УДК 591

МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ РАХ2 И РАХ6 В ЗРИТЕЛЬНОМ НЕРВЕ И МОЗГЕ ПОСЛЕ МЕХАНИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИИ ГЛАЗА ФОРЕЛИ Oncorhynchus mykiss

© 2018 г. Е. В. Пущина^{*a*, *b*, *, А. А. Вараксин^{*a*}, Д. К. Обухов^{*c*}}

^аНациональный научный центр морской биологии ДВО РАН, Россия, 690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17 ^bИнститут физиологии им. А.А. Богомольца, Украина, 01024, Киев, ул. Богомольца 4 ^cCaнкт-Петербургский государственный университет, Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

**E-mail: puschina@mail.ru* Поступила в редакцию 09.11.2017 г. Окончательный вариант получен 02.05.2018 г.

После механической травмы глаза изучено распределение транскрипционного фактора Pax2+ в оптическом нерве форели *Oncorhynchus mykiss* на стороне повреждения и контралатеральном нерве. Установлено, что травма оптического нерва форели приводит к увеличению количества Pax2+ реактивных астроцитов, особенно в области головки и проксимальной части зрительного нерва, участвующих в начальных стадиях регенерации аксонов оптического нерва. При повреждении зрительного нерва в отделах мозга форели, имеющих направленные ретинальные входы – диенцефалоне и зрительном тектуме, выявлено значительное увеличение гетерогенной популяции Pax6+ клеток. Часть Pax6+ клеток имеет недифференцированный фенотип и входит в состав реактивных нейрогенных ниш, расположенных в перивентрикулярной зоне и паренхиматозных областях мозга. Другая популяция Pax6+ клеток имеет фенотип радиальной глии и возникает в результате активации конститутивных нейрогенных доменов, а также в составе вновь образованных реактивных нейрогенных ниш. Таким образом, в результате повреждения зрительного нерва в отделах мозга, имеющих направленные ретинальные проекции и отделах мозга не имеющих ретинальных проекций, а также удаленных областях, возникает выраженный нейрогенный ответ, связанный с появлением реактивных нейрогенных ниш и радиальной глии. Полученные результаты свидетельствуют, что повреждение зрительного нерва ведет к усилению реактивного нейрогенеза в мозге взрослой форели.

Ключевые слова: транскрипционный фактор Pax2, Pax6, зрительный нерв, репаративный нейрогенез, радиальная глия, конститутивная и реактивная нейрогенная ниша **DOI:** 10.1134/S047514501805004X

введение

В последнее время появляется все больше данных, что процессами пролиферации и дифференцировки клеток, а также их гибели в ЦНС позвоночных управляют семейство регуляторных генов РАХ. Эти гены регулируют пролиферацию, миграцию, дифференцировку клеток и апоптоз (Thomson, Ziman, 2011). Доказательства, полученные на различных моделях, подтверждают филогенетическую консервативность функций генов этого семейства у животных (Soukkarieh, 2007; Thomson, Ziman, 2011). В процессе развития ЦНС гены семейства Рахб участвуют в клеточной и региональной специфичности, пролиферации, поддержании свойств прогениторных клеток и нейрональной дифференцировки, а также антиапоптозной функции (Thomson, Ziman, 2011). Имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют о критической роли Рах генов в пре- и постнатальном развитии ЦНС. Как полагают, именно Рах гены обеспечивают возможные молекулярные механизмы, с помощью которых они регулируют пролиферацию и дифференцировку нейрональных клеток (Horie, Sango, 2003; Soukkarieh, 2007). Наряду с участием Рах генов в эмбриогенезе, в исследованиях показан высокий уровень экспрес-

Сокращения: Pax2- – Pax2-иммунонегативный; Pax2+ – Рах2-иммунопозитивный; Рах6- – Рах6-иммунонегативный; Рах6+ – Рах6-иммунопозитивный; Вв – вентральная зона вентральной области конечного мозга; Вд – дорсальная зона вентральной области конечного мозга; Вл – латеральная зона вентральной области конечного мозга; Вт - вентральный таламус; ГОН – головка оптического нерва; Дд – дорсальная зона дорсальной области конечного мозга; Дл латеральная зона дорсальной области конечного мозга; Дт дорсальный таламус; Дц – центральная зона дорсальной области конечного мозга; ЗТО – задне-туберальная область; ИГХ – иммуногистохимия; ИОС – интраорбитальный сегмент; МК - мозжечковый крест; МС - маргинальный слой; НСК – нейральная стволовая клетка; ОН – оптический нерв; ОП – оптическая плотность; ОТ – оптический тектум; ПВЗ – перивентрикулярная зона; ПВС – перивентрикулярный слой; ПЗ – пролиферативная зона; ПОк – крупноклеточное ядро преоптической области; ПОм - мелкоклеточное ядро преоптической области; РГ – радиальная глия, РСК – ретикулоспинальные клетки; РФ – ретикулярная формация; ЦБС – центральный белый слой; ЦСБС центральный серый и белый слой; ЦСС – центральный серый слой; ЯОЛ – октаво-латеральные эфферентные нейроны.

сии Рахб для поддержания фенотипов клетокпредшественников у взрослых животных, а также для сохранения пластичности зрелых нейронов в ответ на различные экологические раздражители (Gerber et al., 2002). Известно, что отсутствие экспрессии Рахб в постнатальном развитии астроцитов уменьшает их нейрогенный потенциал (Heins et al., 2002).

Исследование экспрессии субъединиц транскрипционного фактора Рахб (Рахба и Рахбb соответственно) в мозге развивающихся эмбрионов данио D. rerio показало, что обе субъединицы экспрессируются в сетчатке, а также в развивающемся теленцефалоне, диенцефалоне и стволе мозга (Kleinjan et al., 2008). Наиболее интересным и показательным считается факт обнаружения экспрессии данных генов на территории переднемозговых нейромеров, а также границе среднемозгового тегментума и продолговатого мозга данио (Wullimann, Muller, 2004). Наличие интенсивной экспрессии Рахб в данных областях мозга данио и других позвоночных в период раннего эмбриогенеза показано в нескольких работах (Stoykova, Gruss, 1994; Wullimann, Muller, 2004), однако локализация данного транскрипционного фактора в более поздние периоды онтогенеза к настояшему времени изучена недостаточно. Особое внимание к исследованию локализации Рахб в мозге позвоночных стало развиваться после установления участия данного фактора в процессах репаративного нейрогенеза позвоночных животных и человека (Thomson, Ziman, 2011). Наличие белкового продукта Рах6 в перивентрикулярных областях мозга молоди симы связано с участием данного фактора в процессах конститутивного нейрогенеза, хорошо выраженного у молоди лососевых рыб (Пущина и др., 2012). Показано, что Рахб широко экспрессируется в мозге тихоокеанской симы в различные периоды постэмбрионального развития, однако паттерны иммунолокализации маркируемых клеток при раннем развитии (годовалая молодь) и в более поздние периоды (двухгодовалая молодь и старше) значительно отличаются (Пущина и др., 2012). Установлено, что на границах переднемозговых нейромеров маркирование Рахб позволяет выявлять структуру этих нейромеров, поскольку селективно маркирует различные типы клеток, расположенных на территории перивентрикулярных пролиферативных зон, а также мигрирующие и клетки, находящиеся в начальной стадии нейрональной дифференцировки, локализованные в более глубоких субвентрикулярных слоях.

Транскрипционный фактор Pax2 принимает участие в развитии зрительной системы позвоночных животных (Thomson, Ziman, 2011). У взрослых животных экспрессия Pax2 сохраняется в субпопуляции Мюллеровых клеток и астроцитов сетчатки и головки зрительного нерва (Parrilla

ОНТОГЕНЕЗ том 49 № 5 2018

et al., 2009). Установлено, что во время развития зрительной системы, головка зрительного нерва играет важную роль в пространственной организации, выходящих из сетчатки аксонов зрительного нерва (Oster et al., 2004). Особую роль в развитии этого процесса играют нейроэпителиальные клетки, экспрессирующие транскрипционный фактор Pax2, регулирующий рост аксонов в составе зрительного нерва (Parrilla et al., 2013). Повреждение зрительного нерва используется часто в качестве удобной экспериментальной модели для исследования процессов регенерации ЦНС рыб, подобные исследования в частности были проведены на золотой рыбке Carassius auratus (Matsukawa et al., 2004; Parrilla et al., 2009, 2013) и данио D. rerio (Becker, Becker, 2008).

Ранее проведенные исследования на взрослой форели показали, что в результате повреждения оптического нерва (OH) форели, в различных отделах мозга активизируется пролиферация и нейрогенез в нейрогенных нишах зрительного тектума и мозжечка (Пущина и др., 2016). Пролиферативная активность была также обнаружена в клетках поврежденного зрительного нерва (Pushchina et al., 2016).

Целью настоящей работы является исследование динамики иммунолокализации белковых продуктов транскрипционных факторов Pax2 и Pax6 в зрительном нерве и различных областях головного мозга взрослой форели, (в которых ранее было установлено наличие Рахб в раннем постэмбриональном периоде развития) в условиях механической травмы глаза. В задачи настоящего исследования входило: 1) исследование распределения фенотипов Pax2+ и Pax2- клеток в различных нейроанатомических зонах зрительного нерва форели через 1 нед. после травмы, 2) изучение локализации белкового продукта транскрипционного фактора Рах6 в областях мозга форели имеющих направленные ретинальные проекции (зрительный тектум, ядра таламуса, преоптическая область), зонах мозга, лишенных прямых ретинальных входов (конечный мозг), а также пространственно удаленных от области травмы областях мозга (ядра черепно-мозговых нервов, ретикулярная формация ствола) в условиях интактности и после повреждения зрительного нерва.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе было использовано 90 особей форели Oncorhynchus mykiss, в возрасте 12–18 мес. Масса тела животного составляла 300–450 г, длина тела – 40–46 см. Животные были получены с Рязановского экспериментально-производственного рыбоводного завода в 2016 году. Для адаптации форель содержали в аквариумах с пресной водой при температуре 16–17°С, с одноразовым кормлением. Соотношение освещенного и темного периодов в сутках составляло 14/10 ч. Содержание растворенного кислорода в воде — 7—10 мг/дм³, что соответствует нормальному насыщению. Все экспериментальные манипуляции с животными были проведены в соответствии с правилами, регулируемыми уставом Национального научного центра морской биологии, Ресурсного центра ННЦМБ ДВО РАН и Этического комитета, регламентирующего гуманное обращение с экспериментальными животными. Животные были анестезированы в 0.1% растворе трикаин метансульфоната MS222 (Sigma, США) в течение 10—15 мин.

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

Механическая травма правого глаза форели была произведена в соответствии с ранее описанной методикой (Пущина и др., 2016; Pushchina et al., 2016). С помощью стерильной иглы (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) наносили механическое повреждающее воздействие в область глаза на глубину 1 см. при котором повреждали роговицу и слизистую оболочку глаза, сетчатку, хрусталик, а также головку зрительного нерва с прилежащими к нему тканями. Изменения гистологической структуры прилежащих глазодвигательных мышечных волокон, данные ИГХ маркирования PCNA в клетках зрительного нерва, а также идентификация клеток с признаками апоптоза в поврежденном зрительном нерве, свидетельствующие об изменении его структуры вследствие нанесенной механической травмы обсуждались ранее (Пущина и др., 2016). В результате травматического воздействия повреждали центральную часть сетчатки, пигментный эпителий сетчатки. головку зрительного нерва с прилежащей глазодвигательной мускулатурой (Pushchina et al., 2016). Контралатеральный зрительный нерв использовали в качестве контроля. Непосредственно после нанесения механического повреждения животных выпускали в аквариум с пресной водой для восстановления и дальнейшего мониторинга.

Иммуногистохимия. Для исследования локализации транскрипционных факторов Pax2 в зрительном нерве и Pax6 в интегративных центрах мозга и зрительных ядер таламуса форели использовали иммунопероксидазное маркирование на замороженных свободно плавающих срезах

зрительного нерва и мозга. Оценка активности транскрипционных факторов была проведена через 1 нед. после нанесения механического повреждения. Замороженные срезы зрительного нерва толщиной 50 мкм инкубировали in situ с первичными поликлональными антителами кролика против Pax2 (Clone: Polv 19010: Catalog No. 901001; Biolegend, San Diego, CA, США; 1: 300), при температуре 4°С в течение 48 ч. Для визуализации маркера использовали кроличью стрептавидин-биотиновую систему визуализации (HRP conjugated Anti-Rabbit IgG SABC Kit; Catalog No. SA1022; Boster Biological Technology, Pleasanton, СА, США). Для выявления продуктов реакции применялся субстрат красного цвета (VIP Substrate Kit, Cat. No. SK-4600; Vector Labs, Burlingame, США) в сочетании с докрашиванием метиловым зеленым (Меркулов, 1969).

Для выявления белкового продукта транскрипционного фактора Рах6, через 1 нед. после травматического воздействия использовали моноклональные антитела против транскрипционного фактора Pax6 (clone: AD 2.38; Chemicon, Billerica, МА, США; 1:400). Для визуализации ИГХ маркирования использовали стандартный АВС комплекс Vectastain Elite ABC kit (Cat. No. 6100; 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 докрашиванием метиловым зеленым (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 сут и обрабатывали, как срезы с первичными антителами. Во всех контрольных экспериментах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

Денситометрическое исследование интенсивности ИГХ маркирования Pax2 и Pax6 в клетках зрительного нерва и мозга форели было проведено с использованием программы Axiovision на базе инвертированного микроскопа Axiovert Apotome 200. На основании данных денситометрического анализа определены различные уровни активности Pax2 и Pax6 в клетках. Эти данные, наряду с морфометрическими параметрами клеток были использованы для классификации и типизации иммунопозитивных клеток, вновь образованных в период протекания репаративного ответа в пролиферативных зонах и дефинитивных центрах мозга.

Анализ содержания белковых продуктов Рах2 и Рах6 методом вестернблоттинга. Для вестернблоттинга было использовано 10 интактных особей взрослой форели и 10 особей после механической травмы глаза. Извлекали поврежденный ипсилатеральный и контралатеральный зрительный нервы у животных, отделяя волокна зрительных нервов от прилежащих тканей и помещали в 0.01 М Трис-HCl (pH 7.2) буфер. Мозг животных извлекали из черепа в 0.01 М Трис-HCl (pH 7.2) буфер и акуратно отделяли конечный мозг, промежуточный мозг, зрительный тектум и ствол мозга. Образцы зрительных нервов, конечного и промежуточного мозга, тектума и ствола и аналогичные отделы мозга форели, взятые через 1 нед. после повреждения глаза быстро охлаждали и гомогенизировали в троекратных объемах охлажденного на льду буфера в стеклянном гомогенизаторе Potter-Elvehim PTFE (Sigma, Aldrich, США). Буфер для гомогенизации содержал 20 мМ Трис-HCl буфера (pH 7.2) с добавлением 0.25 М сахарозы, 10 мМ ЭГТА, 2 мМ ЭДТА, и ингибиторы протеаз: 2 мМ PMSF, 50 мг/мл лейпептина, 25 мг/мл апротинина, 10 мг/мл пепстатина, и 2 мМ дитиотреитола. Образцы гомогенатов мозга форели центрифугировали в течение 15 мин при 15000 g в роторе Beckman Coulter Ti50. Содержание белкового продукта Pax2 определяли в зрительных нервах, а Pax6- в гомогенатах конечного, промежуточного отделов мозга, тектума и ствола головного мозга. Аликвоты гомогенатов в объеме 50 мг наносили на полосу движения белка и разделяли с помощью додецилсульфата натрия в полиакриламилном-гель-электрофорезе (SDS PAGE) на 10% полиакриламидном геле. После электрофореза выделенный белок акуратно переносили на нитроцеллюлозную мембрану и оставляли на ночь в 0.01 М Трис-HCl буфере (pH 8.0) с добавлением 0.15 M NaCl. содержащим 4% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США). Мембраны промывали в дистиллированной воде и инкубировали с первичными моноклональными антителами мыши против транскрипционного фактора Pax6 (clone: AD 2.38; Chemicon, Billerica, MA, США; в разведении 1:200) и поликлональными антителами кролика против транскрипционного фактора Pax2 (clone: Poly 19010; Catalog No. 901001; Biolegend, San Diego, СА, США; в разведении 1: 400) в 0.01 М Трис-НС1 буфере, содержащим 1% БСА и 0.2% Тween 20 в течение 3 ч при комнатной температуре. Затем мембраны промывали при встряхивании в 0.01 М Трис-HCl буфере, содержащем 0.2% Tween-20 и инкубировали с вторичными антителами лошади против антител мыши (Vector Labs, Burlingame, США) или биотинилированными антителами осла (Goat-anti-Mouse IgG Secondary antibody HRP; Cat. No. HAF007; Novus Biologicals; Littleton, CO, США) в том же буфере в течение 1 ч. После троекратных промывок в течение 10 мин каждая, мем-

ОНТОГЕНЕЗ том 49 № 5 2018

браны помещали в 0.01 М Трис-НСІ буфер (рН 7.2). Иммуногистохимическую реакцию проявляли с помощью авидин-биотиновой системы визуализации ABC (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, Burlingame, США) и стрептавидин-биотиновой системы визуализации (HRP conjugated Anti-Rabbit IgG SABC Kit; Catalog No. SA1022; Boster Biological Technology, Pleasanton, CA, США). Для выявления продуктов реакции применялся субстрат красного цвета (VIP Substrate Kit, Čat. No. SK-4600; Vector Labs, Burlingame, CIIIA). После развития окраски мембраны промывали в дистиллированной воде и высушивали. Для количественной оценки полученные блоты сканировали с помощью денситометра Bio-Rad GS 670 (США). Молекулярная масса транскрипционного фактора Рах6 сравнивалась с предварительно окрашенными маркерами молекулярной массы (Sigma, США) и соответствовала изоформе протеина с молекулярной массой 47 кДа. Молекулярная масса транскрипционного фактора Рах2 сравнивалась с предварительно окрашенными маркерами молекулярной массы (Sigma, США) и соответствовала 46 кДа.

Морфометрическая обработка. Морфометрическую обработку осуществляли с помощью програмного обеспечения инвертированного микроскопа Axiovert 200 M с модулем АроТоте 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.

Статистическая обработка. Количественная обработка морфометрических данных ИГХ маркирования Рах2 и Рах6 проведена с помощью программ Statistica 12 и Місгоsoft Ехсеl 2010. Для количественной оценки результатов использован ANOVA-тест; данные представлены в виде среднее \pm Стандартное отклонение ($M \pm m$). Значения P < 0.01, P < 0.05 и P < 0.001 считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение фактора Рах2 в зрительных нервах. Для контроля специфичности антител против Рах2 был использован вестернблоттинг. В исследованиях на данио (Krauss et al., 1991) и золотой рыбке (Parilla et al., 2009) было установлено, что изоформе протеина Рах2 соответствует молекулярная масса 46 кДа. В исследованиях на форели через 1 нед. после повреждения ОН была идентифицирована полоса протеина, соответствующая данной молекулярной массе (рис. 1а). Количественное соотношение транскрипционного фактора Рах2 в ипси- и контралатеральном нервах свидетельствуют о значительном увеличении содержа-



Рис. 1. Рах2 в зрительном нерве форели *Oncorhynchus mykiss* через 1 нед. после травмы. (а) – одиночная полоса протеина, соответствующая молекулярной массе 46 кДа в контра- и ипсилатеральном нерве форели; (б) – иммуномаркирование Рах2 в проксимальной части контралатерального нерва, Pax2+ клетки показаны красными стрелками, Pax2округлые клетки (белые стрелки), Pax2- удлиненные клетки (черные стрелки), овалом обведено скопление Pax2клеток в центральной части нерва; (в) – Pax2 в дистальной части контралатерального нерва, парные Pax2+ мелкие астробласты показаны оранжевыми стрелками, пунктиром отграничена периферическая часть нерва; (г) – Pax2-маркирование в головке зрительного нерва, содержащей участки с повышенной плотностью распределения Pax2+ клеток (оранжевые стрелки) в дорсальной части (ограничена пунктиром) и Pax2- морфологически гетерогенные клетки в вентральной части. (а) – вестернблоттинг, (б–г) – иммунопероксидазное маркирование Pax2 в сочетании с окраской метиловым зеленым по Браше. Масштабный отрезок: (б, в) – 100 мкм, (г) – 50 мкм.

ния данного протеина на стороне повреждения (рис. 1а).

Оценка количества Pax2+ клеток была проведена на стороне поврежденного нерва и на контралатеральной стороне. ИГХ маркирование Pax2 было выявлено в ядрах, а также 3 типах клеток, морфологические параметры которых приведены в табл. 1. Согласно результатам исследования, экспрессия Pax2+ была обнаружена в ядрах и морфологически гетерогенных клетках, которые были разделены нами на 3 основные группы (табл. 1). Среди иммунопозитивных клеток встречались мелкие округлые клетки, соответствующие астробластам, овальные клетки различной степени удлиненности, соответствующие астроцитам, а также узкие биполярные клетки средних и крупных размеров, соответствующие мигрирующей популяции астроцитов.

При иммуномаркировании Pax2 в контралатеральном нерве распределение Pax2— клеток было неравномерное, в центральной части нерва определялись скопления небольших удлиненных астроцитов, среди которых встречались мелкие немногочисленные Pax2+ астробласты, формирующие отдельные пары клеток (рис. 16). Крупные удлиненные палочковидные Pax2— астроциты, располагались в периферических областях нерва, где также располагались зоны повышенной плотности распределения Pax2+ астробластов и удлиненных астроцитов (рис. 16). В дистальной части зритель-

	Мелкие	Средние	Крупные	Ядра	
Типы клеток	размеры клеток, мкм	размеры клеток, мкм	размеры клеток, мкм	размеры ядер, мкм	
Рах2+ ипсилатерал.	$7.8 \pm 0.5/4.3 \pm 0.9$	$9.8 \pm 0.5/4.3 \pm 0.9$	$12.4 \pm 1.7/3.7 \pm 1.0$	$4.8 \pm 1.5/3.8 \pm 0.3$	
Рах2+ контралатерал.	$7.8 \pm 1.1/4.1 \pm 1.5$	$10.4 \pm 0.3/4.1 \pm 2.0$	—	$4.5 \pm 0.7/2.9 \pm 0.6$	
Pax2–	$7.9 \pm 0.3/4.1 \pm 0.9$	$10.4 \pm 1.3/2.8 \pm 0.6$	—	$5.5 \pm 0.76/3.4 \pm 0.3$	

Таблица 1. Морфометрические параметры Pax2+ и Pax2- клеток ($M \pm m$) зрительных нервов форели *Oncorhynchus mikiss* через 1 нед. после механической травмы

ного нерва волокна контралатерального зрительного нерва содержат редкие парные Pax2+ мелкие астробласты (рис. 1в). В области головки зрительного нерва были идентифицированы смежные участки, содержащие волокна с большим количеством Pax2+ клеток дорсальной части и Pax2- морфологически гетерогенные клетки в вентральной части (рис. 1г).

Соотношение Pax2+ и Pax2– клеток в головке оптического нерва (ГОН), интраорбитальном сегменте (ИОС), проксимальной и дистальной частях контралатерального нерва показаны на рис. 2a. На стороне повреждения соотношение Pax2+ и Pax2– астроцитов в различных областях нерва представлено на рис. 2б. Максимальное количество Pax2+ астроцитов было выявлено в ГОН и проксимальной части ипсилатерального нерва (рис. 2в), тогда как в ИОС и дистальной части поврежденного нерва плотность распределения Pax2+ клеток была ниже. Процентное соотношение содержания Pax2+ и Pax2– астроцитов в контра- и ипсилатеральных нервах было сходным (рис. 2г).

В ГОН и проксимальной части поврежденного зрительного нерва плотность распределения Pax2+ клеток превышала в 10–13 раз таковую на контралатеральной стороне (рис. 2в, 3а). В ГОН была выявлена максимальная плотность распределения овальных и удлиненных средних и крупных Рах2+ астроцитов (рис. 3б). В проксимальной части ОН наблюдалась высокая плотность распределения Pax2+ клеток (рис. 3в). В дистальной зоне поврежденного ОН плотность распределения Pax2+ клеток была значительно ниже, и преобладали Pax2- клетки. Сходный паттерн распределения был выявлен и в ИОС (рис. 26). В поврежденном нерве были обнаружены области повышенной плотности распределения Pax2- астробластов, содержашие также скопления Pax2+ клеток в дорсальной части и по периферии, и одиночные Pax2- удлиненные клетки, расположенные в центральной части (рис. 3г). Такие очаги мы идентифицировали в качестве зон, содержащих реактивные астробласты, представляющие потенциальные центры регенерации поврежденных зрительных волокон в ОН форели.

Экспрессия транскрипционного фактора Рахб в мозге форели

Анализ содержания содержания Рахб в мозге форели методом вестернблоттинга. Антитела против транскрипционного фактора Рах6, тестированные с помощью вестернблоттинга выявляли изоформу протеина с молекулярной массой 47 кДа (рис. 4). Для определения экспрессии в гомогенатах мозга форели антитела к Рахб использовали при концентрации 2 мг/мл. Сравнительное содержание белкового продукта массой 47 кДа в различных отделах мозга форели показало (рис. 4), что после повреждения глаза обнаружено значительное увеличение его экспрессии в конечном и промежуточном отделах мозга. Высокий уровень экспрессии Рах6 в условиях интактности наблюдался в тектуме и стволе мозга форели, после травмы в тектуме уровень экспрессии фактора несколько усилился, а в стволе произошло некоторое снижение экспрессии Рахб (рис. 4).

Иммуногистохимический анализ содержания белкового продукта транскрипционного фактора Рахб в мозге форели

Рахб в конечном мозге интактной форели. В конечном мозге контрольных животных ИГХ маркирование Рахб определялось в дорсальной и вентральной областях. В них было выявлено два уровня активности ИГХ маркирования: интенсивный (130 \pm 9.7 ЕОП), при котором сома клетки полностью маркирована Рахб и умеренный $(70 \pm 12.6 \text{ EOI})$, при котором наблюдалось менее интенсивное маркирование цитоплазмы и отчетливо визуализировались ядра нейронов (рис. 5а). Интенсивное маркирование Рахб было выявлено в клетках всех морфологических типов (табл. 2). Такие клетки были найдены в трех областях дорсальной (Дд, Дл и Дц) и двух областях вентральной (Вд и Вл) зон теленцефалона. Умеренный тип активности Рахб был выявлен в большинстве маркированных нейронов всех зон теленцефалона (табл. 2).

В Дд нами были выделены 4 типа Pax6+ клеток, отличающихся по морфологическим параметрам и интенсивности иммуномаркирования



Рис. 2. Сравнительная оценка содержания Pax2+ и Pax2- клеток в зрительных нервах форели *Oncorhynchus mykiss* через 1 нед. после травмы. (а) – соотношение Pax2+ и Pax2- клеток в головке зрительного нерва (ГОН), интраорбитальном сегменте (ИОС), проксимальной (ПЧ) и дистальной (ДЧ) частях контралатерального нерва $(M \pm m)$; (б) – аналогичное соотношение на стороне повреждения (n = 5 в каждой группе, # P < 0.05 достоверные межтрупповые отличия); (в) – плотность распределения Pax2+ астроцитов в контра- и ипсилатеральном зрительных нервах форели (n = 5 в каждой группе; * P < 0.05 достоверные отличия контра- и ипсилатеральных групп; ** P < 0.001 достоверные отличия контра- и ипсилатеральных групп; (г) – процентное соотношение содержания Pax2+ и Pax2- астроцитов в контра- и ипсилатеральных нервах.

Рахб (табл. 2). Интенсивное маркирование Рахб было выявлено в небольших и более крупных овальных, мультиполярных и биполярных клетках (табл. 2; рис. 5а). В Дл плотность распределения Рах6+ клеток была выше, чем в Дд, характер иммуномаркирования нейронов в Дл был аналогичный Дл (табл. 2). В центральной части дорсальной зоны Дц было выделено несколько групп Рах6+ нейронов овальной, би- или мультиполярной морфологии нескольких размерных групп (табл. 2; рис. 5б). В вентральной области конечного мозга форели экспрессия Рах6+ определялась в двух зонах: дорсальной Вд и латеральной Вл. В Вд интенсивная экспрессия Рах6+ выявлена в двух популяциях мелких недифференцированных клеток с высокой плотностью распределения в дорсальной части зоны (табл. 2; рис. 5в), а умеренная – в популяциях овальных, более крупных клеток, расположенных в медиальной и вентральной зонах (табл. 2; рис. 5в). В Вл интенсивная экспрессия Рахб была обнаружена в наиболее мелких недифференцированных, двух популяциях овальных и мультиполярных клетках, одиночных либо парных, диффузно распределенных по территории зоны (табл. 2). Умеренная интенсивность Рахб выявлялась в более многочисленных овальных и мультиполярных нейронах, которые обычно окружали интенсивно маркированные клетки (табл. 2). Соотношение интенсивно и умеренно маркированных клеток в различных областях конечного мозга представлено на рис. 5г.

Рахб в конечном мозге после повреждения OH. После повреждения OH в перивентрикулярной зоне Дд определялся слой интенсивно маркированных клеток, расположенных непосредственно под слоем иммунонегативных клеток (рис. 6а). Маркированные Рахб клетки были представлены недифференцированными мелкими либо овальными формами с высоким либо умеренным иммуномаркированием (табл. 2; рис. 6а). После травматического повреждения зрительного нерва в конечном мозге в дорсальной и вентральной об-



Рис. 3. Рах2 в поврежденном зрительном нерве форели *Oncorhynchus mykiss* через 1 нед. после травмы. (а) – Рах2+ астроциты (овальные клетки показаны оранжевыми стрелками, удлиненные мигрирующие клетки показаны голубыми стрелками) и Рах2– клетки (белые стрелки) в проксимальной части поврежденного нерва; (б) – в головке зрительного нерва (удлиненные Рах2– клетки показаны черными стрелками); (в) – общий вид распределения Рах2+ клеток в проксимальной части поврежденного нерва; (б) – в головке зрительного нерва (удлиненные Рах2– клетки показаны черными стрелками); (в) – общий вид распределения Рах2+ клеток в проксимальной части поврежденного нерва, скопление клеток в центральной области нерва ограничено пунктирным контуром; (г) – зоны повышенной плотности распределения Рах2– клеток (врезка), окруженные скоплениями Рах2+ астробластов в дорсальной части и по периферии, одиночные Рах2– удлиненные клетки (голубые стрелки), расположены в центральной части нерва. Иммунопероксидазное маркирование Рах2 в сочетании с окраской метиловым зеленым по Браше. Масштабный отрезок; (а, б) – 100 мкм, (в, г) – 200 мкм.



Рис. 4. Репрезентативное изображение иммуноблотов содержания белкового продукта транскрипционного фактора Рахб в мозге форели *Oncorhynchus mykiss*. Одиночная полоса протеина, соответствующая молекулярной массе 47 кДа присутствовала в конечном, промежуточном отделах мозга, зрительном тектуме и стволе мозга форели у контрольных животных и после повреждения зрительного нерва.

ластях было выявлено появление Рах6+ клеток, имеющих фенотип радиальной глии (рис. 6б–6д). Плотная сеть волокон РГ выявлялась Дл, постепенно снижаясь в вентральном направлении (рис. 6б). В вентральной области наибольшая плотность распределения РГ была обнаружена в латеральной (табл. 2; рис. 6в) и вентральной (табл. 2; рис. 6г) зонах. В Вв волокна РГ были сгруппированы в виде



Рис. 5. Рахб в конечном мозге интактной форели *Oncorhynchus mykiss.* (а) – в дорсальной зоне дорсальной области (Дд), интенсивно маркированные клетки показаны белыми стрелками, умеренно – красными, белыми квадратами оконтурены кластеры умеренно маркированных клеток; (б) – в центральной части дорсальной зоны (Дц), черными стрелками показаны маркированные волокна, в квадратах – гетерогенные маркированные кластеры иммунопозитивных клеток; (в) – в дорсальной зоны (Дц), черными стрелками показаны маркированные волокна, в квадратах – гетерогенные маркированные кластеры иммунопозитивных клеток; (в) – в дорсальном ядре вентральной зоны (Вд). Иммунопероксидазное маркирование Рахб в сочетании с окраской метиловым зеленым по Браше. Масштабный отрезок: (a-B) – 100 мкм. (r) – соотношение интенсивно и умеренно маркированных Рахб клеток ($M \pm m$) в дорсальной (Дд), латеральной (Дл), центральной (Дц) зонах дорсальной области и дорсальной (Вд) и латеральной (Вл) зонах вентральной области теленцефалона интактной форели (n = 5 в каждой группе; ** P < 0.001 достоверные отличия между умеренно и интенсивно маркированными клетками).

дискретного очага, окруженного сосудами и иммунонегативными клетками (рис. 6г). В поверхностных слоях перивентрикулярной зоны определялась плотная сеть Рах6+ волокон, маркированные клетки располагались в виде локальных скоплений в субвентрикулярной зоне. В дорсальной части вентральной области (Вд) клетки РГ были организованы в виде небольших пучков, разделенных промежутками (табл. 2; рис. 6д). Плотность распределения Рах6+ радиальной глии и тел маркированных клеток в вентральной области достоверно превышали (p < 0.05) таковой в дорсальной области (рис. 6е).

Рахб в промежуточном мозге интактной форели. У контрольных животных в промежуточном мозге иммуномаркирование Рахб было выявлено в преоптической области и перивентрикулярных ядрах таламуса. В преоптической области Рахб+ клетки были идентифицированы в крупноклеточной ПОк (рис. 7а) и мелкоклеточной частях ПОм ядра (рис. 7б). В ПОк интенсивное маркирование Рахб было выявлено в овальных, биполярных и крупных мультиполярных нейронах (табл. 2). В ПОм интенсивное и умеренное маркирование Рахб было выявлено в мелких недифференцированных клетках и более крупных овальных клетках двух типов (табл. 2). Маркированные клетки были расположены в субвентрикулярной зоне непосредственно под слоем интенсивно маркированных Рахб перивентрикулярных клеток (рис. 7б).

В таламусе маркирование Рахб исследовали в перивентрикулярных ядрах: дорсальном (Дт) и вентральном (Вт). На уровне нейроэпителиальной конститутивной нейрогенной зоны, расположенной между Р2 и Р3 нейромерами, интенсив-

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ РАХ2 И РАХ6

	Интактные животные		Повреждение зрительного нерва			
Области мозга Тип клеток	размеры клеток, МКМ	оптическая плотность, ЕОП	тип клеток	размеры клеток, мкм	оптическая плотность, ЕОП	
		Теленцес	ралон		•	
Дд	$8.5 \pm 0.2/6.8 \pm 1.0$	134.2 ± 6.7	Недиффер.	$7.7 \pm 1.3/4.9 \pm 1$	156.7 ± 4.9	
Недифференц.	$8.0 \pm 0.8/6.6 \pm 1.7$	62.3 ± 5.6				
Овальные	$11.3 \pm 1.2/8.7 \pm 1.6$	132.6 ± 5.3	_	—	—	
	$10.9 \pm 0.9 / 7.8 \pm 1.0$	77.4 ± 6.1				
Мультиполярные	$14.5 \pm 0.7/9.8 \pm 1.9$	131.1 ± 6.2	_	-	-	
Биполярные	$17.8 \pm 1.0/8.0 \pm 0.5$	130.6 ± 4.3	_	_	_	
Дл	$6.9 \pm 0.3 / 5.2 \pm 0.6$	106.0 ± 4.2	Недиффер.	$7.1 \pm 0.4/4.8 \pm 0.9$	124 ± 3.7	
Недифференц.	$8.9 \pm 1.0 / 8.0 \pm 0.2$	68.4 ± 7.1		$8.7 \pm 1.2 / 7.5 \pm 0.4$	72.5 ± 5.2	
Овальные	$9.6 \pm 0.6 / 7.5 \pm 0.7$	110 ± 5.3	РΓ	$11.3 \pm 3/5.7 \pm 1.3$	134.2 ± 7.4	
	$10.3 \pm 0.2/8.1 \pm 0.4$	85 ± 8.6				
Мультиполярные	$14.3 \pm 0.3/6.9 \pm 1.5$	108.0 ± 6.3	_	_	-	
		74.5 ± 3.2				
Дц	$28.1 \pm 0.6/21.5 \pm 1.5$	136.4 ± 5.8	—	_	—	
Овальные	$33.3 \pm 2.0/22.5 \pm 2.9$	74.2 ± 4.7				
Мультиполярные	$37.3 \pm 2.3/25.9 \pm 1.5$	132.8 ± 3.9	—	-	-	
Мультиполярные	$43.6 \pm 1.5/25.2 \pm 1.6$	131.8 ± 7.3	—	-	-	
	$41.2 \pm 0.9/21.4 \pm 4.3$	76.5 ± 7.9				
Мультиполярные	$53.9 \pm 2.7/32.1 \pm 3.8$	68.2 ± 6.3				
Вд	$5.7 \pm 0.9 / 4.5 \pm 1.2$	135.3 ± 8.3	РΓ	$11.4 \pm 3.1/7 \pm 0.9$	132.4 ± 5.2	
Недифференц.	$6.6 \pm 0.3 / 5.4 \pm 0.3$	81.5 ± 6.9				
Недифференц.	$7.8 \pm 0.5/5.9 \pm 0.7$	137.2 ± 6.3	_	$7.1 \pm 0.6/4.7 \pm 0.5$	130.9 ± 3.8	
Овальные	$7.2 \pm 0.2/5.3 \pm 0.5$	74.5 ± 5.7				
Вл	$6.5 \pm 0.5 / 5.2 \pm 0.4$	151.8 ± 8.4	_	$6.2 \pm 0.7/4.4 \pm 0.6$	133.7 ± 3.6	
Недифференц.						
Овальные	$9.8 \pm 0.3 / 5.0 \pm 1.3$	135.2 ± 6.1	_	$10.2 \pm 0.4/6.1 \pm 1.2$	126.3 ± 4.1	
	$9.9 \pm 0.7/7.4 \pm 1.3$	82.5 ± 9.1		$9.8 \pm 0.9/8.2 \pm 1.0$	67.5 ± 3.2	
Овальные	$11.6 \pm 0.6 / 7.6 \pm 0.5$	138.8 ± 5.3	РΓ	$12.5 \pm 2.8/6.2 \pm 0.8$	136.7 ± 5.4	
	$12.1 \pm 0.5/8.8 \pm 1.0$	73.5 ± 7.7				
Мультиполярные	$14.3 \pm 0.3/7.9 \pm 0.4$	139.4 ± 8.1	_	_	_	
	$14.0 \pm 0.7/9.3 \pm 1.2$	79.5 ± 6.2				
Вв			РΓ	$11.7 \pm 1.7/5.3 \pm 1.2$	135.1 ± 3.5	
_	_	_	Недиффер.	$6.8 \pm 0.4/5.1 \pm 0.6$	132.3 ± 7.2	
_	_	_	Овальные	$9.4 \pm 0.3/5.2 \pm 0.6$	128.2 ± 5.2	
				$9.9 \pm 0.4/6.2 \pm 0.8$	65.3 ± 2.7	
I	Диенцефалон					
ПОк	$10.6 \pm 0.3 / 7.3 \pm 1.7$	133.7 ± 6.6	Недиффер.	$7.8 \pm 1.3/5.6 \pm 1.1$	153.6 ± 1.7	
Овальные		96.8 ± 17.4				
Биполярные	$14.3 \pm 0.9 / 7.6 \pm 0.1$	100.9 ± 6.5	Овальные	$9.9 \pm 0.9/6.6 \pm 1.4$	152.8 ± 5.2	
Мультиполярные	$22.2 \pm 3.0/17.2 \pm 1.2$	144.0 ± 1.6		_	-	
ПОм	$5.7 \pm 0.5/4.1 \pm 0.7$	96.3 ± 13.4	Недиффер.	$7.7 \pm 2.5/5.2 \pm 1.4$	151.8 ± 3.4	

Таблица 2. Морфометрические параметры Pax6+ клеток ($M \pm m$) в пролиферативных зонах и глубоких слоях мозга форели *Oncorhynchus mykiss* в условиях интактности и после механической травмы

Таблица 2. Продолжение	Таблица 2.	Продолжение
------------------------	------------	-------------

	Интактные животные		Повреждение зрительного нерва		
Области мозга Тип клеток	размеры клеток, мкм	оптическая плотность, ЕОП	тип клеток	размеры клеток, мкм	оптическая плотность, ЕОП
Недифференц.					
Овальные	$8.5 \pm 0.3 / 5.6 \pm 0.5$	105.3 ± 2.7	Овальные	$11.0 \pm 1.2/6.6 \pm 0.9$	154.5 ± 1.5
	$10.2 \pm 0.5 / 7.1 \pm 1.4$	97.1 ± 2.6			
Дт	$7.4 \pm 0.4 / 5.8 \pm 1.4$	127.5 ± 15.3	Недиффер.	$5.2 \pm 0.8/4.8 \pm 0.6$	139.5 ± 4.0
Недифференц.					
Овальные	$9.1 \pm 0.6 / 7.2 \pm 1.5$	101.7 ± 10.3	Овальные	$9.4 \pm 0.7/7.7 \pm 1.3$	160.8 ± 1.3
Биполярные	$13.0 \pm 1.1/7.0 \pm 1.5$	97.6 ± 11.2	Мигрир.	$13.3 \pm 3.7/6.6 \pm 2$	140.0 ± 1.9
			P2		100.0 ± 5.3
Мультиполярные	$17.6 \pm 0.9/8.0 \pm 1.9$	114.8 ± 14.4	Мигрир.	$8.7 \pm 1.5/5.8 \pm 1.2$	145.3 ± 4.6
			P3		106.1 ± 6.5
Вт	$7.6 \pm 0.4 / 5.5 \pm 1.1$	163.0 ± 10.2	Недиффер.	$7.4 \pm 0.8/5.3 \pm 0.9$	154.0 ± 7.7
Недифференц.					
Овальные	$10.2 \pm 0.8/5.9 \pm 1.6$	156.1 ± 6.8	Овальные	$9.4 \pm 0.6/6.3 \pm 1.2$	147.2 ± 4.8
Биполярные	$13.6 \pm 0.8/8.6 \pm 1.3$	166.7 ± 4.2	Мультипол.	$23.2 \pm 0.7/10.3 \pm 0.7$	113.2 ± 10.4
1		Тект	ум		
MC	$6.2 \pm 0.8/4.5 \pm 0.3$	85.1 ± 3.8	Недиффер.	$5.5 \pm 0.7/4.5 \pm 0.4$	141.8 ± 1.4
Недифференц.					
Овальные	$8.1 \pm 0.6 / 5.3 \pm 0.5$	85.2 ± 3.4	РГ	$8.2 \pm 0.9/5.4 \pm 0.6$	123.0 ± 1.5
WGG				$12.1 \pm 0.7/7.3 \pm 0.5$	124.1 ± 1.6
цсс	$7.2 \pm 0.4/5.1 \pm 0.5$	123.4 ± 19	Недиффер.	$6.9 \pm 0.3/4.8 \pm 0.5$	79.2 ± 11
Недифференц.					
Овальные	$9.0 \pm 0.7/6.5 \pm 1.4$	144.7 ± 5.7	_	—	—
	$11.3 \pm 0.8/6 \pm 0.8$	84.9 ± 13.8			
Биполярные	$14.8 \pm 1.7/6.6 \pm 0.8$	129.9 ± 29.9	Биполярн.	$14.3 \pm 1.6/6.4 \pm 0.9$	82.4 ± 8
ЦСБС	$7.1 \pm 0.2/5.8 \pm 1$	109.0 ± 23.6	Недиффер.	$7.1 \pm 0.3/5.7 \pm 0.8$	72.8 ± 5.3
Недифференц.					
Овальные	$8.9 \pm 0.4/5.4 \pm 0.3$	90.5 ± 12.8	Овальные	$8.7 \pm 0.6 / 5.5 \pm 0.5$	78.7 ± 7.4
	$11.6 \pm 0.8/7.4 \pm 1.8$	95.2 ± 18.0			
Биполярные	$17.4 \pm 2.7/5.7 \pm 1.3$	109.1 ± 14.6	—	-	—
	$28.6 \pm 3.7 / 5.9 \pm 0.7$	111.0 ± 24.6			
ЦБС	$7.1 \pm 1/4.2 \pm 0.6$	105.8 ± 20.1	Недиффер.	$7.2 \pm 0.8/4.3 \pm 0.5$	98.4 ± 6.3
Недифференц.					
Овальные	$12 \pm 1.5/5.8 \pm 2.6$	131.4 ± 16	Овальные	$10.8 \pm 1.3/5.5 \pm 1.4$	80.9 ± 13.2
Биполярные	$16.3 \pm 1.3/5.5 \pm 1$	127.6 ± 5.0	_	—	_
ПВС	59 + 02/44 + 04	1354 + 69	Нелиффер	$61 \pm 04/45 \pm 06$	1035 + 39
Нелифференц	5.7 ± 0.2 / 1.1 ± 0.7	100.1 ± 0.9	πομηφφορ.	0.1 <u>-</u> 0.1/ 1.3 <u>-</u> 0.0	100.0 ± 0.9
Подифференц.	$9.2 \pm 0.1/5.1 \pm 0.5$	$1/2 2 \pm 0 2$	Operation	8 2 ± 0 5 /5 2 ± 0 7	102.7 ± 15.1
Овальные	$0.2 \pm 0.1/3.1 \pm 0.3$	143.3 ± 8.3	Овальные	$0.2 \pm 0.3/3.2 \pm 0.7$	102.7 ± 10.1
		83.9 ± 11.4			
'		Продолговат	гый мозг*		
я∨*	$25.9 \pm 1.9/16.7 \pm 3.8$	169.4 ± 16.2	*	$21.9 \pm 3.2/13.3 \pm 1.5$	136.7 ± 4.3
*	$31.9 \pm 1.5/19.6 \pm 6.5$	164.1 ± 11.1	*	$30.0 \pm 2.5/20.9 \pm 2.3$	119.7 ± 19.4

	Интактные животные		Повреждение зрительного нерва		
Области мозга Тип клеток	размеры клеток, мкм	оптическая плотность, ЕОП	тип клеток	размеры клеток, мкм	оптическая плотность, ЕОП
*	$44.2 \pm 5.2/22.5 \pm 4.1$	175.2 ± 2.9	*	51.8 ± 9.2/30.6 ± 9.0	132.6 ± 4.4
*	$75.3 \pm 4.7/27.1 \pm 6.9$	159.3 ± 13.2	*	_	_
яVI*	$20.0 \pm 0.8 / 15.0 \pm 0.8$	139.3 ± 12.5	*	$19.1 \pm 1.9/11.9 \pm 1.4$	166.8 ± 4.1
*	$30.4 \pm 3.1/18.2 \pm 3.4$	146.9 ± 5.8	*	$35.8 \pm 7.7/18.6 \pm 4.7$	148 ± 17.3
		102.5 ± 7.3			
*	41.1 ± 3.1/19.9 ± 3.6	158.7 ± 3.4	Биполярн.	39.3 ± 17.7/11.4 ± 1.9	140.3 ± 3.7
яVII*	$31.8 \pm 1/15.9 \pm 1.7$	186.6 ± 1.3	*	$31.8 \pm 1.5/13.6 \pm 1.4$	155.2 ± 10
*	$45.9 \pm 4.1/26.4 \pm 6.2$	185.8 ± 2.7	*	$43.9 \pm 6.3/23.1 \pm 5.7$	157.1 ± 6.6
*	57.7 ± 3.9/22.9 ± 7.9	191.5 ± 1.3	*	$54.2 \pm 5.2/21.8 \pm 5.1$	161.9 ± 4.7
*	$79.2 \pm 6.5/25.7 \pm 4.3$	182.2 ± 4.2	*	$75.4 \pm 6.2/23.6 \pm 5.7$	150.1 ± 9.4
*	$98.4 \pm 7.3/24.4 \pm 8.2$	174.4 ± 8.1	*	$96.2 \pm 6.7/20.4 \pm 5.2$	144.1 ± 15.4
PCK*	$30.8 \pm 3/17.6 \pm 7.5$	155.9 ± 4.9	*	$24.5 \pm 2.1/14.0 \pm 2.7$	139.2 ± 5.6
*	$41.2 \pm 3/24.6 \pm 7.4$	154.9 ± 12.3	*	$32.2 \pm 5.7/16.9 \pm 3.6$	148.9 ± 4.6
*	$55.8 \pm 5.2/25 \pm 6.5$	163.2 ± 1	*	$62.6 \pm 9.4/31.0 \pm 9.9$	138.9 ± 8.6
ЯОЛ*	$28.4 \pm 4.1/13.2 \pm 3.4$	172.6 ± 4.3	*	$25.7 \pm 3.7/15.4 \pm 4.5$	158.4 ± 3.3
*	$43.7 \pm 2.5/21.3 \pm 5.7$	178.8 ± 5.7	*	$40.9 \pm 4.2 / 19.6 \pm 4.2$	155.2 ± 5.7
яIX*	$19.5 \pm 4.1/15.2 \pm 3.6$	136.7 ± 2.9	*	$18.3 \pm 3.1/13.2 \pm 6.6$	110.4 ± 3.5
*	$33.3 \pm 5.8/18.6 \pm 3.0$	143.9 ± 3.8	*	$31.3 \pm 7.8/15.6 \pm 5.8$	108.4 ± 5.8
яХ*	$25.7 \pm 2.9/13.3 \pm 4.4$	135.9 ± 1.8	*	$22.6 \pm 7.1/11.3 \pm 8.4$	112.8 ± 4.3
*	33.4 ± 3.1/17.7 ± 2.3	129.7 ± 6.9	*	$30.4 \pm 5.1/15.7 \pm 4.0$	105.3 ± 4.7
Area postrema	$6.0 \pm 0.6/4.2 \pm 0.4$	103.4 ± 5.2	Недиффер.	$5.8 \pm 0.4/4.1 \pm 0.6$	96.3 ± 3.2
Недифференц.					
Овальные	$8.5 \pm 0.8/4.3 \pm 0.5$	113.0 ± 4.1	Овальные	$8.9 \pm 0.7/4.5 \pm 0.8$	89.0 ± 4.5
BPΦ*	$18.3 \pm 3/12.1 \pm 2.1$	145.1 ± 4.2	*	$16.3 \pm 4.1/11.9 \pm 3.3$	92.0 ± 6.6

Таблица 2. Окончание

* В продолговатом мозге большинство Pax6+ нейронов имели мультиполярную морфологию.

ность маркирования Рах6 в перивентрикулярных клетках была ниже, чем в прилежащих областях (рис. 7в). В вентральном ядре мелкие недифференцированные Рах6+ клетки, располагались под слоем перивентрикулярных клеток, а овальные клетки и биполярные нейроны — в более глубоких слоях (табл. 2: рис. 7г). Вентральнее таламического нейромера (РЗ) располагалась еще одна конститутивная нейрогенная зона, содержащая немногочисленные интенсивно маркированные Рах6 клетки двух типов: мелкие недифференцированные и удлиненные мигрирующие (рис. 7г).

Данные количественного анализа показали, что после травматического повреждения ОН форели было обнаружено увеличение количества Рах6+ клеток на территории матричных зон промежуточного мозга и в прилежащих к ним областях клеточной миграции, а также увеличение плотности распределения радиальной глии (рис. 8а-г). Через

ОНТОГЕНЕЗ том 49 **№** 5 2018

1 нед. после повреждения в ПОм наблюдалось значительное увеличение интенсивно маркированных Pax6+ нейронов (p < 0.05) и существенное увеличение умеренно маркированных Рах6+ клеток (p < 0.01) (рис. 8а). В ПОк в результате повреждения было выявлено существенное увеличение интенсивно и умеренно Pax6+ маркированных нейронов, а также Pax6— клеток (p < 0.01) (рис. 8б). В дорсальном таламусе после повреждения наблюдали экстремальное повышение количества интенсивно маркированных Pax6+ клеток (p < 0.05) и существенное увеличение умеренно маркированных Pax6+ и Pax6- клеток (*p* < 0.01) (рис. 8в). В вентральном таламусе после повреждения ОН наблюдалось значительное увеличение интенсивно маркированных Рахб нейронов (p < 0.05), а также повышение Pax6- клеток (*p* < 0.01) (рис. 8г). Данные иммуноблоттинга подтверждают общее увеличение экспрессии Рахб в диенцефалоне после травматического повреждения ОН (рис. 4).



ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ РАХ2 И РАХ6

Рис. 6. Рахб в конечном мозге форели Oncorhynchus mykiss через 1 нед. после повреждения зрительного нерва. (a) – в дорсальной зоне (Дд), белыми стрелками показаны интенсивно маркированные клетки, красными – умеренно маркированные, черными – волокна радиальной глии, белыми квадратами оконтурены нейроэпителиальные реактивне нейрогенные ниши, содержащие маркированные клетки; (б) – в латеральной зоне (Дл), голубыми стрелками показаны Рах6- клетки нейроэпителия, желтыми – волокна радиальной глии, зелеными – клетки эндотелия сосудов, красным овалом оконтурены мигрирующие вдоль волокон радиальной глии умеренно маркированные клетки, красными звездочками – Рахб – клетки в составе реактивных нейрогенных ниш паренхиматозной локализации, белыми звездочками – Рахб – клетки в составе нейроэпителиальных реактивных нейрогенных ниш, белым пунктиром показаны направления радиальной миграции клеток; (в) – в латеральной зоне (Вл), обозначения как на (а) и (б); (г) – в вентральной зоне (Вв), черным овалом оконтурено скопление волокон радиальной глии; (д) – в дорсальной зоне (Вд), голубым овалом оконтурена реактивная нейрогенная ниша, содержащая интенсивно маркированные клетки, в крупном белом квадрате – скопление умеренно маркированных клеток в глубоких слоях Вл. Иммунопероксидазное маркирование транскрипционного фактора Рахб в сочетании с окраской метиловым зеленым по Браше. Масштабный отрезок: (а–д) – 100 мкм. (е) – соотношение интенсивно маркированных Рахб недифференцированных клеток и радиальной глии $(M \pm m)$ в дорсальной и вентральной областях теленцефалона форели после травмы (n = 5 в каждой группе; # P < 0.05 достоверные межгрупповые отличия).



Рис. 7. Рахб в промежуточном мозге интактной форели *Oncorhynchus mykiss*. (а) – в крупноклеточном ядре (ПОк) преоптической области (ПОк оконтурено красным прямоугольником), белыми стрелками показаны крупные Pax6+ нейроны, красными – мелкие Pax6+ нейроны, черными – Pax6+ клетки перивентрикулярной области, белыми звездочками отмечены Pax6– клетки; (б) – в мелкоклеточном ядре (ПОм) преоптической области; (в) – в дорсальном таламическом ядре (Дт), скопление интенсивно маркированных Pax6 недифференцированных клеток показано белой стрелкой, умеренно маркированные Pax6 клетки, окружающие отогнутый пучок Мейнерта (опм) – голубой стрелкой, нейроэпителиальная конститутивная нейрогенная ниша показана черным треугольником, окружающие ее интенсивно маркированные перивентрикулярные скопления Pax6+ клеток соответствуют P2 и P3 нейромерам; (r) – в вентральном таламическом ядре (BT), обозначения как на (в). Иммунопероксидазное маркирование Pax6 в сочетании с окраской метиловым зеленым по Браше. Масштабный отрезок: (a–r) – 100 мкм.



Рис. 8. Сравнительная оценка содержания Pax6+ и Pax6– клеток в ядрах промежуточного мозга форели *Oncorhynchus mykiss* через 1 нед. после травмы. (а) – в мелкоклеточном преоптическом ядре (ПОм); (б) – в крупноклеточном преоптическом ядре (ПОк); (в) – в дорсальном таламусе; (г) – в вентральном таламусе. (n = 5 в каждой группе; * P < 0.01 достоверные отличия от контрольной группы; ** P < 0.05 достоверные отличия от контрольной группы.)

Рах6 в промежуточном мозге форели после повреждения ОН. После повреждения в дорсальной мелкоклеточной части преоптической области (ПО) регистрировалось большое количество Pax6+ клеток без признаков дифференцировки, расположенных в перивентрикулярной и субвентрикулярной зонах (рис. 9а). В ПОм встречались овальные клетки среднего размера и мелкие с высокой интенсивностью маркирования, а мигрировавшие клетки располагались в более глубоких слоях диенцефалона (табл. 2; рис. 9а). В вентральной крупноклеточной части ПОк после повреждения была выявлена сеть Рах6+ радиальной глии (рис. 96, 9в), а также недифференцированные и овальные клетки в перивентрикулярной и субвентрикулярной областях, формирующие реактивные нейрогенные ниши (рис. 9в). На территории дорсального таламуса в матричной зоне, расположенной между границами Р2/Р3 нейромеров, после травмы идентифицировалась значительная пролиферативная активность и существенное увеличение Рах6- нейроэпителиальных клеток в поверхностных слоях, Рах6+ клеток в субвентрикулярных слоях (рис. 9г). В области дорсального Р2 и вентрального Р3 нейромеров выявлялась плотная сеть волокон радиальной глии (рис. 9д). Клеточный состав перивентрикулярной и субвентрикулярной областей Дт, Мт и Вт характеризовался морфологической неоднородностью (табл. 2). На границе нейромеров Р2/Р3 идентифицировали плотное скопление Рах6— клеток (рис. 9г), которое не выявлялось у интактных животных.

В заднетуберальной области (ЗТО) обнаружена высокая плотность распределения Pax+ клеток субвентрикулярной локализации вокруг отогнутого пучка Мейнерта (рис. 9е) и большое количество недифференцированных Рах6-клеток в дорсальной части ЗТО (рис. 9e) с высокой плотностью распределения волокон РГ в вентральной части таламуса (рис. 9ж). В переднем таламическом ядре после повреждения обнаружена высокая интенсивность маркирования Рахб (табл. 2). Мелкие недифференцированные и крупные биполярные клетки характеризовались высокой интенсивностью маркирования Рахб (табл. 2; рис. 9з). Скопления Рах6- клеток в перивентрикулярной области дорсальной части ЗТО маркировала границы нейромеров и локальные скопления клеток РГ в вентральном таламусе (рис. 9ж, 9и).

В диенцефалоне форели, после травматического повреждения глаза было выявлено значительное увеличение плотности распределения перивентрикулярных нейроэпителиальных клеток,



Рис. 9. Рахб в промежуточном мозге форели Oncorhynchus mykiss через 1 нед. после повреждения зрительного нерва. (а) – в мелкоклеточном преоптическом ядре (ПОм), черными стрелками указаны нейроэпителиальные клетки, синими – маркированные клетки субвентрикулярной зоны, красными – иммунонегативные клетки глубоких слоев; (б) – в ростральной части крупноклеточного преоптического ядра (ПОк), красными стрелками показаны Рах6- клетки, желтыми – волокна радиальной глии, голубыми овалами оконтурены нейроэпителиальные реактивные нейрогенные ниши, в красном овале – реактивная ниша субвентрикулярной локализации; (в) – в каудальной части ПОк, белым пунктиром оконтурен участок схождения волокон радиальной глии; (г) – в матричной зоне, между Р2 и Р3 нейромерами, скопление Pax6- нейроэпителиальных клеток показано голубой треугольной стрелкой, Pax6+ клетки показаны голубыми стрелками, реактивные нейрогенные ниши оконтурены голубыми овалами, розовым овалом оконтурена реактивная ниша субвентрикулярной локализации, желтым контуром и стрелками показаны Рах6+ клетки и нейрогенные ниши паренхиматозной локализации; (д) – в дорсальном таламусе, красными стрелками показаны Рах6- нейроэпителиальные клетки, черными – радиальная глия, белыми – Pax6+ клетки субвентрикулярной локализации; (e) – в заднетуберальной области (ЗТО), в квадрате показан участок морфогенетического поля, прилежащий к отогнутому пучку Мейнерта (ОПМ), черными треугольниками показаны реактивные нейроэпителиальные ниши; (ж) – в ростральном отделе вентрального таламуса, в красном овале Рахб- клетки, мигрирующие вдоль волокон радиальной глии; (3) – в переднем таламическом ядре (ПТЯ), красными овалами обведены реактивные нейрогенные ниши паренхиматозной локализации; (и) – в каудальной части вентрального таламуса. Иммунопероксидазное маркирование Рахб в сочетании с окраской метиловым зеленым по Браше. Масштабный отрезок — 100 мкм.

контактирующих с просветом мозгового желудочка (рис. 9а–9в). На территории ПЗ между нейромерами Р2 и Р3 обнаружено большое количество Рах6+ клеток в субветрикулярной зоне и среди мигрировавших клеток (рис. 9г). Слабо маркированные волокна РГ прослеживались от перивентрикулярной области, окружающей ПЗ по направлению к переднему таламическому ядру (рис. 9з), однако более интенсивное маркирование РГ наблюдалось на территории Р2 и Р3 нейромеров. После травмы в области претектального нейромера Р1 клетки формировали плотное морфогенетическое поле в зоне, прилегающей к отогнутому пучку Мейнерта (рис. 9е).

Рах6 в оптическом тектуме интактной форели. В оптическом тектуме (OT) контрольных животных распределение Рахб было выявлено в клетках маргинального слоя (МС), центрального серого (ЦСС), центрального серого и белого слоев (ЦСБС), центральный белого (ЦБС) и перивентрикулярного серого слоев (ПВС). В МС и ПВС было выявлено 2 типа клеток – недифференцированные мелкие и овальные клетки (табл. 2). Во внутренних слоях тектума ЦСС, ЦСБС и ЦБС идентифицировали также Pax6+ биполярные клетки различных размеров и морфологии (табл. 2). Обший вид иммуномаркирования Рахб в тектуме представлен на рис. 10а. В маргинальном слое умеренное маркирование Рахб выявлено в поверхностно расположенных мелких недифференцированных клетках и более крупных овальных клетках с радиальными отростками (рис. 10б). Под слоем поверхностных иммунопозитивных клеток выявлены скопления мелких Рах6- клеток (рис. 10б). В ЦСС Рах6+ клетки были представлены мелкими недифференцированными интенсивно маркированными и двумя типами овальных клеток с интенсивным и умеренным маркированием Рах6, а также Рах6-клеток (табл. 2; рис. 10в). В ЦСБС высокая интенсивность маркирования Рахб обнаружена в крупных вертикальных биполярных клетках (рис. 10г). В ЦБС высокая интенсивность маркирования Рах6 была выявлена в трех типах клеток (табл. 2; рис. 10д). В ПВС выявлена максимальная плотность распределения Pax6+ недифференцированных и овальных клеток (рис. 10д). Толщина ПВС была минимальной в дорсальной части и максимальной в латеральной части ОТ.

Рахб в оптическом тектуме форели после повреждения OH. После повреждения в MC зрительного тектума форели определялись интенсивно маркированные Рахб клетки, имеющие фенотип радиальной глии. По сравнению с интактными животными после травматического повреждения OH интенсивное иммуномаркирование Рахб в нейронах всех слоев зрительного тектума практически отсутствовало, при этом во всех зонах тектума выявлялись одиночные мелкие недифференцированные Рах6– клетки и их небольшие скопления (рис. 11а, 11г–11е).

В дорсальной зоне тектума плотность распределения РГ была минимальной (рис. 12а). Клетки РГ отличались морфологической гетерогенностью и высокой интенсивностью маркирования Рах6 (табл. 2; рис. 12а, 12б). Над слоем Рах6+ РГ определялся слой Рах6- мелких клеток. формирующих различные скопления (рис. 11а, 11б). Среди таких клеток встречались мелкие округлые интенсивно маркированные Рах6+ клетки, одиночные, либо образующие небольшие кластеры (рис. 11б). Здесь же были выявлены скопления Рах6- клеток, образующие реактивные нейрогенные ниши пиальной и паренхиматозной локализации (рис. 11а). Иногда выявлялись паттерны радиальной миграции Pax6- клеток вдоль волокон РГ (рис. 11а, 11в).

В медиальной зоне тектума плотность распределения Рах6+ РГ в маргинальном слое была выше, чем в дорсальной зоне (рис. 116, 11г). Количество интенсивно маркированных клеток медиальной зоны также превышало таковое дорсальной (рис. 12а). Над слоем клеток РГ выявлялись одиночные реактивные нейрогенные ниши пиальной локализации, с интенсивно маркированными Рах6 клетками без отростков (рис. 11в, 11г). В отличие от дорсальной зоны в МС медиальной зоны не было идентифицировано реактивных ниш пиальной локализации (рис. 11в, 11г). В латеральной зоне тектума в МС была выявлена максимальная плотность распределения и высокая интенсивность маркирования Pax6 в РГ (рис. 11д, 11е; 12а). Pax6+ клетки РГ были организованы в виде небольших пучков, включающих 2-3 клетки, их отростки прослеживались на значительном расстоянии вглубь маргинального слоя, вплоть до слоя оптических волокон (рис. 11е). На территории ЦСС и ЦСБС были выявлены крупные скопления мелких, недифференцированных, слабо маркированных Pax6 либо Pax6- клеток, формирующих кластеры вновь образованных клеток, мигрирующие вдоль волокон РГ (рис. 11д). Над слоем интенсивно маркированных клеток РГ в латеральной зоне, как и в других зонах тектума были выявлены небольшие реактивные нейрогенные ниши субпиальной локализации (рис. 11е). После травмы на территории каудальной пролиферативной зоны тектума было выявлено максимальное количество реактивных нейрогенных ниш субпиальной и перивентрикулярной локализации. В отличие от дорсальной и медиальной зон тектума, после травматического повреждения ОН в латеральной зоне нейрогенные ниши были наиболее выраженными и крупными (рис. 11e).

Анализ количественного распределения Pax6маркированных клеток и радиальной глии в ОТ форели у контрольных животных и после механи-



Рис. 10. Рахб в зрительном тектуме интактной форели *Oncorhynchus mykiss.* (а) – общий вид иммуномаркирования Рахб в тектуме, МС – маргинальный слой, ОС – слой зрительных волокон, ЦСС – центральный серый и белый слой, ЦБС – центральный белый слой, стрелками показаны сосуды; (б) – в поверхностных слоях, белые стрелки – Рахб+ клетки МС, в белом прямоугольнике конститутивная нейрогенная ниша, желтые стрелки – Рахб- клетки, красные стрелки – клетки с умеренной интенсивностью маркирования Рахб; (в) – в центральном сером слое, красные стрелки – интенсивно маркированные проекционные нейроны, белые стрелки – слабо маркированные проекционные клетки, зеленые стрелки – клетки сосудов; (г) – в центральном сером и белом слое, голубым овалом оконтурен кластер Рахб+ клеток, остальные обозначения как на (в); (д) – в центральном белом слое; (е) – в перивентрикулярном сером слое. ПВС – перивентрикулярный серый слой, иммунопероксидазное маркирование транскрипционного фактора Рахб в сочетании с окраской метиловым зеленым по Браше. Масштабный отрезок: (а) – 200 мкм, (б-е) – 100 мкм.



Рис. 11. Рахб в зрительном тектуме форели *Oncorhynchus mykiss* через 1 нед. после повреждения зрительного нерва. (а) – в дорсальной зоне тектума, черными стрелками показаны интенсивно маркированные клетки и их скопления, красными – радиальная глия, белыми – недиффернцированные маркированные клетки глубоких слоев, в черных прямоугольниках реактивные нейроэпителиальные нейрогенные ниши с Рахб– клетками, в красных овалах – реактивные нейрогенные ниши с Рахб– клетками паренхиматозной локализации; (б) – фрагмент дорсальной зоны при большем увеличении, голубыми стрелками показаны Рахб– клетки; (в) – в медиальной зоне тектума, белой стрелкой показана слабо маркированная горизонтальная биполярная клетка в ЦСС, черным прямоугольником оконтурена перивентррикулярная реактивная нейрогенная ниша; (г) – фрагмент медиальной зоны при большем увеличении, белыми стрелками показаны слабо маркированные Рахб клетки; (д) – в латеральной зоны при большем увеличении, белыми стрелками показаны слабо маркированные Рахб клетки; (д) – в латеральной зонь при большем увеличении, белыми стрелками показаны слабо маркированные Рахб клетки; (д) – в латеральной зонь при большем увеличении, белыми стрелками показаны слабо маркированные Рахб клетки; (д) – в латеральной зонь при большем увеличении, белыми стрелками показаны слабо маркированные Рахб клетки; (д) – в латеральной зонь при большем увеличении, белыми стрелками показаны слабо маркированные Рахб клетки; (д) – в латеральной зонь при большем увеличении, белыми стрелками показаны слабо маркированные Рахб клетки; (д) – в латеральной зонь при большем увеличении, белыми стрелками показаны слабо маркированные рахб клетки; (е) – фрагмент латеральной зоны при большем увеличении, обозначения см. (а). Иммунопероксидазное маркирование Рахб в сочетании с окраской метиловым зеленым по Браше. Масштабный отрезок: (а, в, д) – 200 мкм, (б, г, е) – 50 мкм.



Рис. 12. Количественное распределение Рахб-маркированных клеток и радиальной глии в тектуме форели у интактных животных и после повреждения зрительного нерва. (а) – количество Рахб+ радиальной глии в маргинальном слое дорсальной, медиальной и латеральной зонах тектума $(M \pm m)$; (б) – количество интенсивно маркированной (Pax6+++) радиальной глии, умеренно маркированных (Pax6++) клеток и Pax6– клеток $(M \pm m)$ в маргинальном слое тектума (n = 5 в каждой группе; * P < 0.01 достоверные отличия от контрольных групп; ** P < 0.05 достоверные отличия от контрольных групп); (в) – центральном сером слое, обозначения как на (б) (n = 5 в каждой группе; ** P < 0.05 досстоверные отличия от контрольных групп); (r) – в центральном сером и белом слое (n = 5 в каждой группе; * P < 0.01 достоверные отличия от контрольных групп); (g) – в центральном белом слое (n = 5 в каждой группе; * P < 0.01 достоверные отличия от контрольных групп); (e) – в перивентрикулярном слое (n = 5 в каждой группе; * P < 0.01 достоверные отличия от контрольных групп); (e) – в перивентрикулярном слое (n = 5 в каждой группе; * P < 0.01 достоверные отличия от контрольных групп); (e) – в перивентрикулярном слое (n = 5 в каждой группе; * P < 0.01 достоверные отличия от контрольных групп); (e) – в перивентрикулярном слое (n = 5 в каждой группе; * P < 0.01 достоверные отличия от контрольных групп); (e) – в перивентрикулярном слое (n = 5 в каждой группе; * P < 0.01 достоверные отличия от контрольных групп); (e) – в перивентрикулярном слое (n = 5 в каждой группе; * P < 0.01 достоверные отличия от контрольных групп); (e – в перивентрикулярном слое (n = 5 в каждой группе; * P < 0.01 достоверные отличия от контрольных групп); (e – в перивентрикулярном слое (n = 5 в каждой группе; * P < 0.01 достоверные отличия от контрольных групп); (e – в перивентрикулярном слое (n = 5 в каждой группе; * P < 0.01 достоверные отличия от контрольных групп)

ческой травмы глаза представлен на рис. 12. Сравнительная характеристика плотности распределения Рах6+ РГ в дорсальной, медиальной и латеральной зонах тектума МС показала, что в данных областях при повреждении ОН наблюдается соответственное увеличение количества позитивной РГ, однако достоверных отличий между зонами выявлено не было (рис. 12а). Сравнительное распределение Pax6+ PГ в MC достоверно (p < 0.01) возрастало после повреждения ОН. Значительное увеличение Pax6— клеток (p < 0.05), окрашенных метиловым зеленым также было установлено после повреждения, тогда как число умеренно маркированных Рах6 клеток после травмы возрастало незначительно (рис. 12б). В ЦСС у контрольных животных были выявлены немногочисленные интенсивно маркированные Рахб нейроны (рис. 12в). После повреждения интенсивно маркированных Рах6 клеток обнаружено не было, однако выявили многократное увеличение количества умеренно маркированных клеток (p < 0.05), и незначительное снижение Рах6- клеток по сравнению с контролем (рис. 12в). В ЦСБС в условиях интактности также присутствовали интенсивно маркированные Pax6 нейроны различных типов, которые не выявлялись после повреждения, как и в ЦСС (рис. 12в, 12г). После повреждения ОН количество умеренно маркированных клеток в ЦСБС достоверно возрастало (p < 0.01) и значительно увеличивалось количество Pax6- клеток (p < 0.01), окрашенных метиловым зеленым (рис. 12г). В ЦБС не было установлено достоверного увеличения количества Pax6+ клеток, но число Pax6клеток было достоверно ниже (p < 0.01), чем у контрольных животных (рис. 12д). В ПВС после повреждения ОН было выявлено достоверное возрастание (p < 0.01) количества умеренно маркированных Рахб клеток (рис. 12е).

Рахб в стволе мозга интактной форели. В стволе мозга контрольных животных интенсивное маркирование Рахб было выявлено в перивентрикулярной области, клетках, прилежащих к мягкой мозговой оболочке, и проекционных нейронах РФ и ядер черепно-мозговых нервов (рис. 13а, 13б). В главном ядре тройничного нерва высокая интенсивность маркирования Рахб была идентифицирована в четырех типах нейронов (табл. 2; рис. 13а). В ядре отводящего VI нерва было выявлено интенсивное и умеренное маркирование Рахб (табл. 2; рис. 13б). Интенсивно маркировались крупные нейроны межпучковой области (рис. 13б). В вентральной части РФ определялись конститутивные нейрогенные ниши, содержащие мелкие умеренно маркированные нейроны (рис. 13б). В ядре лицевого VII нерва маркированные Рахб нейроны формировали гетерогенную популяцию (рис. 13в). На территории латеральной РФ было обнаружено скопление умеренно маркированных Рахб и Рахб- клеток (рис. 13в). Высокая интенсивность маркирования Рахб была определена и в ПВЗ ствола, на дне IV желудочка, формируя непрерывный слой клеток, а также со стороны мозжечка, где интенсивно маркированные клетки формировали небольшие кластеры (рис. 13в). На протяжении всего медуллярного отдела ствола высокая интенсивность маркирования Рахб была выявлена в ретикулоспинальных нейронах (РСК) и октаво-латеральных эфферентных нейронах (ЯОЛ) (табл. 2; рис. 13г), ядрах IX и X нервов (рис. 13д), скоплении нейронов в области area postrema (рис. 13д). В перивентрикулярной области были обнаружены интенсивно маркированные клетки, образующие конститутивные нейрогенные ниши (рис. 13д). В каудальных медуллярных областях были идентифицированы Рах6+ волокна в области мозжечкового креста (МК) и ПВЗ (рис. 13е). Небольшие скопления Pax6+ клеток распределялись в латеральной РФ и вентральной РФ (табл. 2). Вдоль всего медулярного отдела у интактных животных были обнаружены немногочисленные мелкие интенсивно маркированные Рахб клетки во внешних слоях мозга, контактирующих с мягкой мозговой оболочкой (рис. 13б-13г).

Рахб в стволе мозга форели после повреждения ОН. В стволе мозга после повреждения выявлены локальные скопления мелких Рахб— клеток, отсутствующих в условиях интактности (рис. 14а). Такие группы недифференцированных клеток, определяемые нами, как реактивные нейрогенные ниши, часто располагались среди проводя-

Рис. 13. Рахб в стволе мозга интактной форели *Oncorhynchus mykiss.* (а) – в главном ядре тройничного нерва, ($\overline{\text{NV}}$ оконтурено красным прямоугольником), черными стрелками показаны маркированные нейроны перивентрикулярной области, красными – умеренно маркированные клетки межпучковой области, HtpV – нисходящий тракт тройничного нерва, BBT – вторичный вкусовой тракт; (б) – в ядре отводящего нерва ($\overline{\text{SV}}$ оконтурено голубым квадратом), черными кругами оконтурены конститутивные нейрогенные ниши, черными стрелками показана радиальная глия пиальной локализации, голубой стрелкой показана умеренно маркированная клетка, $\overline{\text{MIK}}$ – межпучковая клетка; (в) – в ядре лицевого нерва ($\overline{\text{SVI}}$) оконтурено черным прямоугольником), голубыми прямоугольниками оконтурены перивентрикулярные конститутивные нейрогенные ниши, черными стрелками показана радиальная глия пиальной локализации, голубой стрелкой показана умеренно маркированная клетка, $\overline{\text{MIK}}$ – межпучковая клетка; (в) – в ядре лицевого нерва ($\overline{\text{SVI}}$) оконтурено черным прямоугольником), голубыми прямоугольниками оконтурены перивентрикулярные конститутивные нейрогенные ниши, красным пунктиром оконтурены скопления умеренно маркированных клеток латеральной ретикулярной формации, мпп – медиальный продольный пучок; (г) – в октаволатеральном ядре ($\overline{\text{SV}}$, оконтурено овалом), ретикулоспинальные клетки (PCK, оконтурены овалом); (д) – в ядре блуждающего нерва ($\overline{\text{SX}}$, оконтурено овалом), маркированные клетки и в области *area postrema* оконтурены белым овалом белыми стрелками – маркированные клетки субвентрикулярной зоны, остльные обозначения как на ($\overline{\text{B}}$), – в области мозжечкового креста ($\overline{\text{MK}}$), скопление умеренно маркированные клеток в латеральной ретикулярной формации оконтурено овалом, в прямоугольнике – маркированные клетки субвентрикулярной зоны, остльные обозначения как на ($\overline{\text{B}}$) – в области мозжечкового креста ($\overline{\text{MK}}$), скопление умеренно маркированных клеток в латеральной ретикулярной формации оконтурено овалом, в



щих путей латеральной ретикулярной формации, многие скопления были пронизаны волокнами РГ (рис. 14б). В перивентрикулярной области, на территории ядер IX–X нервов отмечалась повышенная плотность распределения Рах6+ РГ, вдоль волокон которой регистрировались многочисленные мигрирующие Рах6– клетки (рис. 14б). У просвета IV желудочка над слоем Рах6+ РГ были выявлены мелкие округлые Рах6– недифференцированные клетки, а также элементы многорядного Рах6– нейроэпителия (рис. 146, 14в). В латеральной части ствола были идентифицированы до-

вольно крупные ПВЗ с высокой плотностью клеток и максимальной активностью Рахб (рис. 14г). В субвентрикулярной зоне визуализировалось скопление клеток с умеренной либо низкой активностью Рахб (рис. 14г). Слабая интенсивность маркирования Рахб была выявлена в М-клетке (рис. 14д). Из прележащей перивентрикулрной области, содержащей интенсивно маркированные перивентрикулярные клетки и интенсивно маркированные клетки субвентрикулярной области, мигрирующие вдоль иммунопозитивных волокон РГ (рис. 14д). В постравматический период было зарегистрировано появление волокон и клеток РГ, расположенных в субпиальной области ствола (рис. 14е). В ретикулоспинальных клетках (РСК) после травмы было выявлено интенсивное маркирование Рахб (табл. 2; рис. 14ж). Среди крупных мультиполярных нейронов ретикулярной формации мы наблюдали обширные скопления реактивных нейрогенных Рах6-ниш паренхиматозной локализации (рис. 14ж). Клетки ядра VI нерва маркировались Рахб (рис. 143), интенсивность их маркирования была выше, чем у интактных животных (табл. 2). Вентральнее ядра отводящего нерва были обнаружены крупные биполярные, средние и мелкие нейроны, окруженные скоплениями недифференцированных Рах6клеток внутри ядра и в прилежащих областях (табл. 2; рис. 14з). Интенсивное маркирование Рахб сохранялось также в крупных соматосенсорных нейронах главного ядра тройничного нерва и клетках ЛРФ (рис. 14и).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования было установлено, что экспрессия транскрипционных факторов Pax2 и Pax6 в зрительном нерве и центрах головного мозга взрослой форели имеет существенные отличия в условиях интактности и после механической травмы зрительного нерва. Установленные отличия во всех случаях свидетельствуют об усилении экспрессии данных транскрипционных факторов в условиях травмы, что свидетельствует об участии регуляторных генов семейства PAX в процесах репаративного нейрогенеза.

Транскрипционный фактор Pax2 при повреждении зрительного нерва рыб

Рах2 принадлежит к семейству транскрипционных факторов Pax2/5/8, для которых характерно наличие парного домена, ДНК-связывающих доменов формирующих октапептид, взаимодействующий с другими пептидами и ингибиторного домена (Parrilla et al., 2012). Во время эмбрионального развития Pax2 участвует в репарации сосудистой оболочки, дифференцировке глиальных предшественников и регулирует направление роста аксонов ганглиозных клеток сетчатки через головку зрительного нерва и оптическую хиазму (Soukkarieh, 2007). Рах2 обеспечивает астроцитарный фенотип клеток у взрослых позвоночных, а также регулирует рост аксонов у различных видов рыб (Stanke et al., 2010; Parrilla et al., 2012). У *D. rerio* ген Рах2 представлен двумя изоформами: *pax2a* и *pax2b*. Паттерн экспрессии гена *Pax2a* в значительной степени сходен с экспрессией гена *pax2* млекопитающих.

Ген *pax2b* участвует в развитии зрительного нерва, однако его экспрессия отсрочена во времени по сравнению с *pax2a* (Pfeffer et al., 1998). Экспрессия Pax2 в астроцитах зрительного нерва ранее была обнаружена у данио (Macdonald et al., 1997) и у золотой рыбки *C. auratus* (Parrilla et al., 2009). Согласно оценке Макдональда и его коллег (Macdonald et al., 1997) в зрительном нерве данио 25% Pax2+ клеток соответствуют ретикулярным астроцитам. Результаты исследований Парилла и ее коллег показали, что содержание Pax2+ астроцитов в зрительном нерве золотой рыбки существенно ниже, чем у данио, но при этом у *C. auratus* выявлено градиентное распределение Pax2+ клеток (Parrilla et al., 2009).

Результаты вестернблоттинга показывают, что в поврежденном нерве форели уровень экспрессии Pax2 значительно выше, чем в контралатеральном нерве. Ранее результаты иммуноблоттинга показали, что у данио уровень экспрессии Pax2 значительно превышает таковой золотой рыбки (Parrilla et al., 2009).

Исследование распределения Pax2+ клеток было проведено в нейроанатомических зонах зрительного нерва форели, в которых ранее было показано наличие Pax2+ клеток у других видов рыб (Macdonald et al., 1997; Parrilla et al., 2009). Такой подход позволил нам сопоставить результаты, полученные на форели с уже известными данными о локализации Pax2+ клеток у других видов рыб.

Согласно результатам исследования локализации Pax2 в зрительном нерве форели, иммуномаркирование выявлено как в ядрах глиальных клеток, так и в гетерогенной популяции астроцитов, которые были отнесены нами к трем размерным группам (табл. 1). В частности, среди иммунопозитивных клеток в соответствии с классификацией Парилла (Parrilla et al., 2009) были выявлены мелкие круглые клетки, представляющие астробласты, овальные клетки различной степени удлиненности, соответствующие астроцитам, а также узкие биполярные клетки средних и крупных размеров, соответствующие мигрирующей популяции астроцитов. На стороне повреждения, в составе ОН преобладали более крупные Рах2+ астроциты, что дополнительно свидетельствует в пользу морфологической гетерогенности Рах2+ клеток, участвующих в репаративном ответе. При



Рис. 14. Рахб в стволе мозга форели *Oncorhynchus mykiss* через 1 нед. после повреждения зрительного нерва. (а) – реактивные нейрогенные ниши в стволе мозга, черным пунктиром оконтурен вентрокаудальный реактивный кластер, расположенный в основании тектума, красным овалом – субпиальный реактивный кластер, в черных овалах – реактивные кластеры паренхиматозной локализации, черная треугольная стрелка указывает на гетерогенные скопления клеток в составе нейрогенных ниш; (б) – реактивные нейрогенные ниши в перивентрикулярной и субвентрикулярной областях, белыми стрелками показаны Рахб– клетки, черными – Рахб+ клетки, в белом овале – субвентрикулярной и оралости, бельные кластер, в черном – паренхиматозный реактивный кластер; (в) – в ядре лицевого нерва (ЯVII – оконтурено прямоугольником); (г) – перивентрикулярная реактивныя нейрогенная зона (оконтурена овалом) в латеральной части ствола; (д) – в области М-клетки, субвентрикулярный реактивный кластер соконтурен пунктиром, более крупная реактивная нейрогенная зона ограничена однородным овалом; (е) – Рахб+ клетки и волокна радиальной глии (черные стрелки) в субпиальной области ствола; (ж) – реактивные паренхиматозные кластеры Рахб– клеток (РСК, черные стрелки); (з) – Рахб+ нейроны отводящего нерва (ЯVI в черном прямоугольнике), Рахб+ радиальная глия субпиальной локализации (черные стрелки), паренхиматозные кластеры (красные стрелки); (и) – Рахб+ нейроны отводящего нерва (ЯV) и латеральной формации (в красные стрелки); (и) – Рахб+ нейроны главного ядра тройничного нерва (SV) и латеральной ретикулярной формации (в красные стрелки), окруженные многочисленными Рахб – реактивными паренхиматозными клетками. Иммунопероксидазное маркирование Рахб в сочетании с окраской метиловым зеленым по Браше. Масштабный отрезок: (а) – 200 мкм, (б–и) – 100 мкм.

повреждении в зрительном нерве форели также были выявлены Pax2— клетки, что соответствует данным, полученным ранее на *C. auratus* (Parrilla et al., 2009, 2012). Таким образом, после механической травмы в зрительном нерве форели Pax2 выявляется в гетерогенной популяции астроцитарных клеток, соответствующей различным стадиям развития глиальных клеток, включающий спектр переходных форм от недифференцированных до зрелых и мигрирующих астроцитов.

В ходе сравнительного анализа распределения Pax2+ клеток в поврежденном и неповрежденном зрительных нервах форели были установлены отличия в паттернах распределения иммунопозитивных клеток для различных нейроанатомических зон зрительного нерва. В головке и проксимальной части поврежденного зрительного нерва плотность распределения Pax2+ клеток превышала в 10-13 раз таковую на контралатеральной стороне (рис. 2а). Здесь же была выявлена максимальная плотность распределения овальных и удлиненных средних и крупных Pax2+ астроцитов. Наши результаты соответствуют данным для других видов рыб, в частности золотой рыбки, для которой было установлено, что после механического повреждения в зоне между сетчаткой и ГОН были выявлены реактивные астробласты, участвующие в репаративном ответе (Parrilla et al., 2012). В исследованиях на золотой рыбке было показано, что особенности репаративного ответа связаны со способом повреждения зрительного нерва. В частности, при раздавливании ОН у золотой рыбки наблюдался более быстрый и более мощный астроцитарный ответ, чем при криоповреждении (Parrilla et al., 2012, 2013).

Соотношение Pax2+/Pax2- клеток в головке поврежденного зрительного нерва форели составляло 2 : 1 (рис. 26). Сходное соотношение клеток было выявлено в проксимальной части ОН (рис. 26). В ИОС и дистальной зоне поврежденного ОН плотность распределения Pax2+ клеток была значительно ниже, в ней преобладали Pax2клетки. В поврежденном нерве обнаружены области повышенной плотности распределения Pax2- астробластов, содержащие также скопления Pax2+ клеток. Такие очаги мы идентифицировали как зоны, содержащие реактивные астробласты – потенциальные центры регенерации поврежденных зрительных волокон в ОН форели.

Ранее нами было установлено, что при повреждении зрительного нерва взрослой форели, при маркировании PCNA в клетках зрительного нерва форели идентифицируются 4 типа клеток (Пущина и др., 2016). Морфологические параметры и особенности локализации PCNA+ и Pax2+ клеток позволяют предполагать, что часть популяции Pax2+ астробластов может одновременно быть и PCNA-позитивной. В исследованиях на золотой рыбке установлено наличие двух астроцитарных фенотипов: Pax2+/PCNA+ и Pax2+/PCNA-(Parrilla et al., 2013). Мы полагаем, что в результате травматического повреждения в ОН форели Рах2+ клетки могут представлять гетерогенные популяции, соответствующие пролиферирующим реактивным Pax2+ астробластам и Pax2+/PCNAастроцитам. Наличие большого количества Рах2+ клеток в проксимальной части поврежденного ОН форели может объясняться миграцией иммунопозитивных астроцитов вдоль поврежденных волокон. В исследованиях на золотой рыбке количество Pax2+/PCNA+ клеток через 7-90 сут после повреждения значительно превышало таковое в контроле (Parrilla et al., 2013). Характер распространения подобных клеток среди аксонов ганглиозных клеток сетчатки, а также ограниченное распространение их в объеме между сетчаткой и ГОН, свидетельствует, что Рах2+ астроциты в ГОН представляют популяцию реактивных астроцитов, участвующих в репаративном ответе. Результаты исследований на *С. auratus* показали, что Pax2+ астроциты, расположенные в головке зрительного нерва и интраорбитальном сегменте имеют морфологические отличия (Parrilla et al., 2009), что вероятно свидетельствует о различных источниках происхождения таких клеток в эмбриогенезе (Morcillo et al., 2006). Исследование популяции Pax2+ астроцитов при регенерации зрительного нерва C. auratus (Lillo et al., 2002; Parrilla et al., 2012) и Tinca tinca (Jimeno et al., 1999) показало, что эти клетки не идентичны S100+ астроцитам и представляют, очевидно, разные популяции.

Значительное увеличение Рах2+ клеток на стороне поврежденного ОН форели, очевидно, свидетельствует о начальных стадиях регенерации аксонов ганглиозных клеток. Согласно общепринятой гипотезе подобная локализация Pax2+ астроцитов среди волокон ганглиозных клеток сетчатки связана с пространственной реорганизацией и упаковкой регенерирующих аксонов (Garciá, Koke, 2009). Данное предположение подтверждается результатами исследований на золотой рыбке, у которой был обнаружен увеличенный уровень экспрессии рах2а через 7 дней после повреждения сетчатки (Parrilla et al., 2013). Однако, мы не склонны считать, что появление подобной реакции у форели представляет классический астроцитарный ответ, сходный с реакцией астроцитов в зрительном нерве млекопитающих (Garciá, Koke. 2009). В исследованиях на золотой рыбке было установлено, что уровень экспрессии рах2а через 2 месяца после повреждения снижается, тогда как количество Pax2+ астроцитов повторно увеличивается (Parrilla et al., 2013). Появление повторно повышения количества Pax2+ астроцитов связано с ремиэлианизацией аксонов ГКС, проецирующихся в тектум (Matsukawa et al., 2004).

Известно, что при развитии зрительной системы Pax2 обеспечивает выживание экспрессирующих его клеток (Soukkarieh, 2007), определяет астроцитарный фенотип макроглии (Stanke et al., 2010) и исключает дифференцировку глиоцитов в пигментные клетки (Macdonald et al., 1997). Мы полагаем, что данные функции Pax2 необходимы для поддержания высокого уровня пролиферативной активности в течение регенеративного периода. Большинство Pax2-негативных клеток в ОН форели могут предствлять популяции микроглии и/или макрофагов, присутствие которых ранее было установлено при регенерации зрительного нерва линя (Jimeno et al., 1999).

Транскрипционный фактор Рах6 в мозге форели после травмы глаза

При механическом повреждении ОН, анализ ИГХ локализации Рах6 проводили в центрах мозга, для которых у рыб ранее было установлено наличие прямых связей с сетчаткой – промежуточном мозге и зрительном тектуме (Nortcutt, 2008). В этих областях мы предполагали возникновение максимально быстрой и ярко выраженной реакции активации конститутивных и появление реактивных нейрогенных ниш в ответ на повреждение зрительного нерва. Согласно исследованиям, проведенным в различных областях мозга рыб, в частности, теленцефалоне, сетчатке, среднем мозге, мозжечке и спинном мозге показано наличие в этих регионах мозга клеток-предшественников, обладающих свойствами нейральных стволовых клеток (Than-Trong, Bally-Cuif, 2015). Ранее у рыб в этих центрах было установлено наличие РГ (Menuet et al., 2005; Ito et al., 2010), являющейся основным источником долговременных конститутивно активных и/или активируемых предшественников, характеризующихся высокой гетерогенностью, в том числе нейроэпителиальных предшественников. В качестве центра, не имеющего прямых ретинальных входов в мозге рыб мы исследовали конечный мозг форели. Продолговатый мозг мы рассматривали как максимально удаленную область от зоны повреждения, в частности были исследованы перивентрикулярная область, зоны медиальной и латеральной ретикулярной формации, ядра черепно-мозговых нервов и пиальная области.

Промежуточный мозг. Наличие иммуногенности к фактору Рахб в перивентрикулярном диенцефалоне рыб было показано для данио (Rink, Wullimann, 2000; Wullimann, Muller, 2004) и молоди симы (Pushchina et al., 2012). В ядрах диенцефалона Рахб-иммунопозитивность в контроле была выявлена в преоптической области и перивентрикулярных ядрах таламуса, однако количество маркированных клеток в норме было невысоким (рис. 8а, 8б). У форели с поврежденным

ОНТОГЕНЕЗ том 49 № 5 2018

зрительным нервом в области перивентрикулярных диенцефалических ядер наблюдались существенные структурные перестройки, появление иммуномаркированной радиальной глии, и активация конститутивних нейроэпителиальных нейрогенних ниш в области Р2 и Р3 нейромеров. Наличие конститутивной радиальной глии в диенцефалоне взрослого данио было установлено в преоптической области, эпиталамусе, дорсальном и вентральном таламусе, заднем бугорке, в дорсальной, вентральной и каудальной областях гипоталамуса, ядрах синенцефалона и претектума (Than-Trong, Bally-Cuif, 2015). РГ в этих областях диенцефалона данио экспрессирует различные маркеры РГ, такие как GFAP, BLBP или AroB (Menuet et al., 2005). Наличие конститутивной радиальной глии в диенцефалоне различных возрастных групп молоди симы и взрослых животных было установлено в наших предыдущих исследованиях (Пущина и др., 2012; Pushchina et al., 2013). После травматического повреждения ОН в перивентрикулярных ядрах диенцефалона форели было выявлено значительное увеличение числа Pax6+ клеток на территории матричных зон промежуточного мозга и в прилежащих к ним субвентрикулярных областях. В крупноклеточном преоптическом ядре, дорсальном и вентральном таламусе после травмы обнаружено появление Pax6+ клеток с фенотипом радиальной глии. На территории конститутивных нейрогенных ниш, прилежащих к Р2 и Р3 нейромерам после травмы было выявлено появление Рах6- нейроэпителия в области матричных зон дорсального и вентрального таламуса, заднетуберальной области. В этих же областях были обнаружены интенсивно маркированные Рахб локальные нейрогенные зоны, отсутствующие у контрольных животных. Такие области, окружающие отогнутый пучок Мейнерта, в заднетуберальной зоне, вентральном таламусе мы относили к реактивным нейрогенным нишам, возникшим в ответ на повреждение ОН. В глубоких областях диенцефалона были идентифицированы скопления Рах6недифференцированных клеток, отсутствующие у контрольных животных, которые мы также относим к реактивным нейрогенным нишам паренхиматозной локализации. Такие скопления клеток были выявлены в вентральном таламусе, претектальной и прегломерулярной областях.

Таким образом, после повреждения ОН в промежуточном мозге форели было установлено: 1) возникновение реактивных Pax6+ и Pax6нейрогенных ниш перивентрикулярной и паренхиматозной локализации; 2) появление Pax6+ РГ на территории ПОк дорсального и вентрального таламуса; 3) увеличение интенсивно Pax6+ маркированных клеток в крупно- и мелкоклеточных преоптических ядрах, дорсальном и вентральном таламусе (p < 0.05); 4) увеличение умеренно Pax6+ клеток в ПО и дорсальном таламусе (p < 0.05); 5) увеличение Pax6- клеток в ПОк, дорсальном и вентральном таламусе (p < 0.05). Полученные результаты свидетельствуют об интенсификации процессов репаративного нейрогенеза в диенцефалоне, где в качестве регулятора может выступать транскрипционный фактор Рах6. Данные вестернблоттинга в условиях интактности показывают незначительный уровень экспрессии фактора Рахб у контрольных животных и значительное повышение уровня синтеза Рах6 при травматическом повреждении зрительного нерва. Биохимические данные находятся в соответствии с данными ИГХ маркирования на препаратах мозга и позволяют диагностировать значительное повышение уровня белкового продукта Рах6 после травматического повреждения ОН форели.

Оптический тектум. Крыша среднего мозга является крупнейшим областью мозга рыб, принимающей направленные ретинальные входы (Wullimann, 1998). У контрольных животных Рах6-иммунопозитивность была обнаружена в клетках различных слоев зрительного тектума. Интенсивность иммуномаркирования Рахб в нейронах различных морфологических типов была двух типов высокой и умеренной. У контрольных животных определялось небольшое количество интенсивно иммуномаркированных клеток РГ в маргинальном слое, однако после повреждения ОН количество клеток РГ многократно возрастало в дорсальной, медиальной и латеральной зонах тектума, достигая максимальных показателей в латеро-каудальной зоне тектума (рис. 12а). Клетки, имеющие морфологию радиальной глии, являлись преобладающим типом интенсивно маркированных Рах6 клеток после повреждения ОН. У контрольных животных мы также находили небольшое количество подобных клеток в МС, а также отдельные интенсивно маркированные дифференцированные клетки с цитоплазматической локализацией маркированного продукта Pax6 на территории глубоких слоев тектума: ЦСС, ЦСБС и ЦБС. Подобное маркирование Рах6 в проекционных нейронах встречается также и в других отделах мозга форели, однако после травмы ОН мы не выявили маркирование Pax6 в дифференцированных клетках тектума. Интенсивное иммуномаркирование Рахб после повреждения ОН было выявлено в отдельных недифференцированных клетках, расположенных в глубоких слоях тектума. Достоверное увеличение Рах6+ радиальной глии наблюдалось в МС. содержащим как тела клеток РГ. так и их отростки, прослеживаемые на значительном расстоянии вглубь тектума. В МС и ЦСБС тектума после травмы ОН мы выявили достоверное увеличение Pax6- недифференцированных клеток в составе реактивных нейрогенных ниш. Поверхностные нейрогенные Рах6- ниши были найдены в МС, Рахб-негативные ниши паренхиматозной локализации были выявлены в ЦСБС. В ЦСС, ЦСБС и ПВС после травмы было найдено достоверное увеличение количества умеренно и слабо маркированных Рахб недифференцированных клеток, мигрирующих вдоль волокон РГ. В целом, характер иммуномаркирования Рахб после травмы ОН свидетельствует о значительных изменениях его экспрессии в тектуме, в частности, локализации в клетках РГ, недифференцированных клетках глубоких слоев, на этом основании мы предполагаем, что тектум является одной из главных зон мозга, участвующих в репаративном ответе при травме ОН.

Данные вестернблоттинга иммуномаркирования Рахб в тектуме свидетельствуют о значительном уровне экспрессии данного фактора в условиях интактности и незначительном повышении количества Рахб после травмы. Согласно данным ИГХ маркирования на срезах мозга после травмы ОН маркирование Рахб не выявляется в крупных нейронах, как это было характерно для интактных животных. Мы полагаем, что после травматического повреждения ОН происходит перераспределение экспрессии Рахб из крупных клеток в клетки, имеющие фенотип РГ, вследствие чего наблюдается повышение уровня белкового продукта в тектуме.

Теленцефалон. Согласно данным Вуллимана прямых ретинальных связей с конечным мозгом у рыб не обнаружено (Wullimann, 1998). Однако, принимая во внимание сведения об участии паллиальной пролиферативной зоны в репаративном нейрогенезе у данио (Than-Trong, Bally-Cuif, 2015), мы исследовали особенности иммунолокализации Pax6 в конечном мозге форели в условиях интактности и после травматического повреждения ОН. Исследование локализации фактора Pax6 у контрольных животных показало наличие двух уровней маркирования Pax6 – интенсивного и умеренного, причем количество умеренно маркированных клеток в дорсальной Дд и латеральной Дл зонах значительно превышает число интенсивно маркированных клеток. Мы полагаем, что снижение количества интенсивно маркированных клеток в перивентрикулярной области форели связано со снижением интенсивности конститутивного нейрогенеза. После повреждения ОН интенсивное маркирование Рахб было выявлено в реактивных нейрогенных нишах, расположенных в составе пролиферативной зоны дорсальной области (Дд). В этой области конечного мозга форели мы не выявили Рах6+ РГ. однако иммуномаркирование перивентрикулярных клеток паллиальной зоны указывает на значительное увеличение продукции Pax6+ клеток в составе нейроэпителиальных нейрогенных ниш, имеющих поверхностную локализацию. В нейроэпителиальных клетках была обнаружена в основном ядерная иммунолокализация Рахб. В Дл

зоне после повреждения ОН были выявлены реактивные Рах6+ нейрогенные ниши перивентрикулярной и субвентрикулярной локализации, а также волокна РГ, вдоль которых осуществлялась миграция Рах6+ и Рах6- клеток. Подобные паттерны локализации Рах6+ реактивных нейрогенных ниш были также выявлены в латеральной, вентральной и дорсальной зонах вентральной области. Плотность распределения РГ и направления миграции клеток в дорсальной и вентральной областях теленцефалона отличались, однако в целом, можно резюмировать следующее. При повреждении ОН в конечном мозге форели наблюдался выраженный репаративный ответ, связанный с активацией конститутивных нейроэпителиальных нейрогенных ниш и появлением реактивных нейрогенных ниш, продуцирующих Pax6+ клетки недифференцированного фенотипа и Рах6+ РГ.

Данные иммуноблоттинга свидетельствуют, что количество белкового продукта Рахб у животных после повреждения ОН значительно повышается с уровнем экспрессии контрольных животных. Эти данные соответствуют результатам ИГХ маркирования Рахб на срезах мозга и могут объясняться возникновением реактивных и активацией конститутивных нейрогенных эпителиальных ниш в ответ на травматическое повреждение ОН. Таким образом, пролиферативные зоны конечного мозга форели по данным настоящего исследования вносят значительный вклад в репаративный нейрогенез в ответ на повреждение ОН.

У данио клетки с характеристиками РГ расположены вдоль перивентрикулярной зоны паллиума (Adolf et al., 2006). Тела клеток РГ формируют монослой, контактирующий с церебро-спинальной жидкостью, а длинные радиальные отростки клеток распространяются вглубь паллиальной паренхимы, вплоть до пиальной поверхности мозга, контактируя с крупными кровеносными сосудами. У данио клетки РГ характеризуются отличающейся морфологией в разных областях паллиума; в частности, у клеток РГ отличаются размеры и форма тел, а также длина и степень разветвленности радиального отростка (März et al., 2010). Экспрессия маркеров РГ в паллиуме данио: нестина, GFAP, BLBP, ароматазы В, S100b, виментина, глутамин синтатезы характеризуется определенной гетерогенностью (März et al., 2010; Berberoglu et al., 2014), требующей более полной и разносторонней характеристики, для понимания ее функциональной значимости.

При исследованиях травматического повреждения теленцефалона взрослого данио типичные звездчатые паренхиматозные астроциты не выявляются (Ganz et al., 2010; März и др., 2010). В наших исследованиях на интактной форели, а также после травматического повреждения ОН звездчатые астроциты также не были идентифицированы. Однако после травматического повреждения ОН в тектуме, промежуточном мозге и теленцефалоне регистрируется наличие типичной радиальной глии, что является характерным признаком реактивного глиоза, характерного для мозга млекопитающих. В мозге взрослых млекопитающих реактивные астроциты являются ненейрогенными клетками, тем не менее, они способны формировать мультипотентные нейросферы и нейроны in vitro, что свидетельствует об ограничительном влиянии на них межклеточного окружения in vivo (Seidenfaden et al., 2006; Robel et al., 2011). Принимая во внимание результаты исследований на данио (Kroehne et al., 2011), мы полагаем, что реактивная Рах6+ РГ после травматического повреждения в мозге форели обладает свойствами эндогенных нейрогенных предшественников, продуцирующих нейробласты, которые способны мигрировать как в конститутивные, перивентрикулярные нейрогенные ниши, а также глубоко в паренхиму мозга, что обычно не наблюдается в интактном мозге.

Продолговатый мозг. У контрольных животных ИГХ маркирование Рахб было выявлено в первентрикулярной области, а также в ядрах черепно-мозговых нервов и проекционных нейронах ретикулярной формации. Эти области у контрольных животных характеризовались высокой интенсивностью маркирования белкового продукта транскрипционного фактора Рах6. После повреждения ОН в продолговатом мозге наблюдалось возникновение Pax6- реактивных нейрогенных ниш паренхиматозной, пиальной и субпиальной локализации, отсутствующих в условиях интактности. Была обнаружена реактивация конститутивных нейрогенных ниш перивентрикулярной локализации, включающих Pax6– и Pax6+ клетки. После травмы ОН были выявлены реактивные пиальные нейрогенные ниши во внешних слоях продолговатого мозга, соответствующих вторичным пролиферативным зонам, содержащие как Рах6-, так и Рах6+ клетки. В таких реактивных нейрогенных нишах интенсивность маркирования Рахб была очень высокой. Наряду с нейрогенными нишами выявлены отдельные интенсивно маркированные Pax6 нейроны и волокна РГ во внешних областях продолговатого мозга, прилежащих к мозговым оболочкам. Подобная локализация Рах6+ клеток и РГ в зонах взрослого нейрогенеза не характерна для интактных животных и также рассматривалась нами, как реакция на повреждения ОН. Другой характерной особенностью репаративного ответа продолговатого мозга на повреждение ОН стало формирование многочисленных реактивных Рах6— нейрогенных ниш паренхиматозной локализации, отсутствующих в условиях интактности. На фоне выраженного репаративного ответа, в продолговатом мозге форели наблюдалось неко-

321

торое снижение интенсивности маркирования Рахб в крупных проекционных клетках ретикулярной формации и ядрах черепно-мозговых нервов по сравнению с контрольными животными. Таким образом, в результате повреждения ОН в продолговатом мозге форели было выявлено появление многочисленных реактивных нейрогенных ниш во вторичных пролиферативных зонах и паренхиме и активация конститутивных нейрогенных ниш в перивентрикулярной области.

Данные вестернблоттинга свидетельствуют о снижении количества Рахб в мозге форели после повреждения ОН. Это соответствует данным ИГХ маркирования Рахб на срезах мозга, поскольку, после травмы ОН мы наблюдали появление большого количества Рах6- реактивных нейрогенных ниш и снижение интенсивности маркирования Рах6 в проекционных нейронах ретикулярной формации и/или ядрах черепно-мозговых нервов. Полученные результаты позволяют предполагать, что в результате травмы ОН в удаленной от области травмы зоне мозга возникает выраженный репаративный ответ, проявляющийся в появлении реактивных нейрогенных ниш различной локализации. большинство из которых содержат Рах6- клетки недиференцированного фенотипа.

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.
- Пущина Е.В., Вараксин А.А., Обухов Д.К. Репаративный нейрогенез в мозге и изменения в зрительном нерве взрослой форели Oncorhynchus mykiss после механического повреждения глаза // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 1. С. 15–39.
- Пущина Е.В., Обухов Д.К., Вараксин А.А. Нейрохимические маркеры клеток перивентрикулярной зоны мозга симы Oncorhynchus masou (Salmonidae) // Онтогенез. 2012. Т. 43. № 1. С. 35–48.
- Adolf B., Chapouton P., Lam C.S. et al. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon // Dev. Biol. 2006. V. 295. P. 278–293.
- 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.
- Berberoglu M.A., Dong Z., Li G. et al. Heterogeneously expressed fezf2 patterns gradient notch activity in balancing the quiescence, proliferation, and differentiation of adult neural stem cells // J. Neurosci. 2014. V. 34. P. 13911–13923.
- *Ganz J., Kaslin J., Hochmann S. et al.* Heterogeneity and Fgf dependence of adult neural progenitors in the zebrafish telencephalon // Glia. 2010. V. 58. V. 1345–1363.

- García D.M., Koke J.R. Astrocytes as gate-keepers in optic nerve regeneration – A mini-review // Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol. 2009. V. 152. P. 135–138.
- *Gerber J.K., Richter T., Kremmer E. et al.* Progressive loss of PAX9 expression correlates with increasing malignancy of dysplastic and cancerous epithelium of the human oesophagus // J. Pathol. 2002. V. 197. P. 293–297.
- *Heins N., Malatesta P., Cecconi F. et al.* Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6 // Nat. Neurosci. 2002. 5. 308–315.
- Horie M., Sango K. Subpial neuronal migration in the medulla oblongata of Pax-6-deficient rats // Eur. J. Neurosci. 2003. V. 17. P. 49–57.
- *Ito Y., Tanaka H., Okamoto H., Ohshima T.* Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum // Dev. Biol. 2010. V. 342. P. 26–38.
- Jimeno D., Velasco A., Lillo C. et al. Response of microglial cells after a cryolesion in the peripheral proliferative retina of tench // Brain Res. 1999. V. 816. V. 175–189.
- Kleinjan D.A., Bancewicz R.M., Gautier P. et al. Subfunctionalization of duplicated zebrafish pax6 genes by cisregulatory divergence // PLoS Genet. 2008. 4(2): e 29. doi 10.1371/journal.pgen.0040029
- Krauss S., Johansen T., Korzh V., Fjose A. Expression of the zebrafish paired box gene pax[zf-b] during early neurogenesis // Development. 1991. V. 113. P. 1193–1206.
- Kroehne V., Freudenreich D., Hans S. et al. Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial gliatype progenitors // Development. 2011. V. 138, P. 4831– 4841.
- Lillo C., Velasco A., Jimeno D. et al. The glial design of a teleost optic nerve head supporting continuous growth // J. Histochem. Cytochem. 2002. V. 50. P. 1289–1302.
- Macdonald R., Scholes J., Strahle U. et al. The Pax protein Noi is required for commissural axon pathway formation in the rostral forebrain // Development. 1997. V. 124. P. 2397–2408.
- Matsukawa T., Arai K., Koriyama Y. et al. Axonal regeneration of fish optic nerve after injury // Biol. Pharm. Bull. 2004. V. 27. P. 445–451.
- Morcillo J., Martinez-Morales J.R., Trousse F. et al. Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH // Development. 2006. V. 133. P. 3179–3190.
- März M., Chapouton P., Diotel N. et al. Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon // Glia. 2010. V. 58. P. 870–888.
- *Northcutt R.G.* Forebrain evolution in bony fishes // Brain Res. Bull. 2008. V. 75. P. 191–205.
- *Oster S.F., Deiner M., Birgbauer E., Sretavan D.W.* Ganglion cell axon pathfinding in the retina and optic nerve // Semin. Cell Dev. Biol. 2004. V. 15. V. 125–136.
- Parrilla M., Lillo C., Herrero-Turrion M.J. et al. Characterization of Pax2 expression in the goldfish optic nerve head during retina regeneration // PLoS One. 2012. 7(2): e32348. doi 10.1371/journal.pone.0032348
- Parrilla M., Lillo C., Herrero-Turrion M.J. et al. Pax2 in the optic nerve of the goldfish, a model of continuous growth // Brain Res. 2009. V. 1255. P. 75–88.
- Parrilla M., Lillo C., Herrero-Turrión M.J. et al. Pax2+ astrocytes in the fish optic nerve head after optic nerve crush // Brain Res. 2013. V. 1492. P. 18–32.

- Pfeffer P.L., Gerster T., Lun K. et al. Characterization of three novel members of the zebrafish Pax2/5/8 family: dependency of Pax5 and Pax8 expression on the Pax2.1 (noi) function // Development. 1998. V. 125. P. 3063– 3074.
- Pushchina E.V., Shukla S., Varaksin A.A., Obukhov D.K. Cell proliferation and apoptosis in optic nerve and brain integration centers of adult trout Oncorhynchus mykiss after optic nerve injury // Neural Regen. Res. 2016. V. 11. P. 578–590.
- *Rink E., Wullimann M.F.* Are dopaminergic diencephalic basal plate neurons induced by pax 6 alar plate cells in the zebrafish? / 13th Biennial Meeting Intern. Soc. Develop. Neurosci. Heidelberg. Abstract volume, 2000. P. 67.
- Seidenfaden R., Desoeuvre A., Bosio A. et al. Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain // Mol. Cell. Neurosci. 2006. V. 32. V. 187–198.
- Soukkarieh C., Agius E., Soula C. Pax2 regulates neuronalglia cell fate choice in the embryonic optic nerve // Dev. Biol. 2007. V. 303. P. 800–813.

- Stanke J., Moose H.E., El-Hodiri H.M., Fischer A.J. Comparative study of Pax2 expression in glial cells in the retina and optic nerve of birds and mammals // J. Comp. Neurol. 2010. V. 518. P. 2316–2333.
- Stoykova A., Gruss P. Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns // J. Neurosci. 1994. V. 14. P. 1395–1412.
- *Than-Trong E., Bally-Cuif L.* Radial glia and neural progenitors in the adult zebrafish central nervous system // Glia. 2015. V. 63. P. 1406–1428.
- Thompson J.A., Ziman M. Pax genes during neural development and their potential role in neuroregeneration // J. Prog. Neurobiol. 2011. V. 94. P. 334–351.
- Wullimann M.F. The central nervous system / In: The Physiology of Fishes. Boca Raton: CRS Press, 1998. P. 245– 282.
- Wullimann M.F., Muller T. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behavior // J. Comp. Neurol. 2004. V. 475. P. 143–162.

The Pax2 and Pax6 Transcription Factors in the Optic Nerve and Brain of Trout Oncorhynchus mykiss after a Mechanical Eye Injury

E. V. Pushchina^{1, 2, *}, A. A. Varaksin¹, and D. K. Obukhov³

¹National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia ²Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 01024 Ukraine ³St. Petersburg University, St. Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: puschina@mail.ru

Received November 9, 2017; in final form, May 2, 2018

The distribution of the Pax2+ transcription factor in the optic nerve after a mechanical eye injury on the side of damage and in the contralateral nerve has been studied in the trout *Oncorhynchus mykiss*. It has been found that injury of the optic nerve in this fish species causes Pax2+ reactive astrocytes involved in the initial stages of optic nerve axon regeneration to increase in number, especially in the area of the head and the proximal part of the optic nerve. As the optic nerve in trout is damaged, a significant growth of the heterogeneous population of Pax6+ cells occurs in the brain divisions that have direct retinal inputs, diencephalon, and optic tectum. A part of the Pax6+ cells have an undifferentiated phenotype and are a component of reactive neurogenic niches located in the periventricular zone and parenchymal regions of the brain. Another population of Pax6+ cells has the radial glial phenotype and appears as a result of activation of the constitutive neurogenic domains also within the newly formed reactive neurogenic niches. Thus, due to the optic nerve injury, a pronounced neurogenic response associated with the appearance of reactive neurogenic niches and radial glia arises both in the brain divisions with direct retinal projections and in those lacking the retinal projections as well as in remote regions. The results obtained indicate that the damage to the optic nerve causes an increased reactive neurogenesis in the brain of adult trout.

Keywords: transcription factor, Pax2, Pax6, optic nerve, reparative neurogenesis, radial glia, constitutive and reactive neurogenic niche