальной дифференциации (Sarnat et al., 1998). В патологических условиях иммунореактивность к нейрогенину может снижаться. Однако при изучении нейрогенеза отсутствие иммуномаркирования нейрогенином не обязательно означает отсутствие нейронов (Unal-Cevik et al., 2004)

Остается актуальным вопрос по поводу оптимального метода для выявления ранней G1 фазы клеточного цикла. Ki-67 – ядерный белок, экспрессирующийся во время деления хромосом и позволяет выявить специфические временные рамки и встраивание BrdU в клетке может быть отслежено по времени. В СГЗ гиппокампа нормального взрослого мозга небольшое число клеток маркируются Ki-67 или BrdU вдоль зубчатой извилины (Kee et al., 2002).

Ретровирусная трансфекция эффективна при идентификации вновь созданных нейронов, поскольку патологические, фармакологические и экологические манипуляции модулируют конститутивный нейрогенез (Ming, Song, 2011). Примечательно, что эта область активных исследований постоянно совершенствуется новыми трансгенными подходами (Zhang et al., 2010). У трансгенных мышей образуются клетки-предшественники, ограниченно экспрессирующие флюоресцентные маркёры. Создание клеток-предшественников и незрелых нейронов в зубчатой извилине гиппокампа мыши регулируется посредством нестин продуцирующего гена, который кодирует зелёный флюоресцентный белок GFP (Filipov et al., 2003). Под транскрипционным контролем пропигмеланокортина геномные последовательности в трансгенах обеспечивают экспрессию в незрелых гранулярных клетках зубчатой извилины (Overstreet et al., 2004). Можно исследовать популяции клеток-предшественников, основываясь на особых свойствах их мембран. Новые клетки демонстрируют высокую устойчивость по отношению к внешним раздражителям и низкий порог для активации синаптической пластичности в незрелых гранулярных нейронах гиппокампа (Schmidt-Hieber et al., 2004).

1.7.2. Молекулярная идентификация белков, связанных с регенерацией

Молекулярная идентификация сигналов, регулирующих процессы регенерации, стала возможна с появлением протеомного анализа (Zupanc, Zupanc, 2011). В исследованиях на мозжечке электрической гимнотиформной рыбы *A. leptorhynchus* были показаны возможности этого подхода при изучении процессов регенерации. Когда исследовали ткань мозжечка, взятую на третьи сут после травмы, отметили заметное увеличение числа новых нейронов, созданных взамен клеток, уничтоженных в месте повреждения (Zupanc, Ott, 1999). В последующих исследованиях с помощью определения массы пептида методом масс-спектрометрической фрагментации идентифицировали до 24 различных белков – регуляторов. В настоящее время эти белки можно разделить на три группы.

Первая группа включает белки цитоскелета α -актин и β -тубулин, необходимые для формирования новых клеток. Восстановление поврежденных аксонов и их развитие у новых клеток в районе травмы и определяется дифференциальной экспрессией α -актина. Последняя необходима для появления аксональных отростков и формирования необходимых условий для их удлинения и поддержания структуры мембраны в районе конуса нарастания (Lund et al., 2002). Роль же β -тубулина, предположительно связывают с созданием новых эндотелиальных клеток, так как его экспрессия увеличивается на месте травмы в течение нескольких сут после нанесения колотой раны. β -III-тубулин представляет собой другую разновидность нейронального пептида, который в нейрогенных зонах экспрессируют незрелые нейроны. В первую группу входят регуляторные белки, отвечающие за правильную сборку этих структурных белков. Например, белок шаперон, содержащий комплекс полипептидов 1, субъединицы которых могут обеспечивать сопровождение цитоскелетных белков тропоподулинов-3 и -4. Данные белки блокируют сборку медленно растущих концов актиновых нитей. Вторая группа состоит из белков, предположительно отвечающих за клеточную пролиферацию (такие как кератин-10), клеточную подвижность (например, тяжелые цепи миозина), защиту нейронов (белки массой 78 kDa: ГС и аспартат аминотрансфераза) и энергетический метаболизм (β -энолаза и АТФ-синтаза). Третья группа состоит из одного белка, относящегося к семейству т.н. транскрипционных «цинковых пальцев 2», синтезируемых в костном мозге (Chen, Yu, 1999).

1.7.3. Выявление пролиферирующих клеток *in vivo*

Для статистически достоверной оценки индекса пролиферации (доли пролиферирующих клеток) обычно учитывают общую продолжительность М-фазы в клеточном цикле, данные о несинхронности митозов в делящихся клетках различных типов. Для этого требуется детальное наблюдение за поведением клеточной популяции и подсчет митотического индекса. В последнем случае используют методы, основанные на маркировании пролиферирующих клеток во время S-фазы клеточного цикла. В частности, метод экзогенного введения нуклеотидных аналогов в новую синтезированную цепь ДНК. На более поздних стадиях митоза методами гибридизации *in situ* можно идентифицировать определенные молекулы, экспрессирующиеся на различных фазах клеточного цикла в процессе подготовки клетки к делению. Подобные молекулы рассматриваются в качестве маркёров клеточной пролиферации (Fesus, Piacentini, 1991). Данные методы основаны на использовании нуклеотидов (³H-тимидин) меченых радиоактивными изотопами или аналогов нуклеотидов, таких как BrdU или 5-йододезоксиуредин (IdU), которые специально вводят в ДНК и далее выявляют с помощью методов автордиографии и иммуноцитохимии. Эти подходы обеспечивают точную идентификацию пролиферирующих клеток и, следовательно, и общую оценку индекса пролиферации.

Впервые изотопы использовались в исследованиях, связанных с развитием ЦНС (Altman, Bayer, 1978). В то время чаще всего использовался нерадиоактивный BrdU, так как считалось, что он достаточно прост в применении и не требует ограничений безопасности при работе с ним (Del Rio, Soriano, 1993). Изотопные и неизотопные методы хорошо дополняли друг друга, поскольку являлись высокоспецифичными. Таким образом, высказанные ранее опасения, что иммуноцитохимическое маркирование (ИЦХ-маркирование) окажется менее специфичным, чем использование радиоизотопов в экспериментальных исследованиях, не были подтверждены. В настоящее время для маркирования пролиферирующих клеток *in situ* наряду с внутрибрюшинным введением трассера, широко используются моноклональные антитела против BrdU. Комбинированное использование антител при двойном маркировании позволяет специфически выявлять BrdU или IdU. В частности, при исследовании временной динамики клеточной пролиферации, что раскрывает дополнительные возможности для кинетических исследований клеточного цикла (Sato et al., 1995). В процессе включения в

ДНК родительской клетки маркёры поровну распределяются между двумя дочерними клетками. Таким образом, можно проследить метку в течение нескольких клеточных поколений в соответствии с кинетическими параметрами клеточного цикла и жизнеспособностью самого животного. Рассчитав время, необходимое для проведения трассирования в новом поколении клеток, можно получить информацию о продолжительности различных фаз клеточного цикла (Bayer, 1983). BrdU представляет собой модифицированный нуклеозид, используемый в исследованиях, связанных с количественной оценкой нейрогенеза. Во время S-фазы клеточного цикла при репликации ДНК происходит его встраивание в структуру молекулы. Данный метод может выявлять увеличение количества клеток-предшественников или изменения в клеточном цикле, восстановление ДНК (Selden et al., 1993), апоптоз (Katchanov et al., 2001) или развитие тетраплоидности у клеток (Yang et al., 2001). Связь между клеточной пролиферацией и встроенным BrdU использовали при изучении пролиферации в развивающейся ЦНС (Nowakowski et al., 1989). Из-за высокой токсичности и способности легко и быстро встраиваться в структуру ДНК, BrdU является причиной мутаций. Он вызывает гибель клеток, образование тератом, изменяет стабильность ДНК, удлиняет клеточный цикл и имеет митогенное, транскрипционное и трансляционное воздействие на клетки, которые его включают (Taupin, 2007). Таким образом, при планировании исследований с участием BrdU значительное внимание уделяется тщательному подбору рабочей концентрации. Для этого используются как рекомендации фирм-производителей, так и наиболее результативные и общепринятые методические источники (Sekerkovga et al., 2004). Токсические эффекты BrdU были обнаружены главным образом в исследованиях на млекопитающих (Goldsworthy et al., 1992), в экспериментах на птицах подобного эффекта выявлено не было (Cattan et al., 2015). Показано, что BrdU не влияет на деление клеток в вентрикулярной зоне после экспериментального введения, в частности, не были выявлены отличия в размерах клеточных ядер. Таким образом, BrdU не оказывает долговременного воздействия на функции нейрогенеза (Cattan et al., 2015). Токсические эффекты BrdU могут являться причиной нарушений в транскрипции ДНК и трансляции белка. Это приводит к последующим мутациям, оказывающим влияние на общее состояние и поведенческую активность организма животных, как во время эмбриогенеза, так и в постэмбриональный период (Biggers et al., 1987; Kolb et al., 1999). Токсическое

воздействие BrdU может являться причиной ненормальной пролиферации *in vivo*, хотя данные относительно влияния на конститутивный нейрогенез остаются противоречивыми (Hancock et al., 2009). Исследования на млекопитающих показали, что концентрации BrdU 50–300 мг/кг не приводят к патологическим эффектам (Cooper-Kuhn, Kuhn, 2002).

Использование иммуноцитохимических методов, основанных на выявлении специфичных маркёров пролиферирующих клеток, еще недавно было сопряжено с рядом проблем. В частности, при исследовании материала человека или тканей животных применение изотопных или неизотопных нуклеотидов было крайне ограничено по разным причинам. Их можно было применять на замороженных срезах или в залитом в парафин материале. Молекулы, предложенные как маркёры клеточной пролиферации, связаны с процессами клеточного цикла и могут помочь оценить метаболическую активность, которая увеличивается во время пролиферации. Существуют очевидные преимущества и недостатки, связанные с использованием подобных эндогенных маркёров в качестве инструмента для выявления пролиферирующих клеток по сравнению с методами, основанными на маркировании вновь синтезированной ДНК. Преимущества заключаются в относительной простоте при использовании и в том, что экспериментальное маркирование *in vivo* не требуется. К недостаткам можно отнести некоторую неопределенность в отношении реальной специфичности данных маркёров. Существует вероятность того, что, по крайней мере, некоторые из подобных молекул не экспрессируются в клетках, находящихся в процессе деления и/или на стадии подготовки к делению. Некоторые сохраняются в течение довольно долгого времени в постмитотических элементах, но процессы фиксации и обработки ткани могут значительно повлиять на способность антигенов специфически связываться с антителами в иммуногенных эпитопах (Collan et al., 1994). Это особенно важно при экспериментальных исследованиях, когда необходимо селективно маркировать пролиферирующие клеточные популяции в заданных временных рамках.

1.7.4. Иммунокрашивание молекулярными маркёрами апоптоза

Некоторые белки, в норме экспрессирующиеся внутри клетки, могут перемещаться на поверхность плазматической мембраны во время апоптоза. Это – отличительная особенность апоптозных клеток. Ряд антител, выработанных против различных молекул, которые индуцируются и/или активируются во время апоптоза,

включает в себя тканевую глутаминазу (Ghibelli et al., 1991) и CD4 молекулы клеточной адгезии (Ish-Shalom et al., 1997). Фрагментация ДНК на олигомеры небольших размеров (Dun Lop, Morris, 1984) является биохимическим идентификатором процессов апоптоза. Она выглядит как нуклеосомная «лестница» ДНК, которая идентифицируется при электрофоретическом разделении ДНК на агарозном геле следующим образом: ДНК нуклеазы разрезают хроматин, образуя фрагменты двойной цепи ДНК, по размерам соответствующим олигомерам нуклеосом.

Важным достижением в выявлении апоптозных клеток *in situ* при световой и флуоресцентной микроскопии стало появление метода «меченных концов»: различные ДНК модифицированные белки, присоединяют меченые нуклеотиды к свободным концам фрагментированной ДНК. В результате расщепления ДНК при апоптозе возможно формирование двухцепочечных моно- и/или олигонуклеосом с низкой молекулярной массой или образование разрывов в одноцепочечной ДНК с высокой молекулярной массой. Эти разрывы цепи ДНК могут быть обнаружены путем ферментативного маркирования свободных концов 3' ОН с измененными нуклеотидными последовательностями. Обычно dUTP связывается с флуорохромом, биотином или дигоксигенином.

ISEL метод включает *in situ* ник-трансляцию с ДНК полимеразой 1 или неизменной T7 полимеразой, маркирование терминальной диоксинуклеотид трансферазой (TdT) и связывание диогсигенин маркированной двойной цепочки ДНК с T4 ДНК-лигазой (Bonfanti, Fasolo, 1997). ДНК полимеразы катализируют образцы добавляемых нуклеотидов, и они достраивают двухцепочечную молекулу ДНК в местах разрывов. Немодифицированная T7 ДНК полимеразы – постоянно работающая матрица ДНК 5'-3'полимеразы и 3'-5'эндонуклеазы для 3' ОН-акцепторных групп на встраиваемых или «липких» концах ДНК (Dipasquale, Wood, 1993).

TdT – необычный вид ДНК полимеразы, обнаруженный в предшественниках лимфоцитов на ранних стадиях их дифференциации (Beach et al., 1992). Она катализирует образцы дезоксирибонуклеотидов трифосфатов, присоединяемых к 3' ОН концам двух или одноцепочечной ДНК. Маркированные TdT энзимом терминальные последовательности (TUNEL – терминальное дезоксиуридиновое мечение концов ДНК) считаются более чувствительными, быстрыми и специфичными, чем ник-фрагменты. Данный метод маркирования апоптозных клеток *in situ* успешно применяется в

ультраструктурных исследованиях. При электронно-микроскопических исследованиях TdT-энзим был использован для ферментативного связывания 11-диоксигенина с фрагментированными участками ДНК в апоптозных клетках, конъюгированных с меченных золотом антителами (Nishikawa, Sasaki, 1995).

T4 ДНК лигаза используется для сшивания *in situ* фрагментов двухцепочечной ДНК, маркированных *in vitro* с диоксигенином (Texas Red®) или разрывов двухцепочечной ДНК с одной основной цепью в апоптозных ядрах (Greco et al., 1998). Такой подход показывает высокую специфичность апоптозной ДНК без ложных позитивных результатов, которым присуще наличие ДНК, поврежденной в результате некроза, автолиза *in vitro*, тепловой денатурации.

1.7.5. Специфические маркёры нейрональной дифференциации

Полисиаловая кислота является специфичным маркёром нейрональных популяций в нейрогенных зонах. Данный маркёр, снижающий клеточную адгезию, был выявлен в мигрирующих нейронах, что позволило идентифицировать 2b и 3 – клеточные типы в зубчатой извилине и С-клетки в СВЗ гиппокампа и в РМП (Seki, 2002). Полисиаловая кислота, как полагают, экспрессируется во время нейрональной дифференциации. Её наличие связывают с синаптической пластичностью. В нейрогенных же зонах экспрессия полисиаловой кислоты наблюдается одновременно с экспрессией даблкортина.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Сима (*Oncorhynchus masou*, Brevoort, 1856) – самый южный и наиболее тепловодный вид семейства лососёвых (Аннотированный каталог, 1998). Пресноводная и проходная формы обитают только на азиатском побережье Тихого океана от Японии до Амура, Сахалина и западных берегов Камчатки (Токранов, Бугаев, 2011). В Приморье, на о. Сахалин, в Японии является объектом аквакультуры и промысла (Дронова, Спиридонов, 2008). Сима является дальневосточным видом-эндемиком Азии с самым узким ареалом обитания среди тихоокеанских лососей (Карпенко, 2013). Длина тела наиболее крупных особей может достигать до 71 см и масса до 9 кг. Но чаще встречаются рыбы с длиной тела 45–60 см и массой от 1.5 до 3 кг. В возрасте 3–7 лет достигает половозрелости, из них обитая 1–3 года в реке и остальное время в море. В период с мая по июль заходят на нерест в реки, с конца июля до сентября нерестятся в верховьях реки и ключевых притоках. После короткого инкубационного периода (до 50 суток) молодь выклёвывается и продолжает обитать в том же месте, в основном, где проходил нерест. Через 1–3 года молодь скатывается в море (Есин и др., 2009). Для симы характерны четкие овальные пятна на теле, короткая голова и крупные зубы (Семенченко, 1980). Сима – самый теплолюбивый вид лососей и главные районы её нагула: воды Японского моря с наиболее высокой температурой. В Приморье и на Сахалине, где ежегодно добывают менее 10 тон, сима имеет незначительное промысловое значение. На Камчатке запасы симы не позволяют ей стать объектом специализированного промысла. Естественное воспроизводство симы в последние годы находится на низком уровне из-за сильно развитого браконьерства и больших объёмов незаконной добычи и нарушений естественных местообитаний (Карпенко, 2013). Промысел симы, в основном, зависит от искусственного воспроизводства на государственных и частных заводах и поддержания численности (Ресурсы поверхностных вод СССР, 1972).

Процессы конститутивного и репаративного нейрогенеза исследовали на 210 годовалых особях молоди симы *O. masou*, с длиной тела 9–11.5 см и массой 20–35 г. Животные были получены с Рязановского экспериментального производственного рыбозавода с 2015 по 2018 г. Симу содержали в аквариуме с аэрируемой пресной водой при температуре 16–17°C, с одноразовым кормлением за сутки.

Соотношение освещенного и темного периодов в сутках составляло 14/10 ч. Содержание растворенного кислорода в воде составляло 7–10 мг/дм³, что соответствует нормальному насыщению. Все экспериментальные манипуляции с животными были проведены в соответствии с правилами, регулируемые уставом Национального научного центра морской биологии А.В. Жирмунского ДВО РАН и Этической комиссией, регламентирующей гуманное обращение с экспериментальными животными (no.4-031018).

Животные были разделены на три группы. Животные в контрольной группе были интактными ($n = 100$), экспериментальные группы состояли из рыб с повреждением мозжечка ($n = 100$) или конечного мозга ($n = 10$), которые были исследованы после нанесения механического повреждения.

2.2. Экспериментальное повреждение мозжечка

Повреждение проводили согласно методике Зупанка и Отта (Zupanc, Ott, 1999): путем прокалывания черепа рыбы тонкой стерильной иглой наносили рану глубиной в 1 мм в парасагиттальном направлении в область тела мозжечка с последующим инъецированием карбоцианинового красителя 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметелиндокарбоцианин перхлорат (Sigma-Aldrich, США) в зону повреждения. Зона травмы охватывала как дорсальный молекулярный, так и гранулярный слой тела мозжечка и не затрагивала другие части головного мозга. Общая глубина прокола в среднем составляла 1205.7 мкм. Сразу после механического повреждения животных выпускали в аквариум с пресной водой для их восстановления и дальнейшего мониторинга. В течение первого часа после повреждающего воздействия проводили видео мониторинг изменений двигательной и поведенческой активности у рыб в экспериментальной группе. Было выявлено, что у животных с травмой мозжечка были существенные изменения двигательной активности по сравнению с контрольной группой: они проявляли повышенную двигательную активность (выпрыгивали из воды и совершали вращательные движения (Sinyakov et al., 2017). Данные наблюдения свидетельствуют о нарушении структуры мозжечка и нижерасположенных двигательных центров ретикулярной формации. В области травмы отчетливо визуализировалась небольшая гематома размерами 1–2 мм.

Для сравнительной оценки воздействия травмы другого отдела на эффекты в мозжечке исследовали травму конечного мозга по методу Кишимото с соавторами

(Kishimoto et al., 2012). Тонкой стерильной иглой наносили рану глубиной в 1 мм в правое полушарие конечного мозга с последующим инъекцированием карбоцианинового красителя 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметелиндокарбоцианин перхлорат (Sigma-Aldrich, США) в зону повреждения.

Для оценки пролиферативной активности клеток с помощью маркирования BrdU в обеих экспериментальных группах одновременно с повреждением мозжечка или 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 ($n = 5$) была введена только интраперитонеально инъекция 10 мг/мл раствора BrdU (Sigma-Aldrich, США) в расчете 20 мкл/г массы тела.

2.3. 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). Для характеристики процессов апоптоза, пролиферации, глиогенеза, нейропротекции и нейродифференциации были использованы методические подходы, связанные с выявлением иммуногистохимической активности.

Исследование травматического воздействия было проведено в краткосрочный период: 1, 2 и 3 сут, соответственно, табл. 1. В указанные временные промежутки, согласно данным литературы, наблюдаются наиболее выраженные эффекты: апоптотические и пролиферативные (Zupanc, Sîrbulescu, 2013), нейрогенные и нейрональной дифференциации (Zupanc, Ott, 1999). Для различных маркёров сроки наступления подобных изменений отличаются (Clint, Zupanc, 2001).

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 суток 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.

Таблица 1 – Основные характеристики эксперимента на молодых симы *O. masou*

no	Возраст	Антитела	Срок повреждения
1	Год	GFAP	1 сут
2	Год	CBS	1 сут
3	Год	НuCD	2 сут
4	Год	PCNA	2 сут
5	Год	Нестин	2 сут
6	Год	Виментин	2 сут
7	Год	BrdU	3 сут
8	Год	ГС	3 сут

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%-ном растворе перекиси водорода в течение 3 минут, 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 TdT-энзима (55 мкл/5 см²) и инкубировали в термостате 1 час при температуре 37°C. После этого срезы мозга погружали в стоп-буфер на 10 мин, после чего троекратно промывали фосфатным буфером по 1 минуте в каждой смене раствора. На срезы наносили 65 мкл/5 см² конъюгат антидиоксигенина и инкубировали в термостате 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 трех сменах

фосфатного буфера и монтировали на предметные стёкла. Для идентификации иммунонегативных нервных клеток полученные препараты выдерживали в течение 15 минут в водном растворе ядерного красителя метилового зеленого (Меркулов, 1969), затем промывали дистиллированной водой в течение 10 с. Обезвоживали по стандартной методике: дифференцировали 10 с в 96% этиловом спирте, затем такое же время в растворе изобутанола. На последних этапах использовали две смены ксилола, по 15 минут в каждой и заключали под покровные стёкла 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). На последнем этапе промывали в дистиллированной воде 3 минуты. 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 минут на льду. Далее инкубировали в 1 М HCl в течение 10 минут при комнатной температуре, затем 20 минут при температуре 37°C. Сразу после инкубации с кислотами срезы были нейтрализованы в 0.1 М боратном буфере в течение 10 минут при комнатной температуре, промыты в фосфатном буфере PBS (pH 7.4) и трижды промыты по 5 минут 0.1% тритоном X-100. Далее на срезы наносили 1% раствор перекиси водорода, разведенный 0.1 М фосфатным буфером (pH 7.2), инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре и трижды промывали по 5 минут 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 минут и далее промывали в трех сменах 0.1 М фосфатного буфера в течение 5 минут. Затем срезы инкубировали с вторичными биотинилированными 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 трех 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. 2). Затем срезы инкубировали с вторичными биотилинированными антителами лошади против иммуноглобулинов мыши (Vector Laboratories, Burlingame, USA). ИГХ реакцию проявляли с помощью стрептовидин-биотиновой системы 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 трех сменах дистиллированной воды для удаления солей. Обезвоживание и заключение препаратов проводили по вышеприведенной схеме. Оценку конститутивного и репаративного нейрогенеза проводили с помощью ИГХ PCNA, ГС, 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. 2). Для устранения неспецифической активности эндогенной пероксидазы свободноплавающие срезы в течение 20 минут при комнатной температуре инкубировали с 1% раствором перекиси водорода на 0.1 М фосфатном буфере, после чего трехкратно 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 $4^{\circ}C$ в течение 1 сут. После чего промывали в трех сменах 0.1 М фосфатного буфера. Для иммуномаркирования срезы инкубировали с

вторичными биотилинированными антителами лошади против иммуноглобулинов мыши при комнатной температуре в течение 2 ч. После чего промывали в трех сменах 0.1 М фосфатного буфера (pH 7.2). Для визуализации ИГХ маркирования была использована стандартная авидин-биотиновая система визуализации АВС-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 трех сменах дистиллированной воды для удаления солей. Обезвоживали в соответствии со стандартной вышеприведенной процедурой и заключали под покровные стёкла в среду Bio-optica (Италия).

Таблица 2 – 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	ГС	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)

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

2.4. Обработка данных. Микроскопия

Для визуализации и проведения морфологического и морфометрического 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). Анализ материала осуществляли с помощью программы AxioVision. Измерения проводили в пяти случайно выбранных микроскопических полях для каждой области исследования. Площадь нейрогенных ниш измеряли в пяти случайно выбранных тест-полях в каждой зоне и брали среднее значение. Микрофотографии препаратов получали с помощью цифровой камеры Axiovert 200. Обработка материала проводили с использованием программы AxioImager и в графическом редакторе Corel Photo-Paint 12.

Денситометрия. Измерение оптической плотности (ОП) продуктов ИГХ маркирования в телах нейронов и иммунопозитивных гранулах проводили с помощью программного обеспечения микроскопа Axiovert 200-M. Для этого в программе Wizard вели стандартную оценку оптической плотности на 5–7 препаратах, выбирая для анализа 10–15 интенсивно/умеренно маркированных и иммунонегативных клеток одного типа. Далее из максимального значения оптической плотности для иммунонегативных клеток (фона) вычитали усреднённое значение оптической плотности для каждого типа клеток, получая фактическое значение в относительных единицах оптической плотности (ЕОП).

Статистическая обработка материала. Количественную обработку морфометрических данных ИГХ-маркирования выполняли с использованием программных пакетов Statistica 12 и Microsoft Excel 2010. Все данные представлены в виде: среднее±стандартное отклонение ($M \pm SD$) и проанализированы с помощью программного приложения SPSS (версия 16.0; SPSS Inc., Chicago, Illinois, США). Все изменения в группе сравнивались с использованием *t*-критерия Стьюдента или однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим анализом Ньюмена-Кеулса. Значения при $P < 0.05$ и $P < 0.01$ считались статистически значимым.

Плотность распределения клеток оценивали с помощью методов вариационной статистики. Индекс апоптоза (ИА) рассчитывался с помощью программного

обеспечения инвертированного микроскопа Axiovert 200 в пяти случайно выбранных микроскопических полях для каждой области исследования. Количественные данные по апоптозу представляли в виде ИА, рассчитанного на профильное поле по формуле.

$$\text{Апоптозный индекс} = \frac{n \text{ TUNEL-позитивных ядер}}{\text{общее } n \text{ ядер}} * 100\%$$

Где n TUNEL-позитивных ядер – количество апоптотических клеток, n – общее количество клеток в исследуемой совокупности. Для количественной оценки результатов был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), с последующим анализом Ньюмена-Кеулса; данные представлены в виде: среднее±стандартное отклонение ($M \pm m$).

Пролиферативный индекс рассчитывали путем подсчета количества положительно окрашенных клеток на 100 ядер (в процентах) из пяти случайно выбранных полей, с использованием программного обеспечения Axiovision (Carl Zeiss, Германия).

$$\text{Пролиферативный индекс} = \frac{n \text{ BrdU-позитивных ядер}}{\text{общее } n \text{ ядер}} * 100\%$$

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Морфологическая структура мозжечка молодежи симы *O. masou*

При окраске мозжечка молодежи симы толуидиновым синим по Нисслю были визуализированы молекулярный, гранулярный и ганглионарный слои клеток (рис. 1).

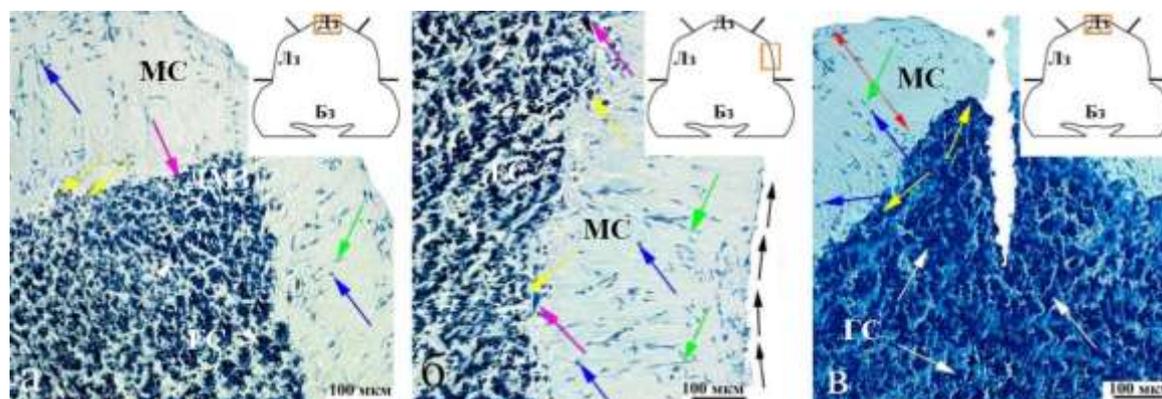


Рисунок 1 – Морфологическая структура мозжечка при окраске по Нисслю. а – дорсальная зона интактного мозжечка; б – латеральная зона поврежденного мозжечка; в – дорсальная зона поврежденного мозжечка. Чёрными стрелками отмечена тангенциальная миграция, красной – радиальная, синими – клетки 1 типа, зелёными – 2 типа, желтыми – клетки Пуркинью, розовыми – эвридендроидные и белыми – клетки 5 типа. Чёрной звездочкой обозначено место прокола. Мс – молекулярный слой, ГС – гранулярный слой.

В соответствии с классификацией Пуэлиса (Pouwels, 1978b), в мозжечке молодежи симы было выделено 5 клеточных типов нейронов: гранулярные клетки и клетки Гольджи в гранулярном слое, клетки Пуркинью (ПК) и эвридендроидные (ЭДК) в ганглионарном и звездчатые клетки в молекулярном. Для характеристики тела мозжечка рассматривали дорсальную, латеральную и базальную зоны, границы которых приведены на рис. 2.

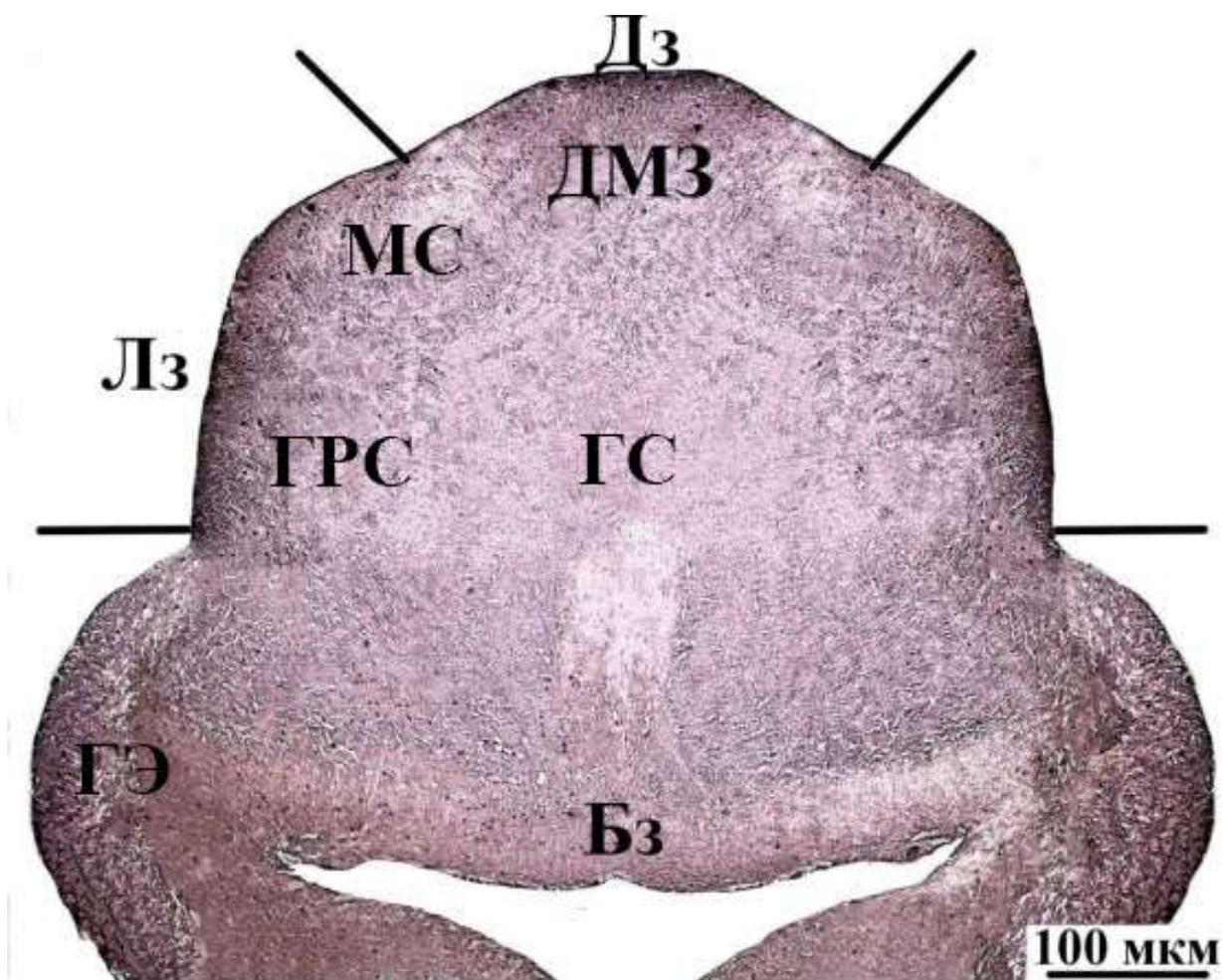


Рисунок 2 – Общий вид мозжечка *O. masou*. BrdU маркирование. Дз – дорсальная зона, Лз – латеральная зона, Бз – базальная зона, ДМЗ – дорсальная матричная зона, ГЭ – гранулярные эминенции, Мс – молекулярный слой, ГРС – ганглионарный слой, ГС – гранулярный слой.

Клеточный состав всех областей мозжечка включал пять морфологических типов клеток, морфометрические параметры которых приведены в табл. 3.

Таблица 3 – Морфометрические параметры клеток (мкм), окрашенных по Ниссию, дорсальной, латеральной и базальной зон мозжечка симы *O. masou* в норме и после механической травмы. Данные представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD – стандартное отклонение. Размеры клеток приведены как средние значения их большого и малого диаметров, указанные через косую черту.

Клеточный тип	Дорсальная зона	Латеральная зона	Базальная зона
1а, округлые			
Контроль	3.8±0.7/3.1±0.6	3.9±0.6/3.3±0.3	3.6±0.5/3±0.5
Повреждение	3.8±0.8/3.1±0.6	3.8±0.6/3.2±0.6	3.3±0.6/3±0.4
1б, округлые			
Контроль	7.5±1.2/6.2±0.9	8±1.3/6.6±1.2	7.2±1/6.8±1.1
Повреждение	8.3±1.8/7.1±1.2	8.5±1.6/7.1±1.7	7.1±1/5.8±0.8
1с, овальные			
Контроль	11.6±1.2/8.8±1.5	9.6±0.9/7.9±1.1	10.9±1/8.7±1.1
Повреждение	11±1.8/9.2±1.6	11.6±0.4/9.5±0.4	10.5±0.7/8.6±1.1
2, палочковидные			
Контроль	16.5±3.5/3.2±0.8	17.3±4.9/3.3±0.7	14.7±1.9/3±0.5
Повреждение	15.2±2.3/2.9±0.3	14.4±2.7/3±0.3	12.1±2.2/2.7±0.7
3, клетки Пуркинье			
Контроль	16±3.8/11.3±1.2	14.9±3/10.5±0.6	15.6±1.3/9.7±1.3
Повреждение	16.3±2.8/10.9±2.6	17.5±1.6/10.5±1.6	16.5±2/9.7±0.8
4, эвридендронидные			
Контроль	29.7±0.4/10.5±1.3	29.3±1.2/10.4±1.2	29.7±1.7/11.9±3.5
Повреждение	27.5±2.5/10.3±0.8	29.1±1.6/12.5±1.6	30±1.5/13.2±1
5, гранулярные			
Контроль	4.1±0.4/4±0.6	4.6±0.5/4.1±0.7	4.2±0.4/4.3±0.3
Повреждение	4.4±0.5/4±0.7	4.7±0.8/3.6±0.3	3.8±0.5/ 4.5±0.5

В молекулярном слое мы идентифицировали маленькие и большие клетки округлой/овальной формы. Мы предполагаем, что они относятся к 1 типу клеток

(звездчатые нейроны, импрегнированные по Кахалю), которые находятся на разных стадиях роста – 1а, 1б и 1с. Кроме того, мы нашли клетки 2 типа, которые имели удлиненную либо и/или палочковидную форму (табл. 3). У контрольных животных большинство округлых клеток 1 и удлиненных 2 типа были расположены в толще молекулярного слоя (рис. 1, а), где плотность распределения таких клеток была достаточно высока (рис. 3).

После травмы в толще молекулярного слоя увеличивалось число удлиненных клеток 2 типа, которые формировали радиально ориентированные, продольные ряды (рис. 1, б). Результаты количественного анализа показали, после повреждения число клеток увеличивалось в молекулярном слое дорсальной (рис. 3, а) и латеральной (рис. 3, б) зонах.

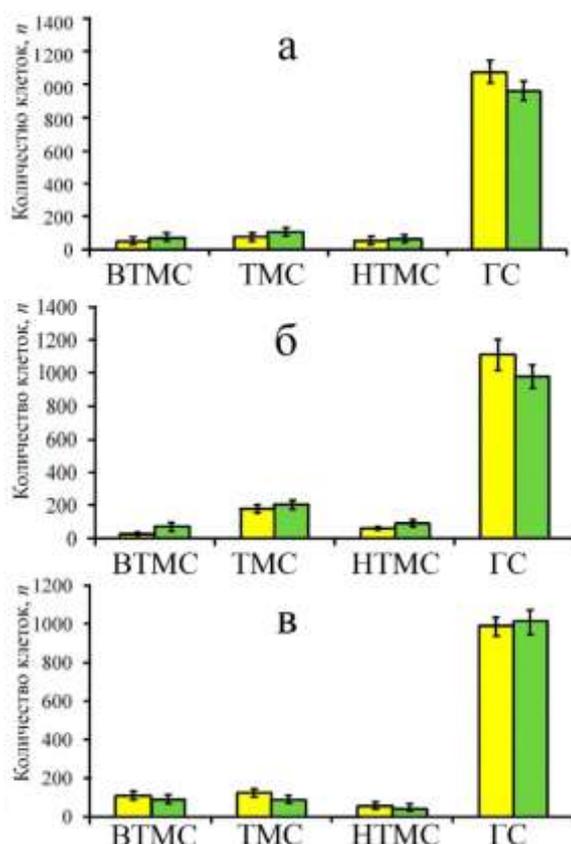


Рисунок 3 – Количество клеток, окрашенных по Нисслю в мозжечке молодежи *O. masou* в норме и после повреждения. а – дорсальная зона; б – латеральная зона; в – базальная зона. Желтые столбцы – количество клеток у интактных животных, зелёные – количество клеток у животных после повреждения. ВГМС – внешняя граница молекулярного слоя, ТМС – толща молекулярного слоя, НЧМС – нижняя часть молекулярного слоя, ГС – гранулярный слой. ($n = 5$ в каждой группе).

В молекулярном слое базальной зоны количество клеток после повреждения, напротив несколько снижалось (рис. 3, в). В ганглионарном слое толуидиновым синим окрашивались сомы грушевидных клеток Пуркинье 3 типа и удлинённые биполярные ЭДК 4 типа (табл. 3). Клетки ганглионарного слоя чаще всего были расположены в один ряд, но иногда в базальной области встречалось многорядное распределение клеток 3 и 4 типов. В поверхностной части молекулярного слоя латеральной и дорсальной зон после повреждения была выявлена тангенциальная и радиальная миграция большого числа удлинённых клеток 2 типа (рис. 1, б, в). У контрольных животных паттерны тангенциальной и радиальной миграции клеток не были выявлены. В дорсальной зоне рядом с мигрирующими клетками 2 типа наблюдались округлые клетки 1b типа, формирующие кластеры по 3–4 элемента (рис. 1, в). В базальной зоне мозжечка после травмы подобный паттерн клеточного распределения не выявлялся. В гранулярном слое была выявлена максимальная плотность распределения гранулярных клеток 5 типа и большая их часть окрашивалась толуидиновым синим, размер их сом составлял около 5 мкм (табл. 3). В дорсальной и латеральной зонах гранулярного слоя количество клеток после травмы снижалось (рис. 3 б, в). В базальной зоне число клеток несколько возрастало. В гранулярном слое изредка встречались отдельные, интенсивно окрашенные клетки, размеры тел которых превышали 5 мкм.

3.2. TUNEL-маркированные структуры в мозжечке молодежи *O. masou* в норме и после повреждения

Повреждающее воздействие наносилось в дорсальную поверхность тела мозжечка и распространялось от молекулярного слоя вглубь гранулярного слоя (рис. 4, а). Через двое суток непосредственно вблизи зоны повреждения выявлялись существенные изменения клеточного состава как в молекулярном, так и в гранулярном слоях. Наиболее характерным феноменом было возникновение обширных зон клеточной миграции из области региональных нейрогенных ниш и наиболее крупной зоны вторичного нейрогенеза ДМЗ, расположенной в дорсомедиальной части тела мозжечка (рис. 4, б). Наибольшую плотность клеток выявляли непосредственно вблизи зоны прокола, градуально снижаясь по мере удаления от области травмы. Рядом с областью травмы локализовались многочисленные TUNEL-маркируемые элементы, соответствующие различным стадиям апоптотического процесса (рис. 4, а). Так, были обнаружены плотные апоптозные тельца, представляющие собой финальные стадии

крупнозернистой конденсации хроматина и апоптотической деградации клеток. Размер апоптозных телец составлял порядка 8–10 мкм. В зонах локализации апоптозных фрагментов были выявлены крупные клетки с базофильной цитоплазмой, диаметр тел которых составлял около 13 мкм. Эти клетки, как правило, имели неправильную форму и обладали цитоплазматическими выростами. Предположительно данные структуры соответствовали региональной микроглии/макрофагам, участвующим в фагоцитозе и утилизации апоптотических фрагментов. Наряду с единичными подобными элементами встречались их небольшие конгломераты, включающие в себя до трёх апоптозных телец (рис. 4, а).

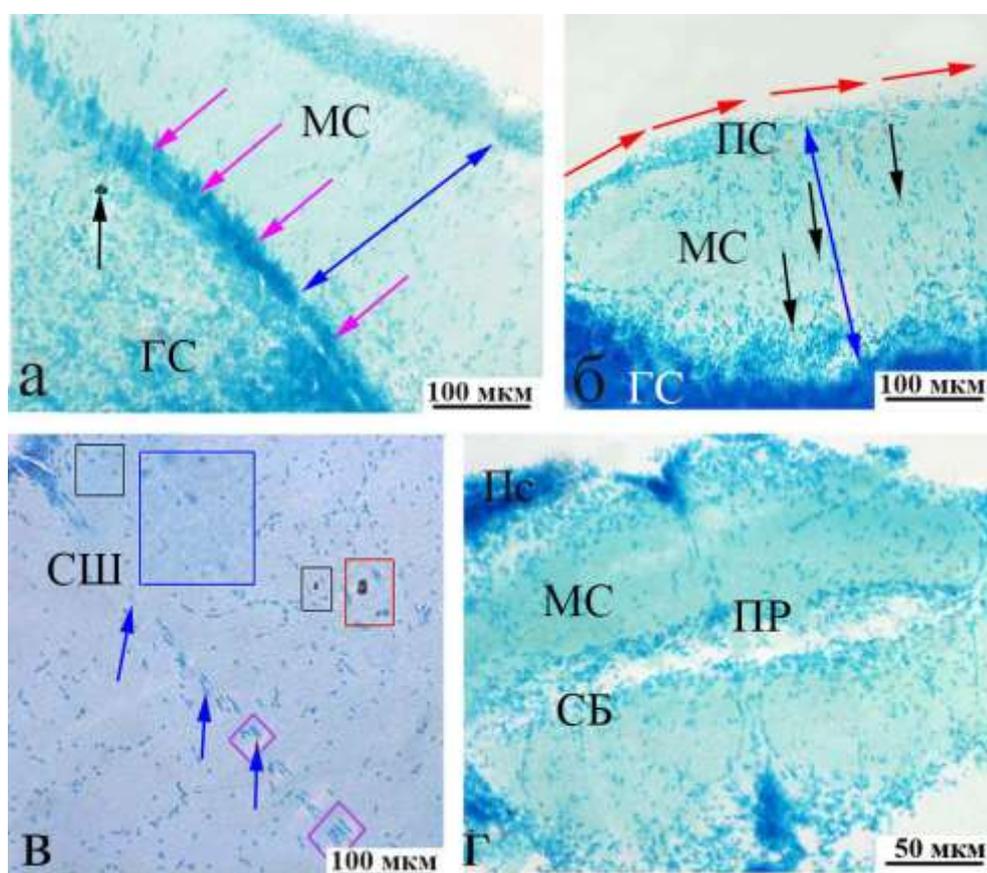


Рисунок 4 – TUNEL-маркированные элементы в повреждённом мозжечке молодёи симы *O. masou*. а – микрофотография области травмы. Розовыми стрелками отмечена область прокола, синей стрелкой – направление радиальной миграции, чёрной стрелкой отмечен апоптозный конгломерат; б – латеральная зона, содержащая в себе клетки, мигрирующие к области травмы. Красными стрелками указано направление тангенциальной миграции, синей – радиальной; чёрными стрелками показаны TUNEL-маркированные фрагменты клеток, подвергающиеся дегрануляции; в – область

срединного шва. Розовой врезкой отмечен кластер мигрирующих клеток; синяя врезка показывает фрагменты, содержащие в себе мелкие TUNEL-маркированные элементы, красная – апоптозные тельца; г – заслонка мозжечка. МС – молекулярный слой, ГС – гранулярный слой, ПС – поверхностный слой, СШ – срединный шов. ПР и СБ – перивентрикулярная и субвентрикулярная области соответственно.

Область травмы пересекала гранулярный слой, где плотность клеток была очень высокой. Этим объясняется сравнительно низкое значение ИА в соответствующих участках. Другой разновидностью апоптотических структур были мелкие TUNEL-маркированные элементы, представляющие собой дегранулированные фрагменты поврежденных клеток. Значение ИА в областях непосредственно вблизи зоны травмы составляло 0.7%. В наиболее поверхностных участках молекулярного слоя наблюдалось очень большое количество мелких клеток 1b типа, лишенных признаков морфологической дифференциации. В толще этого слоя часто присутствовали продольные ряды удлиненных клеток, ориентированные от поверхностного слоя к области травмы (рис. 4, а). Можно было выделить мигрирующие палочковидные клетки с длиной тела от 12 до 17 мкм. Мы предполагаем, что они представляют собой формы, находящиеся на разной стадии роста и относятся ко 2 типу (табл. 3). Среднее количество таких клеток на тест-поле составляло 237 ± 18 . В поверхностной зоне, для которой была характерна высокая плотность клеток, выявлялись мелкие TUNEL-маркированные элементы, соответствующие продуктам дегрануляции клеток этой области.

После нанесения повреждающего воздействия изменялся морфологический состав в различных областях молекулярного слоя – дорсомедиальной и латеральной (рис. 4, б). В зонах вторичного нейрогенеза вблизи области травмы отмечалось очень большое количество недифференцированных клеток по сравнению с аналогичными показателями в более удаленных участках. В гранулярном слое на расстоянии около 250 мкм от участка травмы плотность клеток была выше, чем в более отдаленных участках. Среднее количество клеток на тест-поле в молекулярном слое на расстоянии 100 мкм от зоны прокола составляло 271 ± 24 . Помимо изменений морфологической структуры указанных областей молекулярного слоя, в данных областях диагностировались многочисленные проявления апоптоза. Однако характер апоптотического ответа в этих участках нельзя считать идентичным таковому непосредственно в области нанесения

травмы. В молекулярном слое мозжечка плотность клеток как в поверхностной области, так и в его толще была весьма высокой. Большинство клеток имели удлиненную форму; вероятно, они находились в состоянии миграции. Помимо этого, в гранулярном слое наблюдалось значительное количество недифференцированных клеток. На тест-поле их число составляло 400 ± 35 . В области повреждения наблюдались морфологические проявления тангенциальной и радиальной миграции клеток и были диагностированы многочисленные случаи апоптоза. Большинство TUNEL-маркированных элементов выявлялись в гранулярном слое. Чаще всего это были апоптозные тельца размером около 10 мкм, которые локализовались в дорсомедиальных участках тела мозжечка, прилежащих к зоне вторичного нейрогенеза – ДМЗ. Наличие апоптозных телец в гранулярном слое, видимо, связано с повышенной морфогенетической активностью ДМЗ. Другой зоной локализации одиночных апоптозных телец являлась граница между молекулярным и гранулярным слоями. Апоптозные тельца встречались и в толще молекулярного слоя (рис. 4, б). При этом идентифицировались как фрагменты дегранулирующихся клеток, так и терминальные апоптозные тельца. Среднее значение ИА в молекулярном слое составляло 5%.

Другой областью, в которой наблюдались значительные гистологические изменения после травматического воздействия, была каудальная часть мозжечка. В пределах этой области мы обследовали ее дорсальную часть, зоны ГЭ, расположенные латерально, и область срединного шва (рис. 4, г). Данная структура в большей части был представлена молекулярным слоем. В дорсальной части отмечались весьма высокие значения количества клеток по сравнению с таковыми в интактных участках мозжечка. В зоне ГЭ встречались клетки двух типов. Первый тип соответствовал мелким округлым клеткам диаметром от 4 до 6 мкм, составляя 85% всех наблюдаемых клеток. Ко второму типу относились более крупные элементы с диаметром от 6 до 10 мкм. Таких клеток было значительно меньше (15%). Мы полагаем, что они представляли собой более дифференцированные клетки первого типа на поздних стадиях развития. В зоне срединного шва отмечалось скопление клеток, относящихся к разным типам. Среди них преобладали мигрирующие клетки, отнесенные ко 2 типу. Доля клеток этого типа составляла 62% (рис. 4, в). Среднее значение ИА в молекулярном слое составляло 8%, в пределах ГЭ – 2%, а в дорсальной и латеральной зонах – 4% и 1% соответственно.

Заслонка представляет собой эволюционно уникальную область; у рыб она является наиболее вариабельной в морфологическом аспекте частью мозжечка по сравнению с другими его отделами. Большая часть заслонки размещена под полушариями зрительного тектума в полости тектального желудочка. Заслонка представляет собой непарное образование в пределах нервной ткани мозжечка и относится к наиболее молодым (с точки зрения филогистогенеза) структурам (Андреева, Обухов, 1999). В области заслонки у симы, как и у других видов рыб, наблюдаются активные пролиферативные процессы и в период эмбриогенеза, и в более поздние периоды постэмбрионального развития. Среди других структур мозга в заслонке интенсивность пролиферативных процессов в постэмбриональный период, очевидно, наиболее высока. Таким образом, заслонка мозжечка является активно действующим центром нейрогенеза и у молодежи, и у взрослых рыб. У симы в области заслонки можно было выделить несколько зон – перивентрикулярную, окружающую церебеллярный акведук, прилежащую к ней субвентрикулярную область, молекулярный и поверхностный слои (рис. 4, г). В перивентрикулярной области плотность клеток многократно превышала таковую в других участках заслонки. В этой структуре чаще были представлены недифференцированные клетки 1 типа (70%). Популяция мигрирующих клеток 2 типа была заметно меньшей – 30%. Среднее значение ИА в молекулярном слое заслонки равнялась 5%.

3.3. Радиальная глия в интактном мозжечке молодежи симы *O. masou*

Общий вид распределения ГС-позитивных элементов в дорсальной зоне мозжечка молодежи симы показан на рис. 5, а. Во всех зонах тела мозжечка: дорсальной, латеральной и базальной были обнаружены ГС-позитивные клетки и волокна. У интактных животных на территории молекулярного слоя мозжечка симы активность ГС была выявлена в клетках 1а и 1с типа. Округлые клетки 1с типа были интенсивно маркированы, их размеры приведены в табл. 3. Клетки типа 1а имели округлое тело, но их размер был значительно меньше (табл. 3). В молекулярном слое плотность распределения ГС-позитивных элементов была выше, чем в гранулярном слое. В ДМЗ были выявлены интенсивно маркированные крупные клетки 1с типа, доля таких клеток на профильное поле в молекулярном слое составляла 51%. Клетки 1а типа имели менее интенсивное ГС-иммуномаркирование, их доля в молекулярном слое составляла 35% на профильное поле. Другой тип ГС-позитивных структур в молекулярном слое

представляли иммуномаркированные волокна. Особенности микроскульптуры позволяют выделять более толстые волокна с варикозными утолщениями и более тонкие гладкие волокна (рис. 5, в-е).

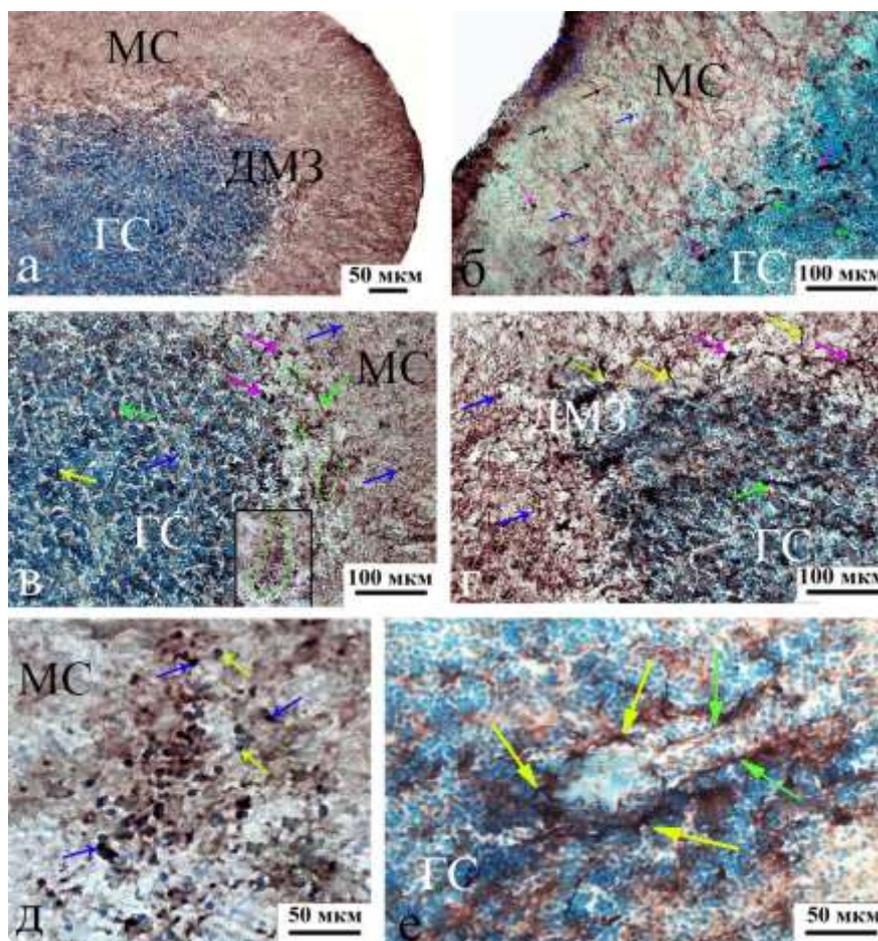


Рисунок 5 – Микрофотографии распределения ГС в мозжечке симы *O. tasou* в норме и после повреждения. а – общий вид распределения ГС в дорсальной зоне интактного мозжечка; б – ГС в латеральной зоне интактного мозжечка, чёрными стрелками отмечены ГС-позитивные волокна РГ, синим пунктиром обведена нейроэпителиальная конститутивная нейрогенная ниша, содержащая ГС-позитивные клетки; в – гранулярный слой дорсальной зоны после травмы; г – молекулярный слой дорсальной зоны после травмы; д – реактивная нейрогенная ниша паренхиматозной локализации. Синими стрелками отмечены клетки 1а типа, желтыми ГС-негативные клетки; е – ГС-позитивные волокна, окружающие мозжечковую гломерулу. МС – молекулярный слой, ГС – гранулярный слой, зелёными стрелками обозначены ГС-позитивные волокна, синими – ГС-позитивные клетки типа 1а, розовыми – ГС-позитивные клетки типа 1с. ИГХ маркирование ГС в сочетании с докрасиванием метиловым зелёным по Браше (Меркулов, 1969).

В ходе морфометрического анализа у контрольных животных было установлено наличие 5 ± 2 фрагментов волокон на профильное поле (рис. 6, д, е, ж).

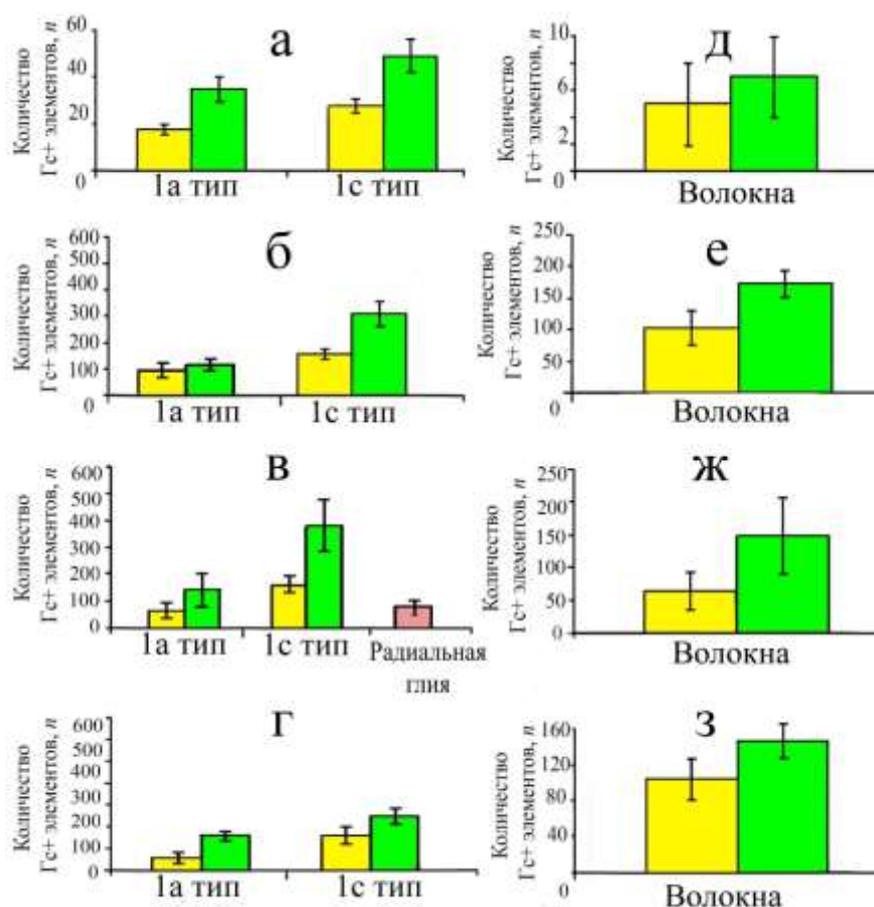


Рисунок 6 – Распределение глутаминсинтетаза–позитивных клеток и волокон в мозжечке молодежи симы *O. masou* в норме и после повреждения. а, д – ДМЗ; б, е – дорсальная зона; в, ж – латеральная зона; г, з – базальная зона. Желтые столбцы – количество клеток у интактных животных, зелёные – количество клеток у животных после повреждения. ($n = 5$ в каждой группе).

Клетки Ia типа у интактных животных располагались в молекулярном слое. Их доля была небольшой: 5.1% в дорсальной, 4% в латеральной и 3.6% в базальной зонах, соответственно. Наибольшее число ГС-позитивных элементов в молекулярном слое в норме приходилось на интенсивно маркированные клетки Ic типа: 45.8% в дорсальной, 37.5% в латеральной и 32.6% в базальной зонах, соответственно. В норме только в латеральной части тела мозжечка в молекулярном слое были зафиксированы тонкие, длинные волокна, морфологически соответствующие РГ (рис. 5, б). Их число составляло 78 ± 25 элементов на профильное поле (рис. 6, в). Иммуномаркированных фрагментов

ГС-позитивных волокон на профильное поле было выявлено 68 ± 16 (рис. 6, ж). В других областях мозжечка подобные структуры отсутствовали, также как и в латеральной области на 3 сут после нанесения травмы. Подавляющее большинство ГС-клеток находилось в гранулярном слое мозжечка (рис. 5, б). В гранулярном слое мы идентифицировали ГС-позитивные волокна, толщина которых варьировала в плоскости среза. Наиболее тонкие волокна оканчивались специфическими концевыми аппаратами, охватывающими отдельные гранулярные клетки или их небольшие скопления. В центральной части гранулярного слоя в норме мы находили локальные области с повышенной клеточной плотностью (рис. 5, е). Такие области имели структурированную организацию: для данных областей было характерно наличие повышенного содержания иммунонегативных клеток гранулярного слоя, чья плотность распределения снижалась по направлению к периферии. Участки повышенной клеточной плотности, содержащие гломерулоподобные комплексы, были окружены более разреженными зонами, в которых преобладали клетки типа 1a с умеренной активностью ГС. Однако кластеры ГС-позитивных клеток, окруженные волокнами, были характерны именно для зон с высокой клеточной плотностью.

3.3.1. Выявление комплексов астроцитоподобных клеток в мозжечке молодежи *O. masou* в норме и после повреждения

Через 3 сут после повреждения мозжечка молодежи симы мы наблюдали значительные изменения активности ГС в разных типах клеток и волокнах как в области прилежащей к травме, так и в более удаленных участках молекулярного и гранулярного слоёв мозжечка. Общий вид мозжечка после травмы представлен на рисунке (рис. 5, в). Со стороны гранулярного слоя толстые ГС-позитивные волокна с варикозными утолщениями направлялись в ДМЗ. На 3 сут после повреждения постепенно увеличивалось число клеток 1c типа и волокон (рис. 6). Исследование клеточного состава в зоне повреждения показало увеличение числа интенсивно маркированных, крупных клеток 1c типа по сравнению с нормой в 1.5 раза. Средние размеры таких клеток на 3 сут после травмы см. в табл. 3.

После травмы увеличивалось количество интенсивно маркированных ГС-позитивных клеток 1c типа в дорсальной, латеральной и в базальной зонах по сравнению с контролем (рис. 6, а, б, в, г). Клетки 1a типа с умеренной активностью ГС были расположены одиночно, более интенсивно маркированные клетки 1c типа

формировали кластеры (рис. 5, б). Появление новых ГС-позитивных клеток и их конгломератов после травмы было характерно в большей степени для молекулярного слоя мозжечка (рис. 5, г). Таким образом, после травмы наблюдалось изменение клеточного состава ГС-позитивных элементов и общее увеличение количества ГС-позитивных клеток различных типов и ГС-позитивных волокон на 3 сут по сравнению с контролем. Подавляющее большинство ГС-клеток находилось в гранулярном слое и их количество на 3 сут после повреждения постепенно увеличивалось. В дорсальной части тела мозжечка на 3 сут после травмы были выявлены средних размеров локальные скопления мелких ГС-позитивных клеток, лишенных признаков дифференциации площадью 716 ± 165 мкм² и крупные скопления площадью 2368 ± 133 мкм² (рис. 5, в). Данные клеточные скопления были окружены немногочисленными гетерогенными иммунопозитивными волокнами.

3.3.2. Инфраганглионарное сплетение в повреждённом мозжечке молодёжи *O. masou*

ИФГС представляет собой переходную зону между молекулярным и гранулярным слоем, содержащую тела клеток Пуркинье (КП) и тела ЭДК (рис. 5, в). Эта переходная зона содержит как клетки гранулярного слоя, так и клетки, встречающиеся в молекулярном слое. Однако крупные ганглиозные клетки: КП и ЭДК в целом определяют особенности данной области мозжечка рыб. На территории ИФГС мозжечка симы активность ГС была выявлена в клетках 1а и 1с типов. Клетки 1с типа на территории ИФГС имели большие размеры по сравнению с клетками в молекулярном слое. Средние размеры клеток 1с типа составляли $10.3 \pm 1.4 / 7.8 \pm 1.1$ мкм в норме и $10.9 \pm 2.1 / 8.3 \pm 1.6$ мкм на 3 сут после травмы. Встречались одиночно расположенные умеренно маркированные клетки типа 1а, иногда формирующие кластеры (рис. 5, д). Клетки 1а типа в зоне ИФГС имели размеры $3.6 \pm 0.3 / 3.8 \pm 0.4$ мкм и обычно были интенсивно иммуномаркированы ГС. Они формировали небольшие кластеры, состоящие из 3–5 элементов (рис. 5, в). Встречались кластеры, содержащие клетки 1а и 1с типов. Во всех случаях интенсивность маркирования ГС в таких скоплениях была высокой. Кластеры мелких ГС-позитивных клеток обычно прилежали к крупным ГС-позитивным ганглиозным клеткам (рис. 5, г). В молекулярном слое дорсальной зоны после травмы были выявлены нейрогенные ниши, содержащие большое количество ГС-позитивных клеток (рис. 5, д).

3.4. Локализация сероводородпродуцирующей системы в мозжечке молодой мыши *O. masou* в норме и после повреждения

При маркировании CBS в норме идентифицировали несколько типов клеток. В молекулярном слое на основании морфологических данных интенсивно маркированные клетки округлой формы, без отростков, были отнесены к клеткам 1b типа. Морфометрические параметры клеток: размеры большого и малого диаметров сом приведены в табл. 3, денситометрические характеристики – в табл. 4. Наряду с интенсивно окрашенными клетками 1b типа в молекулярном слое были идентифицированы интенсивно маркированные овальные клетки 1с типа. Размер их тел составлял от 10.5 до 11.6 мкм, ОП – 60.5 ± 7 ЕОП, в среднем (табл. 3, 4). В интактном мозжечке самая высокая плотность маркирования наблюдалась у округлых клеток 5 типа гранулярного слоя, ОП – 143.6 ± 7.4 ЕОП (табл. 4).

Наиболее интенсивно маркированные клетки 1b типа были выявлены у внешней границы молекулярного слоя, изредка формируя скопления по 8–10 элементов. В ДМЗ все клетки интенсивно маркировались CBS. По мере удаления от ДМЗ концентрация CBS-позитивных клеток постепенно снижалась (рис. 8, а).

Таблица 4 – Денситометрические параметры CBS-позитивных клеток и волокон (ЕОП) в норме и после повреждения.

Клеточный тип	Дорсальная зона	Латеральная зона	Базальная зона
1b, округлые			
Контроль	93.3±11.8	80.3±11.4	86.8±5.9
Повреждение	96.4±9.3	145.4±4.6	108.9±11.2
1с, овальные			
Контроль	90.4±10.4	74.8±11.9	77.7±9.4
Повреждение	87.2±14.1	141±5.6	102.3±15
2, палочковидные			
Контроль	–	–	–
Повреждение	66.7±5.4	–	–
3, клетки Пуркинье			
Контроль	–	–	–
Повреждение	90±10.7	–	–
5, гранулярные клетки			
Контроль	157±17.3	107.4±9.4	143.6±7.4
Повреждение	149.7±15	127.6±13.4	139.7±11.5
Волокна			
Контроль	123.1±12.5	84.5±13.6	122.9±7
Повреждение	127.2±17.6	133.5±18.5	69.8±8.1

Примечание. «–» – CBS-позитивные клетки отсутствуют.

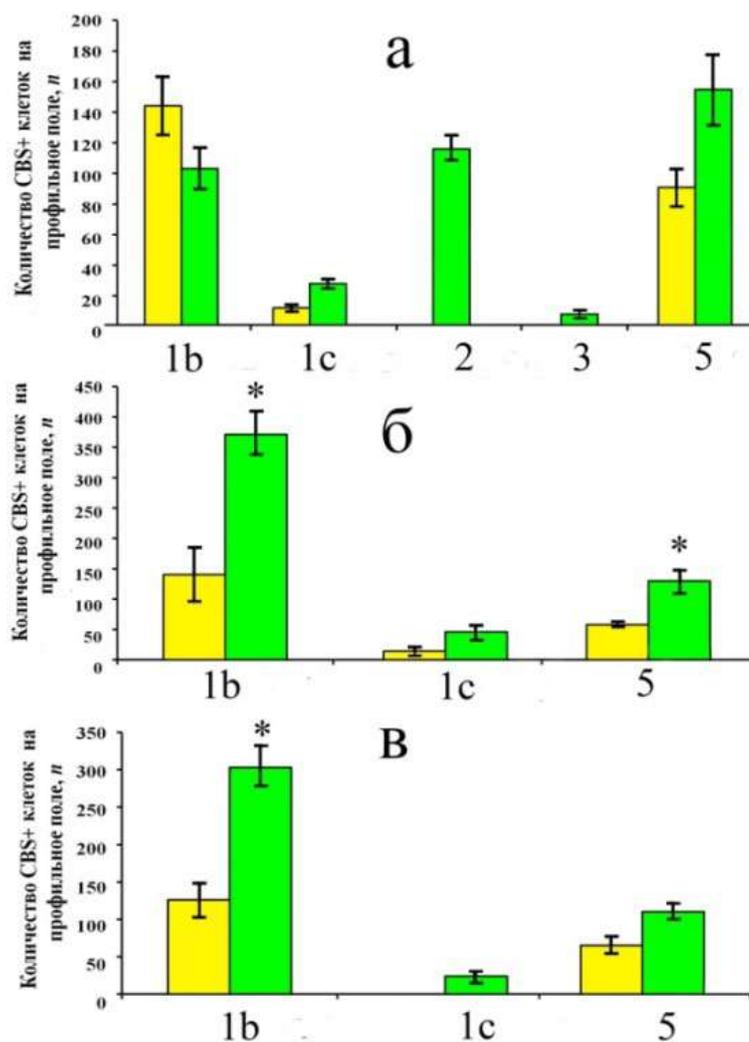


Рисунок 7 – Распределение CBS-позитивных клеток и волокон в мозжечке молодежи симы *O. tasou* в норме и после повреждения. а – дорсальная зона; б – латеральная зона; в – базальная зона. Зелёные столбцы – количество клеток у интактных животных, желтые – количество клеток у животных после повреждения. ($n = 5$ в каждой группе, звёздочкой обозначено $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса). По оси x указан клеточный тип.

В молекулярном слое дорсальной зоны интактного мозжечка было выявлено 144 ± 16 равномерно распределенных округлых клеток 1b типа (рис. 7, а). В гранулярном слое дорсальной зоны, содержащей ДМЗ, было выявлено максимальное число CBS-позитивных клеток 5 типа – 91 ± 12 (рис. 7, а). В латеральной и базальной зонах их число уменьшалось на треть (рис. 7, б, в). Клетки 5 типа в интактном мозжечке распределялись равномерно, окружая по периметру гломерулу. Помимо CBS-позитивных клеток выявлялись интенсивно маркированные CBS волокна, равномерно расположенные преимущественно в ганглионарном и гранулярном слоях, ОП – 123.1 ± 12.5 ЕОП, в

среднем (табл. 4). В молекулярном слое CBS-позитивные волокна были выявлены в незначительном количестве. В интактном мозжечке было выявлено незначительно число более крупных овальных клеток 1b типа (рис. 7). В базальной зоне клетки 1b типа были равномерно распределены по всему молекулярному слою, в отдельных случаях формируя небольшие кластеры. Число клеток 1b и 1c типа было одинаковым в дорсальной и латеральной зонах, в базальной отсутствовали более дифференцированные клетки 1c типа (рис. 7).

Через сут после нанесения механической травмы в мозжечке молодежи симы наблюдались значительные изменения. Во всех зонах прослеживались значительное увеличение количества CBS-позитивных клеток (рис. 7). Для дорсальной зоны характерна наибольшая интенсивность маркирования. В области пролиферативной зоны (ДМЗ) после повреждения были идентифицированы как интенсивно маркированные овальные клетки 1b типа, расположенные единично, так и формирующие небольшие конгломераты из 3–5 плотно расположенных элементов (рис. 8, в). По мере удаления от ДМЗ концентрация CBS-позитивных клеток постепенно снижалась, как и в интактном мозжечке (рис. 8, в). В дорсальной зоне мы не выявили наличия CBS-позитивных волокон. У внешней границы молекулярного слоя интенсивно маркированные клетки 1b и 1c типа формировали конгломераты по 20–30 элементов (рис. 8, в). Также у внешней границы данной зоны были выявлены скопления, содержащие, в среднем, 10 CBS-негативных клеток и 1–2 CBS-позитивные клетки 1b типа. Интенсивность маркирования данных типов клеток была схожей, составляя 90.4 ± 10.4 ЕОП (табл. 4). В толще молекулярного слоя более дифференцированные, овальные клетки 1c типа располагались по отдельности, на небольшом расстоянии друг от друга, в некоторых случаях группируясь по 2–3 элемента. Округлые клетки 1b типа чаще формировали кластеры (рис. 8, д).

После нанесения повреждения в дорсальной зоне было установлено появление радиально мигрирующих клеток 2 типа, характеризующиеся умеренной иммунореактивностью – 66.7 ± 5.4 ЕОП (табл. 4). В латеральной и в базальной зонах мигрирующие клетки 2 типа отсутствовали. Интенсивно маркированные клетки 1c типа, как и в дорсальной зоне формировали скопления по 5–6 элементов, расположенные в толще молекулярного слоя. Округлые клетки 1b типа были равномерно распределены между ними на близком расстоянии друг от друга. В толще молекулярного слоя

латеральной зоны была выявлена большая часть интенсивно маркированных овальных клеток 1с типа, формирующих кластеры, разделенные иммунонегативными зонами. В ганглионарном слое дорсальной зоне поврежденного мозжечка были выявлены CBS-позитивные клетки Пуркинье, ОП иммуномаркирования составляла 90 ± 10.7 ЕОП (табл. 4). Иммунолокализация CBS была выявлена в центральной части клетки (предположительно ядерной зоне), окруженной ободком слабо маркированной цитоплазмы. В результате повреждающего воздействия в латеральной и базальной зонах в 2.5 раза увеличивалось число клеток 1b типа по сравнению с контролем (рис. 7, б, в). В клетках 1b типа данных зон наблюдалось увеличение интенсивности маркирования клеток (табл. 4). Достоверное уменьшение интенсивности маркирования CBS было установлено и в волокнах базальной зоны – с 122.9 ± 7 ЕОП в интактном мозжечке до 69.8 ± 8.1 ЕОП после нанесения травмы.

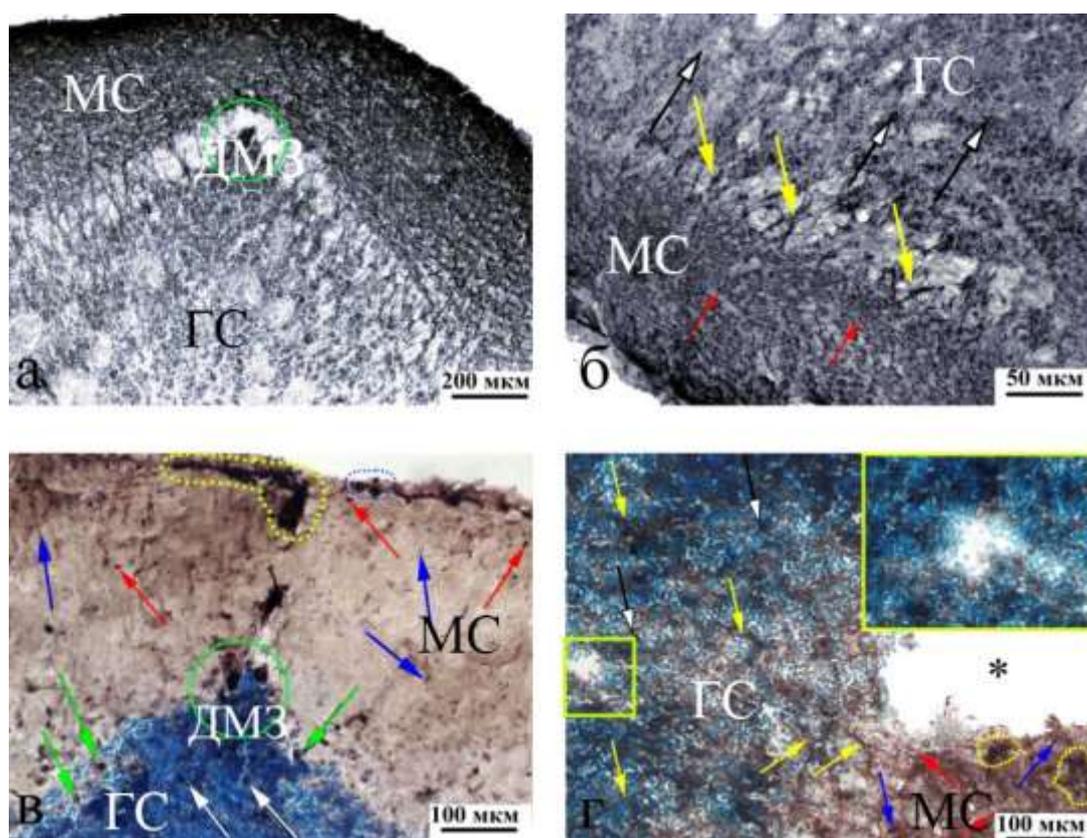


Рисунок 8 – Микрофотографии распределения CBS в мозжечке симы *O. tasou* в норме и после повреждения. а – общий вид дорсальной зоны интактного мозжечка; б – гранулярный слой интактного мозжечка; в – общий вид дорсальной зоны поврежденного мозжечка, синим цветом оконтурено скопление клеток 1b типа, желтым – конгломерат из клеток 1b и 1с типа; г – общий вид гранулярного слоя поврежденного

мозжечка, звездочкой обозначено место прокола, желтой врезкой – область минимальной клеточной концентрации. Зелёным цветом оконтурена ДМЗ, МС – молекулярный слой, ГС – гранулярный слой. Красными стрелками обозначены клетки 1с типа, синими – 2 типа, белыми – 5 типа, зелёными – клетки Пуркинье (3 тип), желтыми стрелками обозначены CBS-позитивные волокна. ИГХ маркирование CBS в сочетании с докрасиванием метиловым зелёным по Браше (Меркулов, 1969).

После повреждения мозжечка клетки 1с типа чаще выявлялись у внешней границы молекулярного слоя. В области повреждения клетки 1b типа формировали непрерывный пласт у внешней границы молекулярного слоя. После нанесения повреждения в дорсальной зоне выявляются паттерны массовой миграции, максимальное число CBS-позитивных клеток выявлено в латеральной зоне. Округлые клетки 1b типа равномерно распределялись в молекулярном слое и формировали кластеры. Наибольшая интенсивность маркирования клеток 1b и 1b типа выявлялась в латеральной зоне (табл. 4). Наиболее высокая интенсивность маркирования CBS была установлена для клеток 5 типа гранулярного слоя, в дорсальной зоне составляющая 149.7 ± 15 ЕОП. Количество таких клеток возрастало в 1.7 раз в дорсальной зоне и в 2 раза в латеральной и базальной зонах (рис. 7, б, в) по сравнению с интактным мозжечком. Большинство клеток формировало кластеры, расположенные на небольшом расстоянии друг от друга. ОП составляла 127.6 ± 13.4 ЕОП и 139.7 ± 11.5 ЕОП, соответственно (табл.4). После повреждения число CBS-позитивных волокон увеличивалось незначительно: 45 ± 11 в ганглионарном и 43 ± 9 в гранулярном. Количество в интактном мозжечке составляло 38 ± 8 и 27 ± 5 в ганглионарном и в гранулярном слое, соответственно. После нанесения повреждения интенсивность маркирования волокон и клеток гранулярного слоя менялась незначительно (табл. 4).

3.5. Экспериментальное маркирование BrdU в интактном мозжечке, в мозжечке *O. masou* при прямом повреждении и травме конечного мозга

При экспериментальном введении BrdU в мозжечке молодежи симы спустя 3 сут проводили оценку количества маркированных ядер и клеток. В результате иммунопероксидазного маркирования BrdU-позитивные элементы окрашивались в темно-фиолетовый цвет, белое вещество мозжечка, перивентрикулярная область, внеклеточное вещество молекулярного слоя не маркировалось BrdU (рис. 3). В контроле

в составе молекулярного и гранулярного слоёв мозжечка были выявлены BrdU-позитивные клетки и, в некоторых случаях, BrdU-позитивные ядра. Согласно классификации И. М. Траниелло нами учитывались два типа элементов, маркированных BrdU: клеточные ядра диаметром около 3.5 мкм и клетки, средний размер которых составлял 5 мкм (Traniello et al., 2014). Клетки и ядра, маркированные BrdU, выявлялись у внешней границы, в толще и в нижней части молекулярного слоя, в гранулярном слое. В норме, при травме мозжечка и при травме конечного мозга BrdU-позитивные клетки имели округлую форму и размеры – 5 мкм, в среднем (см. табл. 5, 6, 7). В нижней части молекулярного слоя дорсальной, базальной и латеральной зон мозжечка как в норме, так и при различных вариантах травмы были локализованы негативные клетки Пуркинье, окруженные 2–3 BrdU-позитивными клетками (ядрами) размером 3.5–5 мкм. Они были выявлены как у контрольных животных, так и при обоих типах травмы (мозжечка и конечного мозга, соответственно).

3.5.1. BrdU-позитивные клетки в ростральной части интактного мозжечка молодежи *O. masou*

Проведенные морфометрические измерения показали, что параметры клеток различных зон ростральной и каудальной частей мозжечка в норме и после нанесения механической травмы были сходны (табл. 5 и 6).

Таблица 5 – Морфометрические параметры BrdU-позитивных клеток * дорсальной, латеральной и базальной зон ростральной части мозжечка симы *O. masou* в норме и после механической травмы мозжечка.

Область	Дорсальная зона	Латеральная зона	Базальная зона
Верхняя треть молекулярного слоя			
Контроль	4.9±0.3/4.1±0.5	5±0.3/3.5±0.4	4.6±0.4/3.7±0.6
Повреждение	5.5±0.6/3.9±0.8	4.9±0.4/3.5±0.5	5.1±0.5/3.7±0.8
Толща молекулярного слоя			
Контроль	4.3±0.6/3.7±0.8	4.5±0.6/3.7±0.6	4.1±0.7/4±0.8
Повреждение	5.5±0.6/3.9±0.8	4.9±0.4/3.5±0.5	5.1±0.5/3.7±0.8
Нижняя часть молекулярного слоя			
Контроль	5±0.4/3.5±0.8	5.1±0.8/4.4±0.8	4.6±0.9/3.6±0.7
Повреждение	5.7±1.2/4.5±1	4.5±0.7/3.7±0.6	5.3±0.9/4±0.6
Гранулярный слой			
Контроль	4.4±0.8/3.6±0.6	4.8±0.8/3.8±0.6	3.9±0.8/3.4±0.3
Повреждение	5.4±0.9/4.5±0.7	4.6±0.9/3.5±0.5	5.2±0.7/4±0.7

Таблица 6 – Морфометрические параметры BrdU-позитивных клеток * дорсальной, латеральной и базальной зон каудальной части мозжечка симы *O. masou* в норме и после механической травмы мозжечка.

Область	Дорсальная зона	Латеральная зона	Базальная зона
Верхняя треть молекулярного слоя			
Контроль	5±0.2/3.5±0.8	4.8±0.3/4.1±0.5	5.2±0.3/3.7±0.7
Повреждение	4.8±0.4/4.1±0.8	5.2±0.4/3.9±0.7	5±0.4/3.5±0.8
Толща молекулярного слоя			
Контроль	5±0.4/3.9±0.5	4.3±0.8/4±0.7	5.1±1/4±0.6
Повреждение	5.1±1.1/4.2±0.8	4.8±0.9/4±0.7	4.7±0.9/3.9±0.6
Нижняя часть молекулярного слоя			
Контроль	4.2±0.8/3.3±0.2	4.6±1/4±1	4.4±0.7/3.6±0.5
Повреждение	5.3±0.8/4±0.6	5.1±0.8/4.3±0.7	4.6±0.9/3.8±0.7
Гранулярный слой			
Контроль	4±0.4/3.5±0.3	4.2±0.8/4.1±0.9	3.9±0.6/3.7±0.5
Повреждение	5±1/4.3±0.9	4.6±0.6/4±0.6	4.8±0.5/4±0.5

В ростральной части мозжечка в дорсальной зоне наибольшее число BrdU-позитивных клеток было выявлено в нижней части молекулярного слоя и в гранулярном слое, наименьшее – в его толще (рис. 9, б). В латеральной зоне максимальная концентрация выявлялась у внешней границы ($P < 0.05$), наименьшая в толще (рис. 9, д).

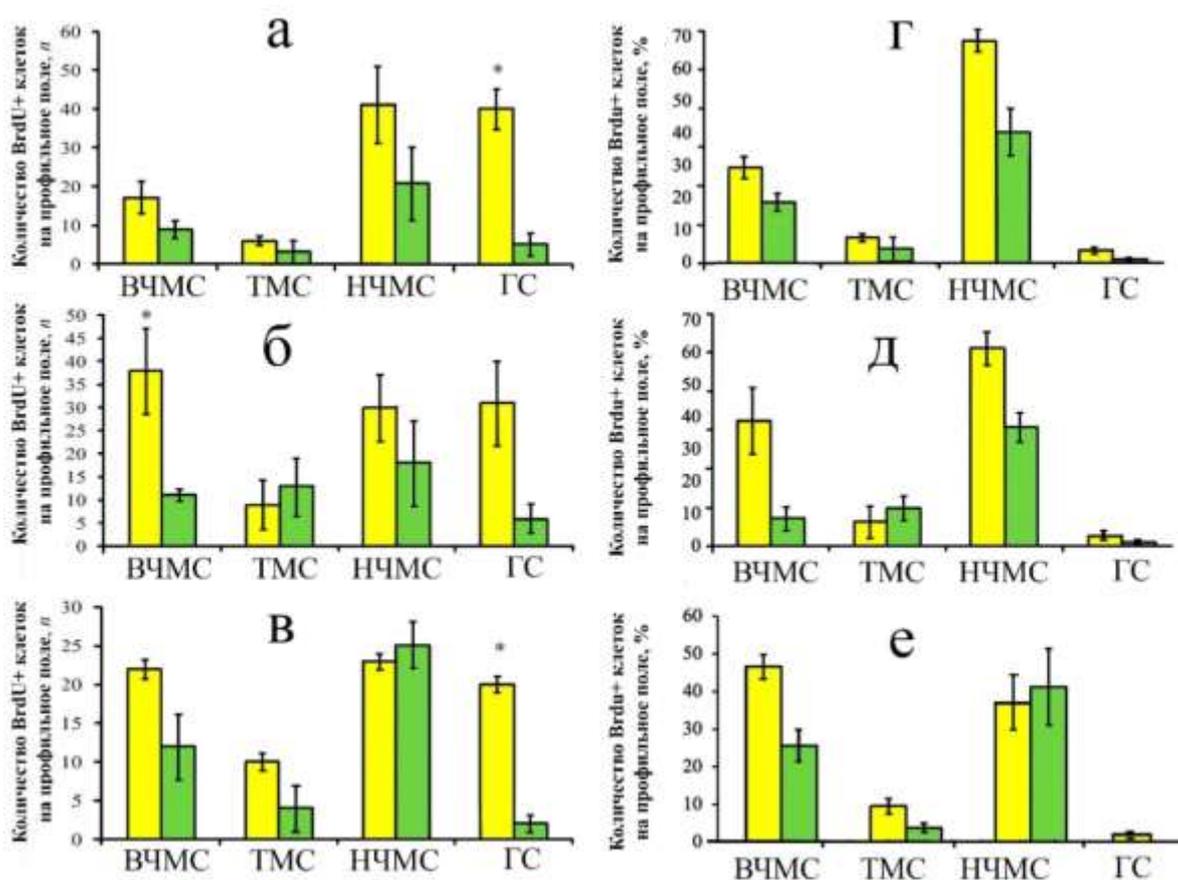


Рисунок 9 – Соотношение клеток, маркированных BrdU в мозжечке молодежи симы *O. masou* в норме. а, б, в – распределение BrdU-позитивных клеток в ростральной и каудальной частях интактного мозжечка. Желтые столбцы – количество клеток в ростральной части мозжечка, зелёные – количество клеток в каудальной части мозжечка; г, д, е – пролиферативный индекс в интактном мозжечке. Обозначения как на а, б, в. ВЧМС – внешняя граница молекулярного слоя, ТМС – толщина молекулярного слоя, НЧМС – нижняя часть молекулярного слоя, ГС – гранулярный слой. ($n = 5$ в каждой группе, звёздочкой обозначено $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, критерий Стьюдента–Ньюмена–Келса).

В базальной зоне в наиболее поверхностных слоях, в нижней части молекулярного и в гранулярном слоях было, в среднем, 20 ± 2 клеток. В толще молекулярного слоя их число снижалось в два раза (рис. 9, з). В толще молекулярного слоя дорсальной и базальной зон интенсивно маркированные BrdU-позитивные клетки располагались одиночно, на большом расстоянии друг от друга. При формировании конгломератов в отдельных случаях интенсивность маркирования клеток снижалась. В толще молекулярного слоя латеральной зоны было выявлено несколько конгломератов

по 3–4 клетки, в базальной части – единичный конгломерат из четырех клеток. В поверхностном слое латеральной зоны BrdU-позитивные клетки были распределены равномерно, на небольшом расстоянии друг от друга (8–10 мкм) (рис. 10, а).

