

УДК 591.3:591.481.1:597.5

ПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ ЗОНЫ МОЗГА МОЛОДИ АМУРСКОГО ОСЕТРА. ВЗАИМООТНОШЕНИЕ С НЕЙРОМЕРАМИ И МИГРАЦИЕЙ ВТОРИЧНЫХ МАТРИЧНЫХ ЗОН¹

© 2007 г. Е. В. Пуцина, М. Ю. Флейшман*, С. С. Тимошин*

Институт биологии моря ДВО РАН

690041 Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17

*Дальневосточный государственный медицинский университет

68000 Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, д. 35

E-mail: puschina@mail.ru

Поступила в редакцию 24.11.05 г.

Окончательный вариант получен 05.04.06 г.

С помощью иммуноцитохимического маркирования пролиферативного ядерного антигена изучены процессы нейрогенеза переднемозгового отдела молоди осетра *Acipenser schrenki*. В мозгу молоди осетровых, как и у других видов костистых рыб, выявлен значительный пролиферативный потенциал. Зоны мозга *Acipenser schrenki* с высокой пролиферативной активностью располагаются у поверхности мозгового желудочка, относящейся к перивентрикулярной полости. Наряду с перивентрикулярной зоной первичной пролиферации в переднемозговом отделе осетра выявлено несколько вторичных пролиферативных зон.

Ключевые слова: пролиферативные зоны мозга, нейрогенез, нейромеры, иммуноцитохимическое маркирование, осетровые.

Концепция нейромерной организации головного мозга костистых рыб, предложенная в 1950-х гг. Бергвистом и Калленом (Bergquist, Kallen, 1954), в исследованиях последних лет получает все большее распространение (Puelles, Rubenstein, 1993; Wullimann, Puelles, 1999; Muller, Wullimann, 2003). Установлено, что постэмбриональные стадии нейрогенеза рыб связаны с пролиферативной активностью вторичных матричных зон мозга (Ekström et al., 2001). Однако локализация этих областей и их взаимоотношения с центрами дифференцировки нейробластов, развитие которых определяет формирование нервных связей головного мозга, в настоящее время остаются неизученными. Показано, что у *Danio rerio* пролиферативные зоны (ПЗ) мозга связаны с паравентрикулярными областями. Также известно, что локализация ПЗ мозга ассоциирована с его эмбриональной сегментной организацией (Wullimann, Rink, 2002). Нейрогенез головного мозга хрящевых ганоидов практически не изучен. Однако в мозгу молоди осетровых, как и у других видов лучеперых рыб, обнаружен огромный потенциал к воспроизводству новых клеток. Chondrostei (осетры и веслоносы) являются наиболее древними представителями лучепе-

рых рыб, отделившимися от Holostei и Teleostei (группа Neopterygii) в палеозойский период и представляющими наиболее примитивную их ветвь. Головной мозг этих рыб развивается по пути эмбрионализации – задержки признаков ранних стадий онтогенеза до более поздних стадий индивидуального развития (Андреева, Обухов, 1999). Тем не менее морфогенетические принципы, детерминирующие высокую кинетику пролиферации клеток мозга, которая определяет уникальные репаративные свойства центральной нервной системы рыб, а также процессы детерминации и дифференцировки нейронов в ходе постнатального нейрогенеза у осетровых, на сегодняшний день практически не изучены.

Цель настоящей работы – исследование морфогенетической организации перивентрикулярной и вторичных матричных зон переднего мозга молоди осетра *Acipenser schrenki*, а именно идентификация ПЗ переднемозгового отдела и картирование вторичных матричных зон теленцефалического, промежуточного, таламического и гипоталамического переднемозговых отделов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для выявления ПЗ мозга и исследования морфогенетических феноменов у осетра *Acipenser schrenki* были использованы препараты, окра-

¹ Работа поддержана Американским фондом гражданских исследований и развития (проект CRDF-Y2-B-03-05) и Министерством образования и науки РФ.

шенные гематоксилин-эозином по Ниссию (Меркулов, 1968), а также материал, иммуноцитохимически маркированный на пролиферативный ядерный антиген (proliferating cell nuclear antigen, PCNA). В работе использовали 10 особей молоди осетра в возрасте 60 сут. Животных анестезировали с помощью 0.1%-ного раствора трикаинметансульфоната (MS-222, "Sigma", США), заливали в парафин по общепринятой методике (Меркулов, 1968) и готовили серийные трансверзальные срезы толщиной 5–6 мкм. Для выявления активности PCNA использовали метод непрямого авидин-биотинового-пероксидазного (АВС-метод) иммунохимического мечения. Парафиновые срезы, наклеенные на полилизиновые стекла, депарафинировали. Для увеличения проницаемости мембран использовали прогревание препаратов в течение 45 мин при температуре 95°C с водным раствором детергента (Target retrieval solution, "DAKO", США). После остывания до комнатной температуры стекла ополаскивали в дистиллированной воде. На срезы наносили 1%-ный раствор перекиси водорода на 0.1 М фосфатном буфере. Выдерживали 5 мин на водяной бане в термостате при 37°C, затем промывали стекла в трех сменах 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.2) по 5 мин. На срезы наносили первичную мышиную моноклональную антисыворотку против PCNA ("DAKO", США) и выдерживали 20 мин на водяной бане в термостате при 37°C. Промывали стекла в трех сменах 0.1 М фосфатного буфера по 5 мин. На срезы наносили вторичные биотинилированные мышиные антитела против иммуноглобулинов кролика (LSAB 2 System, HRP, "DAKO", США). Выдерживали 20 мин на водяной бане в термостате при 37°C, промывали в трех сменах 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.2) по 5 мин. На срезы наносили стрептавидиновую систему визуализации (LSAB 2 System, HRP, "DAKO", США). Выдерживали 20 мин на водяной бане в термостате при 37°C. Промывали стекла в трех сменах 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.2) по 5 мин. Затем выявляли диаминобензидиновые продукты гистохимической реакции. Таблетки диаминобензидина (ДАБ) предварительно растворяли по схеме в фосфатном буфере и приготавливали аликвоты по 1–2 мл. Перед нанесением в аликвоты добавляли 1%-ную перекись водорода на 0.1 М фосфатном буфере из расчета 5 мкл на 0.5 мл аликвоты. Выдерживали 5–7 мин на водяной бане в термостате при 37°C до визуализации маркера (процесс контролировали с помощью микроскопа). Промывали стекла в дистиллированной воде не менее 20 мин, а затем докрашивали срезы гематоксилином Лилли-Майера 30 с, промывали проточной водой 15–20 мин, обезвоживали по стандартной методике и заключали в бальзам.

РЕЗУЛЬТАТЫ

*Топография пролиферативных матричных зон переднемозгового отдела осетра *Acipenser schrenki*.* В работе использовали нейроанатомическую номенклатуру Адрио с соавторами (Adrio et al., 1999), разработанную для хрящевых ганоидов. PCNA-иммунопозитивные клеточные формы картировали в соответствии с описанными нейрогенетическими прозомерными зонами (клеточных групп и волокон) костистых рыб (Diaz-Regueira, Anadón, 2000). Схема головного мозга осетра и границы нейромеров переднемозгового отдела приведены на рис. 1. Роstralная граница проходит через переднюю часть теленцефалона, а каудальной является область заднего бугорка промежуточного мозга (рис. 2). ПЗ ассоциированы с наружными границами мозга, а также с внутренними морфофункциональными комплексами (ядрами переднемозгового отдела). Выявленные ПЗ расположены в пограничной области между теленцефалическим и диенцефалическим отделами. В переднем мозгу (рис. 1) ПЗ ассоциированы с вентрикулярными зонами вентральной теленцефалической области (субпаллиумом), дорсальной теленцефалической зоной (паллиумом), преоптической областью (П5), вентральным (П3) и дорсальным таламусом (П2), эпиталамусом (П2), претектумом (П3), задним бугорком (П3) и гипоталамусом (П5). Полученные результаты демонстрируют, что дорсальная пролиферативная зона конечного мозга (ДД, ДЛ, ДМ), являющаяся областью эмбриональной эверсии, смещена латерально относительно геометрической вершины теленцефалона (рис. 2, а). Субпаллиальная пролиферативная зона включает дорсальную (ВД) и вентральную (ВВ) части (рис. 2, а). Преоптический регион содержит дорсальную мелкоклеточную (МкПЯ) и вентральную крупноклеточную (КкПЯ) пролиферативные зоны (рис. 2, б). Среди ПЗ промежуточного мозга в соответствии с нейромерной организацией мы идентифицировали хабенулярную, претектальную, перивентрикулярные дорсальную и вентральную таламические клеточные скопления (рис. 1; 2, в). Вентрокаудально представлены три слабо выраженные, но тем не менее дискретно организованные зоны клеточной пролиферации. Две из них являются вентрокаудальным продолжением дорсальной и вентральной ПЗ таламуса и ассоциированы с зоной заднего бугорка (рис. 2, г–е), третья расположена в области ядра медиального продольного пучка (рис. 2, г, д). Были выявлены также несколько гипоталамических пролиферативных зон. ПЗ гипоталамуса, являющегося областью вторичного прозенцефалона, содержат нейромеры П4–П6, которые не формируют непрерывных областей (рис. 1). В дорсальной области PCNA-иммунореак-

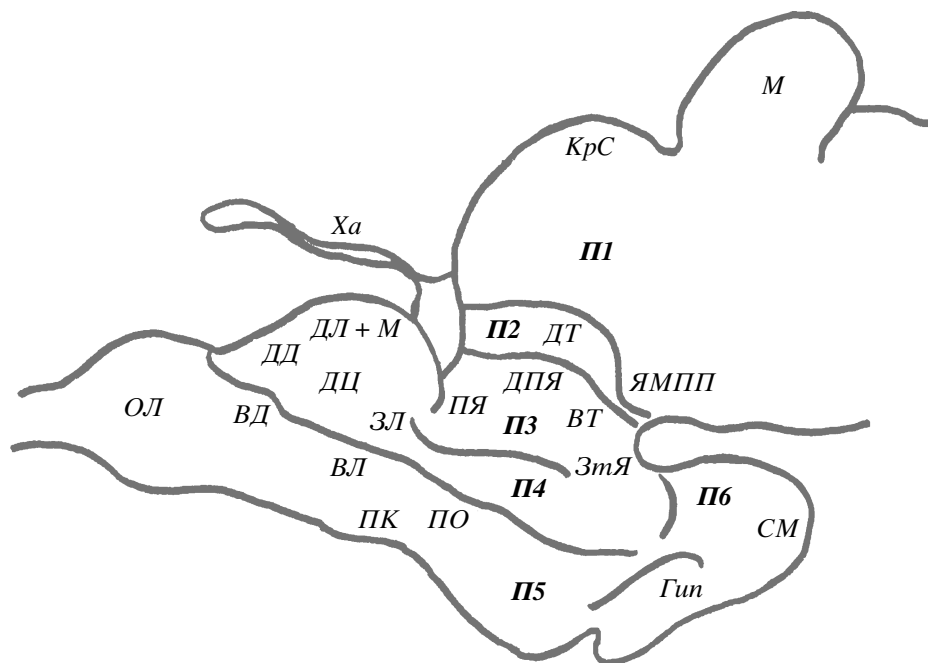


Рис. 1. Схема прозомерной организации пролиферативных зон переднего отдела осетра *Acipenser schrenki*. На сагиттальной проекции показана сегментарная организация переднего мозга осетра. ВД, ВЛ – дорсальная и латеральная зоны вентральной области конечного мозга; Ха – хабенула, Гип – гипофиз; ДД, ДЦ, ДМ, ДЛ – дорсальная, центральная, медиальная и латеральная зоны дорсальной области конечного мозга; ДПЯ – дорсальные перивентрикулярные ядра; ДТ, ВТ – дорсальный и вентральный таламус; ЗЛ – заднелатеральная часть Area dorsalis, ЗмЯ – заднетуберальное ядро; КрС – крыша среднего мозга; М – мозжечок; ОЛ – обонятельная луковица; П1–П6 – прозомеры переднего отдела; ПО – преоптическая область; ПЯ – претектальное ядро; СМ – сосудистый мешок; ЯМПП – ядро медиального продольного пучка; ПК – передняя комиссура.

тивные популяции были выявлены в области прозомера П1 (ядра задней спайки), П2 (хабенулы), П3 (латерокаудального сегмента Area dorsalis (ЗЛ)) и П4–П5 (переднедорсальный регион Area dorsalis теленцефалона, промежуточный регион Area ventralis, дорсальный регион Area ventralis (ВД)). В вентральной области (прозомеры П3–П6) PCNA-иммунореактивные нейроны формируют гетероморфные группы: преоптическое, дорсальное и вентральное таламические ядра, ядро заднего бугорка, заднее гипоталамическое ядро (рис. 2, б–д). В среднем мозгу П3 занимают дорсомедиальный, каудальный и вентролатеральный сегменты тектальных полушарий (рис. 2, г–е), простираясь над каудальной частью полулунного валика (ЛТ) к латеральным ядрам заслонки. Дополнительные группы цереброспинальных ликвороконтактирующих нейронов обнаружены в области прозомера П6 – конечной пластинки сосудистого мешка – и в мелкоклеточной части преоптического ядра, а также в промежутке между прозомерами П3 и П4 – сосудистом сплетении гипоталамуса (паравентрикулярный орган) и ядром заднего желудочка.

Прозенцефалические П3 образованы постмитотическими нейронами и организованы в виде морфогенетических полей. Эти зоны соответствуют зонам эмбриональной миграции, описанным Бергвистом и Калленом (Bergquist, Kallen, 1954).

Активность PCNA в привентрикулярной зоне переднего отдела осетра *Acipenser schrenki*. Активная пролиферация клеток, сопровождающаяся интенсивным маркированием на PCNA, выявлена в перивентрикулярных зонах всех исследованных нами отделов переднего мозга. Эта область головного мозга костистых рыб (Zupank, 2001; Rink, Wullimann 2001) считается зоной первичной пролиферации. Наряду с морфогенетической подвижностью нейробластов в привентрикулярной зоне обнаружена и их кариокинетическая активность (рис. 3). Перивентрикулярные клетки сохраняют подобие эмбрионального нейроэпителлия и образуют псевдомонослой (рис. 3, а; 4, а). По-видимому, данная морфогенетическая особенность связана с подвижностью ядер пролиферирующих клеток. В маркированной PCNA пограничной области было выявлено несколько

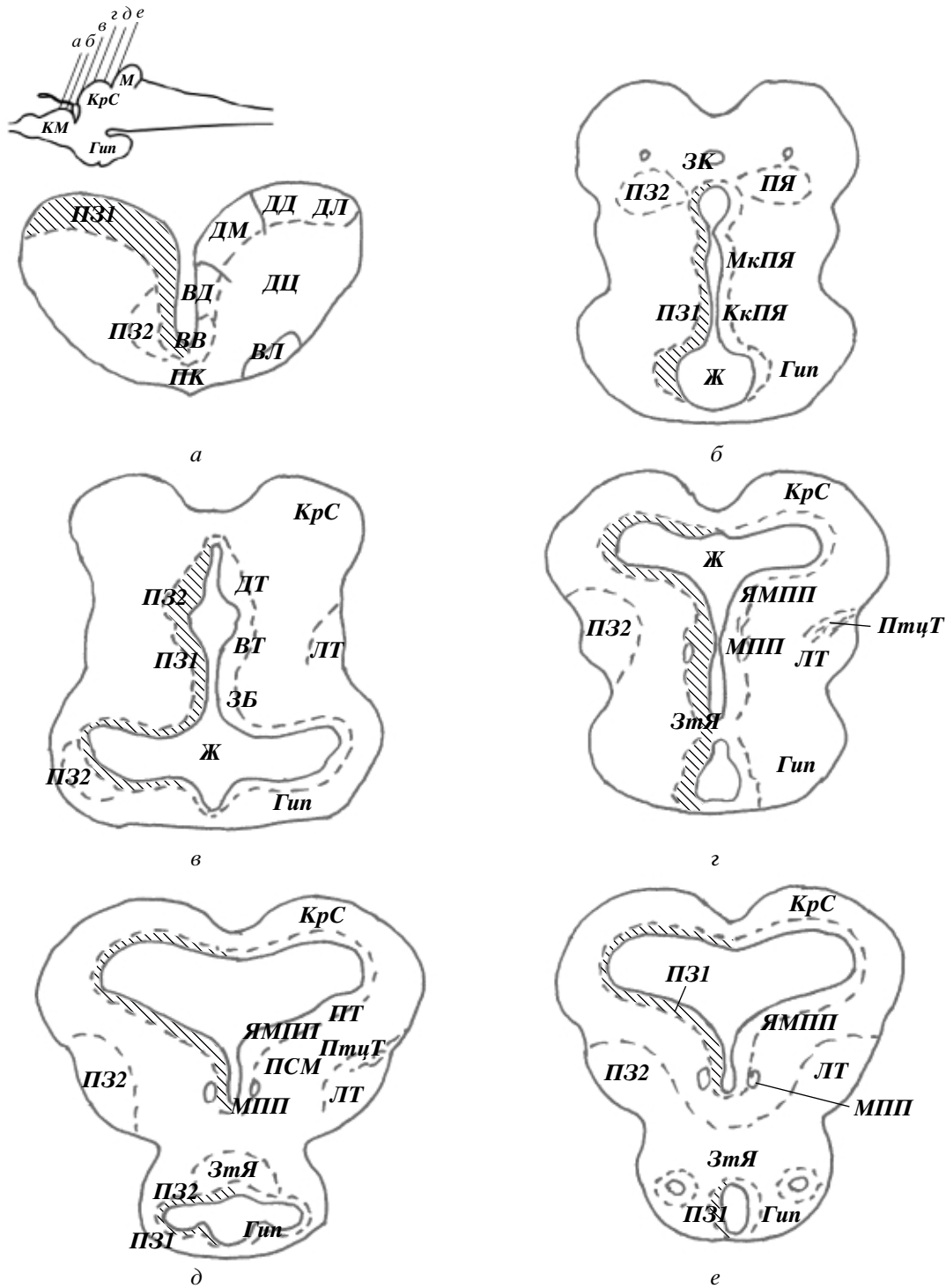


Рис. 2. Топографическая организация пролиферативных зон переднемозгового отдела осетра *Acipenser schrenki*; поперечные проекции: а-е – уровни головного мозга (вверху). (⊗) – перивентрикулярная (ПЗ1) и вторичные (ПЗ2) пролиферативные зоны. ВВ – вентральная зона вентральной области конечного мозга; Ж – желудочек мозга; ЗБ – задний бугорок; ЗК – задняя комиссура; КМ – конечный мозг; ЛТ – латеральный торус; МПП – медиальный продольный пучок; КкПЯ, МкПЯ – крупноклеточная и мелкоклеточная части преоптического ядра; ПСМ – покрывка среднего мозга; ПТ – полунный торус; ПтцТ – претектоцереbellарный тракт; остальные обозначения см. на рис. 1.

разновидностей нейробластов – от овальных до весьма удлинённых (рис. 4, а). Морфология клеток обусловлена различной длиной обращенного в просвет желудочка цитоплазматического выроста (рис. 3). Такие клетки мозаично расположены вдоль вентрикулярных стенок и, по определению Савельева (2001), имеют рапировидную форму. При окрашивании гематоксилином выявляются телофазные нейроны (рис. 3), маркированные PCNA, обычно округлой формы и лишённые отростков. Значительные скопления округлых, PCNA-маркированных нейронов обнаружены в вентральной таламической зоне (рис. 4, б). В таких клетках при окраске гематоксилином видны эксцентрично расположенные телофазные хромосомы (рис. 3, б). Характерно, что в подобных скоплениях митотические фазы синхронизированы, тогда как в дорсальной таламической, преоптической и претектальной привентрикулярных областях клетки находятся на различных стадиях синтеза ДНК, о чем свидетельствует различное местоположение их ядер и положительная реакция на PCNA. Рапировидные же нейроны имеют ядра с диффузно организованным хроматином и цитоплазматические выросты различной длины (рис. 4, в). Все типы выявленных нами перивентрикулярно расположенных клеток являются PCNA-иммунореактивными. Особо следует подчеркнуть иммуноцитохимическую активность удлинённых рапировидных клеток вентральной теленцефалической (субпалиальной) и преоптической, гипоталамической, заднетуберальной областей и заднелатеральной области Area dorsalis (рис 4, в). В последней плотность распределения рапировидных клеток максимальна. В ПЗ дорсального и вентрального таламуса пролиферирующие клетки привентрикулярной области обычно организованы в виде псевдомонослоя, тогда как в гипоталамической, заднетуберальной и вентральной преоптической областях часто встречаются многослойные клеточные скопления (рис. 4, г). В целом клетки привентрикулярной зоны мозга образуют единый очаг пролиферации, распространяющийся на все переднемозговые отделы, имеющие вентрикулярный просвет (рис. 2). В наружной поверхности мозга перивентрикулярная пролиферативная зона ограничена слоем PCNA-негативных клеток. Особенно плотные популяции тел клеток, вышедших из пролиферации и формирующих покровный (мантийный) слой, были выявлены в гипоталамической области (рис. 4, а, б). PCNA-негативные клетки удлинённой формы мы рассматривали как постмитотические нейробласты, мигрирующие к областям дифференцировки. При выходе в дифференцировку иммунонегативные клетки утрачивают связь с прижелу-

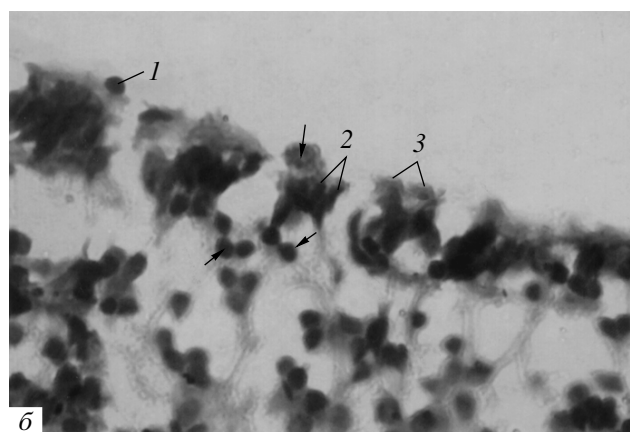
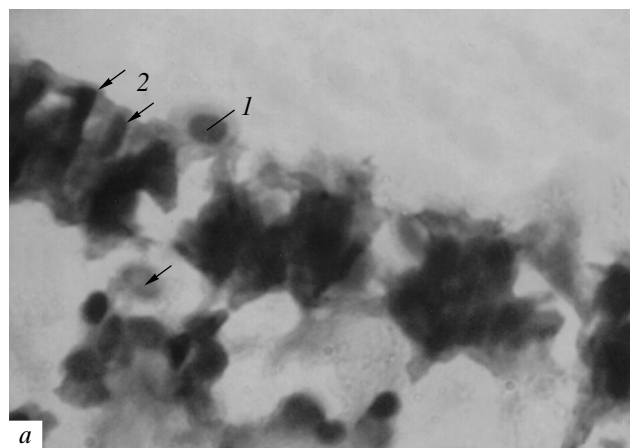


Рис. 3. Морфологическая организация перивентрикулярной области мозга амурского осетра *Acipenser schrenki*: а – перивентрикулярный нейроэпителлий, б – пролиферативный цикл нейробластов таламической области. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.: а – об. $\times 63$, ок. $\times 10$ (водная иммерсия), б – об. $\times 40$, ок. $\times 10$. 1 – телофазный нейробласт, 2 – рапировидные клетки, 3 – дочерние клетки. (—>) – ядра клеток, остальные обозначения см. на рис. 1, 2.

дочковой поверхностью стенки и мигрируют по окружающим их клеткам к наружной стенке мозга. У наружного края пласта некоторые из таких нейронов имеют отростки (рис. 4, д), которые распространяются по наружной поверхности клеточного пласта, формируя так называемый маргинальный слой (рис. 4, е). Наиболее часто такие явления зарегистрированы нами в переднемозговом отделе, в области передней комиссуры.

Активность PCNA во вторичных матричных зонах переднемозгового отдела осетра Acipenser schrenki. Помимо привентрикулярной краевой зоны значительная иммуноцитохимическая активность PCNA обнаружена нами в перивентрикулярных слоях мозга, образующих очаги вторичной пролиферации. Такие вторичные оча-

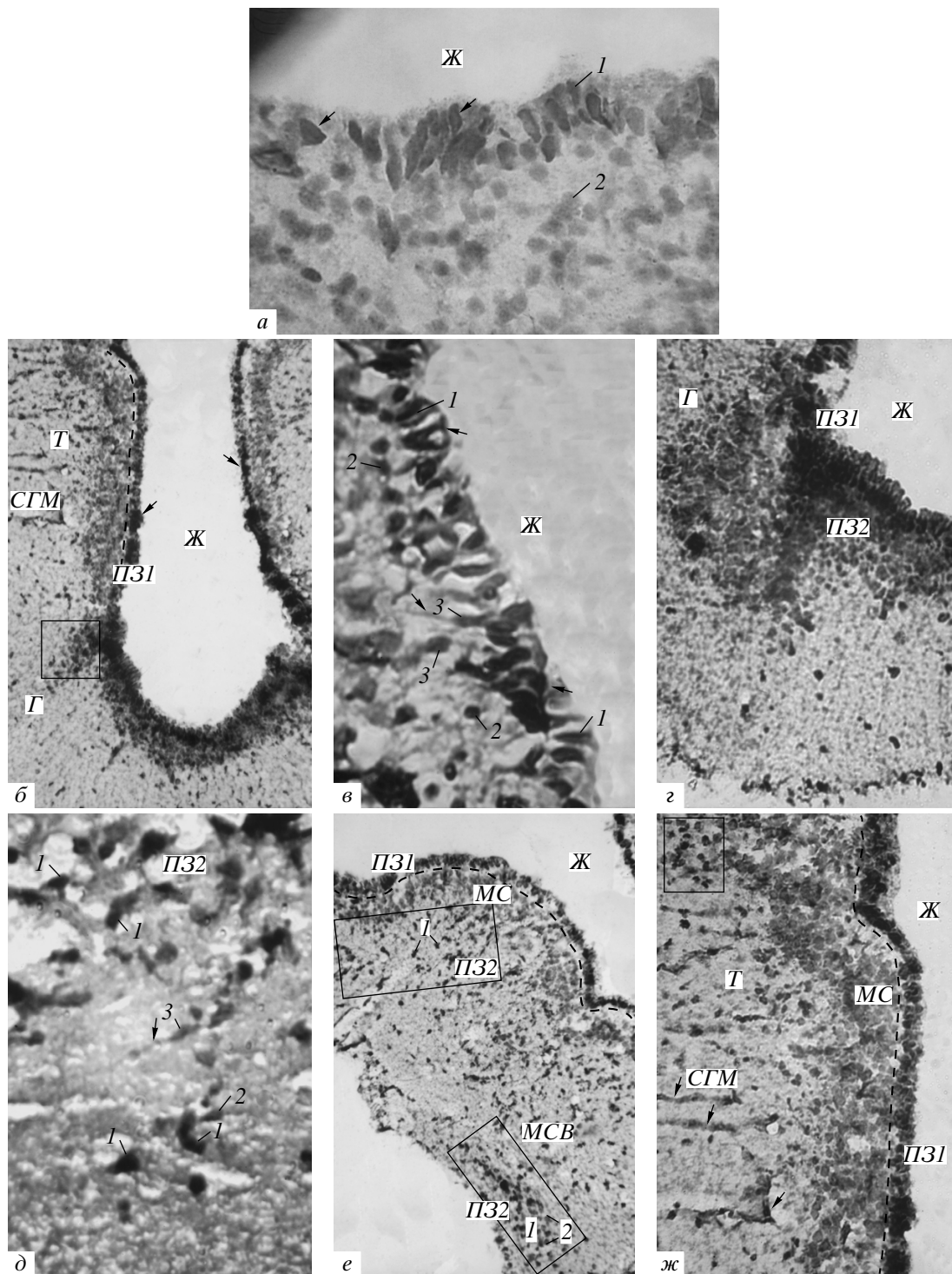


Рис. 4. PCNA-иммуногенные участки головного мозга амурского осетра *Acipenser schrenki*: а – клетки перивентрикулярной таламической области, б – перивентрикулярная пролиферативная зона на уровне таламуса, в – перивентрикулярная пролиферативная зона преоптической области, г – многослойный перивентрикулярный пролиферативный очаг гипоталамуса, д – вторичная пролиферативная зона претектальной области, е – вторичная матричная зона полулунного валика (в квадрате – вторичная пролиферативная зона гипоталамуса), ж – вторичная матричная зона вентрального таламуса. 1 – PCNA-иммунопозитивный псевдомонослой пролиферирующих клеток; 2 – мантийный PCNA-негативный слой клеток, вышедших из пролиферации; 3 – PCNA-негативная клетка, формирующая отросток; (→) – рапировидные нейроны. Т – таламус; Г – гипоталамус; СГМ – сосуды головного мозга, вторичная пролиферативная зона гипоталамуса (ограничена квадратом); МСВ – маргинальный слой волокон; МС – мантийный слой; Ж – желудочек мозга. Пунктирной линией обозначены границы между пролиферирующими и вышедшими из пролиферации клетками ПЗ1. Прямоугольниками ограничены скопления PCNA-иммуногенных клеток, формирующие очаги вторичной пролиферации. Увел.: об. $\times 40$, ок. $\times 10$ (а, в, д); об. $\times 20$, ок. $\times 10$ (г, ж); об. $\times 12.5$, ок. $\times 10$ (б, е).

ги деления клеток располагаются около прижелудочковых зон с повышенной пролиферацией. Часть мигрировавших клеток привентрикулярной зоны мозга сохраняет способность к делению. Пики пролиферации, верифицируемые нами по активности PCNA, свидетельствуют об образовании вторичных зон пролиферации. Наиболее крупные вторичные матричные зоны промежуточного мозга осетра расположены в претектальной, вентральной таламической областях, сосудистом сплетении гипоталамуса, полулунном валике (рис. 2, б–е; 4, е, ж). Плотность распределения иммунореактивных клеток в этих зонах колеблется от умеренной (в вентральном таламическом и гипоталамическом отделах) до высокой (в полулунном валике и претектальном ядерном комплексе) (рис. 4, е). В конечном мозгу зона вторичной пролиферации зарегистрирована в вентральной теленцефалической “субпаллиальной” области.

ОБСУЖДЕНИЕ

Паттерны пролиферативных зон у молоди осетра были верифицированы с помощью иммуноцитохимического маркирования PCNA (вспомогательного белка ДНК полимеразы δ). Как показано в исследованиях Мюллера и Вуллимана (Müller, Wullimann, 2003), маркирование пролиферативных областей мозга *Danio rerio* с помощью PCNA адекватно отражает нейромерную организацию мозга, что подтверждается и с помощью иммуноцитохимического маркирования бромдезоксисуридином (BrdU) и радиоавтографических исследований (Zupanc, 2001; Müller, Wullimann, 2003). Экспрессия PCNA в клетках сохраняется в течение 24 ч после окончания митоза (Wullimann, Puelles, 1999), однако уровень его активности снижается на 30% (Bravo, MacDonald-Bravo, 1987). Обсуждаются методические аспекты применения PCNA в качестве маркера клеточной пролиферации при исследовании различных стадий нейрогенеза головного мозга рыб (Müller, Wullimann, 2003). Показано, что на ранних стадиях эмбрионального развития *Danio rerio* (1–4 сут с момента оплодотворения) маркируются нейроэпителиальные клетки, у которых в этот период продолжительность клеточного цикла невелика (Müller, Wullimann, 2003). Тем не менее PCNA является удобным маркером клеточной пролиферации для исследования постнатального нейрогенеза рыб (Zupanc, 1999; 2001; Candal et al., 2005), поскольку на дальнейших стадиях развития продолжительность клеточного цикла многократно превышает таковую раннего эмбриогенеза. Установлено, что для стадий развития, на которых кинетика пролиферации высока и, следо-

вательно, велика продукция постмитотических клеток, интерпретация экспрессии PCNA при оценке реального числа постмитотических клеток должна быть осторожной (Müller, Wullimann, 2003). Клетки PCNA-иммунонегативных областей большинство авторов определяют как стимулированные к дифференцировке (Bravo, MacDonald-Bravo, 1987; Müller, Wullimann, 2002; Wullimann, Müller, 2004; Candal et al., 2005), поскольку в таких нейронах обнаружены не только Pax6, Zash-1a, Zash-1b, neurogenin 1, neuro-D (маркеры нейродетерминации), но и Nu-protein (маркер дифференцировки).

Проведенное нами исследование позволяет рассматривать процессы постэмбрионального нейрогенеза амурского осетра *Acipenser schrenki* как совокупность процессов пролиферации, миграции клеток и их дифференцировки. В изученных нами первичной и вторичных пролиферативных зонах переднемозгового отдела у этого вида выявлен ряд морфогенетических особенностей. Активная пролиферация клеток у молоди осетра отмечена в привентрикулярных областях теленцефалического, преоптического и таламических отделов мозга, на уровне прозомеров П1–П3. В основе пролиферативных процессов лежит морфогенетическая подвижность как самих нейробластов, так и их ядер. Деление начинается с вытягивания отростка рапировидных нейробластов. После того как клетка устанавливает связь между наружной и внутренней поверхностью стенки мозга, происходит миграция ядра. Ядро нейробласта начинает движение от прижелудочковой стенки мозга к наружной зоне. Не доходя до наружного сегмента клетки, ядро останавливается и начинает обратное движение. В верхней фазе миграции ядра клетка PCNA-иммуногенна, что, вероятно, указывает на процесс синтеза ДНК. Возвращение ядра к прижелудочковой зоне происходит с уже удвоенным числом хромосом. После достижения ядром прижелудочковой стенки мозга начинается втягивание наружного отростка клетки. Затем клетка округляется и вступает в телофазу (рис 3, а). Дочерние клетки (рис. 3, б) начинают формировать отростки, которые выходят к наружной поверхности пласта, и пролиферативный цикл повторяется. При выходе в дифференцировку PCNA-негативные нейробласты утрачивают связь с прижелудочковой поверхностью стенки мозга и мигрируют по окружающим их клеткам к наружной стенке. У наружного края пласта они образуют отростки, которые распространяются по наружной поверхности мозга, формируя при этом маргинальный слой. Высокий пролиферативный потенциал головного мозга осетра обеспечивается еще и тем, что формируются вторичные очаги деления кле-

ток или вторичные матричные зоны мозга. В исследованном нами переднемозговом отделе осетра на уровне вентрального теленцефалического (“субпаллиальная” область), претектального, вентрального таламического, гипоталамического (зона сосудистого сплетения) ядерных комплексов и в области полулунного валика были выявлены очаги вторичной пролиферации. Перечисленные вторичные матричные зоны у осетра преимущественно принадлежат прозомерам ПЗ–П6 и характеризуются общими морфогенетическими признаками. Для всех вторичных матричных зон в отличие от привентрикулярной области характерно наличие как PCNA-иммунопозитивных, так и негативных клеток, а во вторичных очагах пролиферации отсутствует стратификация клеточных пластов на пролиферативный (PCNA-иммуногенный), мантийный (зона тел клеток, вышедших из пролиферации) и маргинальный (слой, состоящий из отростков клеток). В выявленных нами вторичных зонах расположение пролиферирующих (PCNA-реактивных) и дифференцирующихся (PCNA-негативных) клеток носит неупорядоченный мозаичный характер. Вторичные зоны мозга, как правило, прилежат к определенным участкам привентрикулярной области, что, очевидно, свидетельствует об интенсификации деления в них по сравнению с остальными привентрикулярными областями. В большинстве случаев формирование вторичных матричных зон характерно для вентрально расположенных ядер конечного и промежуточного мозга, относящихся к П4–П6, за исключением претектального ядра (П2) и дорсальной части полулунного валика. В области П1–П3 пролиферативная активность у молоди осетра сосредоточена в привентрикулярной матричной зоне.

Проллиферативные зоны мозга были также идентифицированы и у других видов рыб: трехиглой колюшки (Ekström et al., 2001), аптеронотуса (Zupank, 1999, 2001), карася (Margotta et al., 2002) и полосатого данио (Rink, Wullimann, 2001). Методом иммуноцитохимического маркирования исследовано развитие пинеального комплекса и уздечки переднего мозга у миноги (Villar-Cheda et al., 2002). В работе, связанной с картированием вторичных матричных зон мозга у трехиглой колюшки, авторы указывают на наличие двух главных матричных зон – переднемозговой, расположенной на границе между конечным и промежуточными отделами мозга, и пограничной, между среднемозговым отделом и ромбовидным мозгом. Исследование пролиферативной активности нейронов головного мозга электрических рыб *Apteronotus* и *Eigenmannia* показало, что у этих видов подавляющее большинство пролиферирую-

щих нейронов (до 75%) сосредоточено в мозжечке, привентрикулярной зоне, а также в припейсмейкерных ядрах продолговатого мозга (Zupank, 1999, 2001). В теленцефалической, диенцефалической, мезенцефалической и ромбоэнцефалической областях аптеронотуса суммарное число пролиферирующих клеток невелико и составляет около 25% от всех митотически активных клеток мозга. Многие из этих клеток рассредоточены на широкой территории. По-иному обстоит ситуация в зонах с высокой пролиферативной активностью, граничащих обычно с поверхностью мозгового желудочка и паравентрикулярными областями (Zupanc, Horschke, 1995). Сходные данные получены для *Sparus aurata*, у которого вентрикулярные и субвентрикулярные области мозга также сохраняют высокую пролиферативную активность в течение постэмбрионального развития. Подобно электрическим рыбам, у половозрелых особей *Sparus aurata* отмечен высокий уровень пролиферации нейронов молекулярного слоя тела и заслонки мозжечка (Zikopoulos et al., 2000). В переднемозговом отделе многочисленные митотические клетки выявлены в привентрикулярных зонах теленцефалона, в гипоталамусе и таламусе (Zikopoulos et al., 2000).

Методом иммуноцитохимического маркирования PCNA у *Carassius carassius* исследована пролиферативная активность мезенцефалических матричных зон (Margotta et al., 2002). Показано, что иммуноцитохимический тест на PCNA позволяет идентифицировать паттерны распределения митотически активных клеток мозга, которые формируют морфогенетические поля – матричные зоны. Показано также, что наличие таких полей характерно исключительно для костистых рыб, у амфибий и рептилий их нет (Margotta et al., 2002).

С помощью иммуноцитохимического маркирования PCNA, а также методами гибридизации контролирующего нейрогенез генов изучен процесс раннего нейрогенеза и начальной дифференцировки нейробластов у модельного объекта *Danio rerio* (Müller, Wullimann, 2003; Kimmel et al., 2005). Исследование ранних стадий морфогенеза переднемозгового отдела показало, что пролиферативные зоны мозга пространственно упорядочены и организованы в виде нейромеров или сегментов мозга (Wullimann, Puellas, 1999). Данные для промежуточного мозга в значительной степени дополняют модели нейромерной организации мозга Паулса и Рубенштейна (Puelles, Rubenstein, 1993), основанные преимущественно на результатах, полученных для амниот. Были предложены пространственные реконструкции пролиферативных зон мозга полосатого данио на раннем

этапе развития (5 сут после оплодотворения). Нейрогенетическая модель этих авторов (Wullimann, Puelles, 1999) демонстрирует размеры, количество, локализацию и морфологию пролиферативных зон переднего мозга. Она в значительной степени отражает сущность начальных этапов нейроанатомической организации переднего мозга. Идея о сегментарной прозомерной организации дополнительно подтверждается благодаря детализации распределения пролиферативных зон задней части переднего мозга. Следовательно, при рассмотрении вопросов сравнительной морфологии переднемозгового отдела концепция прозомерного происхождения прозенцефалических клеточных масс костистых рыб может быть признана приоритетной.

Таким образом, исследование постнатального нейрогенеза головного мозга костистых рыб имеет важное теоретическое значение для понимания закономерностей пространственной организации вторичных матричных зон головного мозга низших позвоночных. Наши данные показывают, что в переднемозговом отделе молоди осетров существует обширная популяция пролиферирующих клеток и пролиферативные процессы в головном мозгу у осетровых рыб не ограничиваются периодами раннего эмбриогенеза, а продолжаются и в постнатальном развитии, обеспечивая тем самым высокий репаративный потенциал нервных клеток. В переднемозговом отделе осетра иммуногистохимические паттерны распределения PCNA соответствуют областям с высоким уровнем синтеза ДНК, что подтверждено данными для других видов костистых рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева Н.Г., Обухов Д.К. Эволюционная морфология нервной системы позвоночных. СПб.: Лань, 1999. 384 с.
- Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. Л.: Медицина, 1969. 423 с.
- Савельев С.В. Сравнительная анатомия нервной системы позвоночных. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. 271 с.
- Adrio F., Anadón R., Rodríguez-Moldes I. Distribution of serotonin (5HT)-immunoreactive structures in the central nervous system of two chondrosteian species (*Acipenser baeri* and *Huso huso*) // J. Comp. Neurol. 1999. V. 407. P. 333–348.
- Bergquist H., Kallen B. Notes on the early histogenesis and morphogenesis of the central nervous system in vertebrates // Ibid. 1954. V. 100. P. 627–659.
- 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.
- Candal E., Anadón R., DeGrip W., Rodríguez-Moldes I. Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of brown trout // Devel. Brain Res. 2005. V. 154. P. 101–119.
- Díaz-Regueira S., Anadón R. Calretinin expression in specific neuronal systems in the brain of an advanced teleost, the grey mullet (*Chelon labrosus*) // J. Comp. Neurol. 2000. V. 426. P. 81–105.
- Ekström P., Johnson C., Ohlin L. Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones // Ibid. 2001. V. 436. P. 92–100.
- Kimmel C., Ballard W., Kimmel S. et al. T. Stages of embryonic development of the zebrafish // Amer. J. Anat. 2005. V. 203. P. 253–310.
- 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. Embriol. 2002. V. 107. P. 185–198.
- Müller T., Wullimann M. Anatomy of neurogenesis in the early zebrafish brain // Devel. Brain Res. 2003. V. 140. P. 137–155.
- Puelles L., Rubenstein J. Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization // Trends Neurosci. 1993. V. 16. P. 472–479.
- Rink E., Wullimann M. 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.
- Villar-Cheda B., Pérez-Costas E., Meléndez-Ferro M. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunoreactivity and development of pineal complex and habenula of sea lamprey // Brain Res. Bull. 2002. V. 57. P. 285–287.
- Wullimann M., Müller T. Identification and morphogenesis of eminentia thalami in the zebrafish // J. Comp. Neurol. 2004. V. 471. P. 37–48.
- Wullimann M., Puelles L. Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains // Anat. Embryol. 1999. V. 329. P. 329–348.
- Wullimann M., Rink E. The teleostean forebrain: A comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization // Brain Res. Bull. 2002. V. 57. P. 363–370.
- Zikopoulos B., Kentouri M., Dermon C. Proliferation zones in the adult brain of sequential hermaphrodite teleost species (*Sparus aurata*) // Brain Behav. Evol. 2000. V. 56. P. 310–322.
- Zupanc G. Neurogenesis, cell death and regeneration in the adult gymnotiform brain // J. Exp. Biol. 1999. V. 202. P. 1435–1446.
- Zupanc G. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish // Brain Behav. Evol. 2001. V. 58. P. 250–275.
- Zupanc G., Horschke I. Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study // J. Comp. Neurol. 1995. V. 353. P. 213–233.

**Proliferative Zones in the Brain of the Amur Sturgeon Fry.
Interactions with Neuromeres and Migration of Secondary Matrix Zones**

© 2007 г. **Е. V. Pushchina***, **М. Yu. Fleishman****, and **S. S. Timoshin****

**Institute of Marine Biology, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Pal'chevskogo 17, Vladivostok, 690041 Russia*

***Far East State Medical University, ul. Murav'eva-Apostola 35, Khabarovsk, 68000 Russia*

E-mail: puschina@mail.ru

Received November 24, 2005; in final form, April 5, 2006

Abstract---Neurogenesis in the forebrain region was studied in the *Amur sturgeon Acipenser schrenki* fry using immunocytochemical marking of the proliferative nuclear antigen. The brain zones with high proliferative activities were located at the brain ventricle surface facing the periventricular cavity. In addition to the periventricular zone of primary proliferation, several secondary proliferative zones were found in the forebrain region of the *Amur sturgeon*.

Key words: proliferative zones of brain, neurogenesis, neuromeres, immunocytochemical marking, sturgeons.