

МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

УДК 591.3:591.481:597.5

ПРОЛИФЕРАЦИЯ, НЕЙРО- И ГЛИОГЕНЕЗ В НОРМЕ И ПРИ МЕХАНИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МЕЗЕНЦЕФАЛИЧЕСКОГО ТЕГМЕНТУМА МОЛОДИ КЕТЫ *ONCORHYNCHUS KETA*

© 2019 г. Е. В. Пущина^{a, b, *}, И. А. Капустянов^c, А. А. Вараксин^a

^aНациональный научный центр морской биологии ДВО РАН, Россия, 690041, Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17

^bИнститут физиологии им. А.А. Богомольца, Украина, 01024, Киев, ул. Богомольца, д. 4

^cДальневосточный федеральный университет, Россия, 690091, Владивосток, ул. Суханова, д. 8

*E-mail: puschina@mail.ru

Поступила в редакцию 18.10.2018 г.

После доработки 09.11.2018 г.

Принята к публикации 13.11.2018 г.

Методом ИГХ маркирования PCNA, NuCD и GFAP исследовали процессы пролиферации, конститутивного нейро- и глиогенеза в среднемозговом тегментуме молоди интактной кеты *Oncorhynchus keta* и через 3 дня после травматического повреждения. В тегментуме кеты выявлена пролиферативная активность в ПВЗ как в отдельных клетках, так и в небольших кластерах клеток. Наличие конститутивных нейрогенных зон обеспечивает процессы персистентного роста мозга. После повреждения тегментума активизируется пролиферация в ПВЗ, происходит реактивация конститутивных нейрогенных зон и формирование реактивных нейрогенных ниш в паренхиме, пролиферативная активность инициируется также в центрах вторичной пролиферации (базальном тегментуме). Впервые установлено, что травматическое повреждение тегментума приводит к ускоренной дифференциации нейронов в СВЗ и дорсомедиальном тегментуме, а также появление NuCD+ клеток с эндимио- и радиоглиальным фенотипом в СВЗ, отсутствующих у интактных животных. Впервые показано, что в результате повреждения тегментума формируются локальные очаги посттравматического нейрогенеза, расположенные в паренхиме ретикулярной формации и зоны посттравматического глиоза, способствующие более эффективному процессу миграции клеток к зоне травмы. Полученные данные дают новую информацию о конститутивной биологии нейральных стволовых клеток и их участии в регенерации мозга.

Ключевые слова: среднемозговой тегментум, кета, травматическое повреждение, PCNA, NuCD, GFAP, репаративный нейрогенез, радиальная глия, конститутивная и реактивная нейрогенная ниша

DOI: 10.1134/S0475145019020058

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что мозг взрослых позвоночных обладает способностью к нейрогенезу (Bayer et al., 1982), но в последнее время интерес к этому про-

цессу значительно возрос. В центральной нервной системе амниот, популяции постэмбриональных стволовых клеток-предшественников обычно имеют фенотип глии, либо радиальной глии (РГ) и/или астроцитов (Grandel, Brand, 2013). В мозге взрослых млекопитающих локализация нейральных стволовых клеток (вНСК), в основном ограничивается конечным мозгом. Они формируются из эмбриональной радиальной глии (Alvarez-Buylla et al., 2001; Merkle et al., 2004; Xu et al., 2015) и непосредственно не образуют нейроны, продуцируя сначала промежуточную популяцию клеток-предшественников (Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009). Молекулярные фенотипы этих клеток свидетельствуют об их гетерогенности с точки зрения активной пролиферации или покоя (Codega et al., 2014) и комбинации экспрессируемых маркеров (Merkle et al., 2007; Suh et al., 2007; Beckervorders et al., 2014; Giachino, 2014).

Сокращения: BrdU – бромдезоксисуридин; GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок; GFAP+ – GFAP-иммунопозитивный; GFAP– – GFAP-иммунонегативный; NuCD – нейрональный протеин; NuCD+ – NuCD-иммунопозитивный; NuCD– – NuCD-иммунонегативный; PCNA – ядерный пролиферативный антиген; PCNA+ – PCNA-иммунопозитивный; PCNA– – PCNA-иммунонегативный; вНСК – нейральная стволовая клетка взрослого животного; ДЛТ – дорсолатеральный тегментум; ДМТ – дорсомедиальный тегментум; ДМТЯ – ядро дорсомедиального тегментума; ЕОП – единицы оптической плотности; КНН – конститутивные нейрогенные ниши; ЛПП – латеральный продольный пучок; МРФ – мезенцефалическая ретикулярная формация; НСК – нейральная стволовая клетка; ОП – оптическая плотность; ПВ – полулунный валик; ПВЗ – перивентрикулярная зона; РГ – радиальная глия; РНН – реактивные нейрогенные ниши; РФ – ретикулярная формация; СВЗ – субвентрикулярная зона; ЯП – ядро перешейка.

Необходимо идентифицировать различные типы клеток со стволовыми свойствами во взрослом мозге, чтобы иметь возможность оценить гетерогенность нейрогенеза в нейрогенных нишах одного типа и у различных видов животных. Изучение свойств вНСК не млекопитающих позвоночных проводилось главным образом на теленцефалоне *Danio rerio*, у которого в этом отделе мозга обнаружены нейральные стволовые клетки (НСК) с фенотипом РГ и промежуточные предшественники (Pellegrini et al., 2007; Chapouton et al., 2010; März, et al., 2010; Rothenaigner et al., 2011).

Тем не менее, паттерны взрослого нейрогенеза, установленные на данной модели, в основе которых лежит активность глиальных клеток, нуждаются в уточнении и детализации, поскольку эта модель не учитывает всю сложность и гетерогенность вНСК других позвоночных.

Недавние исследования на млекопитающих показали, что некоторые эпендимные клетки имеют свойства потенциальной “нейральной стволовой клетки”. Действительно, субпопуляция эпендимных клеток, как было показано, обладает активностью стволовых клеток у мышей (Coskun et al., 2008) и введение эндотелиального сосудистого фактора роста может реактивировать покоящиеся эпендимные клетки в не нейрогенных регионах взрослого мозга (Luo et al., 2015).

Ситуация в мозге костистых рыб значительно сложнее. Мозг взрослых рыб является местом непрерывной интенсивной пролиферативной деятельности, которая не ограничивается теленцефалом (Grandel et al., 2006; Zupanc, Sîrbulescu, 2011; Pushchina et al., 2017). В некоторых зонах мозга костистых рыб вНСК имеют нейроэпителиальный, а не радиально-глиальный фенотип. У позвоночных первоначально нейронная трубка состоит из нейроэпителиальных клеток, которые симметрично делятся, продуцируя пул нейрональных предшественников. Полученные нейрональные предшественники впоследствии продуцируют нейроны, глиальные и эпендимные клетки, образующие структуру ЦНС (Alvarez-Buylla et al., 2001; Götz, Huttner, 2005; Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009). Исследования последних лет показали, что некоторые пролиферирующие популяции вНСК действительно являются нейроэпителиальными предшественниками стволовых клеток, а не радиальной глии. Это особенно справедливо для оптического тегмента и мозжечка, которые содержат большие популяции вНСК (Kaslin et al., 2009; Alunni et al., 2010; Ito et al., 2010). Дириан и его коллеги в латеральных зонах паллиума данио выявили популяцию взрослых нейроэпителиальных клеток, сохранившихся с раннего развития (Dirian et al., 2014).

Поскольку тегментальная область в мозге рыб является наименее изученной по сравнению с конечным мозгом и мозжечком, основным интерес в нашей работе был сконцентрирован на мезенцефалическом тегментуме и прилежащих к нему областях ствола. В исследованиях на *Carassius carassius* была исследована пролиферативная активность мезенцефалических матричных зон (Margotta et al., 2002). Данные на ранней молодежи форели *Salmo trutta morpha* показали наличие большого количества пролиферирующих клеток в среднем мозге (Candal et al., 2005). У сеголеток и двухгодовалой молодежи симы *Oncorhynchus masou* в области тегментума и ствола мозга при маркировании PCNA выявлена высокая пролиферативная активность и экспрессия транскрипционного фактора Рахб в матричных областях ствола (Pushchina et al., 2017). Исследование нейрональной дифференциации с помощью ИГХ маркирования нейронального протеина (HuCD) ранее проводилось на тилляпии *Oreochromis mossambicus* (Teles et al., 2012), *Gymnotus omarorum* (Olivera-Pasilio et al., 2014) и форели (Пущина и др., 2016). Выявление глии у рыб с помощью глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP) на сегодняшний день носит противоречивый характер. Так у карпа *Cyprinus carpio* описано наличие радиальной глии вдоль всего просвета желудочка мозга (Kálmán, 1998). У других рыб: форели *Salmo trutta morpha* (Alunni et al., 2005), колючей собачки *Squalus acanthias*, и ската *Raia erinacea* (Kálmán, Gould, 2001) не было найдено типичной астроцитарной глии, но были описаны многочисленные клетки радиальной глии, маркируемые GFAP.

Таким образом, ранее проведенные исследования на молодежи рыб разных возрастов и у взрослых животных указывают на наличие конститутивных процессов пролиферации и нейрогенеза у различных видов рыб в области ствола мозга.

Целью настоящей работы было исследование репаративного ответа при травме среднемозгового тегментума молодежи кеты *Oncorhynchus keta*. В задачи исследования входило: 1) определение пролиферативной активности мезенцефалического тегментума в условиях интактности и после травматического повреждения; 2) исследование особенностей конститутивного нейрогенеза мезенцефалического тегментума молодежи кеты и изменений, возникающих после травматического повреждения; 3) исследование участия радиальной глии в процессах конститутивного роста мезенцефалического тегментума молодежи кеты и определение структурных перестроек, возникающих после травмы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе было использовано 70 годовалых особей молоди кеты *Oncorhynchus keta* с длиной тела 9–11.5 см и массой 20–35 г. Животные были получены с Рязановского экспериментального производственного рыбоводного завода в 2017 г. Молодь кеты содержали в аквариуме с аэрируемой морской водой при температуре 16–17°C, с одноразовым кормлением за сутки. Соотношение светового и темного периодов в сутках составляло 14/10 ч. Содержание растворенного кислорода в воде – 7–10 мг/дм³, что соответствует нормальному насыщению. Все экспериментальные манипуляции с животными были проведены в соответствии с правилами, регулируемые уставом ННЦБМ ДВО РАН, и Этической комиссией ННЦБМ ДВО РАН, регламентирующего гуманное обращение с экспериментальными животными. Рыбы были анестезированы в растворе трикаин метансульфоната MS222 (Sigma, США) в течение 10–15 мин.

После анестезии внутричерепную полость обездвиженного животного перфузировали с помощью шприца 4%-ым раствором параформальдегида, приготовленным на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.2). После 30 мин префиксации мозг извлекали из полости черепа и фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 2 ч при 4°C. Затем в течение двух суток выдерживали в 30% растворе сахарозы при 4°C с пятикратной сменой раствора. Серийные фронтальные срезы мозга кеты толщиной 50 мкм готовили на замораживающем микротоме Cryo-Star HM 560 MV (Германия), монтировали на желатинизированные предметные стекла и высушивали.

Экспериментальное повреждение среднего мозга проводили путем прокалывания черепа рыбы тонкой стерильной иглой. Между полушариями оптического тектума, по средней линии мозга, наносили рану глубиной в 3 мм в парасагиттальном направлении. Зона травмы охватывала оптический тектум и тегментум среднего мозга и не затрагивала другие части головного мозга. Сразу после механического повреждения животных выпускали в аквариум для их восстановления и дальнейшего мониторинга.

Иммуногистохимия. Для исследования пролиферативной активности, нейрогенеза и глиогенеза в мезенцефалическом тегментуме молоди кеты использовали моноклональные антитела против ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), нейронального протеина (HuCD), глияльного фибриллярного кислого протеина (GFAP) на свободно плавающих срезах мозга. Оценку пролиферативной активности, нейро- и глиогенеза проводили путем иммунопероксидазного маркирования через 3 дня после нанесения повреждения. Срезы мозга толщиной 50 мкм инкубировали

in situ с первичными моноклональными антителами мыши против PCNA (Santa Cruz Biotech, США, 1 : 300), HuCD (clone: AD2.38; Chemicon Billerica, MA, США, 1 : 300) и GFAP (Abcam, Великобритания, 1 : 300) при температуре 4°C в течение 48 ч.

Для визуализации ИГХ маркирования использовали стандартный ABC комплекс Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories (США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Для выявления продуктов реакции применялся субстрат красного цвета VIP Substrate Kit, Vector Labs, Burlingame (США) с докрасиванием метиловым зеленым по Браше (Меркулов, 1969). Развитие ИГХ окраски контролировали под микроскопом. Материал обезвоживали по стандартной методике в двух сменах этилового спирта (96%), проводили через ксилол и заключали в среду для гистологических препаратов 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.