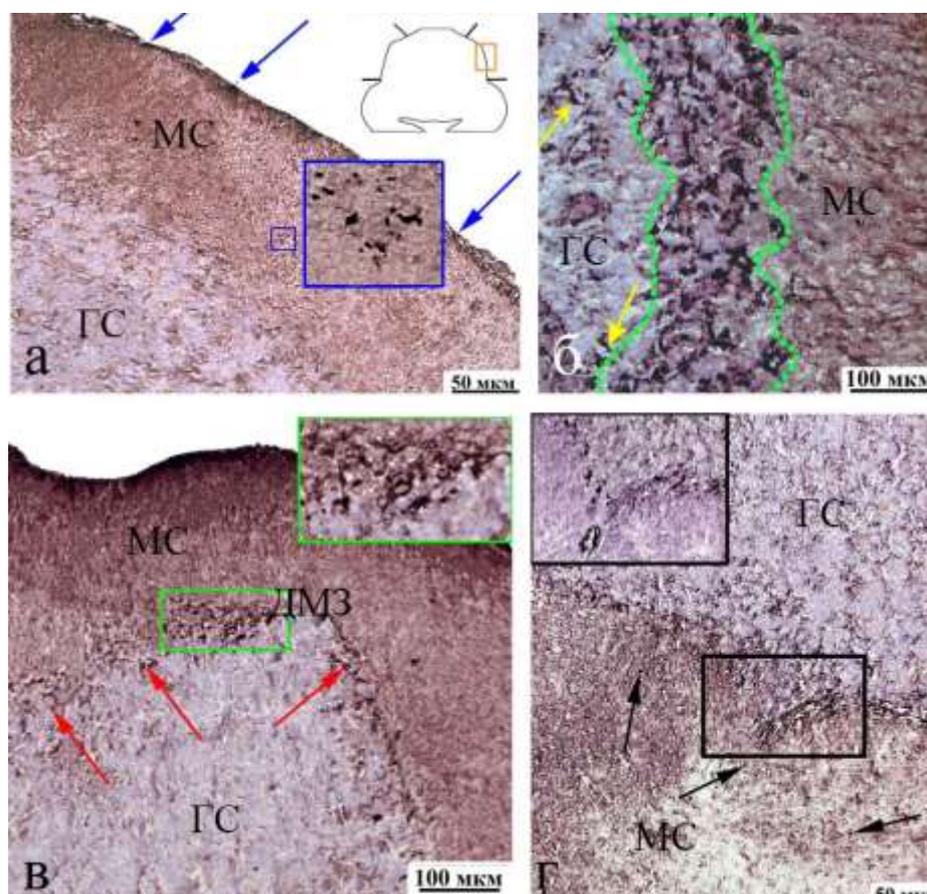


Рисунок 10 – Маркирование BrdU интактного мозжечка молодежи симы *O. masou*. а – латеральная зона рostrальной части мозжечка, на пиктограмме квадратом выделена соответствующая область, синей врезкой обозначен клеточный конгломерат в молекулярном слое; б – гранулярный слой рostrальной части мозжечка: зелёная пунктирная линия обозначает скопление BrdU-позитивных клеток; в – дорсальная зона каудальной части, зелёной врезкой показано скопление BrdU-позитивных клеток; г – базальная зона каудальной части мозжечка, чёрным цветом выделена вентральная вершина базальной зоны; MC – молекулярный слой, ГС – гранулярный слой. Чёрными стрелками отмечены BrdU-позитивные клетки в толще молекулярного слоя, красными – конгломераты клеток в нижней части молекулярного слоя, синими – клетки у поверхности молекулярного слоя. ИГХ маркирование BrdU по методу Daniel Webber (Лондонский Королевский Колледж).

В поверхностном слое дорсальной зоны рядом с ДМЗ плотность распределения BrdU-позитивных клеток была выше по сравнению с аналогичными участками молекулярного слоя. Для нижней части молекулярного и гранулярного слоёв дорсальной зоны было характерно наличие конгломератов по 8–12 элементов. В базальной зоне подобных скоплений выявлено не было. Большой кластер BrdU-позитивных клеток был обнаружен в гранулярном слое (рис. 10, б). В нижней части молекулярного слоя дорсальной и латеральной зон был выявлен наибольший пролиферативный индекс – (68.2% и 63.2%), наименьший – в базальной зоне – 37.1% (рис. 9, г, д, е).

3.5.2. BrdU-позитивные клетки в каудальной части интактного мозжечка молодежи симы *O. masou*

В каудальной части мозжечка количество BrdU-позитивных клеток было ниже, чем в ростральной части; распределение BrdU-позитивных клеток в разных слоях было специфичным (рис 9, а, б, в). В нижней части молекулярного слоя дорсальной зоны число маркированных клеток было в 2 раза ниже, чем в ростральной части мозжечка. В гранулярном слое каудальной части, количество BrdU-позитивных клеток было значительно ниже, чем в ростральной ($p < 0.05$, рис. 9). В дорсальной (рис. 10, в) и в латеральной зоне каудальной части были отдельные маркированные клетки и небольшие группы клеток в толще молекулярного слоя. Количество BrdU-позитивных клеток у поверхности молекулярного слоя латеральной зоны было в 1.7 раза ниже, чем в ростральной части (рис. 9, б). В базальной зоне в области вентральной вершины базальной зоны число BrdU-позитивных клеток значительно увеличивалось: 45 ± 7 в нижней части молекулярного слоя и 53 ± 6 в гранулярном слое (рис. 10, г). В ростральной части соответствующей зоны видимые скопления клеток отсутствовали. Данные количественного анализа показали, что максимальный пролиферативный индекс в каудальной части мозжечка: в нижней трети молекулярного слоя. Минимальный пролиферативный индекс установлен в гранулярном слое каудальной части (рис. 9, г, д, е) и был в 7.5–8.5 раз ниже ($P < 0.01$) по сравнению с ростральной частью (рис. 9, г, д, е). Такие значительные отличия демонстрируют градиентное распределение в различных частях мозжечка.

3.5.3. BrdU-позитивные клетки в мозжечке молодежи симы *O. masou* после повреждения

Зона повреждения проходила через дорсальную поверхность тела мозжечка, от молекулярного слоя вглубь гранулярного слоя (рис. 11, а). Через трое суток после повреждения мозжечка вокруг зоны травмы увеличивалось число BrdU-позитивных клеток как в ростральной, так и в каудальной частях.

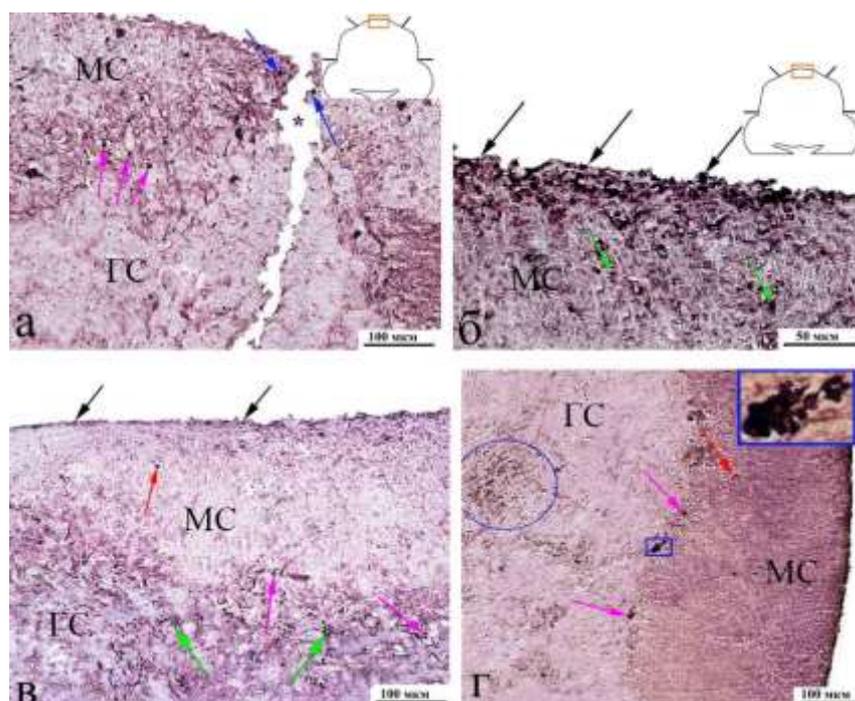


Рисунок 11 – Мозжечок молодежи симы *O. masou* после повреждения. а – область травмы в дорсальной зоне мозжечка (обведена прямоугольником на врезке); б – дорсальная зона ростральной части мозжечка; в – латеральная зона ростральной части мозжечка; г – латеральная зона каудальной части мозжечка после травмы: синий овал показывает скопление BrdU-позитивных клеток в гранулярном слое, синяя врезка обозначает скопление BrdU-позитивных клеток в толще молекулярного слоя. ИГХ маркирование BrdU по методу Daniel Webber (Лондонский Королевский Колледж). МС – молекулярный слой; ГС – гранулярный слой. Звездочкой обозначена зона травмы; чёрные стрелки показывают BrdU-позитивные клетки на поверхности молекулярного слоя; красные стрелки – BrdU-позитивные клетки в толще молекулярного слоя; зелёные стрелки – одиночные BrdU-позитивные клетки в толще молекулярного слоя; синие стрелки показывают клетки возле зоны травмы; розовая стрелка – клеточный конгломерат в толще молекулярного слоя.

В дорсальной зоне рostrальной части мозжечка, содержащей область прокола, количество BrdU-позитивных клеток существенно возросло (рис. 11, б). Однако в нижней части молекулярного слоя количество маркированных клеток, напротив, было ниже, чем в контроле (рис. 12, а).

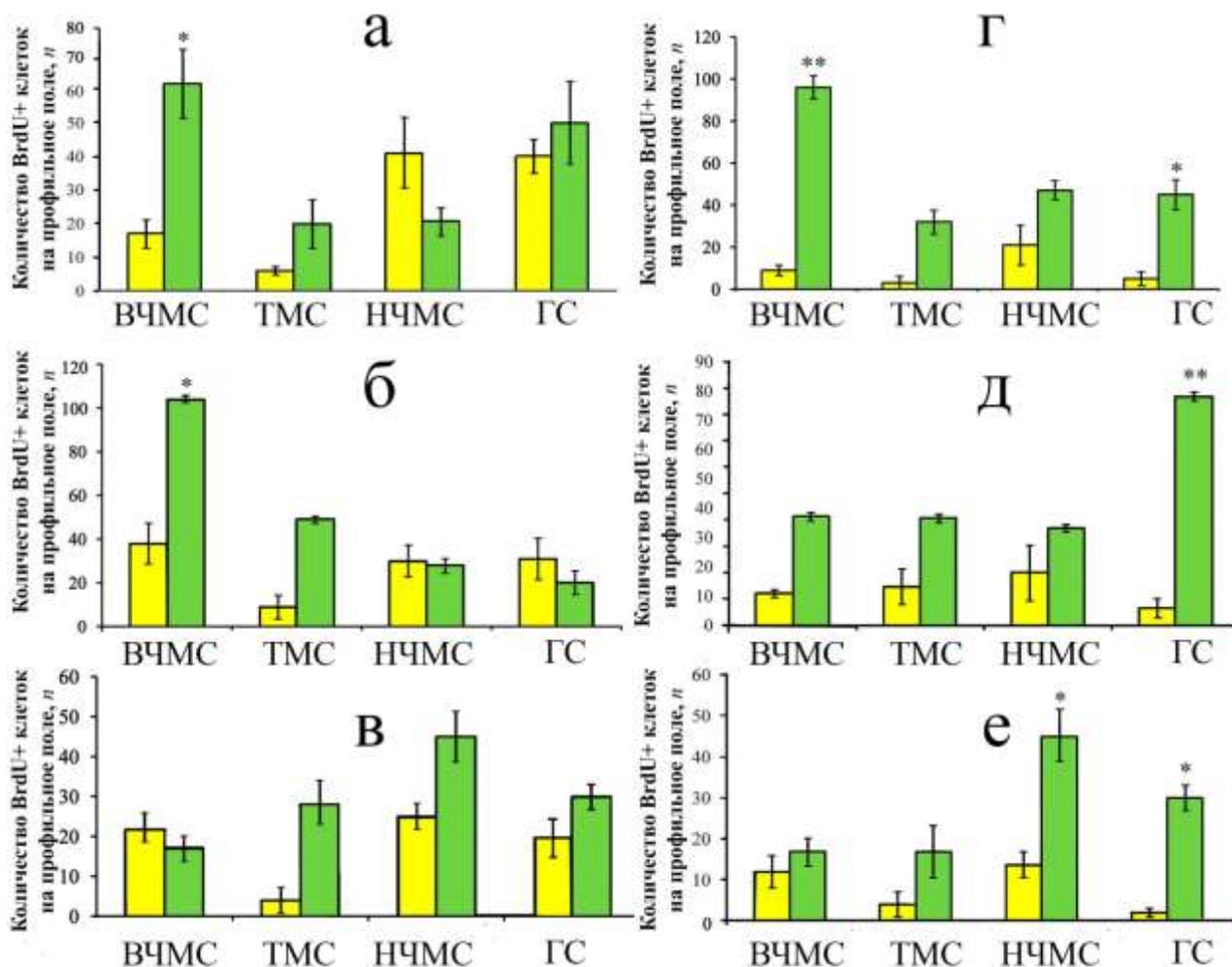


Рисунок 12 – Распределение BrdU-позитивных клеток в рostrальной (а, б, в) и каудальной (г, д, е) частях мозжечка молодежи симы *O. tascui* в условиях нормы и после повреждения. Желтые столбцы – количество клеток у контрольных животных, зелёные – количество клеток у животных при повреждении. ВЧМС – внешняя граница молекулярного слоя, ТМС – толщина молекулярного слоя, НЧМС – нижняя часть молекулярного слоя, ГС – гранулярный слой. ($n = 5$ в каждой группе, звёздочкой обозначено $P < 0.05$, двумя звёздочками – $P < 0.01$ – достоверные отличия от контрольных групп, критерий Стьюдента–Ньюмена–Келса).

У внешней границы дорсальной зоны каудальной части мозжечка количество клеток в молекулярном и гранулярном слоях увеличивалось по сравнению с

ростральной частью ($p < 0.05$, рис. 13, г). В ростральной части количество маркированных клеток базальной зоны после травмы повышалось, особенно у поверхности молекулярного слоя (рис. 12, б). В каудальной части наиболее существенное увеличение количества BrdU-позитивных клеток было выявлено в гранулярном слое (рис. 12, г, д, е). У внешней границы молекулярного слоя дорсальной зоны была выявлена наибольшая плотность распределения BrdU-позитивных клеток (рис. 11, б). В латеральной зоне ростральной части мозжечка значительное возрастание количества BrdU-позитивных клеток ($P < 0.05$) было выявлено в нижней части молекулярного слоя (рис. 12, б). В каудальной части после травмы увеличение числа маркированных клеток было обнаружено во всех частях молекулярного слоя (рис. 12, г, д, е). В гранулярном слое количество маркированных клеток существенно превышало соответствующие показатели у контрольных животных ($P < 0.05$). В толще молекулярного слоя дорсальной части возле зоны прокола было найдено большое количество интенсивно BrdU-позитивных клеток (рис. 11, а). Наибольшее число BrdU-позитивных клеток было выявлено в гранулярном слое дорсальной и латеральной зоны (рис. 12, г). На границе с молекулярным слоем такие клетки формировали небольшие скопления (рис. 11, а). Количественный анализ пролиферативной активности после травмы показал увеличение индексов пролиферации во всех частях мозжечка ростральной и каудальной областей (рис. 13). Особенно в поверхностной части молекулярного слоя латеральной зоны ростральной части ($P < 0.05$, рис. 13, б) и в дорсальной и латеральной зонах каудальной части ($P < 0.05$, рис. 13 г, д). Наиболее существенное повышение индексов пролиферации было выявлено у поверхности молекулярного слоя дорсальной и латеральной зон мозжечка (рис. 13, б, г). Это, очевидно, свидетельствует о преимущественной локализации реактивных нейрогенных ниш в этих зонах. В поверхностном слое базальной зоны ростральной части интактного мозжечка, пролиферативный индекс был выше, чем в соответствующей области после травмы (рис. 13, в).

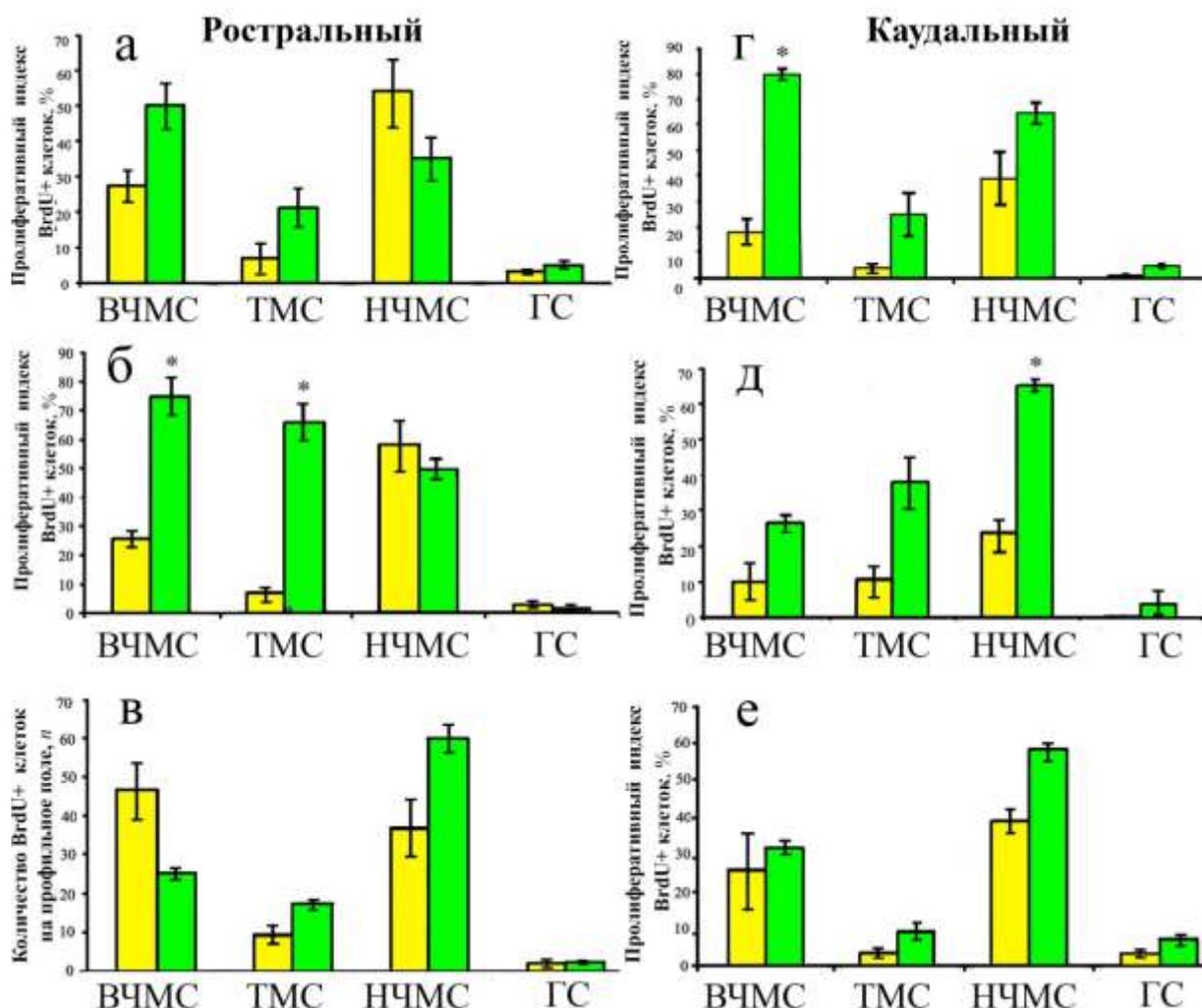


Рисунок 13 – Проллиферативный индекс BrdU-позитивных клеток в ростральной (а, б, в) и каудальной (г, д, е) частях мозжечка молодежи симы *O. masou* в условиях нормы и после повреждения. Желтые столбцы – количество клеток у контрольных животных, зелёные – количество клеток у животных при повреждении. ВЧМС – внешняя часть молекулярного слоя, ТМС – толщина молекулярного слоя, НЧМС – нижняя часть молекулярного слоя, ГС – гранулярный слой. ($n = 5$ в каждой группе, звёздочкой обозначено $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, критерий Стьюдента–Ньюмена–Келса).

В ростральной части интактного мозжечка количество BrdU-позитивных клеток было намного больше, чем в каудальной, что свидетельствует о её большем участии в конститутивном нейрогенезе. После травмы количество маркированных клеток в каудальной части значительно превышала таковую ростральной части.

3.5.4. BrdU-позитивные клетки в мозжечке молодежи симы *O. masou* после повреждения конечного мозга

Через трое суток после повреждения конечного мозга изменения в паттернах пролиферативной активности в различных зонах мозжечка были очевидными. Общий вид мозжечка после повреждения конечного мозга, окрашенного толуидиновым синим по Нисслю, представлен на рис. 15а.

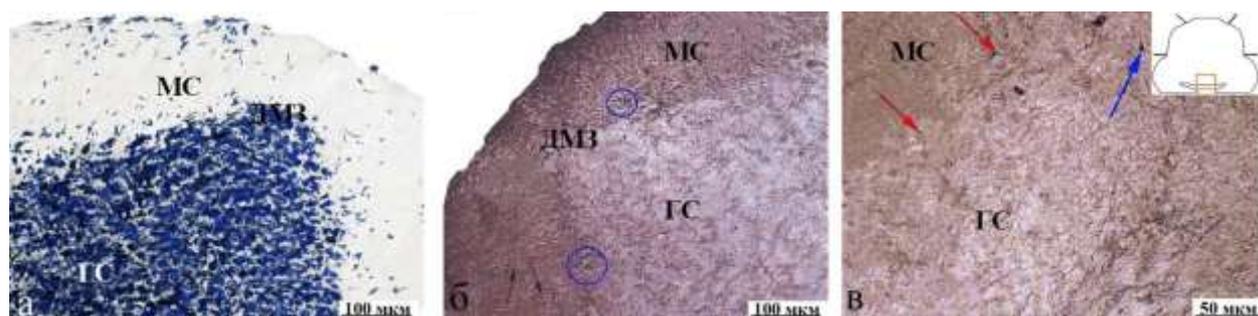


Рисунок 14 – Маркирование BrdU в мозжечке молодежи симы *O. masou* при повреждении конечного мозга. а – общий вид дорсальной зоны при окраске по Нисслю; б – дорсальная зона, синим цветом оконтурен кластер BrdU-позитивных клеток; в – базальная зона. МС – молекулярный слой, ГС – гранулярный слой. Чёрными стрелками обозначены BrdU-позитивные клетки в толще молекулярного слоя, красными – конгломераты клеток в нижней части молекулярного слоя, синими – BrdU-позитивные клетки в гранулярном слое. ИГХ маркирование бромдезоксипуредина (по методу Daniel Webber).

В мозжечке при травме конечного мозга интенсивно маркированные BrdU-позитивные клетки в нижней части молекулярного слоя формировали кластеры по 2–3 элемента (рис. 14, б, в). Наибольшее число маркированных клеток было обнаружено в дорсальной зоне. Клетки были равномерно распределены у внешней границы молекулярного слоя, в толще молекулярного слоя встречались одиночные BrdU-позитивные клетки (рис. 14, б). В базальной зоне наибольшая плотность умеренно маркированных BrdU-позитивных клеток в нижней части молекулярного слоя была выявлена у вентральной вершины. В гранулярном слое дорсальной зоны при повреждении конечного мозга, как и в аналогичной области при повреждении мозжечка, были выявлены многочисленные конгломераты, содержащие до 10 клеток. В толще молекулярного слоя базальной зоны BrdU-позитивные клетки отсутствовали (рис. 14, в).

Анализ количественного распределения BrdU-позитивных клеток в дорсальной зоне после повреждения конечного мозга показал увеличение количества маркированных клеток в молекулярном и гранулярном слоях (рис. 15).

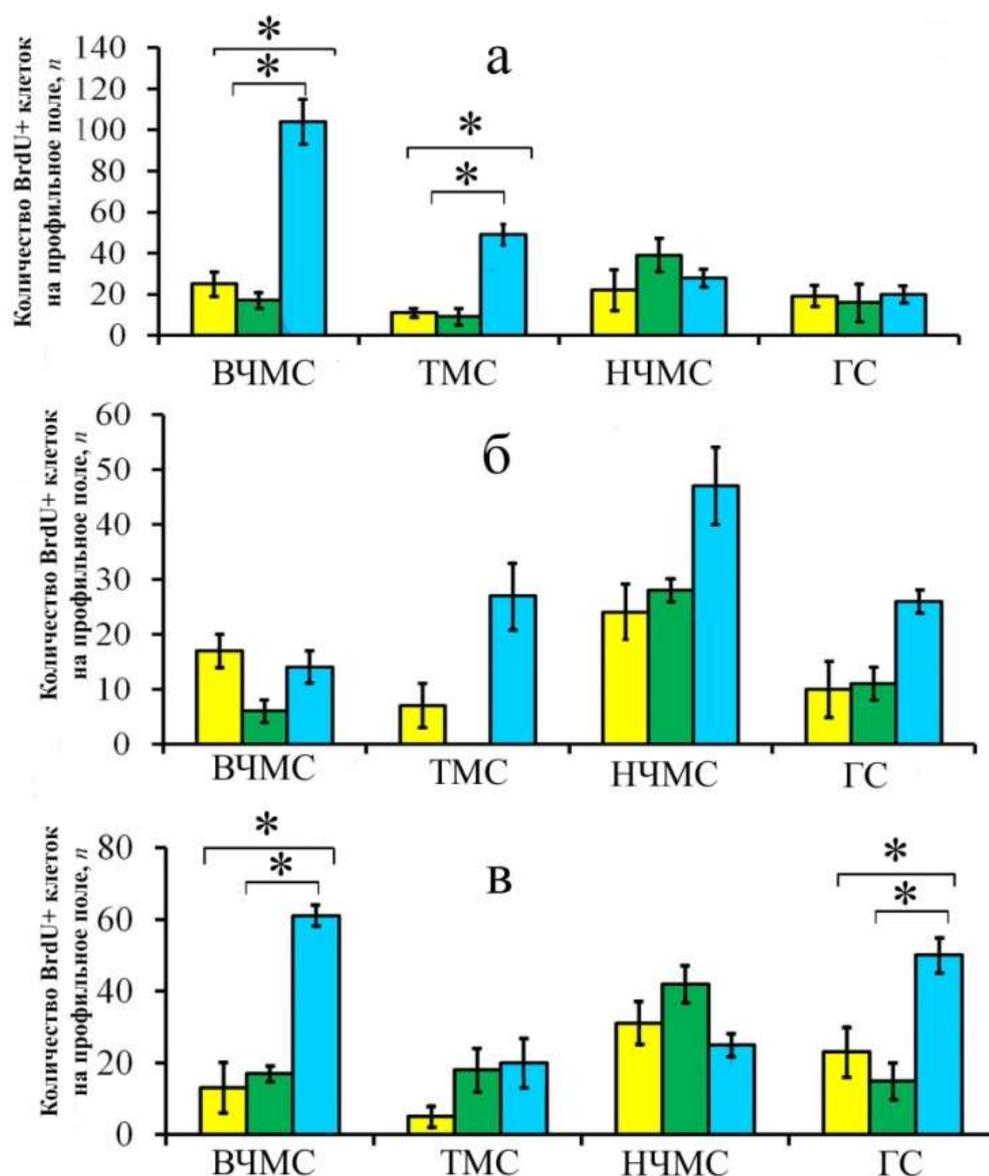


Рисунок 15 – Соотношение BrdU-позитивных клеток в мозжечке *O. masou* в контроле (желтые столбцы), после повреждения конечного мозга (зелёные столбцы) и повреждения мозжечка (синие столбцы). ($n = 5$ в каждой группе; звёздочкой обозначено $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп). ВЧМС – внешняя часть молекулярного слоя; ТМС – толщина молекулярного слоя; НЧМС – нижняя часть молекулярного слоя, ГС – гранулярный слой. Для определения значимых различий между контрольными животными и животными после травмы использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Кейлса.

При этом общий объём пролиферирующих клеток после повреждения конечного мозга был ниже по сравнению с повреждением мозжечка (рис. 15). Анализ соотношения пролиферирующих клеток в латеральной части показал, что общее количество пролиферирующих клеток при повреждении выше, чем при травме конечного мозга ($P < 0.05$, рис. 15, б). В базальной зоне было выявлено снижение числа BrdU-позитивных клеток в поверхностном слое и увеличение маркированных клеток в нижней части молекулярного слоя (рис. 15, в). Сравнительная характеристика BrdU-позитивных клеток в базальной зоне при травме мозжечка и конечного мозга показала сходную картину с дорсальной и латеральной областями (рис. 15, в).

3.5.5. Распределение BrdU-позитивных клеток в области гранулярных эминенций у молодежи симы *O. masou*

Наибольшее число BrdU-позитивных клеток в интактном и повреждённом мозжечке было обнаружено в ГЭ (рис. 16 а, б).

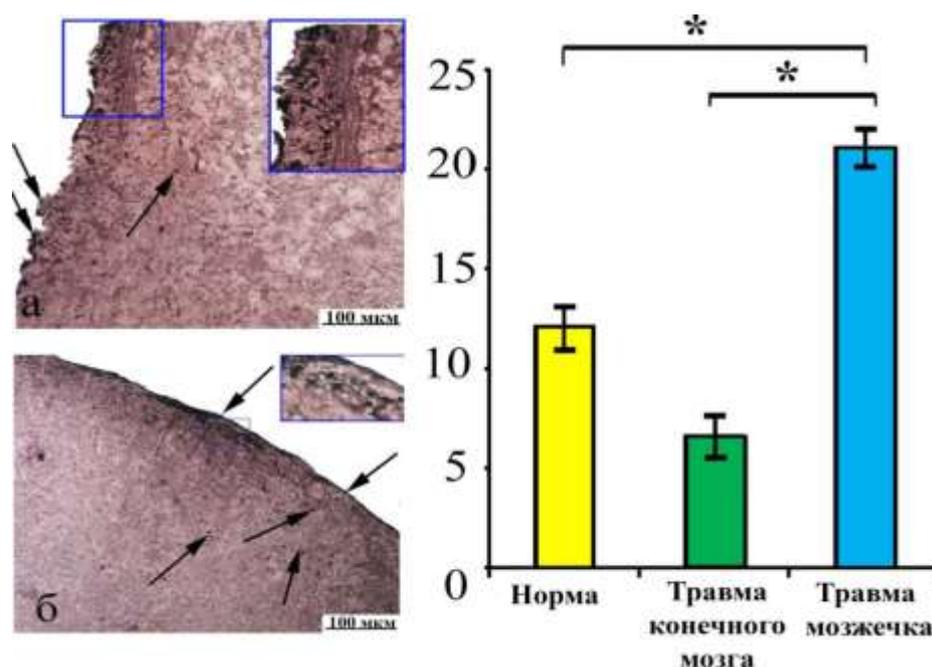


Рисунок 16 – Гранулярные эминенции в мозжечке молодежи симы *O. masou*. а – после повреждения мозжечка; б – после повреждения конечного мозга; в – пролиферативный индекс в области гранулярных эминенций ($n = 5$ в каждой группе; звёздочкой обозначено $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

В интактном мозжечке количество BrdU-позитивных клеток в зоне ГЭ было в среднем 184 ± 28 . Большинство клеток были расположены на поверхности и образовывали интенсивно маркированные BrdU-позитивные кластеры. Подобные кластеры клеток были обнаружены в толще молекулярного слоя; в некоторых случаях были обнаружены единичные, умеренно маркированные BrdU-позитивные клетки. После травмы количество BrdU-позитивных клеток было в два раза выше ($P < 0.05$) (рис. 15 в). BrdU-позитивные клетки в интактном и повреждённом мозжечке располагались на небольшом расстоянии, 4–6 мкм, друг от друга на поверхности ГЭ (рис. 16, а). Как и в интактном мозжечке, наибольшая активность BrdU-позитивных клеток, образующих кластеры по 6–10 клеток в каждом, были характерны для поверхности ГЭ (рис. 16, а, б). Результаты количественного анализа показали, что, несмотря на значительное увеличение количества BrdU-позитивных клеток в области ГЭ, пролиферативный индекс был схож с таковым в теле мозжечка: $12.1 \pm 1.8\%$ в интактном мозжечке и $21.1 \pm 2.7\%$ после травмы (рис. 16, в). После повреждения конечного мозга количество BrdU-позитивных клеток было в 2.6 раза ниже, чем в интактном мозжечке и в 4.5 раза ниже, чем в повреждённом (рис. 16, в).

3.6. Проллиферативный ядерный антиген клетки в мозжечке молодежи *O. masou* в норме и после повреждения

Наиболее крупной областью, содержащей PCNA-позитивные клетки, была ДМЗ. Она располагается в дорсомедиальной части тела мозжечка на границе между молекулярным и гранулярным слоями и плотность распределения PCNA-позитивных клеток в ней была выше по сравнению с прилежащими участками молекулярного слоя (рис. 17, а).

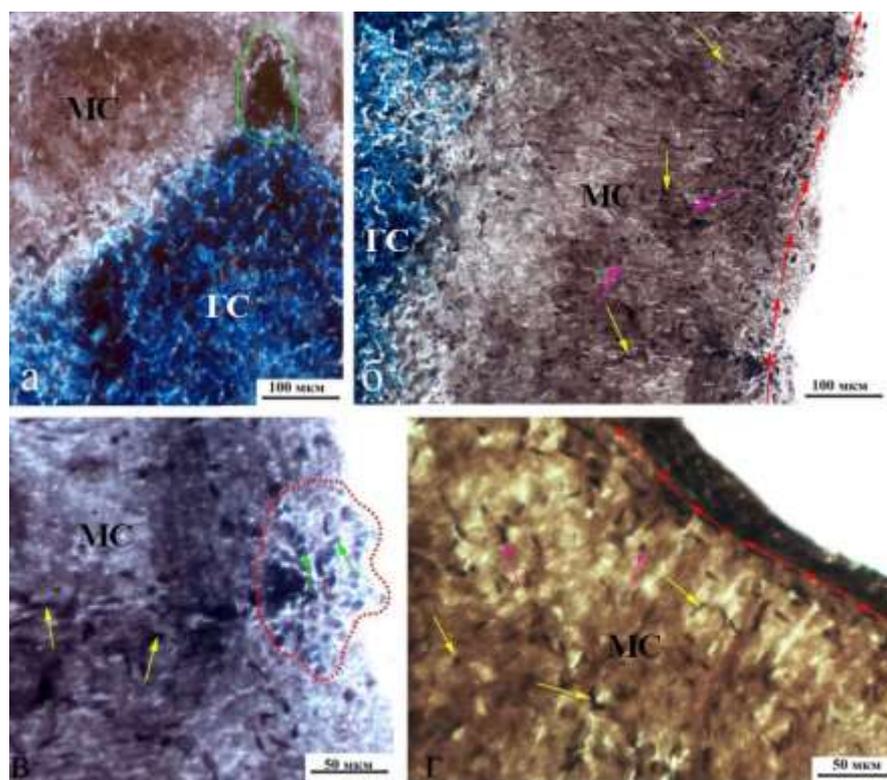


Рисунок 17 – Микрофотографии мозжечка симы *O. masou* в норме (а, б) и после повреждения (в, г) клетки которого содержат PCNA и имеют темно-коричневую окраску. а – общий вид ДМЗ; б – латеральная зона; в – нейрогенная ниша; г –дорсальная зона. Зелёным пунктиром обведена ДМЗ, красными стрелками отмечено направление тангенциальной миграции, желтыми стрелками обозначены мигрирующие клетки, розовыми – пролиферирующие, красным пунктиром обведена нейрогенная ниша, зелёными стрелками – иммунопозитивные клетки, содержащиеся в ней. МС – молекулярный слой, ГС – гранулярный слой. ИГХ маркирование PCNA в сочетании с докрасшиванием метиловым зелёным по Браше (Меркулов, 1969).

В составе данной зоны и в норме, и после повреждения нами было идентифицировано четыре типа клеток, морфометрические параметры которых приведены в табл. 3. Мелкие округлые клетки типа 1а с длиной тела от 3.3 до 3.6 мкм, типа 1б с длиной тела от 6 до 8 мкм и овальные типа 1с от 8 до 11.5 мкм, интенсивно маркировались PCNA и составляли пролиферирующую популяцию. Клетки 2 типа – палочковидные, с длинной осью тела от 10 до 11.5 мкм, относились к мигрирующей популяции, образованной тангенциально и радиально ориентированными рядами клеток. В базальной зоне после повреждения число пролиферирующих клеток увеличивалось в 2.5 раза (рис. 18, а).

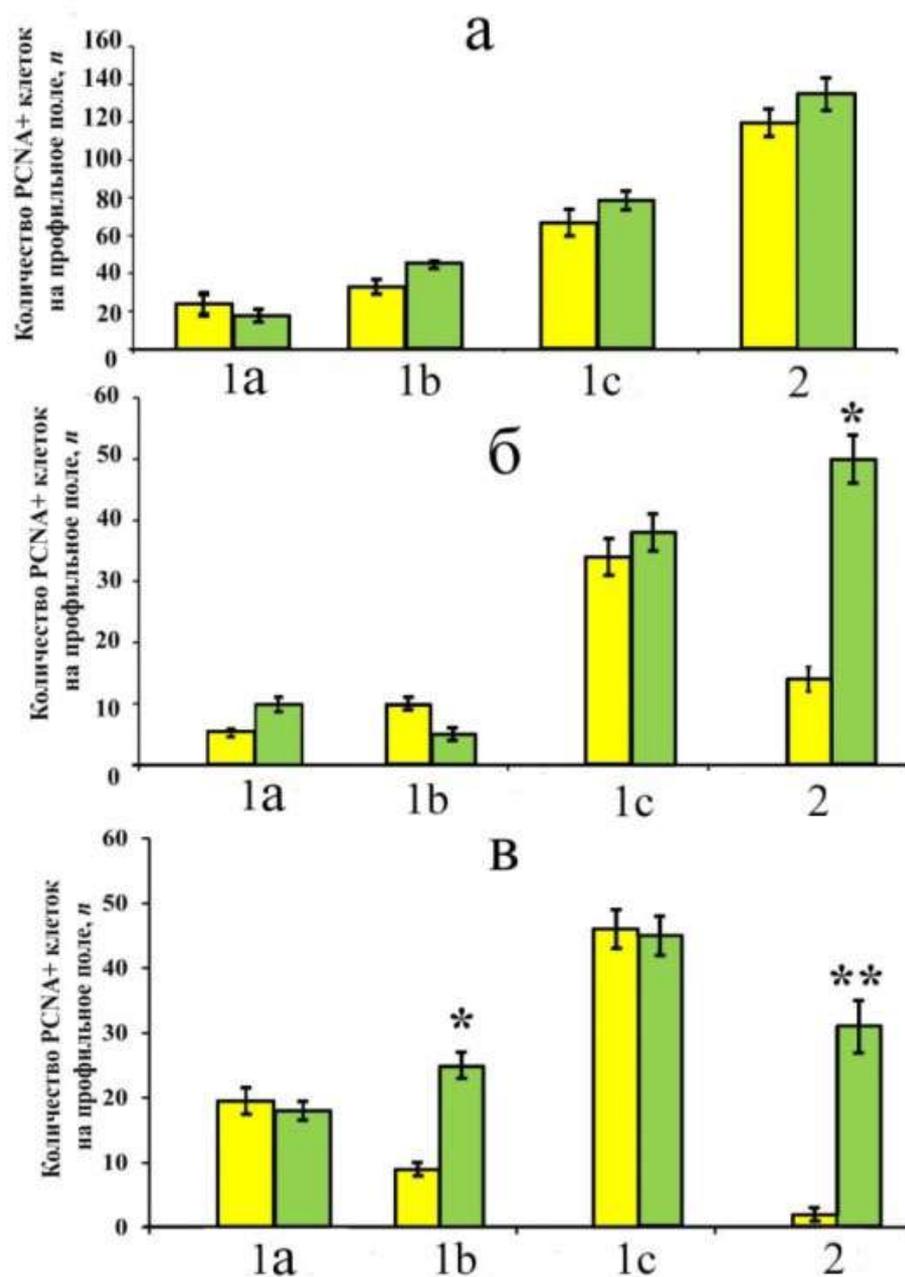


Рисунок 18 – Распределение PCNA-позитивных клеток в мозжечке молодежи симы *O. masou* в норме и после повреждения. а – дорсальная зона; б – латеральная зона; в – базальная зона. Желтые столбцы – количество клеток у контрольных животных, зелёные – количество клеток у животных при повреждении. ($n = 5$ в каждой группе, звёздочкой обозначено $P < 0.05$, двумя звёздочками – $P < 0.01$ – достоверные отличия от контрольных групп, критерий Стьюдента–Ньюмена–Келса). По оси x указан клеточный тип.

В латеральной и базальной зонах в норме нами были выявлены округлые овальные клетки типа 1с (см. табл. 3). Помимо пролиферирующих клеток после травмы появлялись мигрирующие клетки (рис. 18). Мы связываем это с тем, что через сут после повреждения вновь-созданные клетки начинают мигрировать радиально и тангенциально в большем количестве и этот процесс может усиливаться в последующие сутки (рис. 17, г). На территории латеральной зоны были обнаружены плотные кластеры интенсивно маркированных PCNA-позитивных клеток, отделенные друг от друга иммунонегативными зонами. Такие скопления мы идентифицировали, как нейрогенные ниши (рис. 17, в).

3.7. Маркирование нейрональных предшественников с помощью нестина в мозжечке молодежи *O. masou* в норме и после повреждения

При маркировании нестина на основании морфологических данных идентифицировали интенсивно маркированные небольшие клетки округлой формы, без отростков, размером от 3.5 до 5 мкм. Морфометрические параметры клеток: размеры большого и малого диаметров сом приведены в табл. 7. Нестин+ НКП были выявлены во всех зонах интактного мозжечка, что свидетельствует о наличии процессов конститутивного нейрогенеза у молодежи *симы*. Большинство интенсивно маркированных клеток располагались одиночно, иногда формируя у поверхности молекулярного слоя кластеры, содержащие от 6 до 10 элементов. У внешней границы молекулярного слоя было выявлено скопление нестин-негативных клеток, среди которых встречались нестин-позитивные НКП (рис. 19, а). Наибольшее число нестин-позитивных НКП было выявлено у внешней границы молекулярного слоя дорсальной и базальной зон – 22 ± 4 клетки (рис. 20 а, в). В толще молекулярного слоя дорсальной зоны были выявлены единичные интенсивно маркированные нестин-позитивные НКП (рис. 19, а). В районе ДМЗ интактного мозжечка были выявлены скопления интенсивно маркированных нестин-позитивных НКП (рис. 19, а). За пределами данной пролиферативной зоны единичные клетки располагались на значительном удалении друг от друга (рис. 19, а). В толще молекулярного слоя латеральной зоны помимо единичных клеток располагались скопления интенсивно маркированных клеток. В толще молекулярного слоя базальной зоны нестин-позитивные НКП отсутствовали (табл. 7).

Таблица 7 – Морфометрические параметры (мкм) и денситометрические (ЕОП) параметры нестин-позитивных НКП и нестин-негативных клеток в норме и после повреждения.

	Молекулярный слой	Гранулярный слой	Гранулярные эминенции	Область травмы
Нестин-негативные клетки, мкм				
Контроль	4.1±0.4/4±0.3	4.5±0.5/3.9±0.3	4.3±0.4/4±0.4	–
Повреждение	3.8±0.3/3.3±0.3	4.4±0.5/3.8±0.5	3.9±0.5/3.4±0.2	5±0.7/4.1±0.5
Нестин-негативные клетки, ЕОП				
Контроль	47.1±10.4	63.5±8.1	–	–
Повреждение	33.9±7.4	60±9.1	55.6±18.8	220.6±3.1
Нестин-позитивные клетки, мкм				
Контроль	4.5±0.7/3.7±0.5	5±0.9/4.2±0.8	3.9±0.3/3.4±0.1	–
Повреждение	3.8±0.7/3.1±0.5	4.1±0.6/3.2±0.6	4±0.5/3.3±0.5	4.9±0.7/4±0.5
Нестин-позитивные клетки, ЕОП				
Контроль	148±16.4	113.7±10.2	209.1±3.1	–
Повреждение	157.3±18.2	117.5±9.8	226.8±2.6	220.6±3.1

Примечание. «–» – нестин-позитивные и нестин-негативные клетки отсутствуют.

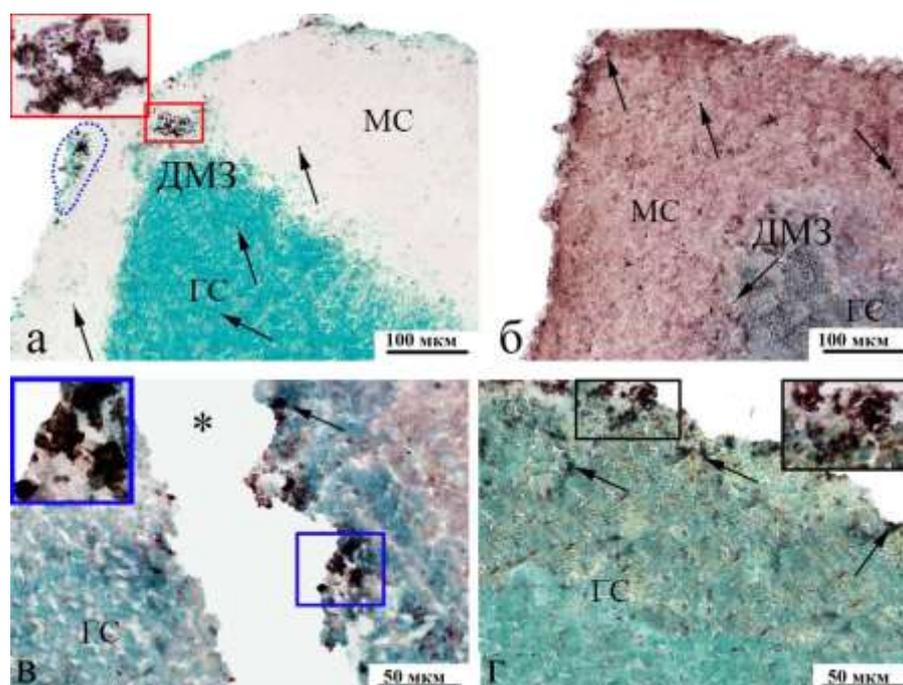


Рисунок 19 – Микрофотографии распределения нестин-позитивных НКП в мозжечке молодежи симы *O. tasou* в норме (а) и после повреждения (б-г). а – общий вид дорсальной зоны интактного мозжечка, врезка оконтуренная красным показывает скопление нестин-позитивных НКП в ДМЗ; б – общий вид дорсальной зоны поврежденного мозжечка; в – общий вид травмы, звездочкой обозначено область повреждения; врезка, оконтуренная синим показывает скопление нестин-позитивных НКП; г – ГЭ поврежденного мозжечка. МС – молекулярный слой, ГС – гранулярный слой. Синим пунктиром выделено скопление нестин-позитивных НКП; чёрными стрелками – отдельные нестин-позитивные клетки. ИГХ маркирование нестина в сочетании с докрасиванием метиловым зелёным по Браше (Меркулов, 1969).

Через двое сут после повреждения количество нестин-позитивных НКП в дорсальной области возрастало в 1.7 раз (рис. 20, а). В ДМЗ поврежденного мозжечка отсутствовали скопления нестин-позитивных НКП (рис. 19, б). Однако в молекулярном слое в три раза увеличивалось число нестин-позитивных НКП, равномерно распределенных по всей его территории на небольшом расстоянии друг от друга (рис. 19, б). Наиболее крупное скопление интенсивно маркированных нестин-позитивных НКП было выявлено в области повреждения (рис. 19, в); размер их тел составлял $4.9 \pm 0.7 / 4.1 \pm 0.5$ мкм. У внешней границы молекулярного слоя базальной зоны были выявлены большие скопления, содержащие до 22 интенсивно маркированных нестин-позитивных НКП. В латеральной области после повреждения в два раза увеличивалось

количество интенсивно маркированных нестин-позитивных НКП, которые формировали скопления (рис. 20, б).

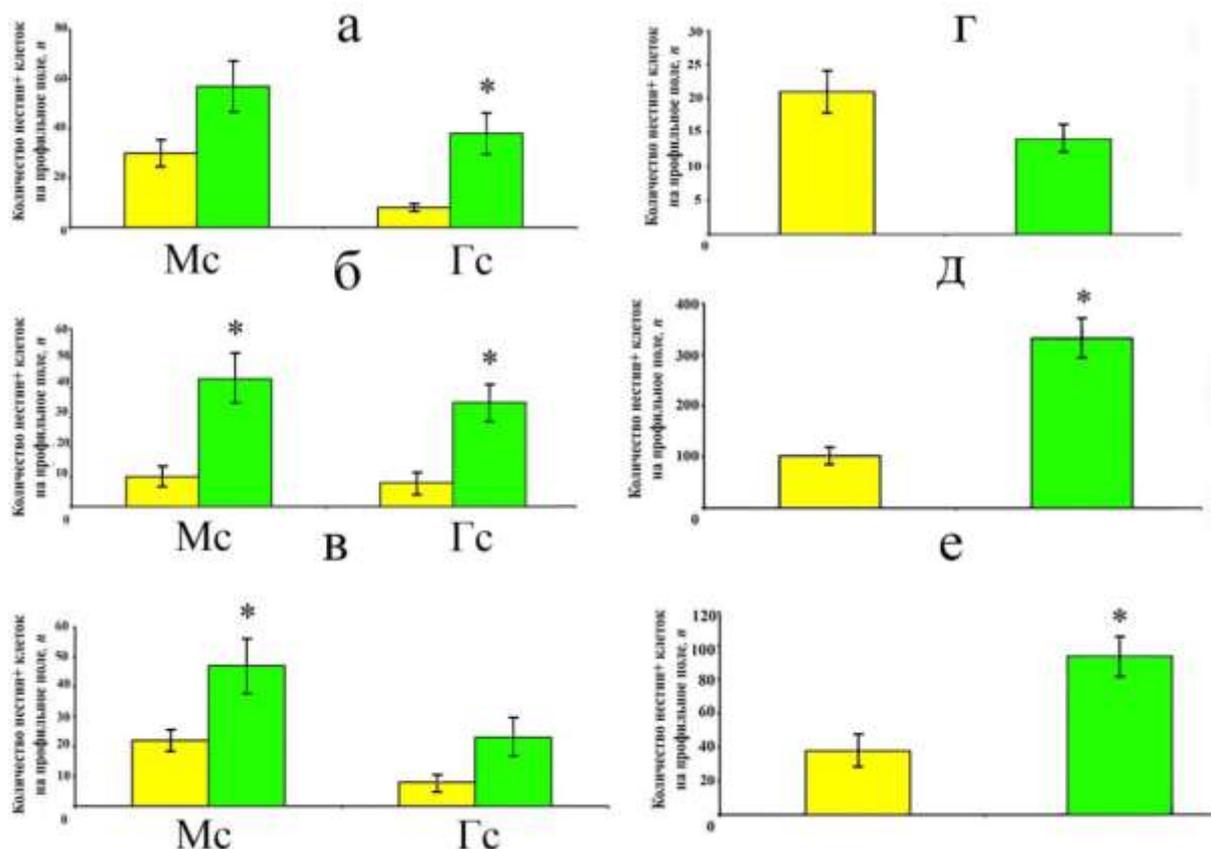


Рисунок 20 – Распределение нестин-позитивных НКП в мозжечке молодежи симы *O. masou* в норме и после повреждения. а – дорсальная зона; б – латеральная зона; в – базальная зона; г – ДМЗ; д – ГЭ; е – область прокола. Желтые столбцы демонстрируют количество клеток у контрольных животных, зелёные – количество клеток в мозжечке при повреждении. Мс – молекулярный слой, Гс – гранулярный слой. ($n = 5$ в каждой группе, $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

В гранулярном слое дорсальной зоны поврежденного мозжечка нестин-позитивные НКП формировали скопления, содержащие 10-12 элементов (рис. 19, б) и их количество увеличивалось в 4.3 раза по сравнению с интактным мозжечком (рис. 20, а). Размеры нестин-позитивных НКП были сходными для интактных животных и после травмы (табл. 7). В теле мозжечка в норме и после нанесения повреждения была характерна высокая интенсивность маркирования нестин-позитивных НКП (табл. 7). В ГЭ интенсивность маркирования достоверно возрастала в 1.5 раза ($P < 0.05$) как в норме,

так и в повреждении, составляя 209.1 ± 3.1 ЕОП в норме и 226.8 ± 2.6 ЕОП после травмы. В области повреждения для нестин-позитивных НКП была установлена высокая интенсивность маркирования 220.6 ± 3.1 ЕОП (табл. 7). ИГХ маркирование нестина показало, что именно в дорсальной зоне, содержащей ДМЗ, и в гранулярном слое поврежденного мозжечка увеличивается число нестин-позитивных НКП в ответ на механическую травму.

После нанесения повреждения возрастало число нестин-позитивных НКП в ГЭ (рис. 20, д). В ГЭ интактного мозжечка было выявлено единичных 15 ± 3 нестин-позитивных НКП и 2–3 кластера по 6–8 элементов на профильное поле. Большая часть маркированных клеток располагалась у внешней границы ГЭ. В толще были выявлены немногочисленные кластеры, содержащие по 15–24 маркированных клеток. Нестин-позитивных иммуномаркирование было выявлено во вновь созданных дочерних клетках (рис. 19, г). Пролиферативный индекс ГЭ в норме составлял $3.8\% \pm 0.7\%$. После повреждения значительно увеличивалось количество нестин-позитивных НКП, образующих диффузные скопления, содержащие по 9–11 элементов (рис. 19, г). В толще ГЭ большинство одиночных клеток располагалось у внешних границ (рис. 19, г). В норме пролиферативный индекс в ГЭ составлял $3.8\% \pm 0.7\%$, через двое сут после повреждения – $8.4\% \pm 0.6\%$, размеры нестин-позитивных НКП в ГЭ были сходными для интактных животных и после травмы (табл. 7).

3.8. Виментин, как маркер нейрональной пластичности в мозжечке молодой самки *O. masou* в норме и после повреждения

В норме ИГХ активность виментина – белка промежуточных филаментов и маркера астроцитарной глии (Arochena et al., 2004) была выявлена во всех зонах тела мозжечка: дорсальной, базальной, латеральной. При маркировании виментина идентифицировали два типа клеток. Интенсивно маркированные, округлой формы виментин-позитивные клетки, лишенные отростков и расположенные в молекулярном слое, были отнесены нами к 1а типу. Размер их тел составлял от 3.6 до 5.8 мкм. Округлые, интенсивно маркированные виментин-позитивные клетки в гранулярном слое соответствовали 5 типу. Морфометрические параметры клеток: размеры большого и малого диаметров сом приведены в табл. 3.

Таблица 8 – денситометрические параметры виментин-позитивных элементов и виментин-негативных клеток* в норме и после повреждения в единицах оптической плотности – ЕОП.

Клеточный тип	Молекулярный слой	Гранулярный слой
1а, округлые		
Контроль	198.5±7.7	–
Повреждение	182.9±1.6	–
Гранулы		
Контроль	156.4±15.2	71.8±12.7
Повреждение	141.9±12.4	151.5±11.2
5, гранулярные клетки		
Контроль	–	177.3±13.4
Повреждение	–	214.97±22.4
Виментин-негативные клетки		
Контроль	75.8±4.6	58.5±6.4
Повреждение	126.6±8.2	94.5±5.5

Примечание. «–» – виментин-позитивные клетки отсутствуют.

Максимальное число виментин-позитивных клеток было выявлено в молекулярном слое (рис. 21). В интактном мозжечке были выявлены единичные кластеры по 6–8 интенсивно маркированных виментин-позитивных клеток (рис. 22, а). Единичные интенсивно маркированные клетки 1а типа были расположены у внешней границы и в толще молекулярного слоя (рис. 22, а).

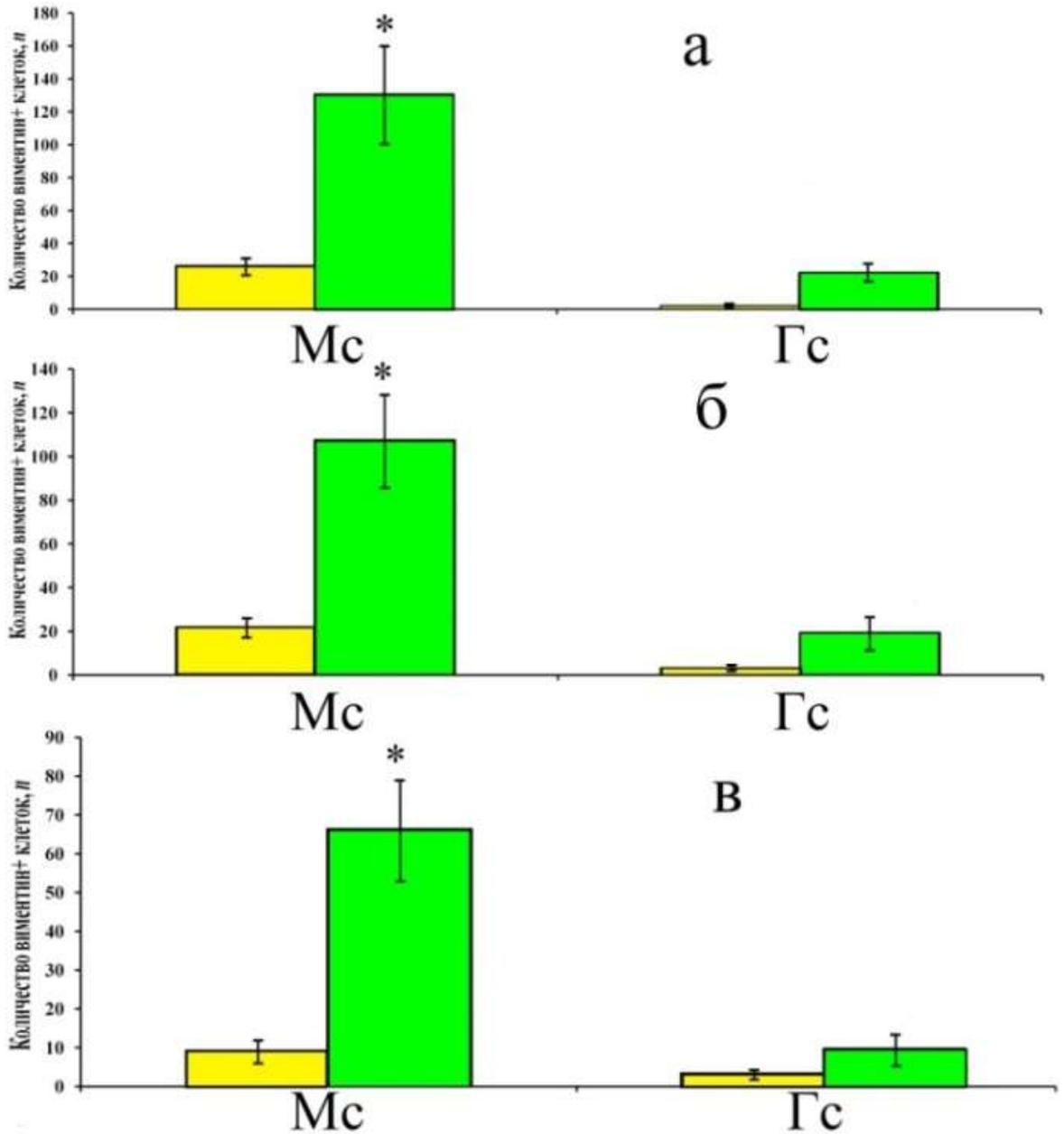


Рисунок 21 – Распределение виментин-позитивных клеток в мозжечке молодежи симы *O. masou* в условиях нормы и после повреждения. Желтые столбцы демонстрируют количество клеток у контрольных животных, зелёные – количество клеток в мозжечке при повреждении. Mc – молекулярный слой, Гс – гранулярный слой. ($n = 5$ в каждой группе, $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

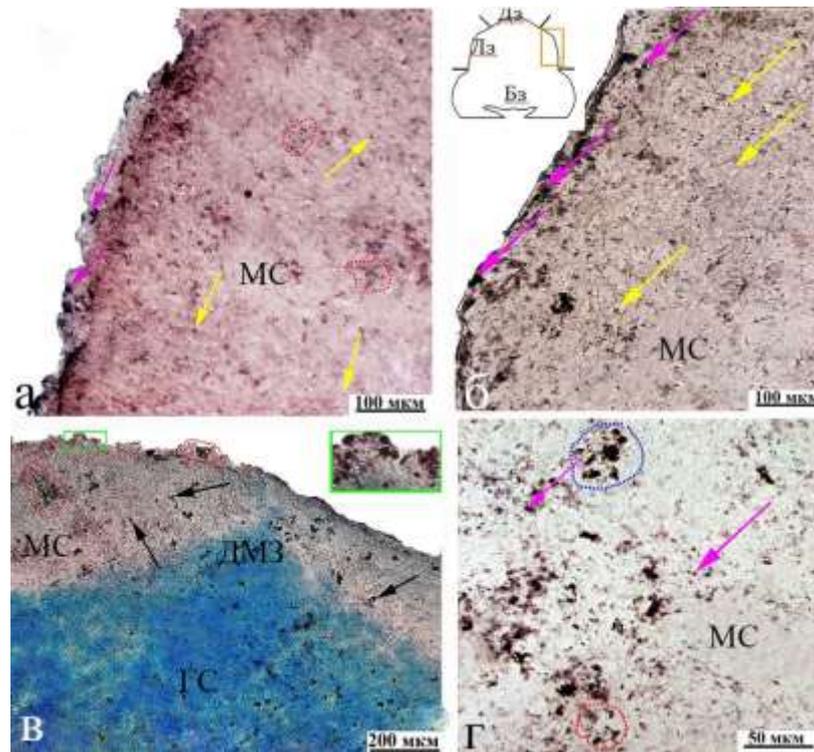


Рисунок 22 – Микрофотографии экспрессии белка промежуточных филаментов виментина в мозжечке симы *O. tasou* в норме (а) и после повреждения (б-г). а – латеральная зона интактного мозжечка; б – латеральная зона поврежденного мозжечка; в – ДМЗ поврежденного мозжечка; г – молекулярный слой поврежденного мозжечка. Зелёной врезкой показано скопление виментин-положительных клеток, розовые стрелки показывают отдельные виментин-положительные клетки 1b типа, желтые – виментин-положительные гранулы. МС – молекулярный слой, ГС – гранулярный слой. Красным цветом оконтурено скопление виментин-положительных гранул, синим – скопление виментин-положительных клеток 1b типа, синие – клетки 5 типа. ИГХ маркирование виментина в сочетании с докрасчиванием метиловым зелёным по Браше (Меркулов, 1969).

В мозжечке были идентифицированы немногочисленные, равномерно распределенные интенсивно маркированные виментин-положительные гранулы (рис. 22, а). Максимальная концентрация и наиболее интенсивное маркирование виментин-положительных гранул было установлено для гранулярного слоя, их оптическая плотность составляла 156.4 ± 15.2 ЕОП (табл. 8). В молекулярном слое интенсивность их маркирования снижалась в два раза, 71.8 ± 12.7 ЕОП (табл. 8). В гранулярном слое латеральной зоны иммуномаркирование виментина было выявлено во вновь созданных дочерних клетках. Гранулярный слой интактного мозжечка содержал небольшое число:

3 ± 1 , единичных, интенсивно маркированных клеток 5 типа (рис. 21, б). В редких случаях клетки имели отростки. В интактном мозжечке самая высокая плотность маркирования наблюдалась у клеток 1а типа – 198.5 ± 7.7 ЕОП и у округлых клеток 5 типа гранулярного слоя, ОП – 177.3 ± 13.4 ЕОП (табл. 8).

Через двое сут после нанесения механической травмы во всех зонах мозжечка молодёжи симы наблюдалось значительное увеличение количества виментин-позитивных клеток. В дорсальной и латеральной зонах количество виментин-позитивных клеток 1а типа возрастало в 5 раз, в базальной в 7 раз ($P < 0.01$) (рис. 21). В гранулярном слое максимальное увеличение в 5 раз числа клеток 5 типа было установлено для дорсальной и латеральной зон (рис. 21, а, б). У внешней границы молекулярного слоя повреждённого мозжечка интенсивно маркированные виментин-позитивные клетки 1а типа были распределены равномерно, в отдельных случаях формируя небольшие кластеры (рис. 22, б). Интенсивность иммуномаркирования виментина в клетках была умеренной либо сильной. У внешней границы дорсальной зоны клетки 1а типа формировали обширные кластеры. Далее у внешней границы латеральной зоны их плотность постепенно снижалась (рис. 21, в). У базальной зоны клетки 1а типа были расположены на большом расстоянии друг от друга.

В толще молекулярного слоя были выявлены немногочисленные кластеры, содержащие по 13–15 интенсивно маркированных виментин-позитивных клеток, единичные виментин-позитивные клетки 1а типа были равномерно распределены между ними (рис. 22, в). Интенсивность маркирования в клетках 5 и 1а типа, виментин-позитивных гранул гранулярного слоя была сходной как в интактном, так и повреждённом мозжечке. При ИГХ маркировании виментина значительно возрастало количество интенсивно маркированных диффузно расположенных небольших гранул, имеющих субклеточную локализацию, расположенных в различных частях сом позитивных клеток по сравнению с контролем (рис. 22, в). Концентрация иммуномаркированных гранул была выше в молекулярном слое, чем в гранулярном (рис. 21, б). В молекулярном слое ОП виментин-позитивных гранул возрастала в два раза по сравнению с контролем (табл. 8). Также выявлялись мелкие интенсивно маркированные дочёрные клетки.

3.9. GFAP-маркирование глиогенеза и нейрональных стволовых клеток в мозжечке молодежи симы *O. masou* в норме и после повреждения

При маркировании GFAP в мозжечке молодежи симы идентифицировали несколько типов клеток: мелкие, округлые умеренно маркированные клетки размером от 4 до 4.5 мкм относили к 1a типу. Мы предполагаем, что они представляют собой клетки, находящиеся на ранней стадии дифференциации. Морфометрические параметры клеток: размеры большого и малого диаметров сом приведены в табл. 3. Крупные, интенсивно маркированные клетки овальной формы размером в 9 мкм, были отнесены к 1с типу (табл. 3). Интенсивность маркирования составляла – 122.28 ± 5.7 ЕОП. В гранулярном слое – области максимальной плотности GFAP-негативных клеток на основании морфологических данных интенсивно маркированные GFAP клетки округлой формы были отнесены к 5 типу (табл. 3). Они располагались на большом расстоянии друг от друга, в редких случаях формируя единичные кластеры по 3–4 элемента. В мозжечке молодежи симы интенсивное маркирование GFAP было выявлено в волокнах трактовых систем: в составе мозжечковых ножек, расположенных в базальной части тела мозжечка, в РГ (рис. 23, а). GFAP-позитивные волокна были представлены в составе экстрацереbellарных восходящих афферентных интенсивно маркированных систем. Помимо этого можно было проследить интенсивно и слабо маркированные радиальные волокна.

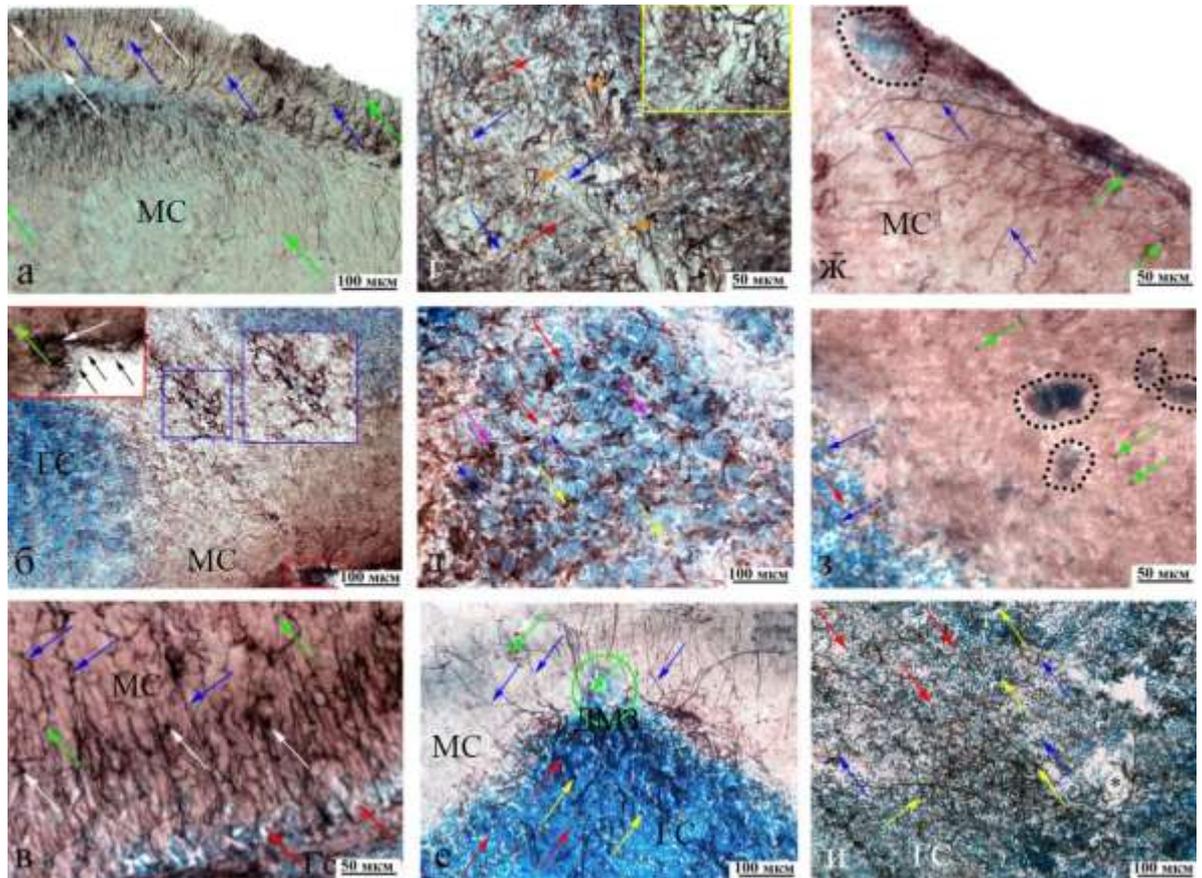


Рисунок 23 – Микрофотографии мозжечка молодежи симы *O. masou* в норме (а-д) и после повреждения (е-и), клетки которого содержат глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP). GFAP-позитивные клетки имеют темно-коричневую окраску, GFAP-негативные – голубую. а – общий вид распределения GFAP на сагиттальной проекции в дорсо-латеральной зоне интактного мозжечка; б – базальная зона мозжечка, врезка оконтуренная красным показывает скопление клеток 1с типа, синим – лиановидные волокна в срединном шве; в – РГ в молекулярном слое; г – лиановидные волокна мозжечка, красными стрелками обозначены толстые лиановидные волокна, синими – тонкие волокна РГ; д – сплетение волокон в гранулярном слое; е – общий вид дорсальной матричной зоны, желтым цветом оконтурена GFAP-негативная ДМЗ; ж – нейрогенная ниша в дорсальной области; з – нейрогенные ниши в латеральной зоне; и – гранулярный слой с умеренной плотностью GFAP-позитивных волокон, звездочкой отмечены разреженные участки. Белыми стрелками обозначены интенсивно маркированные клетки 1с типа, зелёными стрелками – умеренно маркированные клетки 1а типа, чёрными – GFAP-негативные клетки нейроэпителлия, синими – волокна РГ, желтыми стрелками обозначены клетки 5 типа, красными GFAP-негативные клетки, бирюзовыми GFAP-позитивные волокна гранулярного слоя. Чёрным пунктиром

обведены нейрогенные ниши, содержащие GFAP-негативные клетки. МС – молекулярный слой, ГС – гранулярный слой. ИГХ маркирование GFAP в сочетании с докрасиванием метиловым зелёным по Браше (Меркулов, 1969).

В гранулярном слое интактного мозжечка – области максимальной плотности распределения клеток была выявлена область повышенного распределения разнонаправленных, тонких GFAP-позитивных волокон, среднее число которых на профильное поле составляло 700 ± 63 элементов (рис. 23, д). ОП волокон составляла 181 ± 10.7 ЕОП, в зоне сплетения GFAP-позитивных волокон – 132.8 ± 7.2 ЕОП. Число GFAP-позитивных клеток 5 типа составляло 60 ± 5 элементов на профильное поле. Был установлено, что с повышением плотности распределения GFAP-позитивных волокон возрастает и число GFAP-позитивных клеток: 48 ± 4 элементов на профильное поле, а ОП – 172.4 ± 10 ЕОП. В области с умеренной плотностью GFAP-позитивных волокон в гранулярном слое их число составляло 510 ± 37 элементов. Количество GFAP-позитивных клеток 5 типа составляло 22 ± 5 элемента на профильное поле.

Через сут после нанесения повреждения количество GFAP-позитивных клеток и волокон значительно увеличивалось (рис. 24). Интенсивность маркирования GFAP-позитивных клеток после нанесения травмы не изменялась. Клетки 1а типа интактного мозжечка более пластичны, о чем свидетельствуют показатели оптической плотности – 83.3 ± 17.7 ЕОП в норме и 70.4 ± 3.5 ЕОП после повреждения.

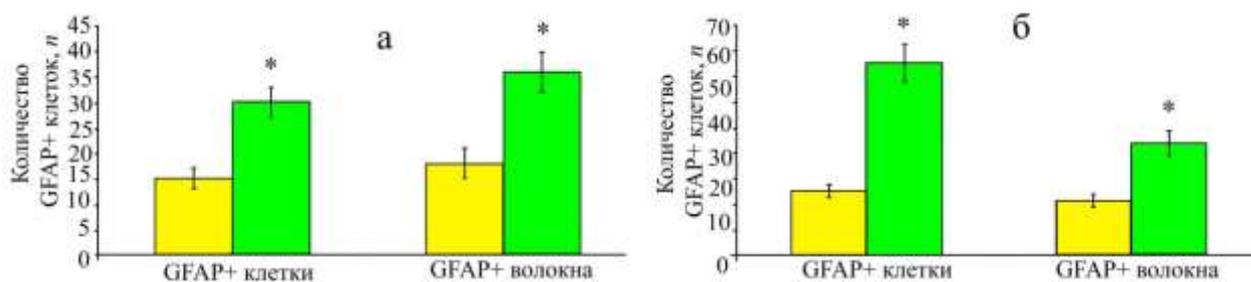


Рисунок 24 – Соотношение GFAP-позитивных клеток и волокон в мозжечке молодежи симы *O. tasou* в условиях нормы и после повреждения. а – дорсальная зона, б – базальная зона. Желтым цветом отмечен контроль, зелёным – повреждение. ($n = 5$ в каждой группе, звёздочкой обозначено $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, Критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

После травмы в дорсальной зоне мозжечка была идентифицирована и охарактеризована ДМЗ, центральная часть которой была GFAP-негативной (рис. 23, е). В данной области формируются разнонаправленные, малоразветвленные, радиально ориентированные пучки тонких GFAP-позитивных волокон. Они являются отростками клеток РГ 1с типа, расположенных у поверхности молекулярного слоя. По этим отросткам пролиферирующие клетки 1а типа более эффективно мигрируют во внутренний слой и к зоне травмы (рис. 23, е). У поверхности дорсальной и базальной зон и в толще молекулярного слоя в латеральной зоне поврежденного мозжечка были выявлены мелкие локальные плотные скопления GFAP- клеток, морфологические параметры которых соответствуют таковым клеток 1b типа, маркированных PCNA (рис. 1, ж, з, табл. 3).

Такие клеточные конгломераты мы рассматриваем, как реактивные нейрогенные ниши, возникающие в ответ на повреждающее воздействие. В дорсальной, базальной и латеральной зонах встречались ниши со средней площадью 3192 ± 427 , 6650 ± 721 и 1393 ± 653 μm^2 соответственно. Во всех вышеуказанных зонах параметры пролиферирующих PCNA-позитивных клеток совпадают по исходным морфологическим параметрам с GFAP-негативными клетками (табл. 3, 9). В составе ниш наблюдалось 2 типа GFAP-негативных клеток: округлые с размером тела от 4 до 6 μm и округлые от 6 до 8 μm (табл. 9).

Таблица 9 – Морфометрические (мкм) и денситометрические (ЕОП) параметры GFAP-негативных клеток* в нейрогенных нишах дорсальной, латеральной и базальной зон мозжечка симы *O. masou* после механической травмы

Клеточный тип	Дорсальная зона	Латеральная зона	Базальная зона
1а, мкм	$5.9 \pm 0.1 / 2.6 \pm 0.1$	$4.1 \pm 0.2 / 3.2 \pm 0.3$	$4.8 \pm 0.0 / 2.7 \pm 0.1$
1а, ЕОП	36 ± 4.6	29.7 ± 6.7	27.8 ± 2.7
1b, мкм	$8 \pm 0.3 / 4.5 \pm 0.3$	$6.3 \pm 0.2 / 4.6 \pm 0.2$	$6.4 \pm 0.2 / 4.6 \pm 0.1$
1b, ЕОП	59.4 ± 5.2	55.3 ± 7.1	64.5 ± 6.8

Клетки типа 1b в среднем, по всей видимости, представляют собой более поздние и дифференцированные стадии развития клеток 1a. В дорсальной и базальной зонах к нейрогенным нишам прилегали GFAP-позитивные радиальные волокна (рис. 1, ж, з). Гетерогенный характер иммуномаркирования волокон, идентифицированных в этих зонах, очевидно, свидетельствует о различной пространственной локализации волокон в объеме среза. Возле нейрогенных ниш латеральной зоны GFAP-позитивных волокон не было обнаружено (рис. 23, з). На некотором удалении от максимального скопления GFAP-клеток обнаружены типичные клетки РГ 1с типа, имеющие крайне высокую интенсивность иммуномаркирования GFAP (116.2 ± 4 ЕОП). Размеры таких клеток оставляли 9 мкм в дорсальной, 6–8 мкм в латеральной и 7 мкм в базальной зонах. Для латеральной зоны было характерно незначительное снижение интенсивности маркирования GFAP-позитивных клеток 1с типа – 83.6 ± 12 ЕОП, в дорсальной и базальной – 109.4 ЕОП.

Средняя длина волокон в молекулярном слое интактного мозжечка на тест-поле составляла 82 ± 7 мкм, в повреждении 130 ± 13 мкм. Это свидетельствует о возрастании плотности распределения GFAP-позитивных волокон в мозжечке молодежи симы в результате травмы. Как и в молекулярном слое, в гранулярном длина волокон увеличивалась, составляя после повреждения 81 ± 13 мкм и норме – 55.12 ± 9.8 мкм. В гранулярном слое поврежденного мозжечка, как и в интактном, были выявлены области с различной плотностью. Количество GFAP-позитивных клеток значительно возрастало по сравнению с нормой, как мы предполагаем, это связано с процессами реактивного глиоза. В отличие от нормы в поврежденном мозжечке были выявлены зоны с низкой плотностью GFAP-негативных клеток, в которых количество GFAP-позитивных клеток 5 типа уменьшалось в два раза по сравнению с зоной умеренной плотности (рис. 24, и). В отличие от интактного в гранулярном слое поврежденного мозжечка не были выявлены зоны повышенной плотности распределения волокон. Число GFAP-позитивных волокон на профильное поле в ней составляло 326 ± 27 элементов.

3.10. Маркёр ранней нейрональной дифференциации NuCD в мозжечке молоди симы *O. masou* в норме и после повреждения

NuCD-позитивные клетки, находящиеся на различных стадиях дифференциации, были выявлены как у поверхности, так и в толще молекулярного слоя, мозжечка в норме и после нанесения повреждения. Для поверхностных слоёв было характерно наличие недифференцированных клеток, в то время как в толще располагались нейроны на различной стадии дифференциации. На основании интенсивности иммуномаркирования, размерных характеристик и наличия отростков нами было выделено 4 типа NuCD-позитивных клеток. Морфометрические характеристики NuCD-позитивных клеток приведены в табл. 3.

В интактном мозжечке наибольшее число NuCD-позитивных клеток было характерно для дорсальной зоны, включающей ДМЗ. В норме на территории этой зоны преобладали недифференцированные округлые клетки NuCD-негативные 1a и NuCD-позитивные клетки 1b типа, слабо маркированные и лишённые отростков. Такие клетки формировали небольшие поверхностно расположенные кластеры по 7–10 клеток, в толще молекулярного слоя располагались чаще всего отдельно, на небольшом расстоянии друг от друга (рис. 25, а). Округлые и овальные интенсивно маркированные NuCD-позитивные клетки в редких случаях формировали кластеры по два клеточных элемента, чаще располагаясь одиночно на небольшом расстоянии друг от друга (рис. 25, а). В дорсальной зоне мы обнаружили, что наибольшее число NuCD-позитивных клеток располагается рядом с ДМЗ, по мере удаления от матричной зоны концентрация клеток уменьшалась в латеральном направлении и в области дорсо-латеральной зоны их число минимально (рис. 25, а). В интактном мозжечке клетки Пуркинье грушевидной формы размером $14.9 \pm 3 / 10.5 \pm 0.6$ мкм в среднем выявлялись в ганглионарном слое (табл. 3). Наибольшее число таких клеток было выявлено в базальной зоне (рис. 26, в). У грушевидных клеток маркировались проксимальные зоны дендритов. Интенсивно маркированные ЭДК размером $31.6 \pm 0.3 / 12.7 \pm 2.7$ мкм, в среднем, встречались во всех зонах. Их количество было значительно меньше по сравнению с другими клеточными формами – 6.5% в дорсальной, 7.5% в латеральной и 12.3% в базальной зонах. На территории латеральной и базальной зон интактного мозжечка в поверхностном слое располагались конститутивные нейрогенные ниши, содержащие интенсивно маркированные, округлые клетки 1c типа (рис. 25, б). Через двое сут после нанесения

травмы плотность распределения клеток в глубоких слоях молекулярного слоя значительно увеличивалась (рис. 26).

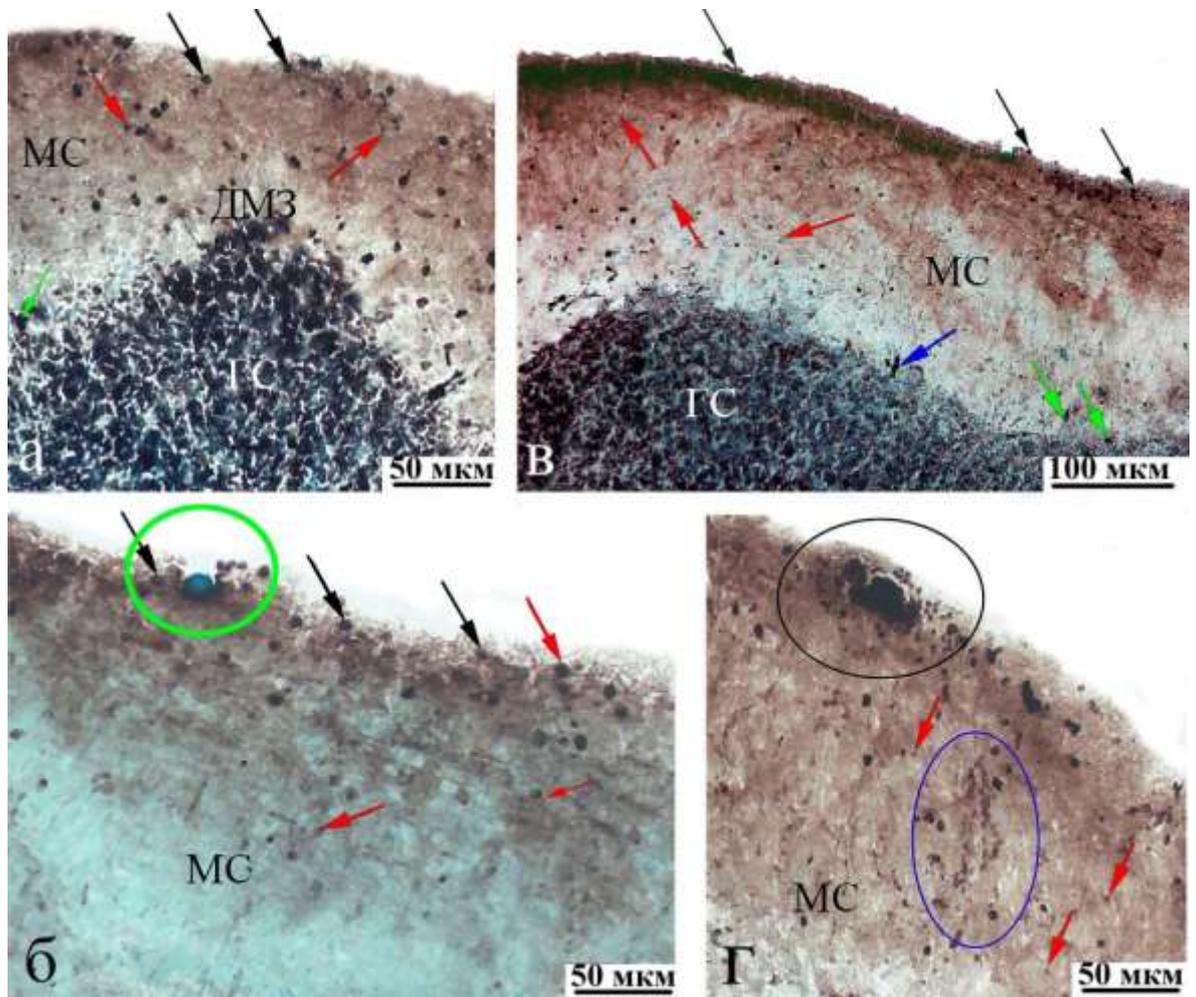


Рисунок 25 – Микрофотографии экспрессии белка NuCD в мозжечке симы *O. masou* в норме (а, б) и после повреждения (в, г). а – дорсальная зона интактного мозжечка; б – молекулярный слой дорсальной зоны интактного мозжечка, зелёным овалом обозначена нейрогенная ниша; в – дорсальная зона поврежденного мозжечка; г – молекулярный слой дорсальной зоны после повреждения: чёрный овал очерчивает поверхностную нейрогенную нишу, содержащую NuCD-позитивные клетки, синий овал, NuCD– мигрирующие клетки. MC – молекулярный слой, ГС – гранулярный слой. Красные стрелки указывают недифференцированные клетки 1a и 1b типа; чёрные стрелки – клетки типа Ic; синие стрелки – ЭДК, зелёные стрелки – клетки Пуркинье. ИГХ маркирование NuCD. ИГХ маркирование NuCD в сочетании с докрасиванием метиловым зелёным по Браше (Меркулов, 1969).

Данные количественного анализа показали, что доля таких клеток составляла 42.3% в дорсальной, 18% в латеральной и 31% в базальной зонах. На территории дорсальной зоны интенсивно маркированные округлые клетки 1c типа имели выраженные отростки, их число значительно превышало количество клеток 1a, b типа. В латеральной зоне плотность распределения клеток была сходной с дорсальной. Однако на территории латеральной зоны в основном преобладали округлые клетки 1c типа (рис. 26, б).

