

МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

УДК 591.3:591.481:597.5

НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ КЛЕТОК ПЕРИВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНЫ МОЗГА СИМЫ *Oncorhynchus masou* (SALMONIDAE)

© 2012 г. Е. В. Пущина¹, Д. К. Обухов², А. А. Вараксин¹

¹Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток
690041 Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17

E-mail: puschina@mail.ru

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

Поступила в редакцию 09.12.10 г.

Окончательный вариант получен 31.01.11 г.

Исследовали локализацию ГАМК, тирозингидроксилазы (ТН), NADPH-диафоразы, транскрипционного фактора Рах6 и пролиферативного ядерного антигена (PCNA) в перивентрикулярной области мозга симы *Oncorhynchus masou* различных возрастных групп. В промежуточном мозге, центральном сером слое дорсомедиального тегмента, продолговатом и спинном отделах мозга симы показано наличие гетерогенных популяций клеток с радиально ориентированными отростками. ТН-, ГАМК-иммунопозитивные и NADPH-d-позитивные клетки расположены в областях PCNA-иммуногенных пролиферативных зон. Возможно, эти клетки являются потомками радиальной глии и участвуют в росте и физиологической регенерации диэнцефалических и медуллярных структур. В разных возрастных группах симы маркирование ТН-, ГАМК, PCNA и Рах6 выявляет нейромерную конструкцию мозга.

Ключевые слова: радиальная глия, костистые рыбы, постнатальный нейрогенез, нейротрансмиттерная сигнализация, миграция, тирозингидроксилаза, ГАМК, развитие, Рах6, NADPH-диафораза, пролиферация.

У разных видов рыб, включая нейрогенетическую модель – данио *Danio rerio*, в головном мозге показано наличие пролиферативных перивентрикулярных областей (Zupanc, Horschke, 1995). Результаты недавних исследований на *Danio rerio* (Grandel et al., 2006) показали, что, новообразованные клетки двигаются от желудочка вглубь мозга, где они дифференцируются в нейроны. Интерес к исследованию этих процессов у рыб обусловлен тем, что радиальная глия (РГ) в большом количестве присутствует в их мозге во взрослом состоянии, поскольку мозг рыб продолжает расти на протяжении всей жизни (Zupanc, 2006). Несмотря на имеющиеся в литературе сведения, участие РГ в процессе нейрогенеза взрослых животных мало изучено. Одной из причин недостатка такой информации является отсутствие надежных маркеров РГ у низших позвоночных. Иммуногистохимические маркеры астроцитарной глии млекопитающих, такие как глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP), виментин (V) или протеин S-100 маркирует лишь отдельные клетки РГ рыб, а окрашивание часто ограничивается либо телом клетки, либо ее длинным отростком (Pelligrini et al., 2007). Наши предварительные исследования на симе показали, что в отличие от других видов

рыб ТН в мозге симы маркирует специфический тип перивентрикулярно расположенных клеток, имеющих длинные радиальные отростки. Такие клетки расположены вдоль просвета III желудочка и в каудальных областях мозга (Пущина, 2010). Сходную картину мы наблюдали при иммуномаркировании ГАМК (Pushchina, Obukhov, 2010). Другим нейрохимическим маркером перивентрикулярной глии в мозге костистых рыб является NADPH-диафораза, впервые описанная в перивентрикулярной зоне мозга солнечника (Ma, 1993).

Используя способность популяции перивентрикулярных клеток в мозге симы синтезировать ТН, ГАМК, NADPH-d мы решили исследовать области локализации данных маркеров и оценить изменения в ходе постнатального морфогенеза. В качестве маркера нейродетерминации (Wullimann, Muller, 2004) и “нейрогенетических ниш” (очагов постнатального нейрогенеза млекопитающих, см. Maekawa et al., 2005, Osumi et al., 2008) у симы был использован транскрипционный фактор Рах6. Для идентификации пролиферирующих клеток мы использовали пролиферативный ядерный антиген (Пущина и др., 2007).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследования послужили трех- и шестимесячные сеголетки (по 20 экз.), годовики (20 экз.) и половозрелые (20 экз.) особи симы *Oncorhynchus masou* полученные с Рязановского экспериментально-производственного рыбоводного завода в 2009 г. Животных содержали в аквариумах с аэрируемой пресной водой при температуре 17–18°C; анестезировали, помещая в кювету с 1% раствором MS-222 на морской воде на 10–15 мин.

Гистохимическое исследование активности NADPH-d проводили в соответствии с общепринятой методикой (Hore, Vincent, 1989), адаптированной нами для головного мозга рыб (Пущина, 2007). Контрольные препараты помещали в среду с добавлением ингибитора NO-синтазы 10 мМ N-монометил-L-аргинина. Выявление ядерного антигена пролиферации (PCNA) проводили на парафиновых срезах мозга симы в соответствии с ранее описанной схемой (Пущина и др., 2007).

Иммуногистохимическое выявление ТН, ГАМК, и транскрипционного фактора Рахб проводили с помощью стандартного авидин-биотинового пероксидазного маркирования на свободноплавающих срезах. Срезы инкубировали с моноклональными антителами мыши против ГАМК (ICN, Biomedicals, USA), (1 : 5000), тирозингидроксилазы (Vector Laboratories, Burlingame, USA), (1 : 10000), с моноклональными антителами человека против транскрипционного фактора Рахб (Chemicon, USA) (1 : 4000), при температуре 4°C в течение 2 сут. Для визуализации иммуногистохимического маркирования использовали стандартный набор (Vectastain Elite ABC Kit, Burlingame, USA). Для выявления продуктов реакции использовали субстраты синего (ГАМК, Рахб) и красного (ТН) цветов (VIP Substrate Kit, Vector Labs, Burlingame, USA). Процесс окрашивания контролировали под микроскопом, срезы промывали в воде, монтировали на предметные стекла, обезвоживали по стандартной методике и заключали в бальзам. Препараты просматривали и фотографировали на микроскопе Axiovert Apotome.

Оценку специфичности иммуногистохимической реакции проводили методом негативного контроля. Срезы мозга, вместо первичных антител, инкубировали с 1% неиммунной сывороткой лошади в течение 1 сут и далее проводили как с первичными антителами. Во всех контрольных экспериментах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Верификация ГАМК, ТН, NADPH-d и Рахб в мозге симы выявила клетки, расположенные в перивентрикулярной зоне (ПВЗ) различных областей мозга. Результаты исследований мозга раз-

личных возрастных групп симы показали, что ГАМК, ТН и Рахб селективно маркирует перивентрикулярные клетки и волокна в диэнцефалоне, тектуме, мозжечке, продолговатом мозге и спинном мозге. Паттерны распределения данных иммуномаркеров соответствуют нейромерной организации мозга симы. На границах первых трех прозомеров, включающих претектум (P1), дорсальный таламус (P2) и вентральный таламус (P3), и ромбомеров продолговатого мозга иммуномаркирование ГАМК, ТН и Рахб отсутствовало.

В спинном мозге годовалой молодежи симы ТН маркировала тела клеток, расположенных у центрального канала и радиально ориентированные волокна, которые на периферии спинного мозга формировали характерные “концевые ножки” (рис. 1, а–в). Иммуногистохимическое (ИГХ) маркирование транскрипционного фактора Рахб и ТН показало наличие иммунореактивной глии в поверхностных слоях тектума у 3-х и 6 месячной молодежи, а также в перивентрикулярном и центральном фиброзном слоях (рис. 1, г, д). Маркирование Рахб у годовалой симы позволило идентифицировать P1–P3 прозомеры, включающие претектум (P1), дорсальный таламус (P2) и вентральный таламус (P3) (рис. 1, е, ж). В мозжечке годовалой симы Рахб-ир клетки были выявлены в области ганглионарного слоя (рис. 1, з). Наибольшая плотность ГАМК-ир волокон и клеточных тел была выявлена в диэнцефалоне полугодовалой симы.

У взрослых особей симы ТН маркирует клетки с радиально ориентированными отростками в области *zona limitans* – границе отделяющей паллиальную часть конечного мозга от субпаллиальной (рис. 2, а, б). В перивентрикулярных областях промежуточного мозга ТН маркирует клетки с радиально ориентированными отростками, расположенные вдоль всего инфундибулюма; в дорсальной области диэнцефалона – на территории претектума, дорсальных и вентро-медиальных ядер таламуса (рис. 2, в), передней части паравентрикулярного органа (рис. 2, г). В вентральной области – в мелкоклеточной части преоптического ядра (рис. 2, д) и переднетуберального ядра. В промежуточном мозге маркирование ТН идентифицировало границы прозомеров (рис. 2, е). В продолговатом мозге симы ТН маркирует клетки с их длинными отростками вокруг медиального продольного пучка (рис. 2, ж) и вентромедиальном медулярном сегменте (рис. 2, з). Наиболее крупное скопление ТН-ир клеток и радиально ориентированных волокон в продолговатом мозге симы выявлено в интерфасцикулярной области (рис. 2, ж). В каудальных областях ТН маркирует перивентрикулярные клетки с радиальными отростками в субвентрикулярной области на территории ядер IX–X черепно-мозговых нервов (рис. 2, ж). Иммунопозитивные клетки сходной морфологии были выявлены в медиальной и латеральной обла-

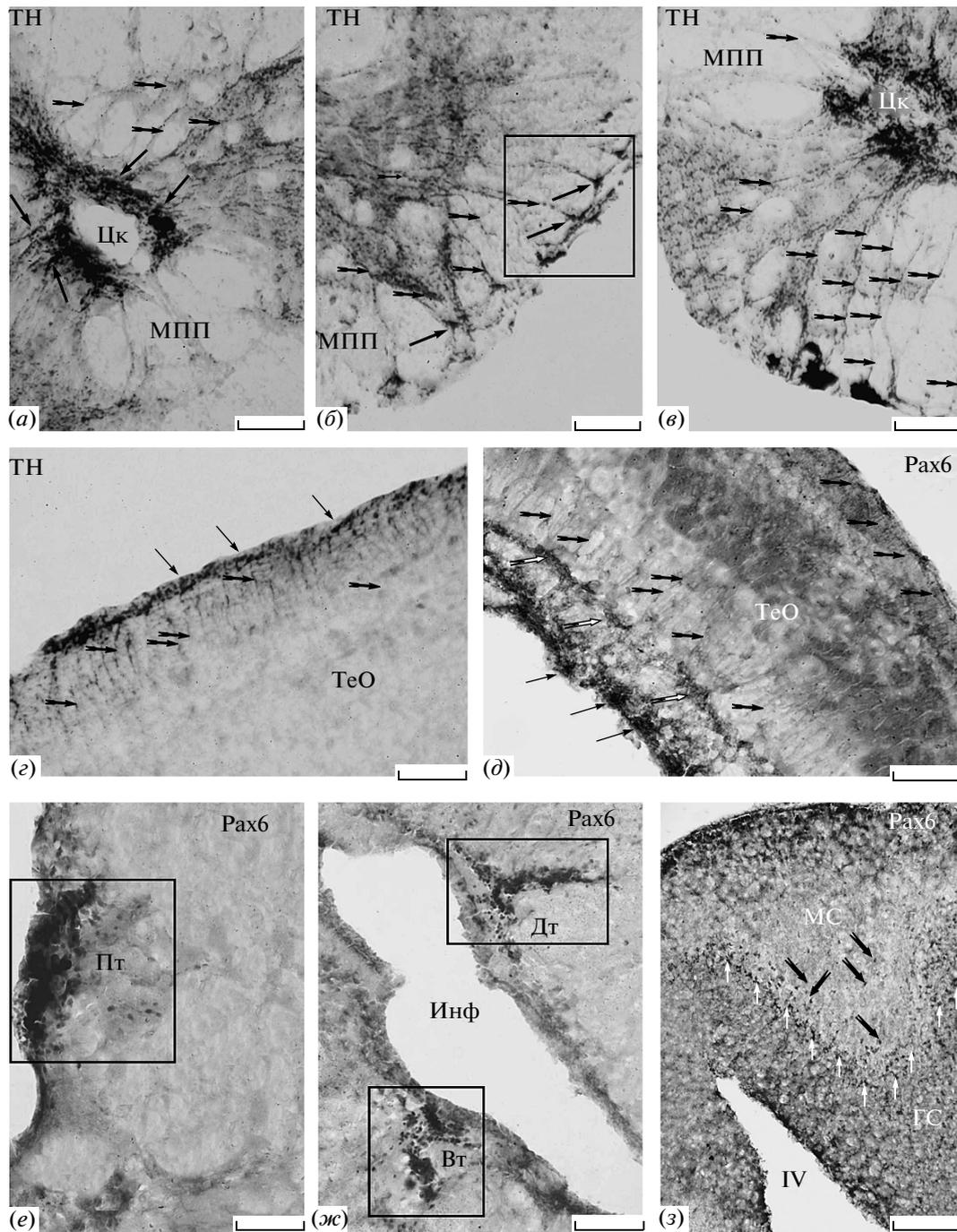
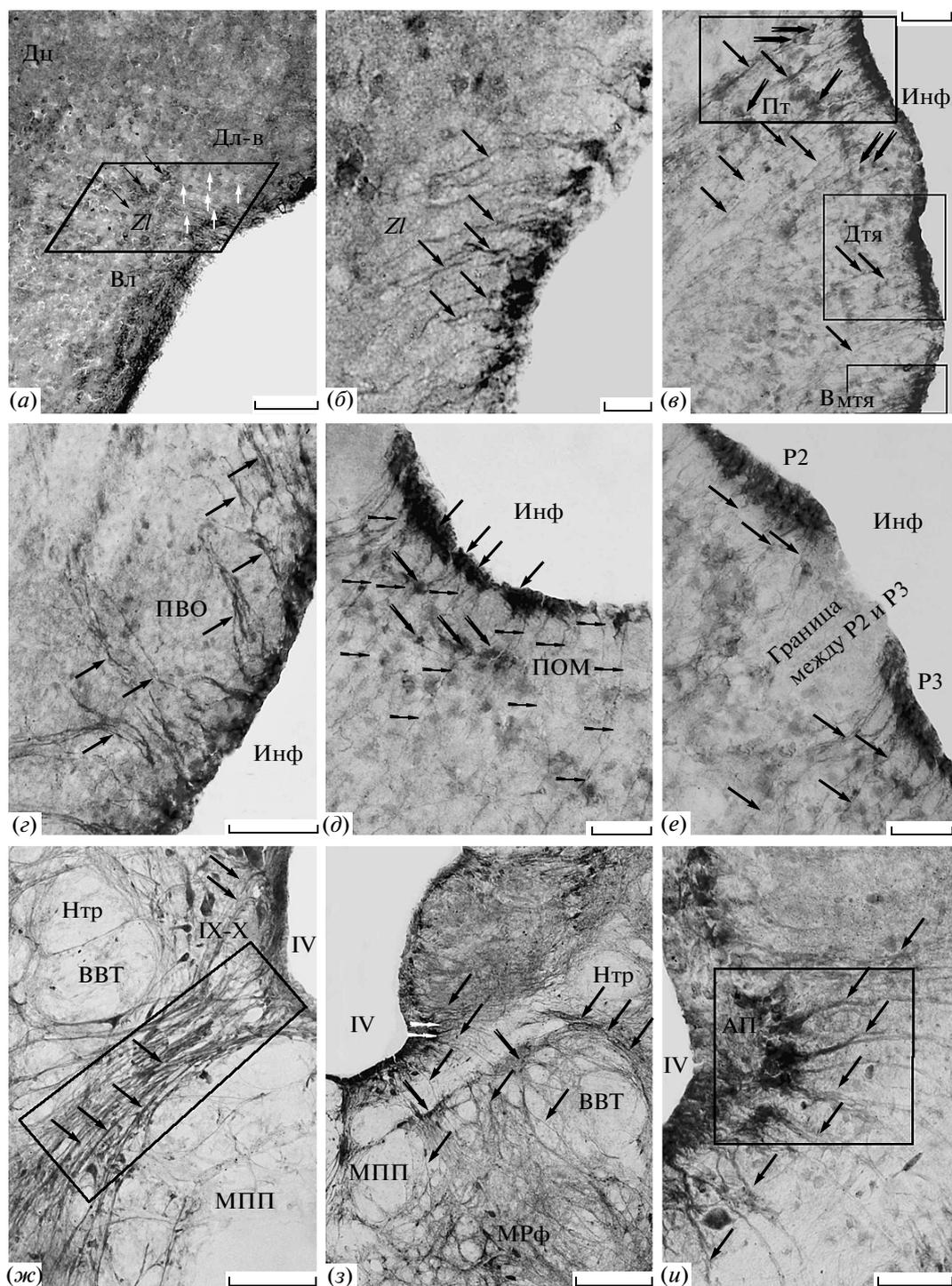


Рис. 1. Иммулокализация ТН и транскрипционного фактора Pax6 в мозге разновозрастной молодежи симы *Onchorhynchus masou*. *a* – иммулокализация ТН в спинном мозге годовалой симы, стрелками показаны тела клеток, расположенных у просвета центрального канала, мелкими фигурными стрелками на *б* и *в* показаны радиальные волокна, квадратом ограничены участки волокон с “концевыми ножками”, обозначенными черными стрелками на *б*, *г* – ТН в поверхностных слоях тектума трехмесячной симы, черными стрелками показаны тела глиальных клеток, мелкими фигурными стрелками показаны волокна, *д* – Pax6 в тектуме полугодовой симы, сплошными стрелками показаны тела иммуногенных клеток перивентрикулярного слоя, стрелками с прорезью тела мигрировавших клеток, фигурными стрелками радиальные волокна; Pax6 в претектуме на *е*, таламусе на *ж* и в мозжечке на *з* годовалой симы, квадратами окуптурены скопления иммунопозитивных клеток, соответствующих претектальному (Пт), дорсальному (Дт) и вентральному (Вт) таламическому прозомерам; белыми стрелками показаны тела Pax6-ир клеток, черными стрелками с прорезью показаны тела мигрировавших клеток. Обозначения: Цк – центральный канал, МПП – медиальный продольный пучок, ТеО – оптический тектум, Пт – претектум, Дт – дорсальный таламус, Вт – вентральный таламус, МС – молекулярный слой, ГС – гранулярный слой, IV – четвертый желудочек. Масштаб: *a–в*, *г*, *е* – 50 мкм, *д*, *ж*, *з* – 100 мкм.



стях *area postrema* (рис. 2, *и*) и межпучковой области спинного мозга.

Иммунолокализация ГАМК в перивентрикулярных областях промежуточного мозга сходна с распределением ТН. ГАМК-ир клетки и радиальные тонкие волокна были выявлены вдоль инфундибулярного просвета, в области крупно- и мелко-клеточной частей преоптического ядра (рис. 3, *а*),

дорсальных таламических ядер (рис. 3, *б*), паравентрикулярного органа и переднетуберального ядра (рис. 3, *в*), дорсального и вентрального таламуса и перивентрикулярного претектума (рис. 3, *г*). Иммунолокализация ГАМК в перивентрикулярной области промежуточного мозга позволила верифицировать границы переднемозговых прозомеров (рис. 3, *е*). В среднем мозге ГАМК-ир клетки и радиальные волокна были выявлены в области

Рис. 2. Иммунолокализация ТН в мозге симы *Oncorhynchus masou*. *а* – иммунопозитивные клетки (черные стрелки) и радиальные волокна (белые стрелки) в области *zona limitans*, Дл – в вентральный сегмент дорсо-латеральной области, Вл – вентро-латеральная область, *б* – клетки с радиальными отростками под большим увеличением (черные стрелки), *в* – перивентрикулярная область дорсального таламуса, прямоугольниками околочтены претектальный регион (Пт), дорсальные таламические ядра (Дтя) и вентромедиальные таламические ядра (Вмтя), черными стрелками показаны волокна, стрелками с прорезью показаны мигрировавшие клетки, *г* – перивентрикулярный участок паравентрикулярного органа (ПВО), *д* – мелкоклеточная часть преоптической области (ПОМ), фигурные стрелки показывают радиальные волокна, черные сплошные стрелки – перивентрикулярные тела ТН-ир клеток, *е* – граница между переднемозговыми нейромерами P2 и P3 на которой отсутствует иммуномаркирование ТН, *ж* – интерфасцикулярный сегмент продолговатого мозга (околочтено прямоугольником), стрелками показаны радиальные волокна, *з* – вентромедиальный медуллярный сегмент, стрелки с прорезью показывают мигрировавшие клетки, *и* – клетки с радиальными отростками в вентро-медиальной области *area postrema* (околочтено прямоугольником). Обозначения: Нтр – нисходящий путь тройничного нерва, Ввт – вторичный вкусовой тракт, IX–X – ядра языкоглоточного и блуждающего нервов, МРФ – медиальная ретикулярная формация, Инф – инфундибулум, Зl – *zona limitans*, Ап – *area postrema*, остальные обозначения, как на рис. 1. Масштаб: *а, г, ж* – 100 мкм, *б* – 20 мкм, *в, д, е, и* – 50 мкм, *з* – 200 мкм.

дорсо-медиального тегментума (рис. 3, *д*) и полулунного валика. В продолговатом мозге ГАМК-ир элементы и тонкие радиальные волокна обнаружены в межпучковой области ретикулярной формации (рис. 3, *е*), на территории ядер IX–X нервов (рис. 3, *ж*), в дорсальной части *area postrema*, среди нейронов вентральной спинномозговой колонны (рис. 3, *з*).

При гистохимическом маркировании NADPH-d в мозге трехгодовалой симы в области перивентрикулярного диэнцефалона, центрального серого слоя продолговатого мозга, тектуме, базальном мезэнцефалоне, мозжечковой заслонке, были выявлены клетки, имеющие радиальные отростки с высокой активностью NADPH-диафоразы (рис. 4). Ро-стрально расположенная популяция NADPH-d-позитивных клеток была обнаружена в мелкоклеточной преоптической области перивентрикулярного диэнцефалона (рис. 4, *а*). Мезэнцефалические скопления клеток глии обнаружены в области базального тегментума и поверхностных слоях тектума (рис. 4, *б*). В мозжечке NADPH-d-позитивные радиальные волокна обнаружены в медиальной части заслонки (рис. 4, *в*). Каудальные NADPH-d-позитивные скопления перивентрикулярных клеток симы были выявлены в субвентрикулярной области на территории ядер V, VII, IX–X черепно-мозговых нервов (рис. 4, *г*). В отличие от ТН- и ГАМК-иммуногенных элементов в этих же областях, NADPH-d-позитивные клетки имели отростки различной длины, а некоторые клетки вообще не имели отростков. Другая популяция мелких NADPH-d-позитивных клеток была выявлена вокруг медиального продольного пучка (рис. 4, *г, д*), на территории медиальной ретикулярной формации (рис. 4, *д*) и постригеминальной клеточной группы центрального серого слоя (рис. 4, *е, ж*).

Маркирование транскрипционного фактора Рахб в мозге взрослой симы существенно отличалось от иммунолокализации этого маркера у молодки (рис. 5). В промежуточном и продолговатом отделах мозга полугодовалой симы были выявлены скопления Рахб-ир клеток, их распределение соот-

ветствовало распределению дорсальных переднемозговых P2–P3 прозомеров и ромбомеров (рис. 5, *а, б*). У взрослой симы Рахб-ир клетки были выявлены в перивентрикулярном диэнцефалоне в области дорсальных и вентромедиальных таламических ядер, переднего таламического ядра, а на участках между дорсальным и вентральным таламусом были обнаружены волокна (рис. 5, *в*). Каудальнее Рахб-ир клетки и волокна были выявлены вдоль инфундибулярного просвета в составе паравентрикулярного органа и переднетуберального ядра (рис. 5, *г*). На границе P2 и P3 нейромеров были выявлены Рахб-ир клетки и длинные волокна, вдоль которых распространялись мелкие слабо маркированные Рахб клетки (рис. 5, *д*). В среднем мозге в области дорсального тегментума и мезэнцефалического центрального серого слоя обнаружено множество мелких Рахб-ир клеток и радиально ориентированных крупных волокон, организованных в пучки (рис. 5, *е*), вдоль которых были рассредоточены многочисленные мелкие Рахб-ир клетки (рис. 5, *ж*). Большинство мезэнцефалических пучков Рахб-ир волокон были направлены в область ретикулярной формации.

Маркирование PCNA в перивентрикулярных областях промежуточного и продолговатого мозга сеголеток, годовиков и взрослых особей симы выявило обширную популяцию пролиферирующих клеток (рис. 6, *а, в–д*). На уровне диэнцефалона и ромбэнцефалона распределение ТН-ир клеток соответствует нейромерной конструкции мозга, подтверждающейся также при маркировании пролиферативных зон с помощью PCNA (рис. 6, *б, ж*). В промежуточном мозге расположение пролиферативных PCNA-иммуногенных зон соответствует прозомерной конструкции переднего мозга (рис. 6, *в*). На границе между дорсальными прозомерами P1–P3 иммунопозитивное маркирование ТН и PCNA отсутствует (рис. 6, *б, в*). В продолговатом мозге годовалой и взрослой симы PCNA-ир клетки были расположены на дне ромбовидной ямки рострально, на уровне V–VII пар черепно-мозговых нервов (рис. 6, *г, д*). У симы этих же воз-

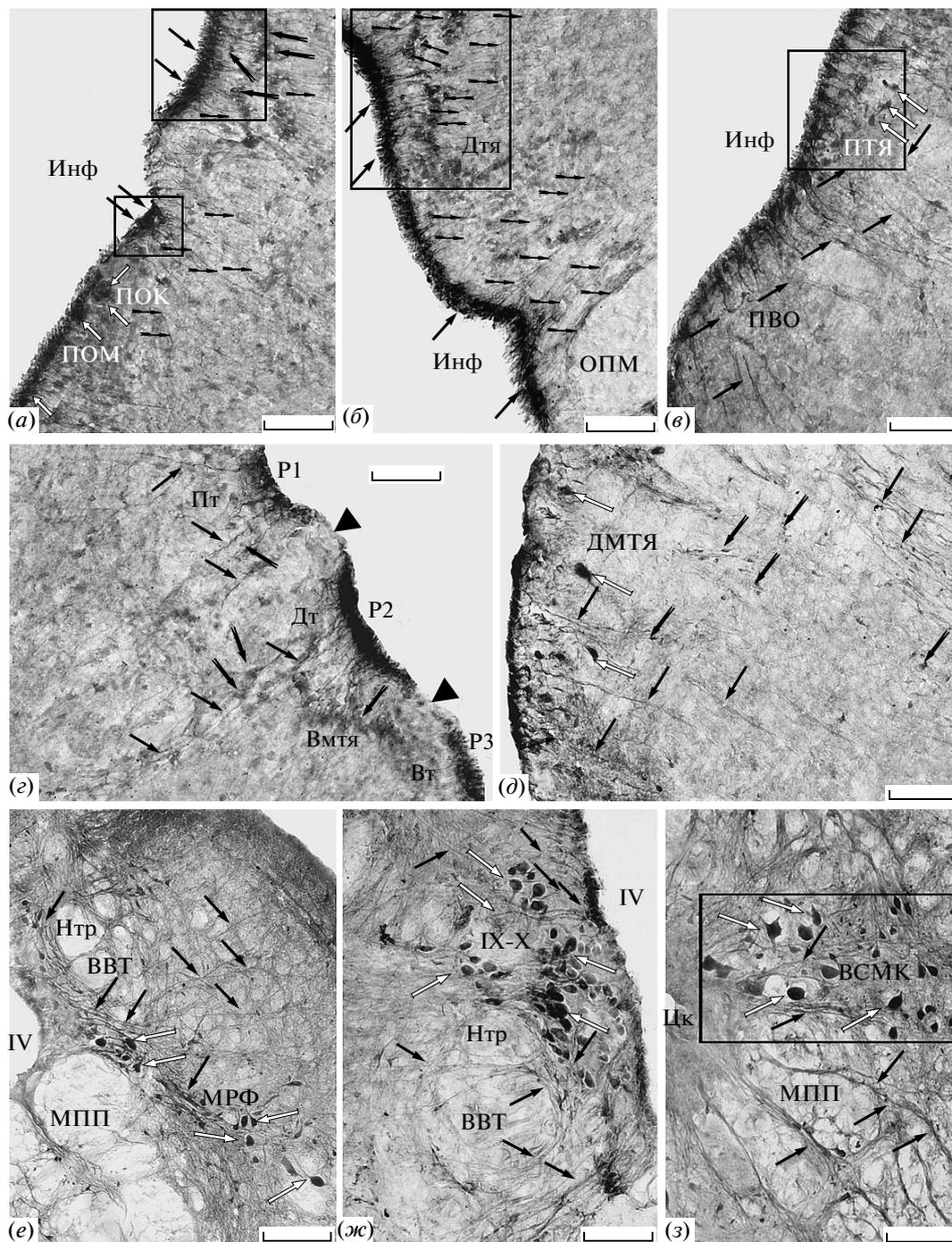


Рис. 3. Иммунолокализация ГАМК в мозге сиры *Onchorhynchus masou*. *а* – кластеры иммунопозитивных клеток с радиальными отростками (оконтурены квадратами) в преоптической области, белыми стрелками показаны нейроны крупноклеточного (ПОК) и мелкоклеточного (ПОМ) ядер, черными стрелками – тела, фигурными стрелками – радиальные волокна, стрелками с прорезью мигрировавшие клетки, *б* – перивентрикулярные ГАМК-ир элементы в области дорсального таламуса, *в* – паравентрикулярного органа, клетки переднетуберального ядра (оконтурено квадратом) обозначены белыми стрелками, *г* – клетки с радиальными отростками в составе переднемозговых нейромеров Р1, Р2 и Р3 на границе которых (черные острия стрелок) отсутствует иммуномаркирование ГАМК, радиальные волокна (черные стрелки), мигрировавшие клетки в составе претектума (Пт), дорсального таламуса (Дт) и вентро-медиальных ядер таламуса (Вмтя) показаны стрелками с прорезью, *д* – радиальные отростки (черные стрелки) в составе дорсомедиального тегмента, белыми стрелками показаны крупные нейроны дорсомедиального тегментального ядра (ДМТЯ), *е* – радиальные волокна в межпучковой области (черные стрелки), иммунопозитивные клетки МРФ показаны белыми стрелками, *ж* – клетки с радиальными отростками на территории ядер IX–X черепно-мозговых нервов (нейроны показаны белыми стрелками), *з* – радиальные волокна на территории спинного мозга (тела нейронов показаны белыми стрелками). Обозначения: ОПМ – отогнутый пучок Мейнерга, ПТЯ – переднетуберальное ядро, ВСМК – вентральная спинномозговая колонна, остальные обозначения, как на рис. 1 и 2. Масштаб: *а–г, ж, з* – 100 мкм, *д, е* – 200 мкм.

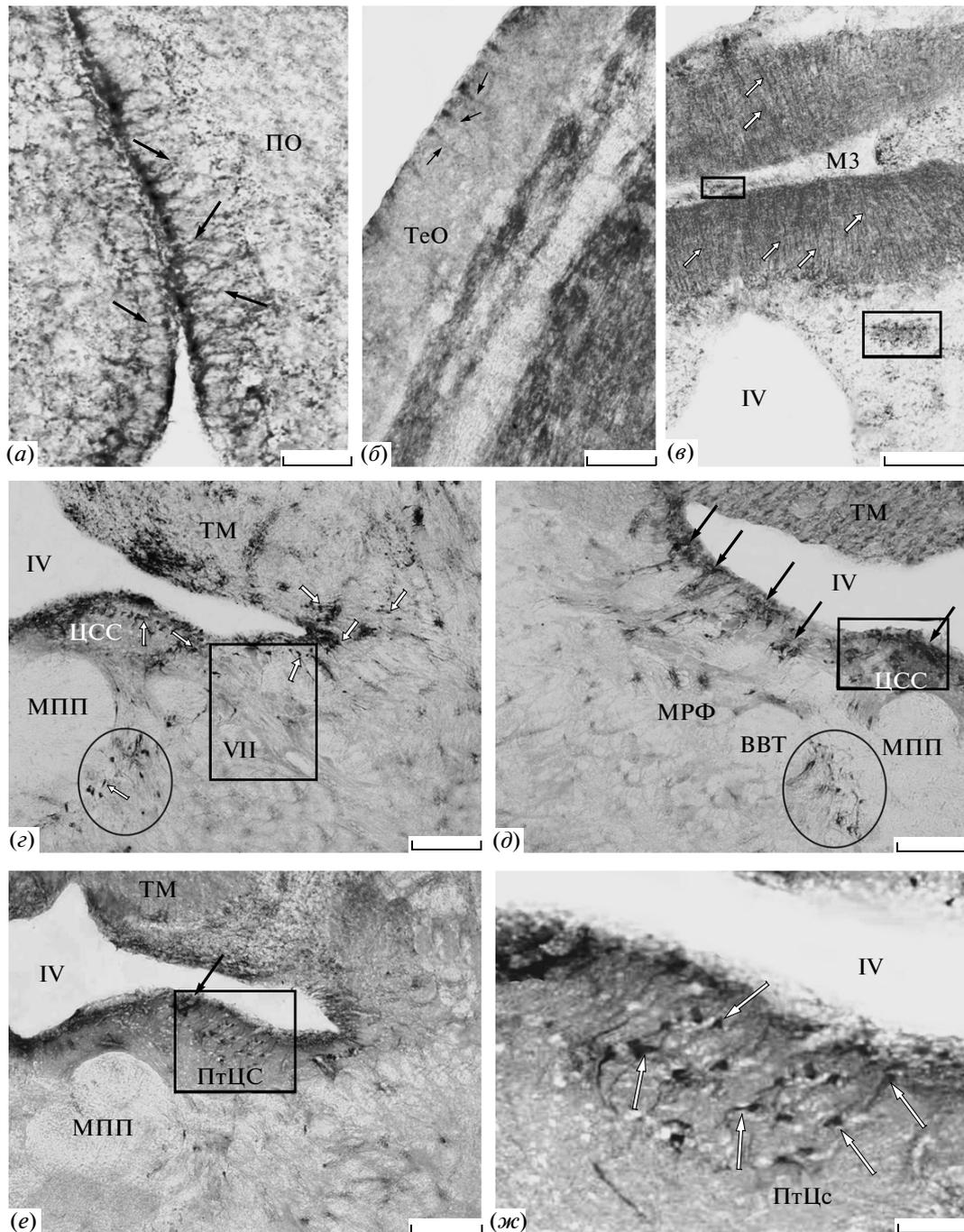


Рис. 4. Локализация NADPH-d в мозге симы *Oncorhynchus masou*. *a* – перивентрикулярные глиоподобные клетки в мелкоклеточной преоптической области (черные стрелки), в поверхностных слоях тектума на *б*, радиальные волокна в медиальной части мозжечковой заслонки (МЗ) на *в*, волокна показаны белыми стрелками, прямоугольниками околнурены комплексы сосудов и периваскулярной глии, *г* – перивентрикулярные клетки в центральном сером слое (ЦСС) субвентрикулярной области на территории ядра лицевого нерва (NADPH-d-негативное ядро VII околнурено прямоугольником), в овале прилежащее к медиальному продольному пучку скопление NADPH-d-позитивных клеток (белые стрелки), *д* – кластеры перивентрикулярных клеток (черные стрелки) ЦСС на территории ретикулярной формации, в квадрате кластер NADPH-d-позитивных клеток, прилежащий к сосуду, *е* – перивентрикулярные клетки на территории постригеминальной группы центрального серого слоя (в квадрате), стрелками показаны сосуды, *ж* – постригеминальная группа перивентрикулярной глии (белые стрелки) на большом увеличении. Обозначения: ПО – преоптическая область, ТМ – тело мозжечка, ПтЦС – постригеминальная группа центрального серого слоя, остальные обозначения, как на рис. 1–3. Масштаб: *а, ж* – 50 мкм, *б* – 20 мкм, *в–е* – 200 мкм.

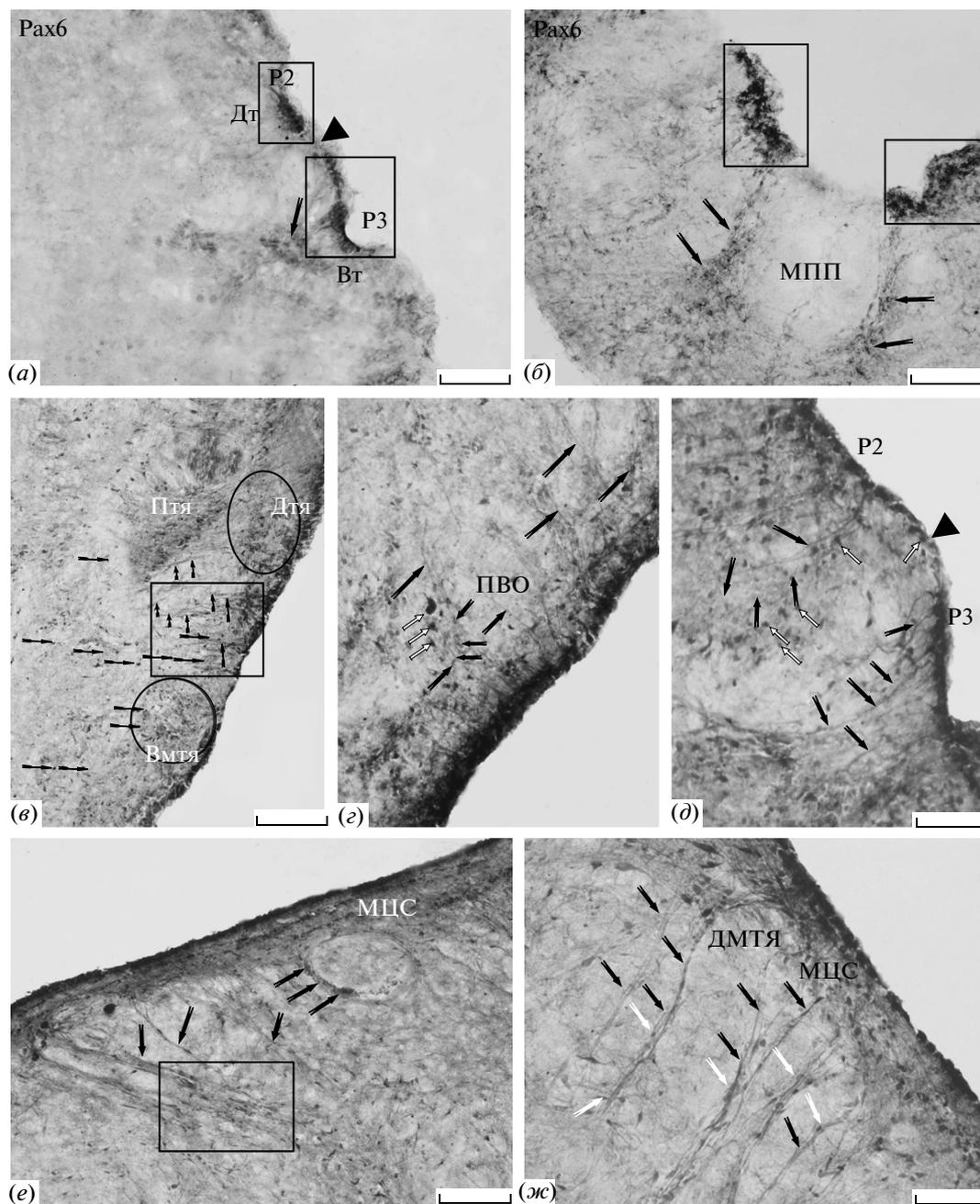


Рис. 5. Иммунолокализация транскрипционного фактора Pax6 в мозге 6-месячной молоди (а, б) и взрослой (в–ж) симы *Oncorhynchus masou*. Скопления иммунопозитивных клеток в промежуточном на а и продолговатом на б отделах мозга (в прямоугольниках) маркирует его нейромерную структуру, участки лишённые иммуномечения являются границами переднемозговых Р2 и Р3 нейромеров (чёрное острое стрелки), стрелки с прорезью показывают скопления мигрировавших Pax6-ир клеток, лишённых отростков (мелкие фигурные стрелки) в составе дорсальных и вентромедиальных ядер таламуса, разделённых участком (в прямоугольнике), содержащим радиальные волокна (чёрные стрелки), з – иммунопозитивные клетки (белые стрелки) и волокна (чёрные стрелки) в составе паравентрикулярного органа, мигрировавшие слабо маркированные Pax6 клетки обозначены стрелками с прорезью, д – Pax6-ир клетки и волокна на границе переднемозговых нейромеров Р2 и Р3, участок лишённый волокон отмечен чёрным острием стрелки, е – Pax6-ир комплексы в области мезенцефалического центрального серого слоя дорсального тегмента, пучки центростремительных волокон (чёрные стрелки) вдоль которых рассредоточены мелкие Pax6-ир клетки (окопированы прямоугольником), скопления мелких Pax6-ир клеток вокруг крупного мезенцефалического тракта показано стрелками с прорезью, ж – Pax6-ир комплексы в области дорсомедиальных ядер тегмента (ДМТЯ), пучки волокон показаны чёрными стрелками, мигрирующие вдоль них клетки – белыми стрелками. Обозначения: МЦС – мезенцефалический центральный серый слой, Птя – переднее таламическое ядро, остальные обозначения, как на рис. 1–4. Масштаб: а, з, д, ж – 100 мкм, б, в, е – 200 мкм.

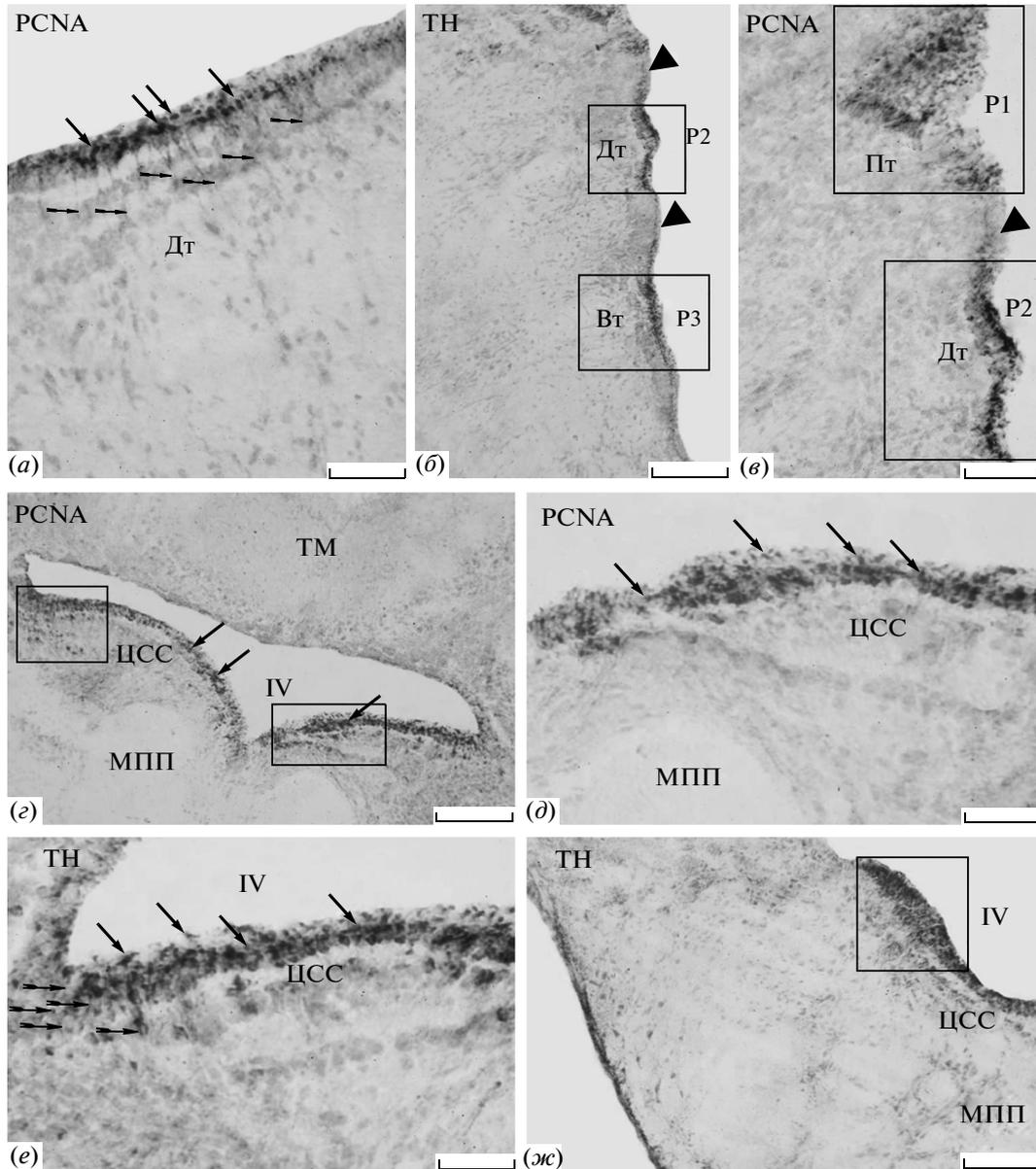


Рис. 6. Иммунолокализация PCNA и TH в мозге разновозрастной симы *Oncorhynchus masou*. *а* – PCNA-ир клетки в дорсальном таламусе взрослой симы, черными стрелками показаны тела иммунопозитивных нейронов, фигурными стрелками показаны радиальные отростки, *б* – кластеры TH-ир клеток годовалой симы в составе дорсального и вентрального таламических нейромеров (P2 и P3) разделенные иммунонегативной зоной (черное острие стрелки), *в* – PCNA-ир пре-тектальный (P1) и дорсально таламический нейромеры (P2) взрослой симы, *г* – PCNA-ир пролиферативная зона на территории центрального серого слоя продолговатого мозга годовалой симы, *д* – PCNA-иммунопозитивные клетки в продолговатом мозге взрослой симы (показаны стрелками), *е* – TH-иммунопозитивные клетки и радиальные волокна (фигурные стрелки) в составе ЦСС годовалой симы, *ж* – скопление TH-ир клеток (оконтурены квадратом) в каудальной части продолговатого мозга годовалой симы. Масштаб: *а, в, д, е* – 100 мкм, *б, г, ж* – 200 мкм.

растных групп была обнаружена сходная иммунолокализация TH (рис. 6, *е, ж*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали, что в перивентрикулярной зоне диэнцефалического, мезенцефалического, медуллярного и

спинного отделов мозга симы локализована гетерогенная в морфологическом и нейрохимическом отношении популяция клеток, часть которых имеет отростки и способна продуцировать TH, ГАМК NADPH-d. Ранее у рыб в перивентрикулярных областях разных отделов головного мозга было показано наличие пролиферативных зон (Extröm et al., 2001; Pellegrini et al., 2007), где молодые клетки

двигаются по направлению от желудочка вглубь мозга, дифференцируясь в нейроны и глию. Результаты настоящего исследования показывают, что у симы в разные возрастные периоды существуют пролиферативные зоны. В этих зонах, расположенных на территории промежуточного и продолговатого мозга были выявлены клетки, экспрессирующие TH, ГАМК и NADPH-d. Мы полагаем, что клетки экспрессирующие данные нейромаркеры являются вновь образованными из радиальной глии нейронами. Возможно, что за счет этих клеток происходит рост диэнцефалических, мезэнцефалических и медуллярных структур мозга симы и их физиологическая регенерация.

В настоящее время установлено, что нейроны вскоре после образования из клеток-предшественников и задолго до формирования межнейронных связей и синаптогенеза начинают секретировать характерные для них сигнальные молекулы (Ugrumov, 2010). Сигнальные молекулы участвуют в аутокринной и паракринной регуляции дифференцировки нейронов-мишеней, выступая в качестве транскрипционных и/или морфогенетических факторов. В исследованиях на млекопитающих доказано долгосрочное морфогенетическое влияние на дифференцировку нейронов-мишеней и экспрессию специфического фенотипа (Ugrumov, 2009, 2010). Показано, что молекулы нейротрансмиттеров, оказывают существенное влияние на развитие клеток в течение эмбриогенеза (Platel et al., 2007), а также в ходе постэмбрионального нейрогенеза субгранулярной зоны зубчатой извилины медиальной и нижней поверхности полушария большого мозга (Cameron et al., 1995; Aniol, Stepanichev, 2007). В последнее время появляются сведения о том, что нейротрансмиттеры регулируют постнатальный нейрогенез в субвентрикулярной области головного мозга у различных позвоночных животных. Для некоторых нейротрансмиттеров установлены сигнальные механизмы, включающие рецепторы, источники высвобождения и молекулы-переносчики (Aniol, Stepanichev, 2007; Platel et al., 2010). Результаты проведенных нами исследований позволяют предполагать, что в промежуточном и продолговатом отделах мозга симы TH, ГАМК и NADPH-d могут выступать в качестве сигнальных молекул, регулирующих процессы постэмбрионального нейрогенеза.

Субвентрикулярная зона (СВЗ) млекопитающих образована различными типами клеток, включающими астроцито-подобные клетки, обладающие свойствами нейрональных стволовых клеток. В ходе эмбриогенеза млекопитающих ГАМК-сигнализация обеспечивает двусторонние связи между астроцито-подобными клетками и нейробластами (Platel et al., 2010). Показано, что в мозге взрослых млекопитающих ГАМК регулирует процессы постэмбрионального нейрогенеза (Aniol, Stepanichev, 2007). У рыб было показано участие

ГАМК в эмбриональном и раннем постэмбриональном развитии головного мозга (Extröm, Ohlin, 1995), а участие в процессах постэмбрионального нейрогенеза (adult neurogenesis) ранее описано не было. ГАМК является важнейшим тормозным нейромедиатором в мозге позвоночных. Однако, помимо роли классического нейромедиатора, ГАМК наряду с глутаматом, серотонином, дофамином и норадреналином обладает нейротрофической активностью в ходе онтогенеза (Madtes, Redburn, 1983). В экспериментах *in situ* и *in vitro* на сетчатке и мозжечке млекопитающих показано участие ГАМК в качестве трофического фактора (Madtes, Redburn, 1983). ГАМК модулирует рост аксонов у тектальных и кортикальных нейронов цыпленка и крысы (Michler-Stuke, Wolff, 1987; Michler, Wolff, 1988). В раннем онтогенезе ГАМК деполаризует новорожденные клетки зубчатой формации гиппокампа и мигрирующие клетки-предшественники, поскольку в них высока внутриклеточная концентрация хлоридных ионов (Overstreet Wadiche et al., 2005). Внешняя ГАМК-индуцированная деполаризация и приток ионов кальция необходимы для начала роста дендритов и их удлинения в образованных постнатально обонятельных интернейронах (Gascon et al., 2006). Прекращение ГАМК-ергической деполаризации на гиперполяризацию с помощью нокаутирования хлоридного импортера NKCC1 в прогениторных клетках субгранулярной зоне гиппокампа уменьшает дендритную арборизацию и приостанавливает формирование синапсов (Ge et al., 2006).

Вопрос о том, образуются ли ГАМК-ергические клетки в процессе постэмбрионального развития у рыб в настоящее время остается открытым. В ранее проведенных исследованиях на трехиглой колюшке *Gasterosteus aculeatus* рассматривалось развитие ГАМК-ергических нейронов в ходе раннего онтогенеза (Extröm, Ohlin, 1995). В течение более поздних эмбриональных стадий и раннего личиночного развития количество ГАМК-ергических нейронов в мозге колюшки неуклонно возрастало до заполнения ими фактически всех переднемозговых ядер (Extröm, Ohlin, 1995). Было показано, что в возрасте 1 месяца ГАМК иммунолокализация перемещается из тел нейронов и трактов в так называемое “нейропильное окрашивание” (Extröm, Ohlin, 1995). В наших исследованиях на полугодовалой и годовалой молодежи симы выявлены похожие изменения иммунолокализации ГАМК. Исследования распределения ГАМК-ергических нейронов в переднем мозге взрослой золотой рыбки (Martinoli et al., 1990) и угря (Medina et al., 1994), показали, что у обоих видов ГАМК-ергические нейроны присутствуют вдоль всего теленцефалона и диэнцефалона. У этих видов множество медиально расположенных клеток обнаружено в дорсальном и вентральном теленцефалоне, а в латеральных и задних областях количество клеток бы-

ло значительно снижено. Преоптический, перивентрикулярный гипоталамический регионы, таламические и претектальные ядра золотой рыбки и угря, как и у взрослой симы, содержит многочисленные ГАМК-ергические клетки. Интересно, что у этих видов, как и у симы наибольшая плотность распределения ГАМК-ергических клеток выявлена в медиальной области, прилежащей к просвету желудочка. Из-за отсутствия данных о времени формирования ядер в этой области мозга рыб сведения о распределении ГАМК в эмбриональном мозге не могут быть экстраполированы на взрослых животных и, следовательно, выводы о том, что эмбриональные ГАМК-ергические ядра могут позднее трансформироваться в ГАМК-ергические структуры взрослых животных носят спекулятивный характер. Тем не менее, некоторые авторы (Extröm, Ohlin, 1995) заключают, что все ГАМК-ергические кластеры выявленные в переднем мозге колюшки на стадии 101 ч развития присутствуют и у взрослых особей золотой рыбки и угря. Исключение составляют ликвороконтактирующие ГАМК-ир нейроны, окружающие 3-й желудочек на уровне гипоталамуса, выявленные у эмбриона колюшки. Такие нейроны не обнаружены во взрослом мозге золотой рыбки. Их появление в мозге эмбрионов колюшки считается транзитным, а функциональное значение этого явления в настоящее время неизвестно.

У молодых и взрослой симы иммулокализация ГАМК была выявлена в клетках перивентрикулярной области и радиальных волокнах промежуточного мозга, среднемозгового тегмента, перивентрикулярного серого слоя продолговатого мозга, интерфасцикулярной области, ядер IX–X пары черепно-мозговых нервов, *area postrema* и вентральной спинномозговой колонны. Мы предполагаем, что у симы в перивентрикулярной области диэнцефалического, мезенцефалического, медуллярного и спинального отделов сохраняются ГАМК-ергические нейроны, имеющие признаки фетальной организации. Мы полагаем, что эти клетки могут являться потомками радиальной глии.

В промежуточном, продолговатом, спинном отделах мозга и тектуме годовалой молодой симы в перивентрикулярных клетках определяется ТН. У взрослых особей симы ТН маркирует перивентрикулярные клетки с радиально ориентированными отростками в промежуточном и продолговатом отделах, что ранее не было показано для рыб. Во всех возрастных группах маркирование ТН выявляло нейромерную конструкцию мозга симы.

У взрослых особей симы маркирование ТН было обнаружено на границе отделяющей паллиальную часть полушарий конечного мозга от субпаллиальной. Это согласуется с данными, полученными на *Danio rerio*, где было показано наличие ТН-иммунореактивных потомков нейробластов,

мигрировавших в составе ростральной миграционной волны (Adolf et al., 2006). ТН-иммунопозитивные элементы, напоминающие радиальную глию, были локализованы в ростральных областях спинного мозга, где наиболее отчетливо представлены главные нейроморфологические признаки клеток этого типа по классификации Ракича (Rakic, 2007). В настоящее время показано, что ТН может выступать в качестве морфогенетического или транскрипционного фактора в определенные периоды онтогенеза, оказывая долгосрочное влияние на дифференцировку некатехоламинергических нейронов и экспрессию их фенотипа (Ugrumov, 2010). Предполагаемым механизмом такого воздействия ТН является наличие дофаминергических D_1 – D_3 рецепторов у клеток-мишеней (Callier et al., 2003). Методами автордиографии и гибридизации *in situ* было показано, что в СВЗ эмбрионов и взрослых животных содержится высокий уровень D_3 рецепторов (Diaz et al., 1997). Рецепторы D_2 типа были выявлены у клеток переходного (transit-amplifying) типа, а D_1 и D_2 рецепторы обнаружены у нейробластов (Hoglinger et al., 2004). Несмотря на то, что некоторые нейробласты из СВЗ млекопитающих дифференцируются в дофаминергические интернейроны обонятельной луковицы, они не экспрессируют ТН (Baker et al., 2001). Этот фермент не был обнаружен и у других типов клеток СВЗ млекопитающих. Тем не менее, было показано, что дофамин выделяется из афферентов *substantia nigra*, которые контактируют с клетками переходного типа субвентрикулярной зоны (Hoglinger et al., 2004). Поскольку в настоящее время распределение дофаминергических рецепторов в головном мозге рыб ограничиваются данными по D_1 рецепторам лишь на одном виде (Kapsimali et al., 2000), а иммулокализация ТН в переднемозговом отделе рыб имеет существенные отличия от таковой млекопитающих (Meek, 1994; Wullmann, Rink, 2001; Пушина, 2009), не исключено, что высокое содержание ТН в перивентрикулярных клетках с радиальными отростками у симы, является примером альтернативного адаптационного механизма, функциональная роль которого на сегодняшний день не известна. Мы предполагаем, что обнаруженные нами перивентрикулярные ТН-ир клетки у симы могут являться потомками радиальной глии. Согласно другому предположению перивентрикулярные ТН-ир клетки симы могут соответствовать так называемым моноэнзиматическим нейронам млекопитающих (Ugrumov, 2009). Такие клетки очень многочисленны, широко распространены в период эмбриогенеза и имеют высокий уровень активности ТН. Моноэнзиматические клетки млекопитающих являются источником метаболического предшественника дофамина – 1-3,4-дигидроксифенилаланина (L-DOPA), синтезируемого тирозингидроксилазой в ТН-ир нейронах и выступающего в

качестве нейротрансмиттера/нейромодулятора, воздействуя на клетки-мишени через катехоламинергические рецепторы.

В настоящее время Рахб рассматривается как высоко консервативный транскрипционный фактор, играющий существенную роль в процессах развития ЦНС позвоночных, включая формирование нервной трубки, миграцию нейронов и образование нейронных сетей (Osumi et al., 2008). НСК экспрессируют Рахб как на начальных стадиях развития ЦНС, так и в течение всей жизни в областях постнатального нейрогенеза – “нейрогенетических нишах” (Götz et al., 1998; Osumi et al., 2008). Семейство генов Рахб экспрессируется главным образом в клетках митотической вентрикулярной зоны кортекса (Puelles et al., 2000), где эти гены контролируют развитие РГ, и ее воспроизводство путем асимметричных митозов (Götz et al., 1998). Фактор Рахб контролирует распределение глутаматергических нейронов во все слои коры, которое осуществляется с помощью клеток РГ (Heins et al., 2002). Более специфическим, считается участие генов Рахб в регуляции региональной специализации клеток-предшественников в вентролатеральной коре (Stoykova et al., 2000). Детальное исследование и описание паттернов экспрессии Рахб в эмбриогенезе данио (Wullmann, Rink, 2001), показало, что большинство переднемозговых доменов экспрессирующих Рахб соответствуют миграционному потоку, описанному в области паллиально-субпаллиальной границы амниот. Однако экспрессия Рахб в пролиферирующих клетках РГ, расположенных перивентрикулярно в паллиуме мыши, в том числе изокортексе (Götz et al., 1998), не была обнаружена в развивающемся паллиуме данио (Wullmann, Rink, 2001). Следовательно, некоторые функции Рахб в развивающемся мозге данио, такие как ингибирование субпаллиальной клеточной миграции в паллиум при участии Рахб (Charouton et al., 1999) или же региональная специализация клеток-предшественников в вентролатеральном кортексе (Stoykova et al., 2000) встречается и у млекопитающих и у телестей и, возможно, характерна вообще для всех позвоночных. Другие же функции Рахб, такие как контролирование внутрипаллиальной радиальной миграции нейронов посредством Рахб-ир РГ, могут быть характерными для амниот или даже исключительно для млекопитающих. В настоящее время установлено, что фактор Рахб экспрессируется в постнатальный период нейронами различных областей головного мозга, включающих обонятельную луковицу, миндалину, таламус и мозжечок (Osumi et al., 2008). Умеренная экспрессия Рахб обнаружена в субгранулярной зоне гиппокампа (Maekawa et al., 2005) и эпендимном слое субвентрикулярной зоны латерального желудочка (Kohwi et al., 2005) – областях мозга млекопитающих в которых нейрогенез продолжается в течение всей жизни.

В СВЗ млекопитающих фактор Рахб экспрессируется в нейрональных стволовых/ранних прогениторных клетках, имеющих морфологию радиальной глии и специфически маркирующихся GFAP и нестином (Maekawa et al., 2005, Osumi et al., 2008). Результаты маркирования Рахб на мозге симы показали, что этот маркер экспрессируется как у ранней молодежи, в возрасте 3 и 6 месяцев, так и у годовиков и у взрослых животных. У годовиков мы наблюдали специфическое маркирование перивентрикулярно расположенных клеток, образующих кластеры, или домены. Распределение переднемозговых Рахб-ир доменов соответствует локализации переднемозговых P1-P3 прозомеров согласно классификации (Puelles, Ribenstein, 2003). Исследование поздних возрастных стадий симы выявило специфические скопления клеток с длинными, радиально ориентированными отростками и клеточными телами, расположенными у просвета мозгового желудочка, либо вдоль иммунопозитивных волокон. Паттерн распространения Рахб-ир комплексов симы, включающих иммунопозитивные и расположенные по ходу волокон слабо маркированные Рахб-клетки, относящиеся по нашему мнению к популяции мигрирующих нейробластов, вполне соответствует картине клеточной миграции, характерной для раннего эмбриогенеза.

Другим нейрохимическим маркером клеток перивентрикулярной зоны в мозге рыб является NADPH-диафораза – гистохимический маркер NO-синтазы, впервые описанная в перивентрикулярной зоне мозга солнечника (Ma, 1993). Обнаружение NADPH-d-позитивных перивентрикулярных клеточных скоплений в мозге взрослой симы подтверждает участие NO в качестве фактора регулирующего постэмбриональный морфогенез (Aniol, Stepanichev, 2007). Показано, что NO регулирует процессы направленного роста аксонов и дендритов, а также миграции дифференцирующихся нейронов (Biker et al., 2005). Распределение NADPH-d-позитивных перивентрикулярных клеток в мозге симы сходно с локализацией TH- и ГАМК-ир доменов, но популяция NADPH-d-позитивных клеток морфологически более гетерогенна.

На уровне переднего и продолговатого мозга данио *Danio rerio*, вдоль вентрикулярного просвета сосуществуют быстро и медленно пролиферирующие субпопуляции клеток РГ, отличающиеся по характеру маркирования BrdU (Adolf et al., 2006). Маркирование PCNA показало, что у годовиков и взрослой симы в перивентрикулярных областях промежуточного и центрального сером слое продолговатого мозга представлена популяция пролиферирующих клеток. Более того, на уровне переднего мозга распределение TH-, ГАМК-, Рахб-ир клеток соответствует нейромерной конструкции мозга, что подтверждается при маркировании пролиферативных зон PCNA. На границе между дор-

сальными прозомерами P2-P3 иммунопозитивное маркирование TH, ГАМК, Рах6 и PCNA отсутствует. В промежуточном мозге расположение пролиферативных PCNA-иммуногенных зон соответствует прозомерной конструкции переднего мозга. Таким образом, в ЦНС симы выявлено несколько PCNA-ир зон пролиферации, в которых находятся клетки экспрессирующие TH-, ГАМК и NADPH-d. Мы предполагаем, что эти клетки являются вновь образованными нейронами, что согласуется с данными, полученными на данио (Adolf et al., 2006).

В настоящее время установлено, что участие нейротрансмиттерной сигнализации в постэмбриональном нейрогенезе позвоночных ограничивается слабой адресацией такого воздействия. Единобразие с которым распространяется нейротрансмиттерная сигнализация вдоль всей СВЗ противоречит концепции о мозаичности клеточной и молекулярной природы СВЗ (Platel et al., 2010). В настоящее время не известно различаются ли виды сигнализации среди нейротрансмиттеров, обладающих значительным биохимическим сходством: ГАМК и глутаматная, дофаминовая и норадреналиновая. Также не ясно каким образом сходные по структуре нейротрансмиттеры (например глутамат и ГАМК), воспринимаются астроцито-подобными клетками, рассматривающимися в качестве нейрональных предшественников млекопитающих. Согласно данным Меркеля с соавторами (Merkle et al., 2007) имеет значение позиционная информация: подобные нейрональные предшественники расположены в разных регионах СВЗ и являются источниками развития различных линий интернейронов (Merkle et al., 2007; Young et al., 2007). Однако не ясно, каким образом нейротрансмиттерная сигнализация избирательно регулирует субпопуляции нейральных клеток-предшественников. Неизвестно как согласуется единообразная нейротрансмиттерная сигнализация с ее функциями — регуляцией клеточной миграции и пролиферации. Одним из возможных объяснений является то, что каждый нейротрансмиттер активирует различные подтипы рецепторов, состав субъединиц у которых регулируется в ходе онтогенеза, и таким образом, приводят в действие различные внутриклеточные пути.

Таким образом, в перивентрикулярной области промежуточного мозга, центрального серого слоя дорсомедиального тегмента, продолговатого и спинного отделов мозга симы показано наличие гетерогенных популяций клеток с радиально ориентированными отростками. TH-, ГАМК-иммунопозитивные и NADPH-d-позитивные клетки расположены в областях PCNA-иммуногенных пролиферативных зон. Возможно, эти клетки являются потомками радиальной глии и участвуют в росте и физиологической регенерации дизэнцефалических и медуллярных структур. В разных воз-

растных группах симы маркирование TH-, ГАМК, PCNA и Рах6 выявляет нейромерную конструкцию мозга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пуцина Е.В. Нитроксидергическая организация ядер краниальных нервов продолговатого мозга костистых рыб // Цитология. 2007. Т. 49. № 6. С. 471–483.
- Пуцина Е.В. Роль радиальной глии в пре- и постнатальном гистогенезе нервной системы позвоночных // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2010. № 1. С. 12–17.
- Пуцина Е.В. Тирозингидроксилаза в ядрах конечного и промежуточного мозга горчака (*Rhodeus sericeus*) // Цитология. 2009. Т. 51. № 1. С. 61–75.
- Пуцина Е.В., Флейшман М.Ю., Тимошин С.С. Проллиферативные зоны мозга молодого амурского осетра *Acipenser shrenki*. Взаимоотношение с нейромерами и миграцией вторичных матричных зон // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 5. С. 345–354.
- Adolf B., Chapouton P., Lam C.S., Topp S., Tannhäuser B., Siröhle 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.
- Aniol V.A., Stepanichev M. Yu. Nitric oxide and gamma-aminobutyric acid as regulators of neurogenesis in the brain of adult mammals: models of seizure activity // Neurochem. J. 2007. V. 1. P. 265–274.
- Baker H., Liu N., Chun H.S., Saino S., Berlin R., Volpe B., Son J.H. Phenotypic differentiation during migration of dopaminergic progenitor cells to the olfactory bulb // J. Neurosci. 2001. V. 21. P. 8505–8513.
- Bicker G. Stop and go with NO: nitric oxide as a regulator of cell motility in simple brains // BioEssays. 2005 V. 27. P. 495–505.
- Callier S., Snapyan M., Le Crom S., Prou D., Vincent J.D., Vernier P. Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates // Biol. Cell. 2003. V. 95. P. 489–502.
- Cameron H.A., McEwen B.S., Gould E. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus // J. Neurosci. 1995. V. 15. P. 4687–4692.
- Chapouton P., Gartner A., Gotz M. The role of Pax6 in restricting cell migration between developing cortex and basal ganglia // Development. 1999. V. 126. P. 5569–5579.
- Diaz J., Ridray S., Mignon V., Griffon N., Schwartz J.C., Sokoloff P. Selective expression of dopamine D₃ receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain // J. Neurosci. 1997. V. 17. P. 4282–4292.
- Extröm 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.
- Extröm P., Ohlin L. Ontogeny of GABA-immunoreactive neurons in the central nervous system in a teleost *Gasterosteus aculeatus* L. // J. Chem. Neuroanat. 1995. V. 94. P. 271–288.
- Gascon E., Dayer A.G., Sauvain M.O., Potter G., Jenny B., De Roo M., Zraggen E., Demarex N., Muller D., Kiss J.Z. GABA regulates dendritic growth by stabilizing lamelli-

- podia in newly generated interneurons of the olfactory bulb // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. P. 12956–12966.
- Ge S., Goh E.L., Sailor K.A., Kitabatake Y., Ming G.L., Song H. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain // *Nature.* 2006. V. 439. P. 589–593.
- Götz M., Stoykova A., Gruss P. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex // *Neuron.* 1998. V. 21. P. 1031–1044.
- 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.
- Heins N., Malatesta P., Cecconi F., Nakafuku M., Tucker K.L., Hack M.A., Chapouton P., Barde Y.A., Götz M. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. // *Nat. Neurosci.* 2002. V. 5. P. 308–315.
- Hoglinger G.U., Rizk P., Muriel M.P., Duyckaerts C., Oertel W.H., Caille I., Hirsch E.C. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease // *Nat. Neurosci.* 2004. V. 7. P. 726–735.
- Hope B.T., Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase // *J. Histochem. Cytochem.* 1989. V. 37. P. 653–661.
- Kapsimali M., Vidal B., Gonzalez A., Dufour S., Vernier P. Distribution of the mRNA encoding the four dopamine D(1) receptor subtypes in the brain of the european eel (*Anguilla anguilla*): comparative approach to the function of D(1) receptors in vertebrates // *J. Comp. Neurol.* 2000. V. 419. P. 320–343.
- Kohwi M., Osumi N., Rubenstein J.L. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. P. 6997–7003.
- Ma P.M. Tanycytes in the sunfish brain: NADPH-diaphorase histochemistry and regional distribution // *J. Comp. Neurol.* 1993. V. 336. P. 77–95.
- Madtes P.C., Redburn D.A. GABA as a trophic factor during development // *Life Sci.* 1983. V. 33. P. 979–984.
- Maekawa M., Takashima N., Arai Y. Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis // *Genes Cells.* 2005. V. 10. P. 1001–1014.
- Martinoli M.G., Dubourg P., Geffard M., Calas A., Rah O. Distribution of GABA immunoreactive neurons in the forebrain of the goldfish *Carassius auratus* // *Cell Tissue Res.* 1990. V. 260. P. 77–84.
- Medina M., Reperant J., Dufour S., Ward R., Le Belle N., Miceli D. The distribution of GABA-immunoreactive neurons in the brain of the silver eel (*Anguilla anguilla* L.) // *Anal. Embryol.* 1994. V. 189. P. 25–39.
- Meek J. Catecholamines in the brains of osteichthyes (bony fishes) // *Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates* / Ed. Smetts W.J.A.J., Reiner A. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. P. 49–76.
- 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.
- Michler A., Wolff J.R. Modulation of neurite growth by GABA in culture // *Neural development and regeneration* / Ed. Glorio A. Berlin: Springer-Verlag, NATO ASI Series, 1988. V. 22. P. 112–124.
- Michler-Stuke A., Wolff J.R. Facilitation and inhibition of neurite elongation by GABA in chick tectal neurons // *Neurotrophic activity of GABA during development* / Ed. Redburn D.A., Schousboe A. Neurology and Neurobiology, 1987. V. 32. New York: Alan R. Liss. P. 253–266.
- Osumi N., Shinohara H., Numayama-Tsuruta K., Maekawa M. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator // *Stem Cells.* 2008. V. 26. P. 1663–1672.
- Overstreet Wadiche L., Bromberg D.A., Bensen A.L., Westbrook G.L. GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus // *J. Neurophysiol.* 2005. V. 94. P. 4528–4532.
- Pellegrini E., Mouriec K., Anglade I., Menuet A., Page Y., Gueguen M., Marmignon M., 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.
- Platel J.C., Laca B., Bordey A. GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis // *J. Mol. Histol.* 2007. V. 38. P. 602–610.
- Platel J.C., Stambouljian S., Nguyen I., Bordey A. Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: the first leg // *Brain Res. Rev.* 2010. V. 63. P. 60–71.
- Puelles L., Kuwana E., Puelles E., Bulfone A., Shimamura K., Keleher J., Smiga S., Rubenstein J.R. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1* // *J. Comp. Neurol.* 2000. V. 424. P. 409–438.
- Puelles L., Rubenstein J.R. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model // *TINS.* 2003. V. 26. P. 469–476.
- Puschina E.V., Obukhov D.K. The participation of radial glia cells into histogenesis of nervous system // *Neuroscience for medicine and psychology.* Sudak, 2010. P. 242–243.
- Rakic P. The radial edifice of cortical architecture: from neuronal silhouettes to genetic engineering // *Brain Res. Rev.* 2007. V. 55. P. 204–219.
- Stoykova A., Treichel D., Hallonet M., Gruss P. Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon // *J. Neurosci.* 2000. V. 20. P. 8042–8050.
- Ugrumov M.V. Developing brain as an endocrine organ: a paradoxical reality // *Neurochem. Res.* 2010. V. 35. P. 837–850.
- Ugrumov M.V. Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: distribution in the brain, development and functional significance // *J. Chem. Neuroanat.* 2009. V. 38. P. 241–256.
- Wullimann M.F., Muller T. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behavior // *J. Comp. Neurol.* 2004. V. 475. P. 143–162.
- Wullimann M.F., Rink E. Detailed immunohistochemistry of Pax6 protein and tyrosine hydroxylase in the early zebrafish brain suggests role of Pax6 gene in development of dopaminergic diencephalic neurons // *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2001. V. 131. P. 173–191.
- Young K.M., Fogarty M., Kessar N., Richardson W.D. Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. P. 8286–8296.

Zupanc G.K. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain // J. Comp. Physiol. A: Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol. 2006. V. 192. P. 649–670.

Zupanc G.K., Horschke I. Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study // J. Comp. Neurol. 1995. V. 353. P. 213–233.

Neurochemical Markers of Cells of the Periventricular Brain Area in the Masu Salm on *Oncorhynchus masou* (Salmonidae)

E. V. Pushchina^a, D. K. Obukhov^b, and A. A. Varaksin^a

^a Zhirmunskii Institute of Sea Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Pal'chevskogo 17, Vladivostok, 690041 Russia

e-mail: pushchina@mail.ru

^b St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

Abstract—Localization of GABA, tyrosine hydroxylase (TH), NADPH-diaphorase, transcription factor Pax6, and the proliferative cell antigen (PCNA) in the periventricular area of the brain of the masu salmon *Oncorhynchus masou* of varying age groups was studied. The presence of heterogeneous cell populations with radially orientated outgrowths in the diencephalon, central gray matter of the dorsomedial tegmentum, medulla oblongata, and spinal cord of the masu salmon was shown. TH-, GABA-immunopositive, and NADPH-d-positive cells are located in the areas of PCNA-immunogenic proliferative zones. It is possible that these cells are descendants of the radial neuroglia and that they participate in the growth and physiological regeneration of diencephalic and medullar structures. In various age groups of the masu salmon, the marking of TH-, GABA, PCNA, and Pax6 reveals the neuromeric structure of the brain.

Keywords: radial neuroglia, teleostei, postnatal neurogenesis, neurotransmitter signaling, migration, tyrosine hydroxylase, GABA, development, Pax6, NADPH-diaphorase, proliferation