

На правах рукописи

ЖАРИКОВА
ЕВА ИГОРЕВНА

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

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2024

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор РАН **Пуцина Евгения Владиславовна**

Официальные оппоненты:

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

Калиниченко Сергей Георгиевич, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

Защита диссертации состоится 27 сентября 2023 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета 24.1.191.01 (Д 005.008.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

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

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/soviet-d-005-008-01/66-zharikova-eva-igorevna>

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

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Ващенко

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

Нейрогенез у взрослых животных определяется как процесс, направленный на развитие, который начинается с деления нейральных стволовых клеток/предшественников взрослого типа (вНСКП), которые генерируют дочерние клетки, предназначенные для нейрональной специализации. Основное различие между конститутивным нейрогенезом взрослых позвоночных и регенеративным нейрогенезом, который происходит после повреждения ЦНС, заключается в том, что последний в значительной степени зависит от активации покоящихся в обычном состоянии вНСКП для повторного включения в клеточный цикл. Один из базовых вопросов заключается в том, какой набор факторов в условиях гомеостаза, и после травмы отвечает за контроль активности вНСКП.

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

Список использованных сокращений: BrdU – 2'-дезоксидезоксибромдезоксиуридин; CBS – цистатионин-β-синтаза; GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок; HuCD – нейрональный протеин; PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток; Vim – виментин; ВВ – вентральная зона вентральной области; ВД – дорсальная зона вентральной области; ВЛ – латеральная зона вентральной области; вНСК – взрослые нейральные стволовые клетки; вНСКП – взрослые нейрональные стволовые клетки-предшественники; ГС – глутамин синтаза; ДД – дорсальная зона дорсальной области; ДК – даблкортин; ДЛ – латеральная зона дорсальной области; ДМ – медиальная зона дорсальной области; ИГХ – иммуногистохимия; НКП – нейрональные клетки-предшественники; НМДА – ионотропный рецептор глутамата; НСК – нейрональные стволовые клетки; НЭ – нейроэпителлий; ПВЗ – перивентрикулярная зона; РГ – радиальная глия; РНН – реактивная нейрогенная ниша; СВЗ – субвентрикулярная зона; ТФ – транскрипционный фактор; ЦНС – центральная нервная система; ЧМТ – черепно-мозговая травма

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

Степень разработанности темы исследования. Нейрогенез взрослых животных рассматривается как гомеостатический механизм, сопровождающий непрерывный рост костистых рыб. В качестве альтернативной, но не исключающей гипотезы, мы полагаем, что нейрогенез у взрослых может обеспечивать форму пластичности, необходимую для адаптации мозга к условиям окружающей среды.

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

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

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

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

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

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

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

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

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

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

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

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

Теоретическое и практическое значение работы. Получены новые данные о структурно-функциональных характеристиках популяций клеток перивентрикулярной и субвентрикулярных областей на ювенильных стадиях постэмбрионального онтогенеза и в условиях острого травматического повреждения. Полученные в ходе экспериментального исследования результаты расширяют имеющиеся представления о пролиферации, нейрональной дифференцировке, а также ненейрональной специализации клеток в условиях ювенильного онтогенеза молоди лососевых рыб. Получены новые данные о высокой

продукции ДК+ нейробластов у молоди лососей в условиях конститутивного и репаративного гомеостаза. Данные о пролиферативной динамике клеток перивентрикулярной зоны в совокупности с результатами иммуномаркирования клеток ненейрональной популяции (виментин, GFAP, ГС) позволяют заключить, что на территории пролиферативных зон паллиума и субпаллиума расположены ВНСКП.

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

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

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

Для экспериментального моделирования нейротравмы колотое повреждение конечного мозга было проведено на годовалой молоди кеты или симы. Использование близкородственных видов тихоокеанских лососей обусловлено необходимостью проведения сравнительных исследований, так и особенностями получения материала. Всего было использовано 60 особей молоди симы *Oncorhynchus masou* и 30 особей молоди кеты *Oncorhynchus keta*.

Положения, выносимые на защиту

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

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

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

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечена использованием современных иммуногистохимических методов и статистической обработкой данных, которые соответствуют целям и задачам. Использование одних и тех же алгоритмов для описания каждого процесса, анализ данных с помощью программного обеспечения, а также воспроизводимость результатов при повторных экспериментах подтверждают это. Результаты исследований, научные положения и выводы подкреплены данными, приведенными на рисунках и в таблицах.

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

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

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

Благодарности. Выражаю огромную благодарность уважаемой профессору РАН, д.б.н., научному руководителю лаборатории клеточной дифференциации ННЦМБ ДВО РАН Евгении Владиславовне Пущиной за ее бесценную помощь, высококвалифицированное руководство и постоянную поддержку в течение всего периода работы в лаборатории. Хочу выразить признательность профессору, д.б.н. Анатолию Алексеевичу Вараксину за его важное участие в сборе материала, освоении новых методик и обсуждении результатов. Также выражаю особую благодарность к.б.н., ст.н.с. Игорю Викторовичу Манжуло за внимание к тексту рукописи, полезные рекомендации и справедливые замечания. Благодарность профессору, д.б.н. Дмитрию Константиновичу Обухову за продуктивное взаимодействие. Также хочу выразить искреннюю признательность коллективу лаборатории клеточной дифференциации ННЦМБ ДВО РАН за непрерывную помощь, активное

обсуждение результатов данной работы и ценные советы. Благодарю инженеров центра коллективного пользования ННЦМБ ДВО РАН, Дениса Владимировича Фомина и Кирилла Александровича Шефера, за их важный вклад в освоении новых методов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Объекты исследования. В работе было использовано 60 особей молоди симы *Oncorhynchus masou*, и 30 особей молоди кеты *Oncorhynchus keta* в возрасте 12–18 месяцев. Животные были получены с Рязановского экспериментального производственного рыбоводного завода в 2018, 2019 и 2020 годах. Животных содержали в аквариуме с аэрируемой пресной водой при температуре 16–17 °С, с одноразовым кормлением в течение суток. Соотношение освещенного и темного периодов в сутках составляло 14/10 ч. Содержание растворенного кислорода в воде составляло 7–10 мг/дм³, что соответствует нормальному насыщению.

Экспериментальное повреждение конечного мозга. Животных анестезировали в кювете с 0,1% раствором трикаин метансульфоната (MS222) (Sigma, St. Louis, MO, США, Cat. #WXBC9102V) в течение 10 мин. при комнатной температуре. Повреждение проводили согласно методике Кишимото с соавторами (Kishimoto et al., 2012). Тонкой стерильной иглой наносили механическое повреждение глубиной 1 мм в область дорсолатерального квадранта правой полусферы конечного мозга. После нанесения повреждения животных выпускали в аквариум с пресной водой для восстановления и дальнейшего мониторинга. В течение 1 ч после повреждающего воздействия проводили мониторинг изменений в двигательной и поведенческой активности у рыб в экспериментальной группе. Существенных изменений у животных с повреждением конечного мозга по сравнению с контрольной группой не обнаружено. В области повреждения отчетливо визуализировалась небольшая гематома размером 1–2 мм.

Методы исследования. Через 3 или 7 суток животные были выведены из эксперимента. Всех рыб глубоко анестезировали в 0,01% растворе трикаин метансульфоната (MS222) (Sigma, St. Louis, MO, США, Cat. #WXBC9102V) в течение 5 мин и подвергали эвтаназии методом быстрой декапитации. Для удаления крови животных перфузировали 4% раствором параформальдегида (PFA, BioChemica, Cambridge, MA, США; Cat. No A3813.1000), приготовленном на 0,1 М фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.2) (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, США; Catalog No 5564) для фиксации образца мозга. Перед началом иммуноокрашивания ткани конечного мозга рыб проводили блокирование активности эндогенной пероксидазы и неспецифического окрашивания (фона). Активность эндогенной пероксидазы блокировали инкубацией с 1%-ной перекисью водорода в течение 20 мин при комнатной температуре. Для устранения неспецифического окрашивания срезы мозга инкубировали с неиммунной сывороткой лошади.

Для исследования пролиферативной активности использовали иммунопероксидазное маркирование PCNA на замороженных свободно плавающих срезах конечного мозга. Срезы толщиной 50 мкм инкубировали с первичными моноклональными антителами мыши против PCNA (PC10; Novus Biologicals, США) в разведении 1:300, при температуре 4°C в течение 48 ч. Для выявления вновь образованных нейронов использовали моноклональные антитела против нейронального протеина HuCD (clone: AD2.38; Chemicon Billerica, MA, США) в

разведении 1:400 при аналогичных условиях. Оценка активности белков была проведена через 3 сут после нанесения травматического повреждения.

