

На правах рукописи

ПУЩИНА

Евгения Владиславовна

**СТРУКТУРА, ХЕМОАРХИТЕКТОНИКА И
ПОСТЭМБРИОНАЛЬНЫЙ ГИСТОГЕНЕЗ ЦНС РЫБ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Владивосток – 2012

Работа выполнена в лаборатории цитофизиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор **Обухов Дмитрий Константинович**

Официальные оппоненты:

Мотавкин Павел Александрович, доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Владивостокский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, советник ректората по науке

Отеллин Владимир Александрович, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова, Российской академии наук, зав. лабораторией онтогенеза нервной системы

Иванков Вячеслав Николаевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Дальневосточный федеральный университет», зав. кафедрой морской биологии и аквакультуры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Защита диссертации состоится « 16 » ноября 2012 г.

в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии моря им А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690059, Владивосток, ул. Пальчевского, 17). Факс: (423) 2310-900, электронный адрес: inmarbio@mail.primorye.ru

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Автореферат разослан « » августа 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Вашенко

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Вопросы эволюции ЦНС позвоночных животных являются одними из наиболее важных в современной эволюционной нейробиологии и физиологии. Исследованию структурно-функциональной организации ЦНС позвоночных уделяется в последнее время особое внимание в связи с широким использованием в научных экспериментах представителей разных групп позвоночных животных, в том числе и низших (рыб, амфибий). Изучение структуры и эволюции ЦНС рыб занимает в этом ряду особое место. Рыбы – наиболее крупный надкласс позвоночных, насчитывающий от 25000 до 31000 видов, в котором в процессе эволюции происходили значительные преобразования. Как эти преобразования отразились на организации их ЦНС, какие структурно-функциональные системы мозга сохранили свои базовые черты, а какие претерпели изменения? Можно ли экстраполировать данные, полученные на представителях отдельных групп позвоночных, в том числе и рыб, на других животных, включая млекопитающих и человека?

В процессе эмбрионального развития позвоночных мы встречаемся с разными вариантами формирования ряда отделов головного мозга. Это касается в первую очередь конечного мозга. Так, у лучеперых рыб (*Actinopterygii*) конечный мозг развивается по эвертированному типу, принципиально отличающемуся от конечного мозга инвертированного типа, характерного для большинства других групп позвоночных, включая хрящевых и двоякодышащих рыб. Согласно современной трактовке, эверсия приводит в процессе развития конечного мозга к формированию полушарий, лишенных латеральных мозговых желудочков, тогда как в полушариях, построенных по инвертированному типу, желудочки формируются. Это связано с разными направлениями миграции нейронов и их распределением в структурах полушария, что значительно затрудняет проведение гомологий зон полушарий эвертированного и инвертированного типов (Butler, Hodos, 2005; Wullimann, Verner, 2007). Из-за эверсии конечного мозга вопрос о местоположении и гомологии ряда отделов полушарий костистых рыб остается до сих пор открытым. В современной литературе существуют разные (часто прямо противоположные) гипотезы относительно такого рода гомологий (Northcutt, 2008; Medina, 2009). Это связано, в частности, с недостаточностью или даже отсутствием ряда базовых данных о структурно-функциональной организации отделов мозга рыб (особенно у представителей таких важных в эволюционном плане групп, как осетровые и лососевые).

В настоящее время единого представления о механизмах физиологической интеграции различных нейромедиаторных модулирующих систем в головном мозге рыб не сформировано. Результаты исследований на различных представителях костистых рыб показали существенные межгрупповые отличия в организации как неспецифических (моноаминергических, дофаминергических, холинергических и др.), так и специфических афферентных проекций в конечный мозг (Arevalo, et al., 1995; Wullimann, 1998, Adrio et al., 1999; Clemente et al., 2004). Сигналам, поступающим от так называемых неспецифических проводящих систем мозга, отводят чаще всего второстепенную роль нейромодуляторов, инициирующих длительные пластические перестройки межнейронных взаимодействий, обеспечивающих непосредственную связь сенсорных и моторных центров при формировании моторных программ поведения. При этом восходящие системы

активации у костистых рыб имеют существенные особенности, связанные с организацией сенсорных систем и их центральных проекций, преобладанием того или иного типов анализаторов, широкой адаптивной радиацией, слабой степенью цефализации мозга и особым типом гистогенеза ЦНС. Изучение этих вопросов является одной из задач нашего исследования.

В последние годы значительное внимание нейробиологов различного профиля привлекает участие в работе мозга «газообразных посредников»: оксида азота (NO) и сероводорода (H₂S). Их присутствие обнаруживается в мозге у представителей разных групп позвоночных: от круглоротых до человека. Немногочисленные данные указывают на высокую степень вариабельности в распределении нитроксидазгических нейронов в мозге рыб (Villani et al., 1995; Anken Rahman, 1996; Villani, Guarnieri, 1999), а сведения об участии оксида азота и сероводорода в функциональной активности нервной системы рыб неупорядочены и противоречивы. Обращает на себя внимание тот факт, что относительное количество NO-синтезирующих нейронов и клеток глии в сенсорных, двигательных и интегративных центрах мозга рыб существенно превышает таковое у наземных позвоночных, в частности млекопитающих (Arevalo et al., 1995; Villani, Guarnieri, 1999; Bordieri et al., 2003). Это предполагает более широкое и разнообразное участие NO в метаболизме нейронов и глии в ЦНС рыб по сравнению с млекопитающими. Однако сведения о взаимоотношениях NO-продуцирующих нейронов мозга рыб с системами классических нейромедиаторов, таких как ацетилхолин, катехоламины и ГАМК, в литературе отсутствуют. Практически ничего не известно о распределении H₂S-продуцирующих систем в ЦНС костистых рыб. Особое значение эти исследования приобретают в связи с появившимися данными о морфогенетической роли классических и газообразных посредников в становлении ЦНС позвоночных животных (Угрюмов, 2010).

Мозг рыб обладает уникальной для позвоночных особенностью – он растет по мере роста организма в течение всей жизни. В связи с этим рыбы являются удобным модельным объектом для изучения эмбрионального и постэмбрионального развития ЦНС, влияния на эти процессы различных факторов. Показано, что в мозге взрослых позвоночных сохраняется система камбиальных элементов, активность которых позволяет пополнять популяцию нейронов и глии в течение длительного периода после рождения (Zupanc, 2009). В настоящее время механизмы пре- и постнатального морфогенеза мозга у рыб, которые долгое время сохраняют личиночное состояние, практически не изучены (Zupanc, 1995; Grandel et al., 2006; Kaslin et al., 2008).

Особенно это касается роли т.н. «радиальной глии» в процессах морфогенеза мозга, наличия и распределения пролиферативных зон в мозге взрослых рыб. Результаты исследований на *Danio rerio* показали, что новообразованные клетки двигаются от желудочка вглубь мозга, где они дифференцируются в нейроны (Zupanc, 2006). Было установлено, что центры пролиферации локализованы вдоль всей rostro-каудальной оси мозга. Интерес к исследованию этих процессов у рыб обусловлен еще и тем, что «радиальная глия», связанная с процессами миграции и дифференцировки нейронов и глии в пренатальном периоде, в большом количестве присутствует в мозге рыб и во взрослом состоянии (в отличие от других позвоночных). Однако, несмотря на имеющиеся в литературе сведения, участие РГ в процессе нейрогенеза взрослых животных мало изучено. Одной из причин

недостатка такой информации является небольшое количество исследованных в этом плане видов и групп рыб, отсутствие надежных маркеров РГ у низших позвоночных.

Осетровые и лососевые рыбы, явившиеся основными объектами нашего исследования, представляют собой древнейшие группы позвоночных, являющиеся наиболее примитивными ветвями лучеперых рыб (Дорофеева, 1998; Артюхин, 2008). На сегодняшний день сведения о развитии мозга осетровых и лососевых, взаимоотношениях эмбриональных и дефинитивных частей в его структуре, процессов пре- и постнатального нейрогенеза, организации и становления нейромедиаторных и модулирующих систем мозга в литературе крайне ограничены. Особенно это касается осетровых рыб, эволюция которых осуществлялась по пути пedomорфоза, для которого характерно замедление темпов онтогенеза органов или их систем и сохранения у взрослых особей эмбрионального состояния соответствующих признаков.

Цель настоящей работы – исследовать организацию, проекционные особенности и взаимоотношения сигналтрансдукторных систем, продуцирующих классические нейромедиаторы (катехоламины, ацетилхолин, гамма-аминомасляная кислота – ГАМК) и газотрансмиттеры (оксид азота и сероводород), в мозге рыб и оценить их участие в процессах постэмбрионального морфогенеза ЦНС.

В работе решались следующие задачи:

1. На основе собственных и литературных данных дать морфофункциональную характеристику системам классических (катехоламинергической, холинергической, ГАМК-ергической) нейромедиаторов у рыб.
2. Проанализировать диэнцефало-теленцефальные взаимоотношения у лососеобразных и карпообразных рыб; дать оценку морфологической, нейрохимической структуре конечного и промежуточного мозга и исследовать связи сенсорных систем с конечным мозгом.
3. Охарактеризовать организацию медиаторноспецифических систем лососей в различные периоды постэмбрионального морфогенеза. Сопоставить стратегии пролиферативной активности матричных зон мозга с распределением медиаторноспецифических и газотрансмиттерных систем.
4. Сопоставить топографию медиаторноспецифических образований ретикулярной формации, сенсорных и двигательных центров ствола и спинного мозга с системами, экспрессирующими газотрансмиттеры.
5. Исследовать взаимоотношение процессов пролиферации и апоптоза в процессе дифференцировки и развития сенсорных систем мозга в постэмбриональный период.
6. Оценить участие газообразных медиаторов в процессах постэмбрионального морфогенеза рыб.

Научная новизна работы. Впервые проведено исследование морфологической, нейрохимической организации и связей сенсорных центров конечного и промежуточного мозга симы *Oncorhynchus masou*. Установлено, что у взрослой симы присутствует уникальный комплекс катехоламинсинтезирующих шипиковых нейронов в вентральных областях теленцефалона, функциональная специализация которого, по-видимому, не эквивалентна таковой нейронам стриатума других позвоночных.

Исследована организация катехоламинергических центров переднемозгового и стволового отделов мозга представителя карпообразных горчака *Rhodeus sericeus*. Впервые изучены взаимоотношения катехоламинергической и NO-продуцирующей систем промежуточного мозга. Установлено два источника катехоламинергической иннервации конечного мозга, доказано, что крупные катехоламинергические клетки заднетуберальной области являются источником восходящих проекций в вентральный теленцефалон.

Исследована нейрохимическая структура стволовых, медуллярных и спинальных отделов мозга рыб. Показано, что у симы NO является нейромодулятором холинергических сомато-, висцеросенсорных и висцеромоторных систем продолговатого и спинного мозга. У амурского осетра *Acipenser schrenckii* впервые изучены взаимоотношения катехоламинергической и NO-продуцирующей систем спинного мозга.

Впервые исследованы процессы постэмбрионального морфогенеза ЦНС осетра и симы, у которых долгое время сохраняются признаки фетальной организации. Установлено, что в перивентрикулярной области мозга симы TH-, ГАМК-ип и NADPH-d-позитивные клетки, имеющие морфологию радиальной глии, расположены в областях PCNA-иммуногенных пролиферативных зон.

Установлено, что в мозге амурского осетра в различные периоды онтогенеза продолжаются базисные гистогенетические процессы. Для раннего постэмбрионального периода характерно формирование вторичных матричных зон. В более поздний период развития процессы пролиферации и апоптоза в мозге осетра способствуют формированию и развитию центральных проекций сенсорных областей мозга.

Впервые в ЦНС рыб исследовано распределение H₂S-продуцирующих элементов, имеющих видоспецифические особенности. У симы изучены взаимоотношения NO- и H₂S-продуцирующих систем. Установлено участие H₂S в модуляции ГАМК-ергической нейротрансмиссии в мозге рыб.

Теоретическое и практическое значение работы. Изучение процессов эволюционного развития ЦНС позвоночных животных и выявление общих закономерностей работы головного мозга животных и человека является важной фундаментальной проблемой эволюционной морфологии. Исследование диэнцефало-теленцефальных отношений в широко дивергентной группе костистых рыб в связи с эверсией их переднемозгового отдела является актуальным подходом для разрешения ряда вопросов функциональной гомологии мозга рыб и других позвоночных. Изучение морфологической и нейрохимической организации и связей конечного и промежуточного отделов мозга у слабо изученных тихоокеанских лососей является определенным вкладом в решение этой проблемы. Исследование связей ядер прегломерулярного комплекса симы выявило восходящие проекции в медиальную и латеральную зоны паллиума. Полученные данные подтверждают гипотезу, что прегломерулярно-мамиллярный комплекс и медиальная зона дорсального теленцефалона рыб, участвующие в процессах обучения и памяти, могут являться функциональными аналогами лимбической системы млекопитающих.

Исследование катехоламинергической системы у карпообразных выявило наличие высокоспециализированного комплекса КЭ клеток в промежуточном мозгу, часть которых синтезирует NO и образует восходящие проекции на вентральную часть (стриатум) конечного мозга. Идентифицированная нами система в мозге

горчака *Rhodeus sericeus*, возможно, соответствует нигростриатной системе мозга амниот. Установлено, что паттерны распределения катехоламинсинтезирующих клеток мозга у лососевых и карпообразных рыб значительно отличаются.

Результаты данной работы могут внести вклад в понимание клеточных механизмов формирования структуры ЦНС рыб в постэмбриональный период онтогенеза. Установленные особенности структурной и нейрохимической организации и характеристика базисных гистогенетических процессов (пролиферации, миграции и дифференциации нервных клеток) во время формирования отделов головного мозга у рыб с признаками эмбрионализации расширяют существующие представления о гистогенезе данных структур в постнатальный период. Предполагается, что во время постэмбрионального онтогенеза у рыб ряд нейротрансмиттеров и газообразных посредников могут рассматриваться в качестве факторов, запускающих и регулирующих клеточные и тканевые процессы генетической программы развития мозга. Материалы данного исследования определяют круг экспериментальных моделей для изучения процессов постэмбрионального нейрогенеза. Полученные данные могут быть использованы в преподавании морфологических дисциплин в процессе подготовки зоологов, гистологов, эмбриологов.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на Международном семинаре «Современные проблемы физиологии и экологии морских животных (рыбы, птицы, млекопитающие)» (Ростов-на-Дону, 2002); IV Международной конференции по функциональной нейроморфологии «Колосовские чтения» (СПб, 2002); VII Региональной конференции по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии студентов, аспирантов, молодых преподавателей и сотрудников вузов и научных организаций Дальнего Востока России (Владивосток, 2004); Симпозиуме с международным участием «Клеточные, молекулярные и эволюционные аспекты морфогенеза» (Москва, 2007); Международной научно-практической конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов – 2» (Борок, 2007); 3-ем, 5-ом, 6-ом и 8-ом Международных междисциплинарных конгрессах «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Украина, 2007, 2009, 2010, 2012); Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы нейроэндокринных регуляций, посвященной 90-летию академика Т.М. Турпаева» (Москва, 2008); Международной научной конференции «Проблемы регуляции висцеральных функций» (Минск, 2008); 11- and 12-th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and Behavior» (St-Petersburg, 2008; 2009); Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы функциональной межполушарной асимметрии и нейропластичности» (НИИ мозга РАМН, Москва, 2008); Международной научной конференции, посвященной 200-летию Чарльза Дарвина «Современные взгляды на эволюцию органического мира» (Киев, Украина, 2009); X-XII научных сессиях Морской биологической станции Санкт-Петербургского государственного университета (Санкт-Петербург, 2009; 2010; 2011); Международной конференции «Закономерности развития патологических состояний и их коррекция» (Минск, Беларусь, 2009); XV Международной конференции по нейрокибернетике (Ростов-на-Дону, 2009); X конгрессе международной ассоциации морфологов (Ярославль, 2010); VIII Всероссийской конференции, посвященной 85-летию А.Л. Поленова

«Нейроэндокринология-2010» (СПб, 2010); XXI научном совещании «Фундаментальные и прикладные аспекты гистологии» к 80-летию проф. А.А. Клишова (СПб, 2010); Всероссийской конференции с международным участием «Современные направления исследований функциональной межполушарной асимметрии и пластичности мозга. Экспериментальные и теоретические аспекты нейропластичности» (Москва, 2010); III Международной конференции «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2010); Вторых чтений памяти академика В.Л. Касьянова (Владивосток, 2011); Международной научной конференции «Актуальные вопросы науки и образования» (Москва, 2011); XIV Международном совещании и VII школе по эволюционной физиологии, посвященных памяти акад. Л.А. Орбели (СПб, 2011); II Всероссийской конференции с международным участием "Современные проблемы эволюционной морфологии животных" к 105-летию со дня рождения академика А.В. Иванова (СПб, 2011); Международной научной конференции «Актуальные вопросы науки и образования» (Москва, 2012); XI конгрессе международной ассоциации морфологов (Самара, 2012), First European Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide (Smolenice, Slovakia 2012), II International Neural Regeneration Symposium (China, Shinjan, 2012). Кроме того, результаты диссертации обсуждались на ежегодных научных конференциях Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН в период с 2002 по 2012 гг.

Положения, выносимые на защиту:

1. Медиаторно-специфические системы в мозге рыб характеризуются морфологической и функциональной гетерогенностью, отражающей их молекулярные и фенотипические особенности. У рыб организация медиаторно-специфических систем находится в соответствии с их функциональной специализацией, имеющей адаптационную направленность. Наличие морфологически и функционально гетерогенных популяций нейронов у рыб с признаками фетализации связано с участием медиаторно-специфических систем в регуляции постэмбрионального морфогенеза ЦНС.
2. Формирование системы нейрохимической коммуникации в ЦНС симы *O. masou* в постэмбриональный период проходит в два этапа. На первом этапе недифференцированные клетки располагаются в матричных зонах мозга и экспрессируют специфические синтезы (КЭ, ГАМК, NO, транскрипционные факторы). Эти вещества, действуя паракринно, участвуют в регуляции базисных гистогенетических процессов: пролиферации, миграции клеток, дифференцировки клеток-мишеней и экспрессии их специфического фенотипа. Под воздействием данных факторов на втором этапе происходит формирование специфических связей, развитие отростков нейронов и синаптогенез.
3. Становление специфических систем активации конечного мозга в постэмбриональный период осуществляется параллельно с дифференцировкой и развитием прегломерулярного комплекса. Системы паракринной и дистантной (синаптической) нейротрансмиссии в мозге симы существуют одновременно, способствуя росту мозга в течение всей жизни.
4. У осетра *A. schrenckii* в основе постэмбрионального морфогенеза мозга, и, в частности, развития сенсорных систем лежат определенные соотношения процессов пролиферации и апоптоза, имеющие NO-зависимый механизм регуляции.

5. NO- и H₂S-продуцирующие системы в мозге рыб:

- 1) являются самостоятельными нейронными комплексами, выполняющими специализированные функции в работе местных нейронных сетей;
- 2) представляют собой отдельные не перекрывающиеся между собой системы внутри- и межклеточного сигналинга, модулирующие активность холин-, ГАМК- и катехоламинергических систем, соответственно;
- 3) регулируют процессы постэмбрионального нейрогенеза в матричных зонах мозга.

Публикации результатов работы. По теме диссертации опубликовано 66 научных работ, среди которых 45 статей (в том числе 25 в журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук», входящие в международные базы цитирования), и 1 учебно-методическое пособие.

Работа выполнена в Лаборатории цитофизиологии Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. Все экспериментальные данные получены автором лично или при его непосредственном участии. Отдельные этапы работы выполнялись в соавторстве с сотрудниками ряда лабораторий Института биологии моря и сотрудниками ЦНИЛ Дальневосточного государственного медицинского университета (г. Хабаровск) и сотрудниками кафедры цитологии и гистологии Санкт-Петербургского государственного университета.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 361 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, пяти глав, отражающих результаты собственных исследований, их обсуждения, заключения и выводов. Список литературы содержит 384 источника (24 отечественных и 360 зарубежных авторов). Диссертация иллюстрирована 95 рисунками и 21 таблицей.

Диссертационная работа выполнялась в рамках плановой научно-исследовательской работы Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН при финансовой поддержке грантов ДВО (гранты №№ 03-ЗГ-06-097, 04-З-Ж-06-001, 05-III-Г-06-099, 09-III-В-06-266, 12-III-А-06-095), Гранта Американского фонда гражданских исследований и развития (CRDF) и Министерства образования РФ (№ У2-В-03-05), Гранта Президента РФ (МК-9001.2006.4).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика объектов исследования. Работа выполнена на 9 видах костистых рыб, среди которых наиболее детально были исследованы сима *Oncorhynchus masou* (сем. Salmonidae), амурский осетр *Acipenser schrenckii* (сем. Acipenseridae) и амурский горчак *Rhodeus sericeus* (сем. Cyprinidae). В таблице 1 приведена общая характеристика исследованного материала. Проведены исследования морфологической и нейрохимической организации различных отделов мозга, их связей и постнатального морфогенеза ЦНС.

У симы 2–3 летнего возраста были исследованы интегративные системы мозга: конечный мозг, зрительный тектум и мозжечок; в промежуточном мозге исследовали сенсорные зоны – прегломерулярный комплекс, включающий переднее, латеральное

Объекты исследования

Группы исследованных рыб	Число особей
Молодь симы <i>Oncorhynchus masou</i> в возрасте 3 месяца	20
Молодь симы <i>Oncorhynchus masou</i> в возрасте 6 месяцев	20
Молодь симы <i>Oncorhynchus masou</i> в возрасте 1 год	20
Молодь симы <i>Oncorhynchus masou</i> в возрасте 2 года	40
Сима <i>Oncorhynchus masou</i> 3 года	60
Кета <i>Oncorhynchus keta</i>	20
Горчак <i>Rhodeus sericeus</i>	30
Молодь осетра <i>Acipenser shrenkii</i> в возрасте 2 месяцев	40
Осетр амурский <i>Acipenser shrenkii</i> 3 года	19
Карп <i>Cyprinus carpio</i>	10
Опистоцентр <i>Pholidapus dybowskii</i>	10
Гольян <i>Phoxinus phoxinus</i>	8
Карась <i>Carassius carassius</i>	8
Фолис <i>Pholis nebulosus</i>	8
Терпуг <i>Hexagrammus octogrammus</i>	8
Общее количество исследованных рыб	321

прегломерулярные ядра, субгломерулярное ядро и мамиллярные тела; перивентрикулярно расположенные гипофизотропные ядра: преоптическое мелко- и крупноклеточное, задне- и переднетуберальные, паравентрикулярный орган, дорсо-медиальные и вентромедиальные ядра таламуса, медиобазальный гипоталамус; в среднем мозге – ядра III и IV черепно-мозговых нервов, дорсомедиальные ядра тегмента, мезенцефалическую ретикулярную формацию; в мозжечке анализировали медиальную и дорсальную области тела, вестибуло-латеральные доли и заслонку; в перешеечной области – ядра шва, вторичное вкусовое ядро, ядро перешейки; в продолговатом мозге – ядра V, VI, VII, IX, X черепно-мозговых нервов, нейроны эфферентной октаво-латеральной колонны, в медиальной ретикулярной формации – ретикулоспинальные и межпучковые клетки; в спинном мозге – нейроны вентральной спинномозговой колонны; интернейроны боковой пластинки и дорсальной области.

Исследования нейронной и цитоархитектонической организации переднемозгового отдела тихоокеанских лососей были проведены на 3–4 годовалых особях кеты *Oncorhynchus keta* (сем. Salmonidae), длиной тела 59–65 см и массой 2.7–4.2 кг, которых отлавливали во второй половине августа 2000–2002 гг. в р. Нарва Приморского края. Сравнительные исследования нитроксидергической организации ядер прегломерулярного комплекса, шва, продолговатого и спинного мозга исследовали на половозрелых особях морских окунеобразных: терпуге *Hexagrammus octogrammus* (сем. Hexagrammidae), фолисе *Pholis nebulosus*, опистоцентре *Pholidapus dybowskii* (сем. Stichaeidae), и карпообразных: гольяне *Phoxinus phoxinus*, карасе *Carassius carassius* (сем. Cyprinidae). При сравнительном исследовании H₂S-продуцирующих центров мозга данные на симе сравнивались с результатами маркирования CBS у половозрелого карпа *Cyprinus carpio* (сем. Cyprinidae).

Процессы постэмбрионального морфогенеза ЦНС исследовали на молоди симы в возрасте 3-х, 6-и месяцев, годовиков и двух- и трехлетних особях. Животные были

получены с Рязановского экспериментально-производственного рыбоводного завода (Приморский край) в 2005–2009 гг. Другим объектом изучения постэмбрионального нейрогенеза была молодь амурского осетра *Acipenser schrenckii* в возрасте 60 дней с момента выклева, а также трехлетние особи этого вида. Животные 3-летнего возраста, массой тела 900–1100 г, длиной 48–55 см были получены с Рязановского экспериментально-производственного рыбоводного завода в 2009 г.

При оценке пролиферативной активности мозга и влияния регуляторных пептидов на интенсивность синтеза ДНК у осетра *Acipenser schrenckii* исследования проводили на икре и молоди. Получение половых продуктов и выращивание мальков осетра осуществлялось в цехах Новоамурского, Анюйского, Владимирского экспериментально-производственных рыбоводных заводов (Хабаровский край). Инкубацию осетровых проводили на стадии набухания оплодотворенной икры. Анализ пролиферативной активности молоди осетра осуществляли на 60 сут инкубации перед помещением особей в естественную среду обитания.

Методы исследования. Для *морфологических исследований* материал окрашивали по стандартной методике Ниссля толуидиновым синим либо крезоловым фиолетовым (Меркулов, 1969), быстро обезвоживали в спиртах и заключали в даммаровую смолу. Для цитоархитектонической характеристики нейронного состава использовали быстрый метод импрегнации по Гольджи в модификации Бюбенета (Ромейс, 1953). На импрегнированных препаратах мозга рыб исследовали морфологические параметры нервных клеток по методике Леонтович (1978). Изображения клеток были получены путем зарисовки препаратов с помощью рисовального аппарата РА-7У 4.2 (Россия) при 100-кратном увеличении объектива. Для характеристики нейронов измеряли большой (*a*) и малый (*b*) диаметры клеток, число дендритов, общую длину ветвей, число конечных ветвей и точек ветвления, площадь клетки. Из этих измерений вычисляли линейный размер клетки:

$$(C_1) = a + b/2;$$

объем тела клетки V_{cl} вычисляли по формуле:

$$V_{cl} = 4/3\pi(b/2)^2(a/2).$$

Для количественной оценки качественных морфометрических различий нейронов симы в возрасте 1 и 2 лет были использованы методы фрактальной формализации. Для определения фрактальной размерности (показатель заполнения структурой топологического пространства) и лакунарности (показатель неоднородности структуры) черно-белые изображения нейронов (полученных при помощи рисовального аппарата при 100-кратном увеличении) сканировали с разрешением 300 точек на дюйм при одинаковом увеличении. Фрактальная размерность изображений определена с помощью компьютерной программы Benoi 1.3 (TruSoft Intel Inc.). Значение фрактальной размерности определено методами разбиения на квадраты (box-counting) и информационной размерности (information dimension) для выборок нейронов, включающих 50 клеток каждого класса. Значение лакунарности определено в программе ImageJ 1.20 (National Institutes of Health, USA) при помощи плагина FracLac (Audrey Karperin, Charles Sturt University).

Для характеристики нейромедиаторных систем структур головного и спинного мозга рыб были использованы молекулярно-биологические подходы, связанные с выявлением гистохимической и иммуногистохимической активности медиаторов либо ферментов их синтеза. Специфические антитела также использовались нами при выявлении пролиферативного ядерного антигена, транскрипционного фактора Pax6 и кальций связывающего белка парвальбумина. Для исследования связей

головного мозга применялось маркирование нервных волокон с помощью карбоцианинового красителя DiI. Для отслеживания восходящих медиаторноспецифических проекций катехоламинергических клеток использовали метод иммунофлюоресцентного маркирования тирозингидроксилазы в сочетании с маркированием DiI.

Для **ферментативной реакции на NADPH-диафору** (NADPH-d, НФ 1.6.99.1) головной мозг рыб фиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2), в течение 2 ч при 4°C. Затем материал пятикратно промывали в течение суток в 30% растворе сахарозы при той же температуре. Приготовленные на криостате серийные фронтальные срезы толщиной 30 мкм инкубировали 1 ч при 37°C в среде, содержащей 0.5 мМ β -NADPH (Sigma), 0.5 мМ нитросинего тетразолиевого (Sigma) и 0.3 % тритона X-100 в 0.15 М Трис-HCl буфере, pH 8.0 (Норе, Vincent, 1989). После инкубации препараты промывали в дистиллированной воде, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в даммаровую смолу. Контрольные препараты помещали в среду с добавлением ингибитора NO-синтазы 10 мМ N^ω-нитро-L-аргинина.

Для **гистохимической идентификации холинергических нейронов** в мозге рыб применяли маркирование холинацетилтрансферазы (ХАТ; НФ 2.3.1.6.). Мозг животных фиксировали в 1% растворе формальдегида, приготовленном на 0.1 М какодилатном буфере с 0.32 М сахарозой, (pH 5.0), при 4°C в течение 2 ч. Материал промывали в какодилатном буфере (pH 5.2) с сахарозой в течение 18 ч с 7-кратной сменой раствора, замораживали и резали на криостате толщиной 25 мкм. Для исключения неспецифической трансферазной активности в инкубационную среду, охлажденную до 4°C (pH 6.0), добавляли 2 ммоль диизопропилфторфосфата (ДФФ), 10% сахарозы, 25 ммоль какодилатного буфера и помещали на ледяную баню (0–4°C) на 1 ч. После прединкубации срезы помещали в инкубационную среду pH 6.0 со следующей конечной концентрацией: 25 ммоль какодилатного буфера, 1 ммоль ДФФ, 4 ммоль холинхлорида, 1 ммоль азотнокислого свинца, 5% сахарозы, 0.3 ммоль ацетил-КоА. Срезы термостатировали при 37°C в течение 2 ч. Промывали в дистиллированной воде, после чего обрабатывали в 5% растворе сульфида аммония. Затем срезы постфиксировали в 5% растворе формальдегида на 0.1 М какодилатном буфере, (pH 5.2) с 0.32 М сахарозой в течение 5 мин, после чего обезвоживали и заключали в бальзам. В контрольных экспериментах из инкубационной среды исключали ДФФ, либо ацетил-КоА, или холинхлорид.

