

МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

УДК 591.3:591.481:597.5

GFAP И PCNA МАРКИРОВАНИЕ В МОЗЖЕЧКЕ МОЛОДИ СИМЫ *ONCORHYNCHUS MASOU* (SALMONIDAE) ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

© 2017 г. М. Е. Стуканёва*, Е. В. Пущина, А. А. Варакин

Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН
690041 Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17

*E-mail: stykanyova@mail.ru

Поступила в редакцию 09.11.2016 г.

Окончательный вариант получен 21.04.2017 г.

Целью работы было изучение процессов пролиферации, участия глии и нейральных стволовых клеток при повреждающем воздействии на мозжечок молоди симы *Oncorhynchus masou*. Методом иммунопероксидазного маркирования глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP) и ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) были исследованы процессы пролиферации и глиогенеза после механической травмы мозжечка молоди симы *Oncorhynchus masou*. После травмы в мозжечке симы интенсивность процессов пролиферации и миграции в различных зонах варьирует. В латеральной и базальной зонах после травмы процессы пролиферации снижаются, а миграции усиливаются. В дорсальной зоне, напротив, по сравнению с интактным мозгом значительно снижаются процессы миграции, а пролиферация возрастает. В дорсальной матричной зоне мозжечка была выявлена интенсивная пролиферация клеток. На территории дорсальной, латеральной и базальной зон молекулярного слоя мозжечка после травматического повреждения идентифицированы нейрогенные ниши, содержащие PCNA+ клетки, а также гетерогенную популяцию PCNA– клеток. На территории нейрогенных ниш обнаружены волокна радиальной глии и единичные мелкие, интенсивно и умеренно маркированные GFAP– клетки. В результате повреждающего воздействия в дорсальной матричной зоне появлялись GFAP+ волокна радиальной глии, формирующие разнонаправленные, радиально ориентированные пучки. Подобные структурные образования не были выявлены у интактных животных. Мы полагаем, что после травмы в дорсальной матричной зоне осуществляется структурная перестройка, связанная с частичной пространственной переориентацией волокон радиальной глии и формированием специфических направляющих для клеток, образованных в этой зоне. В результате травмы в мозжечке симы появлялись элементы радиальной глии, включающие как клетки, имеющие типичную морфологию, так и фрагменты клеток в виде длинных радиально ориентированных отростков или тела клеток, содержащие начальные фрагменты радиальных отростков.

Ключевые слова: радиальная глия, миграция, мозжечок, травма, костистые рыбы, постнатальный нейрогенез, пролиферация

DOI: 10.7868/S047514501705007X

ВВЕДЕНИЕ

Рыбы являются интересным объектом для исследований нейрогенетических процессов, поскольку в период их постэмбрионального развития формирование мозга, рост и дифференцировка интегративных центров активно продолжают (Zupan, 2006). Основой этого является постнатальный нейрогенез — процесс, начинающийся с деления клеток-предшественников, их последующей миграции, дифференцировки новообразованных клеток и заканчивающийся интеграцией новых нейронов в нервную сеть (Kempermann, 2008). Феноменологические проявления нейрогенеза у взрослых рыб схожи с таковыми в эмбриональном мозгу птиц и млекопитающих (Levine et al.,

1994). Предполагается, что взрослый нейрогенез играет важную роль в количественном согласовании и координации нейронов ЦНС в сенсорных и моторных структурах мозга. У млекопитающих рост тела происходит за счет увеличения размеров мышечных волокон, а не их количества. У рыб в течение всей жизни растет количество мышечных волокон, а это, возможно, требует соответствующего увеличения нейрональных единиц для контроля мышечной активности и для численного согласования центральных нейронов и периферических сенсорных элементов. У костистых рыб продуцирование новых нейронов, в сочетании с достаточно долговременным выживанием их значительной части, приводит к постоянному росту мозга и его структур. Если у млекопитающих цен-

тральные отделы сенсорных систем к моменту рождения и/или вскоре после него уже полностью сформированы и находятся в соответствии с количеством сенсорных рецепторов, то у рыб рост и развитие сенсорных проекций в мозге могут продолжаться всю жизнь из-за необходимости адаптироваться к постоянному значительному увеличению размеров тела и объема входящей сенсорной информации. Постоянное образование новых нейронов во взрослом возрасте у рыб обеспечивается присутствием в мозге большого количества радиальной глии (Onteniente et al., 1983; Pellegrini et al., 2007), которая, как известно у млекопитающих выполняет функцию нейрональных стволовых клеток во время эмбрионального нейрогенеза (Noctor et al., 2002; Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009). У млекопитающих новые нейроны формируются, в основном в двух зонах мозга: а) в передней части субвентрикулярной зоны бокового желудочка, из которой незрелые нейроны мигрируют в составе так называемого “рострального миграционного потока” в обонятельные луковицы, где они дифференцируются в гранулярные нейроны и перигломерулярные интернейроны (Curtis et al., 2007) и б) области, расположенной в субгранулярной зоне зубчатой извилины, откуда новые клетки мигрируют на короткие расстояния в гранулярный слой клеток гиппокампа и развиваются в зрелые гранулярные нейроны (Seri et al., 2004). У взрослых костистых рыб высокий нейрогенный потенциал наблюдается во многих областях мозга. Зоны первичной пролиферации у рыб расположены вдоль желудочка мозга и формируют 16 скоплений вдоль rostro-каудальной оси мозга (Ekström et al., 2001). Участки мозга, в которых у взрослых особей происходит весьма интенсивное деление клеток рассматриваются, как зоны вторичного нейрогенеза и локализованы в конечном мозгу, зрительном тектуме и мозжечке, а также в таламусе и в стволе мозга (Zupanc, Ott, 1999).

Рыбы способны регенерировать нервную ткань после механических и химических повреждений в мозжечке, конечном мозге, обонятельных луковицах, в сетчатке и это, как полагают, тесно связано с процессами постэмбрионального нейрогенеза (Takeda et al., 2008; Kroehne et al., 2011; März et al., 2011; Diotel et al., 2013; Zupanc, Sîrbulescu, 2013; Skaggs et al., 2014). Доказано, что нервная ткань рыб после повреждения восстанавливается уже через несколько недель (Zupanc et al., 2003). Восполнение потери большого количества клеток в результате травмы происходит из различных источников: радиальной глии, центров первичной и вторичной пролиферации, а также нейрогенных ниш (Zupanc, 2011).

Для эволюционно древних групп, как лососевые рыбы (Salmonidae), характерна высокая концентрация недифференцированных элементов

как в матричных зонах мозга, так и в паренхиме (Pouwels, 1978). Мозжечок является общепринятой зоной мозга для исследования морфогенетических процессов, поскольку имеет повышенную пролиферативную активность как в условиях нормы, так и при травматическом воздействии (Pouwels, 1978; Zupanc, Sîrbulescu, 2013). Среди пойкилотермных позвоночных мозжечок сохраняет эмбриональные свойства только у взрослых костистых рыб, что характерно и для других регионов их мозга (Margotta et al., 2004).

В настоящее время установлено, что глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) является одним из маркеров нейральных стволовых клеток (Ahmed et al., 2012). Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) используется при исследовании пролиферирующих клеточных популяций (Candal et al., 2005).

Целью работы было изучение процессов пролиферации, участия глии и нейральных стволовых клеток при повреждении мозжечка молодой симы *Oncorhynchus masou*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе было использовано 70 годовалых особей молодой симы *Oncorhynchus masou*, с длиной тела 9–11.5 см и массой 20–35 г. Животные были получены с Рязановского экспериментального производственного рыбоводного завода в 2015 г. Симу содержали в аквариуме с аэрируемой пресной водой при температуре 16–17°C, с одноразовым кормлением за сутки. 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 ННЦБМ, Ресурсного центра ННЦБМ ДВО РАН и Этического комитета, регламентирующего гуманное обращение с экспериментальными животными. Рыбы были анестезированы в растворе трикаин метансульфоната MS222 (Sigma, США) в течение 10–15 мин.

После анестезии внутричерепную полость бездвиженного животного перфузировали с помощью шприца 4%-ым раствором параформальдегида, приготовленным на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.2). После префиксации мозг извлекали из полости черепа и фиксировали в 4%-ом растворе параформальдегида в течение двух часов при 4°C. Затем в течение двух суток выдерживали в 30%-ом растворе сахарозы при 4°C (с пятикратной сменной раствора). Серийные фронтальные срезы мозга симы толщиной 50 мкм изготавливали на замораживающем микротоме Cryo-star HM 560 MV

(ФРГ), монтировали на желатинизированные предметные стекла и высушивали.

Экспериментальное повреждение мозга проводили согласно методике, предложенной Зупанком и Оттом (Zupanc, Ott, 1999). Путем прокалывания черепа рыбы тонкой стерильной иглой наносили рану глубиной в 1 мм в парасагиттальном направлении в область тела мозжечка. Зона травмы охватывала как дорсальный молекулярный, так и гранулярный слой тела мозжечка и не затрагивала другие части головного мозга. Сразу после механического повреждения животных выпускали в аквариум с пресной водой для их восстановления и дальнейшего мониторинга.

Иммуногистохимия. Для исследования пролиферативной активности и глиогенеза в мозжечке молодёжи симы использовали иммунопероксидазное маркирование глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP) и ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) на замороженных, свободно плавающих срезах мозга. Оценку глиогенеза проводили через день, а пролиферативной активности — через 2 дня после нанесения повреждения.

Срезы мозга толщиной 50 мкм инкубировали *in situ* с первичными моноклональными антителами мыши против PCNA (Santa Cruz Biotech, США, 1 : 300), GFAP (Abcam, Великобритания, 1 : 300); при температуре 4°C в течение 48 ч. Для визуализации ИГХ маркирования использовали стандартный ABC комплекс Vectastain Elite ABC kit (“Vector Laboratories”, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Для выявления продуктов реакции применялся субстрат красного цвета (VIP Substrate Kit, “Vector Labs”, Burlingame, США) в сочетании с докрасиванием метиловым-зеленым по Браше (Меркулов, 1969). Развитие ИГХ окраски контролировали под микроскопом. Материал обезвоживали по стандартной процедуре в двух сменах этилового спирта (96%), проводили через ксилол и заключали в среду для гистологических препаратов Bio-Optica (Италия).

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

Микроскопия. Для визуализации процессов пролиферации, глиогенеза и проведения морфологического и морфометрического анализа был использован моторизированный инвертированный микроскоп исследовательского класса Axiovert 200 M с модулем ApoTome и цифровыми камерами AxioCam MRM и AxioCam HRC (Carl Zeiss, ФРГ). Микрофотографии препаратов и анализ материала осуществляли с помощью программы

AxioVision. Измерения проводили при увеличении 40× в пяти случайно выбранных полях зрения для каждой области исследования. Площадь нейрогенных ниш измеряли при увеличении 40× в пяти случайно выбранных тест-полях в каждой зоне и брали среднее значение.

Микрофотографии препаратов получали с помощью цифровой камеры Axiovert 200. Обработка материала проводилась с использованием программы Axioimager и в графическом редакторе Corel Photo-Paint 12.

Статистическая обработка. Количественная обработка материала была выполнена с помощью программы “Описательная статистика” Microsoft Excel 2007. Плотность распределения клеток оценивалась с помощью методов вариационной статистики. Для количественной оценки результатов был использован ANOVA-тест; данные представлены в виде: среднее ± стандартное отклонение ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выявления пролиферативного ядерного антигена в мозжечке

Наиболее крупным образованием, содержащим PCNA+ клетки, была дорсальная матричная зона (ДМЗ) мозжечка. Она располагается в дорсомедиальной части тела мозжечка на границе между молекулярным и гранулярным слоями и плотность распределения PCNA+ клеток в ней была выше по сравнению с прилежащими участками молекулярного слоя (рис. 1а). Согласно ранее проведенным исследованиям (Stukaneva et al., 2015) в составе данной зоны и в норме, и после повреждения нами было идентифицировано четыре типа клеток, морфометрические параметры которых приведены в табл. 1.

Клетки первого типа округлые, с длиной тела от 4 до 6 мкм и второго типа — овальные, от 6 до 10 мкм, интенсивно маркировались PCNA и составляли пролиферирующую популяцию. Клетки третьего типа — удлиненные, размером от 10 до 20 мкм и четвертого — палочковидные, с длинной осью тела от 20 до 22.5 мкм, относились к мигрирующей популяции, образованной тангенциально и радиально ориентированными рядами клеток. В дорсальной зоне в норме преобладали мигрирующие клетки четвертого типа (до 35%), размером $22.3 \pm 0.5/3.2 \pm 0.2$ мкм (см. табл. 1), после повреждения их число снижалось до 1%, тогда как число пролиферирующих клеток увеличивалось в 2.5 раза (рис. 2).

В соответствии с данной ранее классификацией в латеральной и базальной зонах в норме нами было выделено два типа клеток, морфология которых сходна с клетками ДМЗ и дорсальной зоны: округлые, $5.7 \pm 0.3/3.3 \pm 0.2$ мкм и овальные, $10.2 \pm 0.1/4.1 \pm 0.1$ мкм (см. табл. 1). Помимо кле-

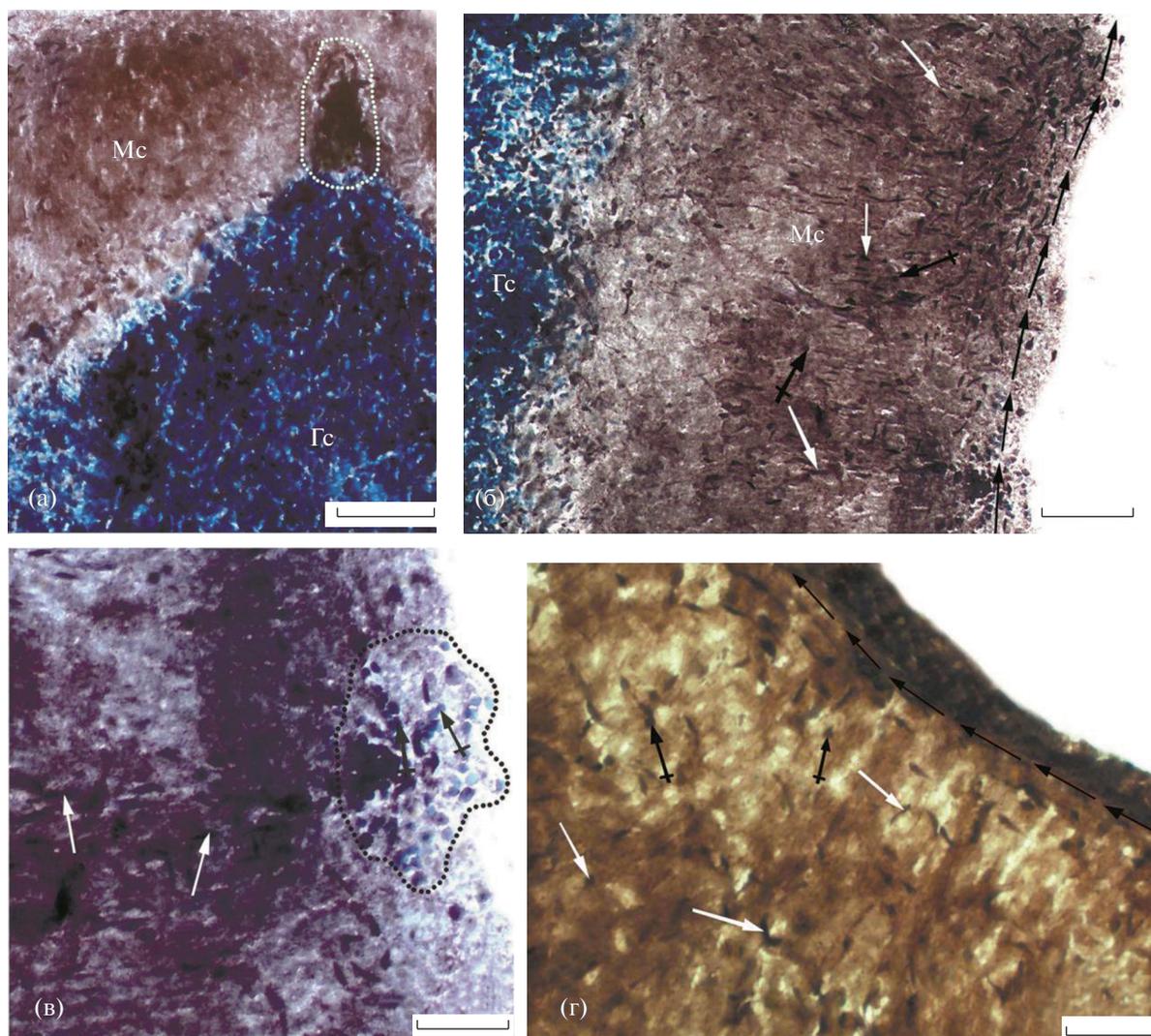


Рис. 1. Микрофотографии мозжечка симы *Oncorhynchus masou* в норме (а, б) и после повреждения (в, г) клетки которого содержат пролиферативный ядерный антиген (PCNA) и имеют темно-коричневую окраску. а – общий вид дорсальной матричной зоны; б – базальная зона; в – дорсальная зона; г – нейрогенная ниша. Белым пунктиром обведена дорсальная, матричная зона, черными стрелками отмечено направление тангенциальной миграции, белыми стрелками обозначены мигрирующие клетки, черными фигурными – пролиферирующие, черным пунктиром обведена нейрогенная ниша, серыми фигурными стрелками – иммунопозитивные клетки, содержащиеся в ней. Масштаб: а, б – 100 мкм, в, г – 50 мкм.

ток двух вышеуказанных типов после травмы появлялись другие мигрирующие клетки: 3-го типа с размерами от 3.1 ± 0.9 до 19.8 ± 0.4 мкм и 4-го типа с размерами от 3.2 ± 0.1 до 22.3 ± 0.5 мкм. В латеральной и базальной зонах после травмы процессы пролиферации заметно снижаются, а миграции – усиливаются (рис. 2). Мы связываем это с тем, что через день после повреждения вновь образованные клетки начинают мигрировать радиально и тангенциально в большем количестве, и этот процесс может усиливаться в последующие сутки (рис. 1г). На территории латеральной зоны были обнаружены плотные кластеры интенсивно маркированных PCNA клеток, отделенные друг

от друга иммунонегативными зонами. Такие скопления мы идентифицировали, как нейрогенные ниши (рис. 1в).

Выявления глиального фибриллярного кислого протеина в мозжечке

В мозжечке молоди симы в норме был обнаружен значительный уровень GFAP-позитивности, выявляемый в волокнах трактовых систем мозжечка: в составе мозжечковых ножек, расположенных в базальной части тела мозжечка, в волокнах радиальной глии, а также в гетерогенной популяции округлых интенсивно и удлинённых

Таблица 1. Морфометрические характеристики PCNA+ ($M \pm m$) дорсальной, базальной, латеральной зон мозжечка молодежи симы *Oncorhynchus masou* в контроле и после повреждения. Размеры PCNA+ клеток приведены как средние значения их большого и малого диаметров, указанные через косую черту

Зона	Клеточный тип			
	первый	второй	третий	четвертый
Дорсальная				
контроль	5.9 ± 0.1/3.6 ± 0.2	11.3 ± 0.1/3.7 ± 0.3	19.8 ± 0.4/3.1 ± 0.9	22.3 ± 0.5/3.2 ± 0.1
повреждение	5.9 ± 0.1/3.6 ± 0.2	11.3 ± 0.1/3.6 ± 0.3	19.2 ± 0.4/3.1 ± 0.5	—
Латеральная				
контроль	5.7 ± 0.1/4 ± 0.1	10.7 ± 0.1/4.8 ± 0.3	—	—
повреждение	3.9 ± 0.2/5.5 ± 0.2	9.7 ± 0.12/3.4 ± 0.3	19.1 ± 0.9/3.4 ± 0.5	21.2 ± 0.5/3.6 ± 0.1
Базальная				
контроль	5.7 ± 0.4/2.6 ± 0.3	10.2 ± 0.2/4.1 ± 0.1	—	—
повреждение	5.9 ± 0.1/3.5 ± 0.1	9.8 ± 0.2/4.1 ± 0.1	17.8 ± 0.9/3.1 ± 0.5	22.5 ± 0.3/6.1 ± 0.3

умеренно маркированных клеток (рис. 3а). GFAP+ волокна были представлены в составе экстрацеллюлярных восходящих афферентных систем (Candal et al., 2005).

В базальной зоне нами было обнаружено большое количество GFAP+ клеток двух типов: мелкие, размером $5.99 \pm 0.11/2.76 \pm 0.12$ мкм, и более крупные: $9.07 \pm 0.26/2.76 \pm 0.34$ мкм. Количество интенсивно иммуномаркированных GFAP+ клеток на срез составляло не более 15. Они имели округлую либо удлинённую форму, были лишены отростков, располагались одиночно или формировали мелкие кластеры (до 4 клеток). В гранулярном слое базальной зоны плотность распределения разнонаправленных, тонких, лишенных микроцитоскульптуры GFAP+ волокон была умеренной. На тест-поле площадью 28000 мкм^2 в среднем приходилось 14 GFAP+ клеток и 24 GFAP+ волокна. На территории белого вещества базальной зоны (ножек мозжечка) в среднем отмечалось 30 GFAP+ клеток и 48 GFAP+ волокон на соответствующем тест-поле площадью 28000 мкм^2 (рис. 3б). В данной области волокна являются преобладающими GFAP+ элементами, количество которых достоверно отличается ($P < 0.05$).

Были проведены сравнительные исследования соотношения GFAP+ клеток и волокон в дорсальной и базальной зонах. Через один день после нанесения повреждающего воздействия наблюдались изменения клеточного состава и волокон по сравнению с интактным состоянием. После нанесения травмы в дорсальной и базальной зонах количество GFAP+ клеток и волокон увеличивалось (рис. 4). Мы полагаем, что увеличение количества GFAP+ клеток связано с появлением в результате травмы активированных астроцитов.

Средняя длина волокон в контроле на профильное поле составляла 82 ± 7 мкм, в поврежде-

нии 130 ± 13 мкм (рис. 3в). Это свидетельствует об увеличении плотности распределения GFAP+ волокон в мозжечке симы в результате травмы. В дорсальной зоне мозжечка была идентифицирована и охарактеризована ДМЗ, центральная часть которой была GFAP-. GFAP+ волокна в ДМЗ формируют разнонаправленные, малоразветвленные, радиально ориентированные пучки тонких волокон (рис. 3в). Они являются отростками клеток радиальной глии, расположенных у поверхности молекулярного слоя, по которым пролиферирующие клетки мигрируют во внутренний слой (рис. 3в).

После травмы у поверхности дорсальной и базальной зон и в глубине молекулярного слоя в латеральной зоне были выявлены мелкие локальные плотные скопления GFAP- клеток, морфологические параметры которых соответствуют таковым клеток 1-го типа, маркированных PCNA (рис. 3г–3е). Такие клеточные конгломераты мы рассматриваем, как нейрогенные ниши, возникающие в мозжечке симы в ответ на повреждающее воздействие. В дорсальной, базальной и латеральной зонах встречались ниши со средней площадью 3192 ± 427 , 6650 ± 721 и $1393 \pm 653 \text{ мкм}^2$ соответственно. Во всех вышеуказанных зонах параметры пролиферирующих PCNA+ клеток совпадают по исходным морфологическим параметрам GFAP- клеток (табл. 2).

В дорсальной и базальной зонах к нейрогенным нишам прилегали GFAP+ радиальные волокна (рис. 3г, 3д). Гетерогенный характер иммуномаркирования волокон, идентифицированных в этих зонах, очевидно, свидетельствует о различной пространственной локализации волокон в объеме среза. Возле нейрогенных ниш латеральной зоны GFAP+ волокон не было обнаружено (рис. 3г). На некотором удалении от максимального скопления GFAP- клеток обнаружены типичные клетки радиальной глии, имеющие край-

ОБСУЖДЕНИЕ

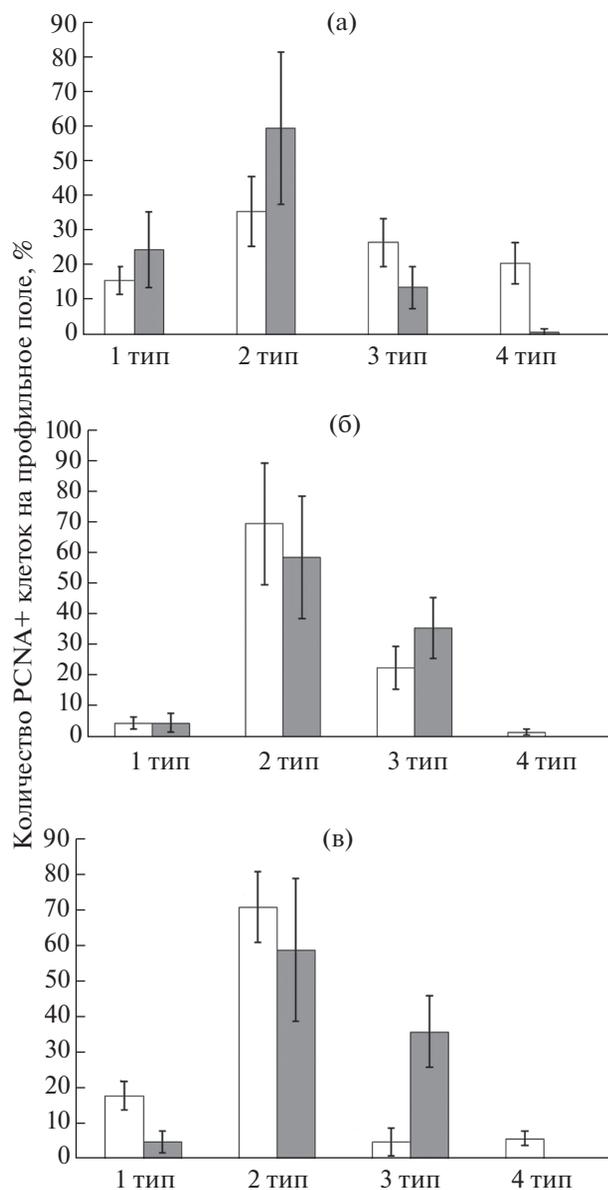


Рис. 2. Распределение клеток четырех типов в мозжечке молоди симы *Oncorhynchus masou* в норме и после повреждения. а – дорсальная зона; б – латеральная зона; в – базальная зона. Белым цветом отмечен контроль, серым – повреждение. Вертикальными отрезками обозначен доверительный интервал при вероятности 0.95.

не высокую интенсивность иммуномаркирования GFAP. Размеры таких клеток составляли 9 мкм в дорсальной, 6–8 мкм в латеральной и 7 мкм в базальной зонах. В составе ниш наблюдалось 2 типа GFAP– клеток: округлые с размером тела от 4 до 6 мкм и округлые от 6 до 10 мкм (табл. 2). Клетки второго типа, по всей видимости, представляют собой более поздние и дифференцированные стадии развития клеток первого типа.

После нанесения травматического повреждения процессы пролиферации и миграции изменяют свою активность в различных зонах. Так результаты GFAP– и PCNA– иммуномаркирования свидетельствуют, что в наибольшей степени пролиферативная активность характерна для дорсальной матричной области (ДМЗ) мозжечка, что соответствует данным для других видов рыб: *D. rerio* (Zupanc, 2006) и *Apteronotus leptorhynchus* (Sîrbulescu et al., 2014). В результате повреждающего воздействия в ДМЗ нами было зарегистрировано появление GFAP+ волокон радиальной глии, формирующих разнонаправленно ориентированные пучки. Подобные структурные образования не были выявлены у интактных животных. Мы полагаем, что после травмы в ДМЗ осуществляется структурная перестройка, связанная с появлением дополнительных маркированных волокон в области травмы, что приводит к двукратному увеличению плотности распределения GFAP+ волокон в данной области. Данные эффекты мы связываем как с интенсификацией пространственной переориентации волокон радиальной глии, так и с формированием специфических направляющих для клеток, образованных в этой зоне. Результаты наших наблюдений позволяют предполагать, что выявленные структурные изменения имеют непосредственное отношение к процессам репаративного нейрогенеза. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют, что после повреждения основной объем пролиферации клеток приходится на ДМЗ мозжечка.

Отличительной особенностью взрослого нейрогенеза костистых рыб является способность к формированию большого числа новых клеток. Исследования на пресноводных рыбах *D. rerio* и *A. leptorhynchus* показали, что скорость пролиферации у данных видов на 1–2 порядка выше, чем у млекопитающих (Zupanc, Zupanc, 2006). У костистых рыб в ответ на повреждение мозга наблюдается массовое повышение интенсивности клеточной пролиферации. Полное восстановление нервной ткани осуществляется за счет заселения новыми нейронами области травмы. У млекопитающих долговременное выживание новорожденных клеток, как правило, ослаблено, и их мозг ограничен в своей способности к восстановлению (Zupanc, Sîrbulescu, 2011).

В мозгу мыши после нанесения механической травмы выявлена пролиферация покоящихся клеток–предшественников в корковой паренхиме (Ahmed et al., 2012). Установлено увеличение количества эндогенных стволовых клеток, формирующих нейросферы при культивировании *in vitro*. Вторичные сферы при дифференцировке дают три типа нейральных стволовых клеток, что ука-

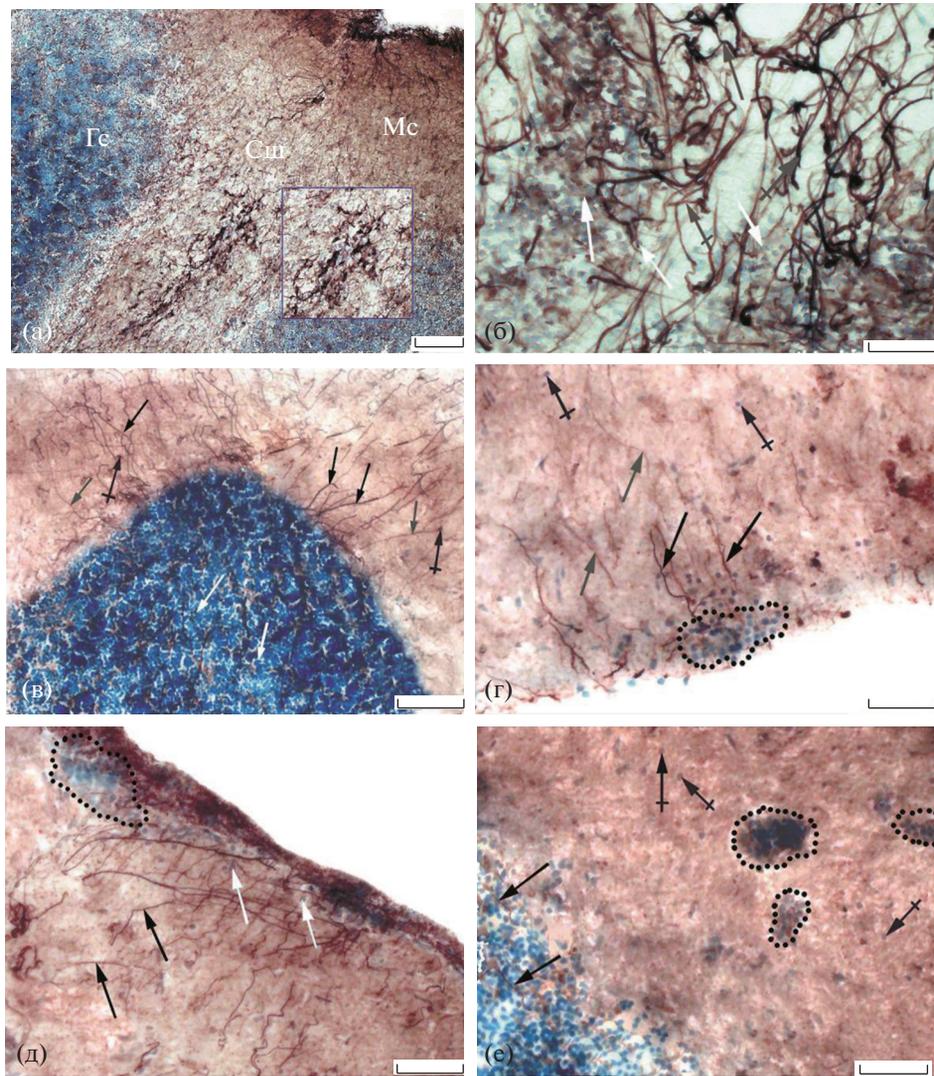


Рис. 3. Микрофотографии мозжечка симы в норме (а, б) и после повреждения (в–е), клетки которого содержат глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP). GFAP+ клетки имеют коричневую окраску, GFAP– – голубую. а – общий вид распределения GFAP в теле мозжечка; б – лиановидные волокна мозжечка; в – общий вид дорсальной матричной зоны; г – нейрогенная ниша в латеральной области; д – нейрогенная ниша в базальной области; е – нейрогенные зоны в дорсальной области. Мс – молекулярный слой, Гс – гранулярный слой, Сш – срединный шов. Серыми фигурными стрелками обозначены толстые волокна, серыми – тонкие, неразветвленные, черными стрелками – радиальная глия, черным пунктиром обведены нейрогенные ниши, черными фигурными стрелками отмечены клетки второго типа, белыми – иммунонегативные клетки. Масштаб: а – 100 мкм, б–е – 50 мкм.

зывает на их мультипотентность как в коре, так и гиппокампе (Ahmed et al., 2012).

С помощью морфологических методов, позволяющих оценивать число клеток в матричных зонах мозга, получены данные о том, что у молодых симы наблюдается высокий исходный уровень пролиферации как в первичной матричной зоне мозга (перивентрикулярной зоне), так и в пролиферативных зонах, выявленных у взрослых животных (Stukaneva et al., 2015).

Первые десять дней в месте нанесения травмы мозга у костистых рыб скорость клеточной пролиферации увеличивается в несколько раз по

сравнению с другими участками тела мозжечка. Эксперименты с маркированием бромдезоксипридино (BrdU) показали, что клетки, образованные за 2 дня до нанесения травмы, принимают участие в процессе регенерации (Zupanc, Ott, 1999). Это наблюдение предполагает наличие связи между непрерывной клеточной пролиферацией в интактном мозге и восстановлением поврежденной области мозга после травмы. Ретроградное трассирование в сочетании с BrdU маркированием S-фазы митоза показало, что новые гранулярные нейроны проецируются в молекулярный слой мозжечка (Zupanc, Ott, 1999). Этот факт позволяет

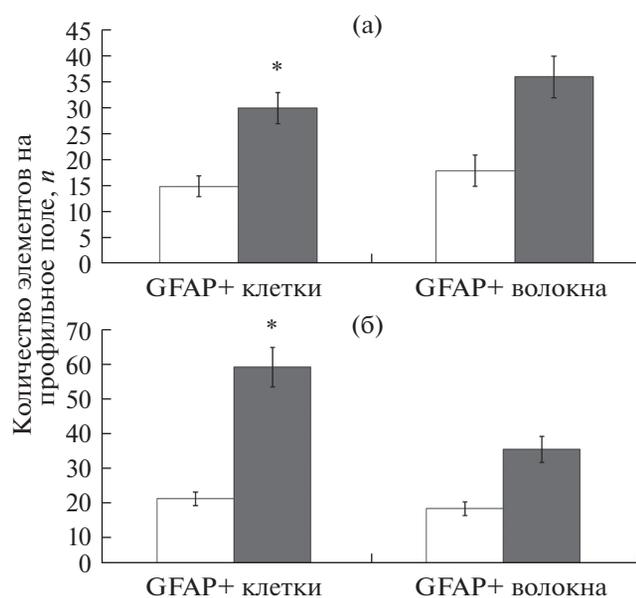


Рис. 4. Соотношение GFAP+ клеток и волокон в мозжечке молоди симы *Oncorhynchus masou*. Белым цветом отмечен контроль, серым – повреждение. Вертикальными отрезками обозначен доверительный интервал при вероятности 0.95. * $P < 0.05$ – достоверные отличия от контрольных групп; а – дорсальная зона; б – базальная зона.

предполагать, что эти нейроны интегрируются в уже существующую нейронную сеть мозжечка.

В наших исследованиях после травмы были верифицированы зоны с нейрогенной активностью – нейрогенные ниши, расположенные в составе молекулярного слоя дорсальной, латеральной и базальной областей мозжечка симы. Их возникновение мы связываем с интенсификацией генетических пролиферативных программ в нейральных стволовых клетках и образованием локальных нейрогенных ниш в ответ на повреждение. При нанесении повреждающего воздействия в нейрогенных зонах начинается ак-

Таблица 2. Морфометрические параметры GFAP-клеток в нейрогенных нишах ($M \pm m$) дорсальной, латеральной и базальной зон мозжечка симы *Oncorhynchus masou* после механической травмы. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартное отклонение. Размеры GFAP-элементов приведены как средние значения их большого и малого диаметров, указанные через косую черту

Зона	Клеточный тип	
	первый	второй
Дорсальная	$5.9 \pm 0.1/2.6 \pm 0.1$	$8 \pm 0.3/4.5 \pm 0.3$
Латеральная	$5.9 \pm 0.2/3.2 \pm 0.3$	$6.3 \pm 0.2/4.6 \pm 0.2$
Базальная	$5.9 \pm 0.0/2.7 \pm 0.1$	$8.3 \pm 0.2/4.6 \pm 0.1$

тивная пролиферация и дифференцировка новых клеток, которые мигрируют к месту нанесения травмы, восстанавливая поврежденную ткань.

Согласно данным Зупанка при повреждении мозга *A. leptorhynchus* в базальной зоне мозжечка начинаются интенсивные процессы нейрогенеза (Zupanc, 2011). Таким образом, данная область может служить источником клеток для репаративного нейрогенеза. В базальной зоне мозжечка в области гранулярных возвышений молоди симы напротив интенсивность пролиферации достаточно высока в контроле и значительно снижается после повреждающего воздействия. Возможно, снижение процессов пролиферации в данной области мозжечка сменяется процессами миграции клеток. В головном мозге взрослых млекопитающих клетки радиальной глии сохраняются в ограниченных нейрогенных областях, таких как субгранулярная зона зубчатой извилины гиппокампа (Morgens et al., 2012; Dimou, Goetz, 2014). Если у мышей GFAP-маркированная глия исчезает с началом миелинизации (Nakahara et al., 2003), то у рыб GFAP-маркированные волокна радиальной глии идентифицируются в различных отделах головного мозга, включая мозжечок, на протяжении всей их жизни (Zupanc, Horschke, 1995).

Мы полагаем, что существование GFAP+ радиальной глии в интакном мозге молоди симы отражает процессы персистентного нейрогенеза. Морфология GFAP+ структур, их топография и взаимоотношения с другими структурными компонентами позволяют предполагать, что они, очевидно, являются элементами лиановидных волокон мозжечка симы. Об этом в частности свидетельствует морфология данных структур и наличие микроцитоскульптуры по ходу волокон и их терминалей.

В мозге млекопитающих GFAP является классическим маркером астроцитов с многочисленными радиально-ориентированными отростками, а также концевыми ножками, часто формируемыми на поверхности сосудов (Doetsch, Scharff, 2001). В настоящее время показано, что GFAP является одним из маркеров нейральных стволовых клеток (Ahmed et al., 2012). Однако, как правило, их фенотип более сложен, и помимо GFAP, содержит виментин, нестин, S-100, Sox2 (Adolf et al., 2006; Sîrbulescu et al., 2014). В исследованиях нескольких областей взрослого мозга костистых рыб были идентифицированы клетки-предшественники, обладающие характеристиками радиальной глии (Charouton et al., 2007; Rothenaigner et al., 2011). При этом они были способны как к самообновлению, так и к созданию клеток различных типов, демонстрируя тем самым характеристики настоящих стволовых клеток (Rothenaigner et al., 2011). Возможно, что, по крайней мере, некоторые из радиальных глиальных клеток в

головном мозге взрослой рыбы *A. leptorhynchus* выступают в качестве таких предшественников. Поскольку GFAP+ астроциты могут участвовать в восстановлении утраченных в результате травмы клеток в субвентрикулярной зоне (Doetsch et al., 1999), очевидно, что эти клетки, обладают способностью к самообновлению. Согласно данным Ахмеда с соавторами, кортикальные астроциты в мозгу мыши перестают делиться на 10-й день постнатального развития, а экспрессия GFAP после травмы становится более выраженной по сравнению с процессами пролиферации (Ahmed et al., 2012).

GFAP+ клетки радиальной глии симы, расположенные в поверхностном слое молекулярного слоя имеют небольшие размеры сомы и длинные неразветвленные отростки. Таким образом, GFAP+ клетки и волокна радиальной глии являются как структурными, так и морфогенетическими компонентами в составе мозжечка молоди симы. Наши данные подтверждают результаты, полученные на *Austrolebias affinis*, *A. charrua* и *A. reicherti* (Fernandez et al., 2011) и *A. leptorhynchus* (Clint, Zupanc, 2001) о наличии GFAP+ радиальной глии в мозжечке костистых рыб. Идентифицированные немногочисленные GFAP+ клетки мы склонны относить к нейральным стволовым клеткам. Такое предположение основано на сочетании морфологических и топографических свойств нейральных стволовых клеток, их взаимосвязи с нейрогенными зонами, а также взаимоотношении с волокнами радиальной глии.

В зонах вторичного нейрогенеза мозжечка симы были идентифицированы GFAP+ волокна и клетки радиальной глии. Данные, полученные на разных видах костистых рыб свидетельствуют, что радиальная глия является преобладающим типом GFAP-иммуномаркированных элементов, сохраняющихся в мозге взрослых рыб. Вдоль этих волокон, число которых увеличивается после травмы, осуществляется миграция клеток (Clint, Zupanc, 2001).

Возникновение нейрогенных ниш на территории дорсальной, латеральной и базальной зон молекулярного слоя мозжечка является следующим этапом репаративного нейрогенеза. Нейрогенные ниши возникают *de novo* после травматического воздействия и содержат PCNA+ клетки, а также гетерогенную популяцию, не содержащую маркер пролиферации. Иммуномаркирование GFAP показало, что в районе нейрогенных ниш выявляются волокна радиальной глии, а также единично расположенные мелкие, интенсивно и умеренно маркированные клетки, фенотипически соответствующие нейральным стволовым клеткам, описанным в мозжечке других костистых рыб (Hinsch, Zupanc, 2006; Kaslin et al., 2013; Sîrbulescu et al., 2014).

Данные Ахмеда и его коллег показали, что после нанесения механической травмы в мозгу мыши активируются эндогенные GFAP+ клетки-предшественники. Примерно 50% клеток, формирующих нейросферы в гиппокампе и 75% – в коре, происходят от GFAP-экспрессирующих клеток. Согласно данным Сирбулеску и ее коллег GFAP в мозжечке *A. leptorhynchus* маркирует нейральные стволовые клетки/клетки предшественники (Sîrbulescu et al., 2014). Это согласуется с гипотезой, что подобные клетки являются предполагаемым источником нейросфер после нанесения травмы (Ahmed et al., 2012). Однако не все нейросферы происходят из GFAP+ клеток: меньшая их доля является потомками GFAP-клеток.

Проведенные исследования позволяют заключить, что после нанесения травмы мозжечка молоди симы к процессам персистентного нейрогенеза добавляются процессы репаративного: начинаются активная пролиферация и дифференцировка новых клеток, которые мигрируют к месту повреждения, восстанавливая ткань. Главными источниками новых нейронов являются нейрогенные ниши, которые формируются в ходе восстановления нервной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований ДВО РАН “Дальний Восток” (проект № 15-I-6-010) и гранта Президента РФ (МД 4318.2015.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. Л.: Медицина, 1969. 423 с.
- Adolf B., Chapouton P., Lam C.S. et al. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in zebrafish telencephalon // J. Dev. Biol. 2006. V. 295. P. 278–293.
- Ahmed A., Shtaya A., Zaben M. et al. Endogenous GFAP-positive neural stem/progenitor cells in the postnatal mouse cortex are activated following traumatic brain injury // J. Neurotrauma. 2012. V. 29. P. 828–842.
- Candal E., Anadon R., Bourrat F. Cell proliferation in the developing and adult hindbrain and midbrain of trout and medaka (teleosts): A segmental approach // Brain Res. Dev. Brain Res. 2005. V. 160. P. 157–175.
- Chapouton P., Jagasia R., Bally-Cuif L. Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates // Bioessays. 2007. V. 29. P. 745–757.
- Clint S.C., Zupanc G.K. Neuronal regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus*: guidance of migrating young cells by radial glia // Brain Res. Dev. Brain Res. 2001. V. 130. P. 15–23.
- Curtis M.A., Kam M., Nannmark U. et al. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension // Science. 2007. V. 315. P. 1243–1249.
- Dimou L., Goetz M. Glial cells as progenitors and stem cells: new roles in the healthy and diseased brain // Physiol. Rev. 2014. V. 94. P. 709–737.

- Diotel N., Vaillant C., Gabbero C. et al.* Effects of estradiol in adult neurogenesis and brain repair in zebrafish // *Horm. Behav.* 2013. V. 63. P. 193–207.
- Doetsch F., Caillé I., Lim D.A.* Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain // *Cell.* 1999. V. 97. P. 703–716.
- Doetsch F., Scharff C.* Challenges for brain repair: insight from adult neurogenesis in birds and mammals // *Brain Behav. Evol.* 2001. V. 58. P. 306–322.
- Ekström P., Johnsson C.M., Ohlin L.M.* Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones // *J. Comp. Neurol.* 2001. V. 436. P. 92–110.
- Fernandez A.S., Rocillo J.C., Casanova G. et al.* Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): a comparative study // *Neuroscience.* 2011. V. 189. P. 12–24.
- Hinsch K., Zupanc G.K.* Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem cells from adult fish brain // *J. Neurosci. Methods.* 2006. V. 158. P. 75–88.
- Kaslin J., Kroehne V., Benato F. et al.* Development and specification of cerebellar stem and progenitor cells in zebrafish: from embryo to adult // *Neural. Dev.* 2013. 8: 9. doi 10.1186/1749-8104-8-9
- Kempermann G.* The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? // *Trends Neurosci.* 2008. V. 31. P. 163–169.
- 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. et al.* Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors // *Development.* 2011. V. 138. P. 4831–4841.
- Levine E.M., Hitchcock P.F., Glasgow E. et al.* Restricted expression of a new paired-class homeobox gene in normal and regenerating adult goldfish retina // *J. Comp. Neurol.* 1994. V. 348. P. 596–606.
- Margotta V., Antonio M., Enrico G.* PCNA-positive cerebellar cells in an adult Teleost, *Carassius carassius* // *J. Neurobiologia.* 2004. V. 15. P. 43–55.
- März M., Schmidt R., S. Rastegar U. et al.* Regenerative response following stab injury in the adult zebrafish telencephalon // *Dev. Dyn.* 2011. V. 240. P. 2221–2231.
- Morrens J., Van Den Broeck W., Kempermann G.* Glial cells in adult neurogenesis // *Glia.* 2012. V. 60. P. 159–174.
- Nakahara J., Takemura M., Gomi H. et al.* Role of radial fibers in controlling the onset of myelination // *J. Neurosci. Res.* 2003. V. 72. P. 279–289.
- Noctor S.C., Flint A.C., Weissman T.A. et al.* Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. P. 3161–3173.
- Onteniente B., Kimura H., Maeda T.* Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry // *J. Comp. Neurol.* 1983. V. 215. P. 427–436.
- Pellegrini E., Mouriec K., Anglade I. et al.* Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish // *J. Comp. Neurol.* 2007. V. 501. P. 150–167.
- Pouwels E.* On the development of the cerebellum of the trout, *Salmo gairdneri*. I. Patterns of cell migration // *Anat. Embryol.* 1978. V. 152. P. 291–308.
- Rothenaigier I., Krecsmarik M., Hayes J.A. et al.* Clonal analysis by distinct viral vectors identifies bona fide neural stem cells in the adult zebrafish telencephalon and characterizes their division properties and fate // *Development.* 2011. V. 138. P. 1459–1469.
- Seri B., Garcia-Verdugo M., Collado-Morente L. et al.* Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus // *J. Comp. Neurol.* 2004. V. 478. P. 359–378.
- Sîrbulescu R.F., Ilieş I., Vitalo A.G. et al.* Adult stem cells in the knife-fish cerebellum // *Dev. Neurobiol.* 2014. V. 75. P. 39–65.
- Skaggs K., Goldman D., Parent J.M.* Excitotoxic brain injury in adult zebrafish stimulates neurogenesis and long-distance neuronal integration // *Glia.* 2014. V. 62. P. 2061–2079.
- Stukaneva M.E., Pushchina E.V., Varaksin A.A. et al.* Monitoring of cell migration and apoptosis in cerebellum of juvenile masu salmon *Oncorhynchus masou* after injury // *Amer. J. BioSci.* 2015. V. 3. P. 19–27.
- Takeda A., Nakano M., Goris R.C. et al.* Adult neurogenesis with 5-HT expression in lesioned goldfish spinal cord // *Neuroscience.* 2008. V. 151. P. 1132–1141.
- Zupanc G.K.* Adult neurogenesis in teleost fish // *Neurogenesis in the Adult Brain* / Eds Seki T., Sawamoto K., Parent J.M. et al. Tokyo: Springer. V. 1. 2011. P. 137–168.
- Zupanc G.K.* Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain // *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 2006. V. 192. P. 649–670.
- Zupanc G.K., Clint S.C., Takimoto N. et al.* Spatio-temporal distribution of microglia/macrophages during regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus*: a quantitative analysis // *Brain Behav. Evol.* 2003. V. 62. P. 31–42.
- 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., Ott R.* Cell proliferation after lesions in the cerebellum of adult teleost fish: time course, origin, and type of new cells produced // *J. Exp. Neurol.* 1999. V. 160. P. 78–87.
- 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 // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013. V. 367. P. 193–233.
- Zupanc G.K., Zupanc M.M.* New neurons for the injured brain: mechanisms of neuronal regeneration in adult teleost fish // *Regen. Med.* 2006. V. 1. P. 207–16.

GFAP and PCNA Marking in the Cerebellum of Cherry Salmon's (*Oncorhynchus masou*) Young in the Event of Mechanical Injury

M. E. Stukaneva*, E. V. Puschina, and A. A. Varaksin

Institute of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia

**e-mail: stykanyova@mail.ru*

Received April 21, 2017

The objective of this work was to study proliferation processes and the role of glia and neural stem cells in the event of injurious action on cerebellum of cherry salmon's (*Oncorhynchus masou*) young. Using the immunoperoxidase staining of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and nuclear antigen of proliferous cells (PCNA), processes of proliferation and gliogenesis after mechanical trauma of cerebellum of cherry salmon's (*Oncorhynchus masou*) young were studied. After the trauma, the intensity of proliferation and migration processes varies in different zones. Proliferation processes decrease after the trauma in lateral and basal zones, and migration increases. In the dorsal zone, on the contrary, migration processes significantly decrease and proliferation increases. In the dorsal matrix zone of a cerebellum, intense cell proliferation was detected. In the dorsal, lateral, and basal zone of the molecular layer of cerebellum after traumatic damage, neurogenic niches containing PCNA and cells, as well as a heterogeneous population of PCNA-cells, were identified. At the location of neurogenic niches, fibers of radial glia and small single intensely or moderately labeled GFAP-cells were discovered. As a result of damaging action, GFAP+ fibers of radial glia, which form differently directed radially oriented bundles, appeared in the dorsal matrix zone. Such structural formations have not been discovered in intact animals. We suppose that, after the trauma, structural reconstruction connected with partial spatial reorientation of the radial glia fibers and formation of specific directions for cells formed in this zone occurs in the dorsal matrix zone. As a result of the trauma, in cherry salmon's cerebellum, elements of the radial glia, including both cells possessing typical morphology and cell fragments presented as long radially oriented appendices or cell body containing initial fragments of radial appendices, appeared.

Keywords: radial glia, migration, cerebellum, trauma, Osteichthyes (bony fish), postnatal neurogenesis, proliferation