В работе были использованы моноклональные мышинные антитела к глиальному фибриллярному кислом белку (GFAP) (Abcam, Cambridge, Великобритания; GF5 Catalog No. ab10062) и виментину (Abcam, Cambridge, Великобритания; 3B4 Catalog No. ab28028), как маркеры астроцитарной глии. В качестве маркера нейрональной миграции использовали антитела к белку даблкортину (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, США CO613 Catalog No. sc-271390), ассоциированному с микротрубочками и экспрессирующемуся незрелыми нейронами. Для исследования локализации транскрипционного фактора Pax2, цистатионин β -синтазы (CBS) и глутамин синтетазы (ГС) в конечном мозге молодки кеты использовали первичные поликлональные антитела кролика против Pax2 (Biolegend, San Diego, CA, США; Catalog No. 901001; 1:300), CBS (GeneTex, Irvine, CA, США; Catalog No. GTX124346; 1:300), и моноклональные антитела мыши против ГС (Abcam, Cambridge, Великобритания; Catalog No. ab64613; 1:300). Все антитела были специфичны для *D. rerio*. Оценка активности белков была проведена через 7 сут после нанесения травматического повреждения в область конечного мозга.

После инкубации, промывая 0,1М фосфатно-солевым буфером, замороженные срезы конечного мозга толщиной 50 мкм инкубировали с первичными антителами при температуре 4°C в течение 48 ч. Для визуализации иммуногистохимического (ИГХ) маркирования использовали стандартный ABC комплекс Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, США). Для выявления продуктов реакции использовали субстрат красного цвета (VIP Substrate Kit, Vector Labs, Burlingame, США). Препараты монтировали на предметные стёкла с полилизинным покрытием (BioVitrum, Россия, Санкт-Петербург). Далее для идентификации иммунонегативных клеток препараты докрашивали 0,1% раствором метилового зелёного (Bioenno, Lifescience, CA, США, Cat #003027). Препараты обезвоживали по стандартной методике и заключали под покровные стекла в среду Bio-optica (Италия).

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

Экспериментальное маркирование BrdU. Для оценки пролиферативной активности клеток с помощью маркирования BrdU в группах одновременно с нанесением механического повреждения конечного мозга животным вводили интраперитонеально инъекцию 10 мг/мл раствора BrdU (Sigma-Aldrich, США) в расчете 20 мкл/г массы тела. Животным из контрольной группы была введена только инъекция 10 мг/мл раствора BrdU. После извлечения мозг целиком заливали в парафин, после чего изготавливали серийные поперечные срезы мозга толщиной 7 мкм, которые монтировали на предметные стекла с полилизинным покрытием. Срезы депарафинированы по стандартному гистологическому протоколу. Далее были обработаны в соответствии с протоколом ИГХ маркирования BrdU (Dolbeare, 1995). Для раскручивания двуцепочечной структуры ДНК проводили кислотный гидролиз (www.thermofisher.com). Срезы мозга инкубировали в 1 М HCl в течение 10 мин на льду. Далее инкубировали в 1 М HCl в течение 10 мин при комнатной температуре, затем 20 мин при температуре 37°C. Сразу после инкубации с кислотами срезы были нейтрализованы

в 0,1 М боратном буфере в течение 10 мин при комнатной температуре и трижды промыты в фосфатном буфере PBS (pH 7,4).

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

Денситометрический анализ. Измерение оптической плотности (ОП) продуктов ИГХ маркирования и последующий морфометрический анализ параметров клеточных тел проводили с помощью программного обеспечения микроскопа Axiovert 200M. Для этого в нескольких местах на препарате измеряли ОП в иммуномаркированных структурах. Далее с помощью программы Wizard вели стандартную оценку оптической плотности для интенсивно и умеренно маркированных и иммунонегативных клеток. Из среднего значения оптической плотности фона вычитали усреднённое значение оптической плотности для каждого типа клеток, получая фактическое значение в относительных единицах оптической плотности (ЕОП).

Статистический анализ. Количественную оценку клеток проводили на отдельно взятое профильное поле при 10× увеличении объектива и 20× окуляра. Весь анализ данных проводили с использованием слепого теста, чтобы уменьшить погрешность экспериментатора. Подсчитывали абсолютное количество клеток каждого типа. Все количественные результаты в настоящем исследовании были представлены как $M \pm SD$ (среднее значение \pm стандартное отклонение среднего), и статистически значимые различия рассматривались при $P < 0,05$. Данные были проанализированы с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA). Сравнение между группами интактных животных и животных после травматического повреждения конечного мозга и другое сравнение между 4 группами проводили с помощью U-критерия Манна–Уитни, остальные данные анализировали с помощью теста Крускала–Уоллиса с последующей коррекцией Бонферрони.

Результаты и обсуждение

Локализация ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) и экспрессия BrdU в паллиуме молодежи симы. Иммунолокализация PCNA была выявлена в дорсальной, латеральной и медиальной зонах конечного мозга интактной молодежи симы *O. masou* (рис. 1а). Топография распределения PCNA+ клеток в каждой зоне имела черты сходства: в поверхностном и субвентрикулярном слоях, определялись одиночные или формирующие небольшие кластеры, пролиферирующие клетки. У контрольных животных отмечалась особенность в формировании выраженного поверхностного перивентрикулярного слоя, содержащего PCNA+ клетки, который распространяющегося на все зоны дорсальной области (рис. 1а). Другая особенность – наличие единичных PCNA+ клеток в глубоких паренхиматозных слоях, вне пределов поверхностной пролиферативной зоны (рис. 1а).

Проллиферативный потенциал клеток медиальной зоны значительно выше, чем в других зонах паллиума (рис. 1в). Наблюдаются паттерны клеточной миграции из поверхностных в более глубокие слои паллиума. Медиальная зона, по нашим данным, вносит наибольший вклад в персистентный морфогенез конечного мозга симы по сравнению с другими зонами.

Годовалая молодь симы находится в состоянии активного роста, процессы персистентного образования новых клеток, согласно нашим данным, интенсивны и встречаются как на территории пролиферативных зон мозга, так и вне их. Мы полагаем, что немаловажную роль могут играть и филогенетические факторы, свидетельствующие о принадлежности лососевых рыб к эволюционно древней группе телеостей, у которых процесс эверсии конечного мозга не завершен и сохранены черты эмбриональной структуры в ювенильном периоде онтогенеза (Wullmann, Muller, 2004). Подобное свойство, определяемое в литературе как фетализация, характерно для филогенетически древних групп позвоночных животных, мозг которых содержит большое количество морфогенетических зон, имеющих повышенный пролиферативный потенциал (Zupanc, Sirbulescu, 2013).

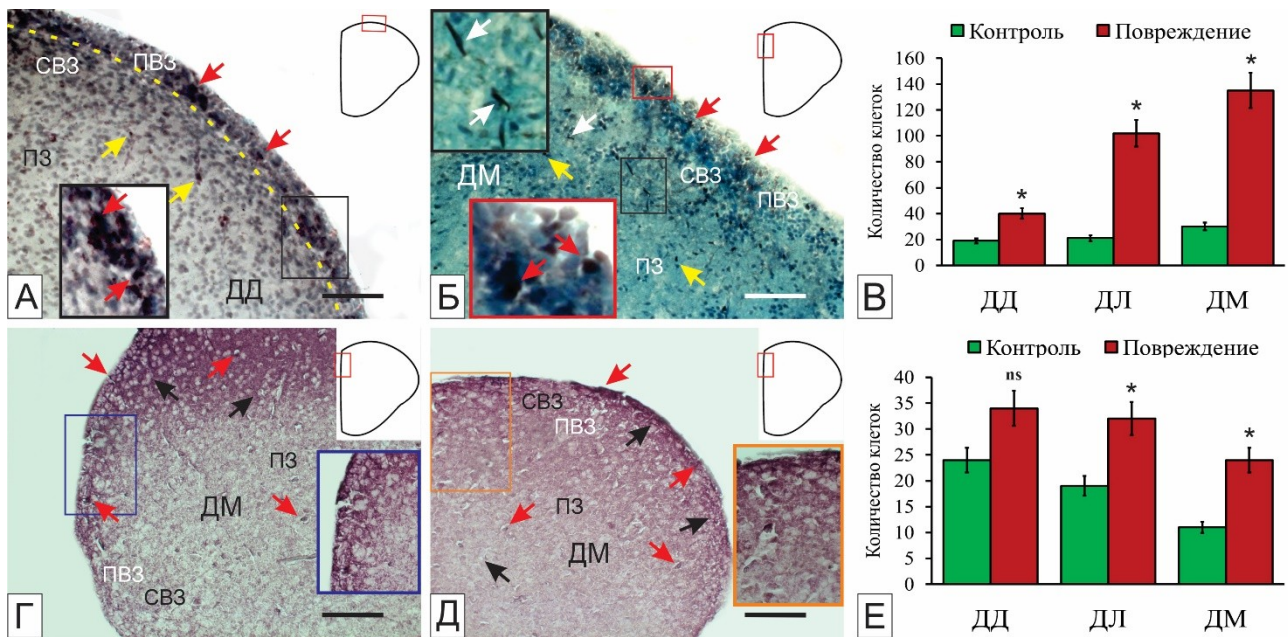


Рисунок 1 – Распределение ядерного антигена пролиферирующих клеток PCNA (а, б, в) и BrdU-иммунопозитивных клеток (г, д, е) (репрезентативное) в дорсальной области теленцефалона молодки симы *O. masou*. (а, г) – в норме; (б, д) – после механической травмы; (в, е) – соотношение иммунопозитивных клеток в контроле и после повреждения ($n = 5$; * $P < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

После повреждения конечного мозга мы наблюдали значительные изменения пролиферативной активности клеток как на территории пролиферативных зон, так и в паренхиме конечного мозга (рис. 1б). Наиболее выраженные изменения топографии пролиферирующих клеток были связаны с перестройкой структуры единого пролиферативного поверхностно расположенного перивентрикулярного пласта и формированием локальных зон индуцированного нейрогенеза. При этом перивентрикулярная пролиферативная зона, как правило, не верифицировалась (рис. 1б). Наблюдалось образование локальных скоплений клеток, PCNA+ элементы, а также обширные популяции мигрирующих клеток (рис. 1б). Подобные изменения возникали после травматического процесса, что позволяет нам относить их к разряду репаративных перестроек.

Другой особенностью посттравматического морфогенеза конечного мозга симы было формирование центров вторичного нейрогенеза на территории медиальной зоны (рис. 1б), обладающей повышенным пролиферативным потенциалом в норме (рис. 1в). После

повреждения в данной зоне были выявлены многочисленные PCNA– клетки, окруженные недифференцированными иммунонегативными клетками (рис. 1б). Плотность распределения в таких скоплениях значительно превышала таковую в прилежащих областях (рис. 1в), что позволяет рассматривать данные образования как единые функциональные комплексы с повышенной пролиферативной активностью. Согласно данным Савельева (2001), формирование центров вторичной пролиферации в мозге позвоночных возникает в тех случаях, когда клетки из первичной перивентрикулярной пролиферативной области, сохраняя повышенный пролиферативный потенциал, мигрируют в более глубокие слои мозга. Такие клетки продолжают пролиферировать и вне обычных условий клеточного микроокружения пролиферативной зоны, формируя центры вторичной пролиферации. При этом часть клеток продолжает пролиферировать, а часть выходит в дифференцировку. Такое скопление клеток вне матричной зоны обычно характеризуется повышенной плотностью распределения, гетерогенным клеточным составом и наличием клеток, находящихся на различной стадии дифференцировки. Именно такие клеточные скопления были нами обнаружены на территории медиальной зоны конечного мозга симы после повреждения.

BrdU представляет собой модифицированный нуклеозид, легко встраивающийся в структуру пролиферирующих клеток. В результате исследования в паллиуме интактной молодежи симы была выявлена гетерогенная популяция BrdU+ клеток и ядер (рис. 1г). Проведенные исследования позволили выявить иммунолокализацию BrdU в дорсальной области теленцефалона (рис. 1е). Среди BrdU-иммуномаркированных элементов, согласно классификации Траниелло (Traniello et al., 2014), были выделены интенсивно маркированные клетки и ядра (рис. 1г). Результаты иммуномаркирования BrdU согласуются с ранее полученными данными иммуномаркирования PCNA в паллиуме молодежи симы. Согласно данным литературы, PCNA маркирует дополнительную ДНК-полимеразу дельта, сохраняющуюся в клетке в течение 24 ч после окончания митоза (Wullimann, Puelles, 1999), однако уровень активности PCNA снижается на 30% (Bravo et al., 1987). Иммуномаркирование BrdU позволяет диагностировать клетки и ядра, находящиеся в S-фазе клеточного цикла, тогда как при маркировании PCNA можно визуализировать более обширную популяцию клеток, находящихся как в состоянии пролиферации, так и недавно вышедшие из клеточного цикла (Bravo et al., 1987). В ДЛ были обнаружены паттерны тангенциальной поверхностной миграции удлинённых BrdU+ клеток, а в ДМ зарегистрирована радиальная миграция BrdU+ клеток из ПВЗ в СВЗ. Как при маркировании PCNA, так и при введении BrdU у молодежи симы были выявлены иммунопозитивные клетки и ядра в составе СВЗ и ПЗ (рис. 1а, г). Однако если маркирование BrdU выявляло отдельные немногочисленные клетки в ПЗ и СВЗ, то при PCNA-иммуномаркировании паттерны клеток с пролиферативной активностью были более многочисленными.

Распределение нейронального маркера HuCD в паллиальной части теленцефалона симы. Наиболее доказанная роль HuCD показана в нейрогенезе, при котором эти протеины влияют на процессы нейрональной дифференцировки в конститутивном и репаративном нейрогенезе. Выживание вновь образованных нервных клонов необходимо для заживления тканей мозга (Rangan et al., 2020).

В дорсальной области интактного конечного мозга HuCD+ клетки были идентифицированы как в составе внешних пролиферативных зон конечного мозга, так в глубоких слоях (рис. 2а). Нейроно-специфичный протеин HuCD в паллиуме молодежи симы определяется в клетках, находящихся на различной стадии нейрональной дифференцировки;

на территории пролиферативных зон NuCD маркирует нейронально-детерминированные клетки-предшественники, в более глубоких слоях – дифференцированные нейроны различной степени зрелости (рис. 2а).

Через 3 сут после повреждения у симы в дорсальной зоне наблюдались как интенсивно, так и умеренно NuCD-иммунопозитивные клетки в глубоких слоях, что существенно отличалось от иммуномаркирования в контроле (рис. 2б). Снижение интенсивности иммуномаркирования NuCD в большинстве дефинитивных нейронов при сохранении интенсивного маркирования в 25% клеток, по нашему мнению, является проявлением адаптивной реакции на механическую травму конечного мозга. В пролиферативной области дорсальной зоны наблюдалось перераспределение NuCD+ клеток, образующих пласт у контрольных животных в виде нерегулярных скоплений с сохранением иммунонегативного поверхностного слоя.

В латеральной зоне соотношение интенсивно и умеренно маркированных NuCD дефинитивных нейронов составляло 1:2,5, что отличается от показателей в дорсальной зоне. После повреждающего воздействия пролиферативная зона претерпевала значительные изменения. Были обнаружены зоны индуцированного нейрогенеза, представляющие собой нейрогенные ниши раз личной морфологии и, возможно, этиологии (рис. 2б).

В медиальной зоне конечного мозга симы в результате травмы было обнаружено значительное увеличение количества интенсивно маркированных NuCD клеток (рис. 2в), расположенных на территории пролиферативной зоны и формирующих потоки мигрирующих клеток нейрональной специализации (рис. 2б). Подобная гиперпродукция нейронов в медиальной зоне после травмы в целом соответствует повышенному пролиферативному потенциалу данной зоны, установленному нами при маркировании PCNA (рис. 1в).

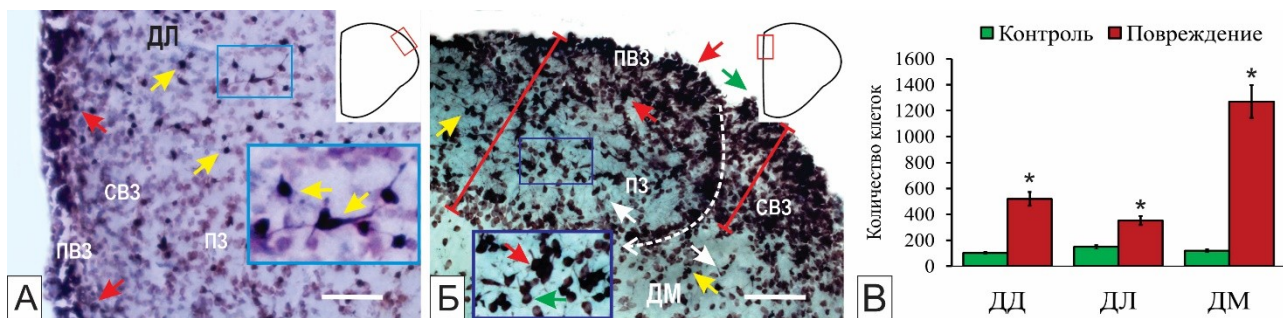


Рисунок 2 – Экспрессия нейронального протеина NuCD (репрезентативное представление) в дорсальной области молодёи симы *O. masou*: (а) – в норме, (б) – после механической травмы, (в) – соотношение иммунопозитивных клеток в контроле и после повреждения. ($n = 5$; * $P < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

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

В наших исследованиях в паллиальной области теленцефалона молодёи интактной симы были обнаружены отдельные интенсивно ДК+ клетки и ДК+ гранулы (рис. 3а, г).

Исследование локализации ДК в паллиуме симы показало низкую экспрессию белка в клетках первичных нейрогенных зон. По сравнению с другими белками промежуточных филаментов: виментином и GFAP, число ДК⁺ клеток снижено в ПВЗ паллиума, что, вероятно, свидетельствует о сравнительно невысоком содержании постмитотических нейробластов в ПВЗ. Тем не менее, в различных областях интактного паллиума выявлено различное содержание ДК⁺ гранул (рис. 3а, г). Мы предполагаем, что экспрессия ДК в виде гранул в паллиуме симы может быть необходима для обеспечения нейрональной пластичности взрослых нейронов.

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

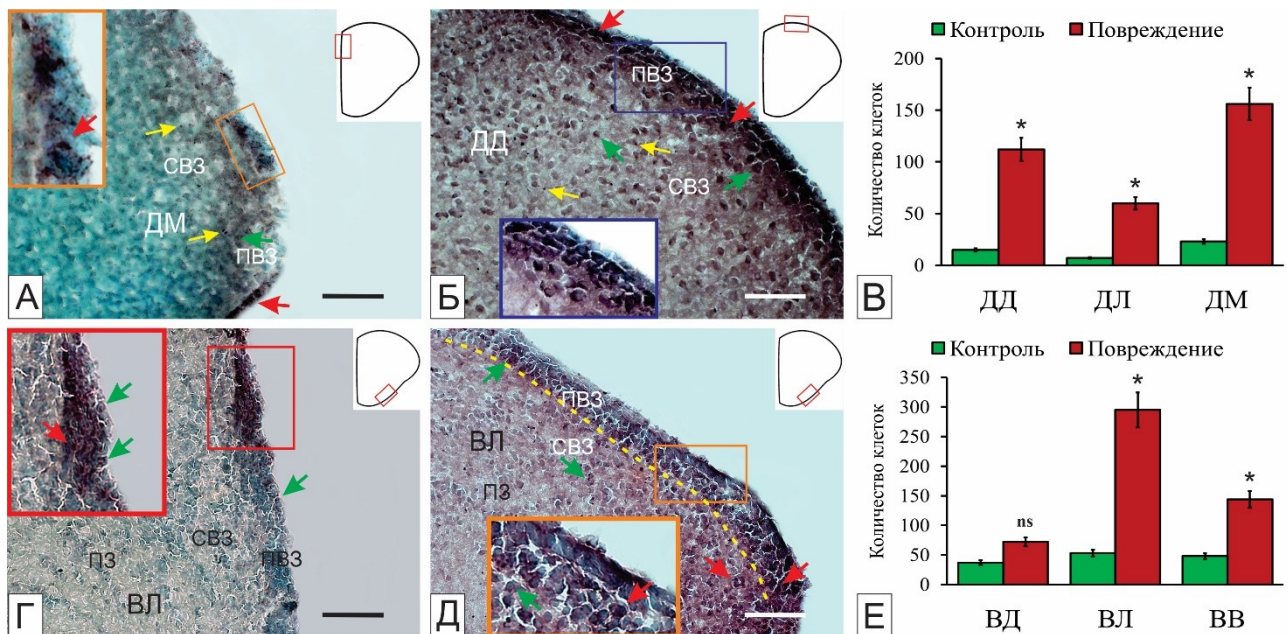


Рисунок 3 – Распределения даблкортина (репрезентативное) в паллиальной (а, б, в) и субпаллиальной (г, д, е) пролиферативных зонах теленцефалона молоди симы *O. masou*. (а, г) – в норме; (б, д) – после механической травмы; (в, е) – соотношение иммунопозитивных клеток в контроле и после повреждения ($n = 5$; $*P < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

В результате повреждения иммуномаркирование ДК претерпевало существенные изменения (рис. 3б, д, в, е). В настоящее время существуют немногочисленные работы, связанные с использованием ДК в качестве маркера репаративного нейрогенеза в мозге млекопитающих при травме ЦНС (Ayanlaja et al., 2017). В паллиальной части мозга симы, по сравнению с контролем, наблюдалось интенсивное ДК-маркирование клеток в перивентрикулярных отделах мозга (рис. 3а, б, г, д).

Характерной особенностью, которая выявляется при маркировании ДК после травмы, является выраженный паттерн миграции клеток из нейрогенной зоны паллиума вглубь

паренхимы мозга (рис. 3б). Это подтверждает одновременный процесс радиальной миграции вновь образованных, в результате травматического процесса, многочисленных нейробластов. Обширная популяция клеток паллиума симы, содержащих даблкортин после травмы включала умеренно ДК-маркированные нейробласты, содержащие цитоплазматические ДК+ включения, а также мелкие интенсивно ДК-маркированные элементы (рис. 3д).

Иммуногистохимическое маркирование GFAP в теленцефалоне молодежи симы.

Использование молекулярных маркеров, с помощью которых верифицируются НСК и нейрональные предшественники в мозге взрослых млекопитающих и других позвоночных, имеет некоторые противоречия. Так, GFAP и виментин рассматриваются в качестве универсальных маркеров астроцитарной глии в мозге позвоночных (Agochena et al., 2004). Тем не менее, типичные астроциты в мозге рыб не выявляются, в то время как верифицируется ограниченная популяция клеток, не имеющих отростков, либо имеющих слабовыраженные апикальные отростки (Kalman, 1998), а также выявляются широко распространённые клетки радиальной глии (Cuoghi, Mola, 2009). Согласно некоторым данным (Couillard-Despres et al., 2005), GFAP маркирует ограниченную популяцию НСК в мозге млекопитающих. В исследованиях теленцефалона интактной молодежи симы, клетки с таницитоподобной морфологией и/или типичные отростчатые астроциты на территории пролиферативных зон выявлены не были (рис. 4а, г). Однако были идентифицированы единичные интенсивно маркированные GFAP клетки, без признаков дифференцировки (рис. 4а, г).

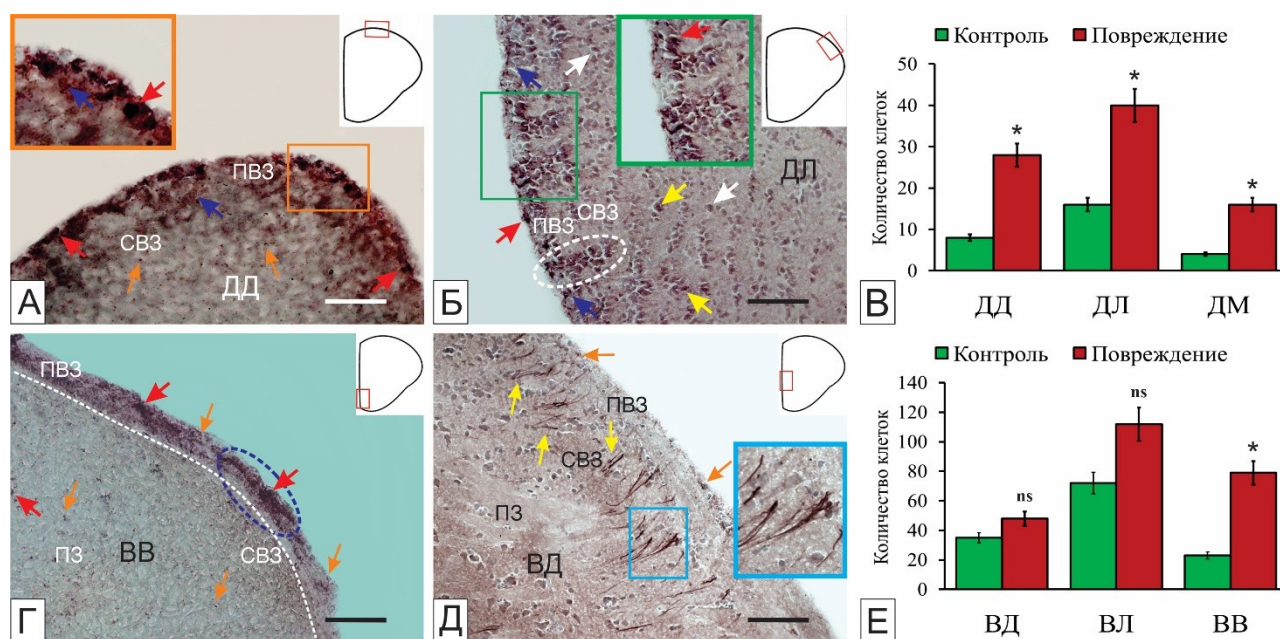


Рисунок 4 – Распределение GFAP (репрезентативное) в паллиальной (а, б, в) и субпаллиальной (г, д, е) пролиферативных зонах теленцефалона молодежи симы *O. masou*. (а, г) – в норме; (б, д) – после механической травмы; (в, е) – соотношение иммунопозитивных клеток в контроле и после повреждения ($n = 5$; * $P < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

В результате травмы были обнаружены структурные перестройки в ПВЗ и СВЗ, следствием которых является появление реактивных структурных комплексов, включающих гетерогенную популяцию GFAP+ клеток и радиальной глии (рис. 4б, д). Выраженный топологический характер таких комплексов, дифференцированная организация различных

типов клеток в них и высокая иерархичность в соотношении отдельных элементов позволяет предполагать, что данные комплексы соответствуют реактивным нейрогенным нишам, содержащим глиальные предшественники, специфичные для постэмбрионального нейрогенеза, реактивизирующиеся в результате травматического процесса.

Паттерн иммуномаркирования GFAP после повреждения значительно отличался от маркирования GFAP у интактных животных (рис. 4а, г). Вместо единичных GFAP+ клеток (рис. 4а, г), появляются гетерогенные клеточные скопления, дополнительные волокна радиальной глии и единичные мелкие интенсивно GFAP-маркированные клетки в паренхиме (рис. 4б, д). Увеличивается общее количество иммуномаркированных клеток во всех областях (рис. 4в, е). Все эти GFAP+ элементы, появляются *de novo* в результате активации резидентных вНСК глиального типа и их последующей медленной пролиферации, в ответ на травму. Мы полагаем, что данные GFAP-иммунопозитивные структуры представляют собой реактивные нейрогенные ниши, содержащие вНСК глиального типа, возникающие в ответ на повреждение. В исследованиях на паллиуме *D. rerio* были выявлены радиальные глиальные вНСК и промежуточные предшественники (Kroehne et al., 2011). Источником вНСК является эмбриональная радиальная глиа (Xu et al., 2015), которая продуцирует промежуточные клетки-предшественники (Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009), характеризующиеся высокой гетерогенностью с точки зрения активной цикличности или покоя (Codega et al., 2014) и экспрессируемых молекулярных маркеров (Giachino et al., 2014).

Иммуногистохимическое маркирование виментина в теленцефалоне молодого симы. При маркировании виментина в паллиуме в норме продукты ИГХ реакции выявлялись в клетках перивентрикулярной области в виде небольших гранул, расположенных в различных частях тел иммунопозитивных клеток (рис. 4г). Отдельные интенсивно маркированные клетки, как правило, формировали небольшие плотные скопления либо располагались в виде многорядного пласта в ПВЗ. В ПВЗ маркировались отдельные удлинённые клетки (рис. 4г). В паллиуме *D. rerio* выявляются клетки глиального фенотипа, маркируемые виментином (Cerdea et al., 1998). Однако в паллиуме *O. masou* виментин-позитивные клетки соответствовали нейрорепителлиальному фенотипу (рис. 4г).

В субпаллиальной области иммуномаркирование виментина у интактных животных было выявлено в ПВЗ (рис. 5г). Интенсивно маркированные внутриклеточные гранулоподобные включения виментина формировали протяженные участки, чередующиеся с зонами иммунонегативности. Наряду с групповыми паттернами распределения виментина в ПВЗ маркировались отдельные гранулы, в СВЗ определялись единичные Vim+ клетки и гранулы. В ПЗ выявлены более обширные зоны, содержащие Vim+ клетки и гранулы паренхиматозной локализации, расположенные в составе локальных скоплений иммунонегативных клеток (рис. 5г).

После повреждающего воздействия, усиливалась экспрессия виментина в клетках ПВЗ (рис. 5б, д), что соответствует данным на *D. rerio* (März et al., 2010). Как и при маркировании GFAP, после повреждения появлялись кластеры виментин-позитивных клеток и многочисленные менее интенсивно виментин-маркированные клетки, а также единичные маркированные клетки в паренхиме мозга. Возникали протяженные участки, содержащие интенсивно маркированные клетки и радиальную глию. Как и в случае с GFAP, маркирование виментином характеризовалось наименее выраженными структурными изменениями и количественными изменениями численности иммунопозитивных клеток.

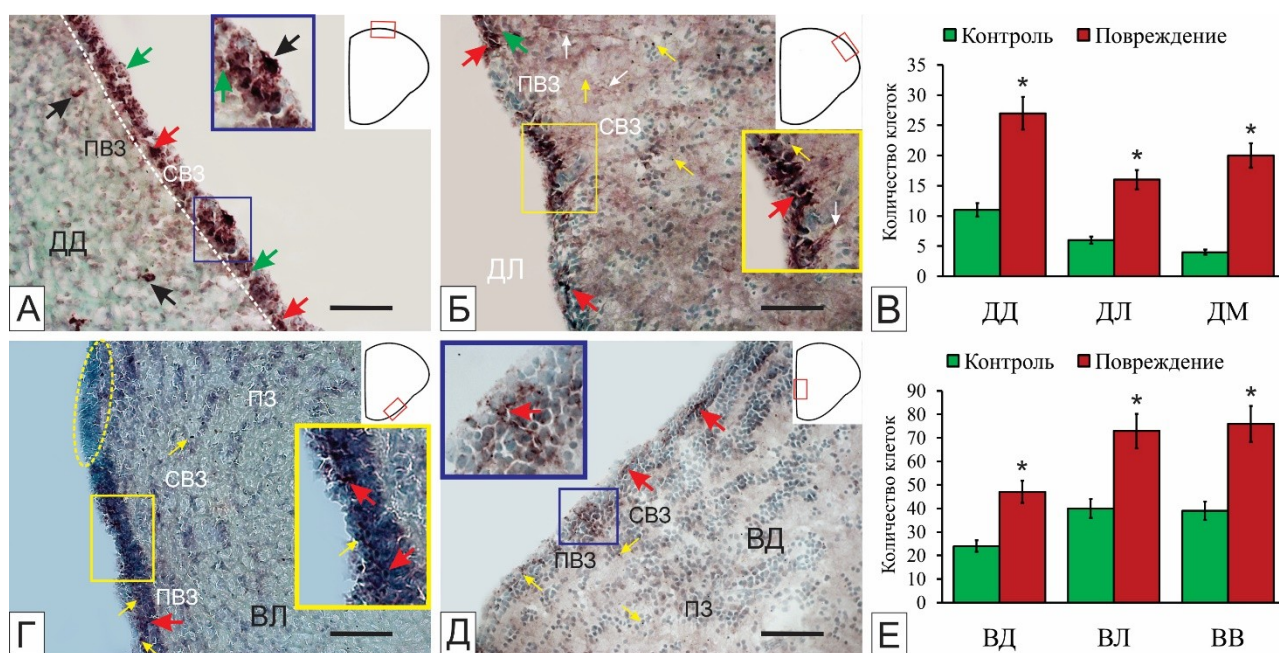


Рисунок 5 – Распределения виментина (репрезентативное) в паллиальной (а, б, в) и субпаллиальной (г, д, е) пролиферативных зонах теленцефалона молодежи симы *O. masou*. (а, г) – в норме; (б, д) – после механической травмы; (в, е) – соотношение иммунопозитивных клеток в контроле и после повреждения ($n = 5$; $*P < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

После нанесения травматического повреждения маркирование виментином характеризовалось увеличением численности иммунопозитивных элементов: клеток и гранул по сравнению с интактной экспрессией виментина (рис. 5в, е). Увеличение численности Vim⁺ клеток характерно для ПВЗ, возникали кластеры Vim⁺ клеток без отростков, появлялись паттерны Vim⁺ кластеров РГ. Мы полагаем, что в результате травматического процесса в паллиуме симы активировался дополнительный пул Vim⁺ НСК глиального фенотипа и их потомков НКП, направленный на устранение последствий травмы.

В связи с этим, мы полагаем, что участки паллиума, содержащие виментин и GFAP иммунопозитивные клетки, соответствуют зонам с высокой нейрональной пластичностью, содержащим взрослые тканеспецифичные нейрональные предшественники, определяющие высокий нейрогенный потенциал в постэмбриональном периоде развития молодежи симы. Это соответствует данным исследований в ЦНС млекопитающих, где было показано, что определённая популяция астроглиальных клеток, в частности, радиальная глия эпендимы и субвентрикулярных регионов, могут продуцировать нейроны, а также астроциты и олигодендроциты, что свидетельствует о специализации таких клеток в качестве вНСК (Grandel, Brand, 2013).

Иммуногистохимическое маркирование глутаминсинтетазы в теленцефалоне молодежи кеты. В интактном мозге молодежи кеты ГС маркирует гетерогенную популяцию нейрональных клеток-предшественников, локализованную в ПВЗ, а также ограниченное количество вНСКП в паренхиме. Как в паллиальной, так и в субпаллиальной областях интенсивность маркирования ГС варьировала от умеренной до высокой (рис. 6 в, е). В паллиальной и субпаллиальной зонах маркирование ГС выявлено в гранулах, расположенных в ПВЗ. В паллиуме интактной кеты ГС наиболее часто маркирует в ПВЗ клетки нейроэпителиального типа, имеющие недифференцированный фенотип и лишённые

отростков (рис. 6 а, в). Подобные ГС+ НЭ клетки были также обнаружены в дорсолатеральном паллиуме *D. rerio* (Suarez et al., 2002).

Однако исследования показали, что в теленцефалоне *D. rerio* нейрональные предшественники характеризуются пространственной гетерогенностью (Ogino et al., 2016). Анализ морфометрических и денситометрических параметров ГС+ клеток в паллиуме кеты подтверждает гетерогенный характер популяции маркируемых вНСКП. В наших исследованиях маркирование ГС отмечалось во всех паллиальных зонах теленцефалона кеты. Характер маркирования позволял выделять как довольно протяженные нейрогенные области, содержащие ГС+ клетки, так и отдельные скопления, морфологически соответствующие локальным нейрогенным нишам конститутивного типа (рис. 6 а, в).

Через 3 сут после повреждения мы наблюдали значительные изменения в локализации ГС в конечном мозге молодежи кеты (рис. 6 б, д). Также установлено появление дополнительного типа ГС+ нейрональных предшественников, имеющих фенотип радиальной глии и отсутствующих у интактных животных. Травматическое повреждение теленцефалона приводило к значительному повышению числа ГС+ клеток в ПВЗ, достоверно превышающему число иммунопозитивных клеток в норме (рис. 6 в, е).

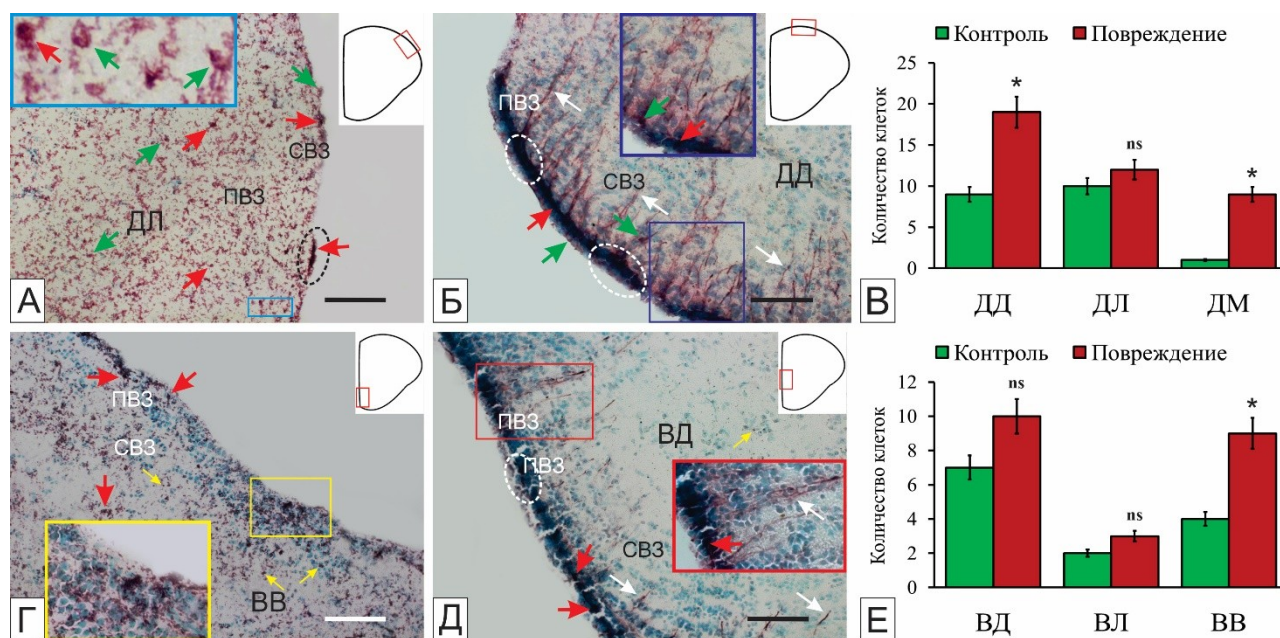


Рисунок 6 – Распределения ГС (репрезентативное) в паллиальной (а, б, в) и субпаллиальной (г, д, е) пролиферативных зонах теленцефалона молодежи кеты *O. keta*. (а, г) – в норме; (б, д) – после механической травмы; (в, е) – соотношение иммунопозитивных клеток в контроле и после повреждения ($n = 5$; $*P < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

Гетерогенная популяция ГС+ клеток в условиях повреждения включала два типа нейрональных предшественников. Первые, НЭ, ранее присутствующие в составе конститутивной нейрогенной ниши и участвующие, как мы полагаем, в процессе реактивации и формирования РНН. Другой тип нейрональных предшественников, отсутствующий у интактных животных, представляет собой гетерогенную популяцию радиальной глии, выявляемую в составе РНН в различных комбинациях. Плотность распределения реактивной РГ в паллиальной области теленцефалона после травмы находилась в соответствии с количеством нейрональных предшественников (рис. 6 б, д).

Наряду с появлением реактивных ГС+ вНСК глиального типа в паллиуме и субпаллиуме происходили процессы клеточной миграции. Траектории движения клеток включали радиальные (вдоль волокон РГ) и тангенциальные паттерны и формирование многочисленных РНН различного объема, локализации и протяженности в паллиуме (рис. 6 б, д). В ДМ паттерны посттравматической миграции ГС+ клеток формировали псевдостратифицированную структуру в СВЗ и ПЗ, в ПВЗ преобладали многочисленные мелкие РНН, включающие НЭ и радиально глиальные ГС+ популяции клеток. ДЛ характеризовалась паттернами тангенциальной миграции ГС+ НЭ клеток, а также участками, содержащими наиболее протяженные волокна РГ. Доля ГС+ в паллиальных и субпаллиальных областях теленцефалона через 3 сут после травмы значительно возрастала по сравнению с контрольной группой (рис. 6 в, е).

Иммуногистохимическое маркирование транскрипционного фактора Pax2 в теленцефалоне молодежи кеты. В конечном мозге молодежи кеты белковый продукт ТФ Pax2 имеет как цитоплазматическую, так и ядерную локализацию (рис. 7 а, б, г, д), вследствие чего мы выделяем гетерогенную популяцию Pax2+ клеток и гранул.

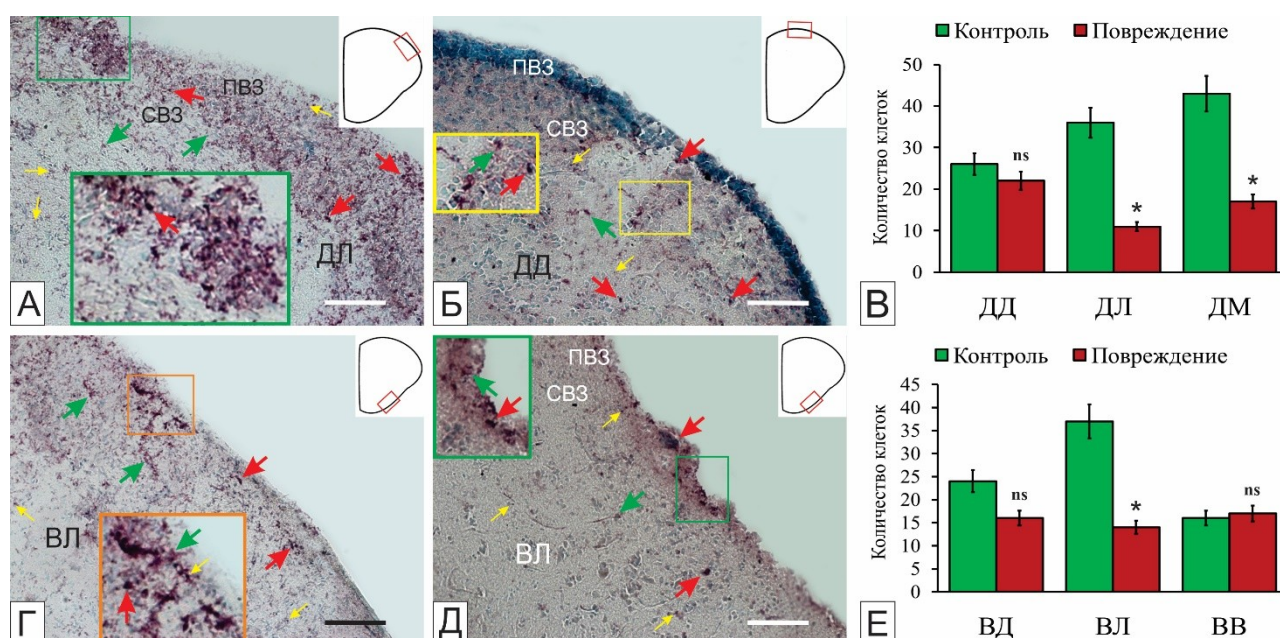


Рисунок 7 – Распределения Pax2 (репрезентативное) в паллиальной (а, б, в) и субпаллиальной (г, д, е) пролиферативных зонах теленцефалона молодежи кеты *O. keta*. (а, г) – в норме; (б, д) – после механической травмы; (в, е) – соотношение иммунопозитивных клеток в контроле и после повреждения ($n = 5$; $*P < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

У интактных животных Pax2+ клетки были выявлены в составе маркированных клеточных кластеров в ПВЗ паллиальной и субпаллиальной областей, в менее плотных субвентрикулярных группах, а также прослеживались одиночные поверхностно локализованные клетки (рис. 7 а, г). Однако в большинстве зон паллиальной области белковый продукт Pax2 маркировался в ядрах клеток. Области, содержащие маркированные Pax2 ядра, имели протяженную в пространстве структуру, формируя морфогенетические поля с различной интенсивностью иммуномаркирования, а паттерн распределения клеток был диффузным (рис. 7 а, б, г, д).

У молодежи кеты Pax2 маркирует популяцию НЭ клеток в различных областях конечного мозга. Pax2 экспрессировался как в цитоплазме клеток, так и в ядрах. Белковый продукт Pax2 маркирует ограниченную популяцию НЭ клеток и ядра клеток неизвестной функциональной специализации, участвующих, как мы полагаем, в процессах конститутивного нейрогенеза. Учитывая данные литературы об участии генов семейства Pax в построении пространственной структуры ЦНС в эмбриогенезе и в постнатальном развитии (Thompson, Ziman, 2011), мы полагаем, что экспрессия Pax2 в ядрах клеток в глубоких паренхиматозных слоях отражает паттернизацию мозга у растущей молодежи кеты. Это предположение находится в соответствии с данными об участии Pax2 в процессе регионализации ЦНС в эмбриональный и постэмбриональный периоды развития позвоночных (Thompson, Ziman, 2011).

После повреждения мозга мы обнаружили популяцию тангенциально мигрирующих интенсивно маркированных Pax2 клеток в поверхностной и базальной части ПВЗ. Такой паттерн локализации Pax2+ клеток был характерен почти для всех областей теленцефалона, что свидетельствует о генерализованном характере экспрессии данного ТФ (рис. 7 б, д).

Иммуногистохимическое маркирование CBS в теленцефалоне молодежи кеты. В паллиуме интактной кеты маркирование CBS было выявлено во всех зонах. В клетках выделялись два уровня иммуноокрашивания: высокий, при котором интенсивно окрашивались ядро и цитоплазма клетки, и умеренный, когда наблюдалось менее интенсивное маркирование цитоплазмы клеток. Особенности маркирования клеток во всех зонах дорсальной области позволили выделить как единичные иммуномаркированные клетки, так и небольшие CBS+ скопления в ПВЗ. Максимальная плотность распределения интенсивно и умеренно маркированных клеток была в ДД, в ДЛ и ДМ показатели были несколько ниже.

После повреждения конечного мозга количество CBS-маркированных клеток в ПВЗ паллиума и субпаллиума значительно возрастало по сравнению с контрольными животными. Количественная оценка CBS+ клеток во всех областях паллиума и субпаллиума через 3 сут после травмы теленцефалона показала достоверное увеличение числа иммунопозитивных клеток ($P < 0,05$). У интактных животных преобладали умеренно маркированные клетки. Однако в остром периоде после травмы это соотношение значительно изменилось, за счет увеличения количества интенсивно маркированных клеток.

Паттерн распределения CBS+ клеток в паллиуме был представлен многорядным пластом интенсивно маркированных клеток значительной протяженности. В ДМ регистрировались небольшие скопления CBS+ клеток в составе ПВЗ и СВЗ; возрастало количество маркированных клеток паренхиматозной локализации, расположенных дискретно либо формирующих небольшие кластеры. В ДЛ увеличилось количество кластеров, содержащих интенсивно маркированные клетки в ПВЗ. В ПЗ регистрировались небольшие кластеры, содержащие интенсивно маркированные клетки.

В субпаллиальной области интактной молодежи кеты CBS-иммунопозитивность была выявлена также во всех зонах. В СВЗ преобладали CBS-клетки, среди которых отмечались небольшие скопления мелких удлинённых базофильных клеток. Однако в более глубокой ПЗ встречались скопления умеренно и интенсивно гомогенно маркированных CBS клеток, организованных в небольшие кластеры или одиночных, а также CBS-мелких базофильных клеток (рис. 8 а, г).

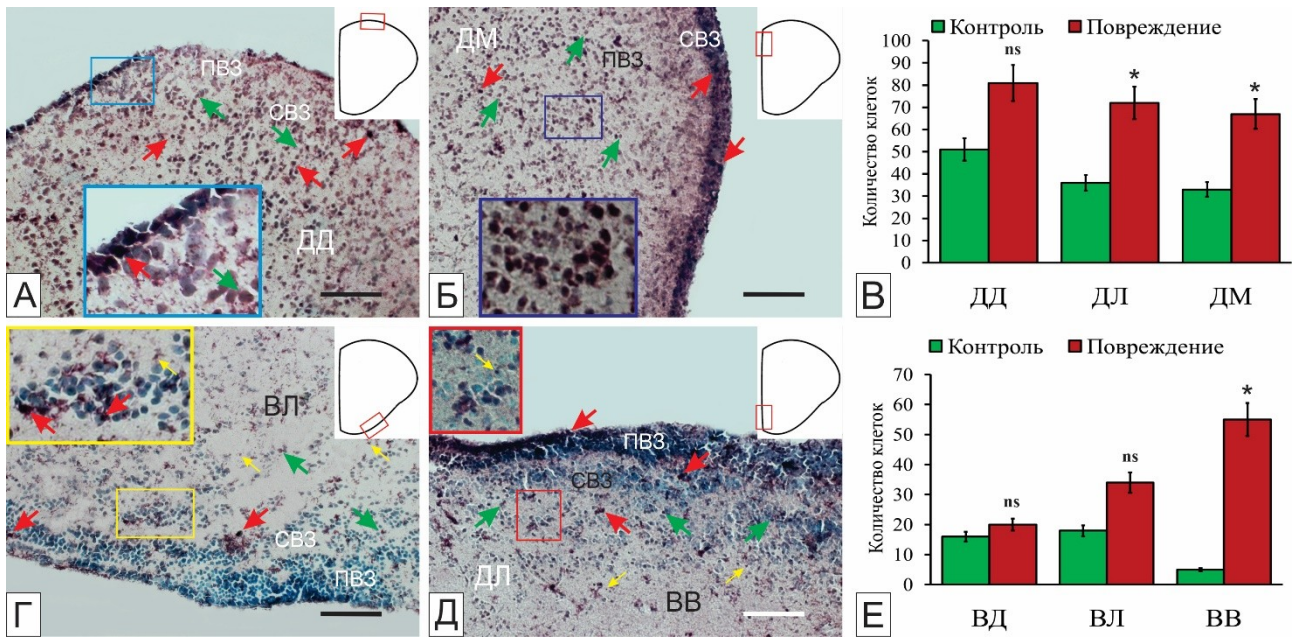


Рисунок 8 – Распределения CBS (репрезентативное) в паллиальной (а, б, в) и субпаллиальной (г, д, е) пролиферативных зонах теленцефалона молодежи кеты *O. keta*. (а, г) – в норме; (б, д) – после механической травмы; (в, е) – соотношение иммунопозитивных клеток в контроле и после повреждения ($n = 5$; $*P < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой, критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

После повреждения конечного мозга количество CBS-маркированных клеток в ПВЗ субпаллиума значительно возросло по сравнению с контрольными животными (рис. 8 в, е). Изменялись морфологические характеристики клеток, в целом, во всех зонах после травмы преобладали клетки более мелких размеров. В субпаллиальной области перестройки, аналогичные таковым в паллиальной области, возникали в дорсальном (ВД) и вентральном (ВВ) ядрах. В ПЗ субпаллиума возросло число отдельных и парных CBS+ клеток, а также их небольших кластеров (рис. 8 б, д).

В настоящее время исследуется участие H_2S в процессе ишемического повреждения мозга, травмы головного мозга и участия данного газотрансмиттера в контроле окислительного стресса и увеличения реактивных форм кислорода при H_2S -зависимой сигнализации. (Gopalakrishnan et al., 2019). Однако сведения о межклеточном взаимодействии и участии H_2S в регенеративных процессах, в частности, при взрослом нейрогенезе и травматическом повреждении мозга, все еще ограничены.

Проведенные нами исследования показали, что в дорсальной и вентральной частях конечного мозга молодежи кеты CBS маркирует гетерогенную популяцию перивентрикулярно и паренхиматозно расположенных клеток. Несмотря на региональные отличия, были выявлены общие черты локализации CBS: протяженные зоны распространения интенсивно маркированных клеток чередовались с участками, лишенными иммунопозитивности, что соответствует паттернам распространения ГС в клетках нейроэпителиального типа в интактном теленцефалоне (рис. 8 б, д).

Результаты иммуномаркирования CBS молодежи интактной кеты во многом соответствуют паттерну распределения NuCD у молодежи симы, что позволяет нам предполагать возможное участие сероводорода в регуляции процессов взрослого нейрогенеза. В подтверждение этого предположения свидетельствует также наличие большого количества NuCD+ нейронов, находящихся на различных стадиях

дифференцировки, в паренхиме дорсальной области, в окружении CBS позитивных нейронов, локализованных в тех же областях.

H₂S-продуцирующие клетки в паренхиме мозга выделяют сероводород в межклеточное пространство, в котором осуществляется дифференцировка молодых нейронов, создавая тем самым особое микроокружение, способствующее нейрональной дифференциации. Выделяемый клетками сероводород может рассматриваться в качестве фактора, участвующего в конститутивном нейрогенезе. Согласно данным, высокий уровень CBS необходим для раннего созревания и роста нейрональных сетей, что также подтверждает роль сероводорода в нейрональной дифференцировке (Robert, Vialard, 2003).

Наличие H₂S-продуцирующего энзима в клетках мозга и, вероятно, в гранулах связано с обеспечением процесса нейрохимической передачи сигналов, и в частности, с активацией НМДА-рецепторов (Kimura, 2019). Активация нейронов в мозге приводит к высвобождению нейромедиаторов, в том числе глутамата, который активирует НМДА-рецепторы, что, в свою очередь, приводит к повышению астроцитарного внутриклеточного кальция и долговременной потенциации (Kumar et al., 2018). Наличие двух уровней активности CBS в клетках и гранулах теленцефалона свидетельствует о медиаторно-модуляторных межклеточных взаимодействиях, что соответствует ранее полученным данным на рыбах (Pushchina et al., 2020).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

Другим важным наблюдением является гетерогенное иммуномаркирование протеина NuCD в различных частях паллиума. В медиальной зоне умеренное маркирование недифференцированных клеток поверхностных паренхиматозных областей было связано, как мы полагаем, с ранней нейрональной дифференцировкой с участием Ca²⁺-связывающих белков, в частности, в процессах конститутивного нейрогенеза. При травматическом повреждении, напротив, в этой области умеренное маркирование было характерно для нейронов, расположенных в паренхиматозных участках мозга с признаком нейрональной дифференцировки. Мы полагаем, что такие изменения паттернов иммунолокализации NuCD связаны с изменением посттравматического кальциевого гомеостаза и с последующей интенсификацией каскада Ca²⁺ в нейронах. Этим объясняется увеличение общего количества NuCD+ клеток после травматического повреждения.

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

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

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

Одним из важных аспектов исследования нейронауки является поиск факторов, влияющих на способность клетки выживать при нейротравме или нейродегенерации и последующих инфильтрационных процессах. Хотя в этом отношении имеется мало информации о генах Рах. В нескольких исследованиях продемонстрирована способность Рах6-экспрессирующих клеток реагировать на нейротравму и обеспечивать благоприятную окружающую среду после инсульта (Tonchev, Yamashima, 2006).

Паттерны экспрессии Рах2 не связаны напрямую с зонами пролиферативной активности, выявленной у кеты. Тем не менее, мы полагаем, что кластерное распределение Рах2-экспрессирующих областей в паллиуме и субпаллиуме, а также выборочное снижение экспрессии в нескольких областях мозга в посттравматический период свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения данного ТФ и его участия в механизмах конститутивного и посттравматического нейрогенеза.

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

ВЫВОДЫ

1. Интенсивная пролиферативная активность, выявляемая при маркировании PCNA и BrdU в перивентрикулярной зоне, и миграция клеток в более глубокие слои мозга, а также формирование локальных индуцированных нейрогенных ниш были выявлены в результате острой механической травмы конечного мозга *Oncorhynchus masou*. Процессы гомеостатического постэмбрионального нейрогенеза, наблюдаемого у интактных животных, и репаративного нейрогенеза у животных при травме, сопровождаются дополнительной нейрогенной индукцией и повышенной клеточной продукцией.
2. Нейроноспецифичный Ca²⁺-связывающий протеин HuCD в паллиуме молодежи симы локализован в клетках, находящихся в различной стадии нейрональной дифференцировки; на территории пролиферативных зон HuCD маркирует нейродетерминированные клетки-предшественники, в более глубоких слоях – дифференцированные нейроны различной степени зрелости. В посттравматический период во всех зонах паллиума происходит изменение паттернов распределения HuCD⁺ клеток, появляются интенсивно и умеренно маркированные клетки и значительно возрастает их общая продукция.
3. У интактной молодежи симы в теленцефалоне наблюдается незначительная экспрессия даблкортина в клетках перивентрикулярной зоны с гомеостатическим нейрогенезом, что не выявлено в участках, содержащих дифференцированные клетки. В посттравматический период в теленцефалоне симы наблюдается изменение паттернов экспрессии даблкортина в клетках перивентрикулярных и субвентрикулярных областей, связанное с появлением диффузных скоплений или плотных конгломератов, отличающихся по клеточному составу и характеру иммуномаркирования в паллиуме и субпаллиуме, увеличивается их количество и интенсивность маркирования.
4. В теленцефалоне молодежи обоих видов рыб идентифицирована популяция вНСКП с нейроэпителиальной морфологией, экспрессирующая GFAP, виментин и ГС в перивентрикулярной области. В результате травматического повреждения значительно увеличивается количество вНСКП, и дополнительно выявляются паттерны экспрессии PГ, имеющие регионально-специфичный характер.
5. У интактных животных CBS-продуцирующие клетки преобладают в паллиальной зоне, преимущественно располагаясь в перивентрикулярных слоях. В результате травматического повреждения значительно увеличивается экспрессия H2S во всех зонах паллиума и субпаллиума. Экспрессия сероводорода в конечном мозге лососевых рыб, очевидно, связана с модуляцией глутаматергической системы, обеспечивая защиту нейронов от эксайтотоксичности.
6. Паттерны экспрессии Pax2 у интактных животных напрямую не связаны с матричными зонами теленцефалона молодежи *Oncorhynchus keta* и формируют морфогенетические поля, в которых экспрессия данного ТФ представлена в ядрах и цитоплазме. В результате травмы количество Pax2-экспрессирующих клеток достоверно снижалось в дорсальной и медиальной паллиальных зонах и латеральной зоне субпаллиума.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. Пущина Е.В., **Жарикова Е.И.**, Вараксин А.А. Персистентный и репаративный нейрогенез в теленцефалоне молоди симы *Oncorhynchus masou* при механической травме // Онтогенез. 2017. Т. 48, № 5. С. 307–320.
2. Pushchina E.V., **Zharikova E.I.**, Varaksin A.A., Prudnikov I.M., Tsyvkin V.N. Proliferation, adult neuronal stem cells and cells migration in pallium during constitutive neurogenesis and after traumatic injury of telencephalon of juvenile masu salmon, *Oncorhynchus masou* // Brain Sciences. 2020. Vol. 10, № 4. Article no. 222. doi:10.3390/brainsci10040222.
3. Pushchina E.V., **Zharikova E.I.**, Varaksin A.A. Mechanical brain injury increases cells' production of cystathionine β -synthase and glutamine synthetase, but reduces Pax2 expression in the telencephalon of juvenile chum salmon, *Oncorhynchus keta* // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22, № 3. Article no. 1279. doi.org/10.3390/ijms22031279.
4. Pushchina E.V., **Zharikova E.I.**, Varaksin A.A. Expression of doublecortin, glial fibrillar acidic protein, and vimentin in the intact subpallium and after traumatic injury to the pallium in juvenile salmon, *Oncorhynchus masou* // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23, № 3. Article no. 1334. doi.org/10.3390/ijms23031334.

Работы в материалах конференций и в других изданиях:

1. Пущина Е.В., **Жарикова Е.И.**, Вараксин А.А. Нейрогенез у взрослых позвоночных животных: вопросы адаптации, эволюции и функциональной специализации // Тихоокеанский медицинский журнал. 2016. № 2. С. 55–61.
2. Обухов Д.К., Пущина Е.В., **Жарикова Е.И.**, Вараксин А.А. Нейрогенез в конечном мозге молоди симы *Oncorhynchus masou* в норме и при механической травме // Материалы докладов XIII Конгресса Международной ассоциации морфологов, 24–27 мая 2016 г., Петрозаводск. Морфология. 2016. Т. 149, № 3. С. 152–153.
3. **Zharikova E.I.** Role of stem cells and astrocytic glial cells in reparative histogenesis in telencephalon of masu salmon *Oncorhynchus masou* // International Conference on Histochemistry and Cell Biology, Phoenix, USA, September 14–15, 2016. Journal of Cytology and Histology. 2016. Vol. 7, № 4 (Suppl). P. 8.
4. Pushchina E.V., Varaksin A.A., Stukaneva M.E., **Zharikova E.I.** Adult and reparative neurogenesis in fish brain // Peripheral nerve regeneration – from surgery to new therapeutic approaches including biomaterials and cell-based therapies development / Ed. A.C. Mauricio. – Rijeka: Intech, 2017. P. 175–195.
5. Пущина Е.В., **Жарикова Е.И.**, Вараксин А.А. Глутаминсинтетаза и цистатионин β -синтаза в конечном мозге молоди кеты *Oncorhynchus keta* при травме // Асимметрия. 2018. Т. 12, № 4. С. 412–418.
6. Pushchina E.V., **Zharikova E.I.**, Varaksin A.A. The ratio of constitutive and reparative neurogenesis in the pallium of juvenile masu salmon (*Oncorhynchus masou*) // Teleosts. physiology, evolution and classification / Ed. M. Herleif. – New York: Nova Science Publishers, Inc., 2018. P. 45–71.
7. **Жарикова Е.И.** Распределение GFAP, виментина и даблкортина в конечном мозге молоди симы *Oncorhynchus masou* // Морфология. 2019. Т. 155, № 2. С. 112.
8. **Жарикова, Е.И.** Нейроиммунный ответ на введение аденовируса в конечном мозге

молоди кеты (*Oncorhynchus keta*) // Оптогенетика+ 2020: вторая Всероссийская научная конференция с международным участием и Школа по современным методам неинвазивного контроля нейрональной активности: сборник научных трудов, Санкт-Петербург, 22–26 апреля 2020 года. – Санкт-Петербург, 2020. С. 105–106.

9. **Жарикова Е.И.**, Пущина Е.В., Вараксин А.А. Рах2-зависимая модуляция посттравматической экспрессии глутаминсинтаз и цистатионин β -синтазы в конечном мозге молоди тихоокеанской кеты *Oncorhynchus keta* // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2020. Т. 56, № 7. С. 586.
10. **Жарикова Е.И.**, Пущина Е.В., Обухов Д.К. Участие генов Рах в процессах нейрогенеза и регенерации // Вопросы морфологии XXI века. Вып. 6: Гистогенез, реактивность и регенерация тканей. Под ред. И.А. Одинцовой, С.В. Костюкевича. – СПб.: Издательство ДЕАН, 2021. С. 36–43.
11. **Zharikova E.I.**, Pushchina E.V. Proliferation and migration of neuronal progenitor cells in telencephalon during constitutive neurogenesis and after traumatic injury of juvenile masu salmon, *Oncorhynchus masou* // Marine Biology in the 21st Century: Achievements and Development Outlook (in Commemoration of the 100th Anniversary of the Birth of Academician Alexey V. Zhirmunsky): Abstracts of the International Conference, Vladivostok, 6–8 октября 2021 года. – Vladivostok: Far Eastern Federal University, 2021. P. 227–229.

ЖАРИКОВА
ЕВА ИГОРЕВНА

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

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук