

ПРОЦЕССЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА В МОЗЖЕЧКЕ МОЛОДИ ТИХООКЕАНСКОГО ЛОСОСЯ ПОСЛЕ МЕХАНИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Поступила 02.07.14

Исследовали процессы пролиферации и апоптоза в различных зонах мозжечка молодого лосося-сибы *Oncorhynchus masu* после экспериментальной механической травмы; учитывалось, что у молодых рыб мозг находится в состоянии роста и это сопровождается интенсивной пролиферативной активностью в матричных зонах. Данные TUNEL-маркирования показали наличие в поврежденном мозжечке высокой апоптотической активности и в зонах постэмбрионального нейрогенеза (гранулярных возвышениях, молекулярном слое), и в поверхностном слое тела мозжечка. Реакция на механическое повреждение мозжечка представляла собой повышение пролиферативной активности в матричных зонах и региональных нейрогенных нишах после нанесения травмы, комбинированное с интенсификацией процессов апоптоза, которая была максимальной в зонах радиальной миграции клеток. Это, очевидно, обеспечивало элиминацию части клеток, образованных в результате как репаративного нейрогенеза, так и естественных морфогенетических процессов. В области травмы наблюдалась тангенциальная и радиальная миграция клеток. Высокий показатель индекса апоптоза отмечался в дорсальной области мозжечка, соответствующей зоне вторичного нейрогенеза. Таким образом, апоптотическая элиминация части клеток происходит уже на стадии их образования в матричных зонах. Интенсивность апоптотических реакций в областях, в которых преобладают фоновые морфогенетические процессы и процессы физиологической репарации после травматического воздействия, и в областях, удаленных от данных зон, неодинакова.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: постэмбриональный и репаративный нейрогенез, пролиферация, апоптоз, миграция, мозжечок, травма, лососевые рыбы.

ВВЕДЕНИЕ

В период постэмбрионального развития формирование мозга позвоночных, рост и дифференцирование его интегративных центров активно продолжаются [1]. Это обеспечивается процессами постэмбрионального нейрогенеза. При травмировании мозга к естественным постэмбриональным процессам роста и пролиферации добавляются процессы репаративного нейрогенеза, которые обеспечиваются за счет формирования дополнительных центров (в основном зон вторичного нейрогенеза и областей локализации паренхимных клеток), а также активации нейрогенных ниш [2].

Интенсивность пролиферативных процессов в различных структурах нервной системы неодинакова, и она изменяется в процессе онтогенеза. Наиболее высокий уровень пролиферации наблюдается в периоды эмбриогенеза и раннего постэмбрионального развития; у взрослых особей соответствующие процессы замедляются [3].

Процессы постэмбрионального нейрогенеза у рыб тесно связаны со способностью представителей этой группы позвоночных обеспечивать эффективную регенерацию нервной ткани ЦНС после повреждения [4, 5]. Обнаружено, что нервная ткань у многих рыб восстанавливается уже через несколько недель после травматизации [6]. Высокий регенеративный потенциал у этих животных детерминирован комбинацией ряда морфогенетических процессов, одним из которых является апоптоз. Данный процесс представляет собой запрограммированную клеточную гибель, регулируемую генами и играю-

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток (РФ).

²Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН (РФ).

³Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: puschina@mail.ru (Е. В. Пущина).

шую главную роль в некоторых нормальных и патологических состояниях Остаётся неизвестным, однако, каково у рыб соотношение процессов пролиферации и апоптоза в процессе репаративного нейрогенеза.

Рыбы являются особо интересным объектом для исследований нейрогенетических процессов. В ЦНС рыб морфогенетические процессы в целом весьма интенсивны; как уже упоминалось, их высокая интенсивность сохраняется на протяжении всей жизни. Другим существенным фактором является то, что у эволюционно древних групп позвоночных высокая концентрация недифференцированных элементов наблюдается как в матричных зонах мозга, так и в его паренхиме [7]. Особенно это касается филогенетически древних групп рыб, к которым относятся лососевые (*Salmonidae*).

Мозжечок является общепринятым интересным объектом для исследования морфогенетических процессов в пределах ЦНС [5, 7], так как пролиферативная активность в нем весьма высока не только в условиях интактности, но и после травматического воздействия.

Мы исследовали процессы репаративного и постэмбрионального нейрогенеза в мозжечке молодежи тихоокеанского лосося-симы; целью работы было выяснение особенностей процессов пролиферации, миграции, а также характеристик апоптоза в данной структуре головного мозга после нанесения экспериментальной механической травмы.

МЕТОДИКА

В работе был использован материал от 10 особей молодежи симы *Oncorhynchus masu* (возраст четыре месяца, длина тела 5.0–6.5 см, масса 14.0–15.7 г). Материал был получен от Рязановского экспериментального производственного рыбоводного завода (Приморский край, РФ), Рыбки содержались в аквариуме с аэрируемой пресной водой при температуре 16–18 °С. Внутричерепную полость обездвиженной рыбки перфузировали с помощью шприца 4%-ным раствором параформальдегида, приготовленным на фосфатном буфере (0.1 М, рН 7.2). После префиксации мозг извлекали из полости черепа и фиксировали в том же растворе в течение 2 ч при 4 °С, а затем в течение двух суток образцы выдерживали в 30 %-ном растворе сахарозы при 4 °С (с пятикратной сменой раствора). Серийные фронтальные срезы мозга экспериментальных

особей толщиной 50 мкм изготавливали на замораживающем микротоме Cryo-star HM 560 MV (ФРГ) и монтировали на желатинизированные предметные стекла. Морфологическая идентификация нейронов мозга производилась после окрашивания срезов водным раствором метилового зеленого [8]. Для окраски полученные препараты выдерживали в течение 15 мин в реактиве Браше [9], затем промывали дистиллированной водой в течение 10 с, после чего погружали на 10 с в 96 %-ный этиловый спирт и на такое же время в раствор изобутанола. Затем срезы обезживали согласно стандартной процедуре; использовали две смены ксилола (экспозиция по 15 мин в каждой) и заключали под покровные стекла в среду Bio-Optica (Италия).

Экспериментальное повреждение мозжечка. Тонкую иглу после прокалывания черепа рыбки погружали примерно на 1 мм в область тела мозжечка [10] с последующим инъектированием карбоцианинового красителя DiI (“Aldrich-Sigma”, США) в зону повреждения. Область травмы захватывала как дорсальный молекулярный, так и зернистый слой тела мозжечка, не затрагивая других структур. В течение первого часа после нанесения травмы рыбки проявляли повышенную двигательную активность (выпрыгивали из воды и совершали вращательные движения). В зоне повреждения отмечались относительно обширные кровоизлияния.

Визуализация проявлений апоптоза (выявление фрагментов ДНК с использованием TUNEL-маркирования. Мозг рыбок фиксировали в 4 %-ном параформальдегиде на фосфатном буфере (0.1 М) в течение 2 ч. Далее образцы тщательно промывали в фосфатном буфере (0.1 М) и помещали на 24 ч в 30 %-ный раствор сахарозы для криопротекции (с семикратной сменой раствора), замораживали в криостате и изготавливали серийные фронтальные срезы толщиной 50 мкм. Для ингибирования активности эндогенной пероксидазы срезы подвергали преинкубации в 3 %-ном растворе перекиси водорода в течение 5 мин. Далее материал промывали в двух сменах фосфатного солевого буфера в течение 5 мин, инкубировали в течение 10 с в растворе выравнивающего буфера, после чего к последнему добавляли раствор TdT-энзима и инкубировали 1 ч в термостате при температуре 37 °С. После этого материал промывали стоп-буфером в течение 10 мин, трехкратно – фосфатным буфером и обрабатывали раствором антидиоксигенина с последующим четырехкратным промыванием в буфере. Для визуализации продуктов реакции использовали суб-

страт для выявления пероксидазы (Vectastain Elite ABC Kit, “Vector Labs”, США), после чего трехкратно промывали дистиллированной водой. Развитие иммуногистохимической окраски контролировали под микроскопом. Затем материал доокрашивали метиловым зеленым по методу Браше [8], монтировали на желатинизированные предметные стекла и высушивали. Материал обезвоживали по стандартной процедуре в двух сменах этилового спирта (96 %), проводили через ксилол и заключали в среду для гистологических препаратов Bio-Optica (Италия).

Микроскопия. Для наблюдения и проведения морфологического и морфометрического анализа использовали инвертированный микроскоп исследовательского класса Axiovert 200 с управляемым предметным столиком, снабженный модулем ApoTome (“Carl Zeiss”, ФРГ). Микрофотографирование препаратов и анализ материала осуществляли с применением программы “AxioVision”.

Числовой материал подвергали статистической обработке с помощью программы “Описательная статистика” Microsoft Excel 2007. Плотность распределения клеток оценивали с применением стандартных методов вариационной статистики. Индекс апоптоза (ИА) рассчитывали с использованием программного обеспечения “AxioVision”, прилагаемого к микроскопу, в пяти случайно выбранных тест-полях зрения для каждой области исследования. Площади тест-полей определяли с помощью программного обеспечения микроскопа.

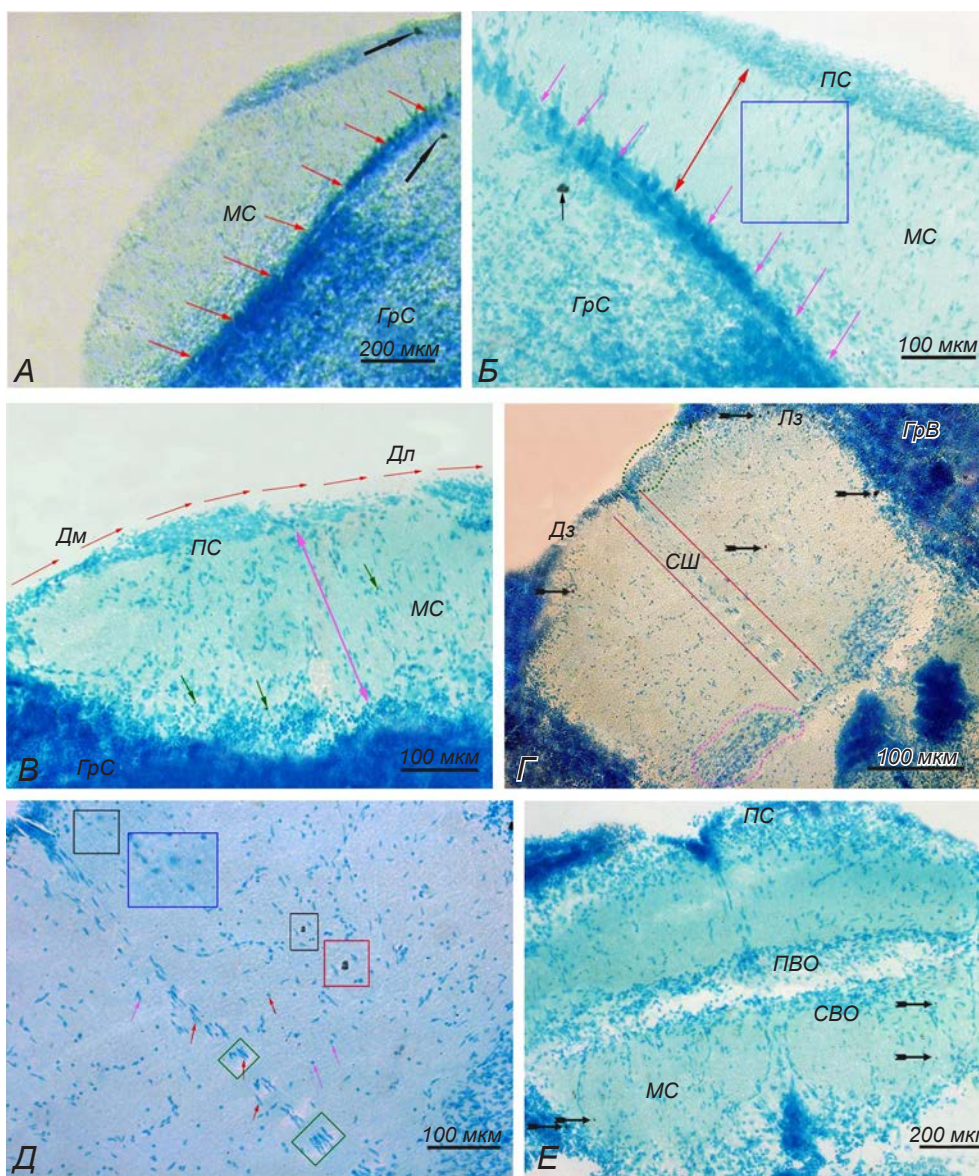
РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика зоны травмы и изменения клеточного состава в мозжечке. Повреждающее воздействие (механическая травма), как уже упоминалось, наносилось на дорсальную поверхность тела мозжечка. Зона травмы распространялась от дорсальной части молекулярного слоя вглубь гранулярного слоя (см. рисунок, А). Общая глубина прокола в среднем составляла 1205.7 мкм.

Через двое суток после нанесения травмы непосредственно вблизи зоны последней выявлялись существенные изменения клеточного состава как в молекулярном, так и в гранулярном слоях. Наиболее характерным феноменом было возникновение обширных зон клеточной миграции из области региональных нейрогенных ниш и наиболее крупной зоны вторичного нейрогенеза, расположенной

в дорсомедиальной части тела мозжечка (см. рисунок, Б). В гранулярном слое на расстоянии около 250 мкм от участка травмы плотность клеток была достоверно ($P < 0.05$) выше, чем в более отдаленных участках. Мы полагаем, что это было обусловлено в основном именно процессами миграции из упомянутых нейрогенных ниш и дорсомедиальной области. Наибольшая плотность клеток выявлялась непосредственно вблизи зоны прокола, градуально снижаясь по мере удаления от области травмы. Рядом с последней областью травмы локализовались многочисленные TUNEL-маркируемые элементы, соответствующие различным стадиям апоптотического процесса (Б). Так, были обнаружены плотные апоптотические тельца, представляющие собой финальные стадии крупнозернистой конденсации хроматина и апоптотической дегградации клеток. Размер апоптотических телец составлял порядка 8–10 мкм. В зонах локализации апоптотических фрагментов были выявлены крупные клетки с базофильной цитоплазмой, диаметр тел которых составлял около 13 мкм. Эти клетки, как правило, имели неправильную форму и обладали цитоплазматическими выростами. Предположительно данные структуры соответствовали региональной микроглии/макрофагам, участвующим в фагоцитозе и утилизации апоптотических фрагментов. Наряду с единичными подобными элементами встречались их небольшие conglomerаты, включающие в себя до трех апоптотических телец. Область травмы пересекала гранулярный слой, где плотность клеток была очень высокой. Видимо, это объясняет сравнительно низкое значение ИА в соответствующих участках в отличие от такового в зонах нейрогенеза (Б). Другой разновидностью апоптотических структур были мелкие TUNEL-маркированные элементы, представляющие собой дегранулированные фрагменты поврежденных клеток. Значение ИА в областях непосредственно вблизи зоны травмы составляло 0.7 %.

В наиболее поверхностных участках молекулярного слоя наблюдалось очень большое количество мелких клеток, лишенных признаков морфологического дифференцирования. В толще этого слоя часто присутствовали продольные ряды удлинённых клеток, ориентированных от поверхностного слоя к области травмы (см. рисунок, Б). Среднее количество таких клеток на тест-поле 10122 мкм² составляло 237 ± 18 . Подобная морфологическая картина в поверхностной части молекулярного слоя, очевидно, отражала интенсивные процессы миграции клеток из поверхностных областей мозжечка к зоне травмы. В поверхностной



TUNEL-маркированные элементы в мозжечке молодой симы после его повреждения.

A – микрофотография области травмы. Красными стрелками показана зона травматизации, черными (здесь и далее) – апоптотные тельца. *MC* – молекулярный, *GrC* – гранулярный слой. *B* – дорсомедиальная часть тела мозжечка, содержащая в себе клетки, которые мигрируют из поверхностного слоя – *ПС* (ограничены прямоугольником). Красной стрелкой указано направление радиальной миграции. *C* – участок латеральной области молекулярного слоя, содержащий в себе клетки, мигрирующие к области травмы. Красными стрелками указано направление тангенциальной миграции, розовой – радиальной; зелеными стрелками показаны TUNEL-маркированные фрагменты клеток, подвергающихся дегрануляции, *Дм* – дорсомедиальная, *Дл* – дорсолатеральная области. *Г* – каудальная часть тела мозжечка. Зеленым контуром ограничен участок дорсальной зоны (*Дз*), розовым – базальной; между красными линиями расположена зона срединного шва (*СШ*); *Лз* – латеральная зона, *GrB* – гранулярные возвышения. *Д* – область *СШ*. Зелеными линиями ограничены кластеры мигрирующих клеток; в красном (*Д1*) и синем (*Д2*) квадратах – фрагменты, содержащие в себе мелкие TUNEL-маркированные элементы (в *Д2*) и апоптотные тельца (в *Д1*); розовыми и красными стрелками показаны клетки разных типов. *Е* – заслонка мозжечка. *ПВО* и *СВО* – перивентрикулярная и субвентрикулярная области соответственно.

TUNEL-марковані елементи в мозочку памолодку сими після його ушкодження.

Морфологические и морфометрические параметры ($M \pm m$) клеток и частота апоптоза в мозжечке молоди сими *Oncorhynchus masu* при повреждении**Морфологічні і морфометричні параметри ($M \pm m$) клітин і частота апоптозу в мозочку памолодку сими *Oncorhynchus masu* при ушкодженні**

Области мозжечка	Клетки на территории зоны			Относительное количество клеток, %	Относительное количество апоптозных телец (индекс апоптоза), %
	тип клеток	большой диаметр, мкм	малый диаметр, мкм		
Молекулярный слой	1	5.04 ± 0.51	3.93 ± 0.69	2.0	5
	2	6.26 ± 0.53	5.25 ± 0.53	8.5	
	3	9.51 ± 0.41	3.53 ± 0.63	55	
	4	13.63 ± 2.33	4.25 ± 0.50	34.5	
Гранулярные возвышения	1	5.21 ± 0.38	4.71 ± 0.42	85	2
	2	7.19 ± 1.33	4.30 ± 0.42	15	
Срединный шов	1	5.79 ± 0.13	3.58 ± 0.12	23	8
	2	8.76 ± 0.34	3.07 ± 0.32	15	
	3	9.78 ± 0.18	2.76 ± 0.15	17.5	
	4	22.88 ± 0.58	2.11 ± 0.17	44.5	
Дорсальная зона	1	5.26 ± 0.47	4.03 ± 0.66	53	4
	2	6.26 ± 0.27	5.03 ± 0.60	12	
	3	8.78 ± 0.46	3.89 ± 0.46	12	
	4	11.15 ± 0.84	3.83 ± 0.65	23	
Заслонка	1	5.52 ± 0.34	4.74 ± 0.60	36	5
	2	6.77 ± 0.58	5.18 ± 0.70	34	
	3	9.13 ± 0.65	3.16 ± 0.48	19	
	4	12.60 ± 1.88	3.45 ± 1.13	11	

зоне, для которой была характерна высокая плотность клеток, выявлялись мелкие TUNEL-маркированные элементы, соответствующие продуктам дегрануляции клеток этой области. Можно было выделить клетки двух типов – палочковидные с длиной тела от 10 до 21 мкм и умеренно удлинённые, с длинной осью тела от 7 до 10 мкм (см. таблицу).

Латеральная и дорсомедиальная части молекулярного слоя тела мозжечка. После нанесения повреждающего воздействия изменения морфологического состава в различных областях молекулярного слоя – дорсомедиальной и латеральной – были вполне очевидными (см. рисунок, В). В зонах вторичного нейрогенеза вблизи области травмы отмечалось очень большое количество недифференцированных клеток по сравнению с аналогичными показателями в более удалённых участках. Так, среднее количество клеток в областях, отстоящих от участка повреждения на 100–150 мкм, составляло 251 ± 23 на тест-поле. Помимо изменений морфологической структуры указанных областей молекулярного слоя, в данных областях диагностировались многочисленные проявления апопто-

за (см. таблицу). Однако характер апоптотического ответа в этих участках нельзя считать идентичным таковому непосредственно в области нанесения травмы. В молекулярном слое мозжечка плотность клеток как в поверхностной области, так и в толще упомянутого слоя была весьма высокой. Основные типы клеток в этой области и их морфологические характеристики указаны в таблице. Среднее количество клеток на тест-поле в молекулярном слое на расстоянии 100 мкм от зоны укола составляло 271 ± 24 . Большинство клеток имели удлинённую форму; вероятно, они находились в состоянии миграции. Помимо этого, в гранулярном слое наблюдалось значительное количество недифференцированных клеток. На тест-участок площадью 31277 мкм^2 их число составляло 400 ± 35 . В поверхностном слое выявлялась типичная картина тангенциальной миграции из областей клеточной пролиферации, направленной в зону травмы. Наряду с тангенциальной миграцией отмечались многочисленные проявления радиальной миграции клеток из зоны вторичного нейрогенеза (дорсомедиальной матричной зоны мозжечка) к области травмы.

При таком варианте миграции длинные оси клеток были направлены перпендикулярно поверхностному слою (см. рисунок, *B*).

Наряду с проявлениями клеточной миграции в дорсомедиальной и латеральной зонах молекулярного слоя были диагностированы многочисленные случаи апоптоза. Большинство TUNEL-маркированных элементов выявлялись в гранулярном слое (см. рисунок, *B*). Чаще всего это были апоптозные тельца размером около 10 мкм, которые локализовались в дорсомедиальных участках тела мозжечка, прилежащих к зоне вторичного нейрогенеза. Представляется весьма вероятным, что вторичная матричная зона располагалась в молекулярном слое в непосредственной близости от областей локализации апоптозных телец. Наличие апоптозных телец в гранулярном слое, видимо, связано с повышенной морфогенетической активностью такой вторичной матричной зоны. Другой зоной локализации одиночных апоптозных телец являлась граница между молекулярным и гранулярным слоями (*B*). Апоптозные тельца встречались и в толще молекулярного слоя. При этом идентифицировались как фрагменты дегранулирующихся клеток, так и терминальные апоптозные тельца. Среднее значение ИА в молекулярном слое составляло 5 %.

Характеристики каудальной части тела (КЧТ) мозжечка. Другой областью, в которой наблюдались значительные гистологические изменения после травматического воздействия, была КЧТ мозжечка. В пределах этой области мы обследовали ее дорсальную часть, зоны гранулярных возвышений, расположенные латерально, и область срединного шва (см. рисунок, *Г*). В большей части данной структуры был представлен в основном молекулярный слой. В дорсальной части также отмечались весьма высокие значения количества (плотности) клеток по сравнению с таковыми в интактных участках мозжечка. Структура наиболее поверхностных слоев была сходна с таковой поверхностной области молекулярного слоя тела мозжечка, описанной ранее. В более глубоких слоях располагалась гетерогенная популяция клеток, относящихся к четырем типам (см. таблицу). В зоне гранулярных возвышений встречались клетки двух типов. Первый тип соответствовал мелким круглым клеткам диаметром от 4 до 6 мкм. Такие единицы были преобладающими, составляя в упомянутой зоне 85 % всех наблюдаемых клеток. Ко второму типу относились более крупные элементы с диаметром

от 6 до 10 мкм. Таких клеток было значительно меньше (15 %); можно было полагать, что они представляли собой более дифференцированные клетки первого типа на поздних стадиях развития. В зоне срединного шва отмечалось скопление клеток, относящихся к четырем разным типам. Размеры клеток мигрирующей популяции в зоне центрального шва варьировали от 8.1 и до 18.75 мкм; таких клеток было в среднем 59 ± 4 . Общее же количество клеток на тест-поле размером 10122 мкм² в данной зоне составляло 265 ± 23 . Среди них преобладали мигрирующие клетки, отнесенные к третьему и четвертому типам. Размеры тел клеток третьего типа составляли от 7 до 10 мкм, а их доля – 17 % (см. рисунок, *Д*). Клетки четвертого типа с большей осью от 10 до 21 мкм составляли 45 % общего количества. Среднее количество мигрирующих клеток равнялось 165 на вышеупомянутое тест-поле. Среднее значение ИА в молекулярном слое составляло 8, в пределах гранулярных возвышений – 2, а в дорсальной и латеральной зонах – 4 и 1 % соответственно.

Заслонка представляет собой эволюционно уникальную область мозжечка; у рыб она является наиболее варибельной в морфологическом аспекте частью мозжечка по сравнению с другими его отделами. Большая часть заслонки размещена под полушариями зрительного тектума в полости тектального желудочка. Заслонка представляет собой непарное образование в пределах нервной ткани мозжечка и относится к наиболее молодым (с точки зрения филогистогенеза) структурам [11]. В области заслонки у симы, как и у других видов рыб, наблюдаются активные пролиферативные процессы и в период эмбриогенеза, и в более поздние периоды постэмбрионального развития. Среди других структур мозга в заслонке интенсивность пролиферативных процессов в постэмбриональный период, очевидно, наиболее высока. Таким образом, заслонка мозжечка является активно действующим центром нейрогенеза и у молодежи, и у взрослых рыб. У симы в области заслонки можно было выделить несколько зон – перивентрикулярную, окружающую церебеллярный акведук, прилежащую к ней субвентрикулярную область, молекулярный и поверхностный слои (см. рисунок, *Е*). В перивентрикулярной области плотность клеток многократно превышала таковую в других участках заслонки. В заслонке встречались все четыре основных типа клеток (см. таблицу). В этой структуре чаще были представлены недифференцированные клетки второго (36 %) и первого (34 %) типов. Популяция мигрирующих

клеток (третьего и четвертого типов) была заметно меньшей – 30 %. Среднее значение ИА в молекулярном слое заслонки равнялась 5 %.

ОБСУЖДЕНИЕ

В наших исследованиях эффекты повреждающего воздействия на мозжечок комбинировались со сложным морфогенетическим фоном продолжающегося постэмбрионального развития мозга симы. Экспериментальные рыбки находились в процессе активного роста, что обуславливало повышенную пролиферативную активность в морфогенетических зонах мозжечка и перивентрикулярной области мозга. В исследованиях на другом виде рыб – *Danio rerio* – ранее было установлено, что повреждение мозжечка вызывает усиление пролиферации клеток в наружных областях, прилежащих к мозговым оболочкам, а также в области мозжечковой заслонки [10] и в гранулярных возвышениях. Такие данные были получены с помощью экспериментального маркирования делящихся клеток бромдезоксисуридином (BrdU) [1] и другими маркерами пролиферации [12]. Высокая нейрогенетическая активность после нанесения травматического повреждения была выявлена и в мозжечке ножеголовки *Apteronotus leptorhynchus*. У этого вида, относящегося к специализированной группе электрических гимнотиформных рыб, мозжечок занимает до 75 % всего объема мозга; он является наиболее крупным нейрогенетическим центром как в период постэмбрионального нейрогенеза, так и в условиях травматического воздействия [13].

В своих заключениях мы опирались, с одной стороны, на данные литературы о состоянии матричных зон мозжечка у взрослых рыб и об изменениях состояния указанных зон при нанесении повреждающего воздействия [5], а с другой – на результаты сопоставления морфологических паттернов непосредственно вблизи зоны повреждения и на некотором удалении от нее.

У молоди симы наблюдается весьма высокая исходная интенсивность пролиферации как в первичной матричной области мозга (перивентрикулярной зоне), так и в зонах вторичной пролиферативной активности, выявляемых у взрослых животных [14]. Соответствующие данные могут быть получены с помощью иммуномаркирования пролиферативного ядерного антигена (PCNA) и с применением “чисто морфологических” методов, позволяющих оцени-

вать количество случаев митоза в матричных зонах мозга. К таким зонам мозга в мозжечке относится, в частности, дорсомедиальная область. Интенсивность пролиферации клеток в этой области была ранее описана у взрослых особей *Danio rerio* [15] и аптеронотуса [16]. В нашей работе в условиях повреждения мозжечка особо высокая пролиферативная активность была идентифицирована в дорсомедиальной зоне, поверхностном слое и гранулярных возвышениях тела мозжечка и вестибулолатеральных долях. Таким образом, можно заключить, что пролиферация клеток в упомянутых зонах мозжечка, и без того весьма интенсивная в условиях нормальной морфогенетической активности в пределах данного периода онтогенеза, дополнительно усиливается после повреждающего воздействия. Наличие вновь образованных клеток в поверхностном слое мозжечка мы также связываем частично с фоновой морфогенетической активностью, а частично – с повреждающим воздействием. В результате повреждения мозжечка у молоди симы усиленная пролиферативная активность индуцировалась как в традиционных зонах постэмбрионального нейрогенеза, так и в поверхностном слое. Совокупный уровень пролиферативной активности в данных зонах превышал показатели активности у взрослых особей *Danio rerio*, определенные с использованием BrdU [5, 17]. У этого вида на поперечных срезах тела мозжечка идентифицировалось не более пяти–десять вновь образованных клеток на срез. Подобные несоответствия могут быть связаны как с методическими аспектами (использование в упомянутых работах более тонких срезов мозга), так и с физиологическим статусом экспериментальных объектов. У взрослых рыб частота проявлений пролиферации, выявляемых согласно результатам маркирования BrdU, также относительно невысока. При этом, однако, надо иметь в виду, что включение метки учитывалось в пределах ограниченного периода времени (1–2 ч). В исследованиях пролиферативной активности тектума у трехмесячной молоди форели (определение по наличию пролиферативного ядерного антигена [12]) было обнаружено, что количество PCNA-иммунопозитивных клеток в целом невелико. Есть, правда, подозрения, что активность антител, используемых в вышеуказанной работе, была невысокой. Результаты наших исследований головного мозга, проведенных на другом виде лососей (на том же виде, что и в настоящей работе – симе), указывали на более высокий уровень пролиферативной активности, верифицируемой при мар-

кировании PCNA [18].

Подсчет количества ядер клеток, окрашенных метиловым зеленым, который был проведен в настоящей работе в поверхностном слое мозжечка, свидетельствует о наличии большого количества недифференцированных клеток с высокими значениями ядерно-цитоплазматического отношения. Подобные клетки на основании морфологических критериев могут быть отнесены как к пролиферирующей популяции (единицы первого и второго типов), так и к популяции клеток, находящихся на начальных стадиях дифференциации и/или миграции (третий и четвертый типы; см. таблицу).

Понятно, что пролиферативный ответ на повреждение мозжечка у молоди симы следует интерпретировать с учетом достаточно высокого фонового уровня активности матричных зон мозга.

Процесс апоптотической гибели клеток сопровождается процессом “нормального” постэмбрионального нейрогенеза [19] и одновременно является физиологической реакцией со стороны ЦНС симы на повреждение мозжечка. Проявления апоптоза в ходе нормального развития мозга рыб были описаны у *A. leptorhynchus* [1]. В таких исследованиях было установлено, что в ходе пролиферативной активности матричных зон мозжечка образуются клетки с признаками соматической анеуплоидии. Подобные клеточные единицы являются явно дефектными, поскольку не обладают нормальным диплоидным набором хромосом; они подлежат элиминации по апоптотическому сценарию [21]. В исследованиях на интактных взрослых особях амурского осетра были обнаружены высокие значения ИА в различных участках ЦНС, включая интегративные структуры (зрительный тектум, мозжечок) и сенсорные центры ствола мозга (ядра V и VII пар черепно-мозговых нервов) [18]. Подобные феномены характерны для продолжающейся морфогенетической активности в различных центрах мозга рыб, в которых у этих позвоночных продолжается пополнение новыми клетками в течение всей жизни. Возникающие *de novo* клетки могут встраиваться в существующие нейронные сети не только в период эмбрионального нейрогенеза, но и у взрослых животных. Это явление, в частности, особо характерно для сенсорных областей, пополняющихся новыми структурными элементами по мере роста животного. Апоптоз в таких физиологически активных развивающихся системах может играть роль физиологического фильтра, регулирующего количество новых клеток и обеспечивающего элиминацию “старых”.

В нашей работе в травмированном мозжечке молоди симы было выявлено значительное количество клеток, подверженных апоптотическим изменениям. Визуализация достигалась путем маркирования фрагментов ДНК с длиной не более 130 пар оснований. Наличие таких фрагментов ДНК особенно характерно для поздних стадий апоптоза. В зонах, окружающих область травмы, были выявлены как единичные TUNEL-маркированные структуры, так и кластеры последних, состоящие из нескольких элементов. Наибольшее количество TUNEL-маркированных элементов были обнаружены в областях, прилежащих к морфогенетическим зонам мозжечка. Другой зоной, где концентрация TUNEL-маркированных структур значительно превышала фоновый уровень, были область травмы и непосредственно окружающие ее участки.

Крупные TUNEL-маркированные тельца соответствовали конечной стадии деградации апоптотических клеток. Для такой стадии характерно формирование крупных конденсированных фрагментов, которые не подлежат утилизации с помощью макрофагов/микроглии. Подобные тельца были также идентифицированы в морфогенетических исследованиях на млекопитающих. Другой вариант TUNEL-маркированных элементов – это мелкие слабо конденсированные частицы, представляющие собой продукты дегрануляции клеток, которые элиминируются с помощью апоптоза [21]. Подобные “остатки” клеток идентифицировались на больших территориях, расположенных в различных частях мозжечка. Упомянутые виды TUNEL-маркированных структур в мозжечке симы выявлялись практически повсеместно. Существенно различающиеся значения ИА в разных частях мозжечка свидетельствуют о разной интенсивности процессов апоптоза в матричных зонах, области травмы, прилежащих участках и в интактных областях мозжечка молоди симы.

Мы исследовали проявления структурных реакций в различных анатомических зонах мозжечка молоди симы – дорсальной и латеральной частях тела мозжечка, гранулярных возвышениях, молекулярном слое заслонки и каудальной части тела мозжечка. Как упоминалось выше, травматическое воздействие наносилось в область тела мозжечка и захватывало границу между молекулярным и гранулярным слоями. В результате TUNEL-маркирования было установлено, что в указанных участках интенсивность процессов апоптоза значительно различается. При этом, однако, необходимо принимать во

внимание особые значения плотности распределения клеточных тел в гранулярном слое. У всех позвоночных для данного слоя мозжечка характерна максимальная плотность тел клеток, которые способны образовывать сомато-соматические контакты. В гранулярном слое мозжечка молоди симы плотность распределения клеток также была очень высокой, что, вероятно, и определило относительно низкое конечное значение ИА в зоне травмы. Очевидно, что величина этого индекса находится в обратной зависимости от плотности распределения клеток в данной зоне. Наибольшее значение ИА было выявлено в молекулярном слое мозжечка. Это, видимо, связано с тем обстоятельством, что молекулярный слой является основной зоной радиальной миграции клеток, образованных в результате как репаративного нейрогенеза, так и естественных морфогенетических процессов. Согласно нашим наблюдениям, максимальное количество апоптозных телец присутствуют в зонах миграции клеток. Это позволяет полагать, что часть клеток элиминируются в процессе радиальной миграции. Другое весьма высокое значение ИА было выявлено в дорсальной зоне тела мозжечка, соответствующей зоне вторичного нейрогенеза. В целом в матричной зоне мозга интенсивность апоптотических процессов по сравнению с таковой в других областях достаточно велика. Этот факт свидетельствует о том, что часть вновь образованных клеток элиминируются уже на стадии их присутствия в пределах матричных зон. С другой стороны, в зоне гранулярных возвышений мозжечка ИА составлял лишь 2 %, что, видимо, также связано с высокой плотностью распределения клеток (см. выше) в данных участках. Другим фактором, влияющим на значение ИА, являлось то, что зона гранулярных возвышений – это зона эмбрионального нейрогенеза, возможно, принимающая менее активное участие в репаративном нейрогенезе, чем дорсальная зона. Видимо, интенсивность физиологической элиминации клеток в областях, в которых преобладают либо фоновые морфогенетические процессы, либо процессы физиологической репарации после травматического воздействия, а также в областях, удаленных от упомянутых зон, неодинакова.

В публикациях, касающихся *A. leptorhynchus*, было указано, что интенсивность процессов апоптоза в различные периоды времени неодинакова. Так, наиболее интенсивная элиминация клеток наблюдалась в первые часы после нанесения повреждающего воздействия. Этот процесс с течением

времени ослабевал и у взрослого животного полностью прекращался к 21-ым суткам с момента нанесения травмы [5]. В наших исследованиях на вторые сутки с момента травмирования мозжечка интенсивность TUNEL-маркирования апоптотических структур была уже не очень высокой. Указанное обстоятельство может быть связано с тем, что наиболее активные процессы апоптоза в мозжечке молоди симы после нанесения травмы происходят в еще более ранний период. Учитывая данные о высокой интенсивности процессов пролиферации в мозжечке молоди симы, такое предположение представляется достаточно обоснованным. Тем не менее, процессы апоптоза в зоне, прилежащей к области травмы, были хорошо выраженными. Это, несомненно, указывает на участие данного механизма в процессе утилизации поврежденных клеток. В упомянутый период времени (двое суток с момента нанесения травмы) в зоне повреждения выявлялась повышенная плотность недифференцированных клеток. Этот факт свидетельствует о том, что репаративный процесс перешел в более позднюю стадию. Видимо, процессы репаративного нейрогенеза у молоди лососевых реализуются в более ранние сроки по сравнению с тем, что обычно упоминается в литературе [1, 5]. Скорее всего, это связано с высокой интенсивностью фоновой морфогенетической активности в мозжечке молодых рыб по сравнению с таковой у взрослых животных.

Согласно результатам наших исследований, после механической травматизации мозжечка в области повреждения наблюдаются морфологические проявления тангенциальной и радиальной миграции клеток. Зоны клеточной миграции наиболее хорошо выражены в дорсальной части тела мозжечка, а также в областях вторичного нейрогенеза. После травматического повреждения мозжечка в последнем можно было дифференцировать четыре клеточных типа, относящихся к пролиферирующим популяциям (первый и второй тип) и к популяциям, которые находятся в начальной стадии дифференцирования и/или миграции (третий и четвертый тип; см. таблицу). В наших экспериментальных условиях также можно было идентифицировать две группы TUNEL-маркированных структур – крупные TUNEL-маркированные тельца, соответствующие конечной стадии деградации апоптозных клеток, и мелкие слабо конденсированные частицы – видимо, продукты дегрануляции клеток, элиминируемых по апоптотическому сценарию. В матрич-

них зонах, області травми та інтактних областях мозжечка наблюдались различные уровни апоптотической активности. Наибольшее значение ИА (5 %) после травматического воздействия на мозжечок было обнаружено в молекулярном слое, который является основной зоной радиальной миграции клеток. Непосредственно в зоне травмы через двое суток после ее нанесения было зарегистрировано весьма низкое значение ИА (0.7 %), что, видимо, в основном связано с очень большим общим количеством (максимальной плотностью) клеток в данной области мозжечка. В дорсальной зоне ИА был сравнительно высоким (4 %). Таким образом, интенсивность процессов апоптоза в областях мозжечка молодежи сими, в которых преобладают фоновые морфогенетические процессы и процессы физиологической репарации после травматического воздействия, а также в областях, удаленных от указанных зон, значительно различалась.

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

Все стадии проведенного исследования соответствовали положениям Европейской конвенции о защите животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (86/609/ЕЕС, 1986, Страсбург), и нормативам Комитетов по этике Дальневосточного федерального университета, Института биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН и Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины.

Авторы данной работы – М. Е. Стуканева и Е. В. Пущина – подтверждают отсутствие конфликтов любого рода, касающихся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с исследованием, и взаимоотношений соавторов статьи.

М. Е. Стуканева^{1,2}, Е. В. Пущина^{2,3}

ПРОЦЕСИ ПРОЛІФЕРАЦІЇ ТА АПОПТОЗУ В МОЗОЧКУ ПАМОЛОДКУ ТИХООКЕАНСЬКОГО ЛОСОСЯ ПІСЛЯ МЕХАНІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ

¹Далекосхідний федеральний університет, Владивосток (РФ).

²Інститут біології моря ім. А. В. Жирмунського ДСВ РАН, Владивосток (РФ).

³Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

Резюме

Досліджували процеси проліферації та апоптозу в різних зонах мозочка памолодку лосося-сими *Oncorhynchus masu* після експериментальної механічної травми; бралось до уваги, що у молодих риб мозок знаходиться в стані росту і це супроводжується інтенсивною проліферативною активністю в матричних зонах. Дані TUNEL-маркування показали наявність в ушкодженому мозочку високої апоптотичної активності і в зонах постембріонального нейрогенезу (гранулярних підвищеннях, молекулярному шарі), і в поверхневому шарі тіла мозочка. Реакція на механічне ушкодження мозочка являла собою підвищення проліферативної активності в матричних зонах і регіональних нейрогенних нішах після нанесення травми, комбіноване з інтенсифікацією процесів апоптозу, яка була максимальною в зонах радіальної міграції клітин. Це, очевидно, забезпечувало елімінацію частини клітин, утворених внаслідок як репаративного нейрогенезу, так і природних морфогенетичних процесів. У ділянці травми спостерігалася тангенціальна та радіальна міграція клітин. Високий показник індексу апоптозу відмічався в дорсальній зоні ділянки мозочка, відповідній зоні повторного нейрогенезу. Таким чином, апоптотична елімінація частини клітин відбувається вже на стадії їх утворення в матричних зонах. Інтенсивність апоптотичних реакцій в ділянках, де переважали фонові морфогенетичні процеси та процеси фізіологічної репарації після травматичної дії, і в ділянках, віддалених від даних зон, є відмінною.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. G. K. Zupanc, “Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain,” *J. Comp. Physiol.*, **192**, 649-670 (2006).
2. G. K. Zupanc, U. M. Wellbrock, R. F. Sîrbulescu, et al., “Generation, long-term persistence, and neuronal differentiation of cells with nuclear aberrations in the adult zebrafish brain,” *Neuroscience*, **159**, 1338-1348 (2009).
3. R. W. Williams, “Mapping genes that modulate brain development: a quantitative genetic approach,” *Mouse Brain Dev.*, **30**, 21-49 (2000).
4. A. Takeda, M. Nakano, R. C. Goris, et al., “Adult neurogenesis with 5-HT expression in lesioned goldfish spinal cord,” *Neuroscience*, **151**, 1132-1114 (2008).
5. G. K. Zupanc and R. F. Sîrbulescu, “Teleost fish as a model system to study successful regeneration of the central nervous system,” *Current Topics Microbiol. Immunol.*, **367**, 193-233 (2013).
6. G. K. Zupanc, S. C. Clint, N. Takimoto, et al., “Spatiotemporal distribution of microglia/macrophages during regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus*: a quantitative analysis,” *Brain, Behav., Evolut.*, **62**, 31-42 (2003).
7. E. Pouwels, “On the development of the cerebellum of the trout, *Salmo gairdneri*: I. Patterns of cell migration,” *Anat. Embryol.*, **152**, 291-308 (1978).
8. Г. А. Меркулов, *Курс патологогистологической техники*, Ленинград (1969).
9. Б. Ромейс, *Микроскопическая техника*, Изд-во иностр. лит., Москва (1953).

10. G. K. Zupanc, "Neurogenesis, cell death and regeneration in the adult gymnotiform brain," *J. Exp. Biol.*, **202**, 1435-1446 (1999).
11. Н. Г. Андреева, Д. К. Обухов, *Эволюционная морфология нервной системы позвоночных*, Лань, СПб. (1999).
12. E. Candal, R. Anadon, F. Bourrat, et al., "Cell proliferation in the developing and adult hindbrain and midbrain of trout and medaka (teleosts): A segmental approach," *J. Dev. Brain Res.*, **160**, 157-175 (2005).
13. G. K. Zupanc and R. Ott, "Cell proliferation after lesions in the cerebellum of adult teleost fish: time course, origin, and type of new cells produced," *Exp. Neurol.*, **160**, 78-87 (1999).
14. Ye. V. Pushchina, D. K. Obukhov, and A. A. Varaksin, "Neurochemical markers of cells of the periventricular brain area in the masu salmon *Oncorhynchus masou* (Salmonidae)," *Russ. J. Dev. Biol.*, **43**, No. 1, 35-48 (2012).
15. K. Nagamoto-Combs, D. W. McNeal, R. J. Morecraft, et al., "Prolonged microgliosis in the rhesus monkey central nervous system after traumatic brain injury," *J. Neurotrauma*, **24**, 1719-1742 (2007).
16. R. S. Rajendran, M. M. Zupanc, and A. Lösche, "Numerical chromosome variation and mitotic segregation defect in the adult brain of teleost fish," *Dev. Neurobiol.*, **67**, 1334-1347 (2007).
17. P. Ekström, C. M. Johnsson, and L. M. Ohlin, "Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones," *J. Comp. Neurol.*, **436**, 92-110 (2001).
18. E. V. Puschina, D. K. Obukhov, and A. A. Varaksin, "Features of adult neurogenesis and neurochemical signaling in the Cherry salmon *Oncorhynchus masou* brain," *Neural. Regen. Res.*, **8**, No. 1, 13-23 (2013).
19. Е. В. Пущина, Д. К. Обухов, "Процессы пролиферации и апоптоза в головном мозге осетра", *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **43**, № 4, 325-326 (2011).
20. G. K. Zupanc and M. M. Zupanc, "Proteomic analysis of CNS injury and recovery," *Adv. Neurobiol.*, **2**, 511-536 (2011).
21. С. Г. Калиниченко, Н. Ю. Матвеева, "Морфологическая характеристика апоптоза и его значение в нейрогенезе", *Морфология*, **131**, 16-28 (2007).