

МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ
И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

УДК 591

ЦИСТАТИОНИН β -СИНТАЗА В МОЗГЕ ФОРЕЛИ *ONCORHYNCHUS*
MUKISS ПРИ ОДНОСТОРОННЕМ ПОВРЕЖДЕНИИ ГЛАЗА
И В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

© 2019 г. Е. В. Пушина^{a, b, *}, А. А. Варакин^b, Д. К. Обухов^c

^aНациональный научный центр морской биологии ДВО РАН,
Россия, 690041, Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17

^bИнститут физиологии им. А.А. Богомольца,
Украина, 01024, Киев, ул. Богомольца, д. 4

^cСанкт-Петербургский государственный университет,
Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

*E-mail: puschina@mail.ru

Поступила в редакцию 28.09.2018 г.

После доработки 14.11.2018 г.

Принята к публикации 20.11.2018 г.

Экспрессии цистатионин β -синтазы (CBS) в мозге взрослой форели в условиях нормы и через 1 нед. после повреждения глаза была оценена методом вестерн блот анализа. Исследование распределения CBS в интактном мозге форели и после механической травмы глаза в конечном мозге, тектуме, мозжечке и стволе мозга проводили методом иммунопероксидазного маркирования на свободноплавающих срезах. Результаты исследования показали увеличение экспрессии CBS в различных отделах головного мозга после травмы глаза. В зрительном проекционном центре мозга – тектуме после травмы были выявлены клетки радиальной глии, экспрессирующие CBS. Появление CBS+ гетерогенной радиальной глии в тектуме форели после травмы глаза свидетельствует о способности реактивных нейральных стволовых клеток (НСК) к синтезу сероводорода. В пролиферативных зонах мозжечка (заслонке) и конечного мозга (вентральная область) были обнаружены CBS+ волокна и клетки. В тегментуме интактной форели экспрессия CBS выявлена в крупных нейронах дорсальной области и пролиферативных зонах. После травмы глаза в стволе мозга появляются реактивные нейрогенные ниши, а в перивентрикулярной зоне CBS-иммунопозитивность не выявляется. Усиление экспрессии H_2S -продуцирующего фермента CBS после травматического воздействия возможно связано с нейропротекторными функциями сероводорода, реализующимися в матричных зонах мозга, связанных с репаративным нейрогенезом. В результате культивирования клеток мозга форели было зарегистрировано формирование нейросфероподобных комплексов, часть которых в монослое обладала CBS-иммунопозитивностью.

Ключевые слова: сероводород, цистатионин β -синтаза, зрительный нерв, репаративный нейрогенез, радиальная глия, нейросфероподобный комплекс, первичная культура клеток

DOI: 10.1134/S0475145019020046

ВВЕДЕНИЕ

За последние два десятилетия появляется все больше сведений об участии сероводорода (H_2S) в

Сокращения: CBS– – цистатионин β -синтаза-негативный; CBS+ – цистатионин β -синтаза-позитивный; K^+ АТР – АТФ-чувствительные калиевые каналы; Вд – дорсальная зона вентральной области конечного мозга; ГАМК+ – гамма-аминомасляная кислота-иммунопозитивные клетки; ДТЯ – дорсальные ядра тегмента; Дц – центральная зона дорсальной области конечного мозга; ЕОП – единицы оптической плотности; ИГХ – иммуногистохимия; МРФ – мезэнцефалическая ретикулярная формация; МС – маргинальный слой; НСК – нейральные стволовые клетки; ОН – оптический нерв; ОП – оптическая плотность; ОС – слой оптических волокон; ОТ – оптический тектум; ПА – парвальбумин; ПА+ – парвальбумин-иммунопозитивные клетки; ПВЗ – перивентрикулярная зона; ПВС – перивентрикулярный слой; РГ – радиальная глия; РФ – ретикулярная формация; СВЗ – субвентрикулярная зона; ЦСБС – центральный серый и белый слой; ЦСС – центральный серый слой.

различных биологических процессах. H_2S экспрессируется в мозге, выполняя ряд функций, как в нормальных условиях, так и при различных патологических состояниях (Nagpure, Bian, 2015). В настоящее время исследуются возможности применения медленно высвобождающих доноров H_2S при терапевтической коррекции различных заболеваний ЦНС, включающих болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, ишемический инсульт и травматическое повреждение головного мозга (Zhang, Bian, 2014). Установлены нейропротекторные свойства H_2S , в частности, его антиоксидантные, противовоспалительные и антиапоптотические эффекты в условиях патологии (Wang et al., 2014).

H_2S модулирует нейропередачу, воздействуя на глутаматные NMDA-рецепторы и вторичные

посредники, повышая внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} и модулируя внутриклеточное содержание цАМФ (Zhang, Bian, 2014). В различных отделах головного и спинного мозга молоди сими *Oncorhynchus masou* CBS-продуцирующие нейроны и волокна могут быть пространственно сопряжены с парвальбумин- и ГАМК-продуцирующими системами (Пушина, Вараксин, 2011; Пушина и др., 2011).

Наряду с другими газотрансмиттерами – окисью азота (NO) и монооксидом углерода (CO), H_2S рассматривается в качестве газообразного посредника и эндогенного нейромодулятора, играющего существенную роль в развитии некоторых патофизиологических состояний ЦНС, в частности вторичного воспаления (Wang et al., 2014). При острых нарушениях нейрональной деятельности, в частности при инсульте, травматическом повреждении головного и спинного мозга, ключевую роль играют процессы вторичного повреждения нейронов. Эндогенный уровень H_2S в головном мозге значительно выше, чем в периферических тканях, и в основном формируется за счет энзима цистатионин β -синтазы (CBS) в астроцитах и высвобождается в ответ на возбуждение нейронов. Механизм вторичного повреждения нейронов, усиливающий эффект, возникающий в результате травматического воздействия, включает в себя нарушение мозговой микроциркуляции, опосредованное глутаматной эксайтотоксичностью, окислительным стрессом, воспалительными реакциями и апоптозом нейронов на фоне усиления синтеза кальция. H_2S расширяет сосуды головного мозга, активируя АТФ-чувствительные калиевые каналы (K^+ АТР) на гладкомышечных клетках. В ходе этого процесса происходит модификация специфических S-сульфидрированных цистеиновых остатков белков K^+ АТР каналов (Wang et al., 2014). При травме H_2S противодействует эффектам, возникающим вследствие распространения глутаматной эксайтотоксичности путем подготовки астроцитов для приема большего количества глутамата из внеклеточного пространства и увеличивая синтез глутатиона в нейронах.

Ранее нами было установлено, что в результате механической травмы глаза в интегративных центрах (тектуме и мозжечке) мозга форели *Oncorhynchus mykiss* возникает пролиферативный ответ (Pushchina et al., 2016) и усиливается экспрессия транскрипционных факторов – Pax2 в зрительных нервах и Pax6 в мозге (Pushchina et al., 2018). После механического повреждения глаза в зрительном тектуме форели было зарегистрировано появление клеток радиальной глии (РГ), экспрессирующих ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) и Pax6, увеличение количества пролиферирующих клеток в паренхиме тектума и

мозжечке, а также возникновение реактивных нейрогенных ниш в областях мозга как имеющих направленные ретинальные входы, так и не имеющих прямых связей с сетчаткой (Pushchina et al., 2016, 2018). Участие сероводорода в антиапоптотических, антиоксидантных и противовоспалительных функциях при церебральной ишемии в настоящее время показано на млекопитающих (Palencia et al., 2015). Установлено, что H_2S ослабляет течение воспалительных реакций (Sodha, Sellke, 2015). Однако, несмотря на данные, полученные в клинических исследованиях и в экспериментах *in vitro* указывающие на возможность использования H_2S для лечения травмы мозга и/или ишемии-реперфузии органов (Wu et al., 2015), основные механизмы данных явлений остаются плохо изученными.

После механической травмы конечного мозга у данио *Danio rerio* и молоди сими *Oncorhynchus masou* происходит активное замещение утраченных нейронов за счет пролиферативной активности нейроэпителиальных клеток и РГ в перивентрикулярной зоне (Ogino et al., 2016; Pushchina et al., 2017). Однако пока не ясно, какие именно сигнальные механизмы, участвуют в активации стволовых клеток после травмы (реактивная пролиферация) и в производстве новых нейронов (регенеративный нейрогенез) из клеток предшественников. В наших предыдущих исследованиях было показано, что у рыб в пролиферативных зонах мозга активно экспрессируется CBS (Пушина, Вараксин, 2011). Наличие H_2S -продуцирующего энзима в пролиферативных зонах мозга, вероятно связано с участием H_2S в конститутивном нейрогенезе.

Исследование свойств клеток ЦНС *in vitro* у форели (Pushchina et al., 2016) и сими (Pushchina et al., 2015b, c) показало их способность к пролиферации и нейрональной дифференцировке. Клетки различных отделов мозга форели в культуре экспрессировали PCNA и формировали нейросфероподобные комплексы (Pushchina et al., 2016). В исследованиях на симе было установлено, что среди суспензионных клеток мозга после 3–4 дней культивирования появляются PCNA+, NuCD+ и CBS+ популяции (Pushchina et al., 2015c). Данные о культивировании клеток мозга аптеронотуса *Apteronotus leptorhynchus* (Hinsch, Zupanc, 2006) показывают, что при добавлении эмбриональной сыворотки в культуральную среду, клетки, изолированные из матричных зон мозжечка способны к дифференцировке в GFAP+ астроциты, виментин+ клетки, NuCD+ нейроны и MAP2+ нейроны (микротубулин ассоциированный протеин 2). В исследовании на аптеронотусе было установлено, что клетки мозжечка и дорсальной зоны теленцефалона способны к формированию нейросфер (Hinsch, Zupanc, 2007).

Учитывая, что репаративный нейрогенез в мозге рыб, в отличие от млекопитающих, идет достаточно интенсивно (Kuritsis et al., 2012; Ogino et al., 2016; Pushchina et al., 2016), мы использовали ранее разработанную модель повреждения глаза для оценки изменения уровня экспрессии CBS в пролиферативных зонах интегративных центров мозга взрослой форели *Oncorhynchus mykiss* до и после травматического повреждения. Исследование свойств клеток мозга форели *in vitro*, в частности способности первичной культуры клеток мозга к пролиферации и синтезу CBS, являлось одной из задач настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе было использовано 70 особей форели *Oncorhynchus mykiss*, в возрасте 15–18 мес. Животные были получены с Рязановского экспериментально-производственного рыбоводного завода в 2018 г. Массово-размерные характеристики животных составляли 280–350 г и 30–36 см соответственно. Для адаптации форель содержали в аквариумах с пресной водой при температуре 16–17°C, с одноразовым кормлением. Соотношение освещенного и темного периодов в сутках составляло 14/10 ч, и содержание растворенного кислорода в воде – 7–10 мг/дм³, что соответствует нормальному насыщению. Все экспериментальные манипуляции с животными были проведены в соответствии с правилами, регулируемые уставом Национального научного центра морской биологии ДВО РАН и Этической комиссией ННЦМБ ДВО РАН, регламентирующего гуманное обращение с экспериментальными животными. Животные были анестезированы в растворе трикаин метансульфоната MS222 (Sigma, США) в течение 10–15 мин.

Механическое повреждение глаза и подготовка материала для ИГХ исследования. Механическая травма правого глаза форели была произведена в соответствии с ранее описанной методикой (Пущина и др., 2016; Pushchina et al., 2016, 2018). С помощью стерильной иглы (Carl Zeiss, Oberkochen, Германия) 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. Контралатеральный зрительный нерв использовали в качестве контроля. После нанесения механического повреждения животных содержали в аквариуме с пресной водой для восстановления и дальнейшего мониторинга.

Иммуногистохимия. Для исследования локализации H₂S-продуцирующих клеток и волокон в конечном мозге, тектуме, мозжечке и стволе мозга форели использовали иммунопероксидазное

маркирование на замороженных свободно плавающих срезах мозга. Оценка активности CBS проводили через 1 нед. после нанесения механического повреждения.

Для идентификации H₂S-продуцирующих клеток и волокон в конечном мозге, тектуме, мозжечке и стволе мозга форели использовали метод непрямого авидин-биотин-пероксидазного (ABC метод) мечения (Пущина и др., 2011). Иммуномаркирование CBS проводилось как на интактных животных, так и через 1 неделю после нанесения механического повреждения. Мозг 5 интактных животных и 5 рыб после травмы фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2) в течение 2 ч при 4°C. Материал промывали в течение 1 сут в 30%-ном растворе сахарозы и готовили на криостате (Cryo-Star HM 560 MV; Германия) поперечные срезы толщиной 50 мкм. Для блокирования активности эндогенной пероксидазы срезы инкубировали в 1%-ном растворе перекиси водорода на 0.1 М фосфатном буфере в течение 30 мин. Срезы мозга толщиной 50 мкм инкубировали *in situ* с моноклональными антителами мыши против цистатионин β-синтазы (Abcam, ab54883, Великобритания) в разведении 1 : 200 при 4°C в течение 48 ч. Далее срезы инкубировали с разведенными биотинилированными вторичными антителами лошади против иммуноглобулинов мыши (Vector Labs, Burlingame, США) в течение 2 ч при комнатной температуре; промывали в трех сменах 0.1 М фосфатного буфера по 5 мин. Иммуногистохимическую реакцию проявляли с помощью стандартной авидин-биотиновой системы визуализации ABC (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, Burlingame, США). Для выявления продуктов реакции срезы инкубировали в субстрате для выявления пероксидазы (VIP Substrate Kit, Vector Labs, Burlingame, США), контролируя процесс развития окраски под микроскопом, срезы промывали и монтировали на предметные стекла, обезжизивали по стандартной методике и заключали в среду BioOptica (Milano, Италия).

Для оценки специфичности иммуногистохимической реакции использовали вестерн иммуноблоттинг, а также метод негативного контроля. Срезы мозга вместо первичных антител инкубировали с 1%-ной неиммунной сывороткой лошади в течение 1 сут и далее проводили как с первичными антителами. Во всех контрольных экспериментах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

При ИГХ маркировании CBS были идентифицированы волокна, тела клеток и их отростки, что дало возможность классифицировать CBS-иммунопозитивные элементы в соответствии с ранее описанной нейрохимической классификацией (Пущина и др., 2011). В соответствии с данной классификацией идентифицированы пять кле-

точных типов: I тип – сверхкрупные мультиполярные клетки с 1–5 первичными дендритами, размером тела от 40 мкм и более (у форели не были выявлены); II – крупные и среднего размера клетки с тремя или более дендритами, размер клеточного тела составляет 25–40 мкм; III тип – среднего размера клетки с 1–3 отростками, лишены варикозных утолщений и размером тела 15–25 мкм; IV тип – мелкие клетки округлой, овальной либо биполярной формы тела размером 6–15 мкм. Клетки, размеры тела у которых не превышали 6 мкм, классифицировались нами как сверхмалые и были отнесены к V типу.

Для сравнительной характеристики интенсивности маркирования CBS в мозге рыб контрольной группы и после повреждения использовалось измерение оптической плотности продуктов ИГХ маркирования CBS. Измерения оптической плотности проводили с помощью программы Axiovision на базе инвертированного микроскопа Axiovert Arotome 200 M. На основании данных денситометрического анализа определены различные уровни активности CBS в клетках. Эти данные, наряду с морфометрическими параметрами клеток (размерными характеристиками тела клеток), были использованы для классификации и типизации клеток, вновь образованных в период протекания репаративного нейрогенеза в пролиферативных зонах, а также дефинитивных центрах мозга. Уровень оптической плотности в CBS+ клетках оценивали по следующей шкале: высокий (160–130), средний (130–100), умеренный (100–80), слабый (80–50 ЕОП), а ее исходное значение измеряли на контрольных препаратах.

Вестерн иммуноблоттинг. Для вестерн блот анализа 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-НСI (pH 7.2) буфер. Мозг животных извлекали из черепа в 0.01 М Трис-НСI (pH 7.2) буфер и акуратно отделяли конечный мозг, зрительный тектум, ствол мозга и мозжечок.

Образцы конечного мозга, тектума, мозжечка и ствола мозга контрольных животных и аналогичные отделы мозга форели, взятые через 1 нед. после повреждения глаза быстро охлаждали и гомогенизировали в трехкратных объемах охлажденного на льду буфера в стеклянном гомогенизаторе Potter-Elvehim PTFE (Sigma, Aldrich, США). Буфер для гомогенизации содержал 20 мМ Трис-НСI буфера (pH 7.2) с добавлением 0.25 мМ сахарозы, 10 мМ ЭГТА, 2 мМ ЭДТА, и ингибиторы протеаз: 2 мМ PMSF, 50 мг/мл лейпептина, 25 мг/мл аprotинина, 10 мг/мл пепстатина, и 2 мМ дитиотреитола. Образцы гомогенатов мозга форели

центрифугировали в течение 15 мин при $15000 \times g$ в роторе Beckman Coulter Ti50. Содержание CBS определяли в гомогенатах мозжечка, конечного мозга, тектума и ствола головного мозга. Аликвоты гомогенатов в объеме 50 мг наносили на полосу движения белка и разделяли электрофорезом с помощью додецилсульфата натрия (SDS PAGE) на 10% полиакриламидном геле. После электрофореза выделенный белок акуратно переносили на нитроцеллюлозную мембрану и оставляли на ночь в 0.01 М Трис-НСI буфере (pH 8.0) с добавлением 0.15 М NaCl, содержащим 4% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США). Мембраны промывали в дистиллированной воде и инкубировали с первичными моноклональными антителами мыши против CBS (Abcam, ab54883, UK; в разведении 1 : 100) в 0.01 М Трис-НСI буфере, содержащим 1% БСА и 0.2% Tween 20 в течение 3 ч при комнатной температуре. Затем мембраны промывали при встряхивании в 0.01 М Трис-НСI буфере, содержащем 0.2% Tween-20 и инкубировали с вторичными антителами лошади против антител мыши (Vector Labs, Burlingame, США) в том же буфере в течение 1 ч. После трехкратных промывок в течение 10 мин каждая, мембраны помещали в 0.01 М Трис-НСI буфер (pH 7.2). Иммуногистохимическую реакцию проявляли с помощью авидин-биотиновой системы визуализации ABC (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, Burlingame, США). Для выявления продуктов реакции применялся субстрат красного цвета (VIP Substrate Kit, Cat. No. SK-4600; Vector Labs, Burlingame, США). После развития окраски мембраны промывали в дистиллированной воде и высушивали. Для количественной оценки полученных блоты сканировали с помощью денситометра Bio-Rad GS 670 (США).

Молекулярная масса CBS, содержащей 551 аминокислотный остаток, сравнивалась с предварительно окрашенными маркерами молекулярной массы (Sigma, США) и соответствовала 63 кДа.

Первичная культура клеток мозга форели. Для исследования свойств ЦНС взрослой форели *in vitro* была получена первичная культуры клеток всего головного мозга с последующим культивированием этих клеток в течение 4 дней и ИГХ оценкой экспрессии PCNA в культуре клеток. Животных подвергали эвтаназии путем быстрой декапитации. Головной мозг асептически извлекали и промывали в стерильном 0.1 М фосфатном буферном растворе (PBS). Измельченную ткань мозга переносили в стерильную пробирку объемом 15 мл и трижды промывали в PBS. Клеточная суспензия была получена путем дезагрегации с трипсином (0.25 или 0.025%) (Sigma, США) или коллагеназой (Sigma, США) (28U или 56U). Ткань мозга инкубировали с ферментами на водяной бане при 28°C в течение 15 мин, затем переносили в стерильные пробирки объемом 50 мл.

Процесс дезагрегации приостанавливали путем перемещения ткани мозга в среду Лейбовица (L-15; Gibco Laboratories, США) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma, США) и 0.4% коктейля из пенициллина/стрептомицина (Gibco Laboratories, США) в соответствии с ранее описанным протоколом (Pushchina et al., 2015c, 2016).

Полученную суспензию клеток мозга собирали в пробирки для центрифугирования в течение 5 мин, затем осторожную извлекали сгустки плавающих клеток с помощью пипетки. Суспензию центрифугировали в роторе (Beckman Coulter Ti50, США) при $200 \times g$ в течение 5 мин, супернатант отделяли от осадка. Плотность клеток в осадке составляла (5×10^5 клеток/мл). Полученную суспензию клеток головного мозга пересаживали в небольшие культуральные дуплексные пластиковые чашки (Carl Zeiss, Германия) диаметром 35 мм и содержали в CO_2 инкубаторе при $28^\circ C$ в течение 4 дней. В течение всего времени культивирования проводился видеомониторинг состояния культивируемых клеток с помощью инвертированного микроскопа исследовательского класса Axiovert Arotome 200 M (Carl Zeiss, Германия) в режиме проходящего света и фазового контраста.

Иммуноцитохимическое выявление CBS и PCNA в первичной культуре клеток мозга форели. Для исследования способности клеток мозга взрослой форели к формированию нейросфер *in vitro*, была получена первичная культура клеток мозга, за которыми осуществлялся мониторинг в режиме фазового контраста в течение 4 дней, после чего был проведен анализ экспрессии CBS в монослойной и суспензионной фракциях клеток. После 4-х дней культивирования, клетки головного мозга были подготовлены для иммуноцитохимического анализа в соответствии со стандартным протоколом. Суспензионную и монослойную фракции разделяли и обрабатывали отдельно. Клетки суспензионной фракции центрифугировали в роторе (Beckman Coulter Ti50) при $250 \times g$ в течение 5 мин. Клетки монослоя в специализированных культуральных чашках (duplex dishes; Carl Zeiss; Германия) фиксировали в 4%-ом растворе параформальдегида, приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2) в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего аккуратно промывали в 0.1 М фосфатным буфере. Для инактивации эндогенной пероксидазы в соответствии с ускоренным протоколом, клетки инкубировали в 3%-ом водном растворе перекиси водорода в течение 3–5 мин, после чего аккуратно промывали в буфере. Для устранения фонового окрашивания, клетки инкубировали в 1%-ом растворе нормальной сыворотки лошади, приготовленной на 0.1 М фосфатном буфере. Далее их инкубировали с первичным моноклональными антителами мыши

против цистатионин β -синтазы (Abcam ab54883, UK; 1 : 200) и пролиферативного ядерного антигена PCNA (Santa Cruz Biotech, США, 1 : 300) в течение 1 ч при $37^\circ C$, с последующим промыванием в 0.01 М фосфатном буфере. На следующем этапе клетки инкубировали с вторичными биотинилированными антителами в течение 10 мин (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, Burlingame, CA, США) и промывали в буферном растворе. Далее следовал этап инкубации клеток с реагентом Vectastain Elite ABC (Vector Labs, Burlingame, CA, США) в течение 5 мин с последующей промывкой в буфере. Продукты иммуноцитохимической реакции (ИЦХ) в клетках визуализировали с помощью субстрата для выявления пероксидазы (VIP Substrate Kit, Vector Labs, Burlingame, США), после развития окраски клетки промывали в фосфатном буфере. Микроскопический анализ иммуномаркированных клеток проводили в условиях водной иммерсии в культуральных чашках (duplex dishes) на специализированном инвертированном микроскопе Аксиоверт 200 М (Carl Zeiss, Германия).

Клетки суспензионной популяции после центрифугирования помещали на покрытые поли-L-лизинном предметные стекла и фиксировали в 4%-ом растворе параформальдегида в течение 30 мин при комнатной температуре; и далее обрабатывали в соответствии с вышеприведенным протоколом. После процедуры ИЦХ маркирования клетки суспензионной фракции инкубировали в субстрате для проявления пероксидазы (VIP Substrate Kit, Vector Labs, Burlingame, США) в течение 10 мин; контролируя процесс развития окраски под микроскопом. Далее клетки на предметных стеклах промывали в трех сменах фосфатного буфера, высушивали при комнатной температуре, обезживали с использованием стандартной техники и заключали под покровные стекла в среду BioOptica (Милан, Италия). Для оценки специфичности ИЦХ реакции, использовали метод негативного контроля. Клетки инкубировали в среде, содержащей 1% неиммунной сыворотки лошади (вместо первичных антител) в течение 2 ч, а затем проводились все вышеперечисленные манипуляции в соответствии со стандартной методикой. Во всех контрольных экспериментах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

Анализ формирования нейросфер. Формирование нейросфер выполнялось под анкерным контролем в независимых условиях на метилцеллюлозе (Sigma, США). В частности, клетки первичной культуры мозга обрабатывали трипсином-ЭДТА или коллагеназой (Sigma, США), а затем культивировали в 24-луночных планшетах (duplex dishes; Carl Zeiss; Германия) 500 клеток/луночку на среде Лейбовица (L-15; Gibco Laboratories, США) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma, США), без добавления ростовых фак-

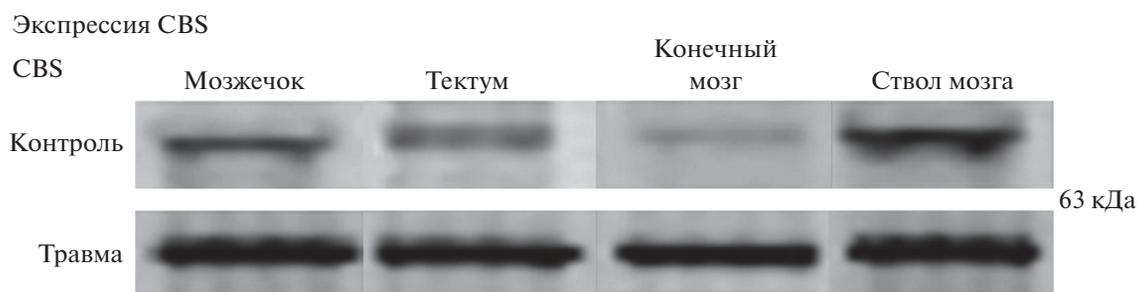


Рис. 1. Репрезентативное изображение иммуноблотов содержания цистатионин β -синтазы в мозге форели *Oncorhynchus mykiss*. Одиночная полоса протеина, соответствующая молекулярной массе 63 кДа, присутствовала в мозжечке, зрительном тектуме, теленцефалоне и стволе мозга форели у контрольных (интактных) животных и через 1 неделю после повреждения зрительного нерва.

торов. После 4-дневного культивирования количество и размер неадгезионных нейросфер идентифицировали и фотографировали с помощью микроскопа Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Германия). Нейросферы, размеры которых превышали 50 мкм были независимо подсчитаны во всех вариантах эксперимента не менее трех раз.

Морфометрическая обработка. Морфометрическую обработку осуществляли с помощью программного обеспечения инвертированного микроскопа Axiovert 200 M с модулем ApoTome и цифровыми камерами Axio Cam MRM и Axio Cam HRC (Carl Zeiss, Германия). Измерения проводили при 20 \times , 40 \times и 63-кратном увеличении в пяти случайно выбранных полях зрения для каждой области исследования.

Статистическая обработка. Количественная обработка морфометрических данных ИГХ маркирования CBS проведена с помощью программ Statistica 10 и Microsoft Excel 2010. Для количественной оценки результатов использован ANOVA-тест; данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Оценка экспрессии цистатионин β -синтазы в мозге форели в условиях нормы и при повреждении глаза методом вестерн иммуноблоттинга. Эндокс цистатионин β -синтаза представляет собой тетрамер, связывающий два субстрата (гомоцистеин и серин) и три дополнительных лиганда (коэнзим пиродоксаль 5'-фосфат, аллостерический активатор S-аденозилметионин и гем). Оценка содержания CBS методом вестерн блот анализа показала наличие протеина с молекулярной массой 63 кДа во всех отделах головного мозга форели. Количественное содержание CBS в различных отделах мозга форели в условиях нормы и после механической травмы глаза приведено на рис. 1. Максимальный уровень экспрессии CBS у интактных животных был выявлен в стволе мозга, мини-

мальный – в конечном мозге. В мозжечке и тектуме присутствовал средний уровень экспрессии CBS. После механической травмы глаза во всех отделах головного мозга наблюдалось значительное повышение уровня экспрессии CBS (рис. 1).

2. Односторонняя механическая травма глаза. Травматическое повреждение глаза приводило к значительным функционально-морфологическим перестройкам в различных анатомических отделах зрительного нерва: головке, интраорбитальном сегменте, проксимальной и дистальной частях. В результате травматического повреждения глаза в поврежденном зрительном нерве наблюдалось значительное увеличение количества Pax2+ астроцитов (Pushchina et al., 2018) и нейролин-экспрессирующих клеток (Pushchina, Varaksin, 2019). 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 (Пушина и др., 2016).

3. ИГХ цистатионин β -синтазы в мозге форели. В мозжечке интактной форели наблюдался умеренный исходный уровень активности CBS (рис. 1). Отдельные тонкие CBS+ волокна были обнаружены в базальной части гранулярного слоя (табл. 1; рис. 2а). Здесь же были выявлены немногочисленные мелкие гранулярные CBS+ клетки, одиночные, либо формирующие небольшие скопления (табл. 1; рис. 2а). В дорсальной матричной зоне (ДМЗ) и молекулярном слое мозжечка интактной форели CBS-иммунопозитивность выявлена не была.

После повреждения в мозжечке форели значительная активность CBS определялась в молекулярном и гранулярном слоях заслонки (табл. 1; рис. 2б). В молекулярном слое CBS выявлена в клетках и волокнах (табл. 1; рис. 2в). Более интенсивное иммуномаркирование нейропилия опреде-

лялось в молекулярном слое. В распределении CBS+ клеток прослеживалась градиентность: более интенсивное иммуномаркирование выявлено в дорсальной части заслонки, менее интенсивное — в вентральной (рис. 2б).

В гранулярном слое тела мозжечка определялись интенсивно маркированные CBS+ клетки, лишенные отростков, удаленные на значительные расстояния друг от друга, либо формирующие плотные кластеры (рис. 2г). Интенсивность маркирования волокон в гранулярном слое изменялась от слабой до умеренной (табл. 1; рис. 2в).

Данные о частотном распределении CBS+ клеток на тест-поле, после одностороннего повреждения глаза представлены на рис. 2д. Наиболее многочисленные клетки (с диаметром тела 7 и 9 мкм) относились к IV типу, их средние параметры составляли $8.4 \pm 1.0/5.2 \pm 0.8$ мкм (рис. 2д). Менее многочисленные клетки других типов соответствовали 3-му ($15.9/11.7$ мкм), 4-му ($11.5/5.2$ мкм) и 5-му типам ($5.9/3.8$ мкм).

Результаты анализа распределений минимального и максимального значений оптической плотности (ОП) иммуномаркирования CBS в клетках молекулярного слоя представлено на рис. 2е; средний диапазон максимальной ОП составляет 2151 ± 244 ЕОП, а минимальной — 1435 ± 257 ЕОП. На диаграмме 2е приведено соответствие распределения ОП нормальному распределению (обозначены в виде красного и синего графиков) для каждого из проанализированных диапазонов. Таким образом, распределение активности CBS в молекулярном слое после повреждающего воздействия изменялось в достаточно широких пределах. Среднее значение ОП для молекулярного слоя заслонки составляло 1793 ± 158 ЕОП.

У контрольных животных в тектуме форели согласно результатам иммуноблоттинга выявлялся невысокий уровень активности CBS (рис. 1). В маргинальном слое идентифицированы слабо маркированные CBS мелкие овальные и круглые клетки, а также немногочисленные слабо маркированные волокна радиальной глии (табл. 1; рис. 3а, 3б). В центральном сером слое (ЦСС) и центральном сером и белом слое (ЦСБС) CBS-иммунопозитивность была выявлена в околядерной зоне мелких клеток 4-го и 5-го типов и радиальных волокнах (табл. 1; рис. 3а).

После травматического повреждения высокая иммунопозитивность CBS определялась в клетках РГ, расположенных в маргинальном слое (МС) (табл. 1; рис. 3в). Клетки РГ интенсивно иммуномаркированы CBS, так, что их морфология определялась, как при окраске по Гольджи (рис. 3г). Плотность распределения CBS+ РГ в тектуме у форели после травмы глаза по сравнению с интактными животными значительно возросла (рис. 3б, 3г).

Анализ частоты встречаемости клеток РГ с различными морфологическими параметрами представлен на рис. 3д; после травматического воздействия, диаметры тел маркированных клеток РГ составляли 5–12 мкм, тогда как у контрольных животных — 7–9 мкм соответственно (табл. 1). Частота встречаемости клеток РГ после травмы примерно одинаковая, за исключением клеток с диаметром сомы около 9 мкм. Такие клетки на срезах тектума преобладали (рис. 3д). Сравнительный анализ параметров РГ в контроле и после травмы глаза позволяет заключить, что в тектуме форели после повреждения глаза CBS-иммунопозитивность появляется в морфологически гетерогенной популяции клеток РГ.

Параметры ОП маркирования CBS в РГ тектума форели после повреждения представлены на рис. 3е. Денситометрическое исследование показало, что соотношения минимального и максимального значений ОП в клетках тектума носят более сложный характер, чем в клетках молекулярного слоя мозжечка (рис. 2е и 3е). Так в тектуме диапазон минимальных значений ОП имел несколько выраженных пиков распределения (рис. 3е) по сравнению с диапазоном максимальных значений ОП, имеющих только один пик и в большей степени соответствующий нормальному (Гауссову) распределению. Среднее значение диапазона максимальной ОП составляло 26.9 ± 5.7 ЕОП, а минимальной — 14.3 ± 6.6 ЕОП. Количественный анализ маркирования CBS в клетках РГ указывает на морфологическую и денситометрическую гетерогенность значений ОП маркированных клеток. Среднее значение ОП в РГ тектума форели после повреждения составляло 22 ± 2.8 ЕОП.

Данные иммуноблоттинга показали более интенсивную экспрессию CBS в стволе мозга интактных животных, по сравнению с другими отделами мозга форели (рис. 1). В клетках ретикулярной формации (РФ) ствола интактной форели определялось интенсивное и умеренное маркирование CBS (табл. 1; рис. 4а). Клетки перивентрикулярной области среднемозгового тегмента форели также имели высокую интенсивность маркирования CBS (табл. 1; рис. 4б). В нейронах тегментальной области активность CBS была высокой, либо умеренной (табл. 1; рис. 4б).

После повреждения количество клеток, маркированных CBS в дорсальном тегменте значительно возросло (рис. 4в). В клетках перивентрикулярной зоны, напротив, после травмы CBS не экспрессировалась (рис. 4в). Часть крупных нейронов дорсо-медиальной зоны имела низкую интенсивность иммуномаркирования CBS, либо была иммунонегативной (рис. 4в). У CBS+ клеток маркировались тела и не определялись отростки клеток. В случае умеренного либо слабого имму-

Таблица 1. Морфометрические параметры CBS+ клеток ($M \pm SD$) в пролиферативных зонах и глубоких слоях мозга форели *Oncorhynchus mykiss* у интактных животных и после односторонней травмы глаза

Области мозга Тип клеток	Интактные животные		Повреждение зрительного нерва		интенсивность маркирования
	размеры клеток, мкм	интенсивность маркирования	тип клеток	размеры клеток, мкм	
Мозжечок					
Волокна гранулярного слоя	2.8 ± 1	+		2.8 ± 1.2	++/++++
Клетки гранулярного слоя	6.2 ± 0.7/6 ± 0.5 IV 5.2 ± 0.6/5 ± 0.6 V	+++ ++	IV	6.2 ± 0.7/4.7 ± 0.9	+++
Клетки молекулярного слоя	—	—	III IV IV V	15.9 ± 1.5/11.7 ± 0.5 11.5 ± 2.2/5.2 ± 0.4 8.4 ± 1/5.2 ± 0.8 5.9 ± 0.5/3.8 ± 0.6	+++ +++ ++++ ++
Оптический тектум					
Маргинальный слой	7.2 ± 0.8/5.8 ± 0.5	+	Радиальная глия	5.4 ± 0.7/3.7 ± 0.5	++
Радиальная глия	9.4 ± 0.5/6.2 ± 0.7	+		7.6 ± 1.2/5.6 ± 0.8 9.2 ± 0.8/6.3 ± 0.6 12.1 ± 1.2/8.4 ± 0.7	++ +++ +++
Центральный серый слой	6.4 ± 0.6/5 ± 0.9 IV 4.8 ± 0.4/4.2 ± 0.7 V	+	Радиальные волокна, ядра клеток	1.5 ± 0.6 3.3 ± 0.3/2.8 ± 0.4	++ +++
Центральный серый и белый слой	6.1 ± 0.3/5.2 ± 0.4 IV 5.2 ± 0.4/4.6 ± 0.3 V	+	Радиальные волокна, ядра клеток	1.5 ± 0.6 2.8 ± 0.5/2.4 ± 0.7	++ +++
Ствол мозга					
Ретикулярная формация	21 ± 3/8.2 ± 2.9 III 18.8 ± 3.5/10.5 ± 3.1 III 8.2 ± 0.5/6.5 ± 1 IV	++++ +++ +++	II III IV	26.7 ± 1.8/16.8 ± 1 16.3 ± 2.6/14.1 ± 0.5 9.3 ± 1.4/7.4 ± 0.8	+++ ++++ +++
Дорсальные тегментальные ядра	35.7 ± 21.8/21.2 ± 7.8 II 16.7 ± 0.3/12.5 ± 0.6 III 5.8 ± 0.6/4.7 ± 0.7 V	+++ ++++ +++	II III IV	26.2 ± 1.5/14.8 ± 1.2 18.3 ± 0.9/16.1 ± 1.5 12.2 ± 1.2/11 ± 0.8	+++ +++ ++++
Теленцефалон					
Центральное скопление дорсальной области	8.2 ± 1.2/4.9 ± 1 IV 5.7 ± 1.3/3.4 ± 0.8 V	+ ++	V IV	5.3 ± 0.9/3.8 ± 0.7 10.2 ± 2/6 ± 0.9	+++ +++
Дорсальное скопление вентральной области	—	—	V	7.1 ± 1.2/4.1 ± 0.4	+++
Вентральное скопление вентральной области	—	—	IV V	8.9 ± 1.1/7 ± 1.6 5.9 ± 0.5/5.4 ± 0.4	+++ +++

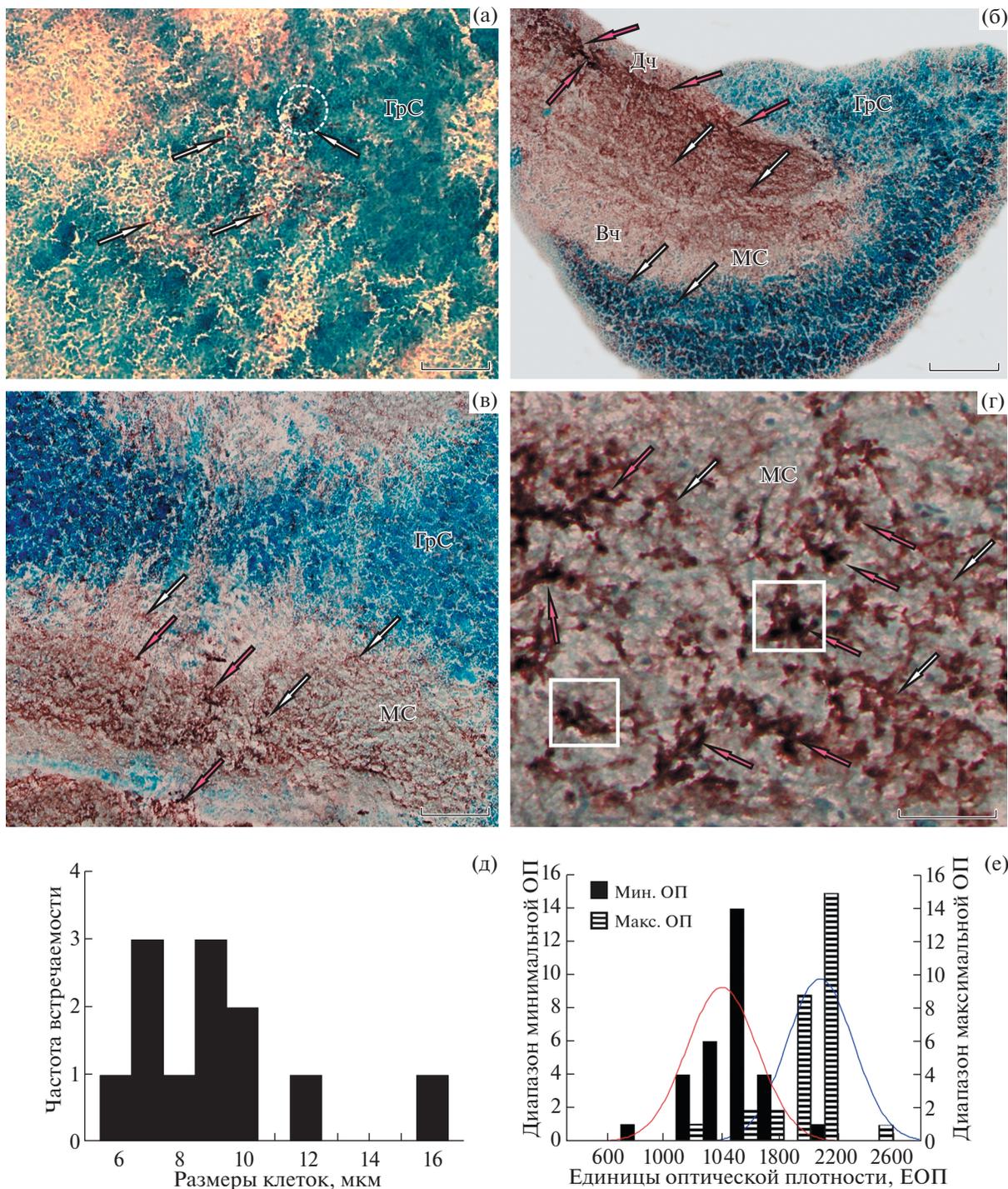


Рис. 2. Цистатионин β-синтаза в мозжечке интактной (а) форели *Oncorhynchus mykiss* и через 1 нед. (б–г) после травмы глаза. (а) – в гранулярном слое (ГрС) тела мозжечка, белыми стрелками показаны CBS+ волокна, пунктиром оконтурено скопление CBS+ клеток; (б) – в заслонке (продольная проекция), розовыми стрелками показаны CBS+ клетки в молекулярном слое (МС), Дч – дорсальная часть, Вч – вентральная часть; (в) – в толще заслонки (трансверсальная проекция); (г) – в гранулярном слое тела мозжечка, в белых квадратах скопления CBS+ клеток. Иммунопереоксидазное маркирование цистатионин β-синтазы в сочетании с окраской метиловым зеленым по Браше. Масштабный отрезок: (а–в) – 200 мкм, г – 50 мкм. (д) – полигон распределения частоты встречаемости CBS+ клеток с различными размерами клеточных сом на тест-поле в молекулярном слое мозжечка после травмы; (е) – диапазоны минимальной и максимальной частоты значений оптической плотности (ОП) иммуномаркирования CBS в клетках молекулярного слоя мозжечка после травмы глаза.

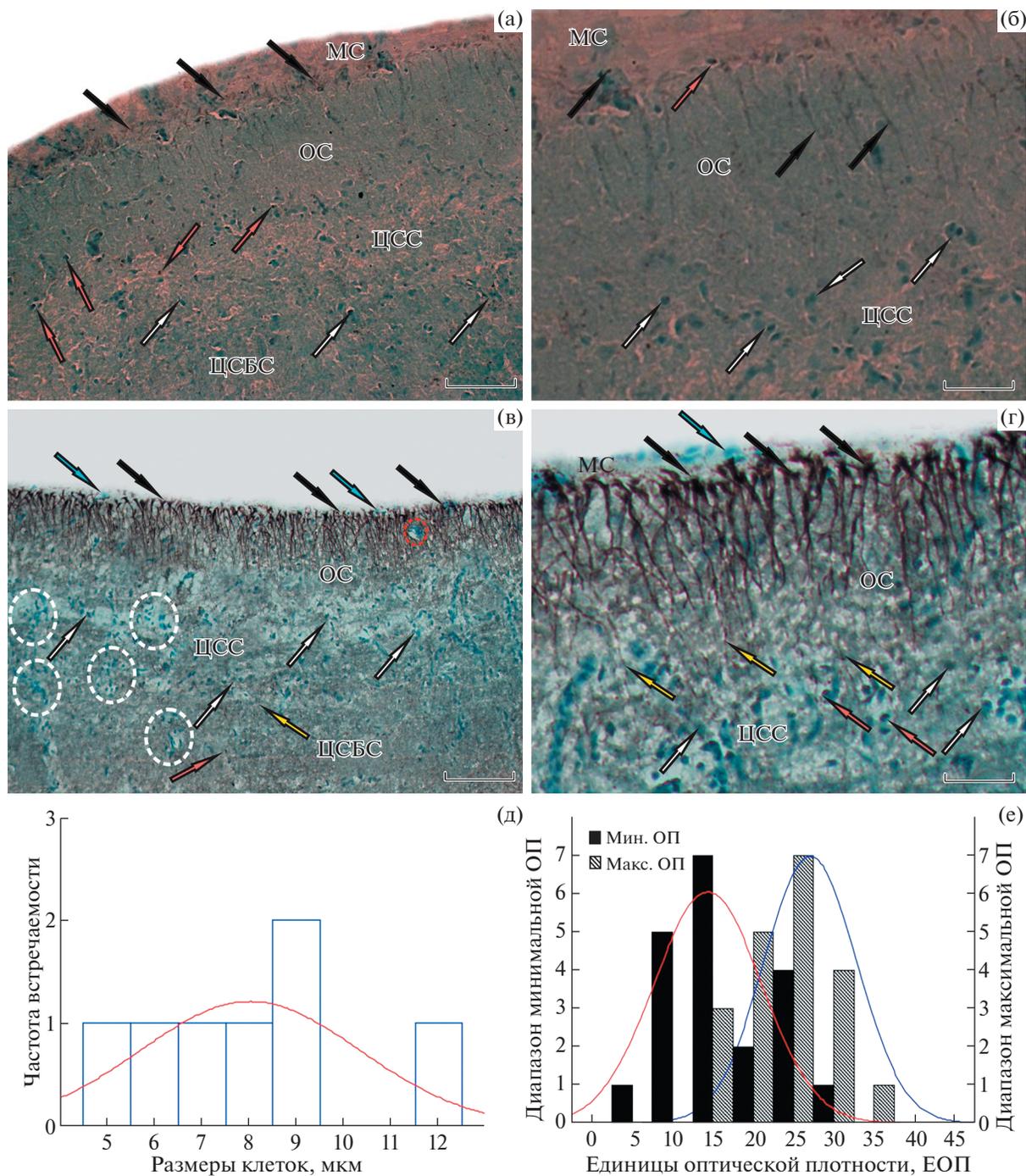


Рис. 3. Цистатионин β -синтаза в зрительном тектуме интактной (а, б) форели *Oncorhynchus mykiss* и через 1 нед. (в, г) после травмы глаза. (а) — слабое CBS иммуномаркирование в мелких клетках маргинального слоя (МС) показано черными стрелками, в толще слоя зрительных волокон (ОС) прослеживаются слабо маркированные волокна радиальной глии, в центральном сером слое (ЦСС) и центральном сером и белом слое (ЦСБС) CBS-иммунопозитивность выявлена в околядерной зоне мелких клеток 4-го (белые стрелки) и 5-го (красные стрелки) типов; (б) — фрагмент тектума на большем увеличении, CBS-клетки обозначены белыми стрелками; (в) — CBS+ радиальная глия (черные стрелки) и CBS-нейроэпителиальные клетки (голубые стрелки) в МС, реактивные нейрогенные ниши в МС (в красном овале) и в ЦСС (в белых овалах) содержат скопления CBS-реактивных нейробластов, отдельные CBS-клетки (белые стрелки) наряду с тонкими CBS+ волокнами РГ (желтые стрелки) пронизывают толщу тектума; (г) — фрагмент тектума на большем увеличении, красными стрелками показаны CBS+ фрагменты околядерной зоны клеток. Иммунопероксидазное маркирование цистатионин β -синтазы в сочетании с окраской метиловым зеленым по Бреше. Масштабный отрезок: (а, в) — 100 мкм, (б, г) — 50 мкм. (д) — полигон распределения частоты встречаемости CBS+ клеток радиальной глии с различными размерами клеточных сом на тест-поле в маргинальном слое зрительного тектума после травмы; (е) — диапазоны минимальной и максимальной частоты значений оптической плотности (ОП) иммуномаркирования CBS в клетках маргинального слоя зрительного тектума после травмы глаза.

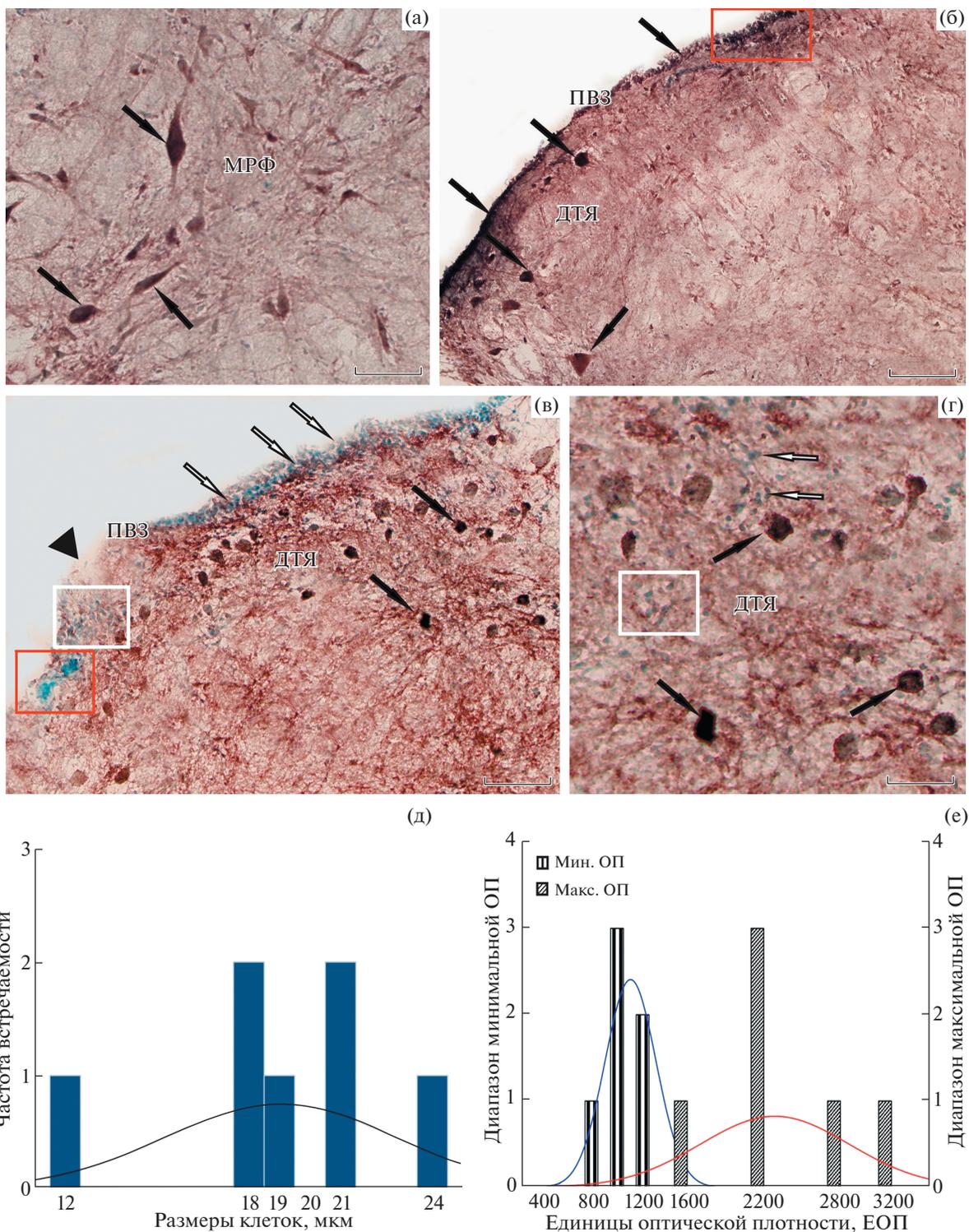


Рис. 4. Цистатионин β-синтаза в стволе мозга интактной (а, б) форели *Oncorhynchus mykiss* и через 1 нед. (в, г) после травмы глаза. (а) – CBS+ клетки (черные стрелки) в составе мезэнцефалической ретикулярной формации (МРФ); (б) – дорсальные ядра тегмента (ДТЯ), в красном прямоугольнике фрагмент перивентрикулярной зоны (ПВЗ), содержащий CBS+ клетки; (в) – в ДТЯ, белыми стрелками показаны CBS-клетки ПВЗ, черной треугольной стрелкой обозначен CBS-фрагмент, соответствующий границе мезэнцефалических нейромеров, в белом и красном прямоугольниках показаны CBS-реактивные нейрогенные ниши; (г) – фрагмент ДТЯ на большем увеличении, белыми стрелками показаны реактивные нейробласты. Иммунопереоксидазное маркирование цистатионин β-синтазы в сочетании с окраской метиловым зеленым по Браше. Масштабный отрезок: (а, г) – 50 мкм, (б, в) – 100 мкм. (д) – полигон распределения частоты встречаемости CBS+ клеток с различными размерами клеточных сом на тест-поле в ДТЯ после травмы; (е) – диапазоны минимальной и максимальной частоты значений оптической плотности (ОП) иммуномаркирования CBS в клетках ДТЯ после травмы глаза.

номаркирования ядра клеток отчетливо визуализировались, а при интенсивном маркировании клеток ядра не определялись (рис. 4г). CBS+ нейроны были окружены многочисленными мелкими иммунонегативными клетками, ядра которых окрашивались метиловым зеленым (рис. 4г). Подобные клетки встречались также в перивентрикулярной области. Мы полагаем, что данная популяция содержит реактивные мигрирующие клетки, появляющиеся после повреждающего воздействия из перивентрикулярной пролиферативной зоны. В перивентрикулярной зоне тегмента форели определялся участок лишенный перивентрикулярных клеток, соответствующий границе среднемозговых нейромеров (рис. 4в).

Среди иммунопозитивных клеток тегмента было выявлено 3 типа: крупные клетки (2-ого типа), размером $22.2 \pm 1.5/14.8 \pm 1$ мкм с высокой активностью CBS, клетки средних размеров (3-го типа) $18.3 \pm 0.9/16.1 \pm 1.5$ мкм с высокой либо умеренной активностью CBS и мелкие клетки (4-го типа) $12.2 \pm 1.2/11 \pm 0.8$ мкм с умеренной активностью CBS.

Диаграмма частотного распределения CBS+ клеток после травмы в тегменте форели приведена на рис. 4д. Наиболее часто встречались клетки 2-го и 3-го типов с большим диаметром 18 и 21 мкм соответственно, клетки с диаметром 12, 19 и 24 мкм встречались в два раза реже (рис. 4д). Денситометрическое исследование ОП иммуномаркирования CBS в дорсальном тегменте форели показало, что клетки этой области после травмы в достаточной степени гетерогенны (рис. 4е). Диапазон минимальной ОП был сравнительно узкий с выраженным пиком 1151 ± 198 ЕОП, максимальной ОП 2276 ± 581 ЕОП – более широким (рис. 4е).

Результаты иммуноблоттинга показали, что в теленцефалоне форели уровень экспрессии CBS в условиях интактности очень низкий (рис. 1а). У интактных животных в конечном мозге CBS+ клетки и волокна практически отсутствовали (рис. 5а), изредка встречались одиночные мелкие околядерные фрагменты овальной формы (табл. 1; рис. 5б).

После травмы в конечном мозге форели CBS-иммунопозитивные клетки выявлены в вентральной субвентрикулярной области (табл. 1; рис. 5в). CBS+ клетки располагались в виде небольших скоплений под слоем иммунонегативных клеток перивентрикулярной зоны (рис. 5в). Интенсивность иммуномаркирования клеток была очень высокой. В глубоких внутренних областях вентральной зоны (дорсальном ядре) выявлялись лишь одиночные мелкие интенсивно маркированные клетки (табл. 1; рис. 5в) 4-го типа, размером $7.1 \pm 1.2/4.1 \pm 0.4$ мкм, морфологически сходные с клетками субвентрикулярной области. В

субвентрикулярной и более глубоких областях дорсального ядра была обнаружена повышенная плотность распределения клеток (рис. 5в), в отдельных случаях можно было проследить ряды последовательно расположенных иммунонегативных клеток (рис. 5г). Мы полагаем, что подобный паттерн распределения клеток после повреждения связан с усиленной миграцией клеток из пролиферативной зоны, возникшей в результате травмы. Частота встречаемости CBS+ клеток показана на рис. 5д. Среди CBS+ клеток преобладают мелкие клетки 4-го типа, диаметром 7 мкм (рис. 5д). Результаты денситометрического исследования ОП в иммунопозитивных клетках теленцефалона форели после травмы приведены на рис. 5е. Диапазоны минимальных и максимальных значений ОП содержали по одному выраженному пику (рис. 5е). Среднее значение ОП в иммунопозитивных клетках вентрального теленцефалона составляло 1715 ± 188 ЕОП.

4. Мониторинг первичной культуры клеток мозга форели *in vitro*. Исследование первичной культуры клеток мозга форели в режиме фазово-контрастной микроскопии показало, что в процессе культивирования небольшая часть клеток осаждалась на поверхность культуральной посуды, формируя монослой, некоторые из таких клеток начинали формировать отростки (рис. 6а). Большая же часть клеток оставалась в суспензии (рис. 6б). Исследование состояния клеток в суспензии показало, что при различных режимах предварительной обработки ферментами (трипсином или коллагеназой), клетки склонны к образованию конгломератов (рис. 6в). Анализ клеточного состава конгломератов показал, что часть из них образована изометричными клетками, которые могут являться потомками одной клетки и, следовательно, представляют типичные нейросферы (врезка на рис. 6в). Другие типы конгломератов были образованы гетероморфными клетками, по всей видимости, вторично, вследствие изменения поверхностных свойств и адгезивности клеток в процессе получения первичной культуры (рис. 6в). В процессе культивирования довольно часто мы наблюдали митотические фигуры в суспензионной фракции клеток (рис. 6г). В результате морфометрического анализа клеток было установлено, что в суспензионной фракции присутствуют клетки 2–5 типов, согласно вышеописанной классификации (Пушина и др., 2011).

5. ИГХ верификация цистатионин β -синтазы в первичной культуре клеток мозга форели. После 4 дней культивирования клеток мозга форели был проведено ИГХ маркирование CBS монослойной и суспензионной клеточных фракций. В монослое были выявлены как CBS-позитивные, так и негативные клетки без отростков (рис. 7а). Клетки, находящиеся в начальной стадии формирования отростков были CBS-иммунонегативными

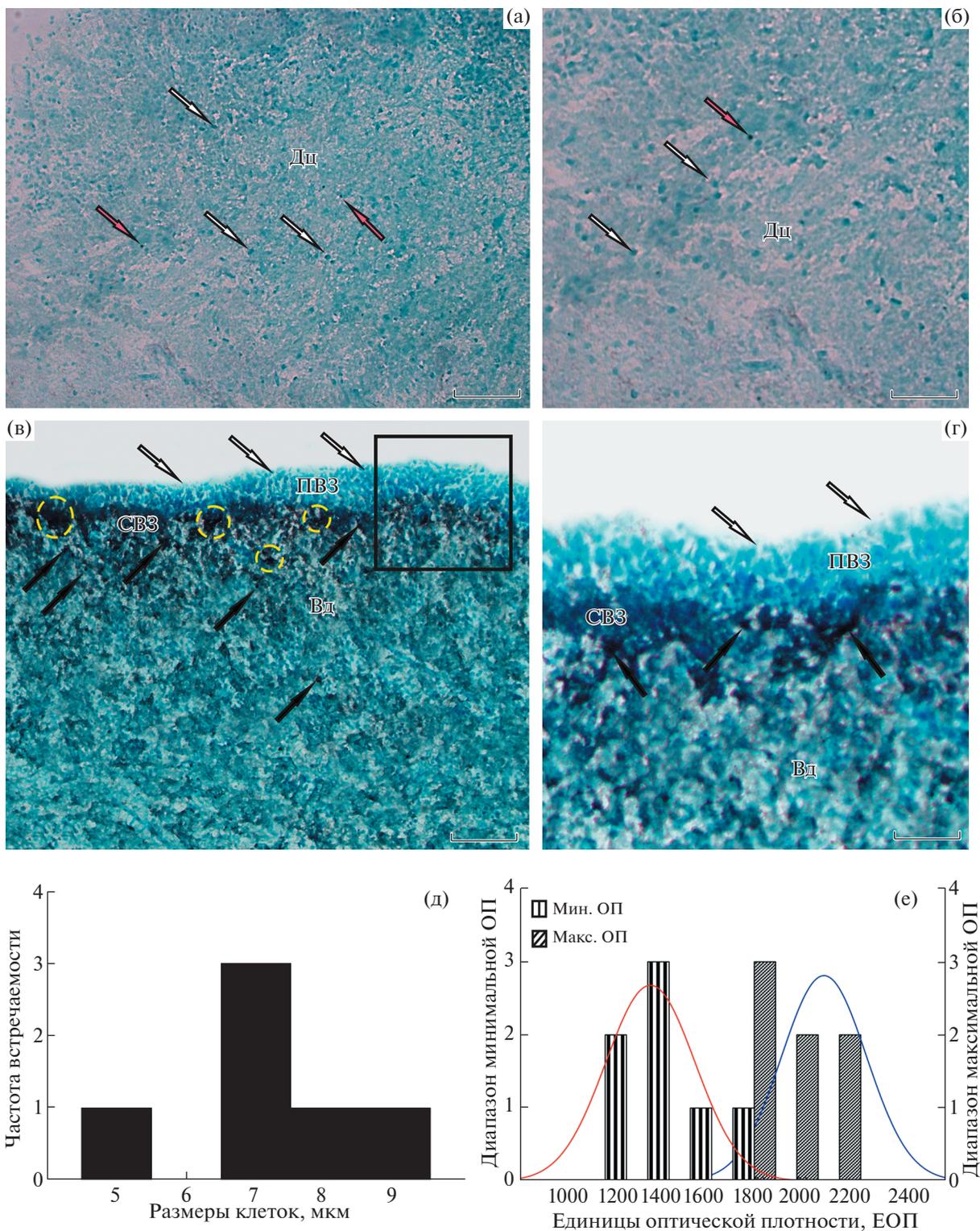


Рис. 5. Цистатионин β -синтаза в конечном мозге интактной (а, б) форели *Oncorhynchus mykiss* и через 1 нед. (в, г) после травмы глаза. (а) – CBS+ клетки (розовые стрелки) и CBS-клетки (белые стрелки) в центральной части дорсальной области (Дц); (б) – фрагмент Дц на большем увеличении; (в) – в дорсальной зоне вентральной области (Вд), в желтых овалах скопления CBS+ клеток в субвентрикулярной зоне (СВЗ); (г) – фрагмент, околнуренный черным квадратом на (в) на большем увеличении. Иммунопероксидазное маркирование цистатионин β -синтазы в сочетании с окраской метиловым зеленым по Браше. Масштабный отрезок: (а, в) – 200 мкм, (б, г) – 50 мкм. (д) – полигон распределения частоты встречаемости CBS+ клеток с различными размерами клеточных сом на тест-поле в Вд тельцефалона после травмы; (е) – диапазоны минимальной и максимальной частоты значений оптической плотности (ОП) иммуномаркирования CBS в клетках Вд тельцефалона после травмы глаза.

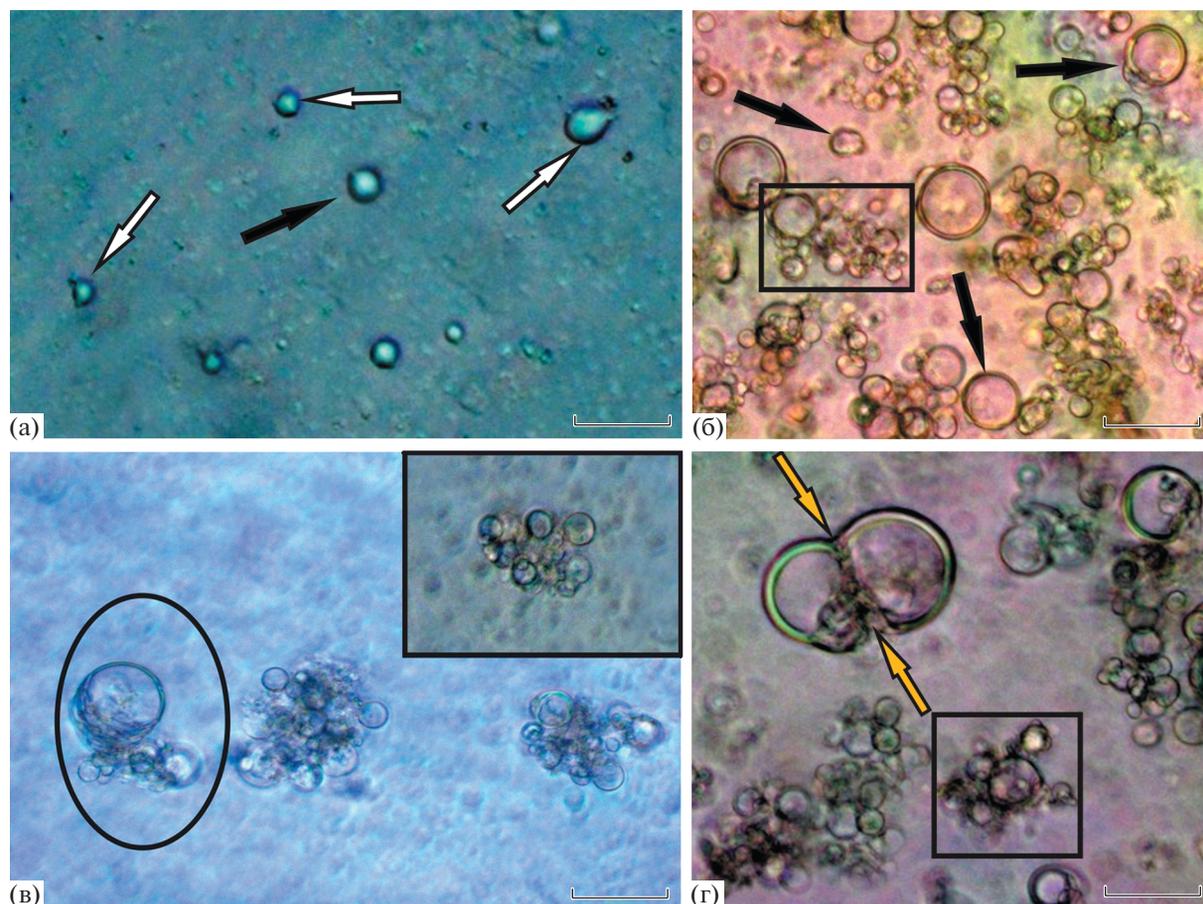


Рис. 6. Первичная культура клеток мозга форели *Oncorhynchus mykiss*. (а) – клетки в монослое показаны черными стрелками, белыми стрелками – клетки, начинающие формировать отростки; (б) – клетки первичной культуры в суспензии, в прямоугольнике показан конгломерат клеток; (в) – конгломераты клеток в первичной культуре (в овале), на врезке показан конгломерат изоморфных клеток в составе нейросферы; (г) – клетки суспензионной фракции в состоянии митоза (желтые стрелки), в прямоугольнике оконтурен клеточный конгломерат. Фазово-контрастная микроскопия. Масштабный отрезок 50 мкм.

(рис. 7б). CBS-позитивность обнаружена в клетках всех типов (табл. 2). Количество CBS+ клеток различных типов было неодинаково: большинство составляли клетки 4-го (38.9%) и 2-го (30.5%) типов (табл. 2). ОП CBS в клетках 3-го типа, составляла 123.2 ± 26.8 ЕОП (табл. 2) при численности клеток 3-го типа 18.6%. В наиболее крупных нейронах 1-го типа (рис. 7в), составляющих 5% от CBS+ клеток было выявлено 2 пика ОП фермента, первый – 175 ЕОП, второй – 78.7 ЕОП. В монослойной фракции клеток мозга форели также были обнаружены кластеры из 2-х CBS+ клеток с высокой активностью фермента (рис. 7г), образованные преимущественно клетками 3-го типа. Среди клеток 2-го типа максимальная ОП составляла 142 ЕОП, минимальная – 103.1 ЕОП. Среди других типов клеток были выявлены максимальные и минимальные показатели ОП маркирования CBS: в клетках 3-го они составили 142.3 ЕОП (макс.) и 77.4 ЕОП (мин.); у клеток 4-го типа 103.2 ЕОП (макс.) и 73 ЕОП (мин.); у клеток

5-го типа 100.5 (макс.) и 75.3 ЕОП (мин.) соответственно.

ИГХ анализ клеток суспензионной фракции выявил экспрессию CBS в клетках 2–5 типов. Морфометрические и денситометрические параметры CBS+ и CBS– клеток представлены в табл. 3. Большую долю CBS+ элементов (84.1%) составляют клетки 5 типа, имеющие наиболее высокие показатели ОП 112.3 ± 19.6 ЕОП (табл. 3). Доля клеток 4-го типа, с ОП 99.7 ± 26.4 ЕОП, составляла 14.8%, а 2-го и 3-го типов с ОП 65.0 и 67.2 ЕОП – 1.0% и 1.9% соответственно (табл. 3). Иммунонегативные элементы представлены клетками 2-го и 5-го типов с одинаковой долей равной 18.5%; клетки 3-го типа составляли 29%, а 4-го – 33.3% (табл. 3). При маркировании CBS в монослое были выявлены более крупные кластеры, образованные изоморфными клетками 4-го и 5-го типов, напоминающие нейросферы (рис. 8а).

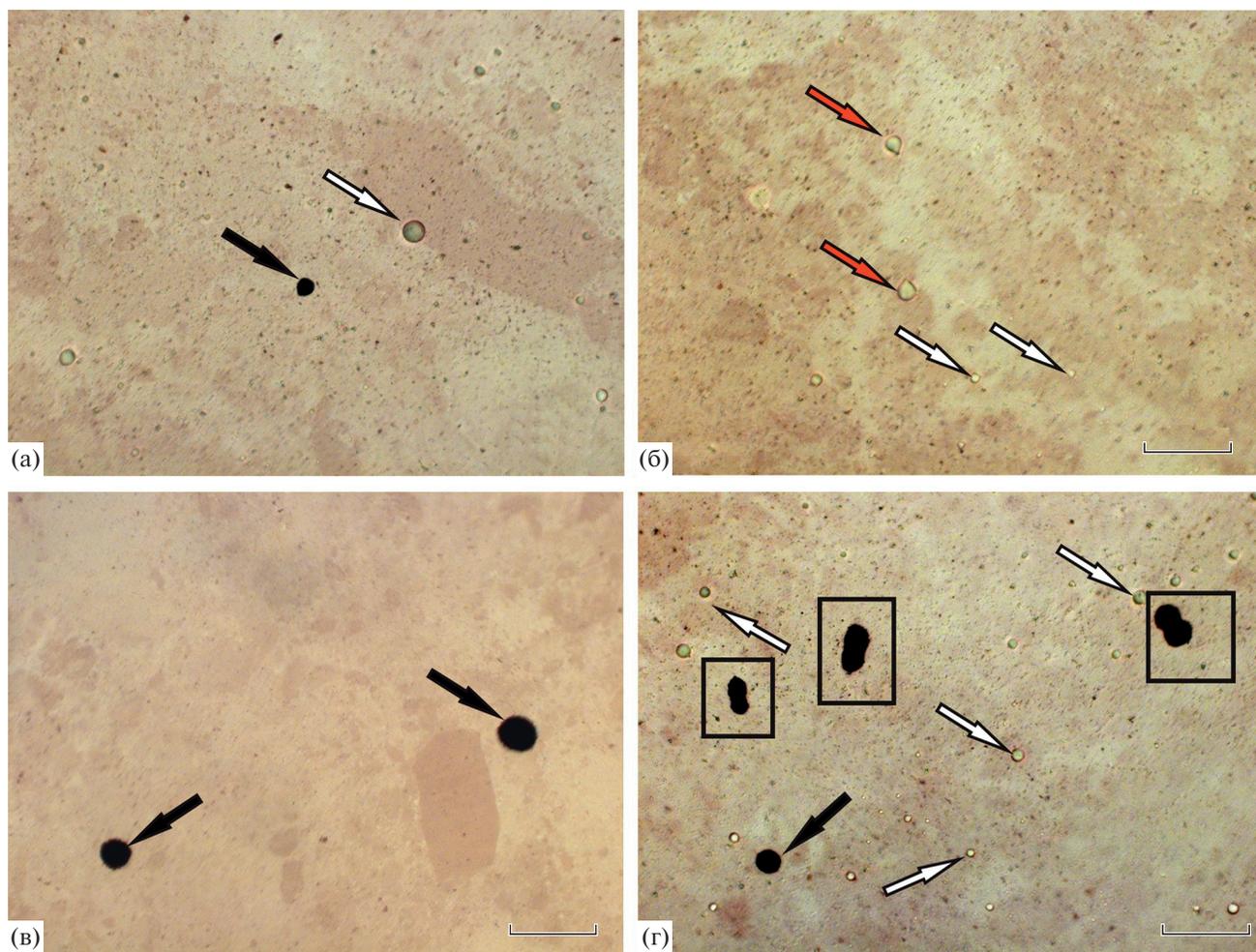


Рис. 7. Иммуногистохимическое маркирование цистатионин β синтазы в клетках первичной культуры мозга форели *Oncorhynchus mykiss*. (а) – CBS+ клетки в монослое (черная стрелка) и CBS-клетки без отростков (белые стрелки); (б) – CBS– клетки в начальной стадии формирования отростков (красные стрелки); (в) – CBS+ крупные нейроны 1-го типа (черные стрелки); (г) – CBS+ кластеры из двух клеток различных типов (в черных прямоугольниках). Иммунопероксидазное маркирование CBS в первичной культуре клеток мозга форели. Масштабный отрезок: 50 мкм.

Среди суспензионных CBS+ клеток также преобладали клетки 4-го и 5-го типов (рис. 8б). Маркирование PCNA клеток суспензионной фракции показало, что пролиферирующие клетки принадлежат к 4-му и 5-му типам (табл. 3, рис. 8в). В большинстве случаев такие клетки формировали нейросферы (рис. 8г). Данные количественного анализа PCNA+ и CBS+ клеток приведены на

диаграмме 8д. Соотношение PCNA+ и CBS+ клеток в мозге форели количественно совпадало (рис. 8д). Таким образом, результаты культивирования клеток мозга форели свидетельствуют, что клетки различных типов сохраняют способность к пролиферации и экспрессии CBS в условиях *in vitro*. Другим важным заключением является способность *in vitro* мелких пролиферирующих

Таблица 2. Морфометрические параметры CBS+ клеток первичной культуры мозга форели в монослое

Типы клеток	Большой и малый диаметры тел клеток, мкм	Доля клеток, %	Оптическая плотность, ЕОП
1	44 ± 2.07/31.61 ± 6.82	5	126.8 ± 68
2	24.78 ± 4.44/16.57 ± 5.34	30.5	110.7 ± 15.6
3	16.70 ± 1.28/11.63 ± 2.26	18.6	123.2 ± 26.8
4	12.32 ± 1.28/9.27 ± 2.21	38.9	85.4 ± 15.8
5	8.91 ± 0.66/6.97 ± 1.24	6.7	86 ± 11.4

Таблица 3. Морфометрические параметры PCNA+, CBS+ и CBS– клеток первичной культуры мозга форели в суспензии

типы клеток	CBS- клетки		CBS+ и PCNA+ клетки		
	большой и малый диаметры тел клеток, мкм	доля клеток, %	большой и малый диаметры тел клеток, мкм	доля клеток, %	оптическая плотность, ЕОП
1	—	—	—	—	—
2	24.9 ± 4.9/17.2 ± 3.6	18.5	23.1 ± 2.4/17.3 ± 1.6	1	65 ± 2.7
3	17.5 ± 1.5/13.5 ± 3.2	29.6	18.4 ± 0.9/16.5 ± 3.1	1.9	67.2 ± 2.2
4	12.7 ± 1.2/9.4 ± 1.2	33.3	11.7 ± 1.5/9.5 ± 1.7	14.8	99.9 ± 26.4
5	8.5 ± 1.2/7.1 ± 1.2	18.5	11.7 ± 1/9.2 ± 1.8*	14.4*	120.8 ± 15.5*
			6.8 ± 1.7/5.6 ± 1.5	84.1	112.3 ± 19.6
			6.9 ± 1.6/5.9 ± 1.4*	88.4*	113.2 ± 8.4*

* Параметры PCNA+ клеток.

клеток в мозге форели формировать нейросферы и экспрессировать CBS.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мозг рыб обладает способностью синтезировать фермент синтеза сероводорода цистатионин β -синтазу (CBS) в различных функциональных комплексах головного мозга у взрослых животных (Пушина и др., 2011). В различных отделах головного и спинного мозга CBS-продуцирующие нейроны и волокна могут быть пространственно сопряжены с парвальбумин- и ГАМК-продуцирующими системами (Пушина, Вараксин, 2011; Пушина и др., 2011). Перивентрикулярные зоны мозга рыб, расположенные вдоль rostro-каудальной оси мозга, находятся в состоянии конститутивного нейрогенеза и содержат пролиферирующие PCNA-позитивные клетки, которые участвуют в построении многокомпонентных структур ретикулярной формации ствола, осуществляющей контроль над двигательной активностью и иннервируют туловищно-хвостовую мускулатуру, объем которой у лососевых рыб возрастает в течение всей жизни (Pushchina et al., 2017). На территории промежуточного мозга перивентрикулярные пролиферативные зоны участвуют в пополнении клеточного состава крупных сенсорных проекционных центров таламуса, таких как ядра преломерулярного и претектального комплексов (Pushchina, 2012; Pushchina et al., 2012). Наряду с пролиферирующими клетками в пролиферативных зонах мозга лососевых рыб установлено наличие газотрансмиттеров, в частности NO и H₂S (Пушина, Вараксин, 2011; Пушина и др., 2012). В пролиферативных зонах мозга рыб показано наличие и других морфогенетических факторов: транскрипционного фактора Pax6 (Pushchina et al., 2012, 2018) и классических нейротрансмиттеров и ГАМК (Pushchina et al., 2017).

Маркирование CBS в мозге интактной форели.

Результаты настоящего исследования показали, что у взрослой интактной форели базовый уровень синтеза H₂S в интегративных центрах мозга — мозжечке, тектуме, конечном мозге и стволе мозга отличается, однако CBS экспрессируется во всех центрах мозга, что согласуется с ранее полученными данными на симе *O. masou* и карпе *Cyprinus carpio* (Пушина и др., 2011). Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают ранее полученные данные о межвидовых отличиях активности CBS в мозге рыб. Мы полагаем, что такие отличия могут коррелировать с возрастными особенностями, в частности, у молоди симы наблюдалось более интенсивное маркирование CBS в мозжечке, тектуме и конечном мозге, чем у форели. Интенсивность иммуномаркирования CBS в мозге карпа в большой степени соответствовала результатам иммуномаркирования интактной форели, однако, межвидовые особенности, у этих видов также были выявлены.

В целом, результаты иммуноблоттинга и ИГХ маркирования CBS в мозге интактной форели свидетельствуют о выраженной экспрессии в стволе мозга (крупно- и гигантоклеточной части РФ), и умеренной активности в мозжечке и зрительном тектуме, что соответствует данным ИГХ маркирования CBS у молоди симы (Pushchina et al., 2017).

Результаты иммуномаркирования CBS в конечном мозге интактной форели, напротив показали низкий уровень экспрессии фермента в клетках центральной зоны (Дц) и отсутствие иммуномаркирования в перивентрикулярной зоне теленцефалона, что подтверждается также данными иммуноблоттинга, свидетельствующими о низкой экспрессии CBS в теленцефалоне форели. Данные на форели существенно отличаются от результатов иммуномаркирования в конечном мозге симы, у которой были выявлены CBS+ биполярные и овальные нейроны среднего и мелко-

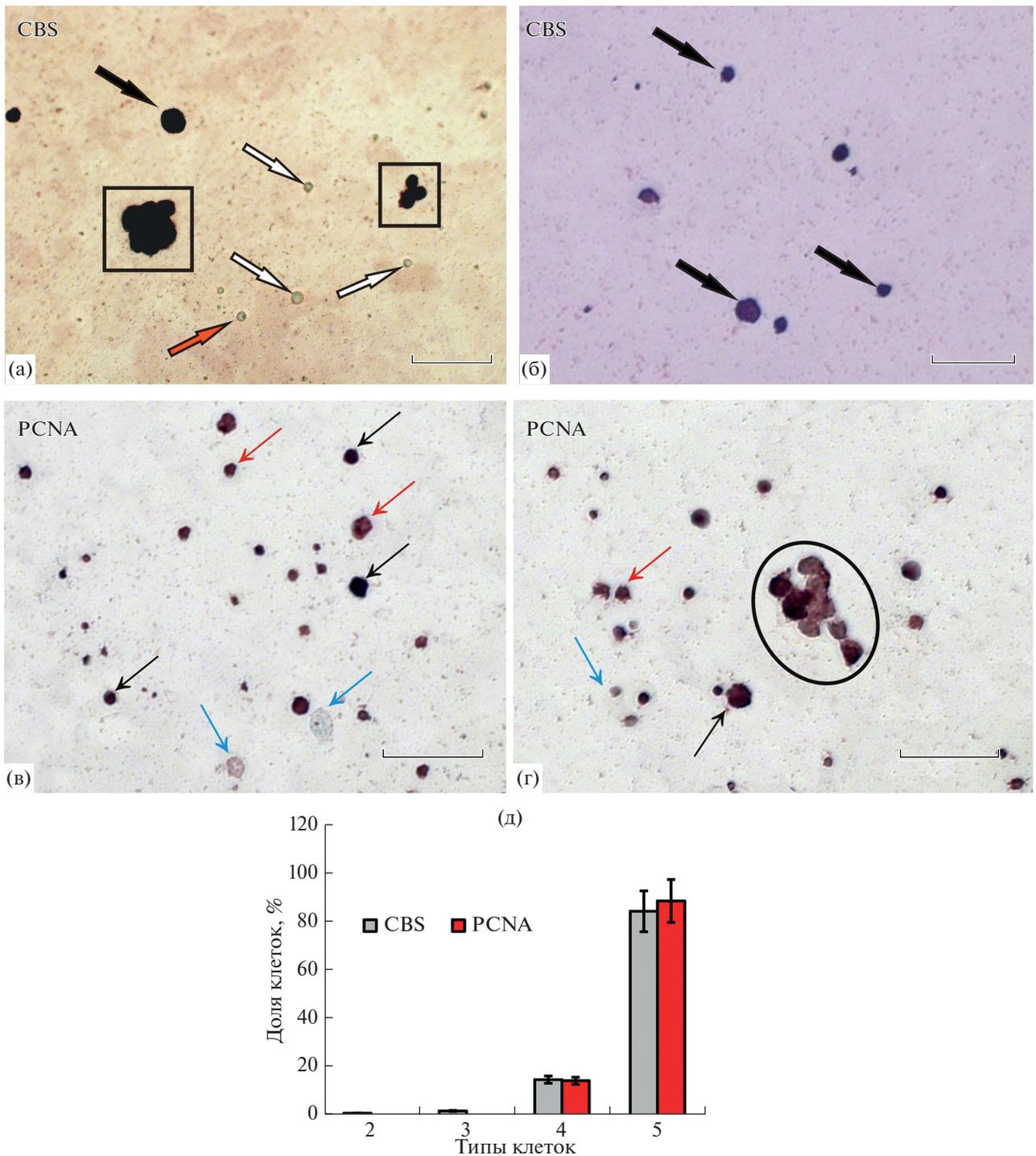


Рис. 8. Иммуногистохимическое маркирование цистатинин β -синтазы и пролиферативного ядерного антигена (PCNA) в клетках первичной культуры мозга форели *Oncorhynchus mykiss*. (а) – CBS+ кластеры изоморфных клеток в монослое, формирующие нейросфероподобные комплексы (в черных прямоугольниках), клетки начинающие формировать отростки показаны красными стрелками, CBS– клетки – белыми стрелками; (б) – CBS+ клетки в суспензии (черные стрелки); (в) – PCNA+ клетки в суспензии, черными стрелками показаны интенсивно маркированные клетки, красными – умеренно маркированные, голубыми – PCNA– клетки; (г) – нейросфероподобный комплекс PCNA+ клеток (в черном овале). Иммунопероксидазное маркирование CBS и PCNA в первичной культуре клеток мозга форели. Масштабный отрезок: 50 мкм. (д) – количественное соотношение CBS+ и PCNA+ клеток различных типов в суспензионной фракции первичной культуры клеток мозга форели.

го размера в дорсальной зоне (Пушина и др., 2011; Pushchina et al., 2017). Мы полагаем, что отличия в маркировании CBS в теленцефалоне интактной форели могут быть обусловлены снижением интенсивности конститутивного нейрогенеза в матричных зонах теленцефалона взрослой форели и более интенсивными процессами постэмбрионального нейрогенеза у молодежи симы. В этой связи целесообразно предположение, что особенности экспрессии CBS в мозге растущей молодежи отличаются от условий синтеза H_2S в мозге более взрослой форели. В целом, снижение конститутивных нейрогенных процессов в мозге рыб коррелирует с уменьшением экспрессии CBS.

Маркирование CBS в мозге форели после травматического повреждения глаза. После одностороннего повреждения глаза данные иммуноблоттинга и ИГХ маркирование в интегративных центрах мозга форели свидетельствуют о существенном повышении экспрессии CBS во всех областях мозга. В результате травматического повреждения значительно возрастает общее количество CBS+ клеток и волокон, а также многократно увеличивается число маркированных клеток в матричных зонах мозга, отсутствующих у интактных животных.

В мозжечке было выявлено появление активности CBS в клетках гранулярного и молекулярного слоев, и волокнах и клетках мозжечковой заноски, которое не определялось у интактных животных. Данные иммуноблоттинга свидетельствуют о значительном повышении продукции CBS в мозжечке форели после травмы. Мы полагаем, что общее увеличение синтеза CBS, диагностируемое методом вестерн иммуноблоттинга, в посттравматический период связано с интенсификацией активности CBS-продуцирующих систем в различных клетках молекулярного и гранулярного слоев мозжечка, а также синтеза CBS в матричных зонах. Очевидно, что появление многочисленных H_2S -продуцирующих клеточных комплексов связано с развитием воспалительной реакции (Sodha, Sellke, 2015). В настоящее время установлено участие H_2S в антиапоптотических, антиоксидантных, а также противовоспалительных функциях при церебральной ишемии (Palencia et al., 2015). Показано, что H_2S ослабляет течение воспалительных реакций у крыс (Sodha, Sellke, 2015). Мы полагаем, что многократное увеличение продукции H_2S в мозжечке форели после травмы связано с нейропротекторным и противовоспалительным ответом. Травматическое повреждение глаза приводит к развитию общего воспалительного ответа в мозге форели, в частности в областях, связанных с пролиферативной активностью.

Данные иммуноблоттинга показали, что в **тектуме** форели после травмы наблюдается значительное увеличение уровня синтеза CBS. Результаты ИГХ маркирования показали, что после

травматического повреждения глаза в МС тектума резко возрастает количество CBS+ клеток с фенотипом РГ. Данные морфологического анализа свидетельствуют о гетерогенности популяции CBS-продуцирующей РГ, отсутствующей у интактных животных. Другим важным эффектом после одностороннего повреждения глаза форели является появление CBS-реактивных ниш, локализованных в МС и более глубоких слоях тектума и отсутствующих у интактных животных. Полученные результаты свидетельствуют, что в результате травмы гетерогенная популяция РГ, которая в настоящее время рассматривается в качестве НСК, начинает экспрессировать CBS. Мы полагаем, что усиленная экспрессия CBS в радиальной глии связана с участием H_2S в активации НСК после травмы (реактивная пролиферация) и в производстве новых нейронов (регенеративный нейрогенез) из клеток предшественников.

Результаты холмологических исследований показали, что оптический тектум является прямой проекцией сетчатки глаза и согласно нашей гипотезе, именно в данной области мозга мы ожидали реактивацию нейрогенных ниш, что подтверждает ранее полученные данные (Pushchina et al., 2018; Pushchina, Varaksin, 2019). Появление CBS+ гетерогенной радиальной глии в МС тектума форели после травмы глаза свидетельствует о способности реактивных НСК к синтезу H_2S .

В теленцефалоне форели, согласно данным иммуноблоттинга, после травмы глаза также было выявлено значительное усиление экспрессии CBS. Результаты ИГХ анализа свидетельствуют о существенном увеличении количества CBS+ клеток в субвентрикулярной зоне вентральной области (Вд). В посттравматический период было выявлено появление плотных CBS+ скоплений клеток, формирующих реактивные ниши в субвентрикулярной зоне. Таким образом, после травмы оптического нерва (ОН) в Вд зоне теленцефалона обнаружено значительное увеличение CBS+ клеток нейроэпителиального фенотипа, расположенных в областях реактивного нейрогенеза, и зонах миграции и дифференцировки нейронов, образованных в посттравматический период. В дорсальной зоне теленцефалона подобные эффекты выявлены не были.

В **стволе мозга** интактной форели, согласно данным иммуноблоттинга, выявлен высокий уровень экспрессии CBS. Данные ИГХ маркирования на срезах ствола мозга показали высокую и умеренную интенсивность маркирования в клетках РФ, дорсальных тегментальных ядер и перивентрикулярной зоны. Полученные результаты свидетельствуют, что H_2S -продуцирующие нейроны в стволе мозга форели также обеспечивают конститутивный уровень для нейрохимических взаимодействий, что подтверждает результаты

иммуномаркирования ГАМК и парвальбумина (ПА) в аналогичных комплексах ствола мозга молодежи симы (Пущина, Вараксин, 2011). В тегментуме симы были выявлены крупные CBS+, ГАМК+ и ПА+ клетки, локализованные в дорсомедиальных ядрах тегментума. Нейроны этого типа представляют собой наиболее ростральную популяцию крупных клеток ствола, участвующую у рыб в организации быстрых двигательных ответов (Braun et al., 1985). У симы, в отличие от карпообразных рыб, в базальном мезенцефалоне и миелэнцефалоне выявлена высокая степень колокализации кальций связывающего белка ПА и ГАМК (Пущина, Вараксин, 2011), что свидетельствует о значительном функциональном включении ПА в ГАМК-ергические системы мозга. Результаты исследований на симе показали, что, помимо ГАМК и ПА, крупные тегментальные нейроны могут содержать в себе H_2S . Мы полагаем, что наличие H_2S в клетках этого типа может выступать в качестве модулятора ГАМК-ергической передачи, а наличие в них ПА указывает на высокие уровни энергетического метаболизма и/или электрической активности.

Другой важной особенностью, обнаруженной как у интактной форели, так и у молодежи симы было наличие CBS+ клеток в перивентрикулярной зоне мезенцефалического тегментума. Мы связываем наличие CBS+ клеток в перивентрикулярной матричной зоне мозга форели с участием H_2S в процессах конститутивного нейрогенеза. Сходные паттерны распределения CBS+ клеток были также обнаружены у взрослого карпа (Пущина, Вараксин 2011). Результаты недавних исследований показали, что нейроны, вскоре после их образования из клеток-предшественников и задолго до формирования межнейронных связей и начала синаптогенеза, начинают секретировать характерные сигнальные молекулы (Ugumov, 2010). В качестве таких молекул могут выступать нейропептиды, ферменты синтеза “классических” нейромедиаторов, трансмембранные и везикулярные транспортеры. Большая часть сигнальных молекул участвуют в аутокринной и паракринной регуляции дифференцировки нейронов-мишеней, выступая в качестве морфогенетических или транскрипционных факторов (Pushchina et al., 2017). У млекопитающих время действия сигнальных молекул ограничивается определенными периодами онтогенеза, во время которых реализуется долгосрочное морфогенетическое влияние на дифференцировку нейронов-мишеней и экспрессию их специфического фенотипа (Ugumov, 2009). У рыб же процессы конститутивного нейрогенеза в перивентрикулярной области мозга продолжаются в течение всей жизни (Pushchina et al., 2017).

В стволе мозга форели, как и в других исследованных его отделах, после травматического по-

вреждения глаза уровень синтеза CBS повышается. Результаты ИГХ маркирования показывают, что CBS+ клетки в перивентрикулярной области после травмы исчезают, при этом, активность в крупных клетках дорсального тегментума и ретикулярной формации сохраняется. Таким образом, в стволе мозга форели после травмы ОН наблюдается изменение продуцирования CBS в клетках перивентрикулярной зоны. Как и в теленцефалоне, после травмы глаза CBS+ недифференцированные клетки с нейроэпителиальным фенотипом были выявлены в субвентрикулярной зоне мезенцефалического тегментума. Наряду с этим было обнаружено появление CBS-реактивных клеток в толще тегментума и ретикулярной формации. Мы полагаем, что в результате травматического повреждения происходит существенная перестройка активности CBS-продуцирующих систем в стволе мозга форели. Эти изменения связаны с реорганизацией конститутивных нейрогенных областей и реактивацией CBS+ клеток участвующих в противовоспалительной реакции в субвентрикулярной зоне.

Участие H_2S в антиапоптотических, антиоксидантных и противовоспалительных функциях при церебральных повреждениях в настоящее время установлено на млекопитающих (Wang, 2012; Palencia et al., 2015). Результаты настоящего исследования отличаются от данных, полученных на мышах, у которых также было показано изменение синтеза CBS после черепно-мозговой травмы (Zhang et al., 2013). Если через 12 ч после травмы мозга в коре и гиппокампе мышей наблюдалось резкое снижение уровня CBS, то дальнейшая динамика (на 3-ий день) была связана со значительным повышением экспрессии CBS в коре и менее выраженным в гиппокампе. Однако, через 1 нед. уровень CBS в коре возрастал практически до контрольного значения, а в гиппокампе оставался значительно ниже контрольного уровня (Zhang et al., 2013). Результаты биохимического анализа показывают значительное увеличение экспрессии CBS в различных отделах мозга форели через 1 нед. после травмы по сравнению с контрольным уровнем. Мы полагаем, что повышенная продукция H_2S создает благоприятные условия для клеточного микроокружения с выраженной нейропротекторной направленностью, облегчающими процесс репаративного нейрогенеза в матричных зонах мозга форели. Показано, что после механической травмы глаза у форели происходит активное замещение утраченных нейронов за счет пролиферативной активности нейроэпителиальных клеток и РГ в перивентрикулярной зоне тегтума (Пущина и др., 2016). Мы полагаем, что H_2S участвует в сигнальных механизмах, связанных с активацией НСК после травмы в тегтуме (реактивная пролиферация), и в производстве новых нейронов (регенеративный нейрогенез) из клеток

предшественников в теленцефалоне, мозжечке и матричных зонах ствола мозга.

После травмы мозга количество микроглии и лейкоцитов в поврежденном полушарии конечного мозга данио (Kyritsis et al., 2012) и кеты (Pushchina et al., 2015a) значительно увеличивается, и остается таким в течение нескольких дней. На основании увеличения экспрессии ряда провоспалительных цитокинов – IL-8, IL-1b и фактора некроза опухоли, после травмы можно увидеть быстрое развитие активного воспалительного ответа (Kyritsis et al., 2012). Эти данные подтверждают, что травма головного мозга рыб приводит к острому воспалительному ответу, который необходим для усиления пролиферации нейрональных клеток предшественников и последующего репаративного нейрогенеза.

Показано, что при индуцированном воспалении, как и при травматическом поражении мозга, у рыб наблюдается усиление пролиферации клеток-предшественников и, как следствие, увеличение количество новых нейронов (Kyritsis et al., 2012). Это позволяет предполагать, что воспалительный ответ может быть одним из молекулярных сигналов, которые неизбежно предшествуют активации клеток РГ, выполняющих в мозге рыб функции НСК (Ogino et al., 2016). В исследованиях на рыбах было показано, что воспаление необходимо для усиления пролиферации нейрональных клеток-предшественников и последующего нейрогенеза. Этот процесс, наблюдаемый после травмы ЦНС, запускается путем активации молекулярных программ, вызванных повреждением (Kyritsis et al., 2012). Исследования на млекопитающих показали, что острое воспаление препятствует взрослому нейрогенезу и регенеративным процессам (Kizil et al., 2012). Таким образом, в отличие от млекопитающих, у рыб, воспаление может рассматриваться как положительный регулятор регенерации нейронов в центральной нервной системе.

Экспрессия CBS в клетках мозга форели *in vitro*. Результаты культивирования клеток мозга форели показали, что клетки различных типов обладают отличающимися свойствами и сохраняют способность экспрессировать CBS при культивировании *in vitro*. Результаты нашего исследования согласуются с ранее полученными данными на форели (Pushchina et al., 2016) и молоди симы (Pushchina et al., 2015b, c). Учитывая предыдущие данные и результаты настоящего исследования можно заключить, что клетки мозга лососевых рыб сохраняют высокий пролиферативный потенциал при культивировании и способны к формированию нейросфероподобных комплексов (Pushchina et al., 2015b, c, 2016). Ранее нами было установлено, что у форели значительная пролиферативная активность характерна для суспензи-

онной фракции клеток (Pushchina et al., 2016). Такие клетки, как правило, принадлежали к 4-му и 5-му типу мелких недифференцированных клеток и входили в состав PCNA+ нейросфер. Наиболее интенсивно маркировались PCNA клетки диаметром менее 5 мкм, которые рассматриваются нами в качестве активно пролиферирующих НСК в матричных областях мозга форели (Pushchina et al., 2016).

Результаты настоящего исследования клеток мозга форели в первичной культуре и последующее ИГХ маркирование CBS показывают, что для клеточных форм различных типов, обнаруженных в монослое, характерна интенсивная экспрессия CBS. Крупные клетки 1-го и 2-го типов монослойной популяции интенсивно маркировались CBS. Такие клетки *in vivo* были наиболее характерны для стволовой части мозга и встречаются в составе РФ и ДТЯ. При культивировании *in vitro* они сохраняют CBS-иммунопозитивность. Ранее CBS+ клетки были обнаружены в первичной культуре головного и спинного мозга молоди симы (Pushchina et al., 2015c).

Линейные количественные корреляции в монослое были выявлены между клетками 4-го и 5-го типов у молоди симы, экспрессирующими маркеры нейрональной дифференцировки NuCD, транскрипционный фактор Pax6 и CBS (Pushchina et al., 2015b). Доля клеток 4-го типа, экспрессирующих данные маркеры у молоди симы, составляла от 15 до 20%, а клеток 5-го типа – около 80% (Pushchina et al., 2015b). Результаты настоящего исследования на форели показали, что CBS+ клетки 4-го и 5-го типов в монослое способны к формированию CBS+ нейросфероподобных комплексов. Эти данные дополняют полученные ранее результаты иммуномаркирования PCNA на первичной культуре клеток мозга форели (Pushchina et al., 2016) и свидетельствуют, что формирование нейросфероподобных комплексов характерно не только для мелких клеток суспензионной фракции, но и для более крупных клеток в монослое. Популяции клеток 4-го и 5-го типов способна экспрессировать CBS и видимо отличаются по свойствам от ранее идентифицированных нами у форели суспензионных клеточных форм, обладающих пролиферативной активностью и маркируемых PCNA (Pushchina et al., 2016).

В суспензионной фракции клеток форели популяция CBS+ клеток является гетерогенной. Анализ количественного соотношения CBS+ и PCNA+ суспензионных клеток показал высокую степень сходства в количественном распределении клеток 4-го и 5-го типов экспрессирующих этих маркеры у форели, что возможно указывает на колоколизацию данных маркеров. Эти результаты соответствуют ранее полученным данным на суспензионной фракции клеток спинного мозга

симы (Pushchina et al., 2015c). В суспензионной фракции клеток молоди симы ранее было установлено наличие PCNA+ нейросфер, обладающих свойствами стволовых клеток (Doe et al., 1998). Таким образом, результаты культивирования клеток мозга форели указывает на участие H₂S в конститутивном нейрогенезе, что согласуется с ранее полученными данными на молоди симы.

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

- Пущина Е.В., Вараксин А.А. Сероводород-, парвальбумин- и ГАМК-продуцирующие системы в головном мозгу лосося-симы // *Нейрофизиология*. 2011. Т. 43. № 2. С. 109–122.
- Пущина Е.В., Вараксин А.А., Обухов Д.К. Газообразные посредники в головном мозге симы *Oncorhynchus masou* (Salmoniformes, Salmonidae) // *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 2012. Т. 48. № 1. С. 85–95.
- 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., Вараксин А.А., Обухов Д.К. Цистатионин β-синтаза в ЦНС симы *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) и обыкновенного карпа *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) // *Нейрохимия*. 2011. № 1. С. 30–41.
- Пущина Е.В., Жарикова Е.И., Вараксин А.А. Персистентный и репаративный нейрогенез в теленцефалоне молоди симы *Oncorhynchus masou* при механической травме // *Онтогенез*. 2017. Т. 48. № 5. С. 359–374.
- Braun K., Scheich H., Schachner M., Heizmann C.W. Distribution of parvalbumin, cytochrome oxidase activity and 14C-2-deoxyglucose up-take in the brain of the zebra finch. I. Auditory and vocal motor systems // *Cell Tissue Res*. 1985. V. 240. P. 101–115.
- Doe C.Q., Fuerstenberg S., Peng C.Y. Neural stem cells: from fly to vertebrates // *J. Neurobiol.* 1998. V. 36. P. 111–127.
- Hinsch K., Zupanc G.K. Generation and long-term persistence of new neurons in the adult zebrafish brain: a quantitative analysis // *Neuroscience*. 2007. V. 146. P. 679–696.
- Kizil C., Kaslin J., Kroehne V., Brand M. Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish // *Dev. Neurobiol.* 2012. V. 72. P. 429–461.
- Kyrstis N., Kizil C., Zocher S., Kroehne V., Kaslin J., Freudenberg D., Iltzsch A., Brand M. Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain // *Science*. 2012. V. 338. P. 1353–1356.
- Nagpure B.V., Bian J.S. Brain, learning, and memory: role of H₂S in neurodegenerative diseases // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2015. V. 230. P. 193–215.
- Ogino T., Sawada M., Takase H., Nakai C., Herranz-Pérez V., Cebrián-Silla A., Kaneko N., García-Verdugo J.M., Sawamoto K. Characterization of multiciliated ependymal cells that emerge in the neurogenic niche of the aged zebrafish brain // *J. Comp. Neurol.* 2016. V. 524. P. 2982–2992.
- Palencia G., Medrano J.A., Ortiz-Plata A., Farfan D.J., Sotelo J., Sanchez A., Trejo-Solis C. Antipoptotic, anti-oxidant, and anti-inflammatory effects of thalidomide on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats // *J. Neurol. Sci.* 2015. V. 351. P. 78–87.
- Pushchina E.V. Neurochemical organization and connections of the cerebral preglomerular complex of the masu salmon // *Neurophysiology*. 2012. V. 43. № 6. P. 437–451.
- Pushchina E.V., Shukla S., Varaksin A.A. Cell proliferation and differentiation in primary cultures of the juvenile brain of the masu salmon *Oncorhynchus masou* // *Rus. J. Mar. Biol.* 2015c. V. 41. № 6. P. 499–502.
- Pushchina E.V., Shukla S., Varaksin A.A. Hydrogen sulfide in proliferating and differentiated cells in primary cultures of juvenile brain of masu salmon *Oncorhynchus masou* // *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2015b. V. 6. P. 539–545.
- 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.
- Pushchina E.V., Varaksin A.A., Obukhov D.K. The Pax2 and Pax6 transcription factors in the optic nerve and brain of trout *Oncorhynchus mykiss* after a mechanical eye injury // *Rus. J. Dev. Biol.* 2018. V. 49. № 5. P. 264–290.
- Pushchina E.V., Varaksin A.A. Neuroilin expression in the optic nerve and immunoreactivity of Pax6-positive niches in the brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after unilateral eye injury // *Neural Regen. Res.* [serial online]. 2019 [cited 2018 Nov 21]; 14: 156–171. Available from: <http://www.nrronline.org/text.asp?2019/14/1/156/243721>.
- Pushchina E.V., Varaksin A.A., Shukla S., Bulygyn D.A. Multiphoton confocal microscopy (*in vivo* imaging) in the study of early response of macrophages/microglia in damaged midbrain of juvenile chum salmon *Oncorhynchus keta* // *Amer. J. BioSci. Special Issue: Adult and Reparative Neurogenesis: Actual Questions*. 2015a. V. 3. № 2–3. P. 12–18.
- Pushchina E.V., Varaksin A.A., Obukhov D.K., Shukla S. Neurochemical organization and adult neurogenesis in the masu salmon *Oncorhynchus masou* brain. N.Y.: Nova Science Publishers, Inc., 2017. 267 p.
- Pushchina Ye.V., Obukhov D.K., Varaksin A.A. Neurochemical markers of cells of the periventricular brain area in the masu salmon *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) // *Rus. J. Dev. Biol.* 2012. V. 43. № 1. P. 35–48.
- Sodha N.R., Sellke F.W. Attenuation of inflammatory responses by hydrogen sulfide (H₂S) in ischemia/reperfusion injury // *Methods Enzymol.* 2015. V. 555. P. 127–144.
- Ugrumov M.V. Developing brain as an endocrine organ: a paradoxical reality // *Neurochem. Res.* 2010. V. 35. P. 837–850.
- Ugrumov M.V. Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: distribution in the brain, development and functional significance // *J. Chem. Neuroanat.* 2009. V. 38. P. 241–256.

- Wang J.F., Li Y., Song J.N., Pang H.G. Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury // *Neurochem. Int.* 2014. V. 64. P. 37–47.
- Wang R. Physiological implication of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed // *Physiol. Rev.* 2012. V. 92. P. 791–896.
- Wu D., Wang J., Li H., Xue M., Ji A., Li Y. Role of hydrogen sulfide in ischemia-reperfusion injury // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 2015:186908. doi 10.1155/2015/186908
- Zhang X., Bian J.S. Hydrogen sulfide: a neuromodulator and neuroprotectant in the central nervous system // *ACS Chem. Neurosci.* 2014. V. 5. P. 876–883.

Cystathionine β -Synthase in Brain of the Trout *Oncorhynchus mykiss* after Unilateral Eye Damage and in Conditions of In Vitro Cultivation

E. V. Pushchina^{1,2,*}, A. A. Varaksin², 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 September 28, 2018; revised November 14, 2018; accepted November 20, 2018

Expression of cystathionine β -synthase (CBS) in the brain of adult trout under normal conditions and at 1 week after eye injury was assessed using Western blot analysis. The study of CBS distribution in the brain of intact trout and after a mechanical eye injury in the telencephalon, tectum, cerebellum, and brainstem was carried out by the method of immunoperoxidase labeling on free-floating sections. The results of the study showed an increase in CBS expression in different brain divisions after eye injury. In the visual projection center of the brain (tectum), radial glia cells expressing CBS were revealed after the injury. The emergence of CBS+ heterogeneous radial glia in the trout tectum after eye injury indicates the ability of the reactive neural stem cells (NSC) to synthesize hydrogen sulfide. CBS+ fibers and cells were found in the proliferative zones of cerebellum (*valvula*) and telencephalon (ventral region). In the intact trout tegmentum, CBS expression was observed in large neurons of the dorsal region and in the proliferative zones. After the eye injury, reactive neurogenic niches appeared in the brainstem, and no CBS-immunopositivity was detected in the periventricular zone. The increased expression of H₂S-producing CBS enzyme after a traumatic impact can be probably explained by the neuroprotective functions of hydrogen sulfide, which are implemented in the matrix zones of the brain associated with reparative neurogenesis. A cultivation of trout brain cells showed the formation of neurosphere-like complexes, a part of which exhibited CBS-immunopositivity in the monolayer.

Keywords: hydrogen sulfide, cystathionine β -synthase, optic nerve, reparative neurogenesis, radial glia, neurosphere-like complex, primary cell culture