Для идентификации катехоламинсодержащих нейронов применяли **метод гистофлюоресцентного маркирования** с использованием сахаро-фосфатной глиоксалевой кислоты (Буреш и др, 1991). Рыб анестезировали в кювете с 0.1% раствором MS-222 (трикаин метилсульфоната), вскрывали череп и извлекали головной мозг. Свежий мозг замораживали в криостате и изготавливали серийные срезы толщиной 25–30 мкм. Срезы монтировали на желатинизированные предметные стекла. В 100 мл раствора СФГ приготовленного на дистиллированной воде содержалось сахарозы – 10.2% , KН₂РO₄ – 4.2% и глиоксалевой кислоты – 1.5% (pH 7.2). Данный раствор доводили до объема 150 мл дистиллированной водой. В конечном растворе СФГ (pH 7.4) срезы инкубировали в течение 3–5 с, затем высушивали. На срезы наносили каплю не флюоресцирующего минерального иммерсионного масла и помещали в сушильный шкаф с температурой 95°C на 2.5 мин. Препараты просматривали на флюоресцентном микроскопе Leica DM (235–250 нм).

Иммуногистохимические методы исследования. С помощью иммунопероксидазного и иммунофлюоресцентного маркирования на свободноплавающих срезах исследовали локализацию нейрональной NO-синтазы, цистатионин β -синтазы (CBS), ГАМК, тирозингидроксилазы (TH), парвальбумина, транскрипционного фактора Pax6, пролиферативного ядерного антигена (PCNA). В работе были использованы первичные мышинные моноклональные антитела против TH (Vector Laboratories; 1:10000), ГАМК (ICN, Biomedicals, США; 1:5000), PCNA (Dako, Дания), моноклональные антитела человека против транскрипционного фактора Pax6 (Chemicon, США), моноклональные антитела лягушки против ПВ (ICN, Biomedicals, США; 1:4000), поликлональные антитела кролика против pNOS (ICN, Biomedicals, США; 1:5000), поликлональные антитела мыши против CBS (Abcam ab54883, Англия 1:5000), вторичные биотинилированные антитела лошади против иммуноглобулинов мыши (Vector Labs, Burlingame, США) и антитела осла против иммуноглобулинов мыши конъюгированными с Alexa 546 (Molecular Probs, США, 1:300), биотинилированные антитела лошади против иммуноглобулинов человека (Vector Labs), биотинилированными антителами мыши против иммуноглобулинов кролика (LSAB 2 System, HRP, Dako, Дания), биотинилированные антитела козы против иммуноглобулинов кролика (Biomedicals, Германия). Для визуализации ИГХ маркирования pNOS срезы инкубировали с стрептавидин-пероксидазным комплексом (Biomedicals, Германия), стандартной авидин-биотиновой системой визуализации ABC-комплекса (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, Burlingame, США). Для выявления продуктов реакции использовали субстраты красного и серо-синего цветов (VIP Substrate Kit, Vector Labs, Burlingame, США) или выявляли с помощью 3,3'-тетрагидрохлорида диаминобензидина (Sigma, США), контролируя процесс развития окрашивания под микроскопом; срезы промывали в воде, монтировали на предметные стекла, обезвоживали по стандартной методике и заключали в даммаровую смолу.

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

Маркирование проекций перешейка и прегломерулярного комплекса с помощью DiI. Для исследования проекций перешейка области использовали ретроградный карбоцианиновый краситель 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI, Aldrich, Sigma, США). Мозг рыб фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 1 сут, затем в область вторичного вкусового ядра, тело мозжечка, крышу среднего мозга, претектального ядра и вентро-медиального сегмента покрывки мозга на уровне перешейка вводили кристаллы красителя. Для исследования связей прегломерулярно-мамиллярного комплекса симы кристаллы DiI вводили в область переднего, медиального прегломерулярных ядер и мамиллярных тел. Препараты инкубировали в 4% растворе параформальдегида с добавлением 0.01% ЭДТА при комнатной температуре (Hofmann, Bleckmann 1999). На вибраторе (VIBRATOME 3000; Sectioning system, Германия) изготавливали фронтальные, сагитальные и горизонтальные срезы, толщиной 50 мкм, которые заключали в глицерин. Для визуализации маркера использовали оптическую систему AXIOPLAN-2, Imaging (Gerinang).

Для исследования проекций ТН-иммунопозитивных нейронов **иммунофлюоресцентное маркирование тирозингидроксилазы сочетали с трайсированием DiI** нейронов и волокон из вентральной теленцефалической области горчака. Мозг рыб фиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0.1 М фосфатном буферном растворе (pH 7.2), в течение 2 ч, затем в область вентрального теленцефалона вводили кристаллы красителя и инкубировали в данном растворе еще 1 сут. Фронтальные, сагиттальные и горизонтальные вибраторные срезы толщиной 50 мкм инкубировали с первичными моноклональными антителами мыши против ТН (Vector Laboratories, Burlingame, США) в разведении 1:1000 при 4°C в течение 2 сут. Далее срезы инкубировали с вторичными антителами осла против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с Alexa 546 (Molecular Probs, США) в разведении 1:300 в течение ночи. Далее срезы монтировали на стекла и заключали в среду Vectashield (Vector, США). Для визуализации двойного маркирования ТН и карбоцианиновой метки использовали конфокальную лазерную систему Leica TSC SPE (Германия).

Для исследования пролиферативной активности клеток мозга рыб: 3, 6 месячной, 1, 2, 3 годовалой симы; 60 дневной молоди и 3 летних осетров применяли **маркирование пролиферативного ядерного антигена (PCNA)**. Молодь осетра в возрасте 60 сут анестезировали с помощью 0.1% раствора MS-222 (Sigma, США) в течение 5 мин и целиком заливали в парафин, после чего готовили серийные поперечные срезы толщиной 5-6 мкм. Животные 3 летнего возраста осетра, анестезировали в 0.1% растворе MS-222 в течение 10-15 мин. Во внутрочерепную полость обездвиженного животного с помощью шприца перфузировали 4% раствор параформальдегида, приготовленного на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7,2). Мозг рыб извлекали из черепа и фрагментировали на следующие отделы: медуллярный – на уровне долей V, VII и X нервов, мозжечок, роstralную часть ствола – на уровне перешейки, таламус с полушариями тектума и внутренние доли гипоталамуса, и заливали в парафин по общепринятой методике. Проводили ИГХ маркирование PCNA на парафиновых срезах, в термостате при 37° С. После иммуномаркирования срезы докрашивали срезы гематоксилином Лилли–Майера в течение 30 с, промывали проточной водой 15–20 мин, обезживали по стандартной методике и заключали в даммаровую смолу.

Для идентификации апоптозных клеток в мозге 3-летнего осетра использовали **метод иммунопероксидазного маркирования TUNEL**, основанный на выявлении фрагментированных цепочек ДНК. После двухчасовой фиксации в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2), фрагментированные по вышеприведенной схеме отделы мозга осетра промывали в течении суток в 0.1 М фосфатном буфере, затем материал помещали в 30% раствор сахарозы на 0.1 М фосфатном буфере для криопротекции и выдерживали там до полного погружения. Фронтальные и горизонтальные срезы толщиной 20 мкм изготавливали на криостате. Для выявления TUNEL-позитивных структур использовали стандартную иммунопероксидазную систему идентификации Apor-tag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon International Inc., США). Срезы инкубировали согласно стандартной прописи во влажной камере в течение 1 ч при температуре 37°C. Для визуализации продуктов реакции срезы мозга инкубировали в субстрате для выявления пероксидазы (VIP Substrate Kit, Vector Labs, Burlingame, США), контролируя процесс развития окраски под микроскопом, затем промывали в трех сменах фосфатного буфера и монтировали на предметные стекла. Ядра клеток

докрашивали метиловым зеленым по методу Браше (Меркулов, 1969). Обезвоживали по стандартной методике и заключали в даммаровую смолу.

Оценку морфометрических показателей ядра и ядрышек в мозге молоди осетра проводили по методике Цыганкова с соавторами (2006). Под притертые стекла, покрывающие депарафинированные и гидратированные срезы, вводили гель, содержащий 1 часть желатины на 1% растворе муравьиной кислоты и 2 части 50% раствора AgNO_3 . Стекла термостатировали при 37°C в течение 10–15 мин. Морфометрию ядрышек и ядер проводили с помощью морфометрической системы анализа видеоизображения «МЕКОС-Ц». Эксперименты проводили на 60-дневной молоди осетра массой 10–20 г при введении им регуляторных пептидов: седатина (H-Arg-Туг-D-Ala-Phe-Gly-OH) и его безаргининового аналога (H-Туг-D-Ala-Phe-Gly-OH), синтезированных в лаборатории химии пептидов (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва) проф. д.м.н. В.И. Дейгиным, однократно обрабатывали оплодотворенную икру. Животные в контрольной группе были интактными.

Статистическая обработка материала. Подсчет числа нейронов для гистохимических реакций выявления ХАТ, катехоламинов и NADPH-d проводили в 20–25 последовательных серийных срезах, включающих центральные области исследуемых ядер. Учитывали абсолютное количество позитивных нейронов и высчитывали их долю из числа клеток, окрашенных в сходных областях по Нисслю. В дорсальной и вентральной областях конечного мозга исследовали от 150 до 200 маркированных клеток. В медиальной, центральной и латеральной областях тектума в составе 5–6 идентифицированных слоев выбирали от 30 до 50 маркированных нейронов и от 10 до 20 участков содержащих маркированные волокна. В мозжечке анализировали медиальную и дорсальную области тела, вестибуло-латеральные доли и заслонку. В каждой области в составе инфраганглионарного сплетения, гранулярного и молекулярного слоев выбирали от 30 до 50 маркированных клеток и участков содержащих волокна. В стволе мозга (ядра черепно-мозговых нервов, шва, вторичное вкусовое ядро), ретикулярной формации (ретикулоспинальные, межпучковые клетки), вентральной спинномозговой колонны было исследовано от 50 до 100 маркированных клеток. Данные о распределении нейронов обрабатывали методом вариационной статистики с определением критерия достоверности по Стьюденту. Величины среднего квадратичного отклонения (SD) или ошибки среднего (SE) использовали как показатели вариации величины средней. Для обнаружения различий между средними использовали критерий Стьюдента (t-test). Различия считались статистически значимыми при $P < 0.05$.

Измерение оптической плотности продуктов реакции в телах нейронов и параметров клеточных тел (большой и меньший размеры) проводили с помощью программного обеспечения микроскопа Axiovert Apotome. Для этого в нескольких местах на препарате измеряли оптическую плотность фона. Оптическую плотность преципитата в цитоплазме маркированных клеток измеряли на 7–10 препаратах, выбирая для анализа 10–15 клеток одного типа. Из среднестатистических показателей фона вычитали усредненное значение оптической плотности для каждого типа клеток, получая фактическое значение в относительных единицах оптической плотности (ЕОП).

При ИГХ маркировании CBS, ПВ, ГАМК, и гистохимической идентификации NADPH-d у симы были верифицированы тела нейронов и проксимальные участки их дендритов, что позволяет классифицировать маркированные нейроны на следующие

типы: I – сверхкрупные мультиполярные клетки с 1–5 первичными дендритами, размером тела от 40 мкм и более; 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, лишенными варикозных утолщений, и размером тела 15–25 мкм; IV тип – мелкие клетки, округлой, овальной либо биполярной формы тела размером 6–15 мкм. Клетки, размеры тел которых не превышали 6 мкм, классифицировались нами как сверхмалые и были отнесены к V типу.

Количественную оценку содержания пролиферирующих и апоптотических клеток проводили с учетом соотношений PCNA- и TUNEL-маркированных ядер к их общему количеству. Измерения проводили при 400-кратном увеличении в 5 случайно выбранных полях зрения для каждой области исследования. Индекс пролиферации (ИП) определяли в расчете на 1мм² поперечного среза по формуле:

$$\text{ИП} = \frac{\text{Число PCNA-позитивных ядер}}{\text{общее число ядер}} \times 100$$

Индекс апоптоза (ИА) определяли также в расчете на 1мм² поперечного среза по формуле:

$$\text{ИА} = \frac{\text{Число TUNEL-позитивных ядер}}{\text{общее число ядер}} \times 100$$

При обработке результатов для межгрупповых сравнений применяли параметрический метод (t-тест Стьюдента). Числовые данные представлены как средние $\pm$ ошибка среднего ($M \pm m$).

Для оценки степени сопряженности (связи) между признаками (величинами параметров) использовали корреляционный анализ. Корреляционные матрицы построены при помощи программы Statistica 6.0 (StatSoft Inc.) и Microsoft Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

Участие классических нейротрансмиттеров в постэмбриональном нейрогенезе рыб

Проведенные исследования позволяют предполагать, что в мозге лососей (симы) на различных этапах постэмбрионального развития существуют две формы межклеточных коммуникаций. Первая возникает на ранних стадиях постэмбрионального развития и представляет собой межклеточное взаимодействие, осуществляющееся паракринным путем в период, когда клетки еще не имеют развитых отростков и синаптической структуры, однако такие малодифференцированные клеточные формы уже способны экспрессировать специфические синтезы: некоторые нейромедиаторы и синтезирующие их ферменты, газотрансмиттеры, транскрипционные факторы и др. (рис. 1А, В–Г). Мы считаем, что большинство синтезируемых в этот период сигналов участвует в регуляции дифференцировки нейронов-мишеней и экспрессии их специфического фенотипа, выступая в роли морфогенетических факторов, что согласуется с концепцией М.В. Угрюмова (2011) о развитии мозга млекопитающих в период эмбрионального онтогенеза. Уже на ранних стадиях постэмбрионального морфогенеза у симы одновременно существуют две системы нейрохимического сигналинга:

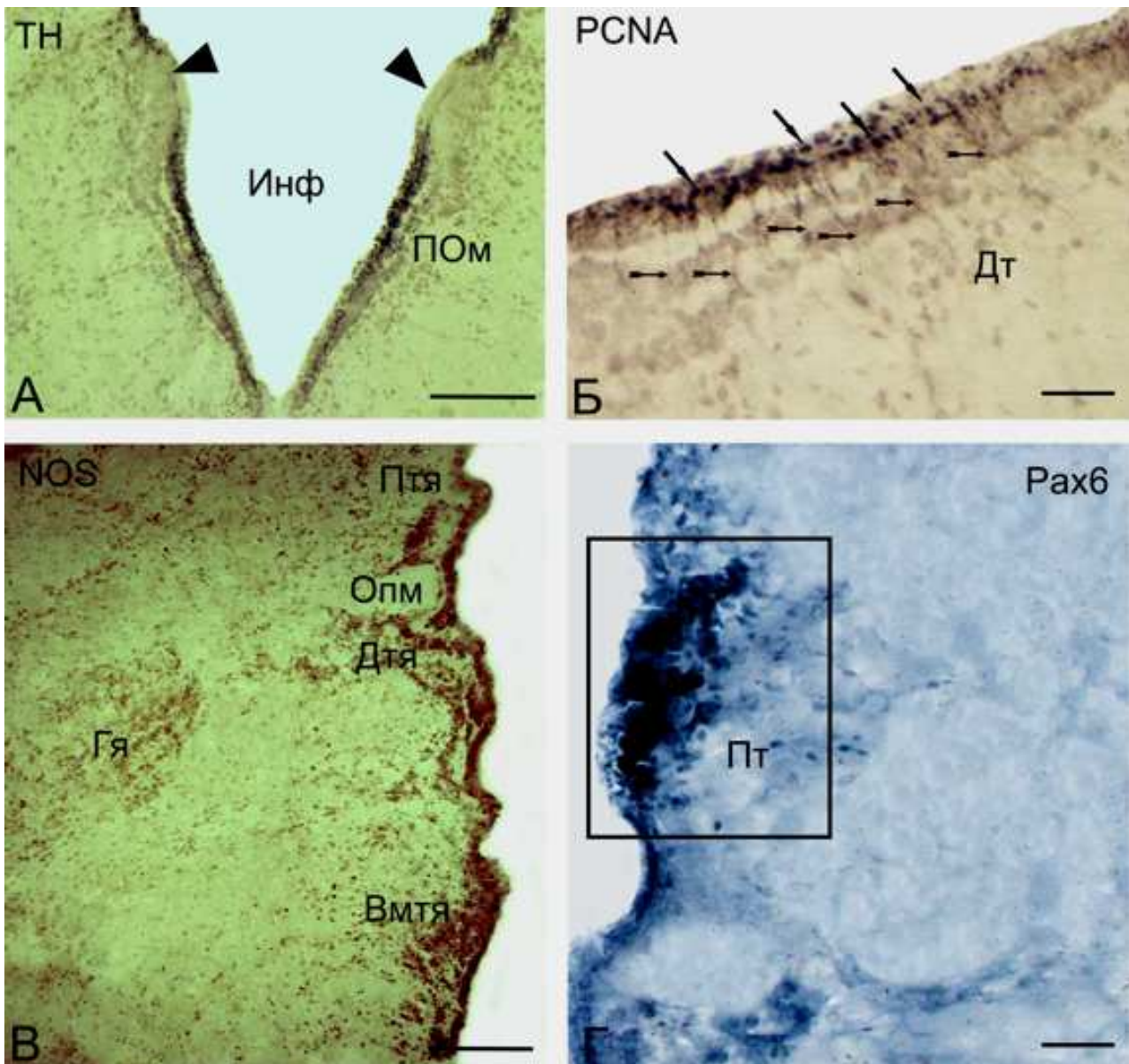


Рис. 1. Иммунолокализация тирозингидроксилазы (А), пролиферативного ядерного антигена (Б), нейрональной нитроксидсинтазы (В) и транскрипционного фактора Pax6 (Г) в перивентрикулярном диэнцефалоне 6 месячной молоди симы. А: треугольниками показаны иммунонегативные границы дорсальных нейромеров; Г: прямоугольником оконтурен кластер иммунопозитивных клеток, образующих претектальный (Р1) нейромер. Масштаб: А, В – 100 мкм, Б, Г – 50 мкм.

дофаминергическая и ГАМК-ергическая, оказывающие паракринное и возможно аутокринное влияние на клетки-мишени до формирования синаптических контактов и начала нейротрансмиссии специфических межнейрональных связей. Исследование на угре показало, что максимальная концентрация D_1 дофаминовых рецепторов выявлена в перивентрикулярных областях (Karsimalli et al., 2000) – матричных зонах мозга в которых нейрогенез продолжается в течение всей жизни животного. Следовательно, клетки, расположенные в пролиферирующих областях являются мишенями для регуляторного воздействия дофамина. Локализуясь на территории крупнейших сосудистых сплетений (переднемозгового и каудального),

синтезируемые в этих регионах вещества (дофамин и ГАМК) могут поступать в портальную систему кровотока и далее в общую систему циркуляции, оказывая регуляторное эндокринное воздействие и на периферические органы (Trudeau, 1997). Таким образом, есть все основания предполагать, что в гипофизотропных областях промежуточного и продолговатом отделах мозга молодцы симы дофамин, ГАМК в недифференцированных клетках перивентрикулярной и субвентрикулярной областей являются индукторами развития (морфогенетическими факторами).

Таблица 2

Морфометрические характеристики и относительные количества нейронов различных нейрохимических типов в ядрах прегломерулярного комплекса и гломерулярном ядре симы *Oncorhynchus masou*

Ядра	Выявляемые нейрохимические агенты									
	синтаза оксида азота (nNOS)		холинацетилтрансфераза (ХАТ)		ГАМК		тирозингидроксилаза (ТН)		парвальбумин (ПА)	
	размеры клеток (мкм)	Суммарное количество (%)	размеры клеток (мкм)	суммарное количество (%)	размеры клеток (мкм)	суммарное количество (%)	размеры клеток (мкм)	суммарное количество (%)	размеры клеток (мкм)	суммарное количество (%)
Гломерулярное	8/7 (II)		20/12 (I)		9/6 (II)		9/7 (II)		6/6 (II)	
	10/8 (II)	30±4	14/6 (III)	18±2	7/7 (II)	50±6	10/6 (II)	12±2	11/7 (II)	48±4
	12/10 (IV)		18/12 (I)		12/6 (III)		15/6 (IV)		12/9 (IV)	
					14/7 (III)		17/8 (III)		13/6 (III)	
Переднее прегломерулярное	10/8 (I)		12/9 (IV)		12/12		8/6 (II)		10/8 (II)	
	15/6 (III)	24±3	13/8 (IV)	9±1	(IV)	47±5	10/7 (II)	14±2	11/7 (II)	45±5
	12/7 (IV)				20/13 (I)		12/6 (III)		13/10	
	14/8 (IV)						12/9 (IV)		(IV)	
Медиальное прегломерулярное	10/8 (II)		12/9 (IV)		8/7 (II)		9/9 (II)		9/7 (II)	
	12/9 (IV)	21±3	13/10 (IV)	12±1	10/7 (II)	32±4	10/7 (II)	8±1	10/8 (II)	30±3
	13/8 (IV)		14+11 (IV)		12/9 (IV)		12/9 (IV)		13/10	
							14/7 (III)		(IV)	

Примечания. Римскими цифрами в скобках указан тип клеток. Средние значения большого и малого диаметров нейронов указаны через косую черту.

Наряду с указанной формой межклеточной сигнализации у лососей в онтогенезе происходит развитие и специфических систем активации переднемозгового отдела и развитие системы дистантной межклеточной сигнализации. Источником этих направленных связей являются ядра прегломерулярного комплекса. Развитие проекционных систем у лососей происходит параллельно с формированием структуры ядер прегломерулярного комплекса. В мозге немлекопитающих позвоночных объем сенсорных проекционных зон увеличивается в течение жизни животного и обеспечивается это за счет пролиферации нейральных стволовых клеток, расположенных в областях особых нейрогенетических ниш (Kaslin et al., 2008). Это связано с необходимостью адаптации ЦНС животных к увеличению размера тела и усилению притока первичной сенсорной сигнализации. Мы считаем, что при участии дофамин-, ГАМК- и NO-ергической систем осуществляется регуляция базисных гистогенетических процессов: клеточной миграции и дифференцировки нейроно- и глиоспецифических линий, поскольку ядра ПГК содержат морфологически и нейрохимически гетерогенные популяции клеток (табл. 2), представляющие различные стадии онтогенеза основных клеточных типов. Клетки, образованные в пролиферативных (PCNA-содержащих) зонах диэнцефалона, мигрируют в область прегломерулярного комплекса, где происходит их последующая дифференцировка и рост. Эти процессы регулируются дофамином и

ГАМК, о чем в частности свидетельствует наличие D₁ и D₂ дофаминовых (Kapsimalli et al., 2000; Verner, Wullimann, 2009) и бензодиазепиновых ГАМК рецепторов В типа (Mueller, Guo, 2009) в данном ядре у рыб. Критическим этапом преобладания паракринных взаимоотношений в мозге симы можно считать период до формирования гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), который по данным (Horsberg, 2011) у лососей формируется в течение первого года жизни. В последующий период онтогенеза происходит формирование специфических связей, а также развитие клеточных отростков у нейронов и синаптогенез.

На сегодняшний день доказано участие радиальной глии в процессах постэмбрионального нейрогенеза путем асимметричных митозов, в результате которого одна дочерняя клетка остается в перивентрикулярной области и имеет округлую форму, другая же имеет длинный отросток, который впоследствии может втягиваться путем сомальной транслокации (Noctor et al., 2004). Показано, что в эмбриогенезе человека предшественники дофаминергических нейронов в базальной части среднего мозга имеют морфологию радиальной глии (Hebsgard et al., 2009). Маркирование TH в клетках радиальной глии у симы различных возрастов (рис. 2 А–Д), а также данные о том, что TH- и ГАМК-ип клетки располагались на территории PCNA-ип пролиферативных зон и вместе с PCNA маркировали нейромерную структуру промежуточного и продолговатого отделов мозга, безусловно свидетельствует, что дофамин- и ГАМК-ергическая сигнализация участвует в процессах постэмбрионального нейрогенеза мозга симы, как мы предполагаем, в качестве индукторов развития. Наши данные согласуются с результатами маркирования ромбомеров мозга у эмбриона акулы *Scyliorhinus canicula* (Rodríguez-Moldes et al., 2011).

Дифференцировка клеток в различных отделах мозга симы происходит во многом гетерохронно. В каудальных отделах мозга ретикулоспинальные клетки, в ядре шва, ядрах V, VII, IX и X пар черепно-мозговых нервов клетки, намного раньше приобретают черты фенотипической специализации, чем в структурах переднемозгового отдела. В нейронах ствола и спинного мозга у симы 1- и 2-ого годов жизни имеются достаточно развитые дендриты и аксоны, на которых, тем не менее, присутствуют выраженные почки роста, что указывает на продолжающиеся в постэмбриональный период рост и развитие этих структур и их дальнейшую дифференцировку (Исаева и др., 2006). В возрасте 3 лет у симы в ядрах головного и спинном мозге были выявлены крупные дифференцированные клетки, экспрессирующие TH, ГАМК и парвальбумин в составе спинальной колонны мотонейронов, ядер черепно-мозговых нервов, ретикулоспинальных клеток, ядер промежуточного мозга.

Наряду с системами синтеза классических нейротрансмиттеров была исследована иммулокализация транскрипционного фактора Pax6, маркирование которого адекватно отражало нейромерную организацию мозга симы различных возрастов. У ранней молодежи (3 и 6 мес) Pax6-ип клетки не имели отростков и формировали небольшие кластеры, соответствующие переднемозговым прозомерам (P1-P3), а в продолговатом мозге такие скопления маркировали ростральные (R1-R2) ромбомеры (рис. 3). На границах нейромеров иммуномаркирование PCNA и Pax6 отсутствовало. У трехлетней симы маркирование Pax6 было выявлено в клетках и радиальных волокнах, расположенных в перивентрикулярной и субвентрикулярной областях промежуточного мозга, что соответствует данным о маркировании Pax6 радиальной глии в зонах постнатального нейрогенеза у млекопитающих (Kaslin et al., 2008). На

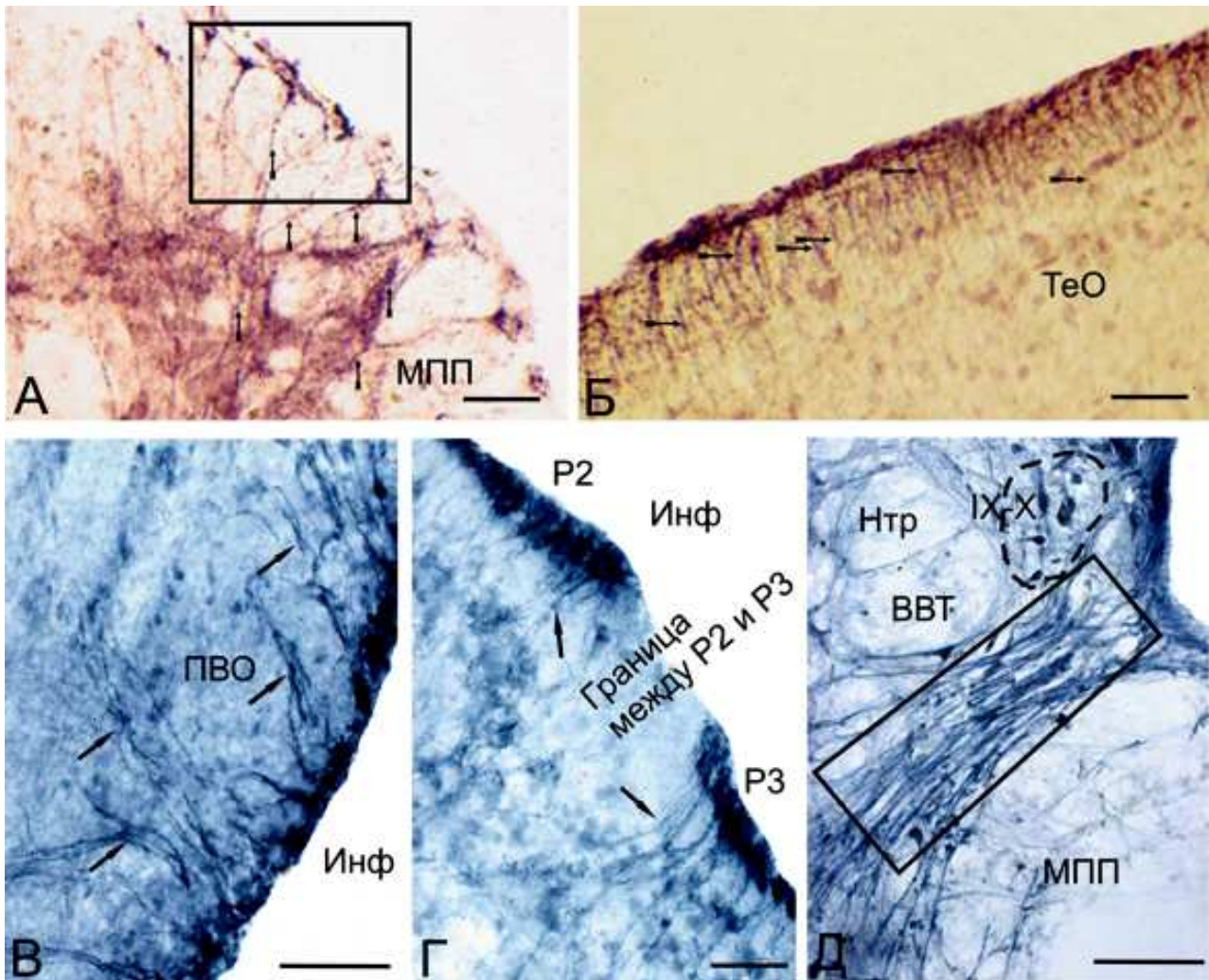


Рис. 2. Иммуногистохимия тирозингидроксилазы в спинном мозге (А) и тектуме (Б) годовалой симы, в промежуточном (В, Г) и продолговатом (Д) отделах 3- годовалой симы. Стрелками показаны радиальные волокна; А: прямоугольником оконтурены участки радиальных волокон, формирующие «концевые ножки»; Г: на границе между дорсальными нейромерами иммуномаркирование ТН отсутствует; Д: прямоугольником оконтурена межпучковая область, содержащая радиальные волокна. Масштаб: А, Б, Г – 50 мкм; В и Д – 100 мкм.

границах переднемозговых нейромеров иммуномаркирование Рахб у 3-летних особей отсутствовало. Экспрессия Рахб была также выявлена в гломерулярном ядре и ядрах прегломерулярного комплекса, что свидетельствует о морфогенетических процессах на территории этого крупнейшего сенсорного центра в постэмбриональный период. Иммунолокализация Рахб в гломерулярном ядре была обнаружена в определенных клеточных скоплениях, соответствующих, по нашему мнению, нейроанатомическим зонам, в которых осуществляется дифференцировка нейронов, проводящих различные типы сенсорной сигнализации. Проведенные исследования позволяют предполагать, что фактор Рахб участвует в регионализации структуры мозга и в постэмбриональный период, а его экспрессия у симы различных возрастов свидетельствует, что процессы нейродетерминации и миграция клеток,

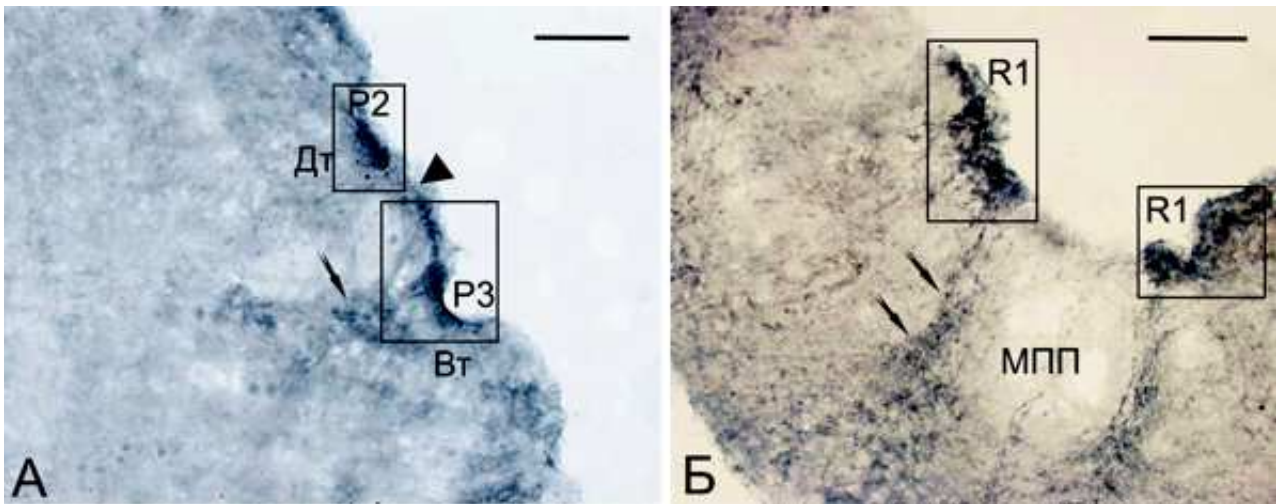


Рис. 3. Иммунолокализация фактора Pax6 в промежуточном (А) и продолговатом (Б) отделах мозга 3 месячной молоди симы. Масштаб: А – 100 мкм; Б – 200 мкм.

сформированных в пролиферативных зонах мозга в эти возрастные периоды, регулируются с помощью данного транскрипционного фактора.

В литературе существует разночтения по поводу организации и топографии дофамин-, ГАМК- и NO-ергических комплексов в головном мозге костистых рыб. Существенные отличия в организации медиаторных систем у различных видов рыб становятся более объяснимыми, учитывая вышеприведенную схему. Мы считаем, что медиаторные системы в мозге рыб следует рассматривать не только с общепринятой точки зрения их дефинитивной нейроанатомической структуры, но необходимо учитывать также данные о гетерогенном молекулярном фенотипе дофаминергических, ГАМК и, по-видимому, NO-ергических систем. Таким образом, для установления гомологий, наряду с систематическим положением, целесообразно учитывать возраст, стадию развития, физиологический статус, а также пол животного.

У взрослых особей симы и кеты клетки дорсо-центральной области конечного мозга достигают высокой степени специализации и по классификации Рамона-Молинера могут быть отнесены к аллодендритному типу. Такие клетки нами обнаружены лишь у наиболее зрелых особей, идущих на нерест, возраст которых составлял 4–5 лет. Одной из форм специализации таких клеток является наличие у них сети базальных дендритов, имеющих шипики. Это соответствует предполагаемой нами специализации таких клеток как ассоциативных шипиковых интернейронов, осуществляющих связи с другими областями дорсальной зоны. Широкое распространение ТН и ГАМК в конечном мозге взрослых особей симы указывает на то, что у рыб к этому периоду развития, наряду с паракриной, существует и дистантная нейротрансмиссия, которая становится преобладающей по мере дальнейшего онтогенетического развития и старения животного. Мы считаем, что приобретение шипикового аппарата нейронами дорсальной (Vd) и внутренней (Vi) областей вентральной зоны может рассматриваться как одна из стадий онтогенетического развития нейронов мозга, свидетельствующая о возрастных изменениях в организации дофаминергической системы лососей.

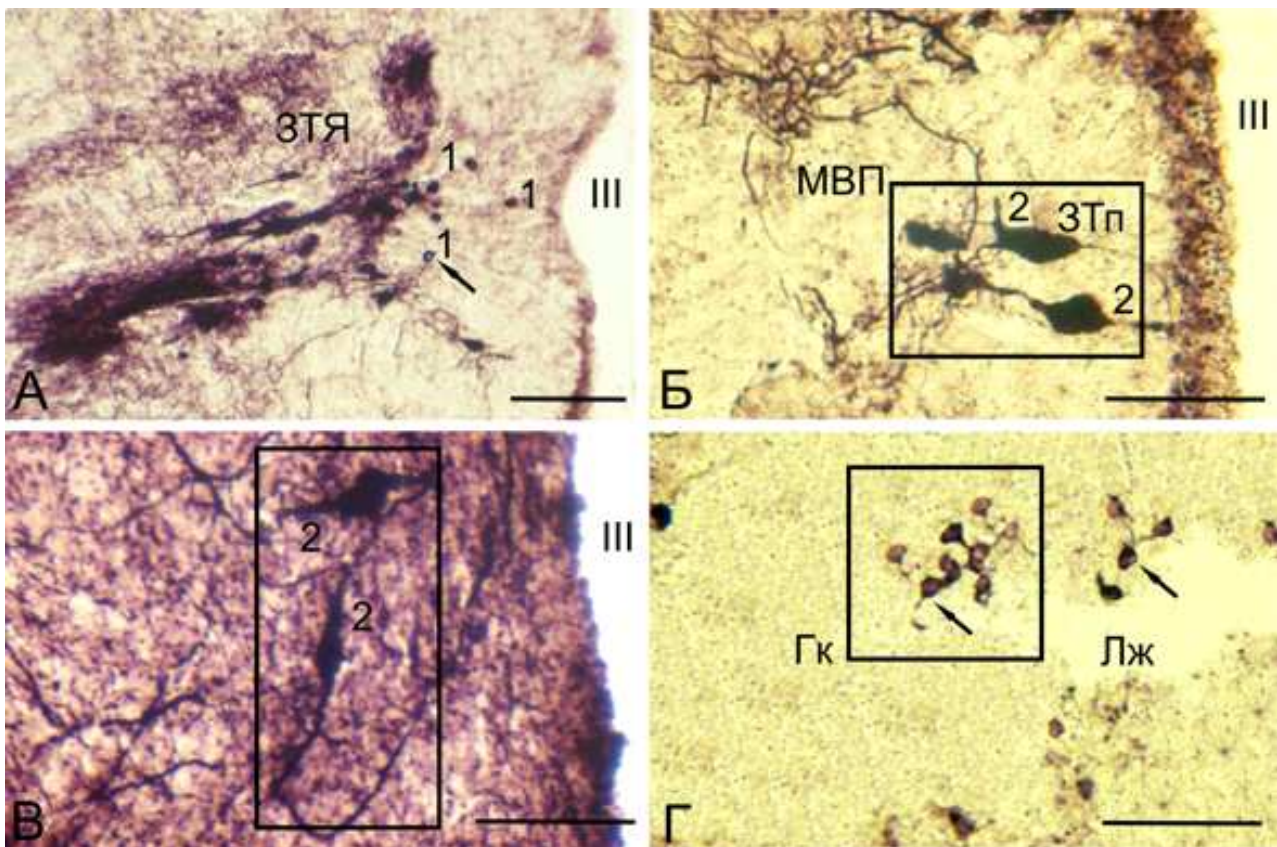


Рис. 4. Три типа нейронов, экспрессирующих тирозингидроксилазу в промежуточном мозге горчака: А – клетки 1-го типа в заднетуберальном ядре, Б и В – клетки 2-го типа, Г – ликвороконтактирующие клетки. Масштаб: А – 100 мкм; Б–Г – 50 мкм.

В качестве модели для проверки альтернативной гипотезы нами была исследована ЦНС горчака (Cyprinidae), достигающего половой зрелости на первом году жизни. В литературе конца XX века активно дискутировались вопросы, касающиеся организации и топографии катехоламинергической системы мозга позвоночных, выявляемой методами формальдегид-индуцированной флюоресценции (FIF) и ИГХ-маркирования тирозингидроксилазы. В этот период была сформулирована гипотеза о существовании в мозге рыб дофамин-депонирующей системы (Meek, 1994). Данные о нейромерной организации и молекулярных маркерах, определяющих дофаминергический фенотип нейронов *D. rerio*, появились лишь недавно (Yamamoto, Vernier, 2011). В мозге горчака нами были верифицированы 3 типа клеток: мелкие округлые, крупные грушевидные либо веретеновидные и биполярные ликвороконтактирующие (ЛКК) (рис. 4). Согласно классификации Мика (Meek, 1994), крупные клетки и ЛКК у горчака могут быть отнесены к элементам дофамин-депонирующей системы. В гипоталамусе горчака были обнаружены немногочисленные ЛКК с низким уровнем активности ТН, но маркируемые глиоксальной кислотой. У некоторых рыб установленные особенности морфологии ЛКК (в частности, наличие апикального дендрита, обращенного в просвет мозгового желудочка) и то, что эти клетки, являясь FIF-позитивными, не содержат ферментов синтеза катехоламинов (ТН-негативные), послужили поводом для предположения, что подобные клетки самостоятельно не синтезируют катехоламины, но получают их из внешних источников, в частности, ликвора или крупных дофаминергических

нейронов (Rink, Wullimann, 2001). Данные маркирования катехоламинергических систем на других группах позвоночных показывают, что дофамин и норадреналин, растворенные в ликворе, имеют большее значение для немлекопитающих позвоночных, поскольку у млекопитающих ЛКК вообще не были идентифицированы (Smeets, Gonzales, 2000). Эти данные не противоречат, а подтверждают результаты, полученные нами на симе.

Восходящие дофаминергические системы горчака *Rhodeus sericeus*

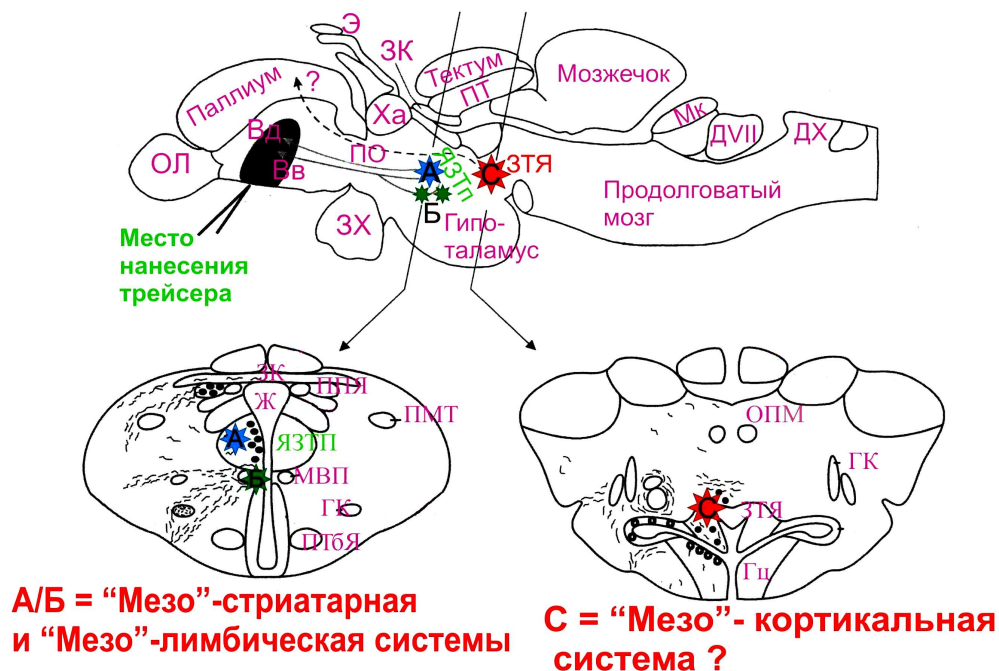


Рис. 5. Схема предполагаемых восходящих катехоламинергических систем горчака в соответствии с данными ИГХ-маркирования тирозингидроксилазы в сочетании с трайсированием DiI.

Отсутствие у карпообразных рыб гломерулярного ядра во многом затрудняет установление гомологий восходящих сенсорных проекций в конечный мозг с таковыми других рыб (Wullimann, 1998). Для установления источников КЭ иннервации вентральной части конечного мозга горчака исследовали проекции из этой области мозга. Трайсирование части дофаминергических волокон вентрального теленцефалона горчака показало, что наряду с интрателенцефальными катехоламинергическими клеточными группами существуют и экстрателенцефалические источники иннервации дорсальных и вентральных ядер (рис. 5). Источниками дофаминергических проекций в вентральную часть конечного мозга являются две популяции клеток заднетуберальной области горчака: крупные 2 типа и мелкие округлые 1 типа. Такие клетки проецируются на дорсальную и вентральную зоны вентральной части теленцефалона соответственно и рассматриваются нами в качестве морфо-функциональных эквивалентов мезостриатной и мезолимбической систем млекопитающих. Идентификация у *D. rerio* дофаминергических волокон в дорсальной области теленцефалона (Rink, Wullimann, 2001) позволяет предполагать, что телеостеи имеют также эквиваленты мезокортикальной (мезопаллиальной) системы.

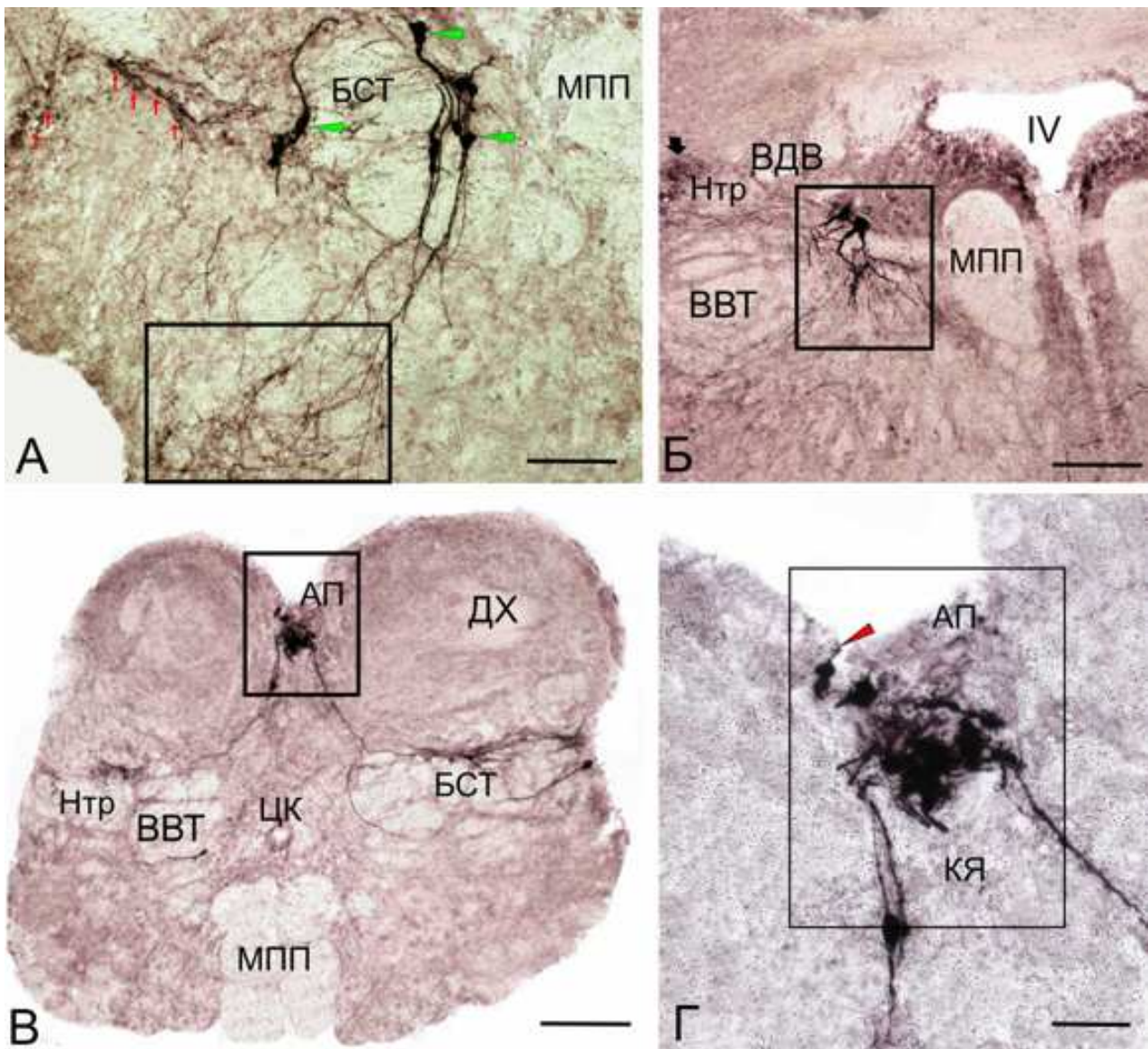


Рис. 6. Тирозингидроксилаза в нейронах продолговатого мозга горчака. А и Б – нейроны межпучковой группы, В и Г – нейроны *area postrema*. Масштаб: А–В – 100 мкм; Б – 50 мкм.

В медуллярном отделе горчака были идентифицированы 3 популяции ТН-ип клеток: 1) межпучковая группа клеток, 2) группа, связанная с системой блуждающего нерва и 3) группа, ассоциированная с *area postrema* (рис. 6). У 3-летней симы во всех вышеперечисленных областях ствола были также идентифицированы крупные ТН-ип клетки с выраженными признаками фенотипической дифференцировки (рис. 2Д). Однако наряду с дифференцированными иммунопозитивными элементами у симы обнаружены ранее не описанные *альтернативные* ТН-ип элементы: мелкие недифференцированные клетки, расположенные на территории пролиферативной перивентрикулярной и субвентрикулярной зон (рис. 7В, Г), многочисленные радиальные волокна, имеющие различную локализацию в медуллярном отделе (рис. 2 В–Д). Мы полагаем, что наличие таких элементов с выраженными признаками фетальной организации, а также радиальных волокон в мозге 3-летней симы связано с процессами

постэмбрионального морфогенеза мозга, а дифференцированные ТН-ип нейроны представляют собой функционально активные к этому периоду онтогенеза элементы дистантной КЭ системы. Исследование КЭ системы медуллярного отдела горчака обнаружило выраженные черты специализации, связанные с организацией медуллярных КЭ комплексов. Анализ этих особенностей показал, что у горчака КЭ клетки в стволе мозга имеют связь с сенсорными системами и могут выступать в качестве локальных интернейронов или проекционных длинноаксонных нейронов в составе нейрональных сетей, либо представлять собой нейросекреторные элементы. Морфология межпучковых нейронов горчака позволяет предполагать их специализацию в качестве локальных межсегментарных нейронов, поскольку их дендриты формируют высокоразветвленную сеть (рис. 6А, Б). Все три группы медуллярных ТН-ип нейронов горчака посылают отростки в продольный катехоламинергический тракт. Часть межпучковых клеток является длинноаксонными нейронами, проецирующиеся в ростральную часть ретикулярной формации, перешеек и вторичное вкусовое ядро – релейные центры, между первичными сенсорными ядрами продолговатого мозга и сенсорными центрами вентрального таламуса. Клетки 2-ой и 3-ей групп (предположительно дофаминергические) имеют доступ к IV желудочку и, вероятно, являются хемосенсорными элементами, осуществляющими связь между цереброспинальной жидкостью и продолговатым мозгом (рис. 6В, Г). Именно в этих клетках у горчака был обнаружен очень высокий уровень активности ТН, что позволяет нам

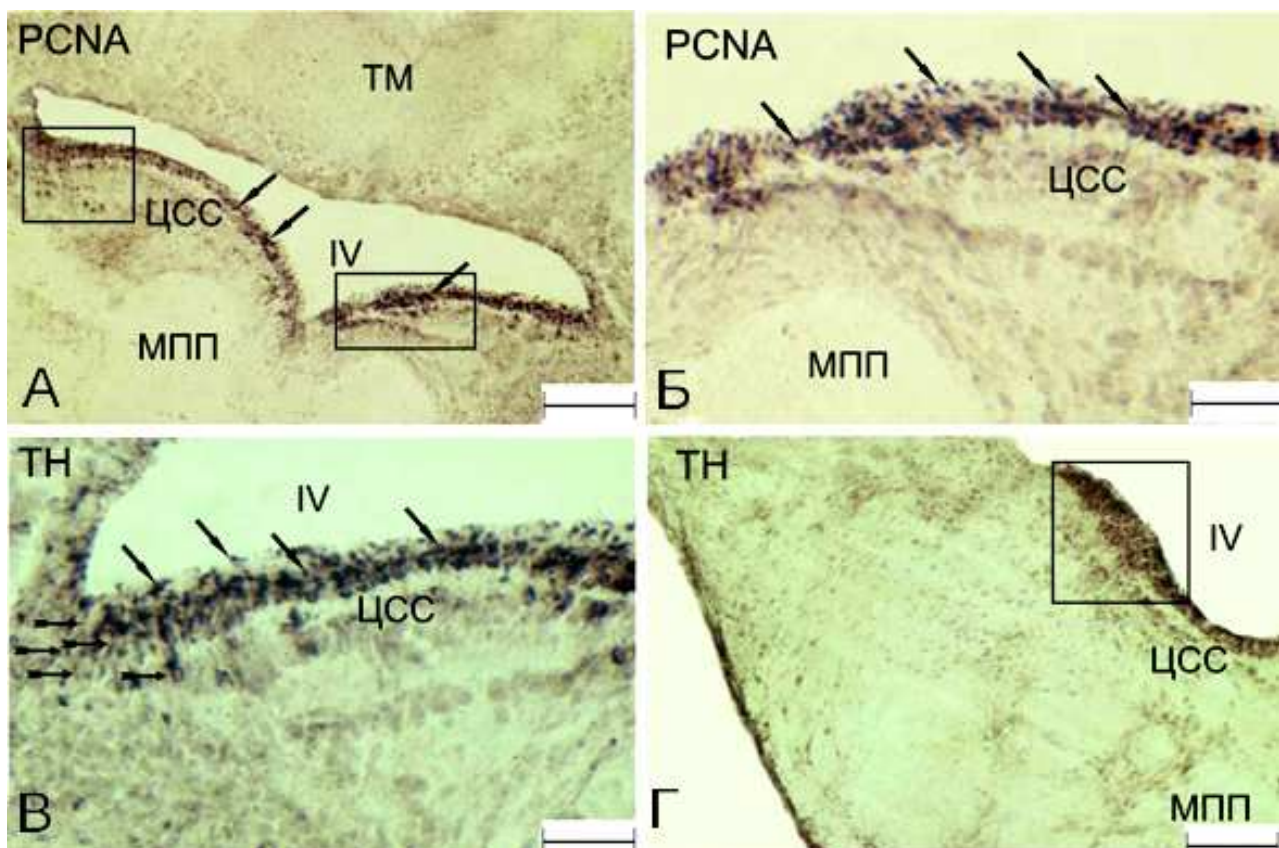


Рис. 7. Иммунолокализация пролиферативного ядерного антигена (А, Б) и тирозингидроксилазы (В, Г) в перивентрикулярной области продолговатого мозга годовалой симы. Масштаб: А, Г – 200 мкм; Б, В – 50 мкм.

предполагать участие этих клеток в качестве источников дофамина в спинномозговой жидкости. Таким образом, все три группы КЭ клеток горчака могут осуществлять нейросекреторную и сенсорную функции, связанные с оценкой положения пищи в пространстве и обеспечивать местную либо удаленную переключательную активность при координации механосенсорной, зрительной и вкусовой функций соответственно. У симы фенотипически зрелые типы ТН-ип клеток, локализованные в аналогичных областях продолговатого мозга, могут иметь сходную функциональную специализацию (рис. 2Д). Однако часть идентифицированных нами ТН-ип элементов расположена в пролиферативных (PCNA-маркируемых) зонах медуллярного отдела (рис. 7А–Г) и на более ранних стадиях онтогенеза маркируют нейромерную структуру медуллярного отдела. На более поздних этапах развития ТН-иммунолокализация выявлена в волокнах радиальной глии в межпучковой области, на территории ромбовидной ямки, а также в популяции мелких клеток перивентрикулярной и субвентрикулярной областей (рис. 2Д). У горчака плотность распределения подобных фенотипически не зрелых клеточных форм в перивентрикулярной области мозга значительно ниже, чем у симы. Мы считаем, что особенности иммунолокализации ТН в медуллярном отделе симы и горчака подтверждают выдвинутое предположение об участии дофамина в качестве морфогенетического фактора, регулирующего развитие мозга рыб в постэмбриональный период.

Участие газотрансмиттеров в модуляции систем классических нейромедиаторов у рыб

Исследование модулирующего влияния газотрансмиттеров на системы классических нейромедиаторов в мозге рыб ранее не проводилось. В наших исследованиях было показано, что суммарная нитроксидергическая продукция в ядрах ствола у различных видов рыб значительно превышает показатели, установленные для других групп позвоночных и, в частности, млекопитающих. Так, в норме у различных видов рыб NO-продуцирующие нейроны были верифицированы в сомато- и висцеросенсорных и висцеромоторных ядрах продолговатого мозга (V, VII, IX, X ядрах черепно-мозговых нервов, рис. 8), эфферентных октаво-латеральных нейронах, ядрах перешейка, вторичном вкусовом ядре, ядрах шва, ядрах глазодвигательного комплекса (III, IV и VI ядрах черепно-мозговых нервов). Большинство этих комплексов у рыб являются холинергическими центрами ствола, участвующими в иннервации брахиомоторной мускулатуры и принимающих сенсорные входы от соматосенсорных, вкусовых экстра- и интраоральных, механосенсорных, октаво-латеральных рецепторов. У рыб в силу низкого уровня цефализации мозга большинство сенсорных входов от соматосенсорных (ядро V), октаво-латеральной, вкусовой экстраоральной (ядро VII), интраоральной (ядро IX) сосредоточено на территории медуллярного отдела, поэтому именно этой областью воспринимается большой объем входящей сенсорной информации (см. схему на рис. 9). Несмотря на значительные межвидовые морфоадаптационные отличия, у окунеобразных и карпообразных рыб выявлены черты сходства в организации медуллярных и спинальных NO-продуцирующих центров. Участие NO в модуляции сенсорных систем переднемозгового отдела млекопитающих на сегодняшний день доказано (Kiss, 2000). Мы предполагаем, что в

продолговатом мозге рыб NO осуществляет модуляцию первичных сенсорных центров, расположенных в составе продолговатого мозга (ядрах черепно-мозговых нервов). У симы все вышеперечисленные ядра стволовой и перешеечной области являются холинергическими и экспрессируют pNOS (см. схему на рис. 9). Первичные сенсорные ядра (V, VII, VIII, IX и X) и вторичные релейные ядра (вторичное вкусовое ядро, ядро перешейка) симы, процессирующие разномодальную сенсорную сигнализацию в ядра прегломерулярного комплекса, модулируются NO (рис. 9). Мы предполагаем, что в мозге симы NO является модулятором сенсорных и двигательных холинергических центров.

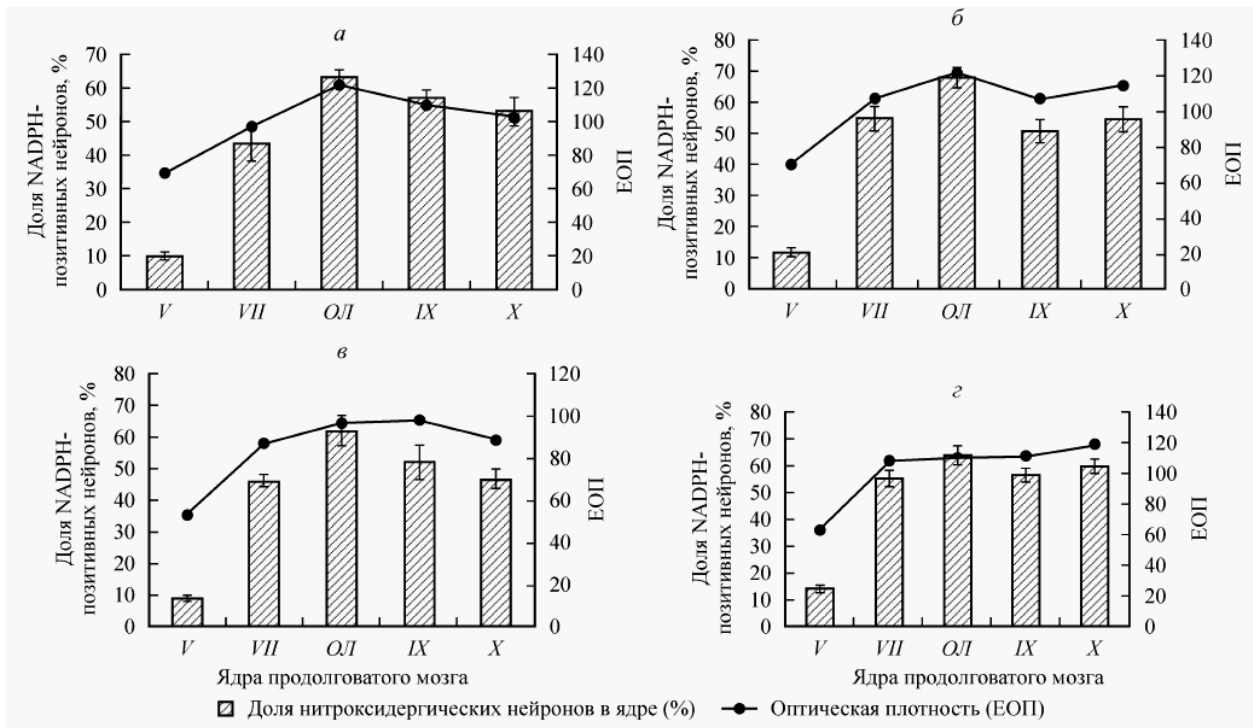


Рис. 8. Количественное распределение и оптическая плотность NADPH-d-позитивных нейронов в продолговатом мозге рыб: а – фолиса, б – опистоцентра, в – терпуга, г – карася.

Важнейшим сенсорным центром, проводящим ноцицептивную информацию у рыб, являются ядра шва. Нами установлено, что у различных видов рыб большинство нейронов верхнего и нижнего ядер шва экспрессируют NADPH-d. Это подтверждает данные, установленные на млекопитающих и человеке, что NO является медиатором ноцицепции (Болдырев и др., 2010). Наличие pNOS-продуцирующих нейронов и высокая активность NADPH-d в ядрах шва, дорсальных волокнах спинного мозга и сенсорной части ядра тройничного нерва свидетельствует об участии оксида азота в модуляции сигналов ноцицептивного и соматосенсорного центров продолговатого мозга рыб.

Исследование локализации pNOS в гипофизотропных ядрах промежуточного мозга взрослых особей горчача показало, что TH-ип и NO-продуцирующие системы в перивентрикулярных и субвентрикулярных ядрах в целом имеют сходную локализацию, а зоной колокализации этих трансмисмиттеров является перивентрикулярное ядро заднего бугорка, где pNOS и TH локализованы в небольших клетках, формирующих восходящие на вентральный теленцефалон

проекции. В таких клетках NO может модулировать синаптическую пластичность проекционных дофаминергических нейронов и регулировать экскрецию дофамина.

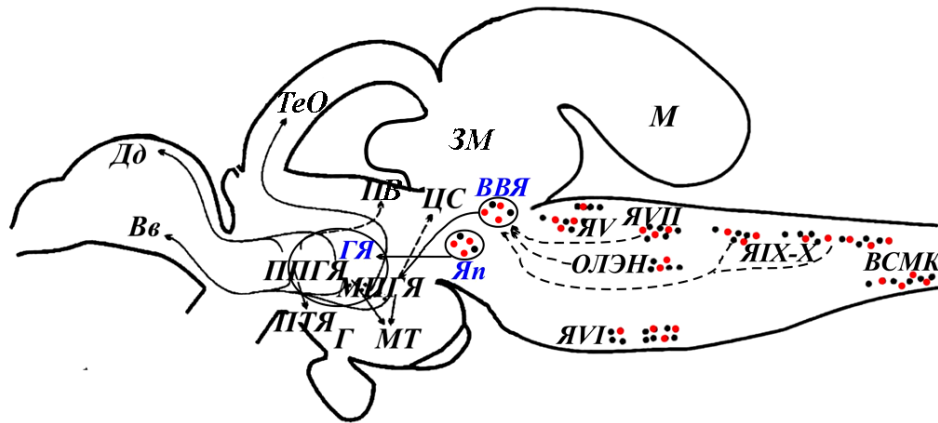


Рис. 9. Схема проведения сенсорной сигнализации от ядер V, VII, IX, X и октаволатеральных нервов продолговатого мозга в конечный мозг. В левой части показаны эфферентные восходящие и нисходящие проекции переднего, медиального прегломерулярных ядер и маммилярного тела симы при маркировании DiI (Пущина, 2012). Нитроксидаергические ядра ствола показаны черными, холинергические – красными кружками. Объяснения в тексте.

Исследование физиологической активности сероводорода в нервной системе млекопитающих началось недавно (Kimura, 2002), а выявление его роли в ЦНС рыб ранее не проводилось. Результаты исследований, проведенные нами на рыбах, позволяют предполагать, что сероводород действует как посредник, регулирующий ряд ферментативных реакций клеток. Распределение фермента синтеза H_2S в ЦНС рыб характеризуется выраженными видоспецифическими особенностями, возможно, отражающими их адаптационный характер и функциональный статус животного.

Иммунолокализация цистатионин β -синтазы в ЦНС взрослых особей симы *O. masou* и карпа *Cyprinus carpio* обнаружена в нейронах вентральной спинномозговой колонны, продолговатого мозга, волокнах и клетках мозжечка, оптическом тектуме и конечном мозге. Сравнительные исследования иммунолокализации CBS и денситометрические данные в различных структурах мозга симы и карпа показали межвидовые отличия, имеющие, очевидно, адаптационное значение (рис. 10). В различных областях мозга симы выявлена варикозная либо гладкая микроцитоскульптура афферентов и их окончаний, что может свидетельствовать о синаптическом либо паракринном способе высвобождения H_2S в этих областях мозга у рыб.

В настоящее время показано участие ГАМК в регуляции эндокринной активности гормонов преоптико-гипофизарного комплекса у ранней молоди *Salmo trutta fario* (Diaz et al., 2011). На личинках и ранней молоди этого вида лососей установлено участие ГАМК-ергической иннервации в регуляции синтеза гипофизарных пептидных гормонов: метенкефалина и галанина (Diaz et al., 2011). В наших исследованиях на симе различных возрастных групп было обнаружено, что ГАМК-ип нейроны присутствуют в различных отделах головного мозга: конечном, перивентрикулярных ядрах промежуточного, среднемозговом тегментуме, стволе, мозжечке и спинном мозге (рис. 11). Помимо нейронной локализации нами были идентифицированы мелкие недифференцированные формы клеток, радиальные волокна, локализованные в областях, где пролиферативная активность клеток

сохраняется и у взрослых животных (рис. 11А, Г). Эти зоны были идентифицированы в промежуточном мозге – на территории преоптической,

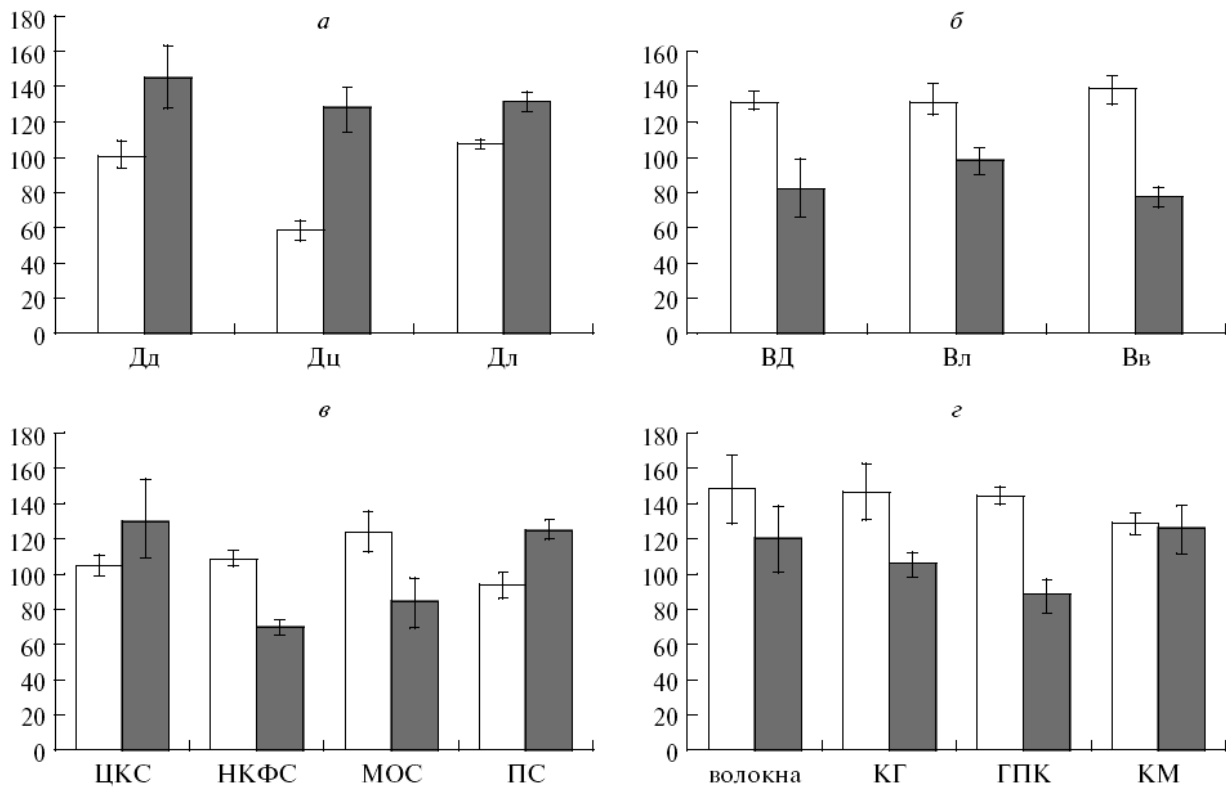


Рис. 10. Денситометрический анализ активности цистатинин β -синтазы в интегративных центрах мозга симы *O. masou* и карпа *C. carpio*: а – дорсальный теленцефалон, б – вентральный теленцефалон, в – мозжечок, г – зрительный тектум. По оси абсцисс – обозначение зон мозга; по оси ординат – уровень оптической плотности. Светлые столбцы – сима, темные – карп.

заднетуберальной и таламической и гипоталамических областей, в области центрального серого вещества среднемозгового тегмента, на медуллярном уровне – в межпучковой области и перивентрикулярно на уровне ядер IX–X пар черепно-мозговых нервов и в спинном мозге. Паттерны распределения ГАМК-ергических элементов в мозге симы во многом напоминают распределение ТН-ип структур, причем это сходство проявляется в наличии как фенотипически зрелых клеточных форм, так и недифференцированных элементов, имеющих перивентрикулярную и субвентрикулярную локализацию и маркирующие нейромерную структуру мозга. Такая иммуноморфология ГАМК-ергических структур, обнаруженная нами у симы разных возрастных групп, может указывать, что, подобно дофамину, ГАМК также следует рассматривать в качестве морфогенетического фактора, оказывающего влияние на постэмбриональное развитие мозга симы.

ГАМК-ергическая нейротрансмиссия характеризуется высокой изменчивостью синаптических ответов. У млекопитающих сероводород регулирует состояние ГАМК-рецепторов различных подтипов, локализованных пре- и постсинаптически (Han et al., 2005). У взрослой симы в областях головного и спинного мозга, содержащих крупные проекционные клетки: дорсальных ядрах тегмента, медиальной ретикулярной формации, ретикулоспинальных клетках, нейронах вентральной спинномозговой колонны была установлена совместная локализация ГАМК, ПА и CBS (рис. 12). Именно эти крупноклеточные образования в мозге рыб

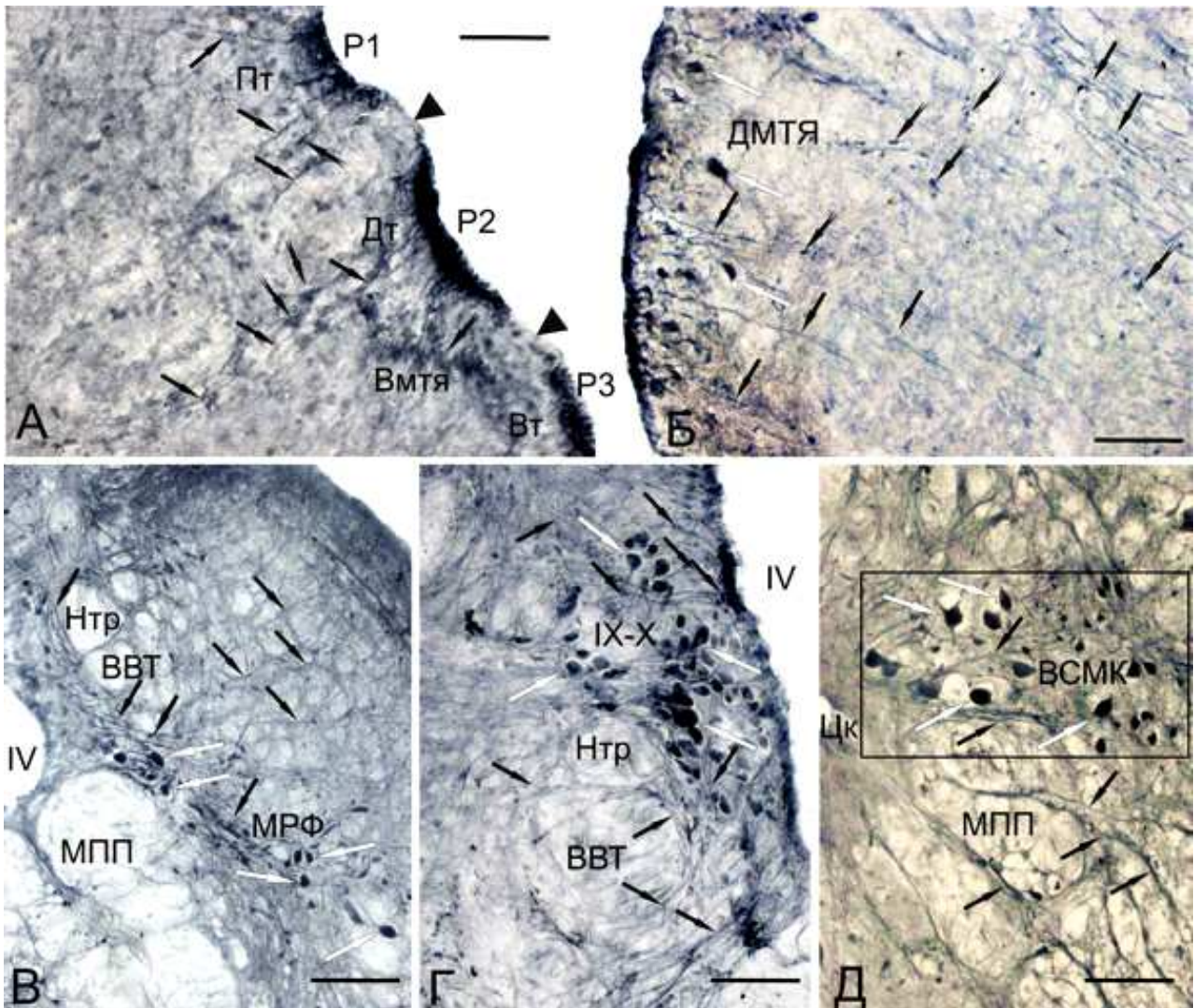


Рис. 11. Иммунолокализация ГАМК в мозге 3-летней симы: А – в диэнцефалоне, видны клетки с радиальными отростками в составе переднемозговых нейромеров (Р1–Р3), на границах которых иммуномаркирование отсутствует; Б – в тегментуме, В – в межпучковой области; Г – в ядрах IX–X нервов; Д – в спинном мозге. Белыми стрелками показаны клетки, черными – волокна радиальной глии. Масштаб: А – 100 мкм; Б–Д – 200 мкм.

участвуют в организации быстрых двигательных ответов (Grillner, 2011). В медуллярных отделах медиальной РФ и области ВСМК симы степень колокализации CBS, ГАМК и ПА очень высока (рис. 123–К). Считается, что наличие парвальбумина способствует формированию буферных кальциевых систем, позволяющих обеспечить множественную генерацию потенциалов действия в нейронах с высокочастотными разрядами (Celio, 1986). Высокая степень колокализации ПА, цитохромоксидазы и 2-дезоксиглюкозы также указывает, что парвальбумин связан с нейронными системами, характеризующимися высоким уровнем окислительного метаболизма (Braun et al., 1985). Показано, что под действием H_2S содержание внутриклеточного кальция в нейронах и глиальных клетках обратимо увеличивается (Dedman, Kaetzel, 1995; Lee et al., 2006). Подобный цАМФ-зависимый механизм активации может быть реализован и в идентифицированных нами крупноклеточных

CBS- и ПА-ип популяциях клеток. Как установлено, угнетение синтеза H_2S приводит

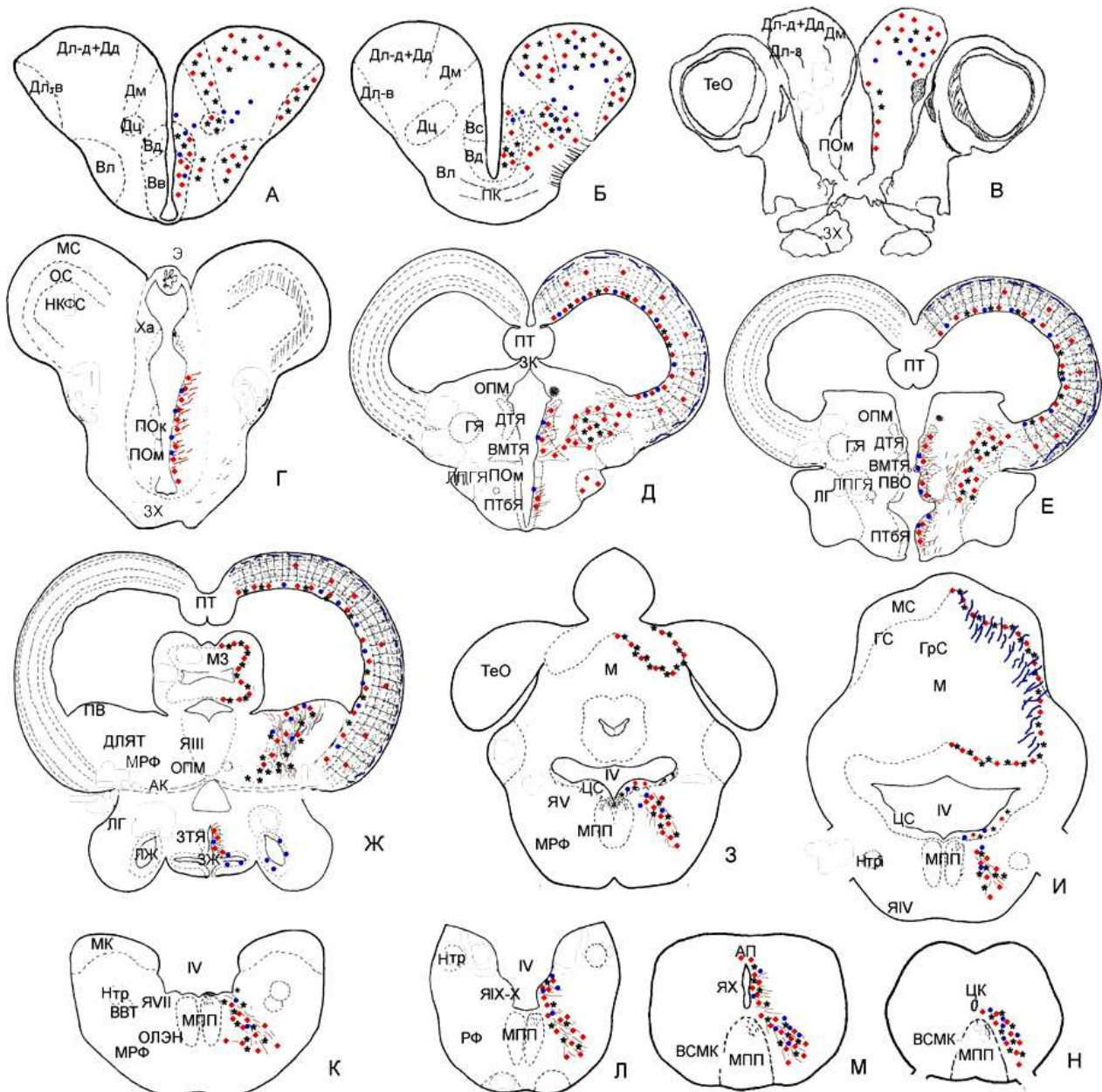


Рис. 12. Схема распределения цистатионин β -синтазы, ГАМК- и парвальбумин-иммунопозитивных локусов на фронтальных срезах ЦНС симы. CBS-, ГАМК- и ПА-иммунопозитивные участки обозначены синими, красными и черными значками соответственно. Обозначения: см. список сокращений.

к значительному снижению уровня внутриклеточного кальция. Это подтверждает заключение о заметном влиянии H_2S -зависимых путей на временные характеристики процессов кальциевого гомеостаза в нейронах (Dedman, Kaetzel, 1995).

Значительная гетерогенность CBS-, ГАМК- и ПА-ип субпопуляций нейронов во всех областях мозга симы указывает на принадлежность таких единиц к различным нейрохимическим и электрофизиологическим системам. Плотность распределения CBS-, ПА- и ГАМК-ип клеток у симы наиболее высока и постоянна в крупноклеточных каудальных регионах мозга – в областях локализации ретикуло-спинальных нейронов, «высокочастотных» маутнеровских клеток и нейронов ВСМК. H_2S -зависимая регуляция высвобождения кальция с участием ПА может

сокращать в соответствующих нейронах рефрактерный период после генерации потенциалов действия и, следовательно, давать животному определенные поведенческие эволюционные преимущества. Таким образом, в популяции крупных тормозных нейронов, содержащих повышенную концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} , экскреция ГАМК по нашему мнению может модулироваться с помощью сероводорода.

Исследование взаимоотношений NO- и H_2S -продуцирующих систем в мозге симы показало, что они представляют отдельные не перекрывающиеся системы внутри- и межклеточного сигналинга. Проведенное нами исследование распределения NADPH-d-позитивных, nNOS- и CBS-иммунопозитивных элементов в различных отделах головного мозга симы, а также особенности иммуномаркирования клеток и волокон указывают на то, что NO- и H_2S -продуцирующие системы представляют самостоятельные нейронные комплексы, выполняющие специализированные функции в работе местных нейронных сетей.

В дорсальной области конечного мозга симы NO является преобладающим газотрансмиттером, эффекты которого реализуются паракринным путем и определяют действие NO в качестве объемного нейротрансмиттера. В вентральной области преобладает система синтеза сероводорода. В этой области конечного мозга симы выявлены высокая активность CBS, возможно имеющая синаптическую локализацию, значительная морфологическая гетерогенность клеток в дорсальном ядре (Вд) и варикозная цитоскульптура афферентов. По-видимому, в конечном мозге симы способ высвобождения газотрансмиттеров влияет на характер оказываемых ими нейромодуляторных эффектов.

В перивентрикулярной зоне промежуточного мозга и тектума симы присутствовали как CBS-, так и nNOS- и NADPH-d-продуцирующие клетки. Наличие NO- и H_2S -продуцирующих элементов в этих областях указывает на возможное участие сероводорода и оксида азота в морфогенезе этих отделов мозга.

У симы были выявлены CBS-ип волокна варикозного типа, пронизывающие слой клеток Пуркинье мозжечка. Наличие таких волокон и CBS-ип окончаний в инфраганглионарном сплетении мозжечка, возможно, свидетельствует о синаптическом способе высвобождения H_2S в этой области мозга симы.

Наличие нитроксидергических клеток и волокон в мозжечке ранее было показано на разных видах рыб путем гистохимического маркирования NADPH-d (Arevalo et al., 1995; Brüning et al., 1995; Giraldez-Perez et al., 2008). Обнаружение nNOS в эвридендронидных клетках симы подтверждает полученные нами ранее данные о гистохимическом маркировании NADPH-d в нейронах этого типа у рыб (Puschina, Varaksin, 2001). По данным Икенага с соавторами (Ikenaga et al., 2006), большинство ЭДК у рыб являются аспартатергическими и получают ГАМК-ергические импульсы от клеток Пуркинье. Согласно нашим данным, популяция ЭДК симы содержит ГАМК-ергические и ПА-ип клетки. Идентифицированные у симы тонкие nNOS-ип волокна, по нашему мнению, являются аксонами эвридендронидных нейронов. Таким образом, оксид азота, локализуясь в проекционных ЭДК, выступает в качестве модулятора аспартатергических сигналов, поступающих в составе эфферентных волокон к различным участкам мозга симы.

Локализация nNOS, NADPH-d и CBS в межпучковых, интерфасцикулярных по классификации Ма (Ma, 1997), клетках симы идентифицирована впервые. Мы считаем, что межпучковые CBS- и nNOS-ип нейроны симы представляют

раздельные субпопуляции клеток ретикулярной формации, модулирующие ГАМК- и холинергические системы продолговатого мозга соответственно.

Таблица 3

Морфометрические характеристики NADPH-d-, nNOS- и CBS-продуцирующих клеток перешеечной области и ствола симы *O. masou*

Область мозга	NADPH-d Размеры клеток (мкм) и тип по классификации Arevalo et al. (1995)*	Активность (ЕОП) NADPH-d	nNOS Размеры клеток (мкм) и тип по классификации Arevalo et al. (1995)*	CBS Размеры клеток (мкм) и тип по классификации Arevalo et al. (1995)*
Продолговатый мозг				
Ядро блуждающего (X) нерва	28.2 ± 1.4/16.5 ± 2.7 II	122.2 ± 2.9 II	29.2 ± 3.7/12.5 ± 2.7 II 43 ± 5.7/19 ± 4.8 I	33.4 ± 6.9/15.6 ± 5.6 II 41 ± 5.9/23.3 ± 6.9 I
Ядро языкоглоточно-го (IX) нерва	26 ± 5.4/20.5 ± 2.3 II	116.6 ± 6.4 II	28 ± 4/18.5 ± 3 II	—
Октаво-латеральные (VIII) ядра	26 ± 2.4/15.8 ± 3.2 II	105.6 ± 3.3 II	25 ± 3.4/16.2 ± 4.2 II 44.5 ± 5.1/21.1 ± 7.1 I	—
Ядро лицевого (VII) нерва	43.2 ± 4.3/20.3 ± 4 I 21.8 ± 4.2/17.4 ± 5 II I	60.1 ± 5.4 I 67.2 ± 3 III	23.8 ± 3.2/18.2 ± 18 III 46.7 ± 6.2/23.3 ± 2 I	—
Ядро отводящего (VI) нерва	19.3 ± 5.2/17.2 ± 4.3 III	65.1 ± 6.7 III	21.1 ± 3.2/14.2 ± 6.5 II	—
Ядро тройничного (V) нерва	45.5 ± 3.2/24.7 ± 5.6 I 27.4 ± 1.2/26.2 ± 3.8 II	86 ± 8 I 92 ± 4.2 II	29.4 ± 3.2/21.2 ± 4.8 II 42.5 ± 5/21.7 ± 3.6 I 10.3 ± 1.2/7.1 ± 2.4 IV	—
Ретикулоспинальные клетки	46.4 ± 3.1/25.6 ± 6.1 I	84 ± 17.3 I	44.2 ± 4.1/22.6 ± 2.1 I	44.8 ± 3.5/20.5 ± 3.1 I
Межпучковые клетки	44.2 ± 3.7/24 ± 2.2 I 25.2 ± 4.8/19.6 ± 3.8 II	102 ± 12 I 96 ± 8.9 II	27 ± 3.8/18.2 ± 4 II 43.2 ± 2.2/ 29 ± 6.2 I	21 ± 3/13.2 ± 2.9 II 42.7 ± 1.8/32.2 ± 7.8 I
Перешеек (Мост)				
Верхнее ядро шва	8.5 ± 3.6/4.9 ± 2.7 IV	116.6 ± 7.1 IV	9.6 ± 2.2/5.4 ± 1.7 IV	—
Нижнее ядро шва	7.9 ± 2.3/5.6 ± 1.4 IV	119.4 ± 5 IV	8.7 ± 0.3/3.6 ± 0.4 IV	—
Вторичное вкусовое ядро	23.4 ± 7.4/17.4 ± 3.4 III	111.5 ± 5.4 III	25.4 ± 3.4/20.4 ± 1.4 II	—

Вторичное вкусовое ядро рассматривается в качестве висцерального интегративного центра продолговатого мозга рыб (Ma, 1997). У карпа в этом ядре была выявлена иммунолокализация CBS, а у симы вторичное вкусовое ядро CBS-иммунонегативно, но содержит NADPH-d и nNOS (табл. 3). Мы полагаем, что при участии H₂S- и NO-продуцирующих систем в мозге рыб осуществляется модуляция сенсорных функций, связанных с оценкой положения пищи в пространстве и координации механосенсорной, зрительной и вкусовой функций. У карпа основным нейромедиатором вкусовой системы является сероводород, а у симы – оксид азота, что подтверждает предположение об использовании рыбами разнообразных сигналтрансдукторных систем для передачи нейрохимической информации в функционально сходных комплексах.

Нами выявлено наличие NO- и H₂S-продуцирующих нейронов в стволовом и перешеечном отделах мозга симы. nNOS-ип и NADPH-d-позитивные нейроны были обнаружены в составе сомато- и висцеросенсорных (V, VII, IX-X) и висцеромоторных (III, IV и VI) ядер черепно-мозговых нервов, октаво-латерального эфферентного комплекса, медиальной ретикулярной формации (табл. 2). CBS в продолговатом мозге симы была обнаружена в нейронах ядра X нерва, ретикулоспинальных клетках и вентро-латеральной ретикулярной формации.

Распределение NO- и H₂S-продуцирующих нейронов в ядрах продолговатого мозга симы указывает, что NO является преобладающим нейромодулятором сомато-, висцеросенсорных и висцеромоторных систем продолговатого мозга, а H₂S, вероятно, модулирует висцеросенсорные системы, связанные с ядром X нерва, и нисходящие двигательные системы.

Газотрансмиттеры как регуляторы постэмбрионального нейрогенеза рыб

В отличие от млекопитающих, мозг рыб обладает высокой нейрональной пластичностью и способен продуцировать новые клетки в течение всей жизни (Wulliman, Puellas, 1999). Результаты нашего исследования указывают на наличие nNOS и NADPH-d как в нейронах, так и в глиальных клетках симы. Показано, что NO играет роль сигнального агента, регулирующего процессы направленного роста аксонов и дендритов, а также миграцию дифференцирующихся нейронов (Platel et al., 2010). Установлено, что субвентрикулярные зоны переