

МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

УДК 591.3:591.481:597.5

РЕПАРАТИВНЫЙ НЕЙРОГЕНЕЗ В МОЗГЕ И ИЗМЕНЕНИЯ
В ЗРИТЕЛЬНОМ НЕРВЕ ВЗРОСЛОЙ ФОРЕЛИ *ONCORHYNCHUS MYKISS*
ПОСЛЕ МЕХАНИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГЛАЗА

© 2016 г. Е. В. Пушина, А. А. Вараксин, Д. К. Обухов*

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

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

E-mail: puschina@mail.ru

Поступила в редакцию 29.12.2014 г.

Окончательный вариант получен 23.04.2015 г.

Изучены пролиферация и репаративный нейрогенез в интегративных центрах мозга после нанесения механической травмы глаза взрослой форели *Oncorhynchus mykiss*. Установлено, что после повреждения глаза пролиферация и нейрогенез в пролиферативных зонах мозга, мозжечка и зрительного тектума существенно усиливаются. В мозжечке выявлено достоверное увеличение пролиферативной активности клеток дорсальной пролиферативной зоны и паренхиматозных клеток молекулярного и гранулярного слоев. Через 1 нед. после травмы в тектуме идентифицированы PCNA-позитивные клетки радиальной глии. Впервые установлено, что в результате травмы глаза в тектуме и мозжечке образуются локальные скопления недифференцированных клеток, образующих т. н. нейрогенные ниши. Дифференцировка клеток в нейрональном направлении, обнаруженная при помощи маркирования клеток антителами против белка NuC/D, происходила в пролиферативных зонах теленцефалона, зрительного тектума, мозжечка и продолговатого мозга форели уже через 2 дня после травмы. Показано, что в пролиферативных зонах мозга форели уровень экспрессии NuC/D выше, чем в дефинитивных нейронах. Дополнительно исследованы вызванные травмой глаза процессы клеточной пролиферации, миграции и апоптоза в контра- и ипсилатеральных зрительных нервах, а также прилежащих мышечных волокнах через 2 дня после повреждения. С помощью антител против PCNA и метода TUNEL дана качественная и количественная оценка процессам пролиферации и апоптоза в клетках зрительного нерва форели.

Ключевые слова: пролиферация, костистые рыбы, репаративный нейрогенез, апоптоз, радиальная глия, нейрогенная ниша, вторичная пролиферативная зона, PCNA, NuC/D, TUNEL-маркирование.

DOI: 10.7868/S0475145016010055

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что среди позвоночных рыбы способны эффективно восстанавливать структуру клеток и волокон после повреждения ЦНС. Это касается как способности восстанавливать численность поврежденных клеток за счет продуцирования новых клеток в матричных зонах мозга и нейрогенных нишах, так и способности восстанавливать структуру аксонов поврежденных нейронов в составе проводящих путей спинного мозга (Zupanc, Sirbulescu, 2013). Однако в настоящее время неизвестно, как этот процесс связан с нейрогенезом во взрослом мозге, и какие элементы

матричных зон мозга рыб участвуют в репаративном нейрогенезе. В качестве удобной модели для нейрогенных исследований во взрослом организме все чаще используют животных эволюционно древних групп, в мозге которых находится большое количество перивентрикулярных пролиферативных зон и активных зон вторичного нейрогенеза (Zupanc, 2009; Pushchina et al., 2014). В отличие от млекопитающих, в мозге взрослых рыб были выявлены многочисленные пролиферативные зоны. Существование таких зон было описано у аптеронотуса *Apteronotus leptorhynchus* (Zupanc, Horschke, 1995), *Sparus aurata* (Zikopoulos et al., 2000), трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* (Ekstrom et al., 2001), данио (Zupanc et al., 2005; Grandel et al., 2006) и нотобранха *Austrolebias* sp. (Fernandez et al., 2011).

Список сокращений: PCNA – пролиферативный ядерный антиген, PCNA-ип – PCNA-иммунопозитивный, PCNA-ин – PCNA-иммунонегативный, NuC/D – нейрональный протеин Nu, NuC/D-ип – NuC/D-иммунопозитивный, NuC/D-ин – NuC/D-иммунонегативный.

Мы исследовали изменения клеточного состава в пролиферативных зонах мозга в ответ на повреждающее воздействие глаза у взрослой форели. Течение регенеративных процессов в мозге рыб после повреждающего воздействия определяется рядом факторов, отличающих динамику данного процесса от такового у других позвоночных, в частности млекопитающих и человека (Zupanc et al., 1998; Becker, Becker, 2008). Известно, что в результате травмы ЦНС в мозге млекопитающих возникает ряд патологических изменений, которые связаны с развитием воспалительного ответа, возникающего в результате токсического воздействия глутамата и других воспалительных медиаторов, а также последующих патологических изменений, связанных с процессами вторичного воспаления и сопровождающихся гибелью большого количества клеток (Palmer et al., 1994; Grosche et al., 1995). Установлено, что в результате травмы ЦНС млекопитающих значительное количество клеток подвергается некрозу, и лишь небольшая их часть элиминируется при помощи апоптоза (Kerr et al., 1995). В мозге рыб при травме клеточный ответ развивается по другому сценарию. Уже через 5 минут в поврежденных клетках наблюдается апоптоз, который усиливается в течение нескольких последующих дней (Zupanc et al., 2005). Элиминация поврежденных клеток осуществляется при участии фагоцитов (микроглии/макрофагов), которые крайне эффективно утилизируют поврежденные клетки, обеспечивая тем самым “чистую смерть” клеток, не оставляющую поврежденного клеточного материала, способствующего развитию вторичного воспаления (Vajda, 2002). Восполнение потери большого количества клеток в результате повреждения в мозге рыб происходит из различных источников: радиальной глии, центров первичной и вторичной пролиферации, а также нейрогенных ниш.

Высокий регенеративный потенциал в ЦНС рыб обеспечивается как активацией особых регенераторно ассоциированных факторов (Zupanc, Sîrbulescu, 2013), так и эффективным влиянием факторов нейропротекции, осуществляющих защиту поврежденных клеток и обеспечивающих долговременное выживание клеток, образованных в результате репаративного нейрогенеза.

Целью настоящей работы было исследование процесса пролиферации в интегративных центрах мозга (мозжечке и тектуме) и репаративного нейрогенеза в мозге взрослой форели *Oncorhynchus mykiss*, после нанесения механической травмы глаза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе было использовано 20 особей форели *Oncorhynchus mykiss*, в возрасте 12–18 месяцев.

Масса тела животного составляла 280–350 г и длина тела – 30–36 см соответственно. Животные были получены с Рязановского экспериментально-производственного рыбоводного завода в 2014 году. Для адаптации форель содержали в аквариумах с пресной водой при температуре 16–17°C, с одноразовым кормлением. Соотношение освещенного и темного периодов в сутках составляло 14/10 ч. Содержание растворенного кислорода в воде составляло 7–10 мг/дм³, что соответствует нормальному насыщению. Все экспериментальные манипуляции с животными были проведены в соответствии с правилами, регулируемые уставом Института биологии моря, Ресурсного центра ИБМ ДВО РАН и Этического комитета, регламентирующего гуманное обращение с экспериментальными животными. Животные были анестезированы в 0.1% растворе трикаин метансульфоната MS222 (Sigma, USA) в течение 10–15 мин.

Повреждение зрительного нерва и подготовка материала для ИГХ исследования. После анестезии во внутримозговую полость обездвиженного животного вводили 0.1 М фосфатный буфер (pH 7.2), содержащий 4% раствор параформальдегида. После префиксации мозг извлекали из внутримозговой полости и фиксировали в растворе параформальдегида при 4°C в течение 2 ч. Затем мозг пятикратно промывали в растворе 30% сахарозы при 4°C в течение 48 ч для криопротекции. Серийные фронтальные и трансверсальные срезы мозга готовили на замораживающем микротоме Cryo-Star HM 560 MV (Германия).

С помощью стерильной иглы наносили механическое повреждающее воздействие в область глаза на глубину 1 см, при котором повреждали как структуры глаза, так и зрительный нерв с прилежащими к нему тканями. Непосредственно после нанесения механического повреждения животных выпускали в аквариум с пресной водой для восстановления и дальнейшего мониторинга.

Иммуногистохимия. Для исследования пролиферативной активности в зрительном нерве и интегративных центрах мозга (зрительном тектуме и мозжечке) форели использовали иммунопероксидазное маркирование ядерного антигена пролиферирующих клеток PCNA на замороженных свободно плавающих срезах зрительного нерва и мозга. Оценка пролиферативной активности была проведена через 1 неделю после нанесения механического повреждения в область глаза. Срезы мозга и зрительного нерва, толщиной 50 мкм инкубировали *in situ* с первичными моноклональными антителами мыши против PCNA (PC10; Novus Biologicals, USA; 1 : 3000), при температуре 4°C в течение 48 ч. Для выявления вновь образованных нейронов, через 2 суток после травматического воздействия использовали моноклональные антитела против нейронального протеина

HuC/D (clone: AD2.38; Chemicon, Billerica, MA, USA; 1 : 4000). Для визуализации ИГХ маркирования использовали стандартный ABC комплекс Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, USA) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Для выявления продуктов реакции применялся субстрат красного цвета (VIP Substrate Kit, Vector Labs, Burlingame, USA) в сочетании с докрасиванием метиловым-зеленым по Браше (Меркулов, 1969). Развитие ИГХ окраски контролировали под микроскопом. Препараты обезвоживали по стандартной методике, и заключали в среду Bio-Optica (Италия). Для оценки специфичности иммуногистохимической реакции использовали метод негативного контроля. Срезы мозга вместо первичных антител инкубировали с 1% раствором неиммунной сывороткой лошади в течение 1 суток и обрабатывали, как срезы с первичными антителами. Во всех контрольных экспериментах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

Денситометрическое исследование интенсивности маркирования PCNA и HuC/D в клетках зрительного нерва и мозга форели было проведено с использованием программы Axiovision на базе инвертированного микроскопа Axiovert AroTome 200. На основании данных денситометрического анализа определены различные уровни активности PCNA и HuC/D в клетках. Эти данные, наряду с морфометрическими параметрами клеток (размерными характеристиками тел клеток) были использованы для классификации и типизации клеток, вновь образованных в период протекания репаративного нейрогенеза в пролиферативных зонах, а также дефинитивных центрах мозга.

Выявление апоптоза с помощью TUNEL-маркирования. Для выявления процессов апоптоза в зрительном нерве форели через 2 дня после нанесения травмы было проведено выявление фрагментированных цепочек ДНК с помощью иммунопероксидазного TUNEL-маркирования. После двухчасовой фиксации в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на фосфатном буфере (0.1 М, pH 7.2), фрагментированные участки поврежденного и не поврежденного зрительных нервов форели промывали в течение суток в 0.1 М фосфатном буфере. Затем материал помещали в 30% раствор сахарозы на 0.1 М фосфатном буфере для криопротекции и выдерживали там до полного погружения. Горизонтальные продольные срезы толщиной 50 мкм изготавливали на замораживающем микротоме Cryo-Star HM 560 MV (Германия). Для выявления TUNEL-позитивных структур использовали стандартную иммунопероксидазную систему идентификации Arotag Peroxidase In Situ Apoptosis Detetion Kit (Chemicon International Inc., USA) в соответствии с прилагаемым фирмой-производителем протоколом. Для визуализации

продуктов реакции срезы мозга инкубировали в субстрате для выявления пероксидазы (VIP Substrate Kit; Vector Labs, USA), контролируя развитие окраски под микроскопом, затем промывали в трех сменах фосфатного буфера и монтировали на предметные стекла. Ядра клеток докрасивали метиловым зеленым по методу Браше. Препараты обезвоживали по стандартной методике и заключали в среду Bio-Optica (Италия).

Морфометрическую обработку осуществляли с помощью программного обеспечения инвертированного микроскопа Axiovert 200 M с модулем AroTome и цифровыми камерами Axio Cam MRM и Axio Cam HRC (Carl Zeiss, Германия). Измерения проводили при 400-кратном увеличении в пяти случайно выбранных полях зрения для каждой области исследования. Индекс пролиферации (ИП) и индекс апоптоза (ИА) определяли в расчете на 1 мм² среза по формулам:

$$\text{ИП} = \frac{n \text{ PCNA-позитивных ядер}}{\text{общее } n \text{ ядер}} \times 100\%;$$

$$\text{ИА} = \frac{n \text{ TUNEL-позитивных ядер}}{\text{общее } n \text{ ядер}} \times 100\%.$$

Количественная обработка морфометрических данных ИГХ маркирования PCNA и TUNEL проведена с помощью программ Statistica 12 и Microsoft Excel 2010. Для количественной оценки результатов использован ANOVA-тест; данные представлены в виде среднее \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Значения $P < 0.05$, и $P < 0.001$ считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование клеточного ответа в зрительном нерве после повреждения. Морфология и TUNEL маркирование

После нанесения механического повреждения в область глаза форели исследована морфология зрительного нерва на стороне повреждения и контралатеральной стороне. Морфологическая структура зрительного нерва форели на контралатеральной стороне представлена на рис. 1а. В этой области среди волокон зрительного нерва по морфологическим критериям было идентифицировано 4 типа клеток (таблица). Среднее количество клеток на профильное поле на контралатеральной стороне составляло 54.5 ± 3.5 . Средний апоптозный индекс в этой области составлял 4.35% (рис. 2а). На контралатеральной стороне были выявлены одиночные TUNEL-маркированные тельца в виде мелких гранул разного размера и более плотных конденсированных апоптозных тельц (рис. 1б). В наших исследованиях TUNEL-маркирование давало положительные результаты при избирательном выявлении апоптозных клеток, имеющих признаки фрагментации ДНК

Морфологические параметры и оптическая плотность иммуномаркирования PCNA в клетках зрительного нерва форели *Oncorhynchus mykiss* после травматического воздействия

Типы клеток	Большой диаметр, мкм	Малый диаметр, мкм	Оптическая плотность маркирования PCNA, ЕОП	
			Мин.	Макс.
1. Крупные	12.1 ± 0.8	5 ± 0.4		
2. Удлиненные	8.4 ± 0.2	4.2 ± 0.5	108	124
3. Круглые	8.6 ± 0.3	6.1 ± 0.3	107	118
4. Мелкие	6.9 ± 0.06	5 ± 0.02	97	120

(рис. 1б–1е). После механического повреждения глаза, распределение TUNEL-позитивных элементов в зрительном нерве было неравномерным (рис. 1в). Эти элементы преобладали на стороне повреждения, градиентно увеличиваясь по мере приближения к области травмы. Интенсивное маркирование ядер апоптотических клеток демонстрировало признаки фрагментации ДНК: темные маркированные пероксидазой гранулы (апоптотические тельца), которые иногда формировали полукольца и однородные конгломераты (рис. 1в, 1д). Такие структуры локализовались на месте расположения ядра, равномерно распределялись по цитоплазме, смещались к цитоплазматической мембране или группировались у одного из полюсов клеточной сомы. Для TUNEL-позитивных элементов характерно наличие неповрежденной клеточной мембраны, вокруг них отсутствуют очаги воспалительной инфильтрации.

После нанесения повреждающего воздействия через 2 сут на ипсилатеральной стороне выявлены участки массовой клеточной миграции, резкое увеличение количества клеток 1-го и 2-го типов (рис. 1г). Такие клетки формировали продольные мигрирующие потоки, окруженные клетками 3-го типа, численность которых также значительно возрастала (рис. 1г). Среднее число клеток на ипсилатеральной стороне в 2.28 раза превышало таковую на контралатеральной стороне. На диаграмме (рис. 2а) показано соотношение количества клеток на контра- и ипсилатеральной сторонах, составлявшее 54.5/124.5 клеток на профильное поле соответственно. Наряду с паттернами клеточной миграции на ипсилатеральной стороне было выявлено массовое скопление апоптотических телец и идентифицированы многочисленные TUNEL-маркированные элементы (рис. 1в, 2а). Средние размеры клеток в зонах массовой локализации апоптотических телец составляли $5.3 \pm 0.7/3.9 \pm 0.5$ мкм, а средние размеры апоптотических телец в этих зонах — $5.9 \pm 0.9/3.9 \pm 0.5$ мкм (рис. 1д). Среднее количество апоптотических телец на профильное поле на контра- и ипсилатеральной сторонах составляло 2.5/22.5 элементов соответственно (рис. 2а). Наряду с апоптотическими тельцами выявлены картины клеточной дегрануляции, представляющие собой более ранние стадии апоптотического процесса, а также TUNEL-мар-

кированные фрагменты дегранулирующего хроматина, имеющего форму полулуний (рис. 1д). Подобные картины были характерны для скопленных дегранулирующих клеток и свидетельствовали о массовом характере апоптоза клеточных элементов на 2 сутки после повреждения зрительного нерва форели. Значительное увеличение количества клеток было обнаружено в областях, разделяющих отдельные пучки волокон зрительного нерва — мезаксонах (эпиневррии) (рис. 1е). В этих зонах также идентифицированы TUNEL-маркированные апоптотические тельца (рис. 1е). Соотношение индексов апоптоза на контра- и ипсилатеральной сторонах на 2 сутки после механического повреждения составляло 4.3/25.7% соответственно (рис. 2б).

Учитывая комплексный характер механического повреждения, затрагивающего различные оболочки и структуры глаза, зрительный нерв и прилежащую глазодвигательную мускулатуру в сочетании с соединительной тканью, наряду со зрительным нервом были исследованы прилежащие к нему мышечные волокна глазодвигательной мускулатуры (рис. 3а). Исследование морфологической структуры мышечных пучков, маркированных TUNEL и окрашенных метиловым зеленым по Браше, показало, что в прослойках соединительной ткани, окружающих мышечные пучки, после нанесения травмы появляется большое количество клеток 1–4 типов, ранее обнаруженных в контра- и ипсилатеральных зрительных нервах (рис. 3а). Эти клетки также были выявлены вдоль радиальных волокон на участке между волокнами зрительного нерва и пучками прилежащих глазодвигательных волокон (рис. 3б). Мы полагаем, что данные клетки, появляющиеся в районе повреждения зрительного нерва, представляют собой группы региональных макрофагов соединительной ткани, мигрирующие к месту нанесения травмы для утилизации поврежденных фрагментов зрительного нерва и прилежащих мышечных элементов.

Исследование морфологической структуры отдельных мышечных пучков показало, что в мышечных волокнах после повреждения наблюдаются начальные стадии апоптотического процесса, фрагментация хроматина в виде многочисленных TUNEL-маркированных диффузных фрагментов

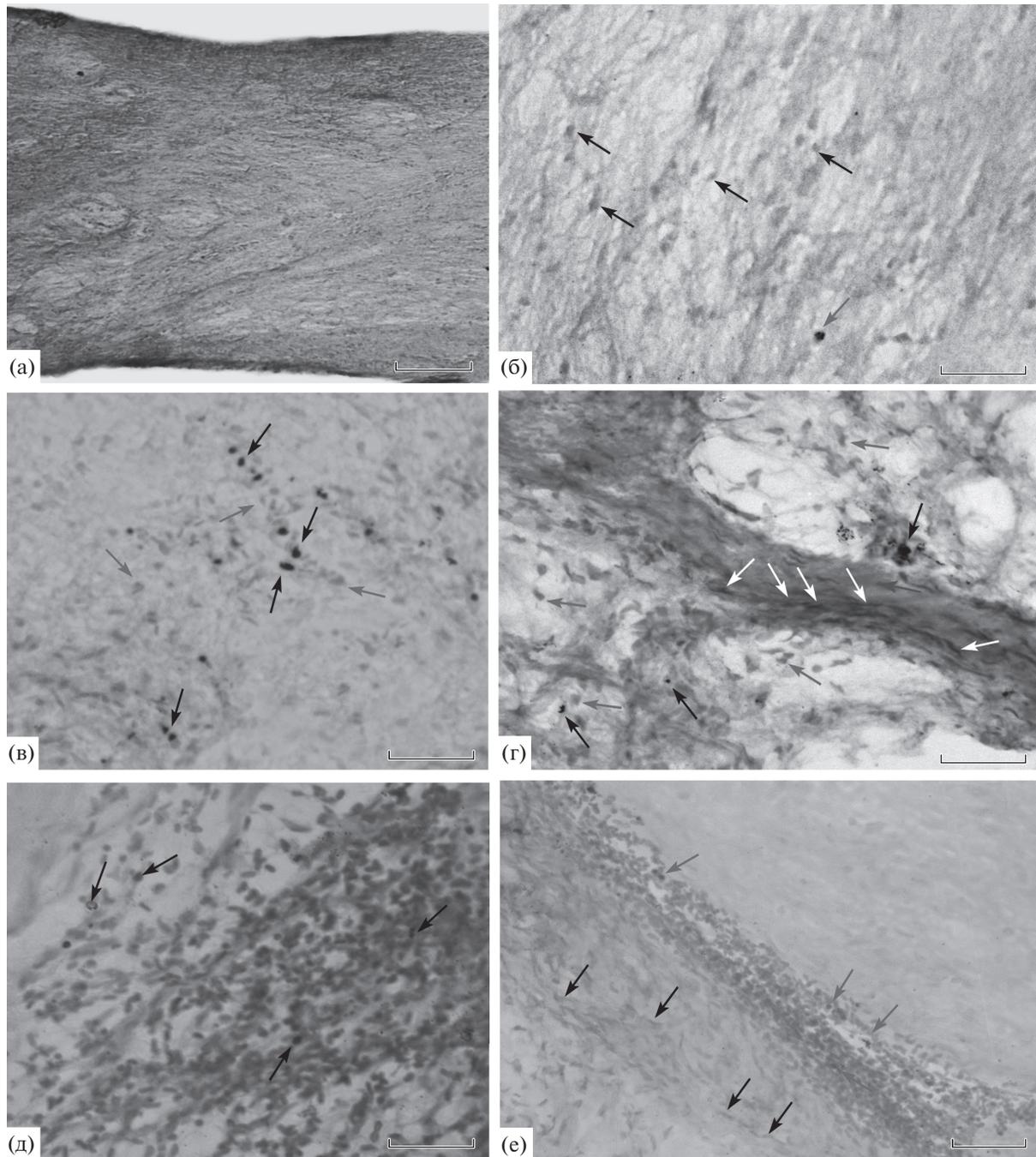


Рис. 1. Морфологическая структура и апоптоз в зрительном нерве форели *Oncorhynchus mykiss* через 2 дня после механической травмы. а – общий вид контралатерального нерва; б – клетки (черные стрелки) и TUNEL-маркированные гранулы в контралатеральном нерве; в – скопление апоптозных телец (черные стрелки) и клеток (красные стрелки) в проксимальной части ипсилатерального зрительного нерва; г – паттерны клеточной миграции (клетки 1-го типа показаны белыми стрелками) в ипсилатеральном зрительном нерве (остальные обозначения как на в); д – массовое скопление клеток 3-го и 4-го типов в эпиневррии ипсилатерального зрительного нерва, белыми стрелками обозначены разные типы TUNEL-маркированных элементов; е – общий вид проксимальной части ипсилатерального зрительного нерва, черными стрелками показаны мигрирующие клетки 1-го типа, белыми – TUNEL-маркированные апоптозные тельца. Иммунопероксидазное маркирование TUNEL в сочетании с окраской метиловым зеленым по Браше. Масштабный отрезок: а – 200 мкм, б–е – 50 мкм.

(рис. 3а, 3в). Однако мы не исключаем наличие и некротического воспалительного процесса в этих областях, поскольку в мышечных волокнах ино-

гда наблюдалась неупорядоченная конденсация хроматина, без “привязки” его к ядерной мембране и кариолиз, который не характерен для

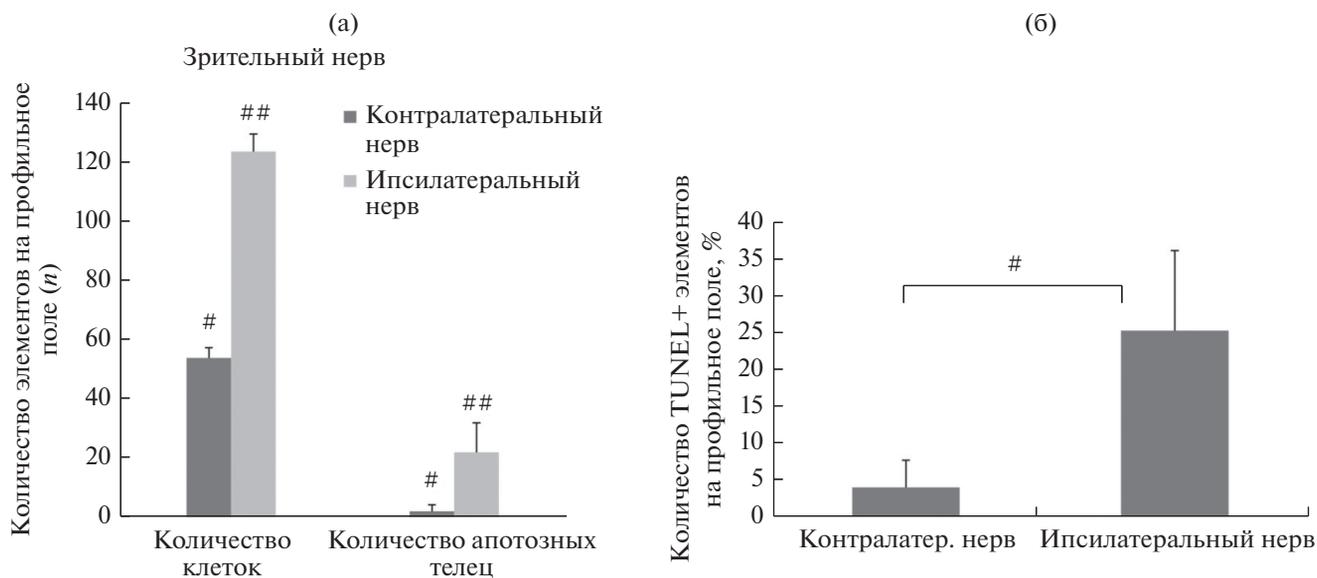


Рис. 2. Сравнительная оценка содержания клеток и TUNEL-маркированных элементов в зрительных нервах форели *Oncorhynchus mykiss* через 2 дня после механической травмы. а – количество клеток, окрашенных метиловым зеленым и TUNEL-маркированных телец ($M \pm m$) на профильное поле в контра- и ипсилатеральном нервах ($n = 5$ в каждой группе; # $P < 0.05$ достоверные отличия в ипси- и контралатеральном нервах; ## $P < 0.001$ достоверные отличия в ипси- и контралатеральном нервах); б – количество TUNEL-маркированных элементов на профильное поле в контра- и ипсилатеральных нервах ($n = 5$ в каждой группе; # $P < 0.05$ достоверные отличия в ипси- и контралатеральном нервах).

апоптоза (рис. 3в). Вокруг мышечных пучков мы наблюдали очаги воспалительной инфильтрации (рис. 3а). В зонах, где волокна ипсилатерального зрительного нерва прилегали к мышечным волокнам, была обнаружена максимальное скопление TUNEL-позитивных апоптотных телец (рис. 3г). Участки соединительной ткани, окружающие пучки мышечных волокон, содержали апоптотные тельца и клетки 1–4 типов (рис. 3г).

Для оценки пролиферативной активности в поврежденном зрительном нерве использовали ИГХ маркирование PCNA, проведенное через 1 неделю после повреждения. Результаты PCNA-иммуномаркирования показали высокий уровень пролиферативной активности клеток в ипсилатеральном зрительном нерве (рис. 4а). Среди иммуномаркированных клеток были выявлены клетки 2, 3 и 4-го типов, однако активность PCNA была также идентифицирована и в мигрирующих клетках 1-го типа (рис. 4а, 4б). Распределение PCNA-ип клеток было неравномерным, клетки 3-го и 4-го типов часто формировали локальные скопления (рис. 4а). Часто мигрирующие клетки 3-го типа располагались в виде продольных рядов в поверхностных слоях отдельных пучков нервных волокон зрительного нерва (рис. 4в), в этом случае в отдельных клетках была отчетливо различима иммунонегативная центральная зона, и уровень активности PCNA был умеренным (рис. 5в). В некоторых случаях можно было разделить слои, содержащие крупные иммуномаркированные клетки 1-го ти-

па, образующие поверхностный миграционный поток и более глубокие слои зрительного нерва, содержащие PCNA-ип клетки 4-го типа с высокой активностью PCNA (рис. 4г). Клетки 2-го типа также образовывали зоны повышенной плотности распределения (рис. 4б). Соотношение общего числа клеток, апоптотных телец и PCNA-ип клеток на профильное поле через 1 неделю после повреждения приведено на рис. 5а, 5б. Результаты денситометрического анализа показали, что в клетках 2, 3, и 4-го типов существуют различия в значениях оптической плотности (см. рис. 5в, таблицу). Данные денситометрического анализа показали, что различия между минимальным и максимальным значением ОП в клетках составляет 22–30%. Соотношение PCNA-иммуномаркированных клеток в контра- и ипсилатеральном нервах форели через 1 неделю после повреждения достоверно отличались (рис. 5г) и со стороны повреждения наблюдалось более чем 3-х кратное увеличение пролиферативной активности клеток в зрительном нерве.

Исследование клеточного ответа в структурах мозга форели после повреждающего воздействия

После травматического повреждения глаза у форели была исследована пролиферативная активность клеток в интегративных центрах мозга – мозжечке и зрительном тектуме с помощью ИГХ маркирования PCNA на гистологических срезах.

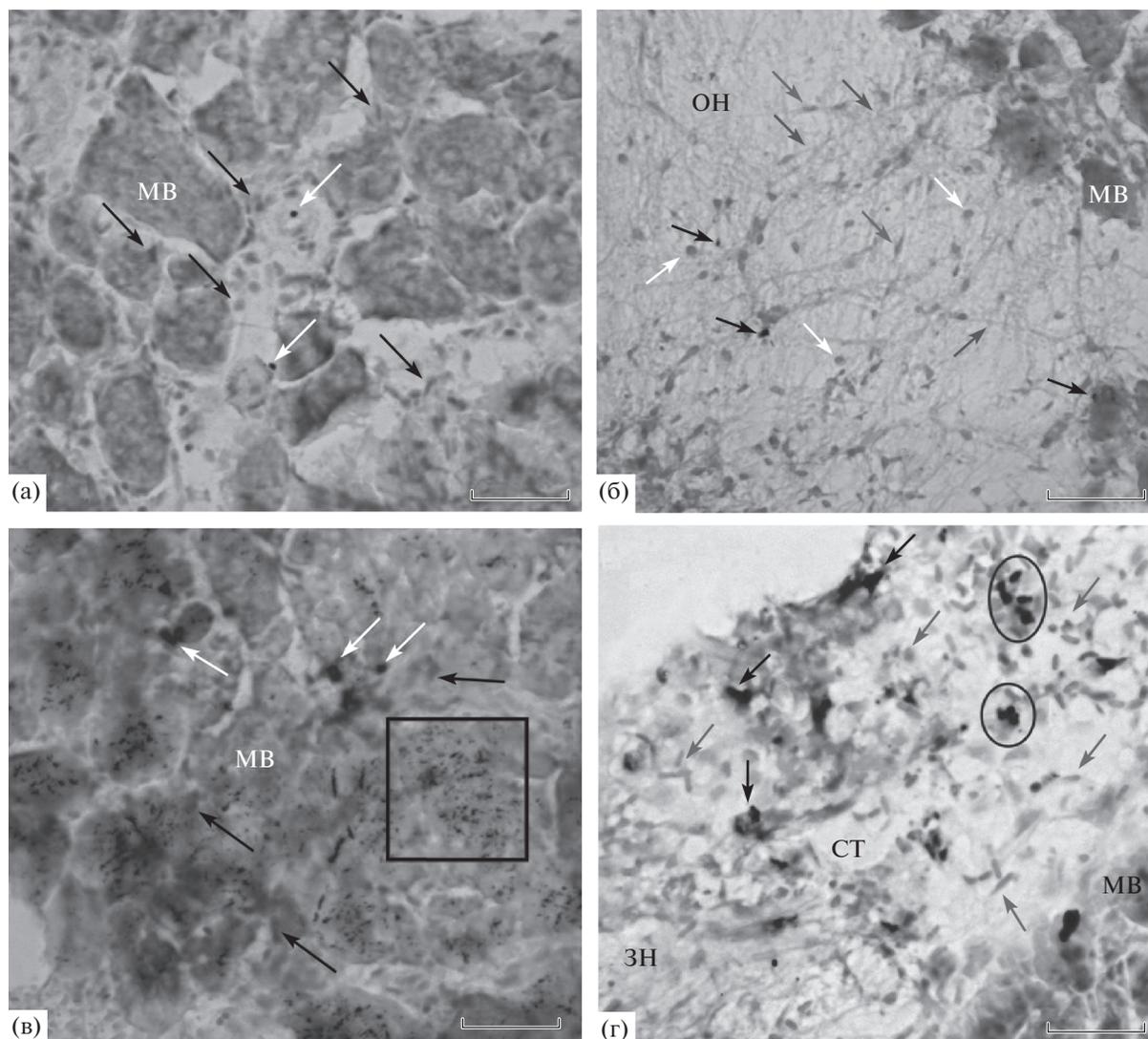


Рис. 3. Морфологическая структура и TUNEL-маркирование прилежащей к поврежденному нерву форели глазодвигательной мускулатуры через 2 дня после травмы. а – поперечный срез пучков глазодвигательных мышечных волокон (МВ), белыми стрелками показаны TUNEL-маркированные апоптозные тельца, черными – клетки, инфильтрирующие пространство между мышечными пучками; б – реконструкция переходного фрагмента, поврежденного зрительного нерва и прилежащей мышечной ткани, содержащего клетки 1–4 типов (клетки 3-го типа показаны белыми стрелками, 1-го типа – красная стрелка), апоптозные тельца (черные стрелки) и радиально ориентированные волокна (синие стрелки), вдоль которых осуществляется клеточная миграция; в – поперечный срез глазодвигательной мышцы, квадратом околнурен фрагмент, содержащий диффузный TUNEL-маркированный материал, плотные апоптозные тельца обозначены белыми стрелками, клетки межмышечного пространства показаны черными стрелками; г – фрагмент поврежденного зрительного нерва (ЗН) в сочетании с периферическим участком глазодвигательной мышцы (МВ), окруженный соединительной тканью (СТ), конгломераты апоптозных телец околнурены овалами, многочисленные клетки 1–4 типов показаны красными стрелками. Иммунопероксидазное маркирование TUNEL в сочетании с окраской метиловым зеленым по Браше. Масштабный отрезок 50 мкм.

Иммунореактивность PCNA в мозжечке форели была выявлена в дорсальной и вентральной областях тела мозжечка. В дорсальной области, расположенной в дорсомедиальной части мозжечка, над гранулярным слоем было выявлено крупное скопление PCNA-ип клеток, образующих дорсальную пролиферативную зону (ДПЗ), описанную также у других видов рыб (рис. 6а). Над ДПЗ были идентифицированы многочисленные клет-

ки, находящиеся в состоянии радиальной и тангенциальной миграции (рис. 6б). В толще молекулярного слоя в дорсальной области преобладали радиально мигрирующие клетки, в поверхностных слоях идентифицированы тангенциально мигрирующие клетки (рис. 6б). Рядом с ДПЗ было выявлено плотное скопление PCNA-иммунонегативных клеток, высокой плотности распределения (рис. 6б). Подобное скопление иммуно-

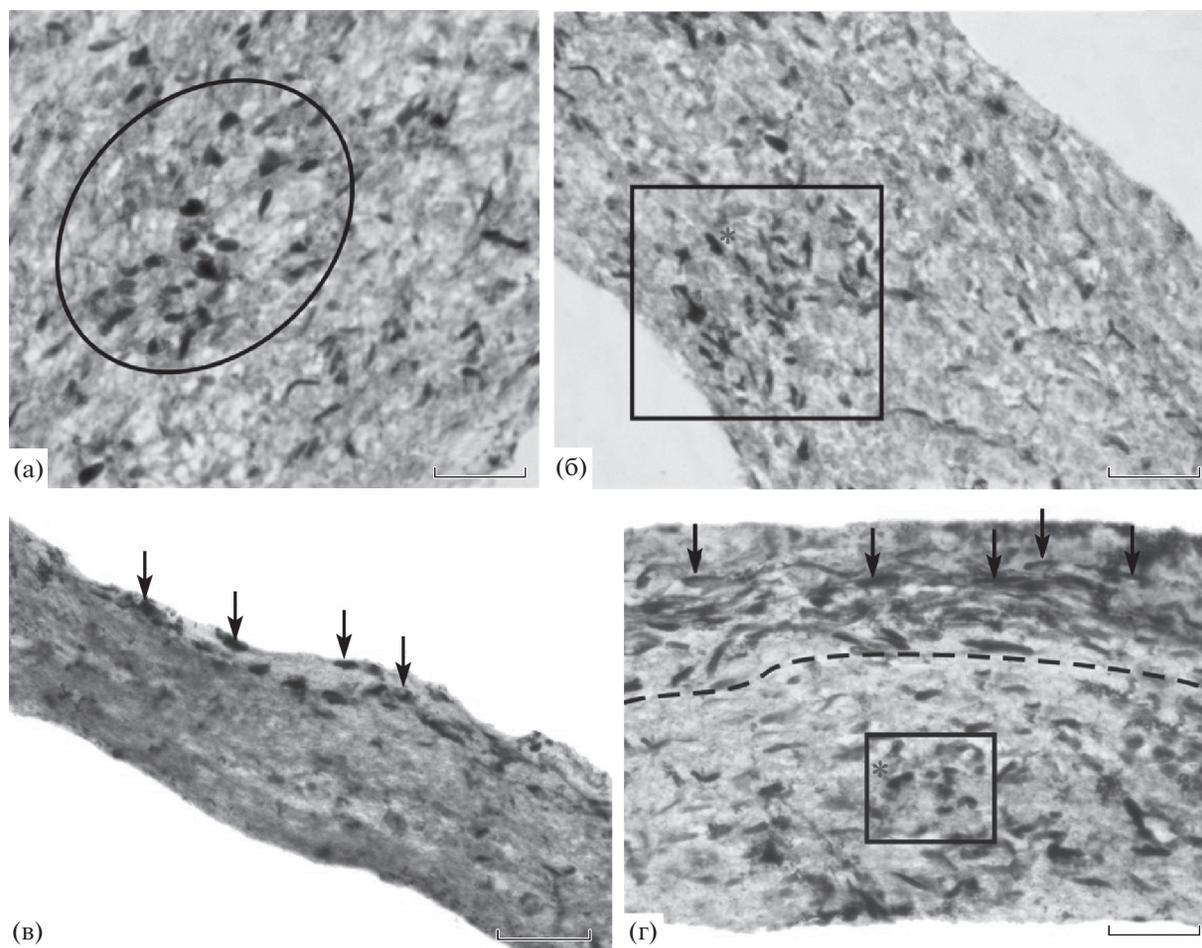


Рис. 4. Локализация ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) в ипсилатеральном зрительном нерве форели через 1 неделю после повреждения. а – скопления интенсивно маркированных клеток 2-го и 3-го типов (окоптурены овалом) в глубоких слоях поврежденного нерва; б – скопление удлиненных иммунопозитивных клеток (окоптурено квадратом) в поверхностных слоях поврежденного нерва, красной звездочкой здесь и на фрагменте (г) показана пара иммуномаркированных клеток, вышедших из митоза; в – поток умеренно маркированных мигрирующих клеток в поверхностных слоях зрительного нерва (показан черными стрелками); г – стратификация мигрирующих умеренно иммуномаркированных клеток 1-го типа (показаны черными стрелками) и высоко иммуногенных клеток 4-го типа (окоптурены квадратом), зона миграции ограничена пунктиром. Иммунопероксидазное маркирование PCNA. Масштабный отрезок 50 мкм.

негативных клеток неправильной формы также обнаружено непосредственно под ДПЗ (рис. 6б). Мы полагаем, что данные клеточные образования представляют собой региональные нейрогенные ниши, образованные в результате травматического воздействия. В толще молекулярного слоя над ДПЗ также были локализованы PCNA-иммунонегативные клетки округлой формы, плотность распределения которых возрастала в дорсальном направлении (рис. 6б). PCNA-иммунопозитивные элементы ДПЗ включали 4 типа клеток: круглые и овальные высоко иммуногенные клетки, размером $8.3 \pm 0.9/6.4 \pm 1.4$ мкм, а также удлиненные веретеновидные и палочковидные элементы размерами $10.5 \pm 0.5/6.9 \pm 1.2$ мкм (рис. 6а). Данные об оптической плотности маркирования PCNA в клетках разного типа ДПЗ и количественной

оценке PCNA-ип клеток в ДПЗ мозжечка форели приведены на диаграмме 7а, 7б. При повреждении оптическая плотность иммуномаркирования несколько возрастает во всех типах клеток (рис. 7а, 7б). Количество PCNA-маркированных клеток 1, 2 и 4 типов в ДПЗ через 1 неделю после механического повреждения достоверно возрастает по сравнению с контролем ($n = 5$; $p < 0.05$), а количество клеток 3-го типа значительно увеличивается ($n = 5$; $p < 0.001$).

В вентральной области тела мозжечка концентрация PCNA-ип элементов была намного ниже (рис. 6в). Отдельные PCNA-ип паренхиматозные клетки были выявлены в молекулярном слое (рис. 6в). В верхних слоях гранулярного слоя встречались одиночные и/или образующие не-

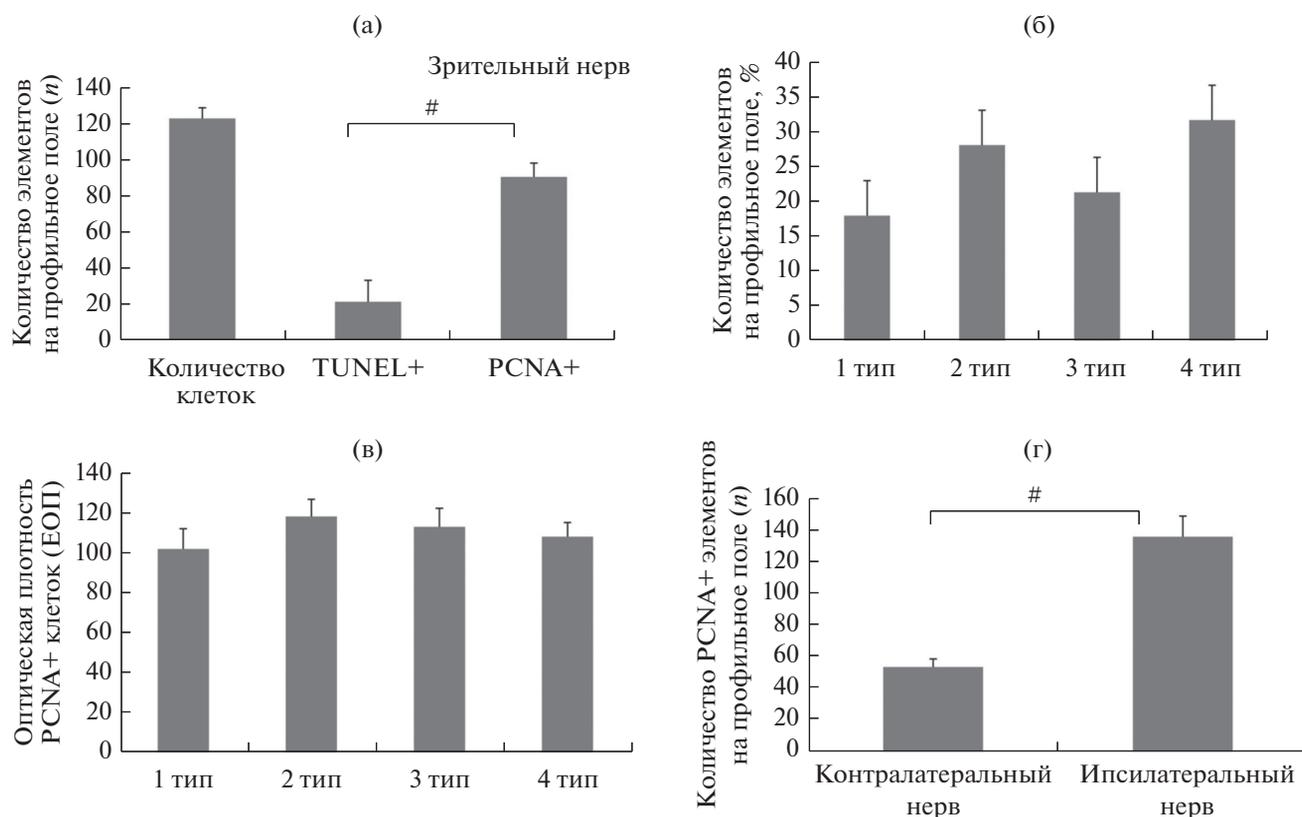


Рис. 5. Оценка содержания пролиферирующих и апоптотных элементов в зрительных нервах форели через 1 неделю после повреждения. а – количество TUNEL+, PCNA-ип элементов и клеток, окрашенных по Браше на профильное поле в поврежденном нерве ($n = 5$ в каждой группе; # $P < 0.05$ достоверные отличия между PCNA+, TUNEL+ группами); б – процентное соотношение PCNA+ клеток 1–4 типов в поврежденном нерве ($M \pm m$); в – оптическая плотность иммуномаркирования PCNA в клетках 1–4 типов в поврежденном нерве ($M \pm m$); г – соотношение PCNA-ип клеток в контралатеральном и ипсилатеральном нервах на профильное поле ($n = 5$ в каждой группе; # $P < 0.05$ достоверные отличия в ипси- и контралатеральном нервах).

большие скопления PCNA-ип паренхиматозные клетки, размеры которых составляли $7.4 \pm 1.6/5.7 \pm 0.9$ мкм. PCNA-ип клетки чаще всего принадлежали к популяции мелких гранулярных клеток. На дорсальной стороне в гранулярном слое количество PCNA-ип клеток было намного выше (рис. 6в). В этой области PCNA-иммуногенность также присутствовала в мелких паренхиматозных клетках инфраганглионарного сплетения (рис. 6г). Иногда на территории инфраганглионарного сплетения выявлялись небольшие скопления PCNA-ип и негативных клеток, образующих кластеры с высокой клеточной плотностью (рис. 6г). Мы полагаем, что данные скопления представляют собой региональные нейрогенные ниши, пролиферативная активность в которых, как и в нише, расположенной рядом с ДПЗ, была индуцирована в результате нанесения механической травмы.

Иммуномаркирование PCNA в тектуме. После механического повреждения глаза были выявлены многочисленные иммунопозитивные клетки во внутренних слоях тектума (рис. 6е): поверх-

ностном волокнистом и клеточном слое (ПВКС), центральном сером слое (ЦСС), центральном белом слое (ЦБС), и перивентрикулярном слое (ПВС). Размеры PCNA-ип клеток во всех слоях варьировали от 6.2/3.4 до 9.5/6.1 и в среднем составляли $7.8 \pm 1.1/4.9 \pm 0.9$ мкм. В маргинальном слое были выявлены PCNA-ип клетки радиальной глии (рис. 6д), размеры тел клеток радиальной глии изменялись от 6.7/5.1 до 9.5/8, составляя в среднем $8.4 \pm 1.2/6.1 \pm 1.3$ мкм. Плотность распределения PCNA-ип радиальной глии была относительно невысока и составляла 33 ± 7 клетки на профильное поле при 40-кратном увеличении объектива. Соотношение PCNA-иммуномаркированных клеток радиальной глии в маргинальном слое и клеток во внутренних слоях тектума показано на рис. 7в. Оптическая плотность иммуномаркирования PCNA в клетках радиальной глии варьировала, встречались высоко иммуногенные клетки (114.5 ЕОП) и менее интенсивно маркированные (104.4 ЕОП). Во внутренних слоях тектума уровень оптической плотности PCNA-ип был выше, чем в клетках радиальной глии и составлял в

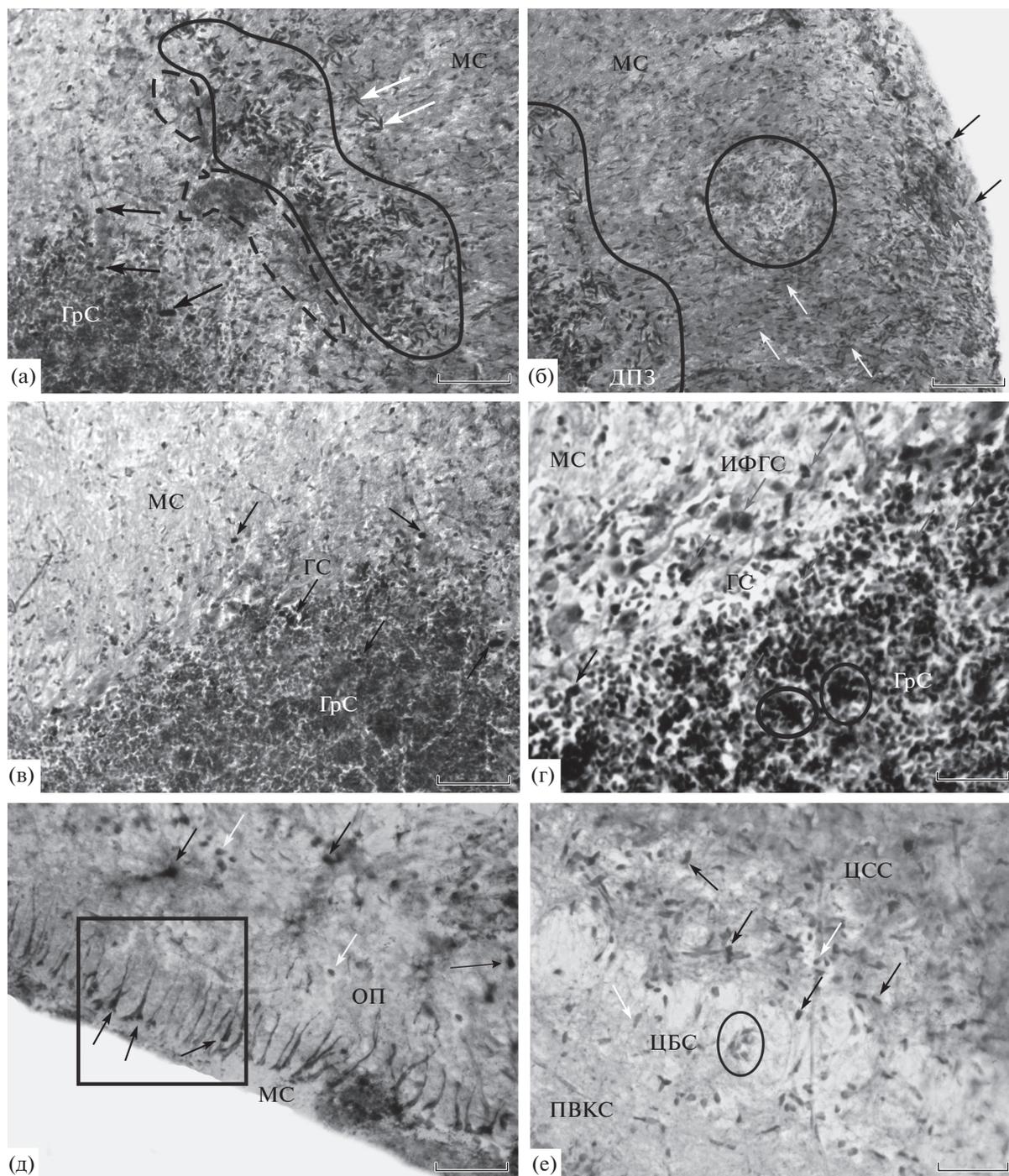


Рис. 6. Локализация PCNA в интегративных центрах мозга форели через 1 неделю после механической травмы. а – PCNA-ип клетки в дорсальной пролиферативной зоне мозжечка (околнурены сплошной линией), скопление PCNA-ип клеток, под ДПЗ околнурено пунктирной линией, черными стрелками показаны интенсивно маркированные овальные клетки гранулярного слоя (ГрС), белыми – палочковидные мигрирующие клетки; б – дорсальная часть молекулярного слоя (МС) мозжечка, скопление PCNA-ип клеток околнурено кругом, черными стрелками показаны PCNA-ип тангенциально мигрирующие клетки, красными – PCNA-ип мелкие округлые клетки, белыми – слабо маркированные радиально мигрирующие клетки; в – вентральная часть тела мозжечка, черными стрелками показаны PCNA-ип клетки в молекулярном, ганглиозном (ГС) и гранулярном слоях; г – зона инфраганглионарного сплетения (ИФГС) в дорсальной части тела мозжечка, голубыми стрелками показаны PCNA-ип клетки ИФГС, красными – PCNA-ип клетки в гранулярном слое, овалами околнурены скопления PCNA-ип клеток в гранулярном слое; д – радиальная глия (околнурена квадратом) в маргинальном слое (МС) зрительного тектума, PCNA-ип клетки показаны черными стрелками, PCNA-ип – белыми стрелками, ОС – оптический слой; е – PCNA-ип клетки в поверхностном волокнистом и клеточном слое (ПВКС), центральном сером слое (ЦСС), центральном белом слое (ЦБС), овалом околнурено скопление PCNA-ип клеток, формирующее нейрогенную нишу. Иммунопероксидазное маркирование PCNA на срезах *in situ*. Масштабный отрезок: а–в – 100 мкм, г–е – 50 мкм.

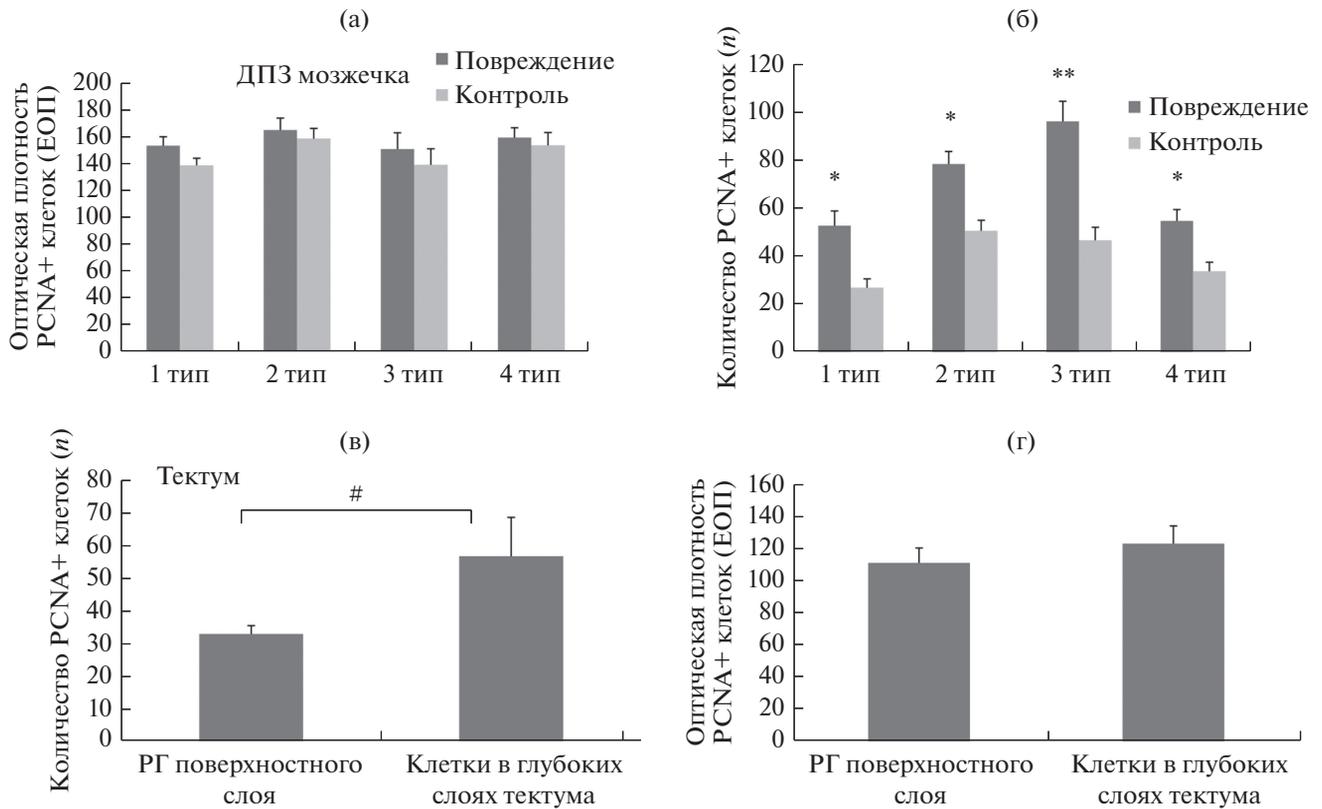


Рис. 7. Оценка содержания пролиферирующих клеток и их денситометрических характеристик в интегративных центрах мозга форели через 1 неделю после повреждения. а – оптическая плотность иммуномаркирования PCNA в клетках 1–4 типов в ДПЗ мозжечка ($M \pm m$); б – количество PCNA-ип клеток 1–4 типов в ДПЗ мозжечка ($n = 5$ в каждой группе; * $P < 0.05$ достоверные отличия от контрольных групп; ** $P < 0.001$ достоверные отличия от контрольных групп); в – соотношение PCNA-ип элементов: радиальной глии и клеток во внутренних слоях зрительного тектума ($n = 5$; # $P < 0.05$ достоверные отличия между двумя группами); г – оптическая плотность иммуномаркирования PCNA в радиальной глии и клеток глубоких слоев тектума ($M \pm m$).

среднем 123 ЕОП (рис. 7г). Максимальная уровень оптической плотности PCNA в клетках тектума составлял 127.7 ЕОП, минимальный – 116.2 ЕОП.

Экспрессия нейронального маркера NuC/D в пролиферативных зонах мозга форели после механического повреждения зрительного нерва

Проведенные исследования позволили установить, что в мозге взрослой форели нейрональный протеин NuC/D экспрессируется как в дефинитивных центрах мозга, так и в пролиферативных зонах. В **конечном мозге** форели были выявлены зоны нейрогенеза, связанные с внешними границами дорсальной и вентральной областей. Поскольку конечный мозг костистых рыб имеет эвертированную структуру полушарий, то пролиферативные зоны (ПЗ) расположены у внешней стенки полушарий. Было установлено, что ПЗ в медиальной зоне дорсальной области полушарий имеет ламинарную структуру, и экспрессия NuC/D выявляется в поверхностных слоях этой области,

что свидетельствует об очень ранней нейрональной специализации клеток, образующихся после травматического повреждения (рис. 8а). На границе дорсальной и медиальной зон было выявлено максимальное количество NuC/D-ип клеток и наиболее высокий уровень активности NuC/D (рис. 8б) клеток, образующихся в посттравматический период (рис. 8б, 9а, 9б). В латеральной зоне встречались локальные скопления NuC/D-ип клеток (рис. 8в), однако общая толщина пролиферативного слоя и выраженность экспрессии NuC/D в клетках пролиферативной зоны была минимальной (рис. 9в), а в дорсальной – напротив, максимальной (рис. 8в, 9а, 9в). Общая схема дорсальной и вентральной областей теленцефалона форели, распределения пролиферативных зон приведена на рис. 8г.

В вентральной области конечного мозга форели, соответствующей стриатарной формации других позвоночных, экспрессия NuC/D была выражена в дефинитивных ядрах: дорсальном и вентральном (рис. 8д, 8е). Исследуя особенности экспрессии нейронального протеина NuC/D, мы

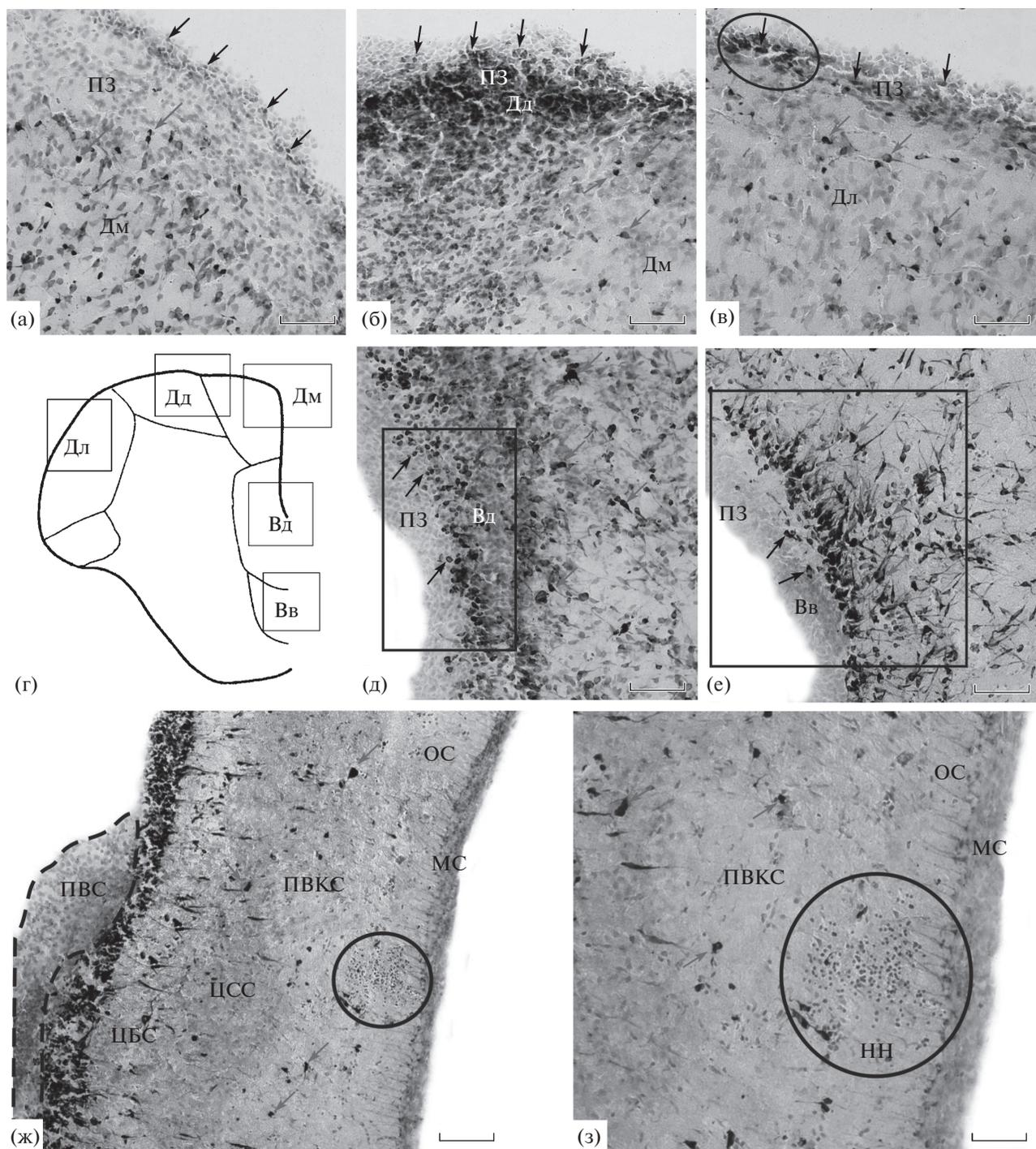


Рис. 8. Локализация нейронального протеина NuC/D в пролиферативных зонах конечного мозга и зрительного тectума форели через 2 дня после механической травмы. а – NuC/D-ип клетки (черные стрелки) в пролиферативной зоне (ПЗ) и в глубоких слоях (красные стрелки) медиальной области (Дм) конечного мозга; б – на границе между дорсальной (Дд) и медиальной (Дм) областями; в – в латеральной (Дл) области, овалом оконтурено скопление NuC/D-ип клеток; г – схема дорсальной и вентральной областей теленцефалона форели, содержащих пролиферативные зоны на рисунках (а–в) и (д, е); д – NuC/D-ип клетки в ПЗ (оконтурено прямоугольником) дорсального ядра вентральной области (Вд) конечного мозга; е – вентрального ядра (Вв) вентральной области (оконтурено квадратом); ж – NuC/D-иммунопозитивность в зрительном тectуме, (обозначения слоев тectума как на рис. бд–бе), овалом оконтурена нейрогенная ниша, пунктиром – каудальная пролиферативная зона тectума; з – нейрогенная ниша (нн) в тectуме на большем увеличении. Иммунопероксидазное маркирование NuC/D на срезах *in situ*. Масштабный отрезок: а–в, д, е – 100 мкм, ж – 200 мкм, з – 50 мкм.

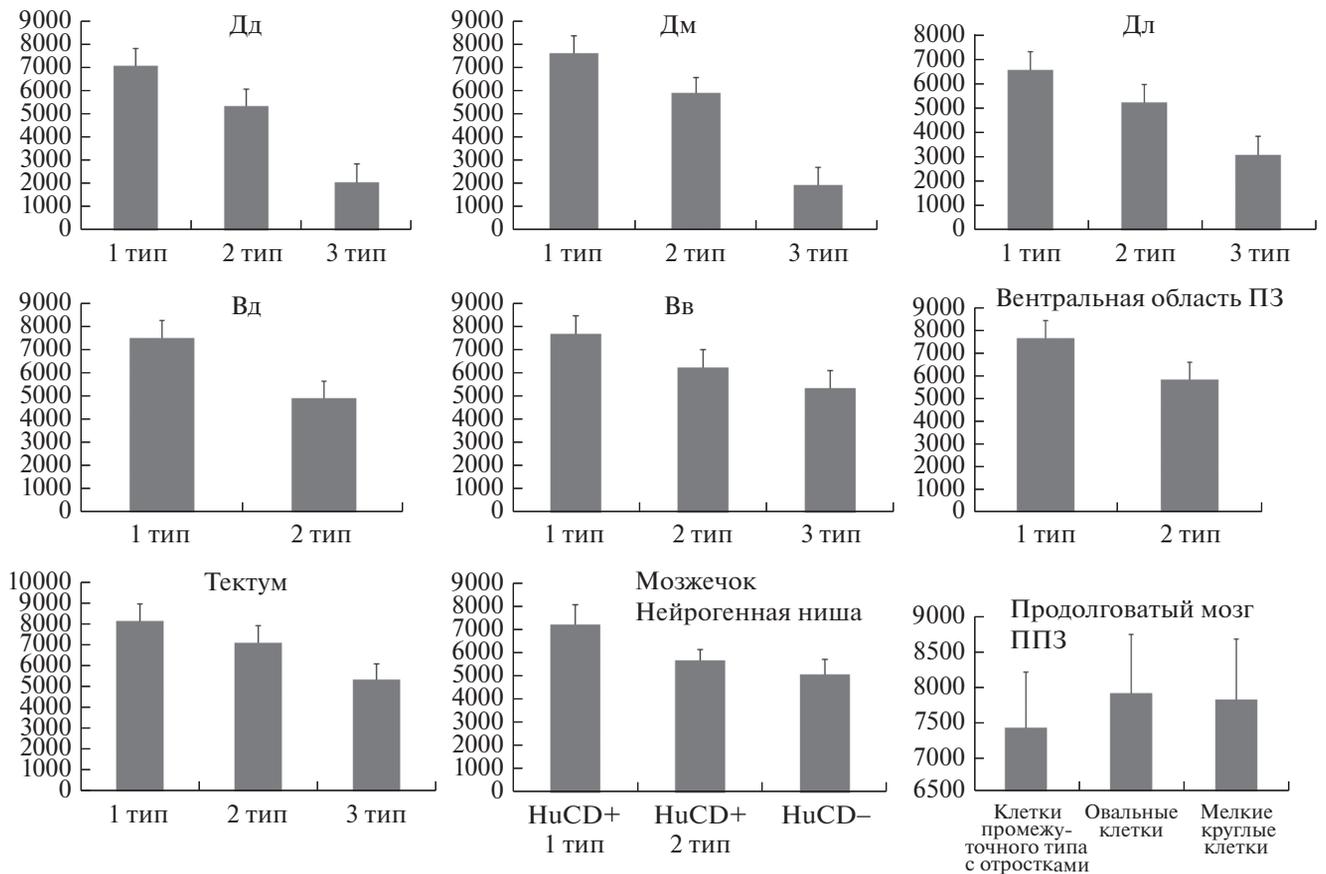


Рис. 9. Денситометрические данные иммуномаркирования нейронального протеина HuC/D в интегративных центрах и пролиферативных зонах мозга форели через 2 дня после механической травмы ($M \pm m$). Верхний ряд – оптическая плотность иммуномаркирования HuC/D в нейронах 1–3 типов дорсальной (Дд), медиальной (Дм), латеральной (Дл) областей дорсального теленцефалона; средний ряд – в нейронах дорсального (Вд), вентрального (Вв) ядер и пролиферативной зоны (ПЗВ) вентрального теленцефалона; нижний ряд – в тектуме, нейрогенной нише мозжечка и перивентрикулярной зоне (ПВЗ) продолговатого мозга.

обнаружили, что в дефинитивных областях конечного мозга (медиальной, дорсальной и латеральной зонах дорсальной области и дорсальной и вентральной зонах вентральной области), а также в ПЗ вентральной области уровень экспрессии HuC/D значительно отличается (рис. 9а–9е). Характерно, что вновь образованные клетки в составе вентральной пролиферативной зоны имеют очень высокий уровень активности HuC/D (рис. 9е), тогда как в нейронах дефинитивных зон интенсивность иммуномаркирования HuC/D может быть не высокой.

В зрительном тектуме активность HuC/D также определялась в зрелых нейронных популяциях практически во всех слоях, за исключением маргинального слоя (МС) и слоя зрительных волокон (ОС) (рис. 8ж, 9ж). HuC/D-ип клетки были выявлены в слоях тектума (рис. 8ж). В поверхностном волокнистом и клеточном и центральном сером слоях были обнаружены клетки различных типов, среди которых наиболее интенсивно маркировались клет-

ки 3-го типа, с размерами $12.3 \pm 14/8.5 \pm 1$ мкм. Другой тип клеток – вертикальные биполярные клетки размерами $29.9 \pm 5.6/6.6 \pm 0.7$ мкм, располагались в центральном сером слое и имели низкий уровень активности HuC/D, составляющий 5460 ± 437 ЕОП. Средние, овальные по форме клетки 3-го и 4-го типа, расположенные в поверхностном волокнистом и центральном сером слоях, с размерами $15.2 \pm 3/10.1 \pm 2.1$ мкм и $13.4 \pm 1.2/8.6 \pm 1.1$ мкм соответственно также имели высокий уровень активности HuC/D.

В каудальной зоне тектума были идентифицированы зоны нейрогенной активности: перивентрикулярный слой, толщина которого значительно превышала таковую центральной и ростральной области, а также появление на территории поверхностных слоев тектума (маргинальном и оптическом) **нейрогенных ниш** (рис. 8ж, 8з). В этих зонах активность HuC/D в центрально расположенных клетках не была выявлена, но HuC/D-ип клетки располагались одиночно или небольшими

группами на периферии (рис. 8з), что свидетельствует о недифференцированной плюрипотентной природе клеток, входящих в состав данных областей среднего мозга. В составе нейрогенных ниш были обнаружены и NuC/D-негативные мелкие клетки, размеры которых составляли $5.3 \pm 0.4/4.7 \pm 0.5$ мкм; уровень оптической плотности в которых составлял 6810 ± 416 ЕОП. На территории каудальной пролиферативной зоны тектума оптическая плотность NuCD-ип клеток составляла 7721 ± 697 ЕОП, в иммунонегативных областях 5850 ± 689 ЕОП.

В мозжечке форели через 2 дня после механической травмы также были идентифицированы области, содержащие NuC/D-иммунопозитивность в дефинитивных клетках молекулярного, гранулярного слоев и инфраганглионарного сплетения, а также в зонах с нейрогенной активностью: ДПЗ, нейрогенных нишах, молекулярном и гранулярном слоях и в т. н. гранулярных возвышениях (рис. 8а–8е).

ДПЗ расположена в дорсо-медиальной части молекулярного слоя, непосредственно над гранулярным слоем (рис. 8б). В составе ДПЗ были выявлены PCNA-ип/NuCD-ин клетки удлиненной формы, и высоко NuC/D-ип клетки, окружающие ДПЗ и образующие локальные зоны повышенной плотности распределения (рис. 8б). Уровень оптической плотности NuC/D-ип клеток в ДПЗ был высоким и умеренным (рис. 9з). В составе зоны были выявлены мелкие высоко иммунопозитивные клетки, отличающиеся по уровню оптической плотности, размерами $8.7 \pm 0.5/7.7 \pm 1.1$ мкм и $10.7 \pm 0.6/8 \pm 1$ мкм (рис. 9з); и более крупные клетки размерами $13.8 \pm 1.2/10.4 \pm 0.9$ мкм, $15.3/7.4$ мкм и $20.4/12.8$ мкм. В мелких умеренно маркированных клетках уровень оптической плотности составлял 5697 ± 572 ЕОП.

После повреждения зрительного нерва в теле мозжечка форели были выявлены локальные нейрогенные ниши, морфологически сходные с таковыми в тектуме (рис. 8в, г). Большая часть нейрогенной ниши была NuC/D-иммунонегативна, однако NuC/D-ип клетки располагались вокруг и внутри ниши, что указывает на раннюю нейродифференциацию таких клеток в посттравматический период (рис. 8г). Размеры иммунонегативных клеток составляли $5.9 \pm 0.4/4.8 \pm 0.6$ мкм, ОП 4821 ± 346 ЕОП. Внутри ниши были расположены интенсивно маркированные NuC/D клетки, размерами $10.7 \pm 0.6/6.9 \pm 2.1$ мкм и $8.5 \pm 0.4/5.6 \pm 0.6$ мкм. Уровень оптической плотности в таких клетках составлял 7660 ± 644 ЕОП. Размеры умеренно маркированных клеток в нейрогенных нишах составляли $11.8 \pm 1.6/7.1 \pm 1.5$ мкм, оптическая плотность – 5213 ± 533 ЕОП.

На дорсо-латеральных поверхностях тела мозжечка в составе молекулярного слоя идентифици-

ровали паттерны тангенциальной и радиальной клеточной миграции (рис. 8д, е). NuC/D-иммунонегативные удлиненные клетки, окрашенные метиловым-зеленым, формировали многослойные ряды мигрирующих клеток в поверхностной зоне молекулярного слоя, а также в его толще (рис. 8д). Среди таких тангенциальных потоков плотность распределения NuC/D-ип мелких клеток была выше, чем в других участках молекулярного слоя. Паттерны радиальной миграции были выявлены в латеральных областях тела мозжечка (рис. 8е). На латеральных и дорсальной поверхностях тела мозжечка часто регистрировались интенсивно NuC/D-ип в поверхностных слоях (рис. 8в, 8д).

В продолговатом мозге форели после травмы выявлены дефинитивные клетки в составе ретикулярной формации и клетки в перивентрикулярной пролиферативной зоне с активностью NuC/D (рис. 8ж, 8з). Дефинитивные нейроны ретикулярной формации имели различный уровень активности NuC/D в крупных, средних и мелких клетках (рис. 8ж). В перивентрикулярной области высокий уровень экспрессии NuC/D выявлен в клетках медиальной, латеральной и дорсальной пролиферативных зон (рис. 8з). Таким образом, для всех перивентрикулярных пролиферативных зон продолговатого мозга было характерно наличие морфологически гетерогенных, но интенсивно маркируемых NuC/D клеток (рис. 9и) по сравнению с дефинитивными областями РФ, содержащими наиболее крупные клетки мозга, но имеющие гетерогенную (умеренную либо низкую) активность NuC/D.

ОБСУЖДЕНИЕ

Животные, развитие которых происходит без внешних эмбриональных оболочек (рыбы и амфибии) имеют весьма значительные способности к регенерации ЦНС, в отличие от амниот (рептилий, птиц и млекопитающих), имеющих довольно ограниченные регенеративные способности во взрослом состоянии. Поскольку сетчатка глаза и зрительный нерв являются функциональными частями мозга, доступными для экспериментального воздействия, повреждение и регенерация зрительного нерва часто используются в качестве модельной системы для исследования регенерации нервов в ЦНС (García, Koike, 2009). При повреждении зрительного нерва у мыши, наблюдается дегенерация аксонов. У рыб наблюдается энергичное прорастание нейритов (спраутинг) через поврежденные аксоны и в течение нескольких дней происходит реиннервация мозга. Показано, что после пересечения зрительного нерва млекопитающих увеличивается количество OX42 и/или NDP-иммунопозитивной микроглии/макрофагов, наблюдаемое как в сетчатке, так и в зрительном нерве (García-Valenzuela et al., 2005; Cen

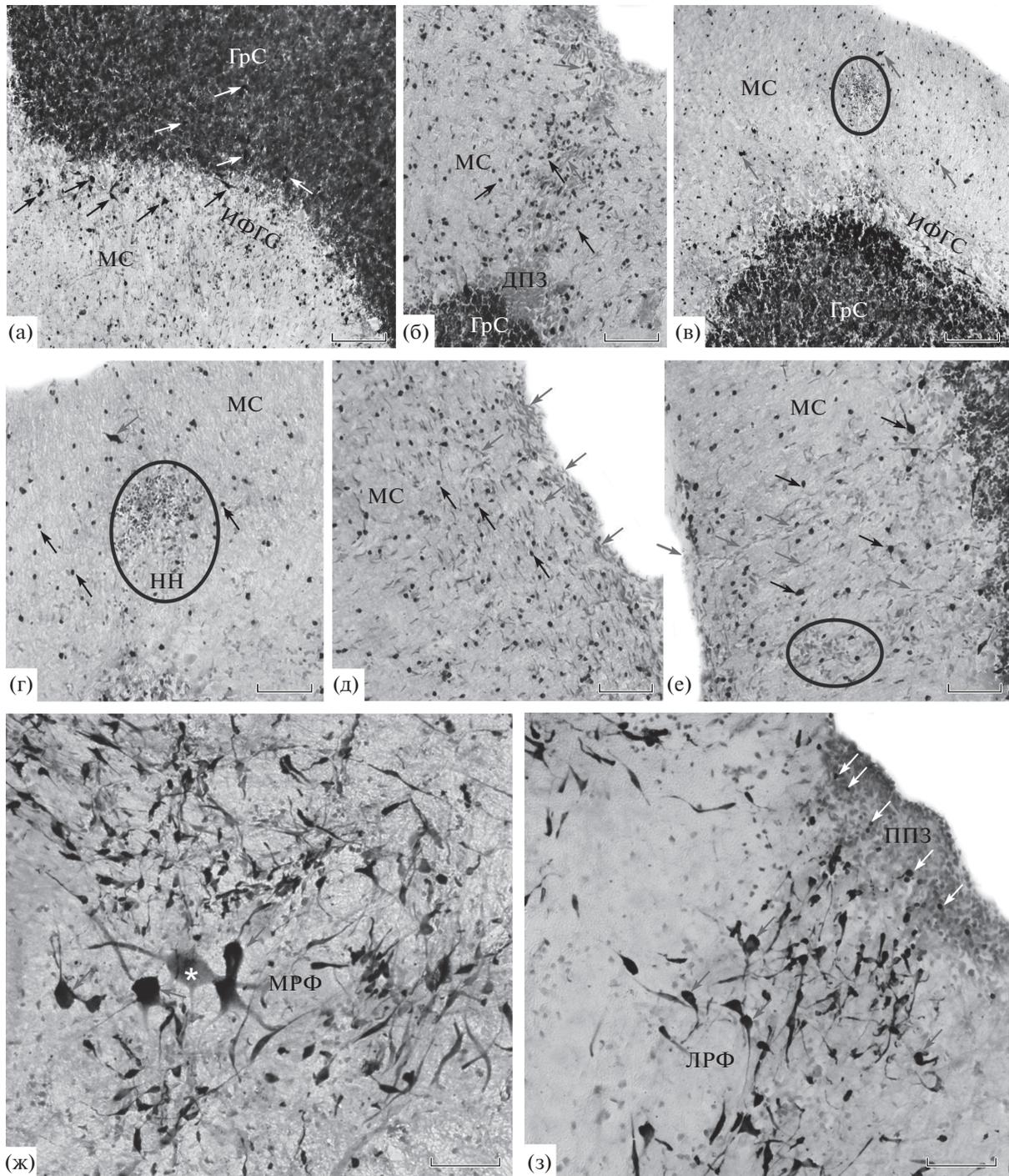


Рис. 10. Локализация нейронального протеина NuC/D в пролиферативных зонах мозжечка и продолговатого мозга форели через 2 дня после механической травмы. а – общий вид тела мозжечка, черными стрелками показаны иммунопозитивные дифференцированные клетки ИФГС, белыми – нейроны гранулярного слоя; б – иммулокализация в ДПЗ, красными стрелками показаны NuC/D-ин мигрирующие клетки; в – в дорсальной части тела мозжечка, овалом оконтурена нейрогенная ниша; г – фрагмент, содержащий нейрогенную нишу на большем увеличении; д – паттерны тангенциальной миграции NuC/D-ин клеток (красные стрелки) в поверхностных слоях молекулярного слоя; е – радиальная миграция клеток в латеральной части тела мозжечка, овалом оконтурена нейрогенная ниша; ж – в медиальной ретикулярной формации (МРФ) продолговатого мозга, белой звездочкой отмечен крупный нейрон с низкой активностью NuC/D, красными стрелками показаны высокоактивные дифференцированные нейроны; з – в перивентрикулярной пролиферативной зоне (ППЗ) и латеральной ретикулярной формации (ЛРФ), белыми стрелками показаны NuC/D-ип клетки в ППЗ. Иммунопероксидазное маркирование NuC/D на срезах *in situ*. Масштабный отрезок: а, в – 200 мкм, б, г–з – 100 мкм.

et al., 2007; Luo et al., 2007). Микроглия в состоянии покоя не секретирует провоспалительные факторы, однако, при активации микроглии наблюдается продуцирование большого количества цитокинов, протеаз, свободных радикалов и различных трофических факторов (Hanisch, 2002; Hailer, 2008). По причине секреции провоспалительных цитокинов и других нейротоксических веществ, появление микроглии обычно усугубляет повреждение нейронов и способствует переходу острого воспалительного процесса в хронический. Известно, что в развивающейся сетчатке фактор роста нервов, продуцируемый клетками микроглии, приводит к гибели ганглиозных клеток сетчатки (Frade, Varde, 1998). У рыб, по всей видимости, астроциты не формируют специфический барьер для регенерации зрительного нерва, однако систематических исследований в этой области не было проведено.

Источники регенерации клеток в сетчатке и мозге рыб. В сетчатке костистых рыб новые нейроны и фоторецепторы возникают из двух нейрогенных ниш (Otterson, Hitchcock, 2003). Первая ниша представлена небольшой зоной, локализованной на периферии сетчатки, в области перехода сетчатки в реснитчатый эпителий (Johns, 1977). Эта зона обычно обозначается как реснитчатая крайняя зона. Вторая ниша образована палочковидными прогениторами, расположенными в центральной области сетчатки. Клетки этой зоны у рыб способны продуцировать палочковидные фоторецепторы после повреждения сетчатки (Johns, 1982). Недавние исследования показали, что палочковые прогениторные клетки являются производными Мюллеровской глии, обладающей свойствами стволовых клеток (Bernardos et al., 2007).

Установлено, что новые нейроны во взрослом мозге млекопитающих возникают из клеток радиальной глии, являющейся функциональным аналогом стволовых клеток (Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009). Во взрослом мозге рыб были установлены различные источники прогениторных клеток. Одна из популяций прогениторных клеток имеет фенотип радиальной глии (Pellegrini et al., 2007; Ganz et al., 2010; Rothenaigner et al., 2011; Charouton et al., 2011). Эти клетки способны как к самовозобновлению, так и продуцированию различных типов клеток, что определяет основные характеристики стволовых клеток (Rothenaigner et al., 2011). Для другой популяции прогениторов характерно отсутствие экспрессии канонических глиальных белков (Kaslin et al., 2009; Ganz et al., 2010; Rothenaigner et al., 2011). В мозжечке данио *D. rerio* такие клетки фенотипически сходны с нейроэпителиальными клетками (Kaslin et al., 2009).

В сетчатке клетки реснитчатой краевой зоны и Мюллеровская глия обладают свойствами ство-

ловых клеток, в частности, они способны к асимметричному митозам и являются самовозобновляющимися. Происхождение стволовых клеток в реснитчатой краевой зоне до конца не ясно. Предполагают, что нейроретинальные стволовые клетки происходят из реснитчатой краевой зоны, совместно с популяцией пролиферирующих клеток, прилежащих к пигментному эпителию из общих стволовых клеток личиночного глаза (Wehman et al., 2005). Напротив, палочковые прогениторы, которые продуцируют палочковые рецепторы в интактной сетчатке, происходят из медленно делящейся популяции Мюллеровской глии, рассеянной среди дифференцированных клеток сетчатки (Bernardos et al., 2007).

После повреждения клетки Мюллеровской глии в сетчатке рыб дедифференцируются в клетки прогениторного типа, что является основой регенерации всех типов клеток, утраченных во время повреждения (Yurco, Cameron, 2005; Thummel et al., 2008). В случае, когда зона повреждения имеет отчетливую локализацию, пролиферирующие клетки появляются в непосредственной близости от зоны повреждения, большей частью в наружном ядерном слое (Stenkamp, 2007). Однако имеются данные, что увеличение пролиферативной активности может также наблюдаться и на некотором удалении от зоны повреждения, что вероятно указывает на существование диффузных факторов, регулирующих подобный ответ (Yurco, Cameron, 2005). Время возникновения пролиферации клеток, индуцированной в результате повреждения удивительно сходно в сетчатке, мозге и спинном мозге (Zupanc, Sirkulesku, 2011). Например, после введения токсина в полость глаза в сетчатке данио пролиферирующие клетки беспорядочно распределены во всех трех слоях сетчатки (Fimbel et al., 2007). Через 3 дня после травмы пролиферирующие клетки локализованы преимущественно во внутреннем ядерном слое и их число продолжает увеличиваться, достигая максимального значения к 5 дню.

Пролиферация и апоптоз в зрительном нерве форели после повреждения. Проведенные исследования показали, что после механического повреждения глаза в зрительном нерве форели наблюдаются как процессы апоптоза, так и пролиферативная активность. Эти процессы преобладают на стороне повреждения, так количество TUNEL-маркированных телец в 6.5 раза, а количество пролиферирующих клеток в 2.8 раза превышают таковые на противоположной стороне. Структура зрительного нерва форели, как и других рыб, образована аксонами ганглиозных клеток сетчатки и клетками глии (Шванновскими клетками, олигодендроцитами и астроцитами), а также имеет некоторое количество соединительной ткани, содержащей макрофаги/микроглию, активизирующимися в ответ на повреждающее воздействие. На сегодняшний день

общая картина взаимодействий астроцитов/ганглиозных клеток во время регенерации ганглиозных клеток у рыб недостаточно изучена. Так, в исследованиях на золотой рыбке при раздавливании зрительного нерва на 7 день была выявлена сеть GFAP-иммунопозитивных реактивных астроцитов (Nona et al., 1994). Появление таких клеток совпадало с прорастанием поврежденных аксонов зрительного нерва. Однако поврежденная область оставалась GFAP-негативной и, таким образом, астроциты были исключены из зоны повреждения в процессе регенерации. В исследованиях Нона с соавторами было высказано, что волокна зрительного нерва золотой рыбки регенерируют настолько быстро, что они не успевают миелинизироваться до достижения ими мозга (Nona et al., 2000). Предполагается, что в регенерирующих аксонах зрительного нерва процесс формирования миелина детерминируется не только глиальными клетками, но и дополнительными факторами микроокружения зрительного нерва, природа которых пока не ясна.

Анализ морфологических параметров, характер PCNA-иммунопозитивности, уровень оптической плотности маркирования PCNA в клетках зрительного нерва форели позволил выделить 4 типа клеток. Эти данные свидетельствуют о гетерогенности популяции пролиферирующих клеток в зрительном нерве. Мы полагаем, что пролиферирующими клетками могут быть клетки микроглии и Шванновские клетки. Данные на золотой рыбке свидетельствуют, что в зоне повреждения зрительного нерва появляются Шванновские клетки неизвестного происхождения, которые отсутствуют в зоне повреждения до начала миелинизации аксонов. По данным Нона с соавторами, такие Шванновские клетки начинают пролиферировать после того, как в процессе регенерации несколько аксонов достигают мозга, и только затем небольшое количество клеток выходит из клеточного цикла и присоединяется к регенерирующим аксонам, участвуя в формировании миелина. После 3 месяцев в зоне повреждения зрительного нерва золотой рыбки ремиелинизация завершается. Регенерирующие аксоны дистально (рядом с мозгом) от зоны повреждения становятся миелинизированы при участии олигодендроцитов и одновременно Шванновских клеток (Nona et al., 1992).

В настоящее время взаимоотношения между фагоцитирующими клетками сетчатки и регенерацией аксонов в зрительном нерве рыб слабо изучены. В исследованиях на золотой рыбке было установлено, что в процессе регенерации зрительного нерва значительно усиливается экспрессия молекул клеточной адгезии в не нейрональных клетках (Battisti et al., 1992). Было показано, что зрительный нерв золотой рыбки содержит макроглию и микроглию, а также попу-

ляцию клеток моноцитарного ряда (гранулярных макрофагов), которые считались уникальными для золотой рыбки (Battisti et al., 1995). Было установлено, что гранулярные макрофаги и микроглия в зрительном нерве золотой рыбки являются OX-42-иммунопозитивными. В течение 1 часа после раздавливания зрительного нерва количество OX-42-иммунопозитивных клеток увеличивается в зоне травмы, оставаясь на высоком уровне до завершения процесса прорастания аксонов, а затем число данных клеток снижается. В зрительном нерве золотой рыбки микроглия (но не гранулярные макрофаги) проявляют фагоцитарную активность. Астроциты, которые хорошо морфологически идентифицируются в интактном нерве, в течение 1 часа после повреждения существенно изменяют свою морфологическую структуру и становятся трудно диагностируемыми. Олигодендроциты в поврежденном нерве золотой рыбки не была достоверно установлена до окончания формирования миелина в регенерирующих волокнах. Установлено, что гранулярные макрофаги способны продуцировать тенасцин и трансформирующий фактор роста (TGF-beta 1). Присутствие тенасцина дополнительно связывают с наличием астроцитов и/или микроглии. Таким образом, быстрый ответ не нейрональных клеток при повреждении, их быстрая фагоцитарная активность и секреция ростовых факторов способствуют быстрой регенерации зрительного нерва. Согласно нашим данным после повреждения глаза в зрительном нерве форели был зарегистрирован апоптоз, а также обнаружены признаки массовой клеточной миграции. Максимальная концентрация апоптозных телец была обнаружена в зонах массового скопления клеток в эпинеуральных областях, что, вероятно, свидетельствует о значительной массовой гибели клеток и последующего усиления фагоцитарной активности микроглии. Наличие клеточной миграции, идентифицированной на 2 сутки после повреждения, также свидетельствует об усилении клеточного потока, направленного к зоне травмы и интерпретируется нами как инвазия макрофагами. Мы предполагаем, что такие участки зрительного нерва могут соответствовать зонам реактивного глиоза, возникающего в ответ на повреждение, природу которого мы планируем прояснить в дальнейших исследованиях.

Мы полагаем, что среди апоптозных структур были представлены гетерогенные типы клеток, включающие макроглию зрительного нерва (астроциты и Шванновские клетки), а также резидентные фибробластоподобные клетки, появляющиеся в результате повреждающего воздействия. В доступной литературе мы не обнаружили данных, обсуждающих процессы апоптоза не нейрональных клеток зрительного нерва рыб. На сегодняшний день в исследованиях регенерации

зрительного нерва у низших позвоночных наиболее исследованным можно считать участие ганглиозных клеток сетчатки в процессе регенерации (Devadas et al., 2000; Zhou, Wang, 2002; Kustermann et al., 2008). Некоторые параллели могут быть проведены между исследованиями регенерации зрительного нерва у млекопитающих и рыб, во многом потому, что существуют выраженные отличия в экспрессии генов, установленные для данных групп позвоночных. Например, экспрессия гена *Bcl-2*, который согласно данным Чо с соавторами (Cho et al., 2005) может играть определяющую роль при регенерации зрительного нерва как у мыши, так и у рыб. Феноменологическое сходство может быть также связано с апоптозом ганглиозных клеток, вследствие повреждения зрительного нерва. Несмотря на то, что у данио данный феномен *in situ* до конца не исследован, были установлены изменения в количестве и распределении ганглиозных клеток после повреждения зрительного нерва (Zhou, Wang, 2002). Показано, что в сетчатке взрослого данио существует приблизительно от 40000 до 56000 ганглиозных клеток, плотность распределения которых зависит от их локализации. После раздавливания зрительного нерва, в ходе регенерации приблизительно 20% ганглиозных клеток погибает в процессе апоптоза (Zhou, Wang, 2002). Недавние исследования органотипической культуры сетчатки взрослого данио показали низкий процент апоптоза (10%) ганглиозных клеток, установленного с помощью маркирования TUNEL эксплантов сетчатки после 3 дней культивирования *in vitro* (Kustermann et al., 2008). Однако после 10 дневого культивирования, TUNEL-маркирование выявляло около 50% популяции ганглиозных клеток; вероятно в результате аксотомии, необходимой для приготовления экспланта сетчатки и последующего удаления пигментного эпителия. Исследования с маркированием BrdU показали, что потеря ганглиозных клеток в экспланте впоследствии не компенсировалась, несмотря на обширную пролиферацию других типов клеток. В исследованиях Кустермана с соавторами не было выявлено пространственной гипертрофии ганглиозных клеток в аксотомированных эксплантах, которые были описаны в сетчатке золотой рыбки в ходе регенерации зрительного нерва после аксотомии (Devadas et al., 2000). Эти отличия в наблюдениях *in vivo* и *in vitro* показывают, что сигналы, присутствующие в интактном организме и отсутствующие в экспланте сетчатки, могут быть ключевыми при выживании ганглиозных клеток и активации прорастания аксонов. Таким образом, на сегодняшний день существует необходимость в дополнительных исследованиях, проясняющих отражает ли аксональный спраунтинг ганглиозных клеток выживание субпопуляции этих клеток или же ганглиозные клетки воз-

никают *de novo* путем дифференцировки предшественников стволовых клеток.

Значительный прогресс в понимании основных закономерностей успешной регенерации при ампутации каудальной части спинного мозга был достигнут в исследованиях на электрической гимнотиформной рыбе аптеронотусе *Apteronotus leptorhynchus* (Zupanc, 2009). В исследованиях на данном виде было продемонстрировано успешное восстановление утраченного фрагмента спинного мозга, ампутированного вместе с частью хвостового плавника. Одной из начальных стадий репаративного процесса, развивающегося после травмы, является значительная гибель клеток в зоне травмы путем апоптоза. Согласно данным Зупанка, первые клетки с признаками апоптоза, возникают в зоне повреждения уже через пять минут после травмы, далее их количество постепенно возрастает, достигая максимального значения в течение нескольких часов (Zupanc et al., 1998). На второй день количество таких клеток в спинном мозге аптеронотуса постепенно снижается, достигая фонового уровня примерно через 3 недели. В течение этого периода лишь некоторые клетки подвергаются некрозу. Апоптоз, как механизм элиминации поврежденных в результате травмы клеток мозга рыб существенно отличается от такового у млекопитающих (Vajda, 2002). У последних, основным способом элиминации поврежденных клеток в зоне травмы является некроз (Liou et al., 2003). Апоптоз же затрагивает незначительный объем клеток в прилегающих к травме областях. Наличие некроза в зоне травмы млекопитающих является одной из причин развития последующего вторичного воспаления в зоне повреждения (Kerr et al., 1995), что в свою очередь вызывает дальнейшее нарастание некротического ответа в области травмы, в результате которого формируются большие полости, лишенные клеток. Эти полости, как правило, ограничены зоной реактивных астроцитов, создающих как механический, так и биохимический барьеры, затрудняющие рост нервных волокон и миграцию клеток в зону повреждения. В отличие от некроза при апоптозе отсутствуют признаки воспалительной реакции, а сами клетки впоследствии уничтожаются с помощью макрофагов/микроглии (Elmore, 2007). Именно такие изменения в зрительном нерве форели мы наблюдали на 2 сутки после повреждения. Изначально численность фагоцитов в области повреждения незначительна, но примерно через три дня после нанесения травмы количество макрофагов начинает возрастать как в самой ране, так и в прилегающих областях (Nagamoto-Combs et al., 2007). Эти данные в полной мере согласуются с нашими наблюдениями на зрительном нерве форели. Таким образом, превалирование процессов "чистой" клеточной смерти при развитии репаративных

процессов в ЦНС рыб является важнейшей особенностью, лежащей в основе регенеративной способности взрослого мозга рыб.

Исследование пролиферативной активности в зрительном нерве форели через 1 неделю после повреждения показало наличие большого количества клеток в состоянии пролиферации, образующих зоны повышенной плотности. Эти скопления образованы овальными клетками 2-го и 3-го типов, и особыми веретеновидными удлиненными клетками, находящимися, как мы полагаем, в состоянии миграции. Маркирование PCNA позволяло идентифицировать клетки, в которых происходит экспрессия дополнительной ДНК-полимеразы δ , наблюдающееся во время S-фазы митоза. Экспрессия PCNA в клетках сохраняется в течение 24 ч после окончания митоза (Wullmann, Puelles, 1999). Исследование распределения пролиферирующих и мигрирующих элементов в зрительном нерве форели показало, что для активно пролиферирующих клеток характерно образование ограниченных зон повышенной плотности распределения, тогда как для мигрирующих клеток характерно поверхностное и диффузное расположение среди волокон зрительного нерва. Анализ денситометрических параметров иммуномаркирования PCNA позволил установить, что высокая оптическая плотность характерна для овальных клеток 2-го и 3-го типов, тогда как ОП в крупных клетках 1-го и мелких клетках 4-го типов была ниже на 22–30%. Согласно данным Браво и МакДональд Браво (Bravo, MacDonald Bravo, 1987), для постмитотических клеток при маркировании PCNA характерно снижение активности на 30%. Это позволяет предполагать, что в зрительном нерве присутствовали как пролиферирующие элементы (мы полагаем, что это клетки глии), так и постмитотические клетки, сохраняющие активность PCNA, уровень которой снижен по сравнению с клетками, находящимися в состоянии пролиферации или непосредственно вышедшими из митоза. Мы предполагаем, что популяции пролиферирующих клеток представлены элементами глии (Шванновскими клетками, олигодендроглией и/или астроцитами), участвующими в формировании посттравматического реактивного глиоза. Мигрирующие постмитотические крупные клетки, вероятно принадлежат к популяции резидентных макрофагов, мелкие слабо маркированные PCNA клетки являются элементами микроглии; обе популяции слабо маркированных клеток (1-го и 4-го типов) могут представлять элементы иммунной системы, мобилизованные в ответ на повреждающее воздействие. Соотношение PCNA-иммуномаркированных клеток в контра- и ипсилатеральном зрительных нервах форели через 1 неделю после повреждения достоверно отличались. При этом на стороне повреждения наблюдалось более чем 3-х кратное увеличение проли-

феративной активности клеток. Мы считаем, что подобное увеличение объема клеток в зрительном нерве на стороне повреждения связано как с пролиферацией глиальных клеток и микроглии, так и с миграцией резидентных макрофагов из прилежащей соединительной ткани.

Если проводить аналогию с процессом регенерации зрительного нерва млекопитающих, то наблюдения, проведенные на золотой рыбке, позволяют сделать заключение, что реактивные астроциты в зрительном нерве могут формироваться из популяции Шванновских клеток (Nona et al., 2000). В первичной культуре астроциты, полученные из новорожденных, крыс экспрессируют неурегулины и их рецепторы, которые *in vivo* привлекают Шванновские клетки к аксонам во время развития, способствующие миелинизации периферических нервов (Francis et al., 1999). Установлено, что ганглиозные клетки ингибируют дифференцировку Шванновских клеток, пока их аксоны не достигнут мозга. Механизм, задерживающий миелинизацию прорастающих аксонов, подразумевает участие Notch сигнального пути (Wang et al., 1998). В зрительном нерве развивающихся крыс олигодендроциты экспрессируют Notch1, а ганглиозные клетки Jagged1, который выступает в качестве лиганда Notch. Такие взаимодействия подавляют дифференцировку олигодендроцитов до завершения процесса достижения аксонов ганглиозных клеток тектума (Wang et al., 1998). Астроциты также могут модулировать микроокружение зрительного нерва. В исследованиях Мака и Волбурга (Mack, Wolburg, 2006) было установлено, что астроциты рыб связаны посредством плотных контактов и десмосом. При исследовании регенерации поврежденных волокон зрительного нерва у *Astatotilapia burtoni* была выявлена экспрессия белков плотных контактов, в частности клаудина-1 в астроцитах, локализованных рядом с новообразованными аксонами ганглиозных клеток. Авторы интерпретируют данную находку, демонстрирующую различные свойства мембран астроцитов, модифицирующих нейроглиальные взаимодействия, которые могут в конечном итоге определять особое микроокружение зрительного нерва. В ЦНС млекопитающих астроциты взаимосвязаны посредством щелевых контактов, но наличие плотных контактов ранее показано не было. Недавно было установлено, что олигодендроциты развивающегося зрительного нерва данио экспрессируют мРНК контактина 1, тогда как у взрослой рыбы экспрессия была обнаружена в глиальных клетках слоя зрительных волокон сетчатки (Schweitzer et al., 2007). Контактныны являются протеинами суперсемейства иммуноглобулинов и предполагается их участие в распознавании клеток. После повреждения зрительного нерва как в олигодендроцитах, так и в ганглиозных клетках уровень контактина 1 у

взрослых рыб значительно выше, чем в процессе эмбрионального развития. Предполагается, что олигодендроциты могут играть важную роль в процессе успешной регенерации ЦНС, возможно оказывая более значительное влияние в непосредственной близости от места повреждения (Schweitzer et al., 2007).

Пролиферативный ответ в интегративных центрах мозга форели после повреждения глаза. После повреждающего воздействия пролиферативная активность была обнаружена в мозжечке и зрительном тектуме, являющимся целевой первичной ретиальной проекцией. После механической травмы глаза, пролиферативная активность была обнаружена в дорсальной матричной зоне мозжечка форели, а также среди единичных паренхиматозных клеток, расположенных в базальной части молекулярного слоя, инфраганглионарном сплетении и гранулярном слое. Были верифицированы локальные PCNA-ин скопления клеток, которые мы идентифицировали в качестве региональных нейрогенных ниш, активированных в результате травматического воздействия. Пролиферативная активность в ДПЗ мозжечка форели, выявленная нами, также была отмечена в мозжечке данио *D. rerio* (Grandel et al., 2006) и аптеронотуса *A. leptorhynchus* (Zupanc et al., 2005). В мозге данио за 30 минутный период образуется примерно 6000 клеток, что соответствует 0.2% клеток всего мозга (Hirnsch, Zupanc, 2007). Количественные исследования, проведенные на мозжечке аптеронотуса показали, что за 2-часовой период у этого вида образуется примерно 100000 клеток, что соответствует 0.06% клеток всего мозга (Zupanc, Horschke, 1995). После травматического воздействия PCNA-ип была выявлена в трех типах клеток мозжечка форели, среди которых выделялась популяция высокоактивных овальных клеток (ОП 116 ± 4.5 ЕОП), и менее интенсивно маркированной популяции удлинённых клеток (ОП 103 ± 3.2 ЕОП). Мы полагаем, что высокоиммуногенные клетки в составе ДПЗ представляют собой популяцию клеток, находящихся в состоянии митоза, а менее интенсивно маркированные удлинённые клетки являются постмитотическими элементами, мигрирующими из ДПЗ в направлении к области повреждения в составе радиальных и тангенциальных миграционных потоков.

Другая популяция клеток, участвующая в пролиферативном ответе ЦНС форели на механическое повреждение, представлена PCNA-негативными плотными локальными скоплениями клеток, обнаруженными непосредственно над и под ДПЗ, а также в инфраганглионарном сплетении. Мы предполагаем, что эти скопления PCNA-ин клеток представляют активированные в результате травмы нейрогенные ниши, что согласуется с данными Зупанка с соавторами (Zupanc et al.,

1996, 2005). Согласно этим данным в теле мозжечка нейральные стволовые клетки (НСК) находятся в специфических пролиферативных зонах “нейрогенных нишах”, расположенных в молекулярном слое. Потомки пролиферировавших клеток мигрируют по специфическим магистралям в гранулярный слой, где они равномерно распределяются (Candal et al., 2005; Zupanc et al., 2005). Во время такой ориентированной миграции в мозжечке молодые клетки направляются волокнами радиальной глии. Третью популяцию представляют PCNA-ип клетки, расположенные одиночно или небольшими скоплениями в нижней трети молекулярного слоя и в гранулярном слое.

Зрительный тектум представляет другой интегративный центр среднего мозга форели, являющийся первичной ретиальной проекцией. Ранее пролиферативная активность мезенцефалических матричных зон методом маркирования PCNA была исследована у *Carassius carassius* (Margotta et al., 2002). Было установлено, что маркирование PCNA позволяет идентифицировать паттерны распределения митотически активных клеток мозга, которые формируют морфогенетические поля – матричные зоны. Матричные зоны, маркируемые PCNA, также были идентифицированы в среднем мозге у взрослого осетра *Acipenser shrenkii* (Puschina, Obukhov, 2011).

При повреждении зрительного нерва у форели PCNA-иммунопозитивность была выявлена в клетках радиальной глии, единичных паренхиматозных клетках внутренних слоев тектума и в перивентрикулярной области. Поскольку известно, что популяция радиальной глии в мозге рыб не является однородной, существуют быстро и медленно пролиферирующие клетки (Adolf et al., 2006), мы предполагаем, что после повреждения в тектуме форели пролиферативная активность усиливается именно в медленно пролиферирующих клетках радиальной глии. Это предположение основано на данных денситометрического исследования активности PCNA в клетках радиальной глии. Плотность распределения PCNA-ип радиальной глии была невысока по сравнению с распределением одиночных паренхиматозных PCNA-ип клеток в глубоких слоях тектума. Мы полагаем, что после повреждения глаза в тектуме начинает пролиферировать лишь часть популяции радиальной глии. Среди клеток радиальной глии выделялись немногочисленные клетки с высокой активностью PCNA (114 ЕОП), что позволяет интерпретировать такие клетки в качестве нейрональных предшественников (Malatesta et al., 2008), находящихся в состоянии асимметричных митозов, что было ранее установлено для РГ в исследовании Ноктора с соавторами (Noctor et al., 2004). Другая, более многочисленная популяция РГ в тектуме форели имела более низкие показатели оптической плотности (104 ЕОП); такие клетки

нами рассматривались в качестве постмитотических элементов.

Особенно крупное скопление PCNA-ип небольших клеток было выявлено в каудальной перивентрикулярной зоне тектума, также обнаруженное и у других видов рыб (Ekström et al., 2001; Zupanc et al., 2005).

Таким образом, в интегративных центрах мозга форели через 1 неделю после повреждения обнаружена пролиферативная активность во вторичной матричной зоне мозжечка, радиальной глии тектума, первичной перивентрикулярной зоне тектума и отдельных паренхиматозных клетках. Были идентифицированы паттерны радиальной и тангенциальной миграции клеток в мозжечке, включающие как PCNA-ип, так и PCNA-ин элементы. Идентифицированы PCNA-ин нейрогенные ниши, особенно многочисленные в дорсальной части тела мозжечка и тектуме.

В мозге взрослой форели процессы перистентного нейрогенеза не высоки и усиление пролиферации в матричных зонах мозжечка, появление нейрогенных ниш, PCNA-ип радиальной глии и единичных пролиферирующих клеток в паренхиме мозжечка и зрительного тектума являются комплексной реакцией мозга на нанесение механической травмы глаза.

Нейрогенез в пролиферативных зонах мозга форели в ответ на повреждающее воздействие. После механической травмы зрительного нерва в пролиферативных зонах мозга форели была выявлена значительная пролиферативная активность. Вновь образованные клетки в этих областях дифференцируются в различные типы клеток, в том числе в нейроны. Для оценки количества нейронов, образованных в результате механической травмы сетчатки и зрительного нерва, были исследованы пролиферативные области мозга, включающие перивентрикулярную и вторичные пролиферативные зоны конечного мозга, тектума, мозжечка и мозгового ствола форели. Полученные данные свидетельствуют об интенсивном образовании новых нейронов в различных центрах головного мозга. Так, процессы нейрогенеза были зарегистрированы в дорсальных и вентральных матричных зонах эвертированного конечного мозга форели. В исследованиях на данио при повреждении конечного мозга в дорсальном теленцефалоне, вновь образованные клетки начинают экспрессировать нейрональный протеин NuC/D через 3–4 дня после повреждения (Ayari et al., 2010; Kroehne et al., 2011; Kishimoto et al., 2012). Эти новые нейроны появляются как рядом с зоной травмы, так и в удаленных от поврежденной зоны областях. В последующие дни количество NuC/D-экспрессирующих клеток градуально возрастает, особенно в зоне повреждения. Пространственно-временной паттерн распре-

ления таких клеток свидетельствует, что вновь образованные клетки приобретают фенотипические свойства, характерные для нейронов во время миграции к зоне повреждения (Zupanc, Sribulescu, 2013).

По нашим наблюдениям у форели, при повреждении глаза наиболее интенсивное образование новых клеток через 2 дня после травмы было характерно для дорсальной пролиферативной зоны. В этой области была идентифицирована максимальная плотность распределения мелких недифференцированных NuC/D-ип клеток, расположенных под NuC/D-ин слоем пролиферирующих клеток. Подобные процессы были выявлены и в других зонах дорсальной области – медиальной и латеральной, имеющие структурные особенности в организации, в частности медиальная ПЗ была более крупной по сравнению с латеральной ПЗ. В вентральной области толстый слой NuC/D-ин клеток был выявлен как в дорсальном, так и в вентральном ядрах. В этих структурах отчетливо проявляется послонная организация, отделяющая ПЗ от дефинитивных NuC/D-ип дифференцированных клеток. В вентральном ядре выявлены недифференцированные NuC/D-ип клетки, расположенные на территории ПЗ, что свидетельствует о ранней нейрональной дифференцировке клеток, образованных в посттравматический период. Однако на территории конечного мозга форели после повреждения нами не были выявлены типичные нейрогенные ниши, как в других отделах нервной системы – тектуме и мозжечке. Тем не менее, на территории дорсальной зоны дорсальной области наряду с NuC/D-ип недифференцированными клетками глубокой зоны были обнаружены NuC/D-ин недифференцированные клетки. Мы считаем, что появление таких элементов на территории Дд является реакцией на травму. Плотность распределения NuC/D-ин клеток в Дд была достаточно высока, что может свидетельствовать о специфических формах нейрогенных ниш в конечном мозге форели, ранее не верифицированных у рыб.

В тектуме и мозжечке форели, после нанесения механической травмы в область глаза характерна активизация крупных региональных нейрогенных ниш, локализованных в дорсальной части тела мозжечка (в молекулярном слое), оптическом слое тектума и более мелких в области инфраганглионарного сплетения, латеральных зонах тела мозжечка. Другой особенностью репаративного нейрогенеза в тектуме форели является появление PCNA-ип клеток радиальной глии в поверхностных слоях тектума. Мы полагаем, что данная особенность связана с адаптивными свойствами данного центра мозга форели, представляющего собой направленную ретинальную проекцию и имеющую тесную функциональную связь с зоной повреждения. Увеличение про-

лиферативной активности в каудальной зоне тектума форели, также является одним из признаков повышения пролиферативного потенциала мозга и рассматривается нами в качестве дополнительного репаративного резерва мозга форели. Увеличение скорости нейрогенеза в пролиферативных зонах мозга форели, в частности в перивентрикулярной зоне продолговатого мозга, в сочетании с высокой активностью NuC/D в клетках перивентрикулярной зоны, по нашей оценке, также является комплексной реакцией ЦНС на репаративный стимул.

Методом ретроградного трайсирования в сочетании с маркированием BrdU в мозжечке *A. leptorhynchus* было показано, что в результате колотого повреждения в гранулярном слое возникают клетки, фенотипически сходные с утраченными в результате травмы (Zupanc, Ott, 1999). Эти новые клетки направляются в область травмы GFAP-иммунопозитивными волокнами радиальной глии (Clint, Zupanc, 2001). В исследованиях с повреждением спинного мозга, вновь образованные клетки развиваются в NuC/D-позитивные и серотонин-позитивные нейроны и S100-позитивные и GFAP-позитивные эпендимоциты и глиальные клетки (Takeda et al., 2008; Sirbulescu et al., 2009).

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что после повреждения глаза и зрительного нерва в пролиферативных зонах конечного мозга, зрительного тектума, мозжечка и ствола мозга взрослой форели наблюдается усиление продуцирования новых нейронов уже через 2 дня после повреждающего воздействия, в отличие от *D. rerio*, у которого подобный ответ возникает через 3–4 дня (Ayari et al., 2010). В конечном мозге взрослой форели наиболее интенсивный нейрогенез наблюдается в дорсальной зоне на территории пролиферативной зоны Dd. В зрительном тектуме значительно усиливается нейрогенез в каудальной перивентрикулярной пролиферативной зоне, среди паренхиматозных клеток в составе слоев тектума. На территории поверхностных слоев (маргинального и оптического) тектума были идентифицированы нейрогенные ниши, содержащих пролиферирующие PCNA-ип/NuCD-ин клетки и NuCD-ип клетки. В мозжечке было установлено достоверное увеличение пролиферации клеток в дорсальной пролиферативной зоне, среди единичных паренхиматозных клеток молекулярного и гранулярного слоев, в латеральной части тела мозжечка выявлены нейрогенные ниши, сходные по структуре с таковыми в зрительном тектуме. В продолговатом мозге идентифицирована высокая активность перивентрикулярной пролиферативной зоны, а также прилежащих областей дорсальной, латеральной и медиальной ретикулярной формации, содержащих высокий уровень активности NuC/D. Таким образом, проведенные исследования позволяют за-

ключить, что для нейронов, образованных в результате репаративного процесса, характерен более высокий уровень экспрессии нейронального маркера NuC/D, по сравнению с клетками в дефинитивных центрах мозга. Исходя из полученных данных, мы предполагаем активное участие данного нейронального пептида в процессах постэмбрионального и репаративного нейрогенеза.

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-I-6-116, раздел III).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Меркулов А.Г. Курс патологогистологической техники. Л.: Медицина, 1969. 340 с.
- 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.
- Ayari B., El Hachimi K.H., Yanicostas C., Landoulsi A., Soussi-Yanicostas N. Prokineticin 2 expression is associated with neural repair of injured adult zebrafish telencephalon // *J. Neurotrauma.* 2010. V. 27. P. 959–972.
- Battisti W.P., Wang J., Bozek K., Murray M. Macrophages, microglia, and astrocytes are rapidly activated after crush injury of the goldfish optic nerve: a light and electron microscopic analysis // *J. Comp. Neurol.* 1995. V. 354. P. 306–320.
- Battisti W.P., Shinar Y., Schwartz M., Levitt P., Murray M. Temporal and spatial patterns of expression of laminin, chondroitin sulphate proteoglycan and HNK-1 immunoreactivity during regeneration in the goldfish optic nerve // *J. Neurocytol.* 1992. V. 21. P. 557–573.
- Becker C.G., Becker T. Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration // *Restor. Neurol. Neurosci.* 2008. V. 26. P. 71–80.
- Bernardos R.L., Barthel L.K., Meyers J.R., Raymond P.A. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. P. 7028–7040.
- 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.J., 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.
- Cen L.P., Luo J.M., Zhang C.W., Fan Y.M., Song Y., So K.F., van Rooijen N., Pang C.P., Lam D.S.C., Cui Q. Chemoattractant effect of ciliary neurotrophic factor on macrophages in retinal ganglion cell survival and axonal regeneration // *Vision Res.* 2007. V. 48. P. 4257–4266.
- Chapouton P., Webb K.J., Stigloher C., Alunni A., Adolf B., Hesl B., Topp S., Kremmer E., Bally-Cuif L. Expression of hairy/enhancer of split genes in neural progenitors

- and neurogenesis domains of the adult zebrafish brain // *J. Comp. Neurol.* 2011. V. 519. P. 1748–1769.
- Cho K.S., Yang L., Lu B., Feng Ma H., Huang X., Pekny M., Chen D.F.* Re-establishing the regenerative potential of central nervous system axons in postnatal mice // *J. Cell. Sci.* 2005. V. 118. P. 863–872.
- Clint S.C., Zupanc G.K.H.* Neuronal regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus*: guidance of migrating young cells by radial glia // *Dev. Brain Res.* 2001. V. 130. P. 15–23.
- Cui Y., Yin Y., Benowitz L.I.* Role of macrophages in optic nerve regeneration // *Neuroscience.* 2009. V. 158. P. 1039–1048.
- Devadas M., Sugawara K., Shimada Y., Sugitani K., Liu Z.W., Matsukawa T., Kato S.* Slow recovery of goldfish retinal ganglion cells' soma size during regeneration // *Neurosci. Res.* 2000. V. 37. P. 289–297.
- Elmore S.* Apoptosis: a review of programmed cell death // *Toxicol. Pathol.* 2007. V. 35. P. 495–516.
- 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.
- Fernández A.S., Rosillo J.C., Casanova G., Olivera-Bravo S.* Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): a comparative study // *Neuroscience.* 2011. V. 189. P. 12–24.
- Fimbel S.M., Montgomery J.E., Burket C.T., Hyde D.R.* Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. P. 1712–1724.
- Frade J.M., Barde Y.A.* Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina // *Neuron.* 1998. V. 20. P. 35–41.
- Francis A., Raabe T.D., Wen D., DeVries G.H.* Neuregulins and ErbB receptors in cultured neonatal astrocytes // *J. Neurosci. Res.* 1999. V. 57. P. 487–494.
- 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.
- García D.M., Koke J.R.* Astrocytes as gate-keepers in optic nerve regeneration // *Comp. Biochem. Physiol. A.* 2009. V. 152. P. 135–138.
- García-Valenzuela E., Sharma S.C., Piña A.L.* Multilayered retinal microglial response to optic nerve transection in rats // *Mol. Vis.* 2005. V. 1. P. 225–231.
- 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.
- Grosche J., Härtig W., Reichenbach A.* Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Müller (glial) cells in retinal light damage of rats // *Neurosci. Lett.* 1995. V. 185. P. 119–122.
- Hailer N.P.* Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells // *Prog. Neurobiol.* 2008. V. 8. P. 211–233.
- Hanisch U.K.* Microglia as a source and target of cytokines // *Glia.* 2002. V. 4. P. 140–155.
- Hinsch K., Zupanc G.K.H.* Generation and long-term persistence of new neurons in the adult zebrafish brain: a quantitative analysis // *Neuroscience.* 2007. V. 146. P. 679–96.
- Johns P.R.* Formation of photoreceptors in larval and adult goldfish // *J. Neurosci.* 1982. V. 2. P. 178–198.
- Johns P.R.* Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cells // *J. Comp. Neurol.* 1977. V. 176. P. 343–357.
- 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.
- Kerr J.F., Gobe G.C., Winterford C.M., Harmon B.V.* Anatomical methods in cell death. In: Schwartz LM, Osborne BA (eds) *Cell Death.* San Diego: Acad. Press, 1995. P. 1–27.
- 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.
- Kroehne V., Freudenreich D., Hans S., Kaslin J., Brand M.* Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors // *Development.* 2011. V. 138. P. 4831–4841.
- Kustermann S., Schmid S., Biehlmaier O., Kohler K.* Survival, excitability, and transfection of retinal neurons in an organotypic culture of mature zebrafish retina // *Cell Tissue Res.* 2008. V. 332. P. 195–209.
- Liou A.K., Clark R.S., Henshall D.C., Yin X.-M., Chen J.* To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways // *Prog. Neurobiol.* 2003. V. 69. P. 103–142.
- Luo J.M., Cen L.P., Zhang X.M., Chiang S.Y., Huang Y., Lin D., Fan Y., van Rooijen N., Lam D.S.C., Pang C.P., Cui Q.* PI3K/akt, JAK/STAT and MEK/ERK pathway inhibition protects retinal ganglion cells via different mechanisms after optic nerve injury // *Eur. J. Neurosci.* 2007. V. 26. P. 828–842.
- Mack A.F., Wolburg H.* Growing axons in fish optic nerve are accompanied by astrocytes interconnected by tight junctions // *Brain Res.* 2006. V. 1103. P. 25–31.
- Malatesta P., Appolloni I., Calzolari F.* Radial glia and neural stem cells // *Cell Tissue Res.* 2008. V. 331. P. 165–178.
- 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.
- Nagamoto-Combs K., McNeal D.W., Morecraft R.J., Combs C.K.* Prolonged microgliosis in the rhesus monkey central ner-

- vous system after traumatic brain injury // *J. Neurotrauma*. 2007. V. 24. P. 1719–1742.
- Noctor S.C., Martinez-Cerdeno 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.
- Nona S.N., Duncan A., Stafford C.A., Maggs A., Jeserich G., Cronly-Dillon J.R. Myelination of regenerated axons in goldfish optic nerve by Schwann cells // *J. Neurocytol.* 1992. V. 21. P. 391–401.
- Nona S.N., Stafford C.A., Duncan A., Cronly-Dillon J.R., Scholes J. Myelin repair by Schwann cells in the regenerating goldfish visual pathway: regional patterns revealed by X-irradiation // *J. Neurocytol.* 1994. V. 23. P. 400–409.
- Nona S.N., Thomlinson A.M., Bartlett C.A., Scholes J. Schwann cells in the regenerating fish optic nerve: evidence that CNS axons, not the glia, determine when myelin formation begins // *J. Neurocytol.* 2000. V. 29. P. 285–300.
- Nona S.N., Thomlinson A.M., Stafford C.A. Temporary colonization of the site of lesion by macrophages is a prelude to the arrival of regenerated axons in injured goldfish optic nerve // *J. Neurocytol.* 1998. V. 27. P. 791–803.
- Otteson D.C., Hitchcock P.F. Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration // *Vision Res.* 2003. V. 43. P. 927–936.
- Palmer A.M., Marion D.W., Botscheller M.L., Bowen D.M., DeKosky S.T. Increased transmitter amino acid concentration in human ventricular CSF after brain trauma // *Neuroreport*. 1994. V. 6. P. 153–156.
- Puschina E.V., Obukhov D.K. Processes of proliferation and apoptosis in the brain of the Amur sturgeon // *Neurophysiology*. 2011. V. 43. № 4. P. 271–286.
- Pushchina E.V., Obukhov D.K., Varaksin A.A. Structure, chemoarchitectonics and postembryonic histogenesis of a central nervous system in a teleost fish // *Teleosts: Evolutionary Development, Diversity and Behavioral Ecology* / Ed. Carone S. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2014. P. 97–152.
- Schweitzer J., Gimnopoulos D., Lieberoth B.C., Pogoda H.M., Feldner J., Ebert A., Schachner M., Becker T., Becker C.G. Contactin 1a expression is associated with oligodendrocyte differentiation and axonal regeneration in the central nervous system of zebrafish // *Mol. Cell. Neurosci.* 2007. V. 35. P. 194–207.
- Sîrbulescu R.F., Ilieş I., Zupanc G.K.H. Structural and functional regeneration after spinal cord injury in the weakly electric teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus* // *J. Comp. Physiol. A*. 2009. V. 195. P. 699–714.
- Stenkamp D.L. Neurogenesis in the fish retina // *Int. Rev. Cytol.* 2007. V. 259. P. 173–224.
- Takeda A., Nakano M., Goris R.C., Funakoshi K. Adult neurogenesis with 5-HT expression in lesioned goldfish spinal cord // *Neuroscience*. 2008. V. 151. P. 1132–1141.
- Thummel R., Kassen S.C., Enright J.M., Nelson C.M., Montgomery J.E., Hyde D.R. Characterization of Muller glia and neuronal progenitors during adult zebrafish retinal regeneration // *Exp. Eye Res.* 2008. V. 87. P. 433–444.
- Vajda F.J. Neuroprotection and neurodegenerative disease // *J. Clin. Neurosci.* 2002. V. 9. P. 4–8.
- Wang S., Sdrulla A.D., diSibio G., Bush G., Nofziger D., Hicks C., Weinmaster G., Barres B.A. Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation // *Neuron*. 1998. V. 21. P. 63–75.
- Wehman A.M., Staub W., Meyers J.R., Raymond P.A., Baier H. Genetic dissection of the zebrafish retinal stem-cell compartment // *Dev. Biol.* 2005. V. 281. P. 53–65.
- Wulliman M.F., Puelles L. Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains // *Anat. Embryol.* 1999. V. 329. P. 329–348.
- Yurco P., Cameron D.A. Responses of Muller glia to retinal injury in adult zebrafish // *Vision Res.* 2005. V. 45. P. 991–1002.
- Zhou L.X., Wang Z.R. Changes in number and distribution of retinal ganglion cells after optic nerve crush in zebrafish // *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*. 2002. 35. 159–162.
- Zikopoulos B., Kentouri M., Dermon C.R. Proliferation zones in the adult brain of a sequential hermaphrodite teleost species (*Sparus aurata*) // *Brain Behav. Evol.* 2000. V. 56. P. 310–322.
- Zupanc G.K., Hinsch K., Gage F.H. Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain // *J. Comp. Neurol.* 2005. V. 488. P. 290–319.
- Zupanc G.K. Towards brain repair: insights from teleost fish // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2009. V. 20. P. 683–690.
- 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.
- Zupanc G.K., Horschke I., Ott R., Rascher G.B. Postembryonic development of the cerebellum in gymnotiform fish // *J. Comp. Neurol.* 1996. V. 370. P. 443–464.
- Zupanc G.K., Kompass K.S., Horschke I., Ott R., Schwarz H. Apoptosis after injuries in the cerebellum of adult teleost fish // *Exp. Neurol.* 1998. V. 152. P. 221–230.
- 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.
- Zupanc G.K., Sîrbulescu R.F. Teleost fish as a model system to study successful regeneration of the central nervous system // *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 2013. V. 367. P. 193–233.
- Zupanc G.K.H., Ott R. Cell proliferation after lesions in the cerebellum of adult teleost fish: time course, origin, and type of new cells produced // *Exp. Neurol.* 1999. V. 160. P. 78–87.

Reparative Neurogenesis in the Brain and Changes in the Optic Nerve of Adult Trout *Oncorhynchus mykiss* after Mechanical Damage of the Eye

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

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

^b*St. Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg 199034 Russia
e-mail: puschina@mail.ru*

Received December 29, 2014; in final form April 23, 2015

Reparative proliferation and neurogenesis in the brain integrative centers after mechanical eye injury in an adult trout *Oncorhynchus mykiss* have been studied. We have found that proliferation and neurogenesis in proliferative brain regions, the cerebellum, and the optic tectum were significantly enhanced after the eye injury. The cerebellum showed a significant increase in the proliferative activity of the cells of the dorsal proliferative zone and parenchymal cells of the molecular and granular layers. One week after the injury, PCNA-positive radial glia cells have been identified in the tectum. We have found for the first time that the eye trauma resulted in the development of local clusters of undifferentiated cells forming so called neurogenic niches in the tectum and cerebellum. The differentiation of neuronal cells detected by labeling cells with antibodies against the protein HuC/D occurred in the proliferative zones of the telencephalon, the optic tectum, cerebellum, and medulla of a trout within 2 days after the injury. We have shown that the HuC/D expression is higher in the proliferative brain regions than in the definitive neurons of a trout. In addition, we have examined cell proliferation, migration, and apoptosis caused by the eye injury in the contra- and ipsilateral optic nerves and adjacent muscle fibers 2 days after the trauma. The qualitative and quantitative assessment of proliferation and apoptosis in the cells of the optic nerve of a trout has been made using antibodies against PCNA and the TUNEL method.

Keywords: proliferation, teleosts, reparative neurogenesis, apoptosis, radial glia, neurogenic niche, secondary proliferative region, PCNA, HuCD, TUNEL-labeling