Микроскопия. Для визуализации процессов пролиферации, нейрогенеза, глиогенеза и проведения морфологического и морфометрического анализа был использован моторизированный инвертированный микроскоп исследовательского класса Axiovert 200 M с модулем ApoTome и цифровыми камерами AxioCam MRM и AxioCam HRC (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии препаратов и анализ материала осуществляли с помощью программы AxioVision. Измерения проводили при увеличении 20× и 40× в нескольких случайно выбранных полях зрения для каждой области исследования. Микрофотографии препаратов получали с помощью цифровой камеры Axiovert 200. Обработка материала проводилась с использованием программы Axioimager и в графическом редакторе Corel Photo-Paint 15.

Денситометрия. Для денситометрического исследования интенсивности маркирования PCNA, HuCD и GFAP в клетках мезенцефалического тегментума кеты все препараты мозга были окрашены одновременно в стандартных условиях. Измерение оптической плотности (ОП) проводили на срезах мозга с использованием программы Axiovision на базе инвертированного микроскопа Axiovert Apotome 200 M (Carl Zeiss, Германия). Для анализа ОП выбирали не менее 50 клеток каждого типа. В клетках отмечались области максимальной локализации продуктов иммуномаркирования и сравнивались с иммунонегативным фоном.

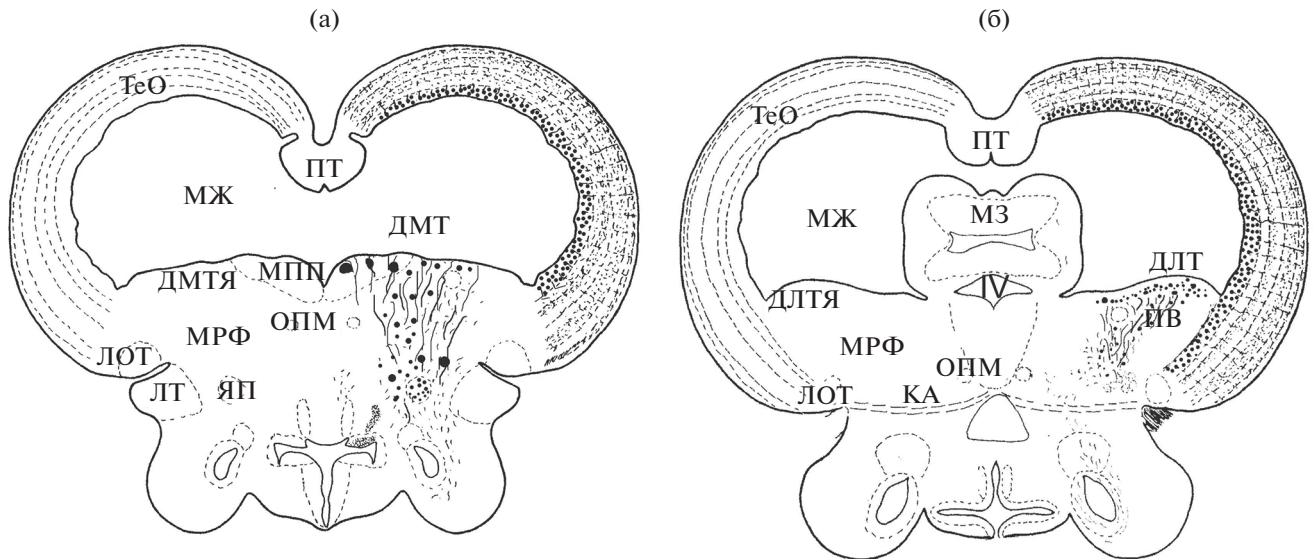


Рис. 1. Схема организации ствола мозга молодой кеты *Oncorhynchus keta* на уровне мезенцефалического тегмента. (а) – в области дорсомедиального тегмента (ДМТ), (б) – в области дорсолатерального тегмента (ДЛТ). Обозначения: ПТ – продольный торус, ТеО – оптический тектум, МЖ – мезенцефалический желудочек, ДМТЯ – дорсо-медиальное ядро тегмента, МПП – медиальный продольный пучок, МРФ – мезенцефалическая ретикулярная формация, ОПМ – отогнутый пучок Мейнерта, ЯП – ядро перешейки, ЛОТ – латеральный оптический тракт, ЛТ – латеральный торус, МЗ – мозжечковая заслонка, ПВ – полулунный валик, КА – ансулярная комиссура, IV – четвертый желудочек.

Морфометрический анализ параметров клеточных тел (измерение большого и малого диаметров сомы нейронов) проводили с помощью программного обеспечения микроскопа Axiovert 200 M. На основании данных денситометрического анализа определены различные уровни активности PCNA, NuCD и GFAP в клетках. Эти данные, наряду с размерными характеристиками, использовались для классификации и типизации клеток, образованных в период конститутивного и репаративного процессов в пролиферативных зонах, и дефинитивных центрах мезенцефалического тегмента.

Статистическая обработка. Количественная обработка материала выполнялась с помощью программы “Описательная статистика” Microsoft Excel 2010. Плотность распределения и размерные характеристики клеток оценивались с помощью методов вариационной статистики. Для количественной оценки результатов находились среднее значение и стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Схема организации ствола мозга молодой кеты на уровне дорсо-медиального тегмента (ДМТ) приведена на рис. 1а, а дорсо-латерального тегмента (ДЛТ) на рис. 1б.

PCNA в тегментах кеты. В стволе мозга контрольных животных маркирование PCNA выявлено в клетках 1-го и 2-го типов в перивентрику-

лярной области (табл. 1; рис. 2а). Маркированные клетки располагались одиночно, либо формировали небольшие локальные кластеры по 4–6 элементов (рис. 2а). Интенсивно PCNA-маркированные клетки (58 ± 8 ЕОП), как правило одиночные, располагались в нижней части перивентрикулярного слоя. Более многочисленные умеренно маркированные PCNA клетки (45 ± 6 ЕОП) занимали поверхностные и срединные части перивентрикулярного слоя (рис. 2а). В субвентрикулярной зоне PCNA+ клетки выявлены не были. В более глубоких слоях мезенцефалической ретикулярной формации (МРФ) найдены многочисленные окрашенные метиловым зеленым клетки, принадлежащие к мигрирующей популяции нейронов тегментальной области. Плотность распределения в этой зоне составляла 450 ± 26 клеток на профильное поле. Среди нейронов тегментальной области и МРФ обнаружены клетки нескольких типов (табл. 1). Сосудистое сплетение IV желудочка, занимающее перивентрикулярную и субвентрикулярную зоны, распространялось на территории медиального тегмента (рис. 2б). Вокруг сосудов локализовались плотные скопления иммунонегативных клеток, расположенных в 3–4 ряда. В зоне тегмента, содержащей сосудистую сеть, были идентифицированы одиночные интенсивно маркированные клетки в перивентрикулярной зоне (ПВЗ); умеренно PCNA маркированных клеток выявлено не было. В ПВЗ встречались конститутивные нейрогенные ниши,

Таблица 1. Морфологические и денситометрические характеристики ($M \pm m$) иммуномаркированных клеток в интактном и поврежденном мезенцефалическом тегментуме молодежи кеты *Oncorhynchus keta*

	Интактный тегментум			Поврежденный тегментум		
	PCNA-иммунопозитивные клетки					
	тип клеток	размеры клеток, мкм	оптическая плотность (ЕОП)	тип клеток	размеры клеток, мкм	оптическая плотность (ЕОП)
Недифференцированные	1	5.6 ± 0.5/3.6 ± 0.6	45.3 ± 12.9	1	6.3 ± 0.4/3.5 ± 1.1	51.5 ± 9.7
Овальные	2	8.0 ± 0.6/5.1 ± 1.2	48.3 ± 7.5	2	8.3 ± 0.5/4.7 ± 0.8	53.1 ± 12.1
Биполярные	3	10.3 ± 0.8/5.7 ± 1.5	46.3 ± 7.7	3	10.1 ± 0.6/6.1 ± 1.3	46.7 ± 7.7
Удлиненные	4	11.9 ± 1.2/6.3 ± 0.9	42.8 ± 10.3	4	15.4 ± 3.2/8.3 ± 2.4	43.4 ± 10.7
NuCD-иммунопозитивные клетки						
Недифференцированные	1	5.8 ± 0.8/3.9 ± 1.2	50.8 ± 12.4	1	6.0 ± 0.6/3.5 ± 0.8	61.6 ± 8.6
Овальные/псевдоуниполярные	2	7.9 ± 0.6/4.2 ± 1.4	61.9 ± 0.3	2	8.0 ± 0.5/3.5 ± 0.9	57.6 ± 16
Биполярные	3	10 ± 0.5/6.4 ± 1.3	63.7 ± 3.9	3	9.8 ± 0.5/4.9 ± 2.1	66.1 ± 0.7
Мультиполярные	4	26.1 ± 14.6/8.6 ± 2.4	63.3 ± 8.4	4	20.1 ± 6.8/9.9 ± 2.9	73.7 ± 4.4
GFAP-иммунопозитивные клетки						
Недифференцированные	1	5.2 ± 1.1/4.0 ± 0.8	55.8 ± 7.4	1	6.9 ± 0.8/5.3 ± 0.7	74.5 ± 5.1
Овальные	2	7.9 ± 0.5/6.4 ± 0.1	82.8 ± 0.8	2	8.4 ± 0.4/5.5 ± 0.9	64.2 ± 13.1
Средние	3	9.1 ± 0.03/5.8 ± 1.1	83.2 ± 2.9	3	9.9 ± 0.6/6.6 ± 0.7	70.9 ± 15.1
Крупные	4	16 ± 2.8/8.6 ± 2.1	83.4 ± 3.2	4	14.7 ± 3.5/7.2 ± 1.7	75.5 ± 4.6

В графе “Размеры клеток” указаны большой и малый диаметры сомы нейронов.

морфологически сходные с таковыми латерального тегментума. Популяция мигрирующих клеток в данной области составляла 268 ± 27 клеток на профильное поле. Дорсомедиальное ядро тегментума, содержащее средние овальные и крупные мультиполярные клетки, располагалось в области медиального тегментума, граничащей с МРФ (табл. 1; рис. 2в). Характер иммуномаркирования PCNA в зоне ядра дорсомедиального тегментума (ДМТЯ) был сходен с таковым в латеральном тегментуме. В перивентрикулярной зоне отчетливо идентифицировались многочисленные умеренно PCNA маркированные клетки в поверхностном слое, интенсивно маркированные клетки были более многочисленными чем в латеральном тегментуме и занимали базальную часть слоя (рис. 2в, 2е). В субвентрикулярной зоне идентифицированы скопления умеренно и интенсивно маркированных клеток 2-го типа с цитоплазматической локализацией PCNA (рис. 2в). Ядра таких клеток были окрашены метиловым зеленым; клетки группировались по 4–6 элементов

и отнесены нами к мигрирующей популяции. Такие скопления в субвентрикулярной зоне прилежали к крупному ДМТЯ. Весьма вероятно, что конститутивные нейрогенные ниши, расположенные непосредственно над мигрирующей популяцией субвентрикулярных клеток, являются источником новых “взросло-рожденных” нейронов в ДМТЯ.

Вдоль rostro-каудальной оси мезенцефалического тегментума мы идентифицировали различную плотность распределения конститутивных нейрогенных доменов. Общий паттерн их распределения в целом был сходным в латеральном и медиальном отделах тегментума (рис. 2а, 2в); однако на границе мезенцефалического тегментума и ромбовидного мозга идентифицированы зоны повышенной плотности распределения клеток. В таких областях нейрогенные ниши были более обширными, в субвентрикулярной зоне выявлено повышенное содержание клеток с маркированной цитоплазмой (рис. 2г). Кроме того, на границах заднемозговых нейромеров выявлена

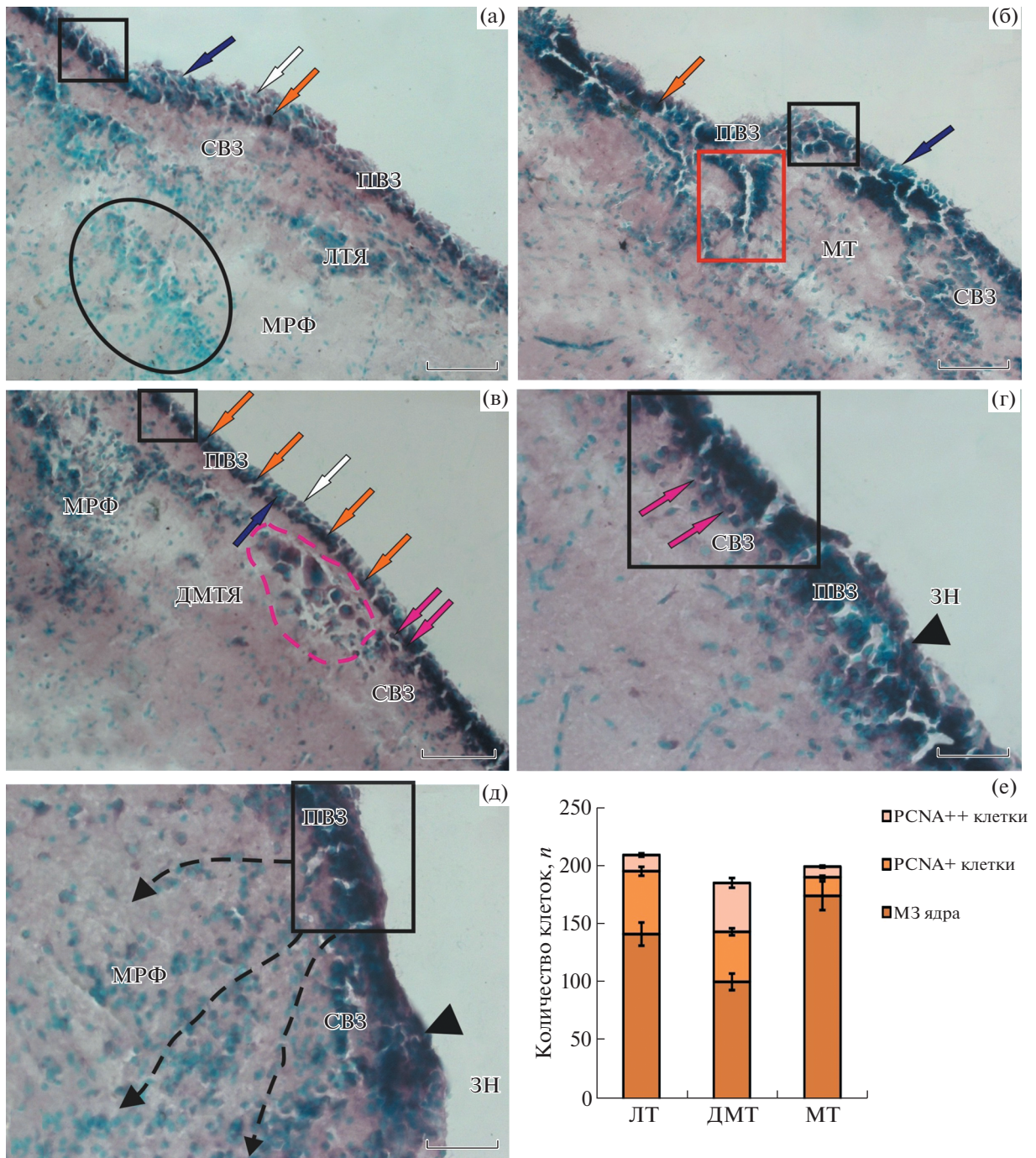


Рис. 2. Локализация пролиферативного ядерного антигена (PCNA) в мезенцефалическом тегменте молоди кеты *Oncorhynchus keta*. (а) – в латеральном тегменте, оранжевая стрелка показывает интенсивно PCNA-маркированные клетки, белая – умеренно маркированные, синяя – ядра клеток, окрашенных метиловым зеленым, конститутивные нейрогенные ниши оконтурены черным квадратом, овалом обведены скопления клеток ретикулярной формации (МРФ), (б) – в области тегментального сосудистого сплетения, красным прямоугольником оконтурен фрагмент сосуда с прилежащими скоплениями периваскулярных клеток, (в) – в дорсомедиальном тегменте, розовым пунктиром оконтурено ДМТЯ, розовыми стрелками показаны PCNA+ мигрирующие клетки, (г) – в области мезенцефало-медулярного перехода, черной треугольной стрелкой показана граница нейромеров, (д) – в области прилежащей к заднемозговому нейромеру, пунктирными линиями показаны направления радиальной миграции клеток. Обозначения: СВЗ – субвентрикулярная зона, ПВЗ – перивентрикулярная зона, ДМТ – дорсомедиальный тегментум, МТ – медиальный тегментум, ЛТ – латеральный тегментум, ДМТЯ – дорсомедиальное тегментальное ядро, ЗН – заднемозговой нейромер. Иммунопероксидазное маркирование PCNA в сочетании с окраской метиловым зеленым. Масштабный отрезок: (а–в) – 100 мкм; (г, д) – 50 мкм; (е) – соотношение интенсивно и умеренно PCNA-маркированных клеток и окрашенных метиловым зеленым ядер в ПВЗ латерального, дорсомедиального и медиального тегментума ($M \pm m$).

повышенная плотность распределения иммунонегативных клеток, окрашенных метиловым зеленым, формирующих характерные утолщения (рис. 2г). В других областях тегмента, прилежащих к задне мозговым нейромерам, выявлена повышенная плотность распределения PCNA-клеток, мигрирующих, как мы полагаем, в глубокие слои мозга и формирующие популяцию клеток ретикулярной формации (РФ) (рис. 2д).

PCNA в тегменте кеты после повреждения. После травматического повреждения в ДМТЯ количество PCNA-маркированных клеток в перивентрикулярной области значительно возросло (рис. 3а, 3е). Интенсивное маркирование (65 ± 4.2 ЕОП) выявлено в популяции удлиненных клеток 4-го типа, тангенциально мигрирующих в перивентрикулярной зоне (рис. 3а, табл. 1). Количество умеренно и интенсивно маркированных клеток 2-го типа также изменялось (рис. 3е). После травмы в перивентрикулярной зоне обнаружены реактивные нейрогенные ниши (рис. 3а). Морфологический состав реактивных нейрогенных ниш (РНН) отличался от такового конститутивных нейрогенных ниш (КНН), в частности РНН содержали интенсивно маркированные клетки 2-го и 3-го типов и иммунонегативные клетки (рис. 3а). От РНН часто можно было проследить участки клеточной миграции, содержащие иммунонегативные клетки, направленные в зону травмы.

Характерной чертой посттравматического процесса в стволе мозга молодежи кеты является появление реактивных нейрогенных зон паренхиматозной локализации (рис. 3б). Такие области содержали многочисленные иммунонегативные скопления клеток в различных слоях МРФ перешейка, медиального и латерального отделов тегмента. В составе реактивных паренхиматозных нейрогенных ниш были идентифицированы клетки 1 и 2-го типов.

Обнаружение PCNA+ клеток во вторичных матричных зонах стало другой характерной особенностью в посттравматическом тегменте. Одной из таких зон являлся базальный тегмент, внешние границы которого прилегают к ангулярной комиссуре (рис. 3в). В этой области после травмы тегмента молодежи кеты мы обнаружили как отдельные интенсивно и умеренно маркированные PCNA клетки (рис. 3в), так и РНН (рис. 3г). У интактных животных иммуномаркирование PCNA в базальном тегменте выявлено не было. Маркирование PCNA в базальном тегменте после травмы отличалось неоднородностью: в медиальной части преобладали нейрогенные ниши (рис. 3г), в латеральной PCNA+ клетки имели многоядную организацию (рис. 3д).

HuCD в тегменте кеты. Маркирование нейронального протеина HuCD выявлено в гетерогенной популяции нейронов, находящихся на различных стадиях дифференциации (рис. 4а, 4б, 4г, 4е, табл. 1). В медиальном тегменте HuCD+ нейроны с недифференцированным фенотипом содержатся в субвентрикулярной зоне и более глубоких слоях (рис. 4а). В зоне первичной пролиферации маркированных клеток не было выявлено за исключением одиночных слабо маркированных мелких элементов, которые мы рассматривали в качестве нейродетерминированных клеток (рис. 4б, 4в). В базальной части перивентрикулярной зоны латерального тегмента найдены группы недифференцированных интенсивно маркированных клеток, представляющее собой популяцию конститутивно образованных клеток, расположенных в базальной части перивентрикулярной области и проникающих в более глубокие субвентрикулярные слои (рис. 4б).

Здесь же были идентифицированы интенсивно маркированные нейроны 2-го и 3-го типов и плотные скопления иммунонегативных клеток, формирующих локальные группы (рис. 4а, 4б). Крупные скопления недифференцированных HuCD+ нейронов в латеральном тегменте располагались вокруг проводящих путей, в частности латерального продольного пучка (рис. 4в). Зоны повышенной плотности распределения клеток, включающие как HuCD+, так и HuCD- клетки, окрашенные метиловым зеленым, были выявлены вдоль росто-каудальной оси мозга, а также в медиолатеральной плоскости, охватывающей территории полулунного валика (ПВ), МРФ и ДМТ (рис. 4а–4в). В этих мезенцефалических зонах наблюдались высокие нейроглиальные индексы, свидетельствующие об интенсивных процессах конститутивного нейрогенеза (рис. 5).

Другим участком повышенной плотности распределения клеток мы считаем ядро перешейка (ЯП) (рис. 4г), которое содержит гетерогенную популяцию HuCD+ клеток, включающую крупные проекционные мультиполярные клетки 4-го типа, узкие биполярные нейроны 3-го типа, умеренно маркированные псевдоуниполярные (2-го типа) и мелкие недифференцированные интенсивно маркированные клетки 1-го типа (рис. 4г, табл. 1). Морфологические особенности организации ЯП в мозге кеты свидетельствует о различной функциональной специализации нейронов и, по-видимому, отражают морфогенетические особенности конститутивного нейрогенеза. Зона РФ, прилежащая к ЯП, представлена более ограниченным количеством нейрональных типов, в частности здесь преобладают биполярные нейроны ретикулярного типа и псевдоуниполярные нейроны (рис. 4г). Плотность распределения ней-

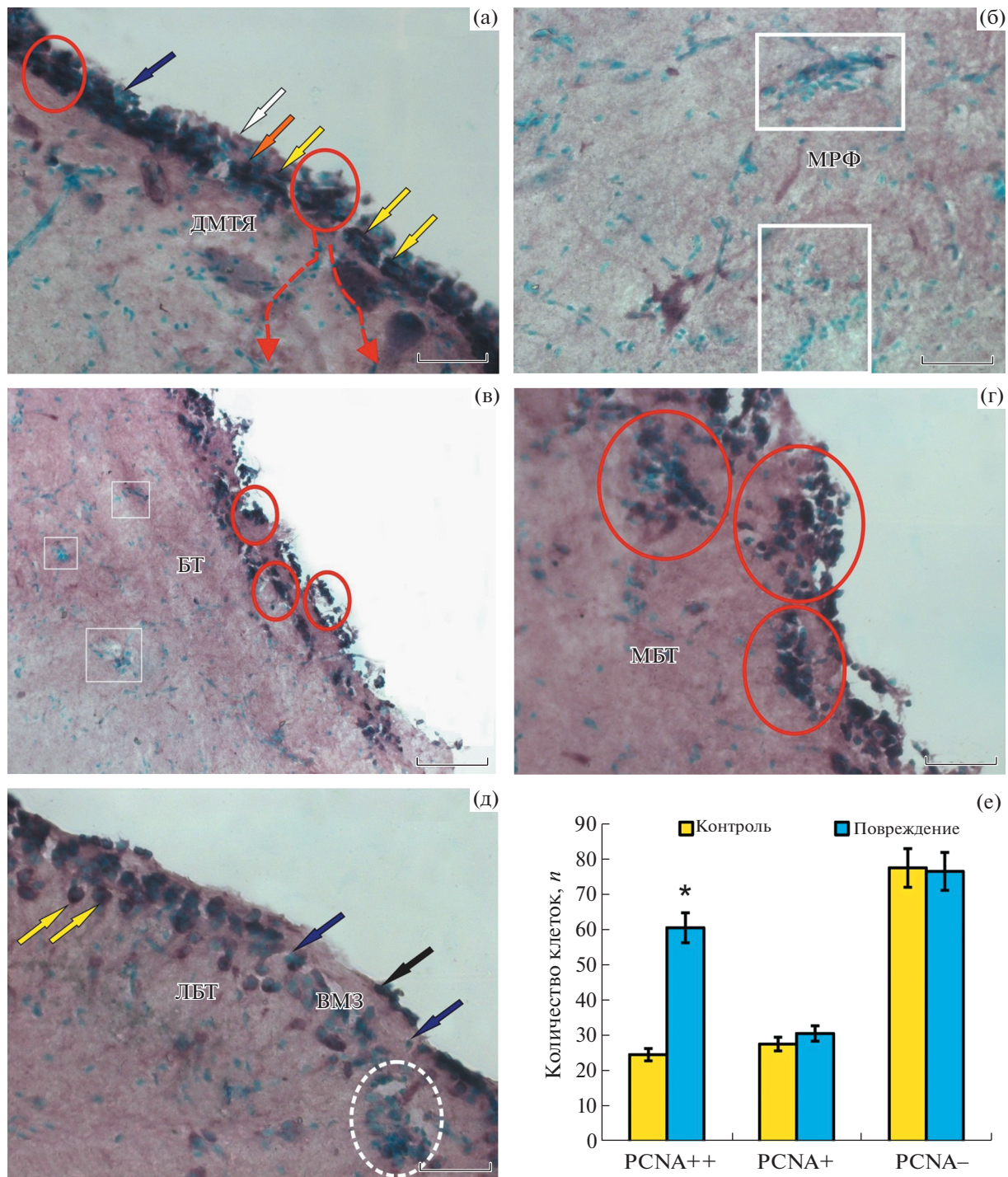


Рис. 3. Локализация PCNA в мезенцефалическом тегментуме молодежи кеты *Oncorhynchus keta* через 3 дня после травматического повреждения. (а) – в дорсомедиальном тегментуме, желтыми стрелками обозначены мигрирующие PCNA-маркированные клетки, в красных овалах реактивные нейрогенные ниши, красным пунктиром обозначено направление миграции клеток, (б) – фрагмент МРФ, содержащий PCNA-нейрогенные ниши паренхиматозной локализации (оконтурены белыми прямоугольниками), (в) – вторичные пролиферативные зоны в базальном тегментуме (БТ), (г) – на большем увеличении, (д) – в латеральной части базального тегментума (ЛБТ), черными стрелками показаны поверхностные PCNA-маркированные клетки, белым овалом оконтурена РНН в субвентрикулярной зоне. Иммунопероксидазное маркирование PCNA в сочетании с окраской метиловым зеленым. Масштабный отрезок: (а, б, г, д) – 50 мкм, (в) – 100 мкм; (е) – соотношение интенсивно и умеренно PCNA-маркированных клеток ($M \pm m$) и окрашенных метиловым зеленым ядер в ПВЗ дорсомедиального тегментума ($n = 5$ в каждой группе; * $P < 0.01$ – достоверные отличия от контрольной группы).

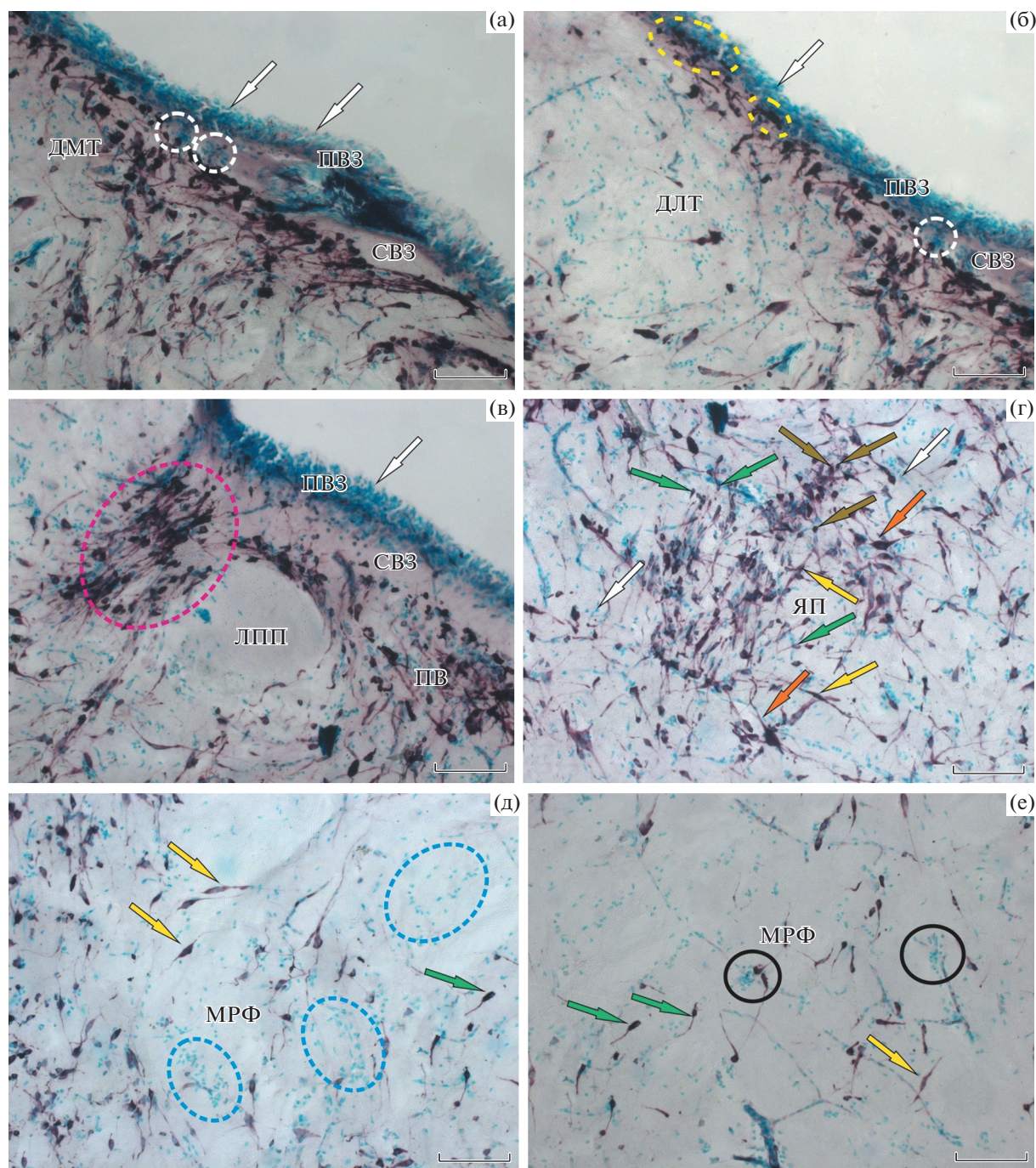


Рис. 4. Локализация HuCD в мезенцефалическом тегментуме молоди кеты *Oncorhynchus keta*. (а) – в ДМТ, белыми стрелками показаны HuCD– клетки, белыми овалами околтурены КНН, (б) – в ДЛТ, желтыми пунктирными овалами околтурены HuCD+ клетки в базальной части ПВЗ, (в) – в ЛТ, розовым овалом околтурено скопление недифференцированных HuCD+ нейронов вокруг латерального продольного пучка (ЛПП), с другой стороны к которому приывают нейрональные скопления полулунного валика (ПВ), (г) – в ядре перешейка (ЯП), оранжевые стрелки показывают крупные мультиполярные нейроны, желтые – узкие биполярные нейроны, коричневые стрелки – недифференцированные плотно окрашенные нейроны, зеленые стрелки – умеренно маркированные псевдоуниполярные нейроны, (д) – в переходной зоне между ЯП и МРФ, в голубых овалах диффузные кластеры HuCD– клеток, (е) – в МРФ, черными овалами околтурены КНН паренхиматозной локализации. Иммунопероксидазное маркирование HuCD в сочетании с окраской метиловым зеленым. Масштабный отрезок: 100 мкм.

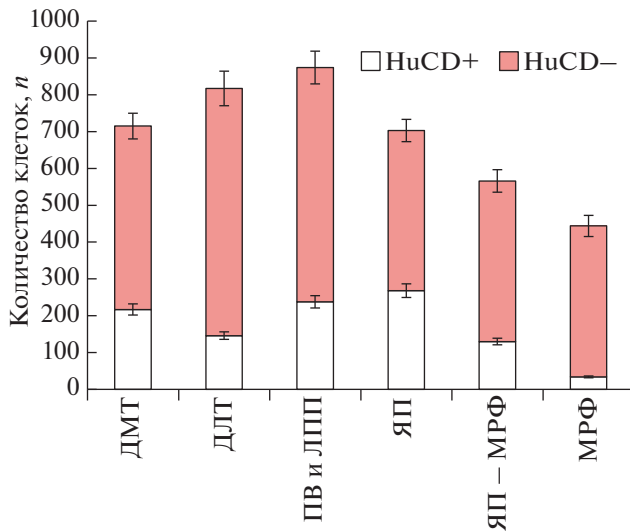


Рис. 5. Количественное соотношение NuCD+ и NuCD- клеток в мезенцефальском тегменте интактной молодежи кеты *Oncorhynchus keta* ($M \pm m$). Обозначения: см. список сокращений.

ронов в МРФ более низкая по сравнению с ЯП (рис. 5). Особенности нейроглиальных отношений в ростральной и каудальной областях МРФ свидетельствуют, что в ростральной МРФ (рис. 4д) распределение глиальных клеток носит более диффузный характер по сравнению с каудальной областью (рис. 4е), для которой характерно наличие конститутивных нейрогенных ниш паренхиматозной локализации.

HuCD в стволе мозга кеты после повреждения.

После повреждения тегмента в субвентрикулярной зоне ДМТ были найдены дифференцированные формы интенсивно маркированных биполярных клеток в субвентрикулярной зоне (СВЗ) (рис. 6а), отсутствующие у контрольных животных. Другой характерной особенностью тегментальной зоны после травмы стало значительное увеличение плотности распределения других дифференцированных типов нейронов (мультиполярных и грушевидных) и появление крупных проекционных клеток (рис. 6а). Мы полагаем, что одним из посттравматических эффектов является ускоренная нейрональная дифференциация клеток тегментальной области и МРФ.

Базальная часть перивентрикулярной зоны, зона миграции и СВЗ содержали NuCD+ клетки, имеющие фенотип РГ (рис. 6б). Клетки ПВЗ и СВЗ интенсивно маркированы NuCD (62 ± 3.2 ЕОП); расположенные между ними мигрирующие клетки характеризовались слабым (50 ± 2.7 ЕОП) или умеренным (56 ± 2.6 ЕОП) маркированием NuCD цитоплазмы и крупным центрально расположенным ядром (рис. 6б). Появление паттерна эпенди-

мо-радиоглиального фенотипа NuCD+ клеток, наряду с эпендимо-глиальным, является одной из характерных особенностей посттравматического нейрогенеза в тегменте кеты.

Мы выявили значительные морфологические изменения в тегменте молодежи кеты, содержащем зону повреждения (рис. 6в). В дорсальной части тегмента плотность распределения NuCD- клеток, окрашенных метиловым зеленым, была настолько высока, что мигрирующие клетки практически полностью заполняли просвет травмы, формируя плотную “пробку” в просвете раневого канала (рис. 6в). В средней зоне раневого канала, расположенной в медиальной части тегмента, просвет травмы можно было идентифицировать, однако, по обе стороны от области травмы располагалось большое количество мигрирующих клеток (рис. 6в). В вентральной части тегмента было выявлено крупное скопление NuCD+ клеток, содержащих нейроны на различных стадиях дифференциации (рис. 6в, 6г). Данное скопление NuCD+ клеток, расположенное в вентральной зоне травмы, мы рассматривали в качестве очага реактивного нейрогенеза. На территории МРФ были обнаружены NuCD+ клетки, имеющие дифференцированный фенотип, окруженный популяцией иммунонегативных клеток, мигрирующих к зоне повреждения (рис. 6д). Плотность распределения NuCD- клеток в различных частях МРФ значительно превышала таковую у контрольных животных. На территории МРФ были идентифицированы зоны репаративного нейрогенеза, содержащие клетки на различной стадии нейрональной дифференциации, отсутствующей у контрольных животных (рис. 6е).

GFAP в тегменте кеты. Маркирование глиального фибриллярного кислого белка в ДМТ молодежи кеты выявляло отдельные интенсивно маркированные клетки 2-го типа в базальной части ПВЗ (82.8 ± 0.8 ЕОП), волокна радиальной глии и фрагменты маркированных волокон проводящих путей дорсального тегмента (рис. 7а, табл. 1). В поверхностной части ПВЗ содержались мелкие клетки с умеренным (55.8 ± 7.4 ЕОП) маркированием цитоплазмы GFAP (рис. 7б). Интенсивно маркированные GFAP клетки базальной части ПВЗ формировали однослойный пласт, либо локальные конститутивные нейрогенные ниши (КНН) (рис. 7а, 7б). От отдельных КНН тянулись радиальные пучки GFAP+ волокон РГ (рис. 7б), которые проходили через СВЗ по направлению к глубоким слоям тегмента и МРФ (рис. 7а). В ПВЗ и СВЗ латерального тегмента отчетливо выявлялись тангенциально расположенные GFAP+ волокна (рис. 7в). Среди них располагались отдельные овальные и средние интенсивно маркированные клетки (табл. 1) и многочисленные

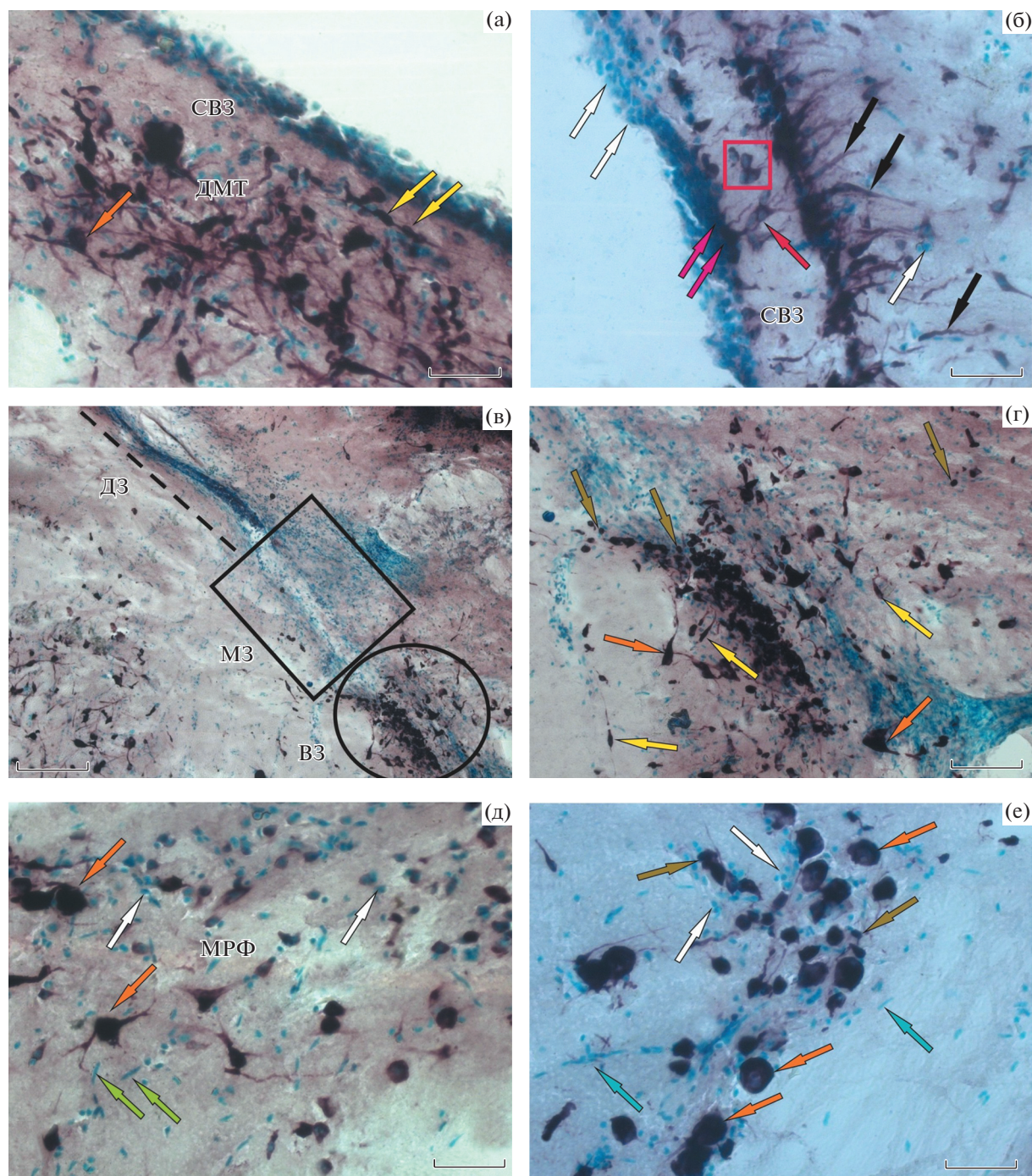


Рис. 6. Локализация HuCD в мезенцефалическом тегментуме молоди кеты *Oncorhynchus keta* через 3 дня после травматического повреждения. (а) – в ДМТ, желтыми стрелками показаны биполярные дифференцированные нейроны, оранжевой – мультиполярная клетка, (б) – в СВЗ, красными стрелками показаны HuCD-маркированные клетки, имеющие фенотип радиальной глии, красным квадратом околтурен кластер мигрирующих клеток, белой стрелкой показано скопление HuCD-эпендимоглиальных клеток, черными – волокна радиальной глии, (в) – общий вид зоны повреждения, пунктиром обозначена дорсальная зона травмы (ДЗ), в квадрате – медиальная зона (МЗ), в овале – вентральная зона (ВЗ), (г) – вентральная зона травмы на большем увеличении, (обозначения как на рис. 3г), (д) – в МРФ, (е) – в зоне репаративного нейрогенеза на территории МРФ, голубыми стрелками показаны мигрирующие HuCD-клетки, остальные обозначения как на рис. 3г. Иммунопероксидазное маркирование HuCD в сочетании с окраской метиловым зеленым. Масштабный отрезок: (а, б, д, е) – 50 мкм, (в) – 200 мкм, (г) – 100 мкм.

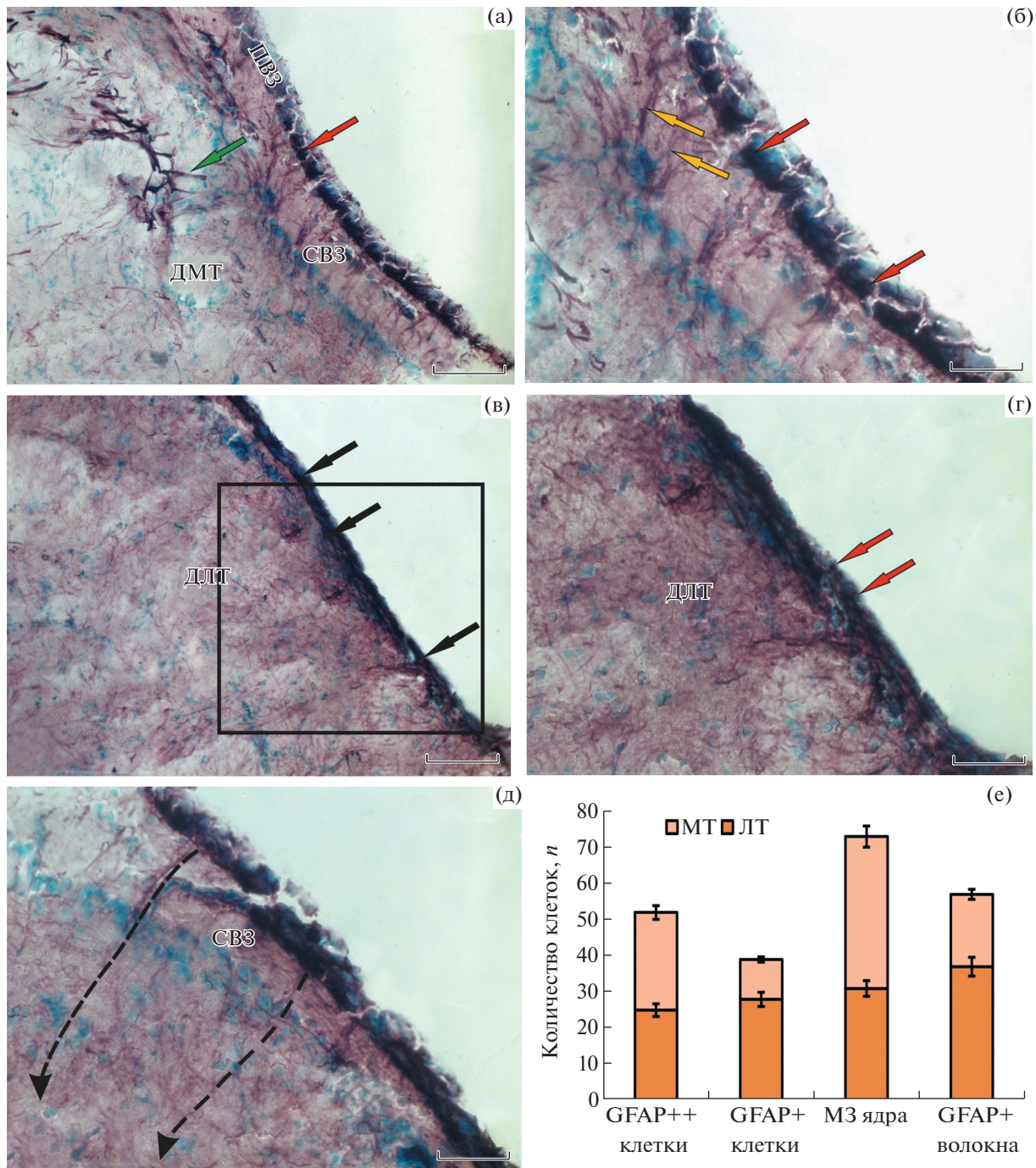


Рис. 7. Локализация GFAP в мезенцефалическом тегментуме молоди кеты *Oncorhynchus keta*. (а) – в ДМТ, красной стрелкой показаны тела клеток радиальной глии, зеленой – маркированные волокна проводящих пучков, (б) – на большем увеличении, желтыми стрелками показаны волокна радиальной глии, (в) – в ДЛТ, черными стрелками показаны тангенциальные GFAP+ волокна, (г) – на большем увеличении, (д) – в дорсальном тегментуме, пунктиром обозначены направления радиальной миграции клеток. Иммунопероксидазное маркирование GFAP в сочетании с окраской метиловым зеленым. Масштабный отрезок: (а, в) – 100 мкм, (б, г, д) – 50 мкм; (е) – соотношение GFAP-маркированных клеток и волокон, и окрашенных метиловым зеленым ядер в медиальном (МТ) и латеральном (ЛТ) тегментуме ($M \pm m$).

GFAP– клетки (рис. 7г). В ДЛТ пучки радиально ориентированных волокон были немногочисленны (рис. 7в). В дорсальном тегментуме пучки

GFAP+ РГ пронизывали субвентрикулярные скопления GFAP– клеток (рис. 7д). Вдоль волокон РГ прослеживались паттерны клеточной ми-

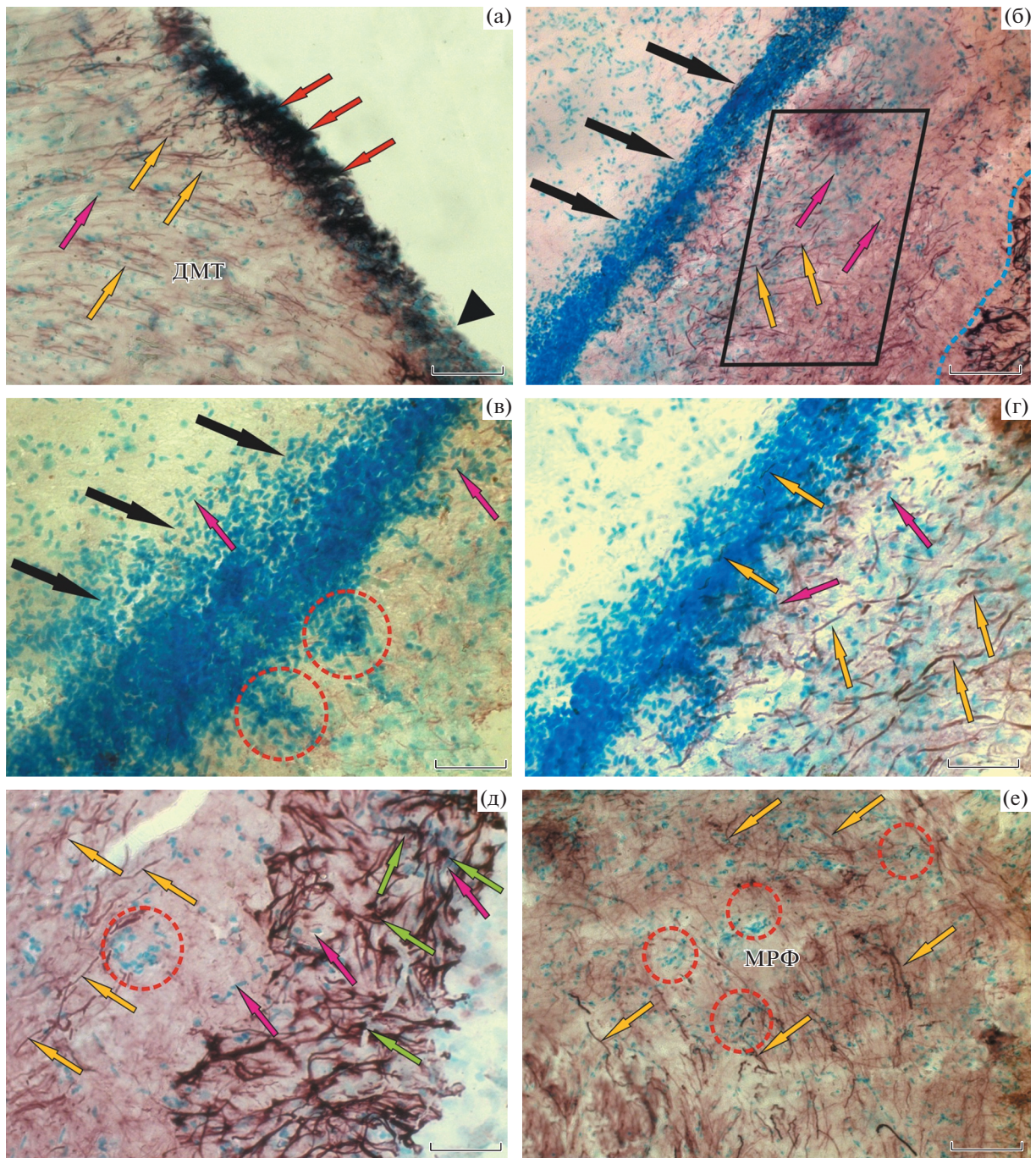


Рис. 8. Локализация GFAP в мезенцефалическом тегменте молодежи кеты *Oncorhynchus keta* через 3 дня после травматического повреждения. (а) – в ДМТ, черной треугольной стрелкой показан участок лишенный GFAP-позитивности, розовыми стрелками показаны мигрирующие GFAP- клетки, остальные обозначения как на ба, бб, (б) – общий вид зоны травмы, черными стрелками показана зона раневого канала, заполненная мигрирующими клетками, черным контуром выделена зона, содержащая радиальные волокна (желтые стрелки) и мигрирующие клетки (розовые стрелки), голубым пунктиром ограничена область интенсивно GFAP маркированной сети, (в) – на большем увеличении зона травмы, красным пунктиром ограничены РНН, (г) – на большем увеличении зона радиальной миграции, (д) – на большем увеличении зона посттравматического глиоза, зелеными стрелками показаны клетки реактивной глии, (остальные обозначения см. а–г), (е) – реактивные нейрогенные ниши и GFAP+ волокна в МРФ. Иммунопероксидазное маркирование GFAP в сочетании с окраской метиловым зеленым. Масштабный отрезок: (а, в, г, д) – 50 мкм, (б, е) – 100 мкм.

грации. Соотношение GFAP+ и GFAP– клеток и волокон в медиальной и латеральной зонах тегмента приведено на рис. 7е.

GFAP в стволе мозга кеты после повреждения. После травматического повреждения тегмента количество GFAP-маркированных клеток значительно возросло, при этом интенсивность иммуномаркирования в большинстве типов клеток варьировала от умеренной до высокой (рис. 8а, табл. 1). В ПВЗ интенсивно маркированные GFAP клетки образовывали многоядные скопления, вертикально пронизывающие всю толщу ПВЗ. Такие скопления были достаточно протяженными и чередовались с областями, лишенными GFAP+ клеток (рис. 8а). От перивентрикулярных областей, содержащих GFAP+ клетки, отходили иммунопозитивные волокна РГ, вдоль которых наблюдались паттерны массовой миграции GFAP– клеток (рис. 8а).

Повреждение мезенцефалического тегмента сопровождалось формированием зоны GFAP– клеток, заполняющих зону прокола прилежащей к зоне миграции, содержащей GFAP+ волокна РГ, вдоль которых мигрируют GFAP– клетки; и пространственно более удаленную зону реактивного глиоза, содержащую GFAP+ клетки и волокна (рис. 8б). В зоне травмы идентифицированы многочисленные мигрирующие из различных областей мозга клетки, заполняющие раневой канал и формирующие скопления различной плотности в периферической зоне (рис. 8в). Зона радиальной миграции содержит GFAP+ волокна реактивной РГ, являющиеся направляющими для многочисленных мигрирующих в зону повреждения GFAP– клеток (рис. 8г). Наиболее удаленные в латеральном направлении от области травмы зоны содержали интенсивно GFAP-маркированные тела клеток 2-го и 3-го типов, РГ и отдельные GFAP+ волокна (рис. 8д, табл. 1). Эти зоны, отсутствующие в тегменте интактных животных, мы рассматриваем как области реактивного глиоза, возникающие в ответ на травматическое повреждение тегмента. После травмы на территории МРФ критически возросло количество GFAP– реактивных паренхиматозных нейрогенных ниш и GFAP+ волокон (рис. 8е).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе регенеративной способности рыб, были разработаны различные модели повреждения мозга взрослых животных (Grandel et al., 2006; Adolf et al., 2006; Lam et al., 2009; März et al., 2010; Ganz et al., 2010; Kishimoto et al., 2012). Благодаря таким исследованиям были выяснены особенности распространения эндо-

генных нейрональных предшественников в ПВЗ, латеральная миграция нейрональных предшественников от ПВЗ к месту повреждения и дифференциация нейронов в области травмы.

Конститутивный нейрогенез участвует в непрерывном росте мозга или обновлении нейронов в разных функциональных условиях у животных (Grandel, Brand, 2013). НСК взрослых животных, включая латентные НСК в не нейрогенных регионах мозга, также могут также быть мобилизованы для регенерации в ответ на повреждение ЦНС (Grandel, Brand, 2013; Christie, Turnley, 2013). В частности, многие не млекопитающие позвоночные способны эффективно восстанавливать поврежденный мозг путем мобилизации НСК и клеток-предшественников (Grandel, Brand, 2013). Специфические различия в регенеративной способности и увеличении нейрогенных областей у позвоночных, по-видимому, коррелируют с филогенетическими взаимоотношениями (Ferretti, 2011). Эти различия частично могут быть вызваны отличающимся потенциалом взрослых НСК. У костистых рыб регенерация двигательных нейронов и дофаминергических нейронов может быть индуцирована в среднем мозге новорожденного животного и, соответственно, после специфической травмы (Parish et al., 2007; Zupanc, Sirbulescu, 2011).

Пролиферативная активность в тегменте молоди кеты в условиях интактности и после механической травмы

В результате проведенных исследований установлено, что на территории мезенцефалического тегмента молоди кеты присутствуют пролиферирующие клетки, маркированные с помощью PCNA, расположенные в составе перивентрикулярной зоны. Плотность распределения клеток неодинаковая, встречаются отдельно расположенные клетки, а также их скопления, формирующие зоны конститутивного нейрогенеза. Именно КНН являются источником новых нейронов в тегменте молоди кеты, участвующие в перистентном пополнении клетками двигательных центров тегмента (ДМТЯ), ядер глазодвигательного комплекса, ЯП и МРФ.

Наряду с плотно окрашенными клетками в ПВЗ были идентифицированы клетки с умеренным уровнем маркирования PCNA, расположенные обычно в поверхностном слое ПВЗ. Согласно данным литературы PCNA маркирует дополнительную ДНК-полимеразу сигма, сохраняющуюся в клетке в течении 24 ч после окончания митоза (Wullimann, Puelles, 1999), однако уровень активности PCNA снижается на 30% (Bravo, Macdonald-Bravo, 1987). Это дает возможность маркировать

как клетки, находящиеся в состоянии пролиферации, так и недавно вышедшие из митоза и находящиеся в состоянии миграции. В наших исследованиях в ПВЗ молоди кеты были обнаружены как интенсивно маркированные PCNA клетки, так и клетки со сниженной интенсивностью иммуномаркирования. Таким образом, в ПВЗ молоди кеты, как и у молоди осетра (Пущина и др., 2007) и сима (Pushchina et al., 2017) клетки находятся на различных стадиях клеточного цикла, что можно эффективно диагностировать с помощью иммуномаркирования PCNA. Как показали исследования Мюллера и Вуллимана (Mueller, Wullimann, 2003), маркирование пролиферативных областей данео с помощью PCNA адекватно отражает нейромерную организацию мозга, что подтверждается с помощью иммуногистохимического маркирования бромдезоксисуридином (BrdU) и радиоавтографических исследований (Zupanč, 2001).

Исследования на молоди кеты показали, что в латеральной и дорсомедиальной областях тегмента количество умеренно маркированных PCNA клеток отличается незначительно, тогда как число интенсивно маркированных клеток в ДМТ существенно превышает таковое в ДЛТ (рис. 2е). Таким образом, число клеток в ДМТ, находящихся в состоянии активной пролиферации существенно выше, чем в ДЛТ. Данные количественного анализа соответствуют также увеличенному числу КНН, идентифицированных нами на территории ДМТ. Здесь же были обнаружены клетки с умеренным маркированием PCNA, мигрировавшие в СВЗ. Мы полагаем, что они конститутивно пополняют популяцию нейронов ДМТЯ в тегменте молоди кеты. На территории медиального тегмента, в зоне локализации сосудистого сплетения продолговатого мозга, количество PCNA+ клеток было минимальным (рис. 2е) что, по-видимому, связано с морфофункциональной специализацией данного отдела мозга, подтверждающейся наличием гиперваскуляризации и прилежащими периваскулярными массами клеток.

Тегментум молоди кеты в целом образован гетерогенными клеточными скоплениями, которые в некоторых областях содержали повышенное количество PCNA+ кластеров, формирующих структуру нейрогенных ниш. Такие области, как правило, чередовались с участками сниженной либо отсутствующей пролиферативной активности. Подобная структура тегмента молоди кеты хорошо подтверждает нейромерную организацию, описанную в работах Вуллимана и Пуеллиса (Wullimann, Puellas, 1999). Клетки PCNA-негативных областей большинство авторов определяют как стимулированные к дифференциации (Bravo,

Macdonald-Bravo, 1987; Mueller, Wullimann, 2002; Wullimann, Mueller, 2004; Candal et al., 2005), поскольку в таких областях обнаружены не только транскрипционные факторы Pax6, Zash-1a, Zash-1b, neurogenin 1, neuro-D (маркеры нейродетерминации), но и HuCD – маркер нейрональной дифференциации. Наконец, в тегментуме кеты были выявлены зоны с высокой интенсивностью миграции PCNA-клеток. Полученные результаты свидетельствуют, что обширные клеточные массы МРФ тегмента кеты пополняются не только в период эмбриогенеза, но и в постэмбриональный период развития.

После травматического повреждения тегмента количество PCNA+ клеток в ПВЗ достоверно возрастало по сравнению с контролем. Число умеренно маркированных и негативных клеток не отличалось от уровня у контрольных животных (рис. 3е). Таким образом, после травмы в ПВЗ тегмента кеты мы регистрировали появление популяции удлинённых, интенсивно PCNA-маркированных клеток, находящихся в состоянии тангенциальной миграции. Подобный тип клеток был ранее зарегистрирован нами в мозжечке сима после травматического повреждения (Стуканева и др., 2017). Мы полагаем, что кинетика пролиферации в посттравматический период значительно превышает показатели у интактных животных. Об этом свидетельствует специфический фенотип интенсивно PCNA-маркированных удлинённых клеток, отсутствующих в условиях интактности. Таким образом, в посттравматический период продукция постмитотических PCNA+ клеток в ПВЗ тегмента молоди кеты значительно возрастает, что соответствует ранее полученным результатам на молоди сима (Стуканева и др., 2017; Пущина и др., 2017).

Другой особенностью мы считаем появление многочисленных PCNA-реактивных нейрогенных ниш паренхиматозной локализации. Большинство таких клеточных скоплений найдено на территории МРФ. Наконец, появление пролиферирующих клеток и РНН в зонах вторичной пролиферации (базальный тегментум) является неотъемлемой чертой посттравматической пролиферации в тегментуме кеты.

Методом маркирования PCNA у *Carassius carassius* исследована пролиферативная активность мезенцефалических матричных зон (Margotta et al., 2002). Было установлено, что паттерны митотически активных клеток мозга у этого вида формируют морфогенетические поля – матричные зоны. Наличие таких полей характерно только для костистых рыб, у амфибий и рептилий их нет (Margotta et al., 2002). Проллиферативные зоны мозга были идентифицированы и у других видов рыб: у трехглазой колюшки (Ekstrom et al., 2001), аптеро-

нотуса (Zupank, 1999, 2001), данио (Rink, Wullmann, 2001), симы (Pushchina et al., 2017).

Исследование пространственной организации и временного регулирования пролиферации НСК в развивающемся тегментуме показало, что в простейшем варианте пролиферативная фаза активности нейроэпителия состоит, по меньшей мере, из трех, частично перекрывающихся этапов (Nakamura, 2013). Первый – этап экспансивного распространения, при котором НСК делятся симметрично, количество НСК увеличивается экспоненциально и формирующийся нейроэпителий расширяется тангиально. Второй – асимметричной нейрогенной пролиферации, который подразделяется на ряд подэтапов. Третий этап представлен глиогенной пролиферацией. Дальнейшие исследования позволили установить, что пролиферативная активность начинается и пространственно организуется вокруг области перешейка (Rapasoli et al., 2012). Эта пространственно-временная организация требует модуляцию скорости распространения, определенное время выхода из клеточного цикла для детерминации, дифференциации и т.д. Данные параметры регулируются как функция времени и положения вдоль росто-каудальной и медиолатеральной осей мозга. Несколько специфических белков: факторы роста, рецепторы, транскрипционные факторы и другие сигнальные белки участвуют в этом регулировании (Ahmed et al., 2009). Факторы роста действуют в восходящем регуляторном потоке, а их рецепторы, нисходящие эффекторы и мишени транскрипционных факторов, соответственно в нисходящем регуляторном потоке клеточного цикла, контролирующего специфические белки (циклины, киназы и т.д.).

Нейрогенез в тегментуме молодежи кеты в условиях интактности после механической травмы

ИГХ маркирование нейронального протеина NuCD в тегментуме молодежи кеты выявило гетерогенную популяцию клеток, расположенных за пределами СВЗ и в более глубоких слоях тегментума. Эти нейроны находились на различных стадиях дифференциации, что, однако, не исключало их участия в функциональной активности локальных нейрональных сетей мезенцефалона, в частности МРФ и дорсального тегментума. Отдельные области нейрональной дифференциации мы находили в базальной части ПВЗ и СВЗ латерального тегментума. Области значительного скопления недифференцированных нейронов, маркируемых NuCD, часто прилежали к проводящим пучкам мезенцефалона или располагались в сенсорных областях тегментума (полулунный валик), содержащих большие скопления диффе-

ренцирующихся нейронов, что соответствует ранее полученным данным на тилипии *Oreochromis mossambicus* (Teles et al., 2012), *Gymnotus omarorum* (Olivera-Pasilio et al., 2014) и *Oncorhynchus mikiss* (Пушина и др., 2016).

В ходе проведенного анализа внутренних областей тегментума и зоны перешейка мы исследовали нейронный состав ядра перешейка (ЯП), переходной области ЯП и МРФ и непосредственно МРФ. Исследования показали, что ЯП характеризуется сложным гетерогенным клеточным составом. Мы идентифицировали различные типы нейронов, отличающихся по морфофункциональным характеристикам. Наиболее крупные мультиполярные нейроны с хорошо выраженными дендритами, очевидно принадлежат к популяции проекционных длинноаксонных нейронов, осуществляющих интегративные функции в ядре (Butler, Hodos, 2005), а удлинённые биполярные клетки с развитыми дендритами выполняют функцию интернейронов (Butler, Hodos, 2005). Наше особое внимание привлекли крупные скопления интенсивно и умеренно маркированных NuCD мелких недифференцированных нейронов. Такие клетки, обычно характеризующиеся псевдоуниполярной морфологией, имели единственный слабо развитый и малоразветвленный отросток. Они формировали группы в структуре которых прослеживались признаки морфотопографической поляризации. Подобные кластеры нейронов мы склонны рассматривать как дифференцирующиеся модули в составе ЯП. Помимо сложной citoархитектонической структуры в ЯП были выявлены многообразные пространственные нейроглиальные отношения. Переходная зона между ЯП и РФ ствола характеризовалась выраженной градиентностью по плотности распределения нейронов и глии. В этой области мы идентифицировали диффузно организованные кластеры NuCD– клеток, расположенные среди NuCD+ клеток ретикулярного типа с би- и псевдоуниполярной морфологией. На территории МРФ плотность распределения NuCD+ нейронов указанного типа была минимальной (рис. 5), однако более выраженными были кластеры NuCD– клеток, прилежащие к нейронам. Такие кластеры мы рассматривали в качестве конститутивных паренхиматозных нейрогенных ниш. Это свидетельствует об интенсивных процессах персистентного нейрогенеза, наблюдающегося у молодежи кеты не только в ПВЗ, но и в паренхиме мозга.

После травматического повреждения тегментума мы выявили появление дифференцированных нейронов с высокой интенсивностью маркирования NuCD в СВЗ и расположенных непосредственно под ней участках дорсомедиального тегментума. В этих же областях наблюдалась об-

шее увеличение нейронов и глии, что согласуется с результатами маркирования NuCD у форели (Пущина и др., 2016). Другой характерной особенностью посттравматического нейрогенеза стало появление NuCD+ клеток с эпендимо-радиогиальным фенотипом в СВЗ. Такие клетки не были выявлены нами у интактных животных, но появлялись в тегментуме после травмы наряду с популяцией NuCD— эпендимогиальных предшественников.

Наиболее яркой и характерной чертой посттравматического нейрогенеза в тегментуме молодежи стало обнаружение локальных паренхиматозных NuCD+ очагов клеток, имеющих гетерогенный состав. Наиболее крупное скопление таких клеток было найдено в вентральной зоне травмы. Оно включало нейроны различных морфологических характеристик: от дифференцированных крупных мультиполярных нейронов до мелких недифференцированных клеток без отростков с высокой плотностью распределения, составляющих большую часть популяции. Следует отметить, что на всем протяжении зона травмы содержала значительное количество NuCD— мигрирующих клеток, заполняющих область травмы и прилежащие к ней участки мозга. Мы полагаем, что данная зона посттравматического нейрогенеза возникла на основе одного из дефинитивных нейрональных центров, что объясняет наличие в нем дифференцированных нейронов. Центры посттравматического нейрогенеза были описаны также в тегментуме данио (Than-Trong, Bally-Cuif, 2015). Мы полагаем, что формирование подобных центров в тегментуме молодежи кеты является одним из критериев высокого нейрогенного потенциала, о чем свидетельствуют и другие, менее крупные, зоны посттравматического нейрогенеза, обнаруженные в прилежащих областях МРФ.

Глиогенез в тегментуме молодежи кеты в условиях интактности после механической травмы

В тегментуме молодежи интактной кеты GFAP маркирует достаточно однородную популяцию недифференцированных клеток с длинными радиально ориентированными отростками, расположенных в базальной части ПВЗ. Мы полагаем, что данная популяция GFAP+ радиальной глии является базовым источником конститутивного нейрогенеза в тегментуме молодежи кеты. Ранее популяция GFAP+ радиальной глии была описана вдоль всего просвета желудочка мозга у карпа *Cyprinus carpio* (Kálmán, 1998), форели (Alumni et al., 2005), колючей собачки *Squalus acanthias*, ската *Raia erinacea* (Kálmán, Gould, 2001) и других рыб.

Сведения о распределении GFAP в мозге различных видов рыб на сегодняшний день носят не-

сколько противоречивый характер. В исследованиях на радужной форели были обнаружены лишь немногочисленные типичные астроциты, расположенные рядом с крупными проводящими пучками мозга у взрослых животных, и отсутствующие у молодежи (Alumni et al., 2005). У *Barbus comiza* (Bodega et al., 1993) выявлены фиброзные астроциты, наличие которых не было подтверждено в других исследованиях (Onteniente et al., 1983; Rubio et al., 1992; Kalman, 1998). Немногочисленные астроциты найдены в продолговатом мозге карпа (Kalman, 1998). GFAP-иммунопозитивные астроциты выделены в первичной культуре молодежи радужной форели (Fröjdö et al., 2002). Звездчатые астроциты выявлены в белом веществе спинного мозга данио в ходе трехмерной сагиттальной реконструкции (Kawai et al., 2001). Некоторые данные указывают, что у рыб присутствие астроцитов филогенетически связано с толщиной церебральной стенки (Wasowicz et al., 1999).

Распределение GFAP+ РГ в тегментуме молодежи кеты неоднородное. Очевидно, GFAP+ клетки формируют матричные зоны, которые чередуются с областями пониженной пролиферативной активности. В пользу этого предположения указывают данные количественного анализа, свидетельствующие, что плотность распределения GFAP+ РГ в ДЛТ значительно выше, чем в ДМТ (рис. 7е). Поскольку РГ в ПВЗ мозга рыб пролиферирует в основном путем асимметричных митозов (Fishell, Kriegstein, 2003; Noctor et al., 2004), у части клеток, расположенных в ПВЗ, радиальные отростки не прослеживаются. Отсутствие радиальных отростков у интенсивно маркированных GFAP клеток может также объясняться сугубо техническими причинами: отросток либо не попадает в плоскость среза, либо может пересекаться во время резки материала.

Результаты иммуноблоттинга на форели показали наличие в мозге двух изоформ GFAP: легкой 50–52 кДа и тяжелой – 90 кДа (Alumni et al., 2005). Легкая изоформа была обнаружена у личинок форели, а также в продолговатом и спинном мозге взрослых особей. Тяжелая изоформа содержалась преимущественно в переднем мозге взрослой форели и выявлялась в гомогенатах мозга личинок (Alumni et al., 2005). Наличие альтернативных изоформ GFAP, согласно предположению авторов, может указывать на существование гетерогенных популяций астроцитов, присутствующих одновременно в мозге форели на разных стадиях онтогенеза.

GFAP-позитивные волокна обнаружены нами в составе проводящих пучков тегментума молодежи кеты. Некоторые волокна, распространяющиеся в тангенциальном направлении, например в области ДЛТ, как мы полагаем, также скорее вы-

полняют структурную роль направляющих для тангенциального перемещения клеток. Мы полагаем, что наличие GFAP, входящего в состав промежуточных филаментов, объясняется его участием в качестве структурного компонента транспортной системы аксонов, что согласуется с биохимическими данными, полученными при исследовании форели (Alumni et al., 2005). Согласно высказанному предположению, тяжелая изоформа GFAP может соответствовать сополимеру GFAP/виментин, наличие которого определяет рост и удлинение нервных волокон (Alumni et al., 2005).

После травматического повреждения тегмента в ПВЗ наблюдалась значительная гипертрофия GFAP-позитивных областей. В отличие от интактных животных, GFAP+ клетки в ПВЗ формировали многогранную структуру, а в СВЗ и более глубоких слоях тегмента выявлялась выраженная структурированность в организации пучков GFAP+ радиальных волокон, вдоль которых отслеживались массовые паттерны миграции GFAP- клеток. Такие области чередовались с участками, лишенными GFAP-иммунопозитивности в ПВЗ.

В области травмы отмечалась выраженная стратификацию в организации GFAP+ клеток и волокон. Так, только с одной стороны от травмы нами зарегистрирована область, содержащая многочисленные GFAP+ радиальные волокна, вдоль которых мигрировало множество GFAP- клеток. Также унилатерально, рядом с данной областью, мы идентифицировали зону, содержащую интенсивно GFAP-маркированную РГ и отдельные маркированные разнонаправленные волокна и клетки, формирующие единую сеть. Эту зону мы рассматриваем в качестве области реактивного посттравматического глиоза, возникающего в ответ на повреждение тегмента. Мы не исключаем, что некоторые клетки РГ в данной области являются источником радиальных волокон, вдоль которых направляются многочисленные клетки, участвующие в репаративном процессе. Наши данные согласуются с результатами исследований посттравматического процесса в конечном мозге данио, у которого также был отмечен кратковременный глиоз (Than-Trong, Bally-Cuif, 2015).

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что после травматического повреждения тегмента молоди кеты, наряду с активацией пролиферации в ПВЗ, наблюдается инициация пролиферативной активности в центрах вторичной пролиферации (базальном тегменте). Нейрогенная активность в результате травмы приводит в действие механизмы активации дополнительной популяции нейрональных прогениторов, в частности, наряду с эпендимоглиальной

нейрогенной активностью, у молоди кеты была обнаружена радиально-эпендимоглиальная. Несмотря на предварительный характер данного исследования, мы полагаем, что в результате посттравматического нейрогенеза ускоряется дифференцировка нейронов в СВЗ и более глубоких областях тегмента кеты. Травматическое повреждение тегмента приводит к формированию локальных очагов посттравматического нейрогенеза, расположенных в паренхиме, и формированию зоны посттравматического глиоза. Последний, как мы полагаем, способствует более эффективному процессу миграции клеток к зоне травмы и, наряду с ПВЗ, участвует в восстановительных процессах.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (МД-4318.2015.4) и Программы фундаментальных исследований ДВО РАН “Дальний Восток” на 2015–2017 гг. (проект № 15-И-6-116, раздел III).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. Л.: Медицина, 1969.
- Пуцина Е.В., Флейшман М.Ю., Тимошин С.С. Пролиферативные зоны мозга молоди амурского осетра *Acipenser sherenkii*. Взаимоотношение с нейромерами и миграцией вторичных матричных зон // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 5. С. 345–354.
- Пуцина Е.В., Вараксин А.А., Обухов Д.К. Репаративный нейрогенез в мозге и изменения в зрительном нерве взрослого форели *Oncorhynchus mykiss* после механического повреждения глаза // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 1. С. 15–39.
- Пуцина Е.В., Жарикова Е.И., Вараксин А.А. Персистентный и репаративный нейрогенез в теленцефалоне молоди сими *Oncorhynchus masou* при механической травме // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 5. С. 359–374.
- Стуканёва М.Е., Пуцина Е.В., Вараксин А.А. GFAP и PCNA маркирование в мозжечке молоди сими *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) при механической травме // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 5. С. 375–385.
- 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 // Dev. Biol. 2006. V. 295. P. 278–293.
- Ahmed S., Gan H.T., Lam C.S., Poonepalli A., Ramasamy S., Tay Y., Tham M., Yu Y.H. Transcription factors and neural stem cell self-renewal, growth and differentiation // Cell Adh. Migr. 2009. V. 3. P. 412–424.
- Alumni A., Vaccari S., Torcia S., Meomartini M.E., Nicotra A., Alfei L. Characterization of glial fibrillary acidic protein and astroglial architecture in the brain of a continuously growing fish, the rainbow trout // Eur. J. Histochemistry. 2005. V. 49. P. 157–166.
- Alumni A., Hermel J.M., Heuzé A., Bourrat F., Jamen F., Joly J.S. Evidence for neural stem cells in the medaka optic tec-

- tum proliferation zones // *Dev. Neurobiol.* 2010. V. 70. P. 693–713.
- Alvarez-Buylla A., García-Verdugo J.M., Tramontin A.D.* A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells // *Nat. Rev. Neurosci.* 2001. V. 2. P. 287–293.
- Bayer S.A., Yackel J.W., Puri P.S.* Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life // *Science.* 1982. V. 216. P. 890–892.
- Beckervordersandforth R., Deshpande A., Schaffner I., Huttner H.B., Lepier A., Lie D.C., Gotz M.* In vivo targeting of adult neural stem cells in the dentate gyrus by a split-cre approach // *Stem Cell Rep.* 2014. V. 2(2). P. 153–162.
- Bodega G., Suarez I., Rubio M., Villalba R.M., Fernandez B.* Astroglial pattern in the spinal cord of the adult barbel (*Barbus comiza*) // *Anat. Embryol.* 1993. V. 187. P. 385–395.
- Bravo R., Macdonald-Bravo H.* Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites // *J. Cell Biol.* 1987. V. 105. P. 1549–1554.
- Butler A.B., Hodos W.* Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation. John Wiley & Sons, Inc., 2005. 2nd ed. 715 p.
- Candal E., Anadón R., DeGrip W.J., Rodriguez-Moldes I.* Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout // *Dev. Brain Res.* 2005. V. 154. P. 101–119.
- Chapouton P., Skupien P., Hestl B., Coolen M., Moore J.C., Madelaine R., Kremmer E., Faus-Kessler T., Blader P., Lawson N.D., Bally-Cuif L.* Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. P. 7961–7974.
- 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 // *Front. Cell. Neurosci.* 2013, 6:70. doi 10.3389/fncel.2012.00070
- Codega P., Silva-Vargas V., Paul A., Maldonado-Soto A.R., Deleo A.M., Pastrana E., Doetsch F.* Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their *in vivo* niche // *Neuron.* 2014. V. 82. P. 545–559.
- Coskun V., Wu H., Bianchi B., Tsao S., Kim K., Zhao J., Bioncetti J.C., Hutnick L., Krueger R.C. Jr., Fan G., de Vellis J., Sun Y.E.* CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 1026–1031.
- Dirian L., Galant S., Coolen M., Chen W., Bedu S., Houart C., Bally-Cuif L., Foucher I.* Spatial regionalization and heterochrony in the formation of adult pallial neural stem cells // *Dev. Cell.* 2014. V. 30. P. 123–136.
- 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 // *J. Comp. Neurol.* 2001. V. 436. P. 92–110.
- Ferretti P.* Is there a relationship between adult neurogenesis and neuron generation following injury across evolution? // *Eur. J. Neurosci.* 2011. V. 34. P. 951–962.
- Fishell G., Kriegstein A.R.* Neurons from radial glia: the consequences of asymmetric inheritance // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2003. V. 13. P. 34–41.
- Frödö E.M., Westerlund J., Isomaa B.* Culturing and characterization of astrocytes isolated from juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 2002. V. 133. P. 17–28.
- Ganz J., Kaslin J., Hochmann S., Freudenreich D., Brand M.* Heterogeneity and Fgf dependence of adult neural progenitors in the zebrafish telencephalon // *Glia.* 2010. V. 58. P. 1345–1363.
- Giachino C., Basak O., Lugert S., Knuckles P., Obernier K., Fiorelli R., Frank S., Raineteau O., Alvarez-Buylla A., Taylor V.* Molecular diversity subdivides the adult forebrain neural stem cell population // *Stem Cells.* 2014. V. 32. P. 70–84.
- Götz M., Huttner W.B.* The cell biology of neurogenesis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. V. 6. P. 777–788.
- Grandel H., Brand M.* Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates // *Dev. Genes Evol.* 2013. V. 223. P. 131–147.
- Grandel H., Kaslin J., Ganz J., Wenzel I., Brand M.* Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate // *Dev. Biol.* 2006. V. 295. P. 263–277.
- Ito Y., Tanaka H., Okamoto H., Ohshima T.* Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum // *Dev. Biol.* 2010. V. 342. P. 26–38.
- Kálmán M.* Astroglial architecture of the carp (*Cyprinus carpio*) brain as revealed by immunohistochemical staining against glial fibrillary acidic protein (GFAP) // *Anat. Embryol. (Berl).* 1998. V. 198. P. 409–433.
- Kálmán M., Gould R.M.* GFAP-immunopositive structures in spiny dogfish, *Squalus acanthias*, and little skate, *Raja erinacea*, brains: differences have evolutionary implications // *Anat. Embryol. (Berl.).* 2001. V. 204. P. 59–80.
- 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 // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. P. 6142–6153.
- Kawai H., Arata N., Nakayasu H.* Three-dimensional distribution of astrocytes in zebrafish spinal cord // *Glia.* 2001. V. 36. P. 406–413.
- Kishimoto N., Shimizu K., Sawamoto K.* Neuronal regeneration in a zebrafish model of adult brain injury // *Dis. Models Mech.* 2012. V. 5. P. 200–209.
- Kriegstein A., Alvarez-Buylla A.* The glial nature of embryonic and adult neural stem cells // *Annu. Rev. Neurosci.* 2009. V. 32. P. 149–184.
- Lam S.H., Mathavan S., Gong Z.* Zebrafish spotted-microarray for genome-wide expression profiling experiments. Part I: array printing and hybridization // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 546. P. 175–195.
- Luo Y., Coskun V., Liang A., Yu J., Cheng L., Ge W., Shi Z., Zhang K., Li C., Cui Y., Lin H., Luo D., Wang J., Lin C., Dai Z., Zhu H., Zhang J., Liu J., Liu H., deVellis J., Horvath S., Sun Y.E., Li S.* Single-cell transcriptome analy-

- ses reveal signals to activate dormant neural stem cells // *Cell*. 2015. V. 161. P. 1175–1186.
- Margotta V., Morelli A., Gelosi E., Alfei L. PCNA positivity in the mesencephalic matrix areas in the adult of a teleost *Carassius carassius* L. // *Ital. J. Anat. Embryol.* 2002. V. 107. P. 185–198.
- 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. V. 58. P. 870–888.
- Merkle F.T., Mirzadeh Z., Alvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain // *Science*. 2007. V. 317. P. 381–384.
- Merkle F.T., Tramontin A.D., García-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 17528–17532.
- Mueller T., Wullimann M.F. Anatomy of neurogenesis in the early zebrafish brain // *Dev. Brain Res.* 2003. V. 140. P. 137–155.
- Mueller T., Wullimann M.F. BrdU-, neuroD (nrd)- and Hu-studies reveal unusual non-ventricular neurogenesis in the postembryonic zebrafish forebrain // *Mech. Dev.* 2002. V. 117. P. 123–135.
- Nakamura H. Midbrain Patterning. Isthmus organizer, tectum regionalization, and polarity formation. In: *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS* / Eds Rubenstein J. and Rakic P. San Diego: Acad. Press, 2013. P. 45–60.
- Noctor S.C., Martínez-Cerdeño V., Ivic L., Kriegstein A.R. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases // *Nat. Neurosci.* 2004. V. 7. P. 136–144.
- Olivera-Pasilio V., Peterson D.A., Castelló M.E. Spatial distribution and cellular composition of adult brain proliferative zones in the teleost, *Gymnotus omarorum* // *Front. Neuroanat.* 2014. V. 8. P. 83. doi 10.3389/fnana.2014.00088
- Onteniente B., Kimura H., Maeda T. Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry // *J. Comp. Neurol.* 1983. V. 141. P. 283–312.
- Parish C.L., Beljajeva A., Arenas E., Simon A. Midbrain dopaminergic neurogenesis and behavioural recovery in a salamander lesion-induced regeneration model // *Development*. 2007. V. 134. P. 2881–2887.
- Pellegrini E., Mouriec K., Anglade I., Menuet A., Le Page Y., Gueguen M.M., Marmignon M.H., Brion F., Pakdel F., Kah O. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish // *J. Comp. Neurol.* 2007. V. 501. P. 150–167.
- Pushchina E.V., Varaksin A.A., Obukhov D.K., Shukla S. Neurochemical organization and adult neurogenesis of masu salmon *Oncorhynchus masou* brain. N.Y.: Nova Science Publishers, Inc., 2017. 267 p.
- Rapacioli M., Duarte S., Rodríguez Celín A., Fiore L., Teruel L., Scicolone G., Sánchez V., Flores V. Optic tectum morphogenesis: a step-by-step model based on the temporal-spatial organization of the cell proliferation. Significance of deterministic and stochastic components subsumed in the spatial organization // *Dev. Dyn.* 2012. V. 241. P. 1043–1061.
- Rink E., Wullimann M.F. The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum) // *Brain Res.* 2001. V. 889. P. 316–330.
- Rothenaigier I., Krecsmarik M., Hayes J.A., Bahn B., Lepier A., Fortin G., Götz 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. V. 138. P. 1459–1469.
- Rubio M., Suarez I., Bodega G., Fernandez B. Glial fibrillary acidic protein and vimentin immunohistochemistry in the posterior rhombencephalon of the Iberian barb (*Barbus comiza*) // *Neurosci. Lett.* 1992. V. 134. P. 203–206.
- Suh H., Consiglio A., Ray J., Sawai T., D'Amour K.A., Gage F.H. *In vivo* fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus // *Cell Stem Cell*. 2007. V. 1. P. 515–528.
- Teles M.C., Sîrbulescu R.F., Wellbrock U.M., Oliveira R.F., Zupanc G.K. Adult neurogenesis in the brain of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* // *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 2012. V. 198. P. 427–449.
- Than-Trong E., Bally-Cuif L. Radial glia and neural progenitors in the adult zebrafish central nervous system // *Glia*. 2015. V. 63. P. 1406–1428.
- Wasowicz M., Ward R., Reperant J. An investigation of astroglial morphology in *Torpedo* and *Scyliorhinus* // *J. Neurocytol.* 1999. V. 28. P. 639–653.
- Wullimann M.F., Mueller T. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behavior // *J. Comp. Neurol.* 2004. V. 475. P. 143–162.
- Wullimann M.F., Puelles L. Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains // *Anat. Embryol. (Berl.)*. 1999. V. 199. P. 329–348.
- Xu L., Tang X., Wang Y., Xu H., Fan X. Radial glia, the keystone of the development of the hippocampal dentate gyrus // *Mol. Neurobiol.* 2015. V. 51. P. 131–141.
- Zupanc G.K. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish // *Brain Behav. Evol.* 2001. V. 58. P. 250–275.
- Zupanc G.K. Neurogenesis, cell death and regeneration in the adult gymnotiform brain // *J. Exp. Biol.* 1999. V. 202(Pt 10). P. 1435–1446.
- Zupanc G.K., Sîrbulescu R.F. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish // *Eur. J. Neurosci.* 2011. V. 34. P. 917–929.

Proliferation, Neuro- and Gliogenesis in Normal and Mechanically Damaged Mesencephalic Tegmentum in Juvenile Chum Salmon, *Oncorhynchus keta*

E. V. Pushchina^{1, 2, *}, I. A. Kapustyanov³, and A. A. Varaksin¹

¹National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia

²Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 01024 Ukraine

³Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690091 Russia

*E-mail: puschina@mail.ru

Received October 18, 2018; revised November 9, 2018; accepted November 13, 2018

Processes of proliferation, constitutive neuro- and gliogenesis in the mesencephalic tegmentum of intact juvenile chum salmon, *Oncorhynchus keta*, and at 3 days after a traumatic injury were studied by immunohistochemistry (IHC) labeling of PCNA, HuCD, and GFAP. In the chum tegmentum, the proliferative activity was revealed both in separate cells and in small cell clusters of the periventricular zone (PVZ). The presence of constitutive neurogenic zones provides the processes of persistent brain growth. After a damage to the tegmentum, proliferation in PVZ is activated, the constitutive neurogenic zones reactivate, and reactive neurogenic niches form in the parenchyma, and also the proliferative activity is initiated in the centers of secondary proliferation (basal tegmentum). It was first found that a traumatic damage to the tegmentum leads to accelerated differentiation of neurons in the subventricular zone (SVZ) and dorsomedial tegmentum, as well as to the appearance of HuCD+ cells with the ependymo- and radiogial phenotype in SVZ, which are absent in intact animals. It was first shown that the local foci of posttraumatic neurogenesis, located in the reticular formation parenchyma, and the zones of posttraumatic gliosis, contributing to a more efficient process of cell migration to the injury area, are formed as a result of tegmentum damage. The data obtained provide new information on the constitutive biology of neural stem cells and their involvement in brain regeneration.

Keywords: mesencephalic tegmentum, chum salmon, traumatic injury, PCNA, HuCD, GFAP, reparative neurogenesis, radial glia, constitutive and reactive neurogenic niche