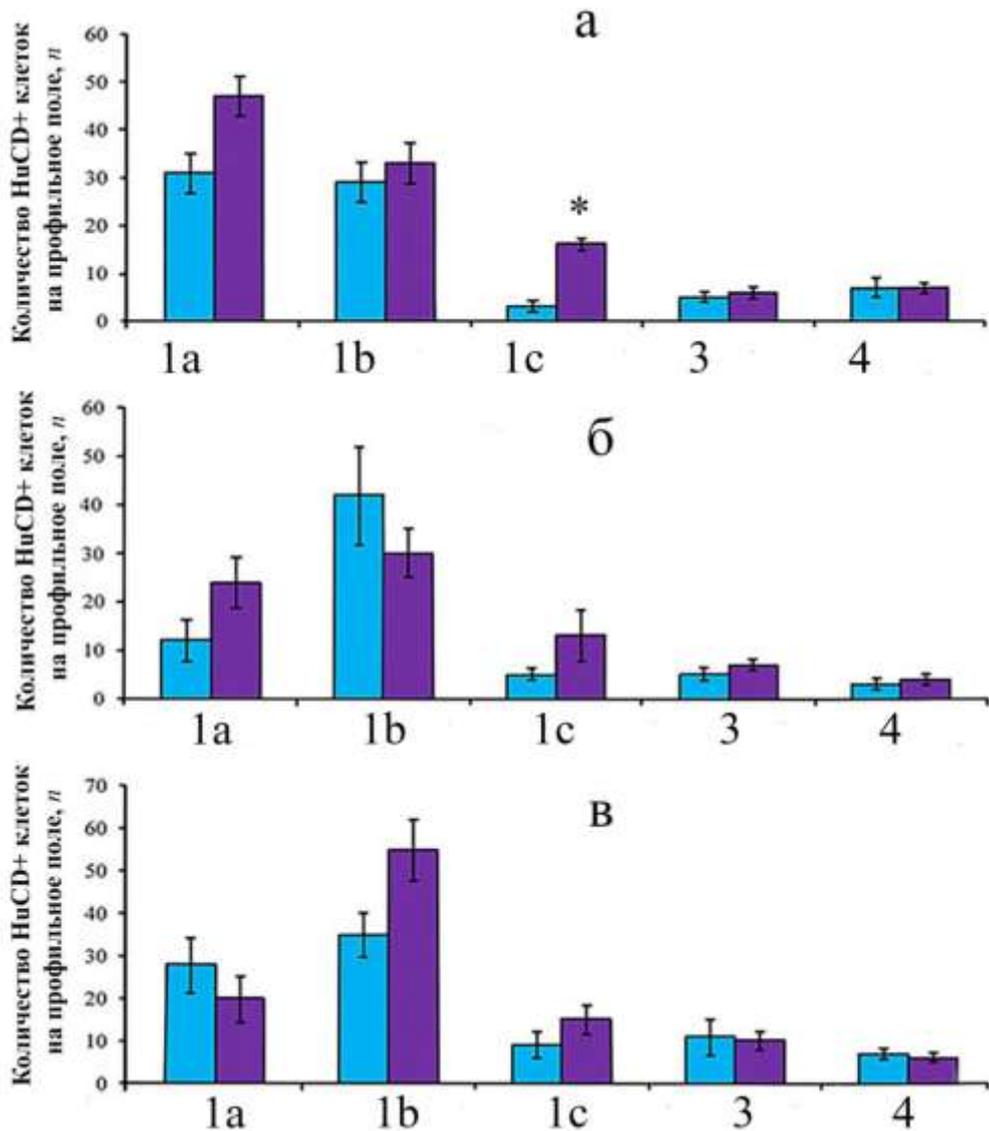


Рисунок 26 – Соотношение HuCD-позитивных клеток в мозжечке *O. masou* в контроле (голубые столбцы) и поврежденного мозжечка (фиолетовые столбцы). ($n = 5$ в каждой группе). а – дорсальная, б – латеральная, в – базальная зона. Звёздочкой обозначено $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп, критерий Стьюдента–Ньюмена–Келса). По оси x указан тип клеток.

Как и в интактном мозжечке наибольшая концентрация клеток была выявлена в дорсальной зоне (рис. 25, в). Клеточный состав ниш интактного мозжечка более однороден в отличие от реактивных нейрогенных ниш, возникающих в ходе травмы и содержащих клетки разного типа, в том числе и недифференцированные. В посттравматический период на всей территории дорсальной зоны было выявлено большое количество NuCD-позитивных клеток. В норме у поверхности молекулярного слоя располагались округлые клетки 1a, 1b типа, формирующие конститутивные нейроэпителиальные нейрогенные ниши (рис. 25, б). После нанесения травмы NuCD-позитивные клетки были выявлены в составе реактивных нейрогенных доменов, содержащие гетерогенные клеточные популяции всех типов, в том числе и крупные, интенсивно маркированные, удлинённые клетки (рис. 25, г). Другим важным наблюдением является увеличение общего числа реактивных нейрогенных доменов на территории мозжечка. Вышеуказанные факты свидетельствуют о реактивации конститутивных нейрогенных ниш после повреждения. Рядом с нейрогенными нишами были выявлены тангенциально мигрирующие слабо маркированные клетки (рис. 25, г). На территории базальной зоны в отдельных случаях были выявлены интенсивно маркированные недифференцированные клетки 1a, b типа, не обнаруженные в составе других зон. В базальной зоне было обнаружено наибольшее число округлых клеток 1b типа после нанесения повреждения – 55 ± 7 клеток (рис. 26). Интенсивно маркированных округлых клеток 1c типа, в отдельных случаях, имеющих отростки, было значительно больше после нанесения повреждения. В глубоких слоях всех зон мозжечка выявлялись крупные клетки Пуркинье (3 тип) и ЭДК (4 тип). Наибольшее их число после повреждения, как и в норме, было выявлено в базальной зоне (рис. 26, в).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Сима *Oncorhynchus masou*

В наших исследованиях эффекты повреждающего воздействия на мозжечок молоди симы комбинировались со сложным морфогенетическим фоном продолжающегося постэмбрионального развития мозга. Экспериментальные рыбки находились в процессе активного роста, что обуславливало повышенную пролиферативную активность как в первичной матричной области мозга (перивентрикулярной зоне), так и в зонах вторичной пролиферативной активности, выявляемых у взрослых животных (Pushchina et al., 2012). Сима подходит в качестве модели 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*.

В своих заключениях мы опирались, с одной стороны, на данные литературы о состоянии матричных зон мозжечка у взрослых рыб и их изменениях при нанесении повреждающего воздействия (Zupanc, Sîrbulescu, 2013), а с другой – на результаты сопоставления морфологических паттернов непосредственно вблизи зоны повреждения и на некотором удалении от нее. Пролиферативный ответ на повреждение мозжечка у молоди симы мы интерпретировали с учетом достаточно высокого фонового уровня активности матричных зон мозга.

Клеточная организация тела мозжечка костистых рыб известна из ряда работ с использованием классической морфологической методологии, в частности метода Гольджи, (Nieuwenhuys, Nicholson, 1969; Pouwels, 1978a-c; Folgueira et al., 2006) и электронно-микроскопических исследований (Pouwels, 1978b). Молекулярный слой содержит параллельные волокна, дендриты клеток Пуркинье, дендриты ЭДК и звездчатые клетки. Мозжечок костистых рыб лишен собственных ядер, но имеет группу специализированных ЭДК, которые расположены рядом с клетками Пуркинье и формируют экстрацереbellарные проекции в различные отделы мозга (Folgueira et al., 2006). В 1974 было впервые установлено, что ганглионарный слой мозжечка мормирид содержит два типа нейронов: клетки Пуркинье и ЭДК. Было высказано предположение, что последние элементы представляют эфференты, в этом отношении сопоставимые с клетками собственных ядер мозжечка высших позвоночных (Nieuwenhuys et al., 1974). Гранулярный слой, расположенный под ганглионарным слоем, состоит из гранулярных

клеток, терминалей мшистых волокон и клеток Гольджи, распределенных по всему гранулярному слою (Nieuwenhuys, Nicholson, 1969; Meek, Nieuwenhuys, 1991). Гранулярные клетки формируют параллельные волокна, которые проникают в молекулярный слой и гребень мозжечка, проецируясь в область боковой линии ромбовидного мозга (Meek, 1992).

4.2. Физиологическая гибель клеток в мозжечке молодежи *O. masou* после механического повреждения

У рыб, в отличие от млекопитающих, процессы апоптоза преобладают над некрозом в результате повреждения (Zupanc et al., 1998). У млекопитающих некротическая гибель клеток – основной процесс в зоне травмы, что приводит к воспалению данного участка и на месте травмы постепенно образуются большие полости, лишенные клеток. Располагаясь на границе с «астроцитарным рубцом», эти полости действуют как биохимические барьеры, предотвращая рост нервных волокон и миграцию клеток в место повреждения. Апоптоз же затрагивает незначительное число клеток только в прилегающих областях. В отличие от некроза апоптоз характеризуется сжатием клетки, конденсацией ядра и образованием везикул, которые уничтожаются другими клетками. Благодаря этому побочные эффекты, свойственные некрозу, такие как воспаление прилежащих тканей, не характерны для апоптоза – «чистой» клеточной смерти (Zupanc, 2012). Пока остается неизвестным, каким образом в процессе нейрогенеза осуществляется баланс процессов пролиферации клеток и апоптоза, обеспечивающий эффективный механизм конститутивного нейрогенеза (Zupanc, Sîrbulescu, 2013). Проявления апоптоза в интактном мозге рыб были описаны у *A. leptorhynchus* (Zupanc, 2006). Установлено, что в ходе пролиферативной активности в матричных зонах мозжечка образуются клетки с признаками соматической анеуплоидии. Такие клетки являются явно дефектными и, не обладая нормальным диплоидным набором хромосом, подлежат элиминации по апоптотическому сценарию (Zupanc, Ott, 1999). У млекопитающих во время раннего эмбриогенеза и на ранних этапах постнатального развития был установлен высокий уровень анеуплоидности для вновь созданных клеток (Rehen et al., 2001). Диффузная картина гибели клеток является характерной чертой мозжечка в посттравматический период у молодежи *O. masou* (Stukaneva et al., 2015; Pushchina et al., 2017b). Повреждение гематоэнцефалического барьера сопровождается интенсивным воспалительным ответом как со стороны

микроглии, так и моноцитов, макрофагов, Т-клеток и нейтрофилов, проникающих в область повреждения (Raivich et al., 1999).

Процесс апоптотической гибели клеток наблюдался в ходе конститутивного нейрогенеза в мозге осетра (Пущина, Обухов, 2011) и одновременно являлся физиологической реакцией со стороны ЦНС симы на повреждение мозжечка. В исследованиях на взрослых особях амурского осетра были обнаружены высокие значения индекса апоптоза в различных участках ЦНС, включая интегративные структуры (зрительный тектум, мозжечок) и сенсорные центры ствола мозга (ядра V и VII пар черепномозговых нервов) (Пущина, Обухов, 2011). Подобные феномены характерны для продолжающейся морфогенетической активности в различных центрах мозга рыб, которые на протяжении всей жизни пополняются новыми клетками по мере роста животного. Возникающие *de novo* клетки могут встраиваться в существующие нейронные сети не только в период эмбрионального нейрогенеза, но и у взрослых животных. Это явление особо характерно для сенсорных областей. Апоптоз в таких физиологически активных развивающихся системах может играть роль физиологического фильтра, регулируя количество новых клеток и обеспечивая элиминацию “старых”.

В результате травматического воздействия на мозжечок молоди симы было выявлено значительное количество клеток, подверженных апоптотическим изменениям, которые были диагностированы с помощью TUNEL-маркирования фрагментов ДНК, длиной около 130 пар оснований. Наличие таких фрагментов ДНК характерно для поздних стадий апоптоза. В зонах, окружающих область травмы, были выявлены как единичные TUNEL-маркированные структуры, так и кластеры, состоящие из нескольких элементов. Наибольшее количество TUNEL-маркированных элементов было обнаружено в областях, прилежащих к морфогенетическим зонам мозжечка. Другой зоной, где концентрация TUNEL-маркированных структур значительно превышала фоновый уровень, были область травмы и непосредственно окружающие ее участки. Крупные TUNEL-маркированные тельца соответствовали поздним стадиям деградации апоптотических клеток. Для таких стадий характерно формирование крупных конденсированных фрагментов, которые не подлежат утилизации с помощью макрофагов/микроглии (Pushchina et al., 2015). Подобные тельца были идентифицированы в морфогенетических исследованиях на млекопитающих

(Калиниченко, Матвеева, 2007). На ранних этапах постнатального периода развития мозжечка млекопитающих апоптоз, как полагают, регулирует быстро растущую популяцию мигрирующих клеток-предшественников во внешнем гранулярном слое. Во внутреннем гранулярном слое частота гибели постмитотических гранулярных клеток с возрастом увеличивается, что очевидно связано с формированием синаптической системы развивающейся коры (Lossi, Merighi, 2003).

Другой вариант TUNEL-маркированных элементов – это мелкие слабо конденсированные частицы, представляющие собой продукты дегрануляции клеток, которые элиминируются с помощью апоптоза (Калиниченко, Матвеева, 2007). Упомянутые виды TUNEL-маркированных структур в мозжечке симы идентифицировались практически повсеместно. Существенно различающиеся значения ИА в разных частях мозжечка свидетельствуют об отличающейся интенсивности процессов апоптоза в матричных зонах, области травмы, прилежащих участках и в интактных областях мозжечка молодежи симы. Травматическое воздействие наносилось в дорсальную область тела мозжечка и захватывало границу между молекулярным и гранулярным слоями. При этом, однако, необходимо принимать во внимание особо высокие значения плотности распределения клеточных тел в гранулярном слое. У всех позвоночных для гранулярного слоя мозжечка характерна максимальная плотность распределения тел клеток, которые способны образовывать сомато-соматические контакты (Андреева, Обухов, 1999). Высокая плотность клеток в гранулярном слое, вероятно, и определила относительно низкое конечное значение ИА в зоне травмы, которое находится в обратной зависимости от плотности распределения клеток. В зоне ГЭ мозжечка (области эмбрионального нейрогенеза) ИА составлял лишь 2%, что, видимо, связано с высокой плотностью распределения клеток в данных участках и с тем фактом, что в них не было выявлено миграции вновь образованных клеток. В районе заслонки мозжечка подвергается апоптозу больше клеток по сравнению с ГЭ.

Наибольшее значение ИА (5%) после травматического воздействия на мозжечок было обнаружено в молекулярном слое. Это, возможно, связано с тем, что молекулярный слой является основной зоной радиальной миграции клеток, образованных в результате как репаративного нейрогенеза, так и естественных морфогенетических процессов. Согласно результатам наших исследований в области повреждения мозжечка наблюдаются морфологические проявления тангенциальной и

радиальной миграции клеток. Данные процессы наиболее полно выражены в дорсальной части, в областях вторичного нейрогенеза. Тот факт, что максимальное количество апоптозных телец было выявлено в зонах радиальной миграции клеток, позволяет предположить, что в ходе миграции часть клеток элиминируются. Другое весьма высокое значение ИА было выявлено в дорсальной зоне тела мозжечка, содержащей дорсальную матричную зону (ДМЗ), соответствующей зоне вторичного нейрогенеза (4%). В различных зонах скорость пролиферации и возникновение вновь образованных клеток напрямую связано с интенсивностью процессов апоптоза.

Полученные нами результаты при маркировании PCNA, BrdU и нестина подтверждают наличие большого количества 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 (Zuranc, Ott, 1999). Запрограммированная клеточная гибель коррелирует с высокой пролиферативной активностью в мозжечке у взрослой гимнотиформной рыбы *A. leptorhynchus* (Zuranc et al., 1998). Было высказано предположение, что вновь образованные клетки, которые не могут сформировать специфические межнейрональные связи, часто подвергаются устранению путем апоптоза (Oppenheim, 1991). Непосредственно в области прокола через двое суток после повреждения было зарегистрировано достаточно низкое значение ИА (0.7%), что, в основном, связано с максимальной плотностью клеток в данной области мозжечка.

Интенсивность физиологической элиминации клеток в областях, в которых преобладают либо фоновые морфогенетические процессы, либо процессы физиологической репарации после травматического воздействия, а также в областях, удаленных от упомянутых зон, неодинакова. Полученные нами результаты соответствуют данным на мозжечке *A. leptorhynchus*, у которой после повреждения наблюдался генерализованный апоптотический ответ, но интенсивность процессов апоптоза в различные периоды времени неодинакова (Zuranc, 1999). Так, наиболее интенсивная элиминация клеток наблюдалась в первые часы после нанесения повреждающего воздействия. Этот процесс с течением времени ослабевал и у взрослого животного полностью прекращался к 21-ым суткам с момента нанесения травмы (Zuranc, Sîrbulescu, 2013). Далее в течение нескольких недель после поражения клетки, устраненные путем апоптоза, заменяются на вновь образованные (Zuranc, 1999).

Большая их часть создается через 1–10 сут после травмы. В течение нескольких недель после травмы нейроны удаляются путем апоптоза и заменяются новыми клетками. За это время скорость пролиферации клеток увеличивается в несколько раз в месте травмы по сравнению с неповрежденными участками мозжечка (Zupanc, Ott, 1999). Полученные нами результаты свидетельствуют о значительном увеличении пролиферации после травмы при маркировании нестина, BrdU и PCNA подтверждают эти наблюдения. У форели *Salmo trutta* в пролиферативных зонах на ранних этапах конститутивного нейрогенеза был установлен высокий уровень апоптоза, но на более поздних этапах развития выявлялся уже в зонах дифференциации клеток (Candal et al., 2005). Большое число апоптотических элементов в гранулярном слое, существенно превышало их количество в молекулярном слое мозжечка *D. rerio*, что вероятно, связано с максимальной плотностью новых клеток в данной области. На основании этих данных авторы предполагают, что апоптоз регулирует количество вновь созданных клеток после того, как они достигли своего конечного назначения в гранулярном слое (Seki et al., 2011).

В наших исследованиях на вторые сутки с момента травмирования мозжечка интенсивность TUNEL-маркирования апоптотических структур была уже не очень высокой. Указанное обстоятельство может быть связано с тем, что наиболее активные процессы апоптоза после нанесения травмы происходят в более ранний период, чем у *A. leptorhynchus*. Учитывая данные о высокой интенсивности процессов пролиферации в мозжечке молодежи симы, такое предположение представляется достаточно обоснованным. Тем не менее, процессы апоптоза в зоне, прилежащей к области травмы, были хорошо выраженными. Это, несомненно, указывает на необходимость участия апоптоза в процессе утилизации большого количества поврежденных из-за травмы клеток и для нейтрализации возрастающей глутаматной эксайтотоксичности (Zupanc, Sirbulesku, 2013). При изучении распределения фермента ГС в мозжечке молодежи симы было показано, что травма может привести к гибели большого числа клеток путем апоптоза из-за токсичности глутамата (Stukaneva et al., 2015; Pushchina et al., 2018).

4.3. Глутаминсинтетаза – маркер радиальной глии и фактор нейропротекции в интактном и поврежденном мозжечке молодежи *O. masou*

Апоптоз, нейровоспаление, пролиферацию клеток, клеточную дифференциацию в поврежденном мозжечке симы мы рассматривали, как совокупность взаимосвязанных

функциональных феноменов. Успешное восстановление в мозге рыбы после травмы определяется рядом факторов, благодаря которым динамика этого процесса отличается от таковой у млекопитающих. Глутамат является основным возбуждающим нейромедиатором в ЦНС (8–10 мМ/кг) и обнаруживается примерно в 80% всех нейронов (Revett et al., 2013). В здоровом мозге участвует в большинстве функций и играет важную роль в развитии ЦНС, элиминации синапсов, миграции клеток, дифференциации и смерти клеток (Komuro, Rakic, 1993). Большая часть глутамата в головном мозге позвоночных локализуется внутриклеточно, а также в нервных волокнах и окончаниях и только небольшая часть присутствует в межклеточном пространстве (Gasparini, Griffiths, 2013). Клетки Пуркинье, звездчатые клетки, корзинчатые клетки и клетки Гольджи являются ингибирующими нейронами, в основном используя ГАМК как нейрональный трансмиттер, тогда как гранулярные клетки являются возбуждающими нейронами, которые используют глутамат (Ottersen, 1993). Удаление глутамата из межклеточного пространства является основной причиной изменений в опосредованной глутаматом активации NMDA рецепторов, индукции и деполяризации нейронов, активность которых регулируется внутриклеточным уровнем Ca^{2+} и Na^{2+} (Revett et al., 2013). Эти процессы приводят к экзоцитозу глутамата и немедленной гибели клеток, что коррелирует с ухудшением функций памяти и обучения в случае нарушения этих процессов (Wenk et al., 2006). В мозжечке *A. leptorhynchus* после травмы количество ГС увеличивается (Zupanc, Sîrbulescu, 2013), в то время как синтез этого фермента в ЦНС млекопитающих после повреждения напротив, подавляется (Grosche et al., 1995). Согласно Гроше и соавторам (Grosche et al., 1995), ГС является специфическим глиальным белком, который превращает токсичный глутамат, накопленный в результате повреждения нейронов, в нейтральную аминокислоту глютамин. В нормальных условиях этот механизм предотвращает нейротоксическое накопление глутамата в нервной ткани, защищая нейроны от гибели клеток. Но после травмы головного мозга у млекопитающих количество синтезируемой ГС недостаточно для нейтрализации токсических эффектов глутамата. Вследствие чего развивается первичное и вторичное воспаления, прогрессируют нейродегенеративные процессы, наблюдаемые после травмы в ЦНС млекопитающих и человека. У костистых рыб усиление активности ГС, вероятно, обеспечивает важный механизм снижения нейродегенеративных эффектов, вызванных нейротоксичностью глутамата. Это предположение основано на наличии

механизмов, определяющих значительные различия в регенеративных способностях млекопитающих и рыб (Zupanc, Sîrbulescu, 2013). У млекопитающих реактивный глиоз, вызванное травмой воспаление и образование глиального рубца считаются основными препятствиями для успешного восстановления мозга (Sofroniew, 2009). Ряд исследований показал, что взрослые млекопитающие не могут эффективно восстанавливать нейроны после травмы (Iosifet et al., 2006). У костистых рыб отсутствие воспаления на более поздней стадии регенерации может быть связано с успешным восстановлением нейронов в головном мозге, но механизм этих процессов пока недостаточно изучен (Christie, Turnley, 2013).

При анализе ИГХ активности ГС у контрольных животных и после повреждения мозжечка у молоди *O. masou* были выявлены существенные различия в распределении фермента. В обоих случаях активность ГС была идентифицирована как в гетерогенной популяции клеток, так и в волокнах. Наличие ГС-позитивных волокон РГ в норме свидетельствует о конститутивном нейрогенезе и о том, что ГС является одним из морфогенетических маркёров РГ, что хорошо согласуется с данными литературы (Akimoto, 1993, Sánchez-Farías, Candal, 2016). У интактных животных в области молекулярного слоя мозжечка активность ГС была обнаружена в клетках 1a и 1c типов. Плотность распределения ГС-позитивных клеток в молекулярном слое у интактных животных достаточно высокая, что свидетельствует о высоком уровне активности фермента и, возможно, о его влиянии на процессы конститутивного нейрогенеза. Мы предполагаем, что метаболический глутамат предположительно участвует в морфогенетических функциях в мозжечке молоди симы *O. masou* и в нормальных условиях может быть локализован в растущих нейронах и в волокнах (Pushchina et al., 2017b). Это мнение подтверждается результатами наших исследований, в которых установлена высокая активность ГС в клетках молекулярного слоя. Особенно в дорсальной части тела мозжечка, которая содержит ДМЗ – область с высокой нейрогенной активностью у интактных животных.

После травмы в 1.5 раза увеличилось количество крупных интенсивно маркированных клеток 1c типа по сравнению с контролем. Количество умеренно ГС-позитивных клеток 1a типа после травмы увеличивалось в 1.9 раза. Клетки 1a типа с умеренной активностью ГС были расположены на большом удалении друг от друга, более интенсивно маркированные клетки 1c типа образовывали кластеры. Появление

новых ГС-позитивных клеток и формирование ими конгломератов после травмы было более характерно для молекулярного слоя тела мозжечка. После травмы во всех областях тела мозжечка количество ГС-позитивных волокон увеличивалось. Особенно крупные и толстые волокна с высоким уровнем активности ГС были обнаружены в базальной части. Такие волокна часто содержали крупные ГС-позитивные окончания с высоким уровнем активности фермента. На основании распределения восходящих афферентов в мозжечке рыбы (Wullimann, 1998) мы предполагаем, что этот тип волокон может соответствовать восходящим глутаматергическим лиановидным волокнам других позвоночных, тогда как идентифицированные концевые утолщения являются окончаниями волокон нодулярного (узелкового) типа. При этом активность волокон в гранулярном слое (*eminetia granularis*) соответствовала норме и была невысокой. Другой причиной может быть тот факт, что на территории гранулярного слоя идентифицируются гломерулоподобные комплексы. Согласно нашим результатам образования, содержащие большое количество ГС-позитивных пресинаптических терминалей, присутствуют в гранулярном слое тела мозжечка у молоди симы *O. masou* (Pushchina et al., 2017b). Принимая во внимание то, что на сегодняшний день аналогичные комплексы, содержащие другие медиаторные системы у рыб не известны, мы склонны относить эти структуры, проявляющие активность ГС в гранулярном слое тела мозжечка молоди симы, к гломерулоподобным комплексам, которые схожи с гломерулами в мозжечке млекопитающих. С другой стороны, необходимо учитывать процессы синаптогенеза в гранулярном слое и, что, как и у других позвоночных, мшистые волокна, гранулярные клетки и клетки Гольджи участвуют в образовании гломерул, которые являются мультисинаптическими комплексами (Pouwels, 1978c). Впервые синапсы 17-миллиметровых мшистых волокон были выявлены у форели. Они содержат больше нейрофиламентов, чем другие аксоны в мозжечке и довольно простая форма «розетки» может быть легко распознана (Pouwels, 1978c). Она была окружена глиальными отростками (Pouwels, 1978d) и имела контакты только с несколькими дендритами гранулярных клеток, а её окончания содержали эллиптические везикулы. В соответствии с наблюдениями световой микроскопии и с данными о структуре гломерулы у млекопитающих, имеющимися в литературе, эти терминали упоминаются как аксоны клеток Гольджи (Pouwels, 1978c).

Такая сложная картина перераспределения активности ГС после травмы свидетельствует о значительной реорганизации ферментативной активности как в волокнах, так и в клетках. Таким образом, после повреждения в различных частях мозжечка молоди симы *O. masou* мы наблюдали изменение клеточного состава ГС-позитивных элементов и общее увеличение количества ГС-позитивных клеток разных типов и ГС-позитивных волокон на 3 сут по сравнению с контролем. Результаты морфологического анализа и данные Реве и его коллег (Revett et al., 2013) показывают, что содержащие ГС клетки представляют собой популяции астроцитоподобных клеток. В конечном мозге *D. rerio* (Ganz et al., 2010; Grupp et al., 2010; März et al., 2011), в мозге *Cyprinus carpio* (Kálmán, 1998) и в мозге *Chelon labrosus* (Arochena et al., 2004) звездчатых астроцитов, типичных для млекопитающих, обнаружено не было. Мы считаем, что ГС в мозжечке молоди симы *O. masou* может маркировать как глутаматергические нейроны, так и астроцитоподобные клетки, содержащие ГС и осуществляющие обратный захват глутамата из межклеточного пространства (Pushchina et al., 2017b). Однако концентрация таких клеток недостаточно высока для того, чтобы связать подобный ответ со стороны ГС-позитивных клеток с образованием астроцитарного ответа, который возникает после травмы в ЦНС млекопитающих. Как известно, пул реактивных астроцитов и их морфологические и биохимические признаки, сформированные после травматического воздействия на мозг млекопитающих, значительно отличаются от астроцитов в норме (Revett et al., 2013). В отличие от астроцитов млекопитающих в ходе развития посттравматического процесса (Sofroniew, 2009) астроцитоподобные клетки, находящиеся в мозге рыб, не образуют так называемый астроцитарный барьер (Baumgart et al., 2012; Takeda et al., 2015). Клеточные механизмы, связанные с преобразованием популяции астроцитоподобных клеток и выделением субпопуляции активированной астроглии в мозге рыб еще не изучены. Тем не менее, изменения в синтезе ГС четко подтверждает нейропротекторные свойства этого фермента и его повышенную продукцию в мозжечке молоди симы *O. masou*. Таким образом, ГС является не только маркером клеток, участвующих в превращении глутамата в глутамин, но она может считаться эффективным фактором нейропротекции, который способствует и облегчает процессы регенерации. Такая пространственная специфика может быть связана, с одной стороны, с эффектами эксайтотоксичности, вызванными травмой и изменением глутаматергической нейротрансмиссии в

поврежденных нейронных сетях. С другой стороны, высокий уровень активности ГС в мозжечке интактной молодежи симы *O. masou* четко указывает на участие глутамата в процессах нейрональной пластичности, особенно в морфогенезе в ходе конститутивного нейрогенеза. После травмы активность ГС увеличивается; тем не менее, мы не исключаем, что эти изменения не обобщены, а отображают изменения активности ГС на 3 сут после травмы.

Эта гипотеза подтверждается данными иммуноферментного анализа (ИФА), проведенного на мозжечке молодежи симы *O. masou* (Pushchina et al., 2016). В ходе долгосрочного мониторинга уже на 2 сут наблюдалось постепенное увеличение активности ГС и его небольшое уменьшение на 3 сут после повреждения мозжечка. В результате ИФА было обнаружено, что активность фермента после повреждения имеет сложный, многопиковый характер. Таким образом, снижение активности ГС на 3 сут после повреждения мозжечка у молодежи симы *O. masou* может быть специфическим проявлением изменения метаболического статуса. В связи с достаточно высокой интенсивностью конститутивного нейрогенеза, наблюдаемого у молодежи симы, мы склонны считать, что ответ от ГС-продуцирующих элементов в мозжечке сложен. Их активность может циклически снижаться, что определяется различными факторами природа которых до сих пор неизвестна.

4.4. Участие сероводорода в модуляции процессов пролиферации и апоптоза в интактном и поврежденном мозжечке молодежи симы *O. masou*

Эндогенно H_2S синтезируется из L-цистеин пиридоксаль-5'-фосфат-зависимого фермента, цистатионин β -синтазы (CBS) и цистатионин γ -лиазы (CSE) (Abe, Kimura, 1996; Kimura, 2002), которая экспрессируется в большом количестве в крови и в мозге млекопитающих и других позвоночных (Doeller et al., 2005). В ЦНС основным источником H_2S является CBS, а в сердечно-сосудистой системе – CSE. Экспрессия CBS важна в головном мозге как первичный источник газообразного медиатора H_2S в физиологических условиях в ЦНС. Первоначально было обнаружено, что CBS имеет более высокую экспрессию в гиппокампе и мозжечке по сравнению с корой и стволом мозга (Abe, Kimura, 1996). В 1996 H_2S был впервые описан, как фактор, вовлеченный в модуляцию нейрональной активности (Abe, Kimura, 1996). Позже было показано его участие в расширении сосудов (Hosoki et al., 1997) и в расслаблении гладкой мускулатуры у млекопитающих и человека (Teague et al., 2002). Предполагают, что H_2S

действует, как связующий элемент, который легко проникает через мембрану и регулирует ферментативную реакцию клеток. Газовые медиаторы NO и H₂S играют важную роль в контроле гомеостаза у позвоночных (Pushchina et al., 2017) и рассматриваются как газотрансмиттеры в некоторых случаях, демонстрируя высокий уровень токсичности (Wang, 2002). Высокая концентрация H₂S может нанести вред мозгу и привести к ухудшению запоминания и обучения (He et al., 2019). Много внимания уделяют токсическим свойствам H₂S, тем не менее, недавно было установлено, что он также действует как физиологически активный медиатор (Gerasimova et al., 2008, Li et al., 2007). В настоящее время существуют сведения о роли CBS в ЦНС костистых рыб: в мозжечке симы, карпа и форели (Pushchina et al., 2017; Пушина и др., 2019).

ИГХ исследования показали, что в мозге CBS экспрессируется в нейронах и астроцитах (Leffler et al., 2011) и клетках микроглии (Hu et al., 2007). Астроциты необходимы для поддержания нормальных физиологических свойств нейронов, поскольку эти элементы глии могут контролировать кислотно-щелочной баланс и поглощать различные нейротрансмиттеры, включая L-глутамат (Koehler et al., 2006). Предполагают, что изменения статуса микроглии являются причиной серьезной патологии, которая приводит к развитию болезни Альцгеймера (Wojtera et al., 2005) и Паркинсона (Kim, Joh, 2006). Поскольку H₂S, как и другие газотрансмиттеры способен быстро диффундировать, предполагают, что он может играть важную роль в активации огромной популяции микроглиоцитов, увеличивая уровень внутриклеточного кальция в соседних клетках (Morale et al., 2006).

Методом иммунопероксидазного маркирования CBS было исследовано распределение CBS-позитивных клеток в различных зонах в норме и через 1 сут после нанесения механической травмы в дорсальную область тела мозжечка. При маркировании CBS как в норме, так и при повреждении в молекулярном слое идентифицировали клетки Ib типа, находящиеся на ранней стадии дифференциации и клетки Ic типа – на более поздней. CBS имел цитоплазматическую локализацию в теле нейронов и проксимальных участках дендритов. Во всех зонах мозжечка интенсивность иммуномаркирования CBS-позитивных клеток варьировала от интенсивной до умеренной. Также CBS интенсивно маркировала волокна терминали которых заканчивались на телах CBS-позитивных клеток. Возможно, в мозжечке молодого симы

H₂S выступает в роли классического нейромедиатора и/или нейромодулятора, который содержится в теле клеток (Pushchina et al., 2017). В эмбриональный период уровень белка CBS, как правило, низкий, но резко возрастает на поздних этапах эмбриогенеза вплоть до раннего постэмбрионального периода (Enokido et al., 2005).

ДМЗ как в норме, так и после повреждения содержала интенсивно маркированные CBS-позитивные клетки 1b типа, которые находились на ранней стадии дифференциации (рис. 8, а, в). Максимальная пролиферативная активность, установленная для данной зоны мозжечка при маркировании PCNA, BrdU и нестина, высокая концентрация CBS-позитивных клеток в ней же предполагает, что H₂S участвует в регуляции пролиферативной активности клеток-предшественников в ходе конститутивного и репаративного нейрогенеза. Это предположение подтверждается тем, что в состав поверхностных ниш, которые содержат пролиферирующие PCNA-позитивные, BrdU-позитивные и нестин-позитивные клетки, в небольшом количестве входили интенсивно маркированные CBS-позитивные клетки 1b типа, находящиеся на ранней стадии дифференциации. Размер этих клеток, их локализация в различных зонах мозжечка и взаимодействие друг с другом указывает на то, что H₂S-продуцирующие клетки выявляются в пролиферативных зонах молодости симы. Нейротрансмиттеры, локализованные в клетках-предшественниках перивентрикулярного региона мозга, могут быть регуляторами конститутивного нейрогенеза (Cameron et al., 1995; Platel et al., 2010). У млекопитающих они оказывают влияние на развитие клеток во время эмбриогенеза и на ход конститутивного нейрогенеза в СГЗ гиппокампа и медиальной и нижней поверхностях полушарий головного мозга (Cameron et al., 1995). Результаты наших исследований позволяют предположить, что H₂S может регулировать конститутивный нейрогенез.

Также было показано, что H₂S вовлечен в регуляцию клеточной пролиферации и апоптоза (Wang, 2012). В ходе ингибирования апоптоза нейронов H₂S, как предполагают, снижается тяжесть нейродегенеративных последствий (Tiong, Bian, 2010). В области травмы в дорсальной зоне мозжечка симы был выявлен высокий уровень пролиферации, апоптоза и количества CBS-позитивных клеток, что подтверждает это предположение.

В интактном мозжечке клетки 1b типа и 1c типа были равномерно распределены по всему молекулярному слою, в отдельных случаях формируя небольшие кластеры.

Молекулярный слой в мозжечке костистых рыб является одной из главных нейрогенных зон, что подтверждает наше предположение об участии H_2S в процессах конститутивного нейрогенеза. Наибольшая концентрация мелких CBS-позитивных клеток 5 типа была выявлена в гранулярном слое дорсальной зоны, 91 ± 12 (рисунок 7, а). В зависимости от области мозга новые клетки могут, как оставаться рядом с областью, где они появились, так и мигрировать в течение 1–2 недель после их образования в определенные районы головного и спинного мозга. В большинстве областей мозжечка (теле и заслонке) молодые нейробласты мигрируют на довольно большое расстояние из пролиферативных зон в гранулярный слой (Ekström et al., 2001, Zupanc et al., 2005). Нейроны начинают синтезировать типичные сигнальные молекулы вскоре после их образования из клеток-предшественников задолго до формирования межнейронных связей (Ugrumov et al., 2010). Этими молекулами могут быть нейропептиды, энзимы, синтезируемые «классическими» нейротрансмиттерами в том числе H_2S и NO , а также трансмембранные и везикулярные транспортеры. Большая часть всех сигнальных молекул принимает участие в аутокринной и паракринной секреции, влияя на процессы дифференциации нейронов-мишеней, функционируя, как морфогенетические и транскрипционные факторы (Ugrumov et al., 2010).

Помимо CBS-позитивных клеток выявлялись интенсивно маркированные CBS-позитивные волокна, равномерно расположенные преимущественно в ганглионарном и гранулярном слоях. В молекулярном слое CBS-позитивные волокна были выявлены в незначительном количестве. В гранулярном слое мы нашли CBS-позитивные волокна, которые, возможно, соответствуют гломерулоподобным комплексам в мозжечке у млекопитающих. При маркировании ГС мы выявляли аналогичные комплексы в гранулярном слое. У млекопитающих в гломеруле наиважнейшими медиаторами являются GABA и глутамат (Medina et al., 1994). H_2S в гранулярном слое выступает как модулятор GABA-эргических синапсов у млекопитающих (Pushchina et al., 2013). CBS-позитивные волокна проходили сквозь ганглионарный слой и, возможно, являются аналогами глутаматэргических лиановидных волокон млекопитающих (Dawe et al., 2008). После повреждения число CBS-позитивных волокон увеличивалось незначительно: 45 ± 11 в ганглионарном и 43 ± 9 в гранулярном. Количество в интактном мозжечке составляло 38 ± 8 и 27 ± 5 в ганглионарном и в гранулярном слое, соответственно. Наличие большого количества CBS-позитивных волокон варикозного

типа и CBS-позитивных терминалей в инфраганглионарном сплетении, возможно, указывает на то, что H_2S выпускается синаптически в этой области мозжечка симы.

Через сут после нанесения механической травмы в мозжечке молодежи симы наблюдалось значительное увеличение числа CBS-позитивных клеток. В результате повреждающего воздействия в латеральной и базальной зонах в 2.5 раза увеличивалось число клеток 1b типа по сравнению с контролем. В клетках 1b типа данных зон наблюдалось увеличение интенсивности маркирования клеток. Увеличение числа клеток и интенсивности маркирования свидетельствует о генерализации процесса репаративного нейрогенеза, АТФ-зависимых изменениях метаболизма, синтезе глутатиона за счет транссульфурации, увеличения вследствие травмы синтеза кальция и выработки глутамата, реактивных форм кислорода и участия H_2S в процессах нейтрализации окислительного стресса (Kimura et al., 2005; He et al., 2017). После повреждения наибольшая интенсивность маркирования характерна для ДМЗ, как и в условиях нормы. По мере удаления от ДМЗ концентрация CBS-позитивных клеток постепенно снижалась, как и в интактном мозжечке (рис. 8, в). Тот факт, что в дорсальной зоне интактного мозжечка CBS изначально присутствует в большом количестве и не меняется после нанесения травмы, мы связываем с тем, что H_2S участвует в нейтрализации глутамата. Было установлено, что H_2S вовлечен в защиту нейронов от окислительного стресса. Активно захватывая свободные радикалы и другие воздействующие вещества, а также удаляя пероксид водорода и липидпероксидазу, предотвращает, таким образом, окисление других биомолекул (Wu et al., 2004). В мозге позвоночных концентрация CBS быстро увеличивается под воздействием электрической стимуляции и глутамата (Awata et al., 1995). Это подтверждается нашими данными при иммуномаркировании ГС: для дорсальной зоны было характерно максимальное число ГС-позитивных клеток по сравнению с другими зонами интактного и поврежденного мозжечка молодежи симы. При этом в других зонах, где в условиях нормы экспрессия CBS была менее выражена, после травмы концентрация CBS и ГС возрастает.

После нанесения повреждения значительно усиливаются показатели нейрогенеза по сравнению с интактными животными. Но только в дорсальной зоне появляются слабо маркированные CBS-позитивные клетки, мигрирующие из нейрогенных зон к области травмы для замены утраченных клеток. Возможно, что по мере миграции и дифференциации клеток-предшественников в них снижается уровень экспрессии CBS.

Отсутствие в латеральной и в базальной зонах клеток 2 типа мы объясняем тем, что через 1 сут после повреждения в данных областях мозжечка они еще не начали активно мигрировать к месту травмы. После повреждения возрастало количество CBS-позитивных клеток 1b и 1c типа у внешней границы молекулярного слоя, которые в отличие от нормы не были расположены отдельно друг от друга, а формировали конгломераты по 20-30 элементов. Из-за перехода клеток к гликолизу и транссульфурации, они формируют подобные скопления, нейтрализуя, таким образом, токсические эффекты, возникающие вследствие окислительного стресса и накопления реактивных форм кислорода (Wang, 2012; Mostafa et al., 2016). Увеличение количества CBS-позитивных клеток 1b типа после повреждения подтверждает факт участия H_2S в процессах пролиферации в ходе репаративного нейрогенеза. При маркировании PCNA, нестина и BrdU нами было установлено, что число пролиферирующих клеток возрастает после нанесения повреждения у поверхностного слоя. Подобные скопления, содержащие, в среднем, 10 CBS-негативных клеток и 1–2 CBS-позитивные клетки 1b типа мы идентифицировали, как нейрогенные ниши, активированные в результате травмы. Было установлено, что в базальной зоне присутствует область, в которой число CBS-позитивных клеток было меньше по сравнению с другими участками мозжечка (рис. 8, г). Вероятно, это связано с тем, что в результате механического повреждения часть клеток была утрачена. Однако в области повреждения в дорсальной зоне клетки 1b типа формировали непрерывный пласт у внешней границы молекулярного слоя (рис. 8, в). Возможно, в результате травмы эта область становится реактивной зоной, в которой развивается нейропротекторный сценарий.

В интактном мозжечке молодые симы клетки Пуркинье не маркировались CBS, но были окружены CBS-позитивными гладкими или имеющими отдельные концевые утолщения волокнами (Puschina et al., 2016). При этом после повреждения во вторичной зоне нейрогенеза – дорсальной, были идентифицированы CBS-позитивные клетки Пуркинье (рис. 8, в). Мы предполагаем, что это связано с тем, что после повреждения в клетках Пуркинье, как и в других клетках происходит активация CBS, направленная на нейтрализацию реактивных форм кислорода и снижения эффектов окислительного стресса, возникающего в зоне травмы (Wang, 2012; Mostafa et al., 2016).

Пущиной и коллегами (Puschina et al., 2016) было показано, что через 4 сут после культивирования клеток, взятых из спинного и головного мозга молодые симы,

образуется гетерогенная популяция CBS-позитивных клеток. Как предполагают, они принадлежали к популяции ретикулоспинальных дифференцированных клеток, мотонейронов дорсального тегментального ядра и мотонейронов спинного мозга. Была показана тесная взаимосвязь между пролиферирующими PCNA-позитивными и CBS-позитивными клетками на основании чего предполагают, что H₂S участвует в пролиферативной активности клеток во время конститутивного нейрогенеза у молодежи (Puschina et al., 2016).

4.5. Пролиферация в интактном и повреждённом мозжечке молодежи *O. masou* при маркировании PCNA и BrdU

У позвоночных нервная трубка изначально состоит из нейроэпителиальных клеток, которые симметрично делясь, образуют пул НКП. Также вНСК, образованные из эмбриональной РГ (Xu et al., 2015), продуцируют промежуточную популяцию клеток-предшественников (Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009). Эти предшественники далее образуют нейроны, глиальные и эндиметальные клетки, составляющие основу ЦНС (Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009). Разнообразие НСК и клеток-предшественников (то есть клеток, которые образуют нейроны, но не обязательно самообновляются) отчасти отвечает за разнообразие и относительную плотность популяций нейрональных подтипов в коре головного мозга. Молекулярные фенотипы этих клеток свидетельствуют об их гетерогенности с точки зрения активной пролиферации или покоя (Codega et al., 2014) и комбинации экспрессируемых маркеров (Beckervordersandforth et al., 2014). Нейроны формируются из разных источников: в первый период эмбрионального развития – из НСК нейрогенного эпителия за счет вертикальной миграции в стенке мозга, а ближе к рождению – из их более поздних потомков (клеток РГ). Клетки РГ могут образовывать не только НКП, но и напрямую постмитотические нейроны, составляющие в дальнейшем большую часть популяции нейронов в различных отделах мозга (в частности, при формировании коры головного мозга и мозжечка) (Zupanc et al., 2005).

Исследования последних лет показали, что некоторые пролиферирующие популяции клеток-предшественников происходят из нейроэпителиальных вНСК, а не клеток РГ. Это особенно справедливо для оптического тектума и мозжечка, которые содержат большие популяции взрослых НСК (Alunni et al., 2010; Lindsey et al., 2014; Kaslin et al., 2009). Исследование образования новых гранулярных клеток в мозжечке

взрослых рыбок *D. rerio* показало, что НСК и клетки-предшественники во время эмбрионального развития образуются в верхней губе ромбовидного мозга, так же как у птиц и грызунов (Kaslin et al., 2009). По мере роста мозжечка эти ниши, содержащие клетки-предшественники, продвигаются из верхней ромбической губы вглубь тела мозжечка (Kaslin et al., 2009; Grandel, Brand, 2012). Желудочковая пролиферативная зона у взрослого *D. rerio* образуется из эмбриональных клеток-предшественников верхней губы мозжечка и постоянно создаёт новые нейроны, хотя и со сниженной скоростью. Данная область расположена дорсо-медиально вдоль углубления тела мозжечка (остатка IV желудочка) (Kaslin et al., 2009). Клетки-предшественники в этой зоне не экспрессируют маркёры РГ, но положительны для нестина, Sox2, Meis и Musashi и имеют базально-апикальную полярность. Из них образуются пролиферирующие предшественники гранулярных клеток, которые в конечном итоге дифференцируются в интернейроны – гранулярные клетки, основной нейрональный подтип, создаваемый в мозжечке взрослого *D. rerio*. Таким образом, желудочковая пролиферативная зона у взрослых особей участвует в создании гранулярных клеток на протяжении всей жизни (Kaslin et al., 2013). Также она создает другие типы клеток, например РГ, которая, в основном, находится в состоянии покоя во взрослом мозжечке. В мозге *D. rerio* НСК радиальные глиаподобные и клетки-предшественники, как полагают, являются преобладающим клеточным типом в гомеостазе и после повреждения (Kizil et al., 2012; Barbosa et al., 2015; Than-Trong, Bally-Cuif, 2015). Однако было установлено, что при повреждении мозжечка нейроэпителиальные клетки являются преобладающим типом НСК, поддерживающих регенерацию (Kaslin et al., 2017).

Нейроэпителиально-подобные СК происходят из дорсальной части вентрикулярной зоны и остаются активными в стареющем мозжечке, где они непрерывно производят большое число гранулярных клеток на протяжении всей жизни. НСК в конститутивных нейрогенных нишах в районе желудочка лишены радиальных отростков и как предполагается, образуют нейроны и глию. Клетки-предшественники происходят из вентральной части желудочка, выстилая его поверхность и медиальный просвет мозга взрослого *D. rerio*. Эти клетки схожи с НСК млекопитающих: экспрессия глиального фибриллярного кислого белка, относительный покой, дифференциация в амплифицирующие предшественники и образование нейронов в течение всей жизни. В неповреждённом мозге большинство клеток-предшественников медленно делятся,

самообновляясь при симметричном делении и образуя нейроны при асимметричном (März et al., 2010; Rothenaigner et al., 2011). В интактном мозге *D. rerio* новые нейроны мигрируют на короткое расстояние от ВЗ и интегрируются в нервные цепи, на что указывают присутствие синаптических везикул и запуск потенциалов действия (Rothenaigner et al., 2011). Постоянное присутствие НСК и интенсивные процессы нейрогенеза у взрослой особи обеспечивают успешное восстановление мозга после травмы. По данным Зупанка и Отта BrdU маркирует ограниченное число клеток в S-фазе клеточного цикла (Zupanc, Ott, 1999). BrdU-маркирование в мозжечке молодого симы *O. masou* выявило два типа элементов: мелкие округлые клетки (клетки 5 типа) и ядра клеток диаметром 3.5 мкм. Результаты исследований на мозжечке *O. masou* свидетельствуют о том, что популяция BrdU маркированных клеток является более однородной, чем клетки, маркированные PCNA (Stukaneva et al., 2017). Экспериментальное маркирование BrdU, в отличие от PCNA позволяет диагностировать лишь клетки, находящиеся в S-фазе клеточного цикла, более того, маркирование BrdU мы проводили на тонких парафиновых срезах толщиной 7 мкм, поэтому количество BrdU-позитивных клеток было существенно ниже, чем при маркировании PCNA.

При маркировании BrdU в гранулярном слое выявлялись большие кластеры BrdU-позитивных клеток, что соответствует данным, полученным на *D. rerio* (Kaslin et al., 2009). В дорсальной зоне интактного мозжечка наибольшая концентрация клеток была обнаружена в ДМЗ, которая постепенно снижалась по мере удаления от этой области. Аналогичная картина наблюдалась при маркировании ГС, CBS, нестина и PCNA. Большое количество дифференцированных NuCD-позитивных клеток было выявлено по всей дорсальной зоне. Через трое суток после повреждения в области прокола в дорсальной зоне в два раза увеличивалось число BrdU-позитивных клеток. Возможно это, указывает на то, что в результате травмы происходит реактивация данной конститутивной зоны с последующей трансформацией в реактивные нейрогенные ниши. Таким образом, дорсальная зона тела мозжечка молодого симы оказывает наиболее выраженное влияние на репаративный нейрогенез, может рассматриваться как зона, в которой происходят интенсивные процессы конститутивного нейрогенеза. Интенсивные процессы пролиферации клеток в этой области были ранее описаны у взрослых особей *D. rerio* (Zupanc, 2006) и *A. leptorhynchus* (Rajendran et al., 2007).

Мы установили, что у интактных животных BrdU-позитивные клетки преобладают в ростральной части мозжечка по сравнению с каудальной. В интактном мозжечке молоди симы *O. masou* максимальный пролиферативный индекс был выявлен рядом с ДМЗ (66.3%); минимальный – в базальной области (37.1%).

После травмы мозжечка *O. masou* мы обнаружили различные уровни пролиферативной активности у поверхности, в толще и глубине молекулярного слоя. Значительное увеличение числа BrdU-позитивных клеток было выявлено у поверхности молекулярного слоя, что связано с появлением большого количества реактивных нейрогенных ниш, которые возникают после травмы. Результаты маркирования BrdU соответствуют данным полученным при NuCD, PCNA и нестин иммуномаркировании нейрогенных ниш мозжечка *O. masou*. По данным Тан-Тронга и Балли-Куифа нейроэпителиальные конститутивные ниши в головном мозге *D. rerio* имеют поверхностную локализацию (Than-Trong, Bally-Cuif, 2015). У этих рыбок повреждение мозжечка вызывает усиление пролиферации клеток в поверхностных областях, прилежащих к мозговым оболочкам, а также в области заслонки и в ГЭ (Zupanc, 1999; Zupanc, 2006; Candal et al., 2005).

Мы установили, что в мозжечке молоди симы наибольшее количество BrdU-позитивных клеток было расположено в ГЭ, что подтверждается данными маркирования нестина. Зона ГЭ является областью максимальной клеточной плотности и традиционно считается зоной эмбрионального нейрогенеза (Volkman et al., 2008). После травмы мозжечка число BrdU-позитивных клеток в данной области возрастало в два раза ($P < 0.05$), что указывает на то, что зона ГЭ активно участвует в репаративном нейрогенезе. Наши данные согласуются с наблюдениями Зупанка и Отта (Zupanc, Ott, 1999), которые зафиксировали большое количество митотически активных клеток в зоне ГЭ мозжечка у *A. leptorhynchus*. Напротив, в ГЭ *D. rerio* они были обнаружены в небольших количествах (Grandel et al., 2006). Такие различия в пролиферативном поведении клеток в области ГЭ, вероятно, можно объяснить способом нанесения травмы или адаптации тех или иных видов рыб к условиям окружающей среды. Тем не менее, в ГЭ пролиферативный индекс был сходен с таковым в теле мозжечка молоди симы. Мы связываем это с тем, что он находится в обратной зависимости от плотности распределения клеток, которая очень высока в области ГЭ.

В глубине молекулярного слоя значительно увеличивалось число пролиферирующих клеток, у интактных животных количество BrdU-позитивных клеток в этой области было крайне низким. Значительное увеличение числа BrdU-позитивных клеток было установлено в глубине молекулярного слоя базальной зоны. Согласно данным Зупанка при повреждении мозга *A. leptorhynchus* в базальной зоне мозжечка начинаются интенсивные процессы нейрогенеза (Zupanc, 2011). Количество BrdU-позитивных клеток в вентральной вершине базальной зоны у *A. leptorhynchus* значительно больше, чем в молекулярном и гранулярном слое других зон мозжечка (Sîrbulescu et al., 2014). В нашем исследовании наибольшее количество BrdU-позитивных клеток у интактных животных было обнаружено в ростральной части, что, вероятно, указывает на интенсивный конститутивный нейрогенез у молодежи симы *O. masou* в этой области. После повреждения мозжечка, напротив, количество BrdU-позитивных клеток значительно увеличивалось в каудальной части. Мы считаем, что нанесение травмы стимулировало реактивацию конститутивных ниш, которые располагались как в ростральной, так и в каудальной частях мозжечка. Низкая пролиферативная активность клеток в каудальной части интактного мозжечка имеет более выраженный пролиферативный потенциал после травмы по сравнению с ростральной частью.

В конечном мозге *D. rerio* наличие или отсутствие глиоза зависит от того каким образом был поврежден мозг (März et al., 2011; Baumgart et al., 2012). Сильная реактивность глиальных клеток наблюдалась 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). При этом значительная доля клеток радиальной глии оставалась в районе поверхности желудочка и почти отсутствовала радиальная миграция к месту повреждения (Baumgart et al., 2012), за исключением случая очень сильного повреждения (Kroehne et al., 2011). Повреждение через ноздри затрагивает половину полушария конечного мозга, но не вентральную зону (в которой располагается множество взрослых НСК/клеток-предшественников) (Kroehne et al., 2011; Baumgart et al., 2012).

Сравнение пролиферативной активности у молодежи симы *O. masou* показало, что после повреждения мозжечка число BrdU-позитивных клеток значительно возрастает по

сравнению с травмой конечного мозга. И напротив, количество пролиферирующих клеток после травмы конечного мозга было схоже с таковым в интактном мозжечке.

PCNA в интактном и повреждённом мозжечке молоди симы *O. masou*

Количество случаев митоза в матричных зонах мозга можно оценить с помощью иммуномаркирования пролиферативного ядерного антигена (PCNA). Уровни PCNA варьируются на протяжении всего клеточного цикла: его экспрессия начинается в поздней фазе G1, максимальна в течение S-фаза и уменьшается при переходе от S к G2-фазе клеточного цикла (Vela-Hernández et al., 1997). Маркирование PCNA выявляет дополнительную ДНК-полимеразу δ (Bravo, MacDonald-Bravo, 1987). Вновь созданные постмитотические клетки могут быть маркированы PCNA, поскольку уровень его экспрессии в клетках, находящихся в клеточном цикле, уменьшается только на 30% в течение 24 часов (Bravo, MacDonald-Bravo, 1987). PCNA маркирует ядро и цитоплазму клетки (Waseem, Lane, 1990). Использование PCNA в качестве маркера пролиферации позволяет разделить области с высокой скоростью пролиферации, состоящие в основном из нейроэпителиальных НСК и областей со слабо маркированными клетками, которые являются плюрипотентными НСК и могут дифференцироваться в постмитотические клетки (Bravo, MacDonald-Bravo, 1987). Маркирование пролиферативных областей с помощью PCNA верно отражает нейромерную организацию мозга *D. rerio* (Mueller, Wullimann, 2009), что было подтверждено с помощью ИГХ маркирования BrdU и радиоавтографических исследований (Zupanc, 2001).

В исследованиях пролиферативной активности оптического тектума у трёхмесячной молоди форели было обнаружено, что количество PCNA-позитивных клеток в целом невелико (Candel et al., 2005). Однако не исключено, что активность антител, используемых в вышеуказанной работе, была невысокой. Результаты исследований головного мозга, проведенных на симе, указывают на более высокий уровень пролиферативной активности, верифицируемой при маркировании PCNA (Puschina et al., 2013). Как показали исследования на форели (Pushchina et al., 2016) и симе (Stukaneva et al., 2017), количество PCNA-позитивных клеток в ДМЗ после прямого повреждения мозжечка (Stukaneva et al., 2017) и зрительного нерва (Pushchina et al., 2016) значительно выше, чем количество BrdU-позитивных клеток после повреждения мозжечка и конечного мозга *O. masou*. Также совокупный уровень пролиферативной

активности при маркировании PCNA превышал показатели пролиферативной активности у взрослых особей *D. rerio* (Zupanc, Sîrbulescu, 2013). У *D. rerio* на поперечных срезах тела мозжечка идентифицировалось не более 5-10 вновь образованных клеток на срез. Подобные несоответствия могут быть связаны как с методическими аспектами (использование более тонких срезов мозга), так и с физиологическим и/или возрастным статусом экспериментальных объектов. Таким образом, паттерны пролиферирующих клеток после маркирования PCNA по количественному уровню и морфологическим характеристикам являются более гетерогенными по сравнению с экспериментальным маркированием BrdU в мозжечке молоди симы.

Как было установлено нами в теле поврежденного мозжечка симы большое число клеток находятся в разных фазах клеточного цикла и представляют собой как находящиеся в состоянии покоя, так и мигрирующие клеточные формы (см. табл. 3). В мозжечке *D. rerio* BrdU и PCNA-маркирование клеток выявляет обширную пролиферацию в молекулярном слое и вдоль ДМЗ, что соответствует нашим данным при маркировании PCNA. Вдоль виментин-позитивных/GFAP-позитивных/BLBP-позитивных радиальных глиальных волокон эти клетки мигрируют радиально к поверхности молекулярного слоя, распределяясь в латеральном направлении во время дальнейшей тангенциальной миграции (Zupanc, Clint, 2003). Вновь созданные нейроны мигрируют в радиальном направлении на большие расстояния из зон пролиферации в молекулярном слое к своей конечной цели в гранулярном слое, дифференцируясь в гранулярные нейроны и равномерно распределяясь (Zupanc et al., 1996; Zupanc et al., 2005). Таким образом, тело мозжечка растёт довольно симметрично.

В мозге взрослого *D. rerio* в пролиферативных зонах вентральной части конечного мозга, хабенулы и мозжечка большинство клеток относится к мигрирующим популяциям, которое быстро покидают эти зоны в течение 5 сут после введения IdU (5-йододезоксиуредин). Учитывая особенности дифференциации и маркирование PSA-NCAM (нейрональный белок клеточной адгезии) предполагают, что эта популяция содержит НКП. Маркируемые PCNA клетки, мигрирующие из молекулярного слоя мозжечка молоди симы, представляют собой НКП, как мы предполагаем.

В ходе репаративного нейрогенеза после активизации микроглии (Raivich et al., 1999), снижения токсических эффектов травмы (Zupanc, Sîrbulescu, 2013), повышается

уровень пролиферации и миграции в различных зонах мозжечка молодежи симы как в традиционных зонах конститутивного нейрогенеза, так и в поверхностном слое. Однако эти процессы обладают свойствами пространственной специфичности, так в наибольшей степени пролиферативная активность характерна для дорсальной области, которая содержит зону вторичного нейрогенеза – ДМЗ. В этой зоне пролиферативная активность наблюдается в норме и мы связываем данные процессы с наличием процессов интенсивного, конститутивного нейрогенеза в мозжечке молодежи симы. В районе ДМЗ нами было идентифицировано 4 типа клеток, маркируемых PCNA. Эти клетки представляли как мелкие, округлые, интенсивно маркированные формы, так и удлиненные клетки, находящиеся в состоянии миграции и формирующие тангенциально и радиально ориентированные ряды клеток. Полученные данные согласуются с результатами на других видах рыб, у которых интенсивность процессов пролиферации в ДМЗ значительно варьирует. Например, у *A. leptorhynchus* в мозжечке формируется 75% клеток мозга. Эти клетки образуются преимущественно в ДМЗ, а также в ГЭ (Zupanc, 2006). Было показано, что мозжечок является наиболее крупным центром нейрогенеза как в постэмбриональном периоде онтогенеза, так и в условиях травматического воздействия (Zupanc, Ott, 1999). Также как у *D. rerio* (Zupanc, 2006) у симы основной объем пролиферации клеток после повреждения приходится на ДМЗ. В латеральной и базальной зонах усиливаются процессы миграции, что является вкладом в репаративный нейрогенез. Таким образом, пролиферативная активность клеток молодежи симы во многом обеспечивает процессы конститутивного нейрогенеза и после повреждающего воздействия в вышеуказанных зонах становится более выраженной.

Отличительной особенностью конститутивного нейрогенеза костистых рыб является способность к формированию большого числа новых клеток. Исследования на пресноводных рыбах *D. rerio* и *A. leptorhynchus* показали, что скорость пролиферации у данных видов на 1–2 порядка выше, чем у млекопитающих (Zupanc, Zupanc, 2006). У костистых рыб в первые десять сут в месте нанесения травмы мозга скорость клеточной пролиферации увеличивается в несколько раз по сравнению с другими участками тела мозжечка. Полное восстановление нервной ткани осуществляется за счет заселения новыми нейронами области травмы. У млекопитающих долговременное выживание вновь созданных клеток, как правило, ослаблено, и их мозг ограничен в своей способности к восстановлению (Zupanc, Sîrbulescu, 2011). Эксперименты с

маркированием BrdU показали, что клетки, образованные за 2 сут до нанесения травмы, принимают участие в процессе регенерации (Zupanc, Ott, 1999). Это наблюдение предполагает наличие связи между непрерывной клеточной пролиферацией в интактном мозге и восстановлением поврежденной области после травмы.

Ретроградное трассирование в сочетании с BrdU маркированием S-фазы клеточного цикла показало, что новые гранулярные нейроны проецируются в молекулярный слой мозжечка (Zupanc, Ott, 1999). Этот факт позволяет предполагать, что эти нейроны интегрируются в уже существующую нейронную сеть мозжечка. В наших исследованиях после травмы мозжечка молодым симы были верифицированы зоны с нейрогенной активностью – нейрогенные ниши, расположенные в составе молекулярного слоя. Их возникновение мы связываем с интенсификацией генетических пролиферативных программ в НСК и реактивацией в ответ на повреждение. В нейрогенных зонах начинается активная пролиферация и дифференциация новых клеток (как было показано при маркировании HuCD), которые мигрируют к месту нанесения травмы, восстанавливая поврежденную ткань. Таким образом, данные области могут служить источником клеток для репаративного нейрогенеза.

4.6. Нестин-позитивные клетки-предшественники в интактном и поврежденном мозжечке молодых симы *O. masou*

Нестин – белок промежуточных филаментов, экспрессирующийся НСК и клетками-предшественниками в СВЗ, в СГЗ гиппокампа и в нейрогенных нишах мозжечка. В СГЗ гиппокампа взрослой мыши – зоне конститутивного нейрогенеза несколько подтипов НКП экспрессируют нестин и образуют новые гранулярные нейроны (Dhaliwal, Lagace, 2011). В СВЗ боковых желудочков GFAP-позитивные и нестин-позитивные радиальные глиядобные предшественники образуют новые интернейроны для обонятельной луковицы и олигодендроциты для мозолистого тела (Bonaguidi et al., 2011). Нестин часто используется в качестве маркера РГ, которая демонстрирует способности к самообновлению и мультипотентности (März et al., 2010; Carmona et al., 2011). Несмотря на значительное внимание, которое уделяется изучению НКП в СВЗ и СГЗ во взрослом мозге млекопитающих, относительно мало сведений о том существуют ли клетки, экспрессирующие нестин вне этих зон (Hendrickson et al., 2011). Нестин не экспрессируется зрелыми нейронами (Albright et al., 2016), в

дифференцированных клетках заменяясь на экспрессию белков специфичных для нейронов или глии (Hendrickson et al., 2011).

Методом иммунопероксидазного маркирования нестина было исследовано распределение НКП в различных зонах мозжечка симы в норме и через двое сут после нанесения механической травмы в дорсальную область тела мозжечка. Выявленные нами скопления интенсивно маркированных клеток-предшественников в районе ДМЗ интактного мозжечка мы рассматриваем как конститутивные нейрогенные ниши. Таким образом, как и при маркировании PCNA и BrdU в наибольшей степени пролиферативная активность характерна для ДМЗ мозжечка, что соответствует данным для других видов рыб: *D. rerio* (Zupanc, 2006) и *A. leptorhynchus* (Sîrbulescu et al., 2015). Для подтверждения того, что пролиферирующие клетки в ДМЗ действительно являются НСК, использовали анализ встроенной метки (Sîrbulescu et al., 2015). Через 10 сут после введения BrdU, когда большая часть вновь созданных гранулярных клеток завершила миграцию, многочисленные клетки, сохранившие метку, все еще присутствовали в ДМЗ. Более того, эти клетки продолжали пролиферировать и почти всегда экспрессировали маркёры НСК (Zupanc et al., 1996). В теле мозжечка *A. leptorhynchus* в ДМЗ клетки-предшественники экспрессировали такие маркёры НСК как: Sox2, Meis1/2/3, Islet1 и Pax6 (Sîrbulescu et al., 2015). Транзитные клетки, в которых заметно снизился уровень маркирования BrdU, в большом количестве присутствовали в ДМЗ, указывая на то, что эта ниша является важным источником новых клеток, которые могут подвергаться еще нескольким митозам во время их миграции к месту назначения. При этом ДМЗ, несмотря на высокую концентрацию в ней митотически активных клеток-предшественников, создает только около 7% пролиферирующих клеток в теле мозжечка. Примерно 80% делящихся клеток в теле мозжечка (судя по маркированию PCNA и BrdU) расположены в молекулярном слое, и, по крайней мере, 45% клеток в этом слое экспрессирует маркёры НСК (Sîrbulescu et al., 2015). Эти высокие показатели подчеркивают важность молекулярного слоя как основного источника взрослых клеток в теле мозжечка молодежи симы. За пределами ДМЗ в молекулярном слое единичные нестин-позитивные НКП располагались на значительном удалении друг от друга (рис. 19, а). Их скопления чередуются с зонами пониженной пролиферативной активности. Наличие небольшого количества нестин-позитивных НКП и нейрогенных ниш в мозжечке интактной симы свидетельствует об интенсивных процессах конститутивного

нейрогенеза. Наши данные соответствуют данным, полученным на *A. leptorhynchus* (Sîrbulescu et al., 2015). Наибольшее число митотически активных клеток-предшественников в молекулярном слое было выявлено вдоль средней линии и под пинальной поверхностью, распространяясь от средней линии латерально на 400-500 микрометров. В мозжечке *A. leptorhynchus* большая часть митотически активных клеток находится в молекулярном и в гранулярном слоях без какой-либо связи с желудочками. При этом доля делящихся клеток в гранулярном слое примерно в 100 раз ниже, чем в молекулярном слое (Sîrbulescu et al., 2015), что соответствует нашим данным при маркировании нестина. В этой области интактного мозжечка были выявлены лишь единичные нестин-позитивные НКП. Проллиферативная активность в гранулярном слое, 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 миграции клеток-предшественников из нейрогенной ниши в ДМЗ в конечную область в гранулярном слое, где они дифференцируются в гранулярные клетки. У млекопитающих наоборот, клетки формируются в гранулярном слое и далее мигрируют во все слои.

После повреждения нестин-позитивные НКП выявлялись во всех зонах мозжечка. В 1.7 раз увеличивалось число нестин-позитивных НКП в дорсальной области, содержащей ДМЗ. В отличие от интактного мозжечка после повреждения в ДМЗ отсутствовали скопления нестин-позитивных НКП, но при этом в 3 раза увеличивалось число равномерно распределенных по всей его территории на небольшом расстоянии друг от друга клеток-предшественников (рис. 19, б). Мы предполагаем, что в процессе репаративного нейрогенеза происходит реактивация ДМЗ: перераспределяется интенсивность процессов пролиферации, клетки из этой зоны начинают мигрировать к области травмы и активируются покоящиеся НСК. На *D. rerio* было показано, что в мозжечке нейроэпителиальные предшественники не образуют все нейронные подтипы в отличие от сетчатки, оптического тектума и паллиума (Kaslin et al., 2013). До сих пор неизвестно могут ли у взрослой особи нейроэпителиальные предшественники ДМЗ увеличить свой нейрогенный репертуар в условиях регенерации у *D. rerio*. Но наши

данные, полученные на молодых симы, свидетельствующие о перестройке ДМЗ при нанесении травмы, позволяют предположить, что нейроэпителиальные предшественники могут повышать свою активность после прямого повреждения мозжечка.

Выявленное крупное скопление нестин-позитивных НКП в области прокола мозжечка симы свидетельствует о том, что основной объём пролиферации после повреждения приходится на эту область. Зона травмы содержала большое количество мигрирующих клеток (ри. 4, а), которые заполняли поврежденную область и прилежащие участки мозга. В мозжечке симы репаративный нейрогенез играет центральную роль в восстановлении мозга путем замены утраченных клеток в результате повреждения на вновь созданные клетки. Такие новообразованные клетки 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 такой зоне несколько увеличивается при повреждении по сравнению с интактным состоянием. Второй источник – область, пролиферативная активность в которой возникает только после повреждения, а в интактном мозге она является митотически «молчащей» (Обухов, Пущина, 2013). Такие зоны соответствуют реактивным нейрогенным нишам, возникающим после травмы в различных частях молекулярного слоя, в основном в каудальной части мозжечка. После повреждения клетки направляются в зону повреждения вдоль волокон РГ, плотность которых увеличивается приблизительно на 8 сут после повреждения (Clint, Zupanc, 2001). Этот эффект ограничивается зоной повреждения и небольшой прилежащей территорией (Обухов, Пущина, 2013). При повреждении мозжечка взрослого *A. leptorhynchus* инициируется пролиферация и создание нейронов как в районе самой травмы (которая до этого момента не участвовала во взрослом нейрогенезе у интактного животного), так и в нейрогенных зонах, расположенных на удалении от травмы (Zupanc, Ott, 1999). Интенсивные процессы конститутивного нейрогенеза, по-видимому, позволяют костистым рыбам привлекать новые клетки к месту травмы гораздо быстрее, чем это было бы возможно при участии в процессах регенерации только тех клеток, которые образуются в ответ на повреждение.

Конститутивный нейрогенез во взрослом мозге рыб связан с устойчивой способностью регенерировать нейроны и нейронные сети после повреждения ЦНС (Kizil et al., 2012; Zupanc, 2001, 2006; Zupanc, Sîrbulescu, 2011). Однако остается неизвестным насколько сильно клеточные процессы, лежащие в основе репаративного нейрогенеза, влияют на конститутивный нейрогенез (Barbosa, Ninkovic, 2016). Небольшая колотая рана, нанесенная иглой в конечный мозг *D. rerio*, индуцирует программы репаративного нейрогенеза без влияния на процессы фонового конститутивного нейрогенеза (Baumgart et al., 2012). Учитывая этот фактор, мы наносили тонкой иглой прямое повреждение в мозжечок молодички симы.

Тот факт, что после травмы нестин-позитивные НКП не формировали кластеры в молекулярном слое в отличие от интактного мозжечка, вероятно связано с тем, что нестин-позитивные НКП соответствуют популяции НСК, которая реактивируется в ходе репаративного нейрогенеза. ЧМТ 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). Эти новые нейроны мигрируют на большие расстояния для того, чтобы заселить поврежденные участки мозга (Barbosa et al., 2015; Kroehne et al., 2011). Кроме конститутивных предшественников с быстрым клеточным циклом мозг взрослого *D. rerio* состоит из покоящихся НСК с медленным циклом (Kizil et al., 2012; Lindsey et al., 2014). Они не могут активно участвовать в нейрогенезе в интактном взрослом мозге, но в случае травмы или гомеостатического дисбаланса их пролиферативная активность значительно увеличивается. Предполагают, что вНСК у *D. rerio* могут быть гетерогенными и создавать более примитивные, недифференцированные клетки (Dirian et al., 2014), которые могут участвовать в регенеративных процессах даже после ряда нанесенных травм и способны замещать вНСК, которые истощаются вследствие травмы (Barbosa, Ninkovic, 2016). Показано, что после ампутации хвостового плавника у *D. rerio* клетки-предшественники полностью восстанавливают всю поврежденную ткань без снижения эффективности даже после повторных ампутаций (Shao et al., 2011). На основании наших данных мы предполагаем, что НСК не могут активно участвовать в нейрогенезе в интактном взрослом мозге, но в случае травмы их пролиферативная активность значительно увеличивается. С этим явлением мы связываем увеличение в 4.3

раза после нанесения повреждения количества нестин-позитивных НКП в гранулярном слое, которые формировали обширные скопления.

Иммуномаркирование нестина в мозжечке молоди симы выявило интенсивно маркированные мелкие клетки, фенотипически соответствующие НСК, описанным в мозжечке других костистых рыб: *D. rerio* и *A. leptorhynchus* (Hinsch, Zupanc, 2006; Kaslin et al., 2013; Sîrbulescu et al., 2015). Выделенные клетки-предшественники из мозжечка взрослого *A. leptorhynchus* при исследовании демонстрировали некоторые из свойств НСК. После 3–4 сут нахождения в культуре они формировали нейросферы, которые пролиферируя, достигали в диаметре 140 мкм в течение 3 недель. Рост нейросфер стимулировался эпидермальным фактором роста и основным фактором роста фибробластов. При добавлении фетальной бычьей сыворотки и ламинина в качестве субстрата клетки из нейросфер развивались как в нейроны, так и в глиальные клетки (Hinsch, Zupanc, 2006). Таким образом, клетки-предшественники, выделенные из зон пролиферации во взрослом мозжечке, проявляют способность к самообновлению и мультипотентности, демонстрируя тем самым характеристики НСК (Hinsch, Zupanc, 2006).

ИГХ маркирование нестина показало, что после повреждения во всех зонах увеличивается число нестин-позитивных НКП, но максимальное повышение уровня пролиферации установлено в молекулярном и в гранулярном слоях дорсальной зоны, которая содержит ДМЗ, в области прокола и в ГЭ. Нестин влияет на движение везикул в клетке, обеспечивая структурную и функциональную поддержку во время клеточной пролиферации (Chen et al., 2010; Carmona et al., 2011). Он контролирует локализацию и расхождение промежуточных белков в цитоскелете, воздействуя, таким образом, на клеточные компоненты во время митоза (Chen et al., 2010). Аномалии генной экспрессии нестина у *D. rerio* приводят к уменьшению размеров тела и роста головы, маленьким глазам, неразвитой сетчатке, дефектам мозга, развития мотонейронов, аксонов и глиальных клеток (Chen et al., 2010). У таких особей в развивающейся ЦНС уменьшается число клеток-предшественников из-за процессов апоптоза (Chen et al., 2010). Все эти наблюдения показывают, что нестин участвует в контроле нейрокинетических способностей и регенеративных клеточных процессах.

В ГЭ интактного мозжечка было выявлено большое число нестин-позитивных НКП, что свидетельствует об интенсивных процессах конститутивного нейрогенеза.

Вновь образованные нестин-позитивные дочерние клетки на территории ГЭ были интенсивно маркированы. После повреждения значительно увеличивалось количество нестин-позитивных НКП, образующих диффузные скопления, содержащие по 9–11 элементов. В ГЭ большинство одиночных клеток располагалось у внешних границ (рис. 19, г). Согласно данным, полученным на других видах костистых рыб, помимо тела мозжечка и заслонки, новые клетки образуются, в ГЭ (Zupanc, 2012). В ГЭ *A. burtoni* было идентифицировано мало признаков пролиферации клеток на 1 сут после введения BrdU, как и у *D. Rerio* и колюшки *Gasterosteus aculeatus* (Ekström et al., 2001; Grandel et al., 2006), в отличие от *A. leptorhynchus*, у которой был выявлен высокий уровень пролиферации в этом отделе мозжечка (Zupanc, Horschke, 1995). Возможно, небольшое количество клеток у *A. burtoni* в ГЭ связано с небольшим промежутком времени после введения BrdU. Остается неизвестной причина подобных относительно небольших изменений, но она может являться результатом видоспецифических различий в поведении, экологии, среде обитания, сенсорных входах или филогении. Дальнейшее изучение необходимо для того, чтобы проверить, способствуют ли такие различия адаптации функционирующих нейронов (Maruska et al., 2011a). В норме пролиферативный индекс в ГЭ составлял $3.8\% \pm 0.7\%$, через 2 сут после повреждения – $8.4\% \pm 0.6\%$, размеры нестин-позитивных НКП были сходными для интактных животных и после травмы. Увеличение числа НКП после нанесения повреждения в ГЭ указывает на то, что данная область принимает активное участие в процессах регенерации. Сходные размеры нестин-позитивных НКП во всех зонах как интактного, так и поврежденного мозжечка размером меньше 5 мкм свидетельствует об отсутствии переходных форм при росте клетки в отличие от PCNA маркирования. Кримбел и его коллеги на мезенхимальных стволовых клетках (СК) млекопитающих установили, что мелкие клетки аналогичного размера, обладают высоким пролиферативным потенциалом (Kimbrel et al., 2014). Тот факт, что интенсивное маркирование нестин-позитивных и BrdU-позитивных клеток было выявлено в ГЭ поврежденного и интактного мозжечка подтверждает наше предположение, что данные зоны принимают активное участие в процессах нейрогенеза.

4.7. Виментин-иммунопозитивность и изменения пластического синтеза в интактном и повреждённом мозжечке молоди симы *O. masou*

Виментин является белком промежуточных филаментов, экспрессируется клетками астроглии (Dahl et al., 1981) и классически рассматривается в качестве универсального маркера астроцитарной глии в мозге позвоночных (Arochena et al., 2004). Наряду с нестином входит в состав цитоскелета НСК и НКП. Иммуноцитохимические исследования эпендимных клеток и РГ, присутствующей в большом количестве в мозге костистых рыб, доказали присутствие в них GFAP (Kalman, Aji, 2002) и виментина (Cerdea et al., 1998). Секвенирование виментина костистых рыб и анализ аминокислотной последовательности показали его высокую степень гомологии с белком человека (Cerdea et al., 1998). На мальках молоди 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 виментином. Установлено, что во время развития ЦНС замещение виментина на GFAP происходит у рептилий (Kalman et al., 1998), птиц (Tapscott et al., 1981) и млекопитающих (Elmqvist et al., 1994).

Виментин-маркирование в мозжечке молоди симы *O. masou* выявило два типа клеток: округлые, интенсивно маркированные клетки 1а типа в молекулярном слое, в редких случаях имеющие отростки и округлые, интенсивно маркированные виментин-позитивные клетки 5 типа в гранулярном слое. В интактном мозжечке у поверхностного слоя были выявлены скопления негативных клеток, которые формировали поверхностные ниши, среди которых встречалось небольшое количество виментин-позитивных клеток. Мы предполагаем, что в мозжечке симы виментин маркирует НКП (Chen et al., 2018).

Наибольшая доля виментин-позитивных элементов в интактном 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. Возможно, что поскольку молекулярный слой содержит покоящиеся НСК, небольшое число виментин-позитивных гранул может входить в состав их цитоскелета. В

гранулярном слое интактного мозжечка виментин интенсивно маркировал дочёрные клетки.

Как и при маркировании нестина и GFAP, маркирование виментина характеризовалось значительным увеличением численности иммунопозитивных клеток после нанесения повреждения. В молекулярном слое дорсальной и латеральной зон количество виментин-позитивных клеток 1a типа возрастало в 5 раз, в базальной в 7 раз. У внешней границы дорсальной зоны были обнаружены поверхностные ниши, содержащие виментин-позитивные клетки, плотность распределения которых постепенно снижалась по мере удаления от ДМЗ. Поскольку в поверхностных нишах после травмы увеличивается число виментин-позитивных клеток, мы предполагаем, что он входит в состав цитоскелета делящихся НКП и регионы с виментин-позитивными клетками соответствуют зонам интенсифицированного метаболизма в мозжечке молодичисы. Количество виментин-позитивных гранул значительно возрастало по сравнению с контролем, и наибольшая концентрация была выявлена в молекулярном слое. Поскольку у рыб отсутствуют типичные астроциты (Privat et al., 1995; Kalman, 1998), как у млекопитающих, мы предполагаем, что усиление экспрессии виментина при повреждении отражает интенсификацию пластических процессов в НКП через несколько сут после травмы.

В поврежденной ЦНС млекопитающих астроциты претерпевают важные морфологические изменения, такие как гиперплазия и гипертрофия с образованием глиального рубца: физического и функционального барьера, окружающего область повреждения. В ходе этого явления, называемого реактивным глиозом, астроциты демонстрируют повышенную экспрессию белков промежуточных филаментов, включая GFAP, виментин, реэкспрессируют нестин (Li, Chopp, 1999) и изменяют экспрессию многих других генов (Ridet et al., 1997). При нанесении повреждения в паллиум *D. rerio* РГ усиливает экспрессию белков промежуточных филаментов, таких как GFAP, виментин, нестин и кальций-связывающего белка S100b, и демонстрирует гипертрофию отростков. Эти структурные изменения напоминают реактивный глиоз у млекопитающих, но у костистых рыб процессы формирования рубца выражены слабо (Baumgart et al., 2012; Mâarz et al., 2011). В мозге рыб GFAP-позитивные отростки с большей вероятностью восстанавливают аксоны, чем образуют какой-либо глиальный рубец (Takeda et al., 2015). 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). В мозжечке молодежи звездчатые клетки, напоминающие типичные астроциты млекопитающих на GFAP и виментин-окрашенных срезах мозга выявлены не были. В связи с этим, мы предполагаем, что усиление экспрессии виментина способствует репаративному нейрогенезу, играя важную роль в защите от последствий травмы.

Для матричных зон мозжечка было характерно наличие большого количества гранул как в составе цитоплазмы клеток, так и в качестве элементов внеклеточного матрикса. Виментин-позитивные внутриклеточные включения имели неправильную форму. Количество включений значительно возросло по сравнению с контролем и наибольшая концентрация иммуномаркированных гранул была выявлена в молекулярном слое (рис. 22, б). В гранулярном слое ОП виментин-позитивных гранул возросла в два раза по сравнению с контролем. Мы предполагаем, что усиление экспрессии виментина при повреждении отражает интенсификацию пластических процессов в НКП через несколько суток после травмы в мозжечке молодежи, как и у млекопитающих.

Исследования мозга взрослых млекопитающих показали, что НКП, найденные в СВЗ боковых желудочков и в СГЗ зубчатой извилины гиппокампа, имеют характеристики астроглии (Doetsch et al., 1999; Bonaguidi et al., 2011). Эти клетки обладают способностью к самообновлению и мультипотентности и, таким образом, по-видимому, функционируют как вНСК в этих двух областях мозга. Клетки, находящиеся в молекулярном слое, размером от 3.6 до 5.8 мкм выявлялись при каждом варианте маркирования (PCNA, BrdU, нестина), на основании чего мы предполагаем, что данный тип является конститутивными нейрональными и/или глиальными предшественниками, присутствующими в молекулярном слое. Как и при маркировании PCNA, BrdU, нестина после нанесения травмы были выявлены кластеры интенсивно и умеренно маркированных клеток, единичные маркированные клетки в толще молекулярного слоя. Виментин-позитивные клетки в мозжечке молодежи могут соответствовать популяции НСК, активизирующейся в результате травматического процесса.

На мозжечке *A. leptorhynchus* было показано, что в ДМЗ примерно половина Sox2-позитивных клеток (маркер стволовых клеток) экспрессируют GFAP и виментин и

соответствующая доля Sox2-позитивных клеток позитивна для белка астроцитов S100. Большое число таких клеток свидетельствует о том, что популяции S100-позитивных/Sox2-позитивных, GFAP-позитивных/Sox2-позитивных и виментин-позитивных/Sox2-позитивных клеток либо идентичны, либо совпадают по многим характеристикам. На основании этих данных авторы предполагают наличие однородной популяции глиальных клеток-предшественников у *A. leptorhynchus*. Конститутивные нейрогенные ниши в мозжечке этой рыбки состоят из неастроцитарных клеток, предположительно эпителиальных/эпендимальных, а также большой доли глиальных клеток, экспрессирующих GFAP, S100, виментин и в небольшом количестве BLBP (Sirbulesku et al., 2015). Эта идея дополнительно подтверждается высокой степенью сходства между экспрессией доменов этих глиальных маркёров, что предполагает наличие единой, однородной популяции глиальных клеток-предшественников. Тем не менее, недавние исследования на *D. rerio* показали, что ДМЗ не маркируется каноническими радиальными или астроглиальными маркёрами, такими как виментин, GFAP, BLBP, но содержит нестин и другие маркёры СК, указывающие на то, что они сохраняют нейроэпителиальные, а не астроглиальные характеристики. Каслин предполагает, что эти нестин-позитивные клетки эпителиального происхождения с высоким уровнем пролиферации, являются основным/единственным источником нейронов в гранулярном слое взрослого *D. rerio* (Kaslin et al., 2009, 2013). Видимо, у *A. leptorhynchus* различия между желудочковой зоной и клетками-предшественниками верхней ромбической губы не так выражены, как у *D. rerio*. Недавние исследования на *D. rerio* показали, что во время развития клетки-предшественники разделяются на две разные линии: предшественники желудочковой зоны на вентральной стороне четвертого желудочка, характеризующиеся экспрессией Ptf1a и глиальных маркёров; и нестин-позитивные клетки-предшественники верхней ромбической губы – эпителиального происхождения с высоким уровнем пролиферации, расположенные в дорсомедиальной части четвертого желудочка (Kaslin et al., 2009, 2013).

В наших исследованиях на молодёжь симы клетки ДМЗ были позитивны для нестина, PCNA, BrdU и были негативны для таких маркёров, как GFAP и виментин. Мы предполагаем, что во время развития НСК и НКП мозжечка молодёжь симы ближе по своим свойствам к *D. rerio*. Таким образом, мы видим некоторые противоречия в судьбе НСК и НКП у различных видов рыб и дальнейшее использование молекулярных

маркёров для верификации НСК, НКП в мозжечке молодежи симы даст более четкий ответ на этот вопрос.

4.8. Особенности глиогенеза и GFAP-негативных нейрональных стволовых клеток в интактном и повреждённом мозжечке молодежи симы *O. masou*

В развивающейся ЦНС млекопитающих РГ функционирует как клетки-предшественники, но на постнатальных стадиях большая ее часть дифференцируется в астроциты и эпендимальные клетки. У взрослых млекопитающих клетки РГ сохраняются в ограниченных нейрогенных областях: СВЗ боковых желудочков конечного мозга и зубчатой извилины гиппокампа, переднем мозге, сетчатке и в мозжечке (Dimou, Goetz, 2014). Клетки со свойствами РГ были обнаружены в мозге взрослого человека, некоторые входили в состав ниш, где они действовали как конститутивные взрослые клетки-предшественники: так называемые «В» клетки субэпендимальной зоны бокового желудочка, клетки «1 типа» субгранулярной зоны зубчатой извилины гиппокампа и, скорее всего, танициты, граничащие с желудочком гиппокампа (Dimou Goetz, 2014). В мозге млекопитающих GFAP является классическим маркёром астроцитов с многочисленными радиально ориентированными отростками, концевыми ножками, часто формируемыми на поверхности сосудов (Doetsch, Scharff, 2001). В настоящее время показано, что GFAP является одним из маркёров НСК (Ahmed et al., 2012). Предполагают, что астроциты, экспрессирующие GFAP, функционируют в качестве основного источника вновь созданных нейронов (Spassky et al., 2005). Однако, как правило, их фенотип более сложен, и помимо GFAP, содержит виментин, нестин, S100, Sox2 (Adolf et al., 2006; Sîrbulescu et al., 2015).

В исследованиях нескольких областей взрослого мозга костистых рыб были идентифицированы клетки предшественники, обладающие характеристиками РГ (Rothenaigner et al., 2011). При этом такие клетки способны как к самообновлению, так и к созданию клеток различных типов, демонстрируя тем самым характеристики настоящих СК (Rothenaigner et al., 2011). Важно отметить, что многочисленные исследования развивающегося конечного мозга млекопитающих дополнительно показали, что клетки РГ действуют как НСК, поскольку они являются источником всех нейронов и различных подтипов дифференцированных глиальных клеток (астроцитов, олигодендроцитов и эпендимальных клеток), либо напрямую, либо через другие типы НКП, впоследствии полученные из них (Turrero García, Harwell, 2017). Изучение свойств

вНСК у низших позвоночных сосредоточено главным образом на конечном мозге *D. rerio*, у которой в этой зоне мозга обнаружены НСК со свойствами РГ, а также промежуточные предшественники (Rothenaigner et al., 2011; März et al., 2010).

Если у мышей GFAP-позитивная РГ исчезает с началом миелинизации (Nakahara et al., 2003), то у рыб GFAP-позитивные волокна РГ идентифицируются в различных отделах головного мозга, включая мозжечок, на протяжении всей жизни (Zupanc, Horschke, 1995). Известно и о других функциональных свойствах РГ взрослых рыбок *D. rerio* (влияние на миграцию нейронов, синаптическую пластичность, нейро-глиальные связи, гомеостаз мозга) (Pellegrini et al., 2005). Мы полагаем, что наличие большого количества GFAP-позитивной РГ в интактном мозге молоди симы отражает процессы конститутивного нейрогенеза. Морфология GFAP-позитивных структур, их топография и взаимоотношения с другими структурными компонентами позволяют предполагать, что они, очевидно, являются компонентами лиановидных волокон мозжечка симы. Об этом, в частности, свидетельствует внешняя морфология маркированных волокон и наличие микроцитоскульптуры по ходу волокон и их терминалей.

В зонах вторичного нейрогенеза мозжечка симы были идентифицированы GFAP-позитивные волокна и клетки РГ. GFAP-позитивные клетки РГ симы, расположенные в поверхностном слое молекулярного слоя, имеют небольшие размеры сомы и длинные неразветвленные отростки. Таким образом, GFAP-позитивные клетки и волокна РГ являются как структурными, так и морфогенетическими компонентами в составе мозжечка молоди симы. 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-позитивной РГ в мозжечке костистых рыб.

В результате повреждающего воздействия в ДМЗ нами было зарегистрировано появление GFAP-позитивных волокон РГ, формирующих разнонаправлено ориентированные пучки. Подобные структурные образования не были выявлены у интактных животных. Мы полагаем, что после травмы в ДМЗ осуществляется структурная перестройка, связанная с двукратным увеличением дополнительных GFAP-позитивных волокон. Данные эффекты мы связываем как с интенсификацией пространственной переориентации волокон РГ, так и с формированием специфических направляющих для клеток, образованных в данной матричной зоне. Результаты наших наблюдений позволяют предполагать, что выявленные структурные изменения имеют

непосредственное отношение к процессам репаративного нейрогенеза. Согласно Клинту и Зупанку (Clint, Zupanc, 2001) плотность GFAP-позитивных волокон, по которым новые клетки мигрируют в место повреждения, увеличивается и остается высокой в течение как минимум 100 сут после травмы. Наличие виментин-позитивных волокон у *A. leptorhynchus* (Zupanc et al., 2012) и GFAP-позитивных у молодежи *O. masou* (Stukaneva et al., 2017) предполагает, что промежуточные филаменты могут участвовать в выживании и дифференциации новых клеток. На сегодняшний день остаются неизвестными сигналы, которые привлекают радиальные глиальные волокна к месту травмы (Skaggs et al., 2014).

Согласно данным Ахмеда с соавторами, в кортикальных астроцитах в мозге мыши экспрессия GFAP после травмы становится более выраженной (Ahmed et al., 2012). В коре и в гиппокампе мыши после нанесения механической травмы выявлена пролиферация эндогенных GFAP-позитивных клеток-предшественников. При культивировании *in vitro* увеличивается количество эндогенных НСК, формирующих нейросферы. Вторичные сферы при дифференциации дают три типа НСК, что указывает на их мультипотентность (Ahmed et al., 2012). Несмотря на то, что реактивные астроциты не проявляют нейрогенные свойства в мозге взрослых млекопитающих, они могут образовывать мультипотентные нейросферы и нейроны *in vitro*, которые подчеркивают важную роль ограничивающей среды *in vivo* (Robel et al., 2011).

GFAP-позитивные клетки-предшественники, экспрессирующие нестин и маркер клеточной поверхности CD15, были идентифицированы у щенков собаки (Walton et al., 2013). Как в мозжечке взрослой костистой рыбы многие из этих клеток находятся в молекулярном слое. Находясь в состоянии покоя *in vivo*, они способны образовывать нейросферы *in vitro*, делясь и давая начало нейронам, которые схожи с каждым из основных подтипов мозжечка (Klein et al., 2005). Несмотря на их мультипотентный потенциал эти эндогенные клетки-предшественники дифференцируются *in vivo* во взрослом мозжечке только в астроциты, включая Бергмановскую глию (Guo et al., 2013). Тем не менее, когда нейросферы, полученные из взрослого мозжечка, пересаживали животным в перинатальный мозжечок, они образовывали клетки нескольких типов, в том числе нейроны мозжечка (Klein et al., 2005).

Напротив, после повреждения мозга *D. rerio* реактивная РГ выполняет функции эндогенных нейрогенных НКП. Она создает нейробласты, которые мигрируют как в

конститутивную, перивентрикулярную область, так и в глубокие слои паренхимы к месту травмы, что обычно не наблюдается у интактных животных (Vitalo et al., 2016). В большей части мозга *D. rerio* (паллиум, гипоталамус, сетчатка, спинной мозг), клетки-предшественники РГ, участвующие в конститутивном нейрогенезе, характеризуется покоем (Marz et al., 2010a). Согласно данным Сирбулеску и её коллег GFAP в мозжечке *A. leptorhynchus* маркирует НСК/клетки-предшественники (Sîrbulescu et al., 2015). Это согласуется с гипотезой, что подобные клетки являются предполагаемым источником нейросфер после нанесения травмы (Ahmed et al., 2012). Однако не все нейросферы происходят из GFAP-позитивных клеток: примерно 50% клеток, формирующих нейросферы в гиппокампе и 75% – в коре, происходят от GFAP-позитивных клеток (Ahmed et al., 2012).

Возникновение нейрогенных ниш на территории молекулярного слоя является следующим этапом репаративного нейрогенеза. Нейрогенные ниши возникают *de novo* после травматического воздействия и содержат PCNA-позитивные и BrdU-позитивные клетки, гетерогенную популяцию, не содержащую маркер пролиферации. Иммуномаркирование GFAP показало, что в районе нейрогенных ниш выявляются 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). Данный тип клеток был выявлен при PCNA, BrdU, нестин и виментин ИГХ маркировании.

В ДМЗ мозжечка молодежи симы было выявлено ограниченное количество интенсивно маркированных GFAP-позитивных клеток. Учитывая тот факт, что значительная часть клеток ДМЗ нестин/BrdU/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, взаимоотношениях с волокнами РГ. Возможно, ДМЗ мозжечка симы состоит из гетерогенной популяции НСК, большая часть которых имеет нейроэпителиальное, а не глиальное происхождение.

Проведенные нами исследования позволяют заключить, что после нанесения травмы мозжечка молодежи симы к процессам конститутивного нейрогенеза добавляются процессы репаративного: для нейтрализации эффектов нейровоспаления поврежденные клетки уничтожаются путем апоптоза, начинается активная пролиферация, миграция и

ускоренная дифференциация новых клеток, которые мигрируют к месту повреждения, восстанавливая ткань. Главными источниками новых нейронов является молекулярный слой, находящиеся в нем нейрогенные ниши, которые формируются в ходе восстановления нервной ткани, ДМЗ, ГЭ и область травмы.

4.9. Терминальная дифференциация и ранняя нейрональная дифференциация в интактном и повреждённом мозжечке молоди симы *O. masou*

Исследование распределения NuCD-позитивных клеток в мозжечке молоди симы *O. masou* выявило увеличение количества иммунопозитивных клеток в дорсальной части мозжечка после травмы, содержащей ДМЗ. Наши результаты согласуются с данными, полученными на *D. rerio* (Kaslin et al., 2009; März et al., 2011). Мы считаем, что увеличение количества новых нейронов в ДМЗ у молоди симы *O. masou* – реакция на травму; похожий функциональный ответ наблюдался у молоди симы *O. masou* после травмы конечного мозга (Pushchina et al., 2017a) и у взрослой форели после повреждения зрительного нерва (Pushchina et al., 2016). Увеличение числа NuCD-позитивных клеток было обнаружено в базальной зоне. Однако в данной зоне наряду с небольшими недифференцированными NuCD-негативными клетками число дифференцированных NuCD-позитивных клеток с отростками и ганглиозных клеток (клетки Пуркинье и ЭДК) также увеличивалось. Согласно данным Каслина у молоди *D. rerio* в возрасте до 1 месяца клетки Пуркинье способны восстанавливаться после нанесения механической травмы. У взрослой рыбки 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 молоди симы в ходе репаративного нейрогенеза способность к восстановлению таких клеток выше, чем у *D. rerio*.

На *D. rerio* было показано, что в мозжечке нейроэпителиальные предшественники не образуют все нейронные подтипы в отличие от сетчатки, оптического тектума и паллиума (Kaslin et al., 2013). До сих пор неизвестно могут ли у взрослой особи нейроэпителиальные предшественники в ДМЗ увеличить свой нейрогенный репертуар в условиях регенерации у *D. rerio*. Но наши данные, полученные на молоди симы, свидетельствующие о перестройке ДМЗ при нанесении травмы, позволяют предположить, что они могут повышать свою активность после прямого повреждения мозжечка.

В посттравматический период большое количество HuCD-позитивных клеток было выявлено по всей дорсальной зоне. В интактном мозжечке рыбы округлые клетки 1 типа образовывали конститутивные нейроэпителиальные нейрогенные ниши на поверхности латеральной и базальной зон. После травмы HuCD-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 HuCD-позитивных клеток, которые находились в состоянии радиальной миграции (Pushchina et al., 2018). После повреждения в паллиальной зоне конечного мозга у молоди симы *O. masou* наибольшее количество HuCD-позитивных клеток было обнаружено в латеральной и дорсальной областях, где мы наблюдали наиболее интенсивную миграцию клеток (Pushchina et al., 2017a). Таким образом, возможно, что повреждение не только усиливает нейрогенез в реактивных нейрогенных нишах, но может ускорять и нейрональную дифференциацию клеток, которые интегрируются в зрелые нейронные сети мозжечка.

Одним из первых ответов на травму ЦНС у *D. rerio* является активация иммунных клеток (Ransohoff, Brown, 2012) и РГ, значительное увеличение пролиферации и создание новых нейронов для замены утраченных (Kroehne et al., 2011; Kizil et al., 2012). Эксперименты на *D. rerio* показали, что примерно 50% всех взросло-рожденных клеток, которые выживают в течение длительного времени, экспрессируют нейрон-специфический белок HuCD (Zupanc et al., 2005; Hirsch, Zupanc, 2006). В мозжечке молоди симы большая часть BrdU, PCNA, нестин-маркированных клеток выходят из зон пролиферации и дифференцируются в HuCD-позитивные нейроны, доказывая, что зоны пролиферации производят, в основном, нейроны.

Ускоренная дифференциация нейронов после нанесения травмы в ДМЗ мозжечка молоди симы, возможно, отражает видоспецифические филогенетические особенности репаративного нейрогенеза, характерные для лососевых. Локализация, топография и т.д. зон пролиферации, которые мы обнаружили у молоди симы, хорошо согласуются с данными признаками для зон пролиферации, описанными у трёхиглой колюшки (Ekström et al., 2001), *D. rerio* (Grandel et al., 2006), и *A. leptorhynchus* (Zupanc, Horschke, 1995). В нашей работе в условиях повреждения мозжечка высокая пролиферативная активность была идентифицирована в дорсальной зоне, поверхностном слое и ГЭ.

Таким образом, можно заключить, что весьма интенсивная пролиферация клеток в упомянутых зонах мозжечка в условиях нормальной морфогенетической активности в заданном периоде онтогенеза, дополнительно усиливается после повреждающего воздействия. Наличие вновь образованных клеток в поверхностном слое мы связываем частично с конститутивной морфогенетической активностью, а частично – с повреждающим воздействием. Через небольшой промежуток времени в зоне повреждения выявлялась повышенная плотность недифференцированных клеток. Этот факт свидетельствует о том, что репаративный процесс перешел в более позднюю стадию, когда снизились токсические эффекты нейровоспаления, основная часть поврежденных клеток была утилизирована путем апоптоза, а процессы пролиферации и дифференциации клеток начали усиливаться. Видимо, процессы репаративного нейрогенеза у молоди лососевых реализуются в более ранние сроки по сравнению с теми, что обычно упоминаются в литературе (Zupanc, 2006; Zupanc, Sîrbulescu, 2013). Мы полагаем, что это связано с высокой интенсивностью конститутивной морфогенетической активности в мозжечке молодых рыбок по сравнению с таковой у взрослых животных.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Н.Г., Обухов Д.К. Эволюционная морфология нервной системы позвоночных. Санкт–Петербург, Лань, 1999. 328 с.
2. Дронова Н.А., Спиридонов В.А. Незаконный, неучтённый и нерегулируемый вылов тихоокеанских лососей на Камчатке // М.: WWF России/TRAFFIC Europe, 2008. 52 с.
3. Есин Е.В., Чебанова В.В., Леман В.Н. Экосистема малой лососёвой реки Западной Камчатки (среда обитания, донное население и ихтиофауна). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. 171 с.
4. Калиниченко С.Г., Матвеева Н.Ю. Морфологическая характеристика апоптоза и его значение в нейрогенезе // Морфология. 2007. Vol. 131. P. 16–28.
5. Карпенко В.И. Оценка состояния запасов и управление промыслом тихоокеанских лососей на Камчатке. Методическое пособие по направлению подготовки бакалавров, специалистов и магистров специальности 110900.62, 110900.68 (110901.62, 111400.65, 111400.68) «Водные биоресурсы и аквакультура». Петропавловск-Камчатский, 2013. С. 64.
6. Коновалов А.Н., Лихтерман Л.Б., Потапов А.А. Клиническое руководство по черепно-мозговой травме. М.: Антидор, 2002. Т. 1. 550 с.
7. Токранов А.М., Бугаев В.Ф. Где крупнее лососи? // Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс. 2011. 72. с.
8. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. Л.: Медицина, 1969. 423 с.
9. Обухов Д.К., Пущина Е.В., Вараксин А.А. Структура пролиферативных зон в ЦНС взрослых позвоночных животных. Общие вопросы гистологии, органов и систем. Вопросы морфологии XXI века. 2013. С. 41–51.
10. Пущина Е.В., Обухов Д.К. Процессы пролиферации и апоптоза в головном мозге осетра // Нейрофизиология/ Neurophysiology. 2011. Vol. 43. P. 325–326.
11. Ресурсы поверхностных вод СССР. Дальний Восток. Л.: Гидрометиздат, 1972. Т. 18, вып. 3. 595 с.
12. Семенченко А.Ю. Анадромная миграция и биологическая характеристика приморской симы. Популяционная биология и систематика лососевых. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1980. С. 52–57.
13. Сергеев В.А. Значение анализа особенностей внутренней картины болезни и механизмов её формирования у больных с отдаленными последствиями черепно-

- мозговых травм, осложненных алкоголизмом, для оптимизации лечебно-реабилитационного процесса // Вестник совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. 2016. Т. 4. С. 110–118.
14. Abe K., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator // *Journal of Neuroscience*. 1996. Vol. 16. P. 1066–1071.
15. Aberg M.A., Aberg N.D., Hedbacker H., Oscarsson J., Eriksson P.S. Peripheral infusion of IGF-1 selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus // *Journal of Neuroscience*. 2000. Vol. 20. P. 2896–2903.
16. Abrous D.N., Koehl M., LeMoal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology // *Physiological Reviews*. 2005. Vol. 85. P. 523–569.
17. Adolf B., Chapouton P., Lam C.S., Topp S., Tannhäuser B., Strähle U., Götz M., Bally-Cuif L. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon // *Developmental Biology*. 2006. Vol. 295. P. 278–293.
18. Aguirre A.A., Ghittajallu R., Belachew S., Gallo V. NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus // *Journal of Cell Biology*. 2004. Vol. 165. P. 575–589.
19. Ahmed A.I., Shtaya A.B., Zaben M.J., Owens E.V., Kiecker C., Gray W.P. Endogenous GFAP-positive neural stem/progenitor cells in the postnatal mouse cortex are activated following traumatic brain injury // *Journal of Neurotrauma*. 2012. Vol. 29. P. 828–842.
20. Aizawa K., Ageyama N., Terao K., Hisatsune T. Primate-specific alterations in neural stem/progenitor cells in the aged hippocampus // *Neurobiology of Aging*. 2011. Vol. 32. P. 140–150.
21. Akimoto Y., Mochizuki Y., Uda A., Omata H., Shibutani J., Nishimura H., Komiya M., Kaneko K., Kawana T., Fujii A. Concentrations of lomefloxacin in radicular cyst and oral tissues following single or multiple oral administration // *Journal of Nihon University School of Dentistry*. 1993. Vol. 35. P. 267–275.
22. Akitake B., Ren Q., Boiko N., Ni J., Sokabe T., Stockand J.D., Eaton B. A., Montell C. Coordination and fine motor control depend on *Drosophila* TRP γ // *Nature Communications*. 2015. Vol. 6. P. 7288.
23. Albright J.E., Stojkovska I., Rahman A.A., Brown C.J., Morrison B.E. Nestin-positive/SOX2-negative cells mediate adult neurogenesis of nigral dopaminergic neurons in mice // *Neuroscience Letters*. 2016. Vol. 615. P. 50–54.

24. Altman J., Bayer S.A. Prenatal development of the cerebellar system in the rat. I. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum // *Journal of Comparative Neurology*. 1978. Vol. 179. P. 23–48.
25. Alunni A., Hermel J.M., Heuzé A., Bourrat F., Jamen F., Joly J.S. Evidence for neural stem cells in the medaka optic tectum proliferation zones // *Developmental Neurobiology*. 2010. Vol. 70. P. 693–713.
26. Alvarez-Buylla A., Theelen M., Nottebohm F. Birth of projection neurons in the higher vocal center of the canary forebrain before, during, and after song learning // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1988. Vol. 85. P. 8722–8726.
27. Ambrogini P., Lattanzi D., Ciuffoli S., Agostini D., Bertini L., Stocchi V., Santi S., Cuppini R. Morphofunctional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus // *Brain Research*. 2004. Vol. 1017. P. 21–31.
28. Ampatzis K., Dermon C. Sex differences in adult cell proliferation within the zebrafish (*Danio rerio*) cerebellum // *European Journal of Neuroscience*. 2007. Vol. 25. P. 1030–1040.
29. Amrein I., Dechmann D.K., Winter Y., Lipp H.P. Absent or low rate of adult neurogenesis in the hippocampus of bats (Chiroptera) // *PLoS One*. 2007. Vol. 2. e. 455.
30. Amrein I., Li P. Adult hippocampal neurogenesis of mammals: evolution and life history // *Biology Letters*. 2009. Vol. 23. P. 141–144.
31. Arochena M., Anadon R., Diaz Ragueira S.M. Development of vimentin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivities in the brain of gray mullet (*Chelon labrosus*), an advanced teleost // *Journal of Comparative Neurology*. 2004. Vol. 46. P. 413–436.
32. Awata S., Nakayama K., Sato A., Kawamura M., Suzuki I., Sugahara K., Kodama H. Degradation of cystathionine gamma-lyase in rat liver lysosomes: effect of leupeptin treatment // *Anatomical Record*. 1963. Vol. 145. P. 573–591.
33. Barbosa C., Mendes-Faia A., Lage P., Mira N. P., Mendes-Ferreira A. Genomic expression program of *Saccharomyces cerevisiae* along a mixed-culture wine fermentation with *Hanseniaspora guilliermondii* // *Microbial Cell Factories*. 2015. Vol. 14. P. 124.
34. Barbosa J.S., Ninkovic J. Adult neural stem cell behavior underlying constitutive and restorative neurogenesis in zebrafish // *Neurogenesis (Austin)*. 2016. Vol. 3. e1148101.

35. Barbosa J.S., Sanchez-Gonzalez R., Di Giaimo R., Baumgart E.V., Theis F.J., Gotz M., Ninkovic J. Live imaging of adult neural stem cell behavior in the intact and injured zebrafish brain // *Science*. 2015. Vol. 348. P.789–793.
36. Bardehle S., Kruger M., Buggenthin F., Schwausch J., Ninkovic J., Clevers H., Snippert H.J., Theis F.J., Meyer-Luehmann M., Bechmann I., Dimou L., Götz M. Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation // *Nature Neuroscience*. 2013. Vol. 1. P. 580–586.
37. Barnea A. Interactions between environmental changes and brain plasticity in birds// *General and comparative endocrinology*. 2009. Vol. 16. P. 128–134.
38. Barnea A., Pravosudov V. Birds as a model to study adult neurogenesis: bridging evolutionary, comparative and neuroethological approaches // *European Journal of Neuroscience*. 2011. Vol. 34. P. 884–907.
39. Baskerville K.A., Kent C., Nicolle M.M., Gallagher M., McKinney M. Aging causes partial loss of basal forebrain but no loss of pontine reticular cholinergic neurons // *Neuroreport*. 2006. Vol. 17. P. 1819–1823.
40. Bastien-Dionne P.O., David L.S., Parent A., Saghatelian A. Role of sensory activity on chemospecific populations of interneurons in the adult olfactory bulb // *Journal of Comparative Neurology*. 2010. Vol. 51. P. 1847–1861.
41. Baumgart E.V., Barbosa J.S., Bally-Cuif L., Götz M., Ninkovic J. Stab wound injury of the zebrafish telencephalon: a model for comparative analysis of reactive gliosis // *Glia*. 2012. Vol. 60. P. 343–357.
42. Beach D., Xiong Y., Zhang H. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA // *Cell*. 1992. Vol. 71. P. 505–514.
43. Beckervordersandforth R., Tripathi P., Ninkovic J., Bayam E., Lepier A., Stempfhuber B., Kirchhoff F., Hirrlinger J., Haslinger A., Lie D.C., Beckers J., Yoder B., Irmeler M., Götz M. *In vivo* fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells // *Cell Stem Cell*. 2010. Vol. 7. P. 744–758.
44. Bell C., Bodznick D., Montgomery J., Bastian J. The generation and subtraction of sensory expectations within cerebellum like structures // *Brain, Behavior and Evolution*. 1997. Vol. 50. P. 17–31.

45. Ben Abdallah N.M., Slomianka B.L, Vyssotski A.L, Lipp H.P. Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice // *Neurobiology of Aging*. 2010. Vol. 31. P. 151–161.
46. Benarroch E.E. Glutamate transporters: diversity, function, and involvement in neurologic disease // *Neurology*. 2010. Vol. 7. P. 259–264.
47. Benitez-Santana T., Simion M., Corraze G., Médale F., Joly J.S. Effect of nutrient availability on progenitor cells in zebrafish (*Danio rerio*) // *Developmental Neurobiology*. 2017. Vol. 77. P. 26–38.
48. Bentivoglio M., Mazzarello P. The history of radial glia // *Brain Research Bulletin*. 1999. Vol. 49. P. 305–315.
49. Bernocchi G., Scherini E., Giacometti S., Mares V. Premitotic DNA synthesis in the brain of the adult frog (*Rana esculenta L.*): an autoradiographic 3H-thymidine study // *Anatomical Record*. 1990. Vol. 228. P. 461–470.
50. Biebl M., Cooper C.M., Winkler J., Kuhn H.G. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain // *Neuroscience Letters*. 2000. Vol. 291. P. 17–20
51. Biggers W.J., Barnea E.R., Sanyal M.K. Anomalous neural differentiation induced by 5-bromo-2'-deoxyuridine during organogenesis in the rat // *Teratology*. 1987. Vol. 35. P. 63–75.
52. Bolognin S., Buffelli M., Puoliväli J., Iqbal K. Rescue of cognitive-aging by administration of a neurogenic and/or neurotrophic compound // *Neurobiology of Aging*. 2014. Vol. 35. P. 2134–2146.
53. Bolteus A.J., Bordey A. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone // *Journal of Neuroscience*. 2004. Vol. 2. P. 7623–7631.
54. Bonaguidi M.A., Wheeler M.A., Shapiro J.S., Stadel R.P., Sun G., Ming G.L., Song H. *In vivo* clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics // *Cell*. 2011. Vol. 145. P.1142–1155.
55. Bonfanti L., Fasolo A., Peretto P., Merighi A. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat // *Brain Research Bulletin*. 1996. Vol. 42. P. 9–21.
56. Bovetti S., Veyrac A., Peretto P., Fasolo A., De Marchis S. Olfactory enrichment influences adult neurogenesis modulating GAD67 and plasticity-related molecules expression in newborn cells of the olfactory bulb // *PLoS One*. 2009. Vol. 4. e6359.

57. Brandt M.D., Jessberger S., Steiner B., Kronenberg G., Reuter K., Bick-Sander A., Von deer Behrens W., Kempermann G. Transient calretinin-expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampus neurogenesis of mice // *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2003. Vol. 24. P. 603–613.
58. Bravo R., MacDonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites // *Journal of Cell Biology*. 1987. Vol. 105. P. 1549–1554.
59. Brus M., Keller M., Lévy F. Temporal features of adult neurogenesis: differences and similarities across mammalian species // *Frontiers in Neuroscience*. 2013a. Vol. 7. Article number 135.
60. Brus M., Meurisse M., Gheusi G., Keller M., Lledo P.M., Lévy F. Dynamics of olfactory and hippocampal neurogenesis in adult sheep // *Journal of Comparative Neurology*. 2013b. Vol. 52. P. 169–188.
61. Butovsky O., Yaniv Z., Schwartz A., Landa G., Talpalar A.E., Pluchino S., Martino G., Schwartz M. Microglia activated by IL-4 or IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells // *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2006. Vol. 31. P. 149–160.
62. Calegari F., Haubensak W., Haffner C., Huttner W. B. Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development // *Journal of Neuroscience*. 2005. Vol. 25. P. 6533–6538.
63. Calzolari F., Michel J., Baumgart E.V., Theis F., Götz M., Ninkovic J. Fast clonal expansion and limited neural stem cell self-renewal in the adult subependymal zone // *Nature Neuroscience*. 2015. Vol. 18. P. 490–492.
64. Cameron H.A., McEwen B.S., Gould E. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus // *Journal of Neuroscience*. 1995. Vol. 15. P. 4687–4692.
65. Campbell K., Götz M. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development // *Trends in Neurosciences*. 2002. Vol. 2. P. 235–238.
66. Candal E., Anadon R., Bourrat F., Rodríguez-Moldes I. Cell proliferation in the developing and adult hindbrain and midbrain of trout and medaka (teleosts): a segmental approach // *Developmental Brain Research*. 2005. Vol. 160. P. 157–175.

67. Candal E., Anadón R., DeGrip W.J., Rodríguez-Moldes I. Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout // *Developmental Brain Research*. 2005. Vol. 154. P. 101–119.
68. Caric D., Raphael H., Viti J., Feathers A., Wancio D., Lillien L. EGFRs mediate chemotactic migration in the developing telencephalon // *Development*. 2001. Vol. 128. P. 4203–4216.
69. Carmona I.C., Luesma Bartolomé M.J., Lavoie-Gagnon C., Junquera C. Distribution of nestin protein: Immunohistochemical study in enteric plexus of rat duodenum // *Microscopy Research and Technique*. 2011. Vol. 74. P. 148–152.
70. Castilla-Ortega E., Pedraza C., Estivill-Torrús G., Santín L.J. When is adult hippocampal neurogenesis necessary for learning? Evidence from animal research // *Reviews in the Neuroscience*. 2011. Vol. 22. P. 267–283.
71. Cattan A., Ayali A., Barnea A. The cell birth marker BrdU does not affect recruitment of subsequent cell divisions in the avian brain // *BioMed Research International*. 2015. 126078.
72. Cerda H., Mori K., Nakayama T., Jaffe K. A synergistic aggregation pheromone component in the banana weevil *Cosmopolites sordidus* Ger 1824 (Coleoptera: Curculionidae) // *Acta Científica Venezolana*. 1998. Vol. 49. P. 201–203.
73. Chen H.L., Yuh C.H., Wu K.K. Nestin is essential for zebrafish brain and eye development through control of progenitor cell apoptosis // *PLoS One*. 2010. Vol. 5. e9318.
74. Chen M., Puschmann T. B., Marasek P., Inagaki M., Pekna M., Wilhelmsson U., Pekny M. Increased neuronal differentiation of neural progenitor cells derived from phosphovimentin-deficient mice // *Molecular Neurobiology*. 2018. Vol. 55. P. 5478–5489.
75. Cheng A., Wang S., Cai J., Rao M.S., Mattson M.P. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation with differentiation in the mammalian brain // *Developmental Biology*. 2003. Vol. 258. P. 319–333.
76. Cheng Y., Black I.B., DiCicco-Bloom E. Hippocampal granule neuron production and population size are regulated by levels of bFGF // *European Journal of Neuroscience*. 2002. Vol. 15. P. 3–12.
77. Cheung T.H., Rando T.A. Molecular regulation of stem cell quiescence // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013. Vol. 1. P. 329–340.

78. Christie K.J., Turnley A.M. Regulation of endogenous neural stem/progenitor cells for neural repair-factors that promote neurogenesis and gliogenesis in the normal and damaged brain // *Nature Reviews in the Neuroscience*. 2004. Vol. 5. P. 146–156.
79. Clint S.C., Zupanc G.K. Neuronal regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus*: guidance of migrating young cells by radial glia // *Developmental Brain Research*. 2001. Vol. 130. P. 15–23.
80. Coleman M.P., Freeman M.R. Wallerian degeneration, wld(s), nmnat // *Annual Review of Neuroscience*. 2010. Vol. 3. P. 245–267.
81. Collan Y., Haapasalo H., Helin H., Kalimo H., Kerttula T., Rantala I., Sallinen P. Sources of variation in the assesment of cell proliferation using proliferating cell nuclear antigen histochemistry // *Journal of Analytical and Quantitative Cytology and Histology*. 1994. Vol. 16. P. 261–268.
82. Cooper-Kuhn C.M., Kuhn G.H. Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain // *Developmental Brain Research*. 2002. Vol. 134. P. 13–21.
83. Cuadros M.A., Navasculcs J. The origin and differentiation of microglial cells during development // *Progress in Neurobiology*. 1998. Vol. 56. P. 173–189.
84. Cuddapah V.A., Robel S., Watkins S., Sontheimer H. A neurocentric perspective on glioma invasion // *Nature Reviews in the Neuroscience*. 2014. Vol. 1. P. 455–465.
85. Curtis M.A., Kam M., Nannmark U., Anderson M.F., Axell M.Z., Wikkelso C., Holtås S., van Roon-Mom W.M., Björk-Eriksson T., Nordborg C., Frisén J., Dragunow M., Faull R.L., Eriksson P.S. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension Maurice // *Science*. 2007. Vol. 315. P. 1243–1249.
86. Dahl D., Rueger D.C., Bignami A., Weber K., Osbom M. Vimentin, the 57000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia // *European Journal of Cell Biology*. 1981. Vol. 24 P. 191–196.
87. Dawe G.S., Han S.P., Bian J.S., Moore P.K. Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K⁺ channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats // *Neuroscience*. 2008. Vol. 152, № 1. P. 169–177.
88. Dayer A.G., Ford A.A., Cleaver K.M., Yassaee M., Cameron H.A. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus // *Journal of Comparative Neurology*. 2003. Vol. 460. P. 563–572.

89. De Pablo Y., Nilsson M., Pekna M., Pekny M. Intermediate filaments are important for astrocyte response to oxidative stress induced by oxygen–glucose deprivation and reperfusion // *Histochemistry and Cell Biology*. 2013. Vol. 140. P. 81–91.
90. Deng W., Aimone J.B., Gage F.H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory // *Nature Reviews in the Neuroscience*. 2010. Vol. 11. P. 339–350.
91. Dhaliwal J., Lagace D.C. Visualization and genetic manipulation of adult neurogenesis using transgenic mice // *European Journal of Neuroscience*. 2011. Vol. 33. P. 1025–1036.
92. Dhanasiri A.K., Fernandes J.M., Kiron V. Glutamine synthetase activity and the expression of three glul paralogues in zebrafish during transport // *Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2012. Vol. 163. P. 274–284.
93. Dimou L, Götz M. Glial cells as progenitors and stem cells: new roles in the healthy and diseased brain // *Physiological Reviews*. 2014. Vol. 9. P. 709–737.
94. Dipasquale B., Wood K.A., Youle R.J. *In situ* labeling of granule cells for apoptosis–associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum // *Neuron*. 1993. Vol. 11. P. 621–632.
95. 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 // *Developmental Cell*. 2014. Vol. 30. P.123–136.
96. Doetsch F., Alvarez-Buylla A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1996. Vol. 9. P. 14895–14900.
97. Doetsch F., Caille I., Lim D.A., Garcí’a–Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain // *Cell*. 1999. Vol. 97. P. 703–716.
98. Doetsch F., Scharff C. Challenges for brain repair: insights from adult neurogenesis in birds and mammals // *Brain, Behavior and Evolution*. 2001. Vol. 58. P. 306–322.
99. Dolbeare F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics // *Histochemical Journal* 1995. Vol. 27. P. 339–369.

100. Duan X., Qiao M., Bei F., Kim I.J., He Z., Sanes J.R. Subtype-specific regeneration of retinal ganglion cells following axotomy: effects of osteopontin and mTOR signaling // *Neuron*. 2015. Vol. 85. P. 1244–1256.
101. Dunlap K.D., Chung M., Castellano J.F. Influence of long-term social interaction on chirping behavior, steroid levels and neurogenesis in weakly electric fish // *Journal of Experimental Biology*. 2013. Vol. 216. P. 2434–2441.
102. 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 // *Journal of Comparative Neurology*. 2013. Vol. 52. P. 3099–3115.
103. Ekdahl C.T., Claassen J.H., Bonde S., Kokaia Z., Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2003. Vol. 100. P. 13632–13617.
104. Ekström 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 // *Journal of Comparative Neurology*. 2001. Vol. 436. P. 92–110.
105. Elmquist J.K., Swanson J.J., Sakaguchi D.S., Ross L.R., Jacobson C.D. Developmental distribution of GFAP and vimentin in the Brazilian opossum brain // *Journal of Comparative Neurology*. 1994. Vol. 344. P. 283–296.
106. Emsley J.G., Hagg T. Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice // *Experimental Neurology*. 2003. Vol. 183. P. 298–310.
107. Enokido Y., Suzuki E., Iwasawa K., Namekata K., Okazawa H., Kimura H. Cystathionine beta-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS // *FASEB Journal*, 2005. Vol. 13. P. 1854–1856.
108. Fernandez A.S., Rosillo J.C., Casa a 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.
109. Ferretti P. Is there a relationship between adult neurogenesis and neuron generation following injury across evolution? // *European Journal of Neuroscience*. 2011. Vol. 3. P. 951–962.

110. Filippov V., Kronenberg G., Pivneva T., Reuter K., Steiner B., Wang L.P., Yamaguchi M., Kettenmann H., Kempermann G. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes // *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2003. Vol. 23. P. 373–382.
111. Fishell G., Goldman J.E. A silver lining to stroke: does ischemia generate new cortical interneurons? // *Nature Neuroscience*. 2010. Vol. 13. P. 145–146.
112. Folgueira M., Anadón R., Yáñez J. Afferent and efferent connections of the cerebellum of a salmonid, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a tract-tracing study // *Journal of Comparative Neurology*. 2006. Vol. 497. P. 542–565.
113. Ganz J., Kaslin J., Freudenreich D., Machate A., Geffarth M., Brand M. Subdivisions of the adult zebrafish subpallium by molecular marker analysis // *Journal of Comparative Neurology*. 2012. Vol. 520. P. 633–655.
114. 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. 5. P. 1345–1363.
115. Gasparini C.F., Sutherland H.G., Griffiths L.R. Studies on the pathophysiology and genetic basis of migraine // *Current Genomics*. 2013. Vol.14. P. 300–315.
116. Geraerts E., Lindsay D.S., Jelicic M., Merckelbach H., Raymaekers L., Arnold M.M., Schooler J.S. Cognitive mechanisms underlying recovered-memory experiences of childhood sexual abuse // *Psychological Science*. 2009. Vol. 20. P. 92–98.
117. Gerasimova E.V., Sitdikova G.F., Zefirov A.L. Hydrogen Sulfide as an Endogenous Modulator of Mediator Release in the Frog Neuromuscular Synapse // *Neurochemical Journal*. 2008. Vol. 2. P. 120–126.
118. Ghibelli L., Farrace M.G., Fesus L., Melino G., Piacentini M., Piredda L. The expression of tissue transglutaminase in two human cancer cell lines is related with programmed cell death (apoptosis) // *European Journal of Cell Biology*. 1991. Vol. 54. P. 246–254.
119. Ghosh S., Hui S.P. Regeneration of zebrafish CNS: adult neurogenesis // *Neural Plasticity*. 2016. 5815439.
120. Goldsworthy T.L., Dunn C.S., Popp J.A. Dose effects of bromodeoxyuridine (BRDU) on rodent hepatocyte proliferation measurements // *Toxicology*. 1992. Vol. 323. P. 26–31.

121. González-Granero S., Lezameta M., García-Verdugo J.M. Adult neurogenesis in reptiles // *Neurogenesis in the Adult Brain I: Neurobiology*. 2011. P. 169–189.
122. Götz M., Sirko S., Beckers J., Irmeler M. Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: *in vivo* lineage, *in vitro* potential and genome-wide expression analysis // *Glia*. 2015. Vol. 63. P. 1452–1468.
123. Grandel H., Brand M. Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates // *Development Genes and Evolution*. 2013. Vol. 22. P. 131–147.
124. 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 // *Developmental Biology*. 2006. Vol. 295. 263–277.
125. Greco M.A., Lossi L., Merighi A., Zagzag D. Apoptosis of undifferentiated progenitors and granule cell precursors in the post-natal human cerebellar cortex correlates with expression of BCL-2, ICE and CPP-32 proteins // *Journal of Comparative Neurology*. 1998. Vol. 399. P. 359–372.
126. Grosche J., Härtig W., Reichenbach A. Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Müller (glial) cells in retinal light damage of rats // *Neuroscience Letters*. 1995. Vol. 185. P. 119–122.
127. Grupp L., Wolburg H., Mack A.F. Astroglial structures in the zebrafish brain // *Journal of Comparative Neurology*. 2010. Vol. 518. P. 4277–4287.
128. Guo C., Eckler M.J., McKenna W.L., McKinsey G.L., Rubenstein J.L., Chen B. Fezf2 expression identifies a multipotent progenitor for neocortical projection neurons, astrocytes, and oligodendrocytes // *Neuron*. 2013. Vol. 80. P. 1167–1174.
129. Gustafsson E., Lindvall O., Kokaia Z. Intraventricular infusion of TrkB-Fc fusion protein promotes ischemia-induced neurogenesis in adult rat dentate gyrus // *Stroke*. 2003. Vol. 34. P. 2710–2715.
130. Hancock A., Priester C., Kidder E., Keith J. R. Does 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) disrupt cell proliferation and neuronal maturation in the adult rat hippocampus *in vivo*? // *Behavioural Brain Research*. 2009. Vol. 199. P. 218–221.
131. Hattiangady B., Rao M.S., Shetty G.A., Shetty A.K. Brain-derived neurotrophic factor, phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus // *Experimental Neurology*. 2005. Vol. 195. P. 353–437.

132. Hattiangady B., Shetty A.K. Aging does not alter the number or phenotype of putative stem/progenitor cells in the neurogenic region of the hippocampus // *Neurobiology of Aging*. 2008. Vol. 2. P. 129–147.
133. He J., Guo R., Qiu P., Su X., Yan G., Feng J. Exogenous hydrogen sulfide eliminates spatial memory retrieval impairment and hippocampal CA1 LTD enhancement caused by acute stress via promoting glutamate uptake // *Neuroscience*. 2017. Vol. 350. P. 110–123.
134. He J.T., Li H., Le Yang L., Mao C.Y. Role of hydrogen sulfide in cognitive deficits: evidences and mechanisms // *European Journal of Pharmacology*. 2019. Vol. 15. P. 146–153.
135. Heine V.M., Maslam S., Joëls M., Lucassen P. J. Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation // *Neurobiology of Aging*. 2004. Vol. 25. P. 361–375.
136. Hendrickson M.L., Rao A.J., Demerdash O.N., Kalil R.E. Expression of nestin by neural cells in the adult rat and human brain // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. e18535.
137. Hinsch K., Zupanc G.K. Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem cells from adult fish brain // *Journal of Neuroscience Methods*. 2006. Vol. 158. P. 75–88.
138. Hoshaw B.A., Evans J.C., Mueller B., Valentino R.J., Lucki I. Social competition in rats: cell proliferation and behavior // *Behavioural Brain Research*. 2006. Vol. 17. P. 343–351.
139. Hosoki R., Matsuki N., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997. Vol. 237. P. 527–531.
140. Hu R., Cai W.Q., Wu X.G., Yang Z. Astrocyte-derived estrogen enhances synapse formation and synaptic transmission between cultured neonatal rat cortical neurons // *Neuroscience*. 2007. Vol. 144. P. 1229–1240.
141. Hughes E.G., Kang S.H., Fukaya M., Bergles D.E. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain // *Nature Neuroscience*. 2013. Vol. 1. P. 668–676.
142. Hui S. P., Dutta A., Ghosh S. Cellular response after crush injury in adult zebrafish spinal cord // *Developmental Dynamics*. 2010. Vol. 239. P. 2962–2979.

143. Iosif R.E., Ekdahl C.T., Ahlenius H., Pronk C.J., Bonde S., Kokaia Z., Jacobsen S.E., Lindvall O. Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis // *Journal of Neuroscience*. 2006. Vol. 26. P. 9703–9712.
144. Ish-Shalom D., Christoffersen C.T., Vorwerk P., Sacerdoti-Sierra N., Shymko R.M., Naor D., De Meyts P. Mitogenic properties of insulin and insulin analogues mediated by the insulin receptor // *Diabetologia*. 1997. Vol. 2. P. 25–31.
145. Ito Y., Tanaka H., Okamoto H., Ohshima T. Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum // *Developmental Biology*. 2010. Vol. 342. P. 26–38.
146. Jin K., Sun Y., Xie L., Peel A., Mao X.O., Batteur S., Greenberg D.A. Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum // *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2003. Vol. 24. P. 171–189.
147. Kalman M. Astroglial architecture of the carp (*Cyprinus carpio*) brain as revealed by immunohistochemical staining against glial fibrillary acidic protein (GFAP) // *Anatomy and Embryology*. 1998. Vol. 198. P. 409–433.
148. Kalman M., Ari C. Distribution of GFAP immunoreactive structures in the rhombencephalon of the sterlet (*Acipenser ruthenus*) and its evolutionary implication // *Journal of Experimental Zoology*. 2002. Vol. 293. P. 395–406.
149. Kaslin J., Kroehne V., Benato F., Argenton F., Brand M. Development and specification of cerebellar stem and progenitor cells in zebrafish: from embryo to adult // *Neural Development*. 2013. Vol. 8, № 9.
150. Kaslin J., Ganz J., Geffarth M., Grandel H., Hans S., Brand M. Stem cells in the adult zebrafish cerebellum: initiation and maintenance of a novel stem cell niche // *Journal of Neuroscience*. 2009. Vol. 29. P. 6142–6153.
151. Kaslin J., Kroehne V., Ganz J., Hans S., Brand M. Distinct roles of neuroepithelial-like and radial glia-like progenitor cells in cerebellar regeneration // *Development*. 2017. Vol. 144. P. 1462–1471.
152. Katchanov J., Harms C., Gertz K., Hauck L., Waeber C., Hirt L., Priller J., von Harsdorf R., Bruck W., Hortnagl H., Dirnagl U., Bhide P.G., Endres M. Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery

- before delayed neuronal cell death // *Journal of Neuroscience*. 2001. Vol. 21. P. 5054–5053.
153. Kee N., Sivalingam S., Boonstra R., Wojtowicz J.M. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis // *Journal of Neuroscience Methods*. 2002. Vol. 115. P. 97–105.
154. Kempermann G. *Adult Neurogenesis* // Oxford University Press; 2 edition, 2011. 616 p.
Это глава в книге? Или вся книга? Неполная ссылка.
155. Kempermann G. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? // *Trends Neuroscience*. 2008. Vol. 31. P. 163–169.
156. Kerschensteiner M., Schwab M.E., Lichtman J.W., Misgeld T. *In vivo* imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord // *Nature Medicine*. 2005. Vol. 11, № 5. P. 572–577.
157. Kim Y.S., Joh T.H. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease // *Experimental and Molecular Medicine*. 2006. Vol. 38. P. 333–347.
158. 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., Lanza R. Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties // *Stem Cells Development*. 2014. Vol. 23. P. 1611–1624.
159. Kimura H. Hydrogen sulfide as a neuromodulator // *Molecular Neurobiology*. 2002. Vol. 26. P. 13–19.
160. Kishimoto N., Shimizu K., Sawamoto K. Neuronal regeneration in a zebrafish model of adult brain injury // *Disease Models and Mechanisms*. 2012. Vol. 5. P. 200–209.
161. Kizil C., Kaslin J., Kroehne V., Brand M. Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish // *Developmental Neurobiology*. 2012. Vol. 7. P. 429–461.
162. Kizil C., Kyritsis N., Brand M. Effects of inflammation on stem cells: together they strive? // *EMBO Reports*. 2015. Vol. 16. P. 416–426.
163. Klein R.J., Zeiss C., Chew E.Y., Tsai J.Y., Sackler R.S., Haynes C., Henning A.K., SanGiovanni J.P., Mane S.M., Mayne S.T., Bracken M.B., Ferris F.L., Ott J., Barnstable C., Hoh J. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration // *Science*. 2005. Vol. 308. P. 38–389.

164. Knoth R., Singec I., Ditter M., Pantazis G., Capetian P., Meyer R.P., Horvat V., Volk B., Kempermann G. Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years // *PLoS One*. 2010. Vol. 5. e8809.
165. Kocher T.D. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model // *Nature Reviews Genetics*. 2004. Vol. 5. P. 288–298.
166. Kohama S.G., Goss J.R., Finch C.E., McNeill T.H. Increases of glial fibrillary acidic protein in the aging female mouse brain // *Neurobiology of Aging*. 1995. Vol. 1. P. 59–67.
167. Koke J.R., Mosier A.L., García D.M. Intermediate filaments of zebrafish retinal and optic nerve astrocytes and Müller glia: differential distribution of cytokeratin and GFAP // *BMC Research Notes*. 2010. Vol. 3. Article number 50.
168. Kolb B., Pedersen B., Ballermann M., Gibb R., Whishaw I. Q. Embryonic and postnatal injections of bromodeoxyuridine produce age-dependent morphological and behavioral abnormalities // *Journal of Neuroscience*. 1999. Vol. 19. P. 2337–2346.
169. Komuro H., Rakic P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors // *Science*. 1993. Vol. 260. P. 95–97.
170. Kornack D.R., Rakic P. Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex // *Science*. 2001. Vol. 294. P.2127–3210
171. Kotrschal K., Van Staaden M.J., Huber R. Fish brains: evolution and environmental relationships // *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 1998. Vol. 8. P. 373–408.
172. Koumans J.T.M., Akster H.A. Myogenic cells in development and growth of fish // *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1995. Vol. 110A. P. 3–20.
173. Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells // *Annual Review of Neuroscience*. 2009. Vol. 32. P. 149–184.
174. Kroehne V., Freudenreich D., Hans S., Kaslin J., Brand M. Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors // *Development*. 2011. Vol. 13. P. 4831–4841.
175. Kuhn H.G., Winkler J., Kempermann G., Thal L.J., Gage F.H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain // *Journal of Neuroscience*. 1997. Vol. 17. P. 5820–5829.
176. Kukley M., Kiladze M., Tognatta R., Hans M., Swandulla D., Schramm J., Dietrich D. Glial cells are born with synapses // *FASEB Journal*. 2008. Vol. 8. P. 2957–2969.

177. Kyritsis N., Kizil C., Zocher 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. 1353–1356.
178. LaDage L.D., Roth T.C., Pravosudov V.V. Hippocampal neurogenesis is associated with migratory behavior in adult but not juvenile white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys ssp.*) // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011. Vol. 278. P. 138–143.
179. Loureiro M., García G. *Austrolebias reicherti* Loureiro and García, a valid species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from Uruguay // *Zootaxa*. 2008. Vol. 1940. P. 1–15.
180. Nakahara K., Alzoreky N.S., Yoshihashi T., Nguyen H.T.T., Trakoontivakorn G. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nordus* (*Citronella grass*) // *Japan Agricultural Research Quarterly*. 2003. Vol. 37. P. 249–252.
181. Oosterhof C.A., El Mansari M., Blier P. Acute effects of brexpiprazole on serotonin, dopamine, and norepinephrine systems: an *in vivo* electrophysiologic characterization // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*. 2014. Vol. 351. P.585–595.
182. Piacentini M., Fesus L., Farrace M.G., Ghibelli L., Piredda L., Melino G. The expression of «tissue» transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis) // *European Journal of Cell Biology*. 1991. Vol. 54. P. 246–254.
183. Lanet E., Gould A.P., Maurange C. Protection of neuronal diversity at the expense of neuronal numbers during nutrient restriction in the *Drosophila* visual system // *Cell Reports*. 2013. Vol. 28. P. 3587–3594.
184. Larsson A., Wilhelmsson U., Pekna M., Pekny M. Increased cell proliferation and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of old GFAP^{-/-}Vim^{-/-} mice // *Neurochemical Research*. 2004. Vol. 2. P. 2069–2073.
185. Larsson E., Mandel R.J., Klein R.L., Muzyczka N., Lindvall O., Kokaia Z. Suppression of insult-induced neurogenesis in adult rat brain by brain-derived neurotrophic factor // *Experimental Neurology*. 2002. Vol. 177. P. 1–8.
186. Lau B.W., Yau S.Y., So K.F. Reproduction: a new venue for studying function of adult neurogenesis? // *Cell Transplantation*. 2011. Vol. 20. P. 21–35.

187. Lazarini F., Lledo P.M. Is adult neurogenesis essential for olfaction? // *Trends in Neurosciences*. 2011. Vol. 34. P. 20–30.
188. Lee J., Seroogy K.B., Mattson M.P. Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice // *Journal of Neurochemistry*. 2002. Vol. 80. P. 539–547.
189. Lee S.W., Clemenson G.D., Gage F.H. New neurons in an aged brain // *Behavioural Brain Research*. 2012. Vol. 22. P. 497–507.
190. Leffler C.W., Parfe a H., Basuroy S., Jaggar J. H., Umstot E.S., Fedinec A.L. Hydrogen sulfide and cerebral microvascular tone in newborn pigs // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2011. Vol. 300. P. 440–447.
191. Levine J.D., Casey C.I., Kalderon D.D., Jackson F.R. Altered circadian pacemaker functions and cyclic AMP rhythms in the *Drosophila* learning mutant *dunce* // *Neuron*. 1994. Vol. 13. P. 967–974.
192. Lichtenwalner R.J., Forbes M.E., Bennett S.A., Lynch C.D., Sonntag W.E., Riddle D.R., Lynch C.D., Sonntag W.E., Riddle D.R. Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-1 ameliorates the age related decline in hippocampal neurogenesis // *Neuroscience*. 2001. Vol. 107. P. 603–613.
193. Lindsey B.W., Tropepe V. Changes in the social environment induce neurogenic plasticity predominantly in niches residing in sensory structures of the zebrafish brain independently of cortisol levels // *Developmental Neurobiology*. 2014. Vol. 74. P. 1053–1077.
194. Lippert-Grüner M., Maegele M., Haverkamp H., Klug N., Wedekind C. Health-related quality of life during the first year after severe brain trauma with and without polytrauma // *Brain Injury*. 2007. Vol. 21. P. 451–455.
195. Liu H., Radlowski E.C., Conrad M.S., Li Y., Dilger R.N., Johnson R.W. Early supplementation of phospholipids and gangliosides affects brain and cognitive development in neonatal piglets // *Journal of Nutrition*. 2014. Vol. 14. P. 1903–1909.
196. Liu Z., Li Y., Cui Y., Roberts C., Lu M., Wilhelmsson U., Pekny M., Chopp M. Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke // *Glia*. 2014. Vol. 62. P. 2022–2033.
197. Lledo P.M., Alonso M., Grubb M.S. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits // *Nature Reviews in the Neuroscience*. 2006. Vol. 7. P. 179–93.

198. Lois C., Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain // *Science*. 1994. Vol. 26. P. 1145–1148.
199. Lossi L., Merighi A. *In vivo* cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS // *Progress in Neurobiology*. 2003. Vol. 69. P. 287–312.
200. Love N.K., Keshavan N., Lewis R., Harris W.A., Agathocleous M. A nutrient-sensitive restriction point is active during retinal progenitor cell differentiation // *Development*. 2014. Vol. 14. P. 697–706.
201. Lugert S., Basak O., Knuckles P., Haussler U., Fabel K., Gotz M., Haas C.A., Kempermann. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging // *Cell Stem Cell*. 2010. Vol. 6. P. 445–456.
202. Luiz E. M., Beatriz M. L. Neurogenesis: A Change of Paradigms // In: H. Ulrich, editor. *Perspectives of Stem Cells: From tools for studying mechanisms of neuronal differentiation towards therapy*, Springer Dheidelberg New York London, 2010. P. 11–33.
203. Lukaszewicz A., Savatier P., Cortay V., Giroud P., Huissoud C., Berland M., Kennedy H., Dehay C. G1 phase regulation, area-specific cell cycle control, and cytoarchitectonics in the primate cortex // *Neuron*. 2005. Vol. 47. P. 353–364.
204. Lund L.M., Machado V.M., McQuarrie I.G. Increased b-actin and tubulin polymerization in regrowing axons: relationship to the conditioning lesion effect // *Experimental Neurology*. 2002. Vol.178. P. 306–312.
205. Lundkvist J., Kastäng F., Kobelt G. The burden of rheumatoid arthritis and access to treatment: health burden and costs // *European Journal of Health Economics*. 2008. Vol. 8, Suppl. 2. P. 49–60.
206. Mahler J., Driever W. Expression of the zebrafish intermediate neurofilament nestin in the developing nervous system and in neural proliferation zones at postembryonic stages // *BMC Developmental Biology*. 2007. Vol. 7. Article number 89.
207. Malatesta P., Appolloni, I., Calzolari, F. Radial glia and neural stem cells // *Cell and Tissue Research*. 2008. Vol. 331. P. 165–178.
208. Malatesta P., Götz M. Radial glia-from boring cables to stemcell stars // *Development*. 2013. Vol. 140. P. 483–486.

209. Malik S.Z., Lewis M., Isaacs A., Haskins M., van Winkle T., Vite C.H., Watson D.J. Identification of the rostral migratory stream in the canine and feline brain // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, №5. e36016.
210. Margotta V., Morelli A., Caronti B. Expression of PCNA positivity in the brain of normal adult heterothermic vertebrates: further observations // *Italian Journal of Anatomy and Embryology*. 2005. Vol. 110. P. 59–74.
211. Maruska K.P., Fernald R.D. Behavioral and physiological plasticity: rapid changes during social ascent in an African cichlid fish // *Hormones and Behavior*. 2010. Vol. 5. P. 230–240.
212. Maruska K.P., Fernald R.D. Plasticity of the reproductive axis caused by social status change in an African cichlid fish: II. Testicular gene expression and spermatogenesis // *Endocrinology*. 2011a. Vol. 15. P. 291–302.
213. Maruska K.P., Levavi-Sivan B., Biran J., Fernald R.D. Plasticity of the reproductive axis caused by social status change in an African cichlid fish: I. Pituitary gonadotropins // *Endocrinology*. 2011b. Vol. 15. P. 281–290.
214. März M., Chapouton P., Diotel N., Vaillant C., Hesl 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.
215. März M., Schmidt R., Rastegar S., Strähle U. Regenerative response following stab injury in the adult zebrafish telencephalon // *Developmental Dynamics*. 2011. Vol. 240. P. 2221–2231.
216. Matsumura S., Hayden T.J. When should signals of submission be given? A game theory model // *Journal of Theoretical Biology*. 2006. Vol. 240. P. 425–433.
217. Mattson M.P., Maudsley S., Martin B. A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: Insulin/IGF-1, BDNF and serotonin // *Ageing Research Reviews*. 2004. Vol. 3. P. 445–464.
218. McEntee W.J., Crook T.H. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain // *Psychopharmacology*. 1993. Vol. 111. P. 391–399.
219. McLeod C.J., Wang L., Wong C., Jones D.L. Stem cell dynamics in response to nutrient availability // *Current Biology*. 2010. Vol. 20. P. 2100–2105.

220. Medina I., Filippova N., Barbin G., Ben-Ari Y., Bregestovski P. Kainate-induced inactivation of NMDA currents via an elevation of intracellular Ca^{2+} in hippocampal neurons // *Journal of Neurophysiology*. 1994. Vol. 72. P. 456–465.
221. Meek J. Why run parallel fibers parallel. Teleostean Purkinje cells as possible coincidence detectors, in a timing device subserving spatial coding of temporal differences // *Neuroscience*. 1992b. Vol. 48. P. 249–28
222. Meek J., Nieuwenhuys R. Palisade pattern of mormyrid Purkinje cells: a correlated light and electron microscopic study // *Journal of Comparative Neurology*. 1991. Vol. 306. P.156–192.
223. Menet V., Prieto M., Privat A., Gimenez y Ribotta M. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin gene // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2003. Vol. 100. P. 8999–9004.
224. Mikula S., Trotts I., Stone J., Jones E.G. Internet-enabled high-resolution brain mapping and virtual microscopy // *NeuroImage*. 2007. Vol. 35. P. 9–15.
225. Ming G.L., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions // *Neuron*. 2011. Vol. 70. P. 687–702.
226. Mirzadeh Z., Merkle F.T., Soriano-Navarro M., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain // *Cell Stem Cell*. 2008. Vol. 3. P. 265–278.
227. Misson J.P., Edwards M.A., Yamamoto M., Caviness V.S. Mitotic cycling of radial glial cells of the fetal murine cerebral wall: a combined autoradiographic and immunohistochemical study // *Brain Research*. 1988. Vol. 46. P. 183–190.
228. Morale M.C., Serra P.A., L'episcopo F., Tirolo C., Caniglia S., Testa N., Gennuso F., Giaquinta G., Rocchitta G., Desole M.S., Miele E., Marchetti B. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration // *Neuroscience*. 2006. Vol. 138. P. 869–878.
229. Mostafa D.K., El Azhary N.M., Nasra R. A. The hydrogen sulfide releasing compounds ATB-346 and diallyl trisulfide attenuate streptozotocin-induced cognitive impairment, neuroinflammation, and oxidative stress in rats: involvement of asymmetric dimethylarginine // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2016. Vol. 94. P. 699–708.

230. Mueller T., Wullimann M.F. An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy // *Brain, Behavior and Evolution*. 2009. Vol. 74. P. 30–42.
231. Nagamoto-Combs K., McNeal D.W., Morecraft R.J., Combs S.K. Prolonged microgliosis in the rhesus monkey central nervous // *Journal Neurotrauma*. 2007. Vol. 11. P. 1719–1742.
232. Nakatomi H., Kuriu T., Okabe S., Yamamoto S., Hatano O., Kawahara N., Tamura A., Kirino T., Nakafuku M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors // *Cell*. 2002. Vol. 110. P. 429–441.
233. Nieuwenhuys R., Nicholson C. A survey of the general morphology, the fiber connections, and the possible functional significance of the gigantocerebellum of Mormyrid fishes // In: Llinas R, editor. *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*. Chicago: American Medical Association, 1969a. P. 107–134.
234. Nieuwenhuys R., Nicholson. Aspects of the histology of mormyrid fishes. In: Llinas R, editor. *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development* // Chicago: American Medical Association, 1969b. P. 135–169.
235. Nieuwenhuys R., Pouwels E., Smulders-Kersten E. The neuronal organization of cerebellar lobe C1 in the mormyrid fish *Gnathonemus petersii* (teleostei) // *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*. 1974. Vol. 144. P. 315–336.
236. Ninkovic J., Götz M. Fate specification in the adult brain-lessons for eliciting neurogenesis from glial cells // *BioEssays*. 2013. Vol. 3. P. 242–252.
237. Ninkovic J., Götz M. How to make neurons-thoughts on the molecular logic of neurogenesis in the central nervous system // *Cell and Tissue Research*. 2015. Vol. 359. P. 5–16.
238. Nishikawa S., Sasaki F. DNA localization in nuclear fragments of apoptotic ameloblasts using anti-DNA immunoelectron microscopy: programmed cell death of ameloblasts // *Histochemistry and Cell Biology*. 1995. Vol. 104. P. 151–159.
239. Nowakowski R.S., Lewin S.B., Miller M.W. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for a anatomically defined population // *Journal of Neurocytology*. 1989. Vol. 18. P. 311–318.
240. Ohira K., Furuta T., Hioki H., Nakamura K.C., Kuramoto E., Tanaka Y., Funatsu N., Shimizu K., Oishi T., Hayashi M., Miyakawa T., Kaneko T., Nakamura S. Ischemia-

- induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells // *Nature Neuroscience*. 2010. Vol. 13. P. 173–179.
241. Olivera-Pasilio V., Lasserre M., Castelló M.E. Cell proliferation, migration, and neurogenesis in the adult brain of the pulse type weakly electric fish, *Gymnotus omarorum* // *Frontiers in Neuroscience*. 2017. Vol. 11. Article number 437.
242. Oppenheim R.W. Cell death during development of the nervous system // *Annual Review of Neuroscience*, 1991. Vol. 14. P. 453–501.
243. Ormerod B.K., Lee T.T., Galea L.A. Estradiol initially enhances but subsequently suppresses (via adrenal steroids) granule cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats // *Journal of Neurobiology*. 2003. Vol. 55. P. 247–260.
244. Ottersen O.P., Zhang N., Walberg F. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum // *Neuroscience*. 1992. Vol. 46. P. 519–534.
245. Overstreet L.S., Hentges S.T., Bumashny V.R., deSouza F.S.J., Smart J.L., Satangelo A.M., Low M.J., Westbrook G.L., Rubinstein M. A transgenic marker for newly born granule cells in dentate gyrus // *Journal of Neuroscience*. 2004. Vol. 24. P. 3251–3259.
246. Palmer T.D., Takahashi J., Gage F.H. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells // *Molecular and Cellular Neuroscience*. 1997. Vol. 8. P. 389–404.
247. Paneda C., Arroba A.I., Frago L.M., Holm A.M., Rmer J., Argente J., Chowen J.A. Growth hormone-releasing peptide-6 inhibits cerebellar cell death in aged rats // *Neuroreport*. 2003. Vol. 14. P. 1633–1635.
248. Paolone N., Manohar S., Hayes S.H., Wong K.M., Salvi R.J., Baizer J.S. Dissociation of doublecortin expression and neurogenesis in unipolar brush cells in the vestibulocerebellum and dorsal cochlear nucleus of the adult rat // *Neuroscience*. 2014. Vol. 265. P. 323–331.
249. Paredes M.F., James D., Gil-Perotin S., Kim H., Cotter J.A., Ng C., Sandoval K., Rowitch D.H., Xu D., McQuillen P.S., Garcia-Verdugo J.M., Huang E.J., Alvarez-Buylla A. Extensive migration of young neurons into the infant human frontal lobe // *Science*. 2016. Vol. 354, № 6308. Article number aaf7073.
250. Patzke N., Spocter M.A., Karlsson K.A., Bertelsen M.F., Haagensen M., Chawana R., Streicher S., Kaswera C., Gilissen E., Alagaili A.N., Mohammed O.B., Reep R.L., Bennett N.C., Siegel J.M., Ihunwo A.O., Manger P.R. In contrast to many other mammals,

- cetaceans have relatively small hippocampi that appear to lack adult neurogenesis // *Brain Structure and Function*. 2015. Vol. 220. P. 361–383.
251. Pekcec A., Baumgartner W., Bankstahl J.P., Stein V.M., Potschka H. Effect of aging on neurogenesis in the canine brain // *Aging Cell*. 2008. Vol. 7. P. 368–374.
252. Pekny M., Wilhelmsson U., Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis // *Neuroscience Letters*. 2014. Vol. 56. P. 30–38.
253. Petreanu L., Alvarez-Buylla A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction // *Journal of Neuroscience*. 2002. Vol. 2. P. 6106–6113.
254. Platel J.C., Dave K.A., Gordon V., Lacar B., Rubio M.E., Bordey A. NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network // *Neuron*. 2010. Vol. 65. P. 859–872.
255. Pouwels E. On the development of the cerebellum of the trout *Salmo gairdneri*. III. Development of neuronal elements // *Anatomy and Embryology*. 1978b. Vol. 153. P. 37–54.
256. Pouwels E. On the development of the cerebellum of the trout *Salmo gairdneri*. IV. Development of the pattern of connectivity // *Anatomy and Embryology*. 1978c. Vol. 153. P. 55–65.
257. Pouwels E. On the development of the cerebellum of the trout *Salmo gairdneri*. V. Neuroglial cells and their development // *Anatomy and Embryology*. 1978d. Vol. 153. P. 67–83.
258. Pouwels E. On the development of the cerebellum of the trout *Salmo gairdneri*. II. Early Development // *Anatomy and Embryology*. 1978a. Vol. 152. P. 309–324.
259. Pravosudov V.V., Omanska A. Dominance-related changes in spatial memory are associated with changes in hippocampal cell proliferation rates in mountain chickadees // *Journal of Neurobiology*. 2005. Vol. 6. P. 31–41.
260. Puschina E.V., Obukhov D.K., Varaksin A.A. Features of adult neurogenesis and neurochemical signaling in the Cherry salmon *Oncorhynchus masou* brain // *Neural Regeneration Research*. 2013. Vol. 8. P. 13–23.
261. Pushchina E.V., Shukla S., Varaksin A.A., Obukhov D.K. Cell proliferation and apoptosis in optic nerve and brain integration centers of adult trout *Oncorhynchus mykiss* after optic nerve injury // *Neural Regeneration Research*. 2016. Vol. 11. P. 578–590.

262. Pushchina E.V., Stukaneva M.E., Varaksin A.A. Neural stem cells in the cerebellum of masu salmon *Oncorhynchus masou* juvenile after mechanical injury // In: Teleosts: Physiology, Evolution and Classification (Herleif M, ed) New York: Science Publishers, Inc., 2018. P. 73–95.
263. Pushchina E.V., Varaksin A.A., Stukaneva M.E., Zharikova E.I. Adult and reparative neurogenesis in fish brain // In: Peripheral Nerve Regeneration – From Surgery to New Therapeutic Approaches Including Biomaterials and Cell-based Therapies Development (Mauricio AC, ed). Rijeka: Intech., 2017b. P. 175–195.
264. Pushchina E.V., Zharikova E.I., Varaksin A.A. Persistent and reparative neurogenesis in the juvenile masu salmon *Oncorhynchus masou* telencephalon after mechanical injury // Russian Journal of Developmental Biology. 2017a. Vol. 48. P. 307–320.
265. Pushchina Ye.V., Obukhov D.K., Varaksin A.A. Neurochemical markers of cells of the periventricular brain area in the masu salmon *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) // Russian Journal of Developmental Biology. 2012. Vol. 43. P. 39–53.
266. Rafalski V.A., Brunet A. Energy metabolism in adult neural stem cell fate // Progress in Neurobiology. 2011. Vol. 93. P. 182–203.
267. Raivich G., Bohatschek M., Kloss C.U., Werner A., Jones L.L., Kreutzberg G.W. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: Graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function // Brain Research Reviews. 1999. Vol. 30. P. 77–105.
268. Rajendran R.S., Zupanc M.M., Lösche A. Numerical chromosome variation and mitotic segregation defects in the adult brain of teleost fish // Developmental Neurobiology. 2007. Vol. 67. P. 1334–1347.
269. Ramón y Cajal S. Degeneration and Regeneration of the Nervous System // Oxford University Press, Oxford, 1928. 976. p.
270. Ransohoff R.M., Brown M.A. Innate immunity in the central nervous system // Journal of Clinical Investigation. 2012. Vol. 122. P. 1164–1171.
271. Ransom B.R., Ransom C.B. Astrocytes: Multitalented stars of the central nervous system // Methods in Molecular Biology. 2012. Vol. 81. P. 3–7.
272. Rao M.S., Hattiangady B., Abdel-Rahman A., Stanley D.P., Shetty A.K. Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation // Journal of Neuroscience. 2005. Vol. 2. P.

- 464–476.
273. Rao M.S., Hattiangady B., Shetty A.K. The window and mechanisms of major age-related decline in the production of new neurons within the dentate gyrus of the hippocampus // *Aging Cell*. 2006. Vol. P. 545–558.
274. Rao T.S., Asha M.R., Ramesh B.N., Rao K.S. Understanding nutrition, depression and mental illnesses. *Indian // Journal of Psychiatry*. 2008. Vol. 50. P. 77–82.
275. Rasmussen S., Imitola J., Ayuso-Sacido A., Wang Y., Starossom S.C., Kivisäkk P., Zhu B., Meyer M., Bronson R.T., Garcia-Verdugo J.M., Khoury S.J. Reversible neural stem cell niche dysfunction in a model of multiple sclerosis // *Annals of Neurology*. 2011. Vol. 6. P. 878–891.
276. Raucci F., Di Fiore M.M., Pinelli C., D'Aniello B., Luongo L., Polese G., Rastogi R.K. Proliferative activity in the frog brain: a PCNA-immunohistochemistry analysis // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2006. Vol. 32. P. 127–142.
277. Raymond P.A., Linda K Barthel L.K., Rebecca L Bernardos R.L., Perkowski J.J. Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish // *BMC Developmental Biology*. 2006. Vol. 6. Article number 36.
278. Rehen S.K., McConnell M.J., Kaushal D., Kingsbury M.A., Yang A.H., Chun J. Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2001. Vol. 98. P. 13361–13366.
279. Reimer M.M., Kuscha V., Wyatt C., Sorensen I., Frank R.E., Knuwer M., Becker T. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging // *Cell Stem Cell*. 2010. Vol. 6. P. 445–456.
280. Revett T.J., Baker G.B., Jhamandas J.M.D., Satyabrata K. Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology // *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2013 Vol. 38. P. 6–23.
281. Ridet J.L., Malhotra S.K., Privat A., Gage F.H. Reactive astrocytes: Cellular and molecular cues to biological function // *Trends in Neurosciences*. 1997. Vol. 20. P. 570–577.
282. Rizzi S., Bianchi P., Guidi S., Ciani E, Bartesaghi R. Neonatal isolation impairs neurogenesis in the dentate gyrus of the guinea pig // *Hippocampus*. 2007. Vol. 1. P. 78–91.
283. Robel S., Berninger B., Götz M. The stem cell potential of glia: lessons from reactive

- gliosis // *Nature Reviews Neuroscience*. 2011. Vol. 1. P. 88–104.
284. Rothenaigner I., Krecsmarik M., Hayes J.A., Bahn B., Lepier A., Fortin G., Gotz M., Jagasia R., Bally-Cuif L. Clonal analysis by distinct viral vectors identifies bona fide neural stem cells in the adult zebrafish telencephalon and characterizes their division properties and fate // *Development*. 2011. Vol. 138. P. 1459–1469.
285. Ruben R.J. Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses // *Acta Otolaryngologica*. 1967. Vol. 220. P. 1–44.
286. Sabelström H., Stenudd M., Reu P., Dias D.O., Elfineh M., Zdunek S., Damberg P., Göritz C., Frisen J. Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice // *Science*. 2013. Vol. 34. P. 637–640.
287. Sairanen M., Lucas G., Emfors P., Castren M., Castren E. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus // *Journal of Neuroscience*. 2005. Vol. 25. P. 1089–1094.
288. Sánchez-Farías N., Candal E. Identification of radial glia progenitors in the developing and adult retina of sharks // *Frontiers in Neuroanatomy*. 2016. Vol. 10. Article number 65.
289. Sarnat H.B., Nochlin D., Born D.E. Neuronal nuclear antigen (NeuN): A marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system // *Brain Development*. 1998. Vol. 20. P. 88–94.
290. Sato Y., Ito T.A., Nozawa M., Kanisawa. Bromodeoxyuridine and iododeoxyuridine double immunostaining for epoxy resin sections // *Biotechnic and Histochemistry*. 1995. Vol. 70. P. 169–174.
291. 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.
292. Schart M. Beyond the zebrafish: diverse fish species for modeling human disease // *Disease Models and Mechanisms*. 2014. Vol. 7. P. 181–192.
293. Schmidt R., Strähle U., Scholpp S. Neurogenesis in zebrafish – from embryo to adult // *Neural Development*. 2013. Vol. 8. Article number 3.
294. Schmidt-Hieber C., Jonas P., Bischofberger. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus // *Nature*. 2004. Vol. 429. P. 184–187.

295. Sekerkovra G., Ilijic E., Mugnaini E. Bromodeoxyuridine administered during neurogenesis of the projection neurons causes cerebellar defects in rat // *Journal of Comparative Neurology*. 2004. Vol. 470. P. 221–239.
296. Seki H., Takeda S., Kinoshita K. Long-term treatment with nicardipine for severe pre-eclampsia // *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2002. Vol. 76. P. 135–141.
297. Selden J.R., Dolbeare F., Clair J.H., Nichols W.W., Miller J.E., Kleemeyer K.M., Hyland R.J., DeLuca J.G. Statistical confirmation that immunofluorescent detection of DNA repair in human fibroblasts by measurement of bromodeoxyuridine incorporation is stoichiometric and sensitive // *Cytometry*. 1993. Vol. 14. P. 154–167.
298. Seki T., Sawamoto K., Parent J.M., Alvarez-Buylla A. *Neurogenesis in the Adult Brain I* // *Neurobiology*, Springer. 2011.
299. Seri B., García-Verdugo J.M., McEwen B.S. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus // *Journal of Neuroscience*. 2001. Vol. 21. P. 7153–7160.
300. Shao J., Chen D., Ye Q., Cui J., Li Y., Li L. Tissue regeneration after injury in adult zebrafish: The regenerative potential of the caudal fin // *Developmental Dynamics*. 2011. Vol. 240. P. 1271–1277.
301. Shechter R., Schwartz M. Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer if but how // *Journal of Pathology*. Vol. 22. P. 332–346.
302. Shihabuddin L.S., Horner P.J., Ray J., Gage F.H. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus // *Journal of Neuroscience*. 2000. Vol. 20. P. 8727–8735.
303. Shimada I.S., LeComte M.D., Granger J.C., Quinlan N.J., Spees J.L. Self-renewal and differentiation of reactive astrocyte-derived neural stem/progenitor cells isolated from the cortical peri-infarct area after stroke // *Journal of Neuroscience*. 2012. Vol. 23. P. 7926–7940.
304. Shimazaki T. Vertebrate neural stem cells: development, plasticity // *Keio Journal of Medicine*. 2016. Vol. 65. P. 1–15.
305. Shimon–Hophy M., Avtalion R.R. Humoral and cellular effects of stress—an extensive model system // *American Journal of Immunology*. 2017. Vol. 13. P. 131–143.
306. Simon C., Götz M., Dimou L. Progenitors in the adult cerebral cortex: cell cycle

- properties and regulation by physiological stimuli and injury // *Glia*. 2011. Vol. 5. P. 869–881.
307. Sinyakov M.S., Haimovich A., Avtalion R.R. Acute stress promotes post-injury brain regeneration in fish // *Brain Research*. 2017. Vol. 1676. P. 28–37.
308. Sîrbulescu R.F., Iliesă I., Vitalo A.G., Trull K., Zhu J., Traniello I.M., Zupanc G.K.H. Adult stem cells in the knifefish cerebellum // *Developmental Neurobiology*. 2015. Vol. 7. P. 39–65.
309. Sîrbulescu R.F., Iliesă I., Zupanc G.K.H. Quantitative analysis reveals dominance of gliogenesis over neurogenesis in an adult brainstem oscillator // *Developmental Neurobiology*. 2014. Vol. 7. P. 934–952.
310. Sirko S., Behrendt G., Johansson P.A., Tripathi P., Costa M., Bek S., Heinrich C., Tiedt S., Colak D., Dichgans M., Fischer I.R., Plesnila N., Staufenbiel M., Haass C., Snopyan M., Saghatelian A., Tsai L.H., Fischer A., Grobe K., Dimou L., Götz M. Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog // *Cell Stem Cell*. 2013. Vol. 1. P. 426–439.
311. Skaggs K., Goldman D., Parent J. M. Excitotoxic brain injury in adult zebrafish stimulates and long-distance neuronal integration glia // *Glia*. 2014. Vol. 62. P. 2061–2079.
312. Snyder J.S., Soumier A., Brewer M., Pickel J., Cameron H.A. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behavior // *Nature*. 2011. Vol. 47. P. 458–461.
313. Sofroniew M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation // *Trends in Neurosciences*. 2009. Vol. 3. P. 638–647.
314. Solis M.M. Adult neurogenesis in songbirds: a tale of two neurons // *Neuron*. 2000. Vol. 25. P. 256–257.
315. Song H., Kempermann G., Overstreet Wadiche L., Zhao C., Schinder A.F., Bischofberger J. New neurons in the adult mammalian brain: synaptogenesis and functional integration // *Journal of Neuroscience*. 2005. Vol. 25. P. 10366–10368.
316. Soriano E., Del Río J.A., Auladell C. Characterization of the phenotype and birthdates of pyknotic dead cells in the nervous system by a combination of DNA staining and immunohistochemistry for 5'-bromodeoxyuridine and neural antigens // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1993. Vol. 6. P. 819–827.

317. Spalding K.L., Bergmann O., Alkass K., Bernard S., Salehpour M., Huttner H.B., Boström E., Westerlund I., Vial C., Buchholz B.A., Possnert G., Mash D.C., Druid H., Frisén J. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans // *Cell*. 2013. Vol. 153. P. 1219–1227.
318. Spassky N., Merkle F.T., Flames N., Tramontin A.D., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis // *Journal of Neuroscience*. 2005. Vol. 25. P. 10–18.
319. Speder P., Liu J., Brand A.H. Nutrient control of neural stem cells // *Current Opinion in Cell Biology*. 2011. Vol. 23. P. 724–729.
320. Steiner B., Klempin F., Wang L., Kott M., Kettenmann H., Kempermann G. Type-2 cells as link between glial and neuronal line age in adult hippocampal neurogenesis // *Glia*. 2006. Vol. 54. P. 805–814.
321. Stocum D.L. *Regenerative biology and medicine* // Academic Press, Burlington, 2006. 431. p.
322. Streit W.J., Walter S.A., Pennell N.A. Reactive microgliosis // *Progress in Neurobiology*. 1999. Vol. 5. P. 563–581.
323. Stukaneva M.E., Pushchina E.V. Processes of proliferation and apoptosis in the cerebellum of the parr (*Oncorhynchus masou*) after mechanical injury // *Neurophysiology*. 2015. Vol. 47. P. 376–385.
324. Stukaneva M.E., Pushchina E.V., Varaksin A.A. GFAP and PCNA marking in the cerebellum of masu salmon's (*Oncorhynchus masou*) juvenile after mechanical injury // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2017. Vol. 48. P. 321–329.
325. Takeda A., Atobe Y., Kadota T., Goris R.C., Funakoshi K. Axonal regeneration through the fibrous scar in lesioned goldfish spinal cord // *Neuroscience*. 2015. Vol. 28. P. 134–152.
326. Tapscott S.J., Bennett G.S., Holtzer H. Neuronal precursor cells in the chick neural tube express neurofilament proteins // *Nature*. 1981. Vol. 292. P. 836–838.
327. Tatsumi K., Takebayashi H., Manabe T., Tanaka K. F., Makinodan M., Yamauchi T., Makinodan E., Matsuyoshi H., Okuda H., Ikenaka K., Wanaka A. Genetic fate mapping of Olig2 progenitors in the injured adult cerebral cortex reveals preferential differentiation into astrocytes // *Journal of Neuroscience Research*. 2008. Vol. 86. P. 3494–3502.
328. Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation // *Brain Research Reviews*. 2007. Vol. 53. P. 198–214.

329. Teague B., Asiedu S., Moore P.K. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility // *British Journal of Pharmacology*. 2002. Vol. 137. P. 139–145.
330. 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.
331. Thiele J., Winter Y. Hierarchical strategy for relocating food targets in flower bats: spatial memory versus cue-directed search // *Animal Behaviour*. 2005. Vol. 69. P. 315–327.
332. Thored P., Arvidsson A., Cacci E., Ahlenius H., Kallur T., Darsalia V., Ekdahl C.T., Kokaia Z., Lindvall O. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke // *Stem Cells*. 2006. Vol. 2. P. 739–747.
333. Thored P., Heldmann U., Gomes-Leal W., Gisler R., Darsalia V., Taneera J., Nygren J.M., Jacobsen S.E., Ekdahl C.T., Kokaia Z., Lindvall O. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke // *Glia*. 2009. Vol. 5. P. 835–849.
334. Tozzini 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.
335. Traniello I.M., Sîrbulescu R.F., Ilieş I., Zupanc G.K. Age-related changes in stem cell dynamics, neurogenesis, apoptosis, and gliosis in the adult brain: a novel teleost fish model of negligible senescence // *Developmental Neurobiology*. 2014. Vol. 74. P. 514–530.
336. Turrero García M., Harwell C.C. Radial glia in the ventral telencephalon // *FEBS Letters*. 2017. Vol. 591. P. 3942–3959
337. Ugrumov M.V. Developing brain as an endocrine organ: a paradoxical reality // *Neurochemical Research*, 2010. Vol. 35. P. 837–850.
338. Unal-Cevik I., Kilinc M., Gursoy-Ozdemir Y., Gurer G., Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal loss: A cautionary note // *Brain Research*. 2004. Vol. 1015. P. 169–174.
339. Vaccarino F.M., Ganat Y., Zhang Y., Zheng W. Stem cells in neurodevelopment and plasticity // *Neuropsychopharmacology*. 2001. Vol. 25. P. 805–831.
340. Van Praag H., Kempermann G., Gage F.H. Neural consequences of environmental enrichment // *Nature Reviews in the Neuroscience*. 2000. Vol. 3. P. 191–198.

341. Van Praag H., Schnider A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D., Gage F.H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus // *Nature*. 2002. Vol. 415. P. 1030–1034.
342. Vela-Hernández J.M., Dalmau I., González B., Castellano B. Abnormal expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the spinal cord of the hypomyelinated Jimmy mutant mice // *Brain Research*. 1997. Vol. 747. P. 130–139.
343. Vitalo A.G., Sîrbulescu R.F., Ilies I., Zupanc G.K.H. Absence of gliosis in a teleost model of spinal cord regeneration // *Journal of Comparative Physiology*. 2016. Vol. 20. P. 445–456.
344. Volkmann K., Rieger S., Babaryka A., Köster R.W. The zebrafish cerebellar rhombic lip is spatially patterned in producing granule cell populations of different functional compartments // *Developmental Biology*. 2008. Vol. 313. P. 167–180.
345. Vuaden F.C., Savio L.E., Piato A.L., Pereira T.C., Vianna M.R., Bogo M.R., Bonan C.D., Wyse A.T. (Long-term methionine exposure induces memory impairment on inhibitory avoidance task and alters acetylcholinesterase activity and expression in zebrafish (*Danio rerio*) // *Neurochemical Research*. 2012. Vol. 37. P. 1545–1553.
346. Vuaden F.C., Savio L.E.B., Rico E.P., Mussulini B.H.M., Rosemberg D.B., de Oliveira D.L., Bogo M.R., Bonan C.D., Wyse A.T.S. Methionine exposure alters glutamate uptake and adenine nucleotide hydrolysis in the zebrafish brain *mol neurobiol* // *Molecular Neurobiology*. 2016. Vol. 5. P. 200–209.
347. Walford R.L., Liu R.K. Husbandry, life span, and growth rate of the annual fish, *Cynolebias adolffi* E. Ahl. // *Experimental Gerontology*. 1965. Vol. P. 161–171.
348. Walton R. M., Parmentier T., Wolfe J. H. Postnatal neural precursor cell regions in the rostral subventricular zone, hippocampal subgranular zone and cerebellum of the dog (*Canis lupus familiaris*) // *Neuron*. 2013. Vol. 80. P. 1167–1174.
349. Wang J.M., Johnston P.B., Ball B.G., Brinton R.D. The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression // *Journal of Neuroscience*. 2005. Vol. 25. P. 4706–4718.
350. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed // *Physiological Reviews*. 2012. Vol. 92. P. 791–896.
351. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter // *FASEB Journal*. 2002. Vol. 16. P. 1792–1798.

352. Wanner I.B., Anderson M.A., Song B., Levine J., Fernandez A., Gray-Thompson Z., Ao Y., Sofroniew M.V. Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury // *Journal of Neuroscience*. 2013. Vol. 33. P. 12870–12886.
353. 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 // *Journal of Cell Science*. 1990. Vol. 96. P. 121–129.
354. Wenk H.N., Brederson J.D., Honda C.N. Morphine directly inhibits nociceptors in inflamed skin // *Journal of Neurophysiology*. 2006. Vol. 95. P. 2083–2097.
355. Wilhelmsson U., Faiz M., de Pablo Y., Sjoqvist M., Andersson D., Widestrand A., Potokar M., Stenovec M., Smith P.L., Shinjyo N. Astrocytes negatively regulate neurogenesis through the Jagged1-mediated Notch pathway // *Stem Cells*. 2012. Vol. 30. P. 2320–2329.
356. Wilhelmsson U., Li L., Pekna M., Berthold C.H., Blom S., Eliasson C., Renner O., Bushong E., Ellisman M., Morgan T.E. Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration // *Journal of Neuroscience*. 2004. Vol. 24. P. 5016–5021.
357. Wojtera M., Sikorska B., Sobow T., Liberski P.P. Microglial cells in neurodegenerative disorders // *Folia Neuropathologica*. 2005. Vol. 43. P. 311–321.
358. Wu B., Zhang G., Shuang S., Choi M.M. Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane // *Talanta*. 2004. Vol. 64. P. 546–553.
359. Wullimann M.F. The central nervous system // *The Physiology of Fishes*. Boca Raton: CRC Press, 1997. P. 245–282.
360. Wyllie A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation // *Nature*. 1980. Vol. 284. P. 555–556.
361. Yang Y., Geldmacher D.S., Herrup K. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease // *Journal of Neuroscience*. 2001. Vol. 21. P. 2661–2668.
362. Yap J.J., Takase L.F., Kochman L.J., Fornal C.A., Miczek K.A., Jacobs B.L. Repeated brief social defeat episodes in mice: effects on cell proliferation in the dentate gyrus // *Behavioural Brain Research*. 2006. Vol. 17. P. 344–350.

363. Yoshimura S., Takagi Y., Harada J., Teramoto T., Thomas S.S., Wasber C., Bakowska J.C., Breakefield X.O., Moskovitz M.A. FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001. Vol. 98. P. 5874–5879.
364. Yu L., Tucci V., Kishi S., Zhdanova I.V. Cognitive aging in zebrafish // *PLoS One*. 2006. Vol. 1. e14.
365. Yu X., Zecevic N. Dorsal radial glial cells have the potential to generate cortical interneurons in human but not in mouse brain // *Journal of Neuroscience*. 2011. Vol. 31. P. 2413–2420.
366. Zainuddin M.S., Thuret S. Nutrition, adult hippocampal neurogenesis and mental health // *British Medical Bulletin*. 2012. Vol. 10. P. 89–114.
367. Zamanian J.L., Xu L., Foo L.C., Nouri N., Zhou L., Giffard R.G., Barres B.A. Genomic analysis of reactive astrogliosis // *Journal of Neuroscience*. 2012. Vol. 3. P. 6391–6410.
368. Zhang J., Giesert F., Kloos K., Vogt Weisenhorn D.M., Aigner L., Wurst W., Couillard-Despres S. A powerful transgenic tool for fate mapping and functional analysis of newly generated neurons // *BMC Neuroscience*. 2010. Vol. 11. Article number 158.
369. Zhu N., Jacobs D.R., Meyer K.A., He K., Launer L., Reis J.P., Yaffe K., Sidney S., Whitmer R.A., Steffen L.M. Cognitive function in a middle aged cohort is related to higher quality dietary pattern 5 and 25 years earlier: The CARDIA study // *Journal of Nutrition Health and Aging*. 2015. Vol. 1. P. 33–38.
370. Zupanc G.K. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain // *Journal of Comparative Physiology*. 2006. Vol. 192. P. 649–670.
371. Zupanc G.K., Sîrbulescu R.F. Teleost fish as a model system to study successful regeneration of the central nervous system // *Current Topics in Microbiology*. 2013. Vol. 367. P. 193–223.
372. Zupanc G.K., Wellbrock U.M., Sîrbulescu R.F., Rajendran R.S. Generation, long-term persistence, and neuronal differentiation of cells with nuclear aberrations in the adult zebrafish brain // *Neuroscience*. 2009. Vol. 159. P. 1338–1348.
373. Zupanc G.K., Zupanc M.M. Proteomic analysis of CNS injury and recovery // *Advances in Neurobiology*. 2011. Vol. 2. P. 511–536.
374. Zupanc G.K. Adult Neurogenesis in Teleost Fish // 2012. P. 136–167.

375. Zupanc G.K. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain // *Journal of Comparative Physiology*. 2006. Vol. 192. P. 649–670.
376. Zupanc G.K., Clint S.C., Takimoto N., Hughes A.T., Wellbrock U.M., Meissner D. Spatiotemporal distribution of microglia/macrophages during regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus*: a quantitative analysis // *Brain, Behavior and Evolution*. 2003. Vol. 62. P. 31–42.
377. Zupanc G.K., Kompass K.S., Horschke I., Ott R., Schwarz H. Apoptosis after injuries in the cerebellum of adult teleost fish // *Experimental Neurology*. 1998. Vol. 152. P. 221–230.
378. Zupanc G.K., Ott R. Cell proliferation after lesions in the cerebellum of adult teleost fish: time course, origin, and type of new cells produced // *Experimental Neurology*. 1999. Vol. 160. P.78–87.
379. Zupanc G.K., Sîrbulescu R.F. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish // *European Journal of Neuroscience*. 2011. Vol. 3. P. 917–929.
380. Zupanc G.K., Zupanc M.M. New neurons for the injured brain: mechanisms of neuronal regeneration in adult teleost fish // *Regenerative Medicine*. 2006. Vol. 1. P. 207–216.
381. Zupanc G.K., Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish // *Brain, Behavior and Evolution*. 2001. Vol. 58. P. 250–275.
382. Zupanc G.K., Horschke I. Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: A quantitative mapping study // *Journal of Comparative Neurology*. 1995. Vol. 35. P. 213–233.
383. Zupanc G.K., Kompass K.S., Horschke I., Ott R., Schwarz H. Apoptosis after injuries in the cerebellum of adult teleost fish // *Experimental Neurology*. 1998. Vol. 15. P. 221–230.
384. Zupanc M.M, Wellbrock U.M., Zupanc G.K. Proteome analysis identifies novel protein candidates involved in regeneration of the cerebellum of teleost fish // *Proteomics*. 2006. Vol. 6. P. 677–696.
385. Zupanc M.M., Horschke I., Ott R., Rascher G.B. Postembryonic development of the cerebellum in gymnotiform fish // *Journal of Comparative Neurology*. 1996. Vol. 370. P. 443–464.
386. Zupanc G.K. Neurogenesis, cell death and regeneration in the adult gymnotiform brain // *Journal of Experimental Biology*. 1999. Vol. 202. P. 1435–1446.