

ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА RAХ6 В ДОЛЕ ЛИЦЕВОГО НЕРВА МОЗГА КАРПА

Поступила 28.06.14

С использованием иммунопероксидазного маркирования исследовали распределение белка транскрипционного фактора Рах6 в непарной доле лицевого нерва (*lobus impar nervi facialis – LINF*) мозга взрослых особей карпа (*Cyprinus carpio*). Значительная часть клеток, в которых экспрессировался белок Рах6, были локализованы в дорсальной, латеральной и базальной зонах наружного слоя *LINF*. Клетки с интенсивной Рах6-позитивностью обычно имели округлую либо слабо удлинённую форму; чаще всего они располагались поодиночке. Средний диаметр большинства меченых клеток составлял 5.8–9.6 мкм; в базальной зоне часть клеток имели более крупные размеры (до 11.4 мкм). Плотность локализации Рах6-позитивных клеток в базальных участках наружного слоя *LINF* была заметно выше, чем в дорсальной и латеральных зонах. В пределах внутреннего слоя *LINF* также были выявлены клетки с относительно высоким содержанием Рах6, но оптическая плотность иммуномаркированного материала здесь была в несколько раз ниже, чем в наружном. Во внутреннем слое меченые клетки образовывали значительные скопления – ниши, разделённые участками иммунонегативности. Площадь сечения таких ниш варьировала от примерно 460 до 2070 мкм². Значительную часть клеток внутреннего слоя, видимо, следует рассматривать как единицы, находящиеся в состоянии миграции. Базальные участки *LINF*, очевидно, представляют собой наиболее значительную область постэмбрионального («взрослого») нейрогенеза в пределах данной структуры; там образуются *de novo* и находятся в состояниях дифференциации и миграции клетки, образованные преимущественно в наружном слое матричной зоны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мозг рыб, карпообразные, доля лицевого нерва, постэмбриональный нейрогенез, транскрипционный фактор Рах6, пролиферация, дифференциация.

ВВЕДЕНИЕ

Карпообразные (*Cyprinidae*) являются одним из семейств группы *Euteleostei* – прогрессивного подразделения класса костистых рыб. В головном мозгу представителей данной группы имеются специализированные структуры, не характерные для других представителей рыб и вообще позвоночных животных. К таким структурам относятся гипертрофированные ядра (доли) черепномозговых нервов, участвующие в передаче и переработке специализированной сенсорной информации, в частности доли блуждающего и лицевого нервов [1].

Важной особенностью мозга рыб является способность их тела вообще и ЦНС в частности к неограниченному росту в течение всей жизни. Интенсивная пролиферация клеток в матричных зонах головного мозга происходит не только в начальных фазах онтогенеза, но и у взрослых рыб. Область первичной пролиферации располагается вблизи поверхности желудочка мозга [2]. Помимо вентрикулярной пролиферативной области, в мозгу рыб имеются еще ряд участков, в которых у взрослых особей наблюдается весьма интенсивное деление клеток; эти участки рассматриваются как зоны вторичного нейрогенеза [3]. Подобные зоны локализованы в конечном мозгу, зрительном тектуме и мозжечке, а также в таламусе и стволе мозга. Они расположены и в упомянутых выше специфических сенсорных областях – долях лицевого и блуждаю-

¹ Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток (РФ).

² Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

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

щего нервов. Наличие пролиферирующих незрелых клеток в непосредственной близости от специализированных сенсорных структур или даже пределах последних, т.е. в областях, содержащих в себе дифференцированные нейроны, характерно исключительно для рыб и не описано у других классов позвоночных.

Важнейшую роль в управлении процессами пролиферации и дифференциации клеток в ЦНС позвоночных играют регуляторные гены семейства *Raxb* [4]. Эти гены имеют критическое значение для регуляции пре- и постнатального развития ЦНС у представителей разных классов позвоночных, т.е. функции данных генов филогенетически консервативны. В процессе развития ЦНС рыб гены семейства *Raxb* задействованы в обеспечение клеточной и региональной специфичности, пролиферации и поддержания свойств прогениторных клеток, дифференциации нейронов, а также в формирование влияний, противодействующих апоптозу [4]. Регуляторные функции *Rax*-генов обеспечиваются специализированными молекулярными механизмами.

Мы исследовали распределение белкового продукта транскрипционного фактора *Raxb* в непарной доле лицевого нерва (*lobus impar nervi facialis* – *LINF*) головного мозга обыкновенного карпа (*Cyprinus carpio*).

МЕТОДИКА

Был исследован головной мозг 10 взрослых особей обыкновенного карпа (размеры тела 32–35 см, масса 480–515 г), предоставленных Рязановским экспериментальным производственным рыболовным заводом (Приморский край, РФ). Рыбы содержались в аквариуме с аэрируемой пресной водой при температуре 17–18 °С. Для проведения морфологических исследований и иммуногистохимического выявления белка транскрипционного фактора *Raxb* животных анестезировали, помещая в кювету с 1 %-ным раствором трикаинметилсульфоната (MS-222) на 15 мин. Внутричерепную полость обездвиженного животного перфузировали 4 %-ным раствором параформальдегида, приготовленным на фосфатном буфере (0.1 М, рН 7.2). После префиксации мозг извлекали из полости черепа, фиксировали в том же растворе в течение 2 ч при 4 °С и выдерживали в течение 48 ч в 30 %-ном растворе сахарозы при 4 °С (с пятикратной сменой раствора). Серийные фронтальные срезы мозга карпа

толщиной 50 мкм изготавливали с помощью замораживающего микротомата.

Для выявления транскрипционного фактора *Raxb* применяли стандартную методику непрямого авидин-биотинового пероксидазного маркирования в свободноплавающих срезах (free floating method). Для устранения неспецифичного окрашивания срезы инкубировали с 1 %-ным раствором неиммунной (нормальной) сыворотки лошади на фосфатном буфере (1.0 М) при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего промывали в трех сменах фосфатного буфера (0.1 М). Далее срезы инкубировали с моноклональными антителами мыши к транскрипционному фактору *Raxb* в разведении 1:4000 (иммуноглобулин G1, клон AD2.38; «Chemicon», США) при 4 °С в течение 24 ч и промывали в трех сменах фосфатного буфера по 5 мин. После этого срезы инкубировали с вторичными биотинилированными антителами лошади к иммуноглобулинам мыши («Vector Labs», США) в течение 2 ч и затем также в течение 2 ч с авидин-биотиновой системой визуализации («Vectastain Elite ABC Kit», «Vector Labs», США) при комнатной температуре в темноте с последующим промыванием в буферном растворе. Данные срезы инкубировали в растворе субстрата для выявления пероксидазы «VIP Substrate Kit» («Vector Labs», США). Развитие иммуногистохимической окраски контролировали под микроскопом. Маркированные срезы промывали в дистиллированной воде, монтировали на стекла, высушивали, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в среду Bio-Optica (Италия).

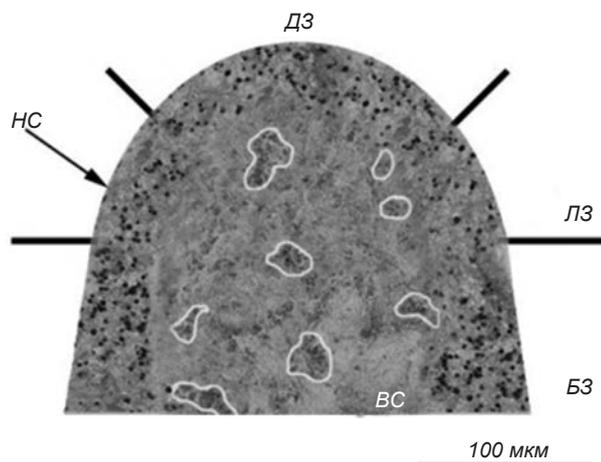
Для контроля специфичности иммуноокрашивания срезы вместо первичных антител к *Raxb* инкубировали с 1 %-ной неиммунной сывороткой лошади в течение 48 ч, далее подвергая стандартным процедурам, описанным выше. Во всех контрольных экспериментах меченые структуры отсутствовали.

Денситометрическое исследование оптической плотности иммуномаркирования *Raxb* проводили с помощью программы денситометрического анализа «Measure Wizard», используя инвертированный микроскоп Axiovert 200M. Оптическую плотность маркирования у клеток различного типа измеряли в пяти независимых полях зрения. Значения данного параметра (в условных единицах оптической плотности – ЕОП) рассчитывали относительно плотности фона и подвергали усреднению. Числовые результаты представлялись в виде средних \pm ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У рыб афферентные волокна от хеморецепторов, расположенных на поверхности тела, идут в составе VII черепномозгового нерва (*n. facialis*) и проецируются в крупное ядро, расположенное по средней линии ромбовидного мозга, – непарную долю лицевого нерва, *lobus impar nervi facialis (LINF)*. Для *LINF* карповых рыб характерны ламинарная организация и топологический принцип связей. В *LINF* выделяют два слоя – наружный и внутренний; в пределах наружного слоя выделяют дорсальную, латеральные и базальные зоны (рис. 1).

Локализация транскрипционного фактора Рах6 в наружном слое *LINF*. Во всех зонах наружного слоя *LINF* присутствовало значительное количество клеток, в которых экспрессировался белковый продукт транскрипционного фактора Рах6 (рис. 2, А, В, Д). Средняя плотность распределения Рах6-ип-клеток в дорсальной зоне составляла 35–36 единиц на тест-поле (поле зрения микроскопа при 400-кратном увеличении). Расстояния между мечеными клетками, как правило, заметно превышали размеры клеточных тел (Б). Плотность распределения меченых клеток в латеральных зонах была выше, чем в дорсальной зоне (В, Г). Данный показатель увеличивался при смещении в росто-каудальном направлении от 39–48 до 70–73 клеток на тест-зону в срезе (В). В



Р и с. 1. Схема организации доли лицевого нерва головного мозга карпа.

НС и *ВС* – наружный и внутренний слои доли; *ДЗ*, *ЛЗ* и *БЗ* – дорсальная, латеральные и базальные зоны *НС* соответственно. Показаны границы ниш *НС*, в которых локализованы Рах6-иммунопозитивные клетки.

Р и с. 1. Схема організації частки лицевого нерва головного мозку карпа.

латеральных зонах клетки с экспрессией Рах6 располагались ближе друг к другу, чем в дорсальной зоне. Межклеточные пространства чаще не превышали размеров клеточных тел.

В базальных зонах наружного слоя *LINF* средняя плотность распределения Рах6-ип-клеток была значительно выше, чем в дорсальном и латеральном участках, варьируя от 100 до 230–258 единиц на тест-поле (рис. 2, Д). Межклеточные расстояния были, как правило, небольшими (Е).

В дорсальной зоне наружного слоя иммуномаркированные клетки располагались преимущественно поодиночке, лишь изредка образуя небольшие кластеры (рис. 2, Б); клетки, входящие в состав кластера, обычно характеризовались относительно невысокой интенсивностью мечения. В латеральных зонах пространственное распределение Рах6-ип-клеток было сходно с таковым в дорсальной зоне (Г). В базальных же зонах наружного слоя кластеры Рах6-ип-клеток встречались чаще (Е), и размеры таких объединений были больше, чем в дорсальной и латеральной зонах.

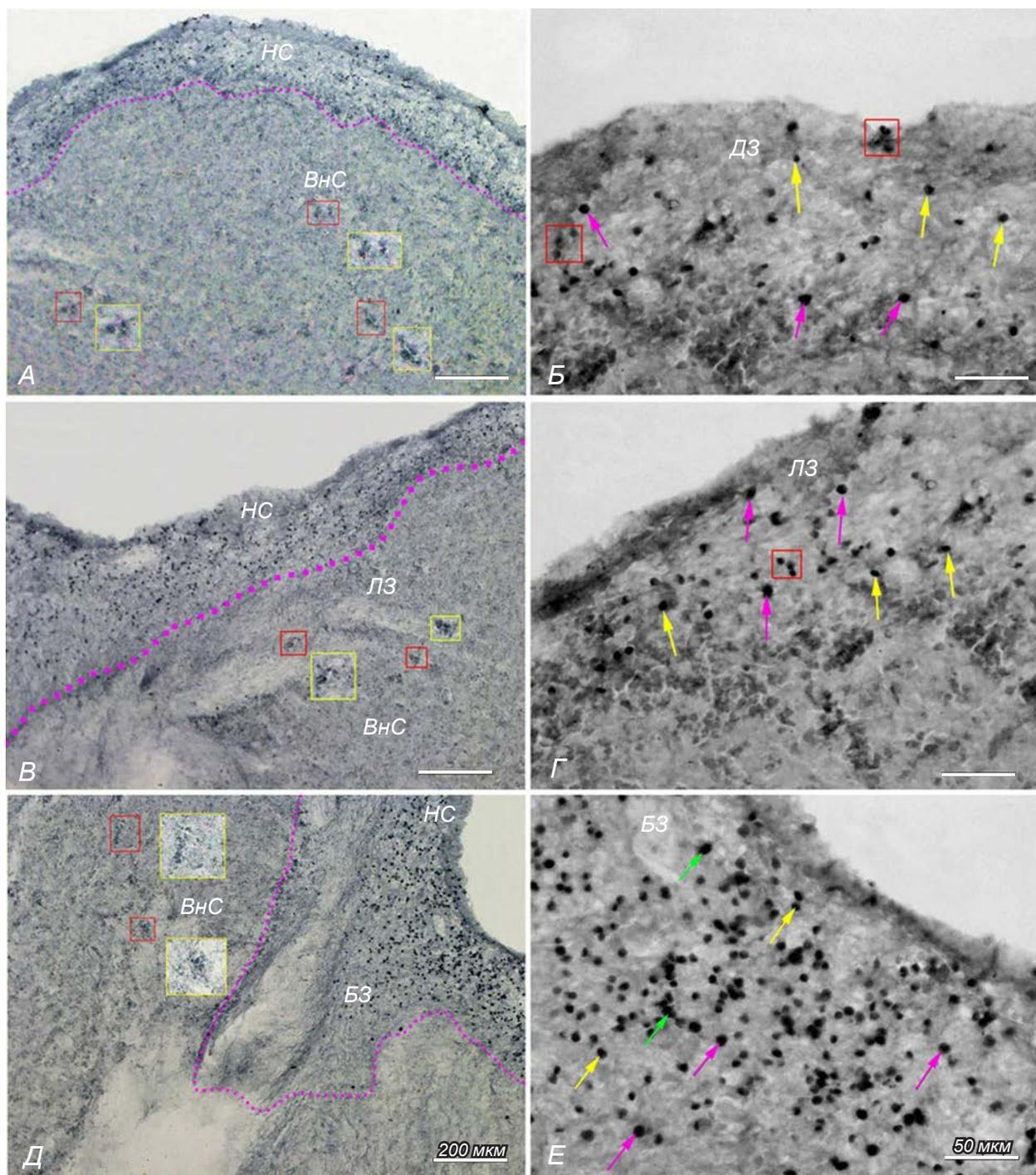
Максимальная оптическая плотность иммуномаркированного преципитата в Рах6-содержащих клетках дорсальной, латеральных и базальных зон наружного слоя достигала 155.0, 175.4 и 153.1 условных ЕОП (рис. 3). У клеток с наибольшей плотностью окрашенного преципитата границы ядра устанавливались с трудом; в иных же случаях хорошо дифференцировались более светлые (менее интенсивно маркированные) ядра, имеющие центральную локализацию либо смещенные к одному из полюсов.

Во всех трех подразделениях наружного слоя *LINF* наибольшее количество Рах6-ип-клеток обнаруживались во внешних участках этого слоя, приближенных к мягкой мозговой оболочке (рис. 2, А, В, Д). В то же время во всех трех зонах имелись клетки с нетипичной локализацией; они находились фактически на границе с внутренним слоем.

Во всех трех подразделениях наружного слоя *LINF* маркированные клетки округлой или овальной формы не имели сколько-нибудь выраженных отростков (рис. 2, Б, Г, Е). Таким образом, они не выявляли каких-либо признаков дифференциации.

Клетки со значительным коэффициентом элонгации поперечного сечения встречались относительно редко. Ядра в таких клетках располагались преимущественно центрально.

Соответственно размерам сом (величинам среднего диаметра их поперечных сечений) Рах6-ип-



Р и с. 2. Локализация белкового продукта транскрипционного фактора Pax6 в доле лицевого нерва (*LINF*) головного мозга взрослого карпа.

A, B, Д – распределение Pax6-иммунопозитивности в дорсальной (*A*), латеральной (*B*) и базальной (*Д*) зонах *LINF*. *НС* – наружный, *ВС* – внутренний слои доли. Красными прямоугольниками ограничены нейрогенные ниши *ВС*, желтыми – фрагменты нейрогенных ниш при большом увеличении; розовым пунктиром обозначены границы *НС*. *Б, Г, Е* – Pax6-иммунопозитивные клетки в наружном слое (*Б* – в дорсальной, *Г* – в латеральной, *Е* – в базальной зоне). Желтыми стрелками обозначены клетки первой, розовыми – второй, зелеными – третьей размерной группы. Красными квадратами обозначены кластеры иммунопозитивных клеток.

Р и с. 2. Локалізація білкового продукту транскрипційного фактора Pax6 у частці лицевого нерва (*LINF*) головного мозку дорослого коропу.

клетки в дорсальной и латеральных зонах наружного слоя *LINF* могли быть отнесены к двум основным размерным группам – мелким и более крупным. Распределения средних диаметров сом таких клеток демонстрировали заметные признаки бимодальности, что и позволяло выделить соответствующие группы клеточных единиц. У мелких клеток дорсальной и латеральных зон диаметры сечения сом составляли 5.8–7.5 и 5.8–7.1, а у более крупных – 7.5–9.6 и 7.1–9.0 мкм соответственно (рис. 3). Относительное количество мелких клеток и в дорсальной, и в латеральных зонах составляло 43, а более крупных – 57 % (рис. 3). В базальных зонах наружного слоя *LINF*, помимо упомянутых выше, наблюдались и более крупные Рах6-ип-единицы; их средние диаметры могли достигать 11.4 мкм. Относительное количество крупных клеток составляло около 25 %, тогда как мелкие клетки встречались реже (рис. 3).

Локализация транскрипционного фактора Рах6 во внутреннем слое LINF. Во внутреннем слое данной структуры мозга взрослых особей карпа клетки, содержащие в себе белок Рах6, располагались в основном в пределах более или менее выраженных клеточных скоплений, отделенных друг от друга иммунонегативными зонами (рис. 1; 2, А, В, Д). Такие скопления квалифицируются как ниши,

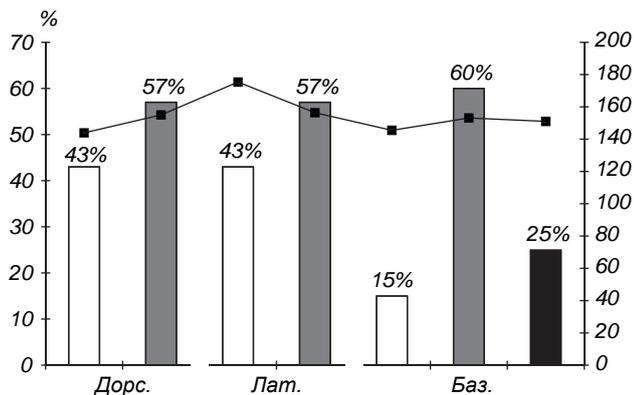
заполненные Рах6-ип-элементами. В среднем обычно в пределах одного среза можно было наблюдать от девяти до 15 ниш, причем их плотность возрастала в вентральном направлении. Среди ниш, включающих в себя Рах6-ип-клетки, выделялись относительно мелкие (площадь поперечного сечения от 459 до 1000 мкм²) и более крупные; площадь отдельных из них достигала 2000–2068 мкм². Мелкие ниши встречались реже, чем крупные; их относительное количество составляло порядка 20–25 %.

Интенсивность маркирования клеток, входящих в состав ип-ниш внутреннего слоя, была, как правило, значительно ниже, чем аналогичный показатель у клеток наружного слоя. В участках внутреннего слоя, прилежащих к дорсальной зоне наружного слоя, индекс оптической плотности маркированных клеток составлял всего от 8.4 до 12.8 ЕОП. В участках вблизи латеральных зон наружного слоя этот индекс мог достигать 37.6, а в базальных участках внутреннего слоя – 38.6 ЕОП. В Рах6-ип-клетках данного слоя границы ядер, как правило, могли быть установлены достаточно легко.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования процессов нейрогенеза в мозгу взрослых костистых рыб начались в 1960–70-х гг. Было обнаружено, что образование новых нейронов в мозгу таких рыб может происходить как после повреждения, так и в условиях интактности [5]. Уже первые исследования данного вопроса с использованием классических гистологических подходов [6] и ауторадиографии (определений распределения Н³-тимидина) [7] позволили обнаружить в мозгу взрослых особей рыб так называемые матричные зоны, в которых наблюдалось особо интенсивное митотическое деление клеток. Вопрос же о том, в какие финальные типы преобразуются вновь сформированные клетки, долгое время оставался невыясненным.

Вскоре (1970–80-е гг.) было обнаружено, что зоны пролиферации имеются и в других отделах ЦНС взрослых рыб, в частности в зрительном тектуме; было также установлено, что в сетчатке могут формироваться новые фоторецепторы [8]. Ультроструктурные исследования позволили получить доказательства того, что клетки в упомянутом отделе мозга рыб способны к дифференциации в типичные нейроны [9]; это, естественно, повысило интерес к изучению данного процесса.



Р и с. 3. Характеристики Рах6-иммунопозитивных (Рах6-ип-) клеток во внешнем слое доли лицевого нерва (*LINF*) мозга карпа.

Представлены диаграммы относительных количеств клеток различных размерных групп (левая шкала, %) и значения средней оптической плотности Рах6-ип-клеток в дорсальной (*Дорс.*), латеральных (*Лат.*) и базальных (*Баз.*) зонах (правая шкала, единицы оптической плотности – ЕОП). Белые, серые и черный столбцы – количества клеток первой, второй и третьей групп (средние диаметры 5.8–7.5, 7.5–9.6 и 9.6–11.4 мкм соответственно).

Р и с. 3. Характеристики Рах6-иммунопозитивных клеток у зрелой особи карпа в части лицевого нерва (*LINF*) мозга карпа.

Более поздние исследования «взрослого» нейрогенеза в мозгу костистых рыб проводились в основном на двух видах – ножегелке *Apteronotus leptorhynchus* и данио *Danio rerio* [2, 10]. Были получены данные о возможности интеграции новых нервных клеток в нейронные сети. Клетки, имеющие свойства стволовых единиц, рассматривались как потенциальные предшественники нейронов и глии. Предполагалось, что процесс гибели клеток путем апоптоза выступает в качестве эффективного регулятора клеточной численности [10, 11]. Были выдвинуты предположения о механизмах регулирования экспрессии генов во время постэмбрионального развития клеток головного мозга [12], и установлена связь между процессом «взрослого» нейрогенеза в интактном мозгу и высоким репаративным потенциалом мозга костистых рыб после нанесения травмы [13].

Отличительной особенностью «взрослого» нейрогенеза у костистых рыб является его высокая интенсивность. Анализ, основанный на маркировании S-фазы митоза клеток с помощью модифицированного нуклеозида 5-бром-2-дезоксигуанидина, показал, что в мозгу *A. leptorhynchus* и данио за 1 ч образуются десятки тысяч новых клеток [14, 15]. Это составляет порядка 0.1 % общего количества клеток головного мозга у соответствующих видов.

Для сравнения следует указать, что в субвентрикулярной зоне (основном участке «взрослого» нейрогенеза у млекопитающих) у взрослых мышей в течение суток формируются до 30 тысяч клеток (т. е. порядка 0.03 % общего количества клеток мозга у данного вида) [16, 17]. В зубчатой извилине гиппокампа у взрослых крыс каждый день образуются примерно девять тысяч новых клеток [18], что соответствует приблизительно 0.003 % клеток мозга у упомянутых животных [19]. Таким образом, скорость пролиферации клеток во взрослом мозгу у костистых рыб по крайней мере на один, если не на два порядка превышает таковую у млекопитающих.

Отличительной особенностью «взрослого» нейрогенеза у костистых рыб является наличие специализированных зон пролиферации – небольших относительно четко ограниченных областей мозга, в которых и на ранних стадиях онтогенеза, и в последующие отрезки времени митотические деления клеток происходят с особо высокой скоростью. Многие из этих зон находятся на территории или вблизи поверхности мозговых желудочков; они рассматриваются как первичные зоны нейрогенеза. Другие матричные области, удаленные от зон пер-

вичной пролиферации, квалифицируются как вторичные зоны [20].

Количество вторичных пролиферативных зон в мозгу взрослых костистых рыб, как уже упоминалось выше [3], довольно значительно. Подобные зоны имеются в мозжечке [15] и ряде других участков конечного, промежуточного, среднего и ромбовидного отделов мозга. В данном аспекте следует также упомянуть обонятельные луковицы и боковые и вентральные участки серого вещества спинного мозга. Результаты нейроанатомических [21] и функциональных [22] исследований дают основания считать дорсолатеральную часть конечного мозга рыб гомологичной гиппокампу млекопитающих и позволяют заключить, что концентрация процесса «взрослого» нейрогенеза в обонятельной луковице и гиппокампе является филогенетически консервативной особенностью мозга позвоночных [23]. Особый интерес, однако, представляют области пролиферации, миграции и дифференциации клеток в специализированных сенсорных областях мозга. К ним относится и ядро лицевого нерва.

Как было обнаружено, *Pax*-гены интенсивно экспрессируются на весьма ранних этапах развития нервной системы – стадиях гастрюляции и образования нервной пластинки, очевидно, влияя и на дальнейшую регионализацию мозга [24]. Эти гены являются ключевыми регуляторами упомянутых выше процессов, контролируя синтез сигнальных молекул и способствуя, таким образом, формированию специфических фенотипов клеток [25]. Дифференцированная экспрессия *Pax6* в мозгу связана с пространственной локализацией клеток, в которых экспрессируются данные гены, в сигнальных сенсорных центрах.

Один из главных феноменов органогенеза – пространственно-временная организация миграции клеток – является необходимым условием для формирования различных клеточных типов. *Pax6*-гены в значительной степени детерминируют процессы перемещения клеток. Для правильной миграции ряда клеточных популяций требуется некий дефицит экспрессии белка *Pax6*. Этот фактор обуславливает изменения миграции нейробластов в развивающейся коре головного мозга и мозжечке мыши [26]. Сокращение числа клеток не обязательно приводит к их дефициту, причем границы прогениторной области благодаря миграции зачастую расширяются. Экспрессия *Pax*-генов во время миграции не обязательна для данного процесса, но она может быть необходима для частичного поддержания про-

гениторного состояния во время миграции при ориентации перемещения пролиферирующих клеток в новые органы и ткани. Наблюдавшиеся в нашей работе Pax6-ип-клетки наружного слоя *LINF*, имеющие нетипичную локализацию (расположенные на границе с внутренним слоем), видимо, могут рассматриваться как морфологическое подтверждение миграции клеток наружного слоя во внутренние участки данного ядра.

Участие белков Pax6 в регуляции клеточной миграции отличается от роли этих белков при их взаимодействии (прямом или косвенном) с молекулами клеточной адгезии. Pax6 участвуют в регуляции экспрессии молекул адгезии L1 [27, 28]. Экспрессия генов *Pax6* влияет также на организацию роста аксонов [29]. Pax6-экспрессирующие клетки продолговатого мозга эмбриона крысы функционально связаны с молекулами клеточной адгезии TAG1 и мигрируют вдоль аксонов, которые экспрессируют этот белок. У *Pax6*-дефицитных крыс экспрессия TAG 1 приостанавливается, что приводит к неправильной миграции данных клеток [26]. Pax6-позитивные нейробласты участвуют в миграционном потоке к обонятельной луковице, где миграция приостанавливается.

Важная функция *Pax*-генов заключается в их способности обеспечивать функциональное переключение процессов пролиферации прогениторных клеток и их дифференциации. В частности, снижение интенсивности пролиферации (подавление митоза) и усиление процессов дифференциации с участием экспрессии упомянутых генов реализуются при формировании глазного пузыря мыши [30]. На более поздних стадиях развития глаза гены *Pax6* в определенные промежутки времени способны активировать нейронспецифичные гены (*Math5*, *Math1* и *Ngn2*), а также прекращать их активность в случае достижения определенного уровня дифференциации [31]. По мере изменения уровня экспрессии Pax6 на ранних стадиях развития глазного поля шпорцевой лягушки *Xenopus* пролиферация стволовых клеток в сетчатке возрастает или убывает, изменяя при этом общую картину клеточной дифференциации. В зрелой же сетчатке экспрессия Pax6 подавляется. При этом функция переключения от пролиферации на ранних стадиях к дифференциации на более поздних сохраняется, что позволяет Pax6 одновременно функционировать и в сетчатке, и в ЦНС [32]. В вышеупомянутых процессах также подразумевается участие нисходящих регуляторных генных каскадов («генов-рабов» и «генов-господ»).

В ходе «взрослого» нейрогенеза изменения уровня фактора Pax6 в гиппокампе крысы обуславливают ускоренное развитие ранних прогениторных клеток на поздних стадиях или быструю дифференциацию в нейроны различных типов [33]. Подобное свойство характерно и для развития спинного мозга. В субвентрикулярной зоне обонятельной луковицы экспрессия Pax6 регулирует миграцию прогениторных клеток в эту луковицу, где происходят их последующая дифференциация и формирование различных подтипов. Вообще у взрослых животных экспрессия Pax6 характеризуется весьма сложными пространственно-временными паттернами [34].

Наружный слой *LINF* головного мозга взрослого карпа содержит в себе сходные по своей морфологии Pax6-содержащие клетки, не имеющие отростков. Различные уровни экспрессии белка Pax6 в разных клетках наружного слоя, видимо, связаны с тем, что данный фактор влияет на ряд процессов – пролиферацию, рост, дифференциацию и миграцию [33, 34]. Первоначально низкий уровень Pax6 способствует пролиферации клеток; затем, с повышением уровня этого фактора в клетках пролиферативной зоны, время выхода из клеточного цикла сокращается, и происходит подавление пролиферации. Относительно низкие уровни Pax6 имеют важное значение для поддержания прогениторного состояния и сохранения недифференцированного паттерна клеток [30, 33]. Нокаут данного гена у мышей приводит к преждевременной дифференциации нейробластов, возникновению атипичных форм олигодендроглии и астроглии в развивающемся спинном мозгу животных [35].

Следует, видимо, полагать, что экспрессия транскрипционного фактора Pax6 в рассматриваемой области интенсивного вторичного нейрогенеза в мозгу взрослых рыб свидетельствует об участии указанного фактора в сложно координированном контроле ряда клеточных процессов – пролиферации прогениторных клеток, регуляции клеточной миграции и дифференциации и управлении нейрогенезом; различные уровни экспрессии этого фактора оказывают влияние на продолжительность клеточного цикла [31, 34, 36]. Подобные способности характерны как для «канонических» (полных) Pax6-белков, так и для различных изоформ данных протеинов. У мышей изоформа 5a основного фактора Pax6 регулирует клеточную пролиферацию только во время развития ЦНС [37]. Эта изоформа, т. е. Pax6(5a), контролирует активность генов нисходящего регуляторного звена (так называемых ге-

нов-рабов). Канонические же Рахб-белки выявлены в субэпендимной зоне и обонятельной луковице мозга млекопитающих [38]. Очевидно, координированная активность генов *Raxb* и их изоформ необходима для правильной дифференциации нейронов различных подтипов и в ходе эмбриогенеза, и в постэмбриональный период.

Поскольку *LINF* является специализированной сенсорной областью мозга, связанной с передачей и обработкой хемосенсорной (вкусовой экстраоральной) сигнализации [39], данная область содержит в себе дифференцированные интернейроны, обеспечивающие интеграцию и обработку указанной информации. Уровень экспрессии Рахб в клетках *LINF* может быть связан с процессом дифференциации вновь образованных нейронов и их миграции в глубокие слои этой доли. Различные уровни оптической плотности маркированного Рахб, наблюдаемые в наружном и внутреннем слоях *LINF* карпа, видимо, свидетельствуют о различном функциональном состоянии Рах-содержащих клеток и преимущественном участии данного фактора либо в процессах пролиферации, либо в процессах миграции и дифференциации. Согласованная экспрессия *Rax*-генов является необходимым условием правильного развития и терминальной дифференциации нейронов [4]. В частности, совместная экспрессия Рахб и Рах2 необходима для формирования границ между различными отделами ЦНС [40]. Таким образом, *Raxb*-гены следует рассматривать как морфогенетические регуляторы, ответственные за переключение между пролиферацией прогениторных клеток и обеспечением правильной нейронной дифференциации [26, 28–32, 41].

Как упоминалось выше, значительное количество Рахб-ип-клеток наблюдались в пределах внутреннего слоя *LINF*. Пространственное распределение этих клеток существенно отличалось от такового в наружном слое. Рахб-ип-клетки, характеризовавшиеся в несколько раз меньшей интенсивностью мечения данного транскрипционного фактора, чем в наружном слое, были сосредоточены в морфологически четко определенных зонах. Такие скопления Рахб-содержащих единиц во внутреннем слое квалифицируются как нейрогенные ниши. Эти ниши разделялись участками, в которых иммунное маркирование отсутствовало. Вероятно, следует полагать, что Рахб-содержащие клетки внутреннего слоя *LINF* (т. е. специализированного образования, участвующего в передаче и обработке сенсорной

сигнализации) являются не пролиферирующими единицами, а клетками, которые находятся в состояниях миграции и дифференциации. Определенный уровень экспрессии *Raxb*-генов в клетках взрослого мозга необходим для обеспечения фенотипа дифференцирующихся прогениторных клеток в результате поступления множественных влияний окружающей среды [42]. При повреждающих воздействиях в нишах внутреннего слоя начинается активная дифференциация новых клеток, которые мигрируют к месту травмирования ЦНС, восстанавливая поврежденную ткань [4, 43].

Из всех рассмотренных участков *LINF* ее базальные участки являются наиболее значительным скоплением клеток, в которых интенсивно экспрессируется белковый продукт транскрипционного фактора Рахб. С учетом этого можно полагать, что базальные области данного ядра представляют собой наиболее важные участки постэмбрионального нейрогенеза в сенсорных ядрах мозга костистых рыб. В указанной области образуются *de novo* и находятся в состоянии дифференциации и миграции клетки, преимущественно образованные в наружном слое. Несмотря на то что функции Рахб во взрослом мозгу еще сравнительно мало изучены, имеются убедительные подтверждения важной роли данного фактора в управлении процессами, связанными с образованием и созреванием нейронов, и в обеспечении согласованности этих процессов [4]. В частности, экспрессия генов *Raxb* направляет течение органогенеза, обуславливая наличие достаточного количества прогениторных клеток для развивающихся тканей. Для функционирования *LINF* у взрослых рыб важно то, что гены *Raxb* обеспечивают поддержание клеток в недифференцированном состоянии и направляют дифференциацию различных клеточных типов в нейрогенных нишах.

Как указывалось выше, экспрессия Рахб в *LINF* мозга карпа может рассматриваться как мультипотентный переключатель, направляющий клетки данной области по различным путям миграции и дифференциации, зависящим от местоположения отдельных клеток в пространстве и от влияний на них особых условий клеточного окружения. Популяции Рахб-экспрессирующих клеток в *LINF* в значительной степени обеспечивают условия для реализации предварительно заложенных клеточных программ, способных связывать сигналы из внешней и внутренней сред в процессе онтогенеза взрослого животного.

Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (МД 4318.2015.04) и Программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» (проект № 15-1-6-116).

Все экспериментальные процедуры соответствовали международным этическим стандартам – положениям Европейской Конвенции о защите животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (86/609/ЕЕС, 1986, Страсбург), и нормативам Комитетов по биоэтике Института биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН и Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины.

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

М. Е. Стуканева¹, Е. В. Пуцина^{1, 2}

ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА PAX6 У ЧАСТЦІ ЛИЦЬОВОГО НЕРВА МОЗКУ КОРОПА

¹ Інститут біології моря ім. А. В. Жирмунського ДВВ РАН, Владивосток (РФ).

² Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

Резюме

З використанням імунопероксидазного маркування досліджували розподіл транскрипційного фактора Pax6 у непарній частці лицьового нерва (*lobus impar nervi facialis* – *LINF*) мозку дорослих особин коропа (*Cyprinus carpio*). Значна частина клітин, у котрих експресувався білок Pax6, були локалізовані в дорсальній, латеральних та базальних зонах зовнішнього шару *LINF*. Клітини з інтенсивною Pax6-позитивністю звичайно мали округлу або слабо подовжену форму; частіш за все вони розташовувалися поодинокі. Середній діаметр більшості мічених клітин складав 5.8–9.6 мкм; у базальній зоні частина клітин мали більші розміри (до 11.4 мкм). Щільність локалізації Pax6-позитивних клітин у зовнішньому шарі базальної зони *LINF* була помітно вищою, ніж у дорсальних і латеральних зонах. У межах внутрішнього шару *LINF* також були виявлені клітини з відносно високим вмістом Pax6, але оптична щільність імуномаркованого матеріалу в цьому шарі була в декілька разів нижчою, ніж у зовнішньому. У внутрішньому шарі мічені клітини утворювали значні скупчення – ніші, розділені ділянками імунонегативності. Площа перерізу таких ніш варіювала від приблизно 460 до 2070 мкм². Значну частину клітин внутрішнього шару, видимо, слід розглядати як одиниці, що знаходяться в стані міграції. Базальні ділянки *LINF*, очевидно, являють собою найбільш значну область постембріонального («дорослого») нейрогенезу в межах да-

ної структури; там утворюються *de novo* і знаходяться в станах диференціації та міграції клітини, утворені переважно в зовнішньому шарі матричної зони.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Н. Г. Андреева, Д. К. Обухов, *Эволюционная морфология нервной системы позвоночных*, Лань, СПб. (1999).
2. 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 zones,” *J. Comp. Neurol.*, **436**, 92-110 (2001).
3. G. K. Zupanc, “Neurogenesis, cell death and regeneration in the adult gymnotiform brain,” *J. Exp. Biol.*, **202**, 1435-1446 (1999).
4. J. A. Thompson and M. Ziman, “Pax genes during neural development and their potential role in neuroregeneration,” *J. Prog. Neurobiol.*, **94**, 334-351 (2011).
5. J. Altman and E. Das, “Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats,” *J. Comp. Neurol.*, **124**, 319-336 (1965).
6. W. Kirsche, “Überpostembryonale matrix zonenim gehirnverschiedener vertebraten und deren beziehung zur hirnbauplanlehre,” *Z. Mikrosk.-Anat. Forsh.*, **77**, 313-406 (1967).
7. W. Richter and D. Kranz, “Autoradiographische untersuchungen über die abhängigkeit des 3H-thymidinindex vom lebensalter in den matrixzonen des telencephalons von *Lebistesreticulatus* (Teleostei),” *Z. Mikrosk.-Anat. Forsh.*, **81**, 530-554 (1970).
8. P. Johns, “Formation of photoreceptors in larval and adult goldfish,” *J. Neurosci.*, **2**, 178-198 (1982).
9. P. A. Raymond, S. S. Easter, and J. A. Burnham, “Post-embryonic growth of the optic tectum in goldfish. II. Modulation of cell proliferation by retinal fiber input,” *J. Neurosci.*, **3**, 1092-1099 (1983).
10. G. K. Zupanc, K. Hinsch, and F. H. Gage, “Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain,” *J. Comp. Neurol.*, **488**, 290-319 (2005).
11. G. K. Zupanc and M. M. Zupanc, “Birth and migration of neurons in the central posterior/prepace-maker nucleus during adulthood in weakly electric knifefish,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9539-9543 (1992).
12. 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).
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. G. K. Zupanc and I. Horschke, “Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study,” *J. Comp. Neurol.*, **353**, 213-233 (1995).
15. K. Hinsch and G. K. Zupanc, “Generation and long-term persistence of new neurons in the adult zebrafish brain: a quantitative analysis,” *Neuroscience*, **146**, 679-696 (2007).
16. C. Lois and A. Alvarez-Buylla, “Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain,” *Science*, **264**, 1145-114 (1994).

17. R. W. Williams, "Mapping genes that modulate brain development: a quantitative genetic approach," *Mouse Brain Dev.*, **30**, 21-49 (2000).
18. H. A. Cameron and R. D. McKay, "Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus," *J. Comp. Neurol.*, **435**, 406-417 (2001).
19. S. Herculano-Houzel and R. Lent, "Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain," *J. Neurosci.*, **25**, 2518-2521 (2005).
20. E. Pouwels, "On the development of the cerebellum of the trout, *Salmo gairdneri*: I. Patterns of cell migration," *Anat. Embryol.*, **152**, 291-308 (1978).
21. A. B. Butler, "Topography and topology of the teleost telencephalon: a paradoxon resolved," *Neurosci. Lett.*, **293**, 95-98 (2000).
22. M. Portavella, B. Torres, and C. Salas, "Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium," *J. Neurosci.*, **24**, 2335-2342 (2004).
23. G. K. Zupanc, "Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain," *J. Comp. Physiol.*, **192**, 649-670 (2006).
24. C. Redies, "Modularity in vertebrate brain development and evolution," *BioEssays*, **23**, 1100-1111 (2001).
25. C. Soukkaieh, E. Agius, and C. Soula, "Pax2 regulates neuronal-glia cell fate choice in the embryonic optic nerve," *Dev. Biol.*, **303**, 800-813 (2007).
26. M. Horie and K. Sango, "Subpial neuronal migration in the medulla oblongata of Pax-6-deficient rats," *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 49-57 (2003).
27. R. Meech, P. Kallunki, and G. M. Edelman, "A binding site for homeodomain and Pax proteins is necessary for L1 cell adhesion molecule gene expression by Pax-6 and bone morphogenetic proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2420-2425 (1999).
28. D. Caric, D. Gooday, and R. E. Hill, "Determination of the migratory capacity of embryonic cortical cells lacking the transcription factor Pax6," *Development*, **124**, 5087-5096 (1997).
29. S. Kanakubo, T. Nomura, K. Yamamura, et al., "Abnormal migration and distribution of neural crest cells in Pax6 heterozygous mutant eye, a model for human eye diseases," *Genes Cells*, **11**, 919-933 (2006).
30. R. H. Duparc, M. Abdouh, and J. David, "Pax6 controls the proliferation rate of neuroepithelial progenitors from the mouse optic vesicle," *Dev. Biol.*, **301**, 374-387 (2007).
31. T. Marquardt, R. Ashery-Padan, and N. Andrejewski, "Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells," *Cell*, **105**, 43-55 (2001).
32. N. A. Zaghoul, "Alterations of rx1 and pax6 expression levels at neural plate stages differentially affect the production of retinal cell types and maintenance of retinal stem cell qualities," *Dev. Biol.*, **306**, 222-240 (2007).
33. M. Maekawa, N. Takashima, and Y. Arai, "Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis," *Genes Cells*, **10**, 1001-1014 (2005).
34. M. Kohwi, N. Osumi, and J. L. Rubenstein, "Pax6 is required for making species subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb," *J. Neurosci.*, **25**, 6997-7003 (2005).
35. M. Sugimori, M. Nagao, N. Bertrand, et al., "Combinatorial actions of patterning and HLH transcription factors in the spatiotemporal control of neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord," *Development*, **134**, 1617-1629 (2007).
36. T. C. Tuoc, K. Radyushkin, A. B. Tonchev, et al., "Selective cortical layering abnormalities and behavioral deficits in cortex-specific Pax6 knock-out mice," *J. Neurosci.*, **29**, 8335-8349 (2009).
37. N. Haubst, J. Berger, and V. Radjendirane, "Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development," *Development*, **131**, 6131-6140 (2004).
38. H. Nakazaki, A. C. Reddy, and B. L. Mania-Farnell, "Key basic helix-loop-helix transcription factor genes Hes1 and Ngn2 are regulated by Pax3 during mouse embryonic development," *Dev. Biol.*, **316**, 510-523 (2008).
39. M. F. Wullmann, "The central nervous system," in: *The Physiology of Fishes*, Boca Raton, CRS Press, New York (1998), pp. 245-282.
40. J. D. Burrill, L. Moran, and M. D. Goulding, "PAX2 is expressed in multiple spinal cord interneurons, including a population of EN1+ interneurons that require PAX6 for their development," *Development*, **124**, 4493-4503 (1997).
41. E. Charytonowicz, I. Matushansky, and M. Castillo-Martin, "Alternate PAX3 and PAX7 C-terminal isoforms in myogenic differentiation and sarcomagenesis," *Clin. Trans. Oncol.*, **13**, 194-203 (2011).
42. J. K. Gerber, T. Richter, and E. Kremmer, "Progressive loss of PAX9 expression correlates with increasing malignancy of dysplastic and cancerous epithelium of the human oesophagus," *J. Pathol.*, **197**, 293-297 (2002).
43. G. K. Zupanc, *Adult Neurogenesis in Teleost Fish*, Springer, Tokio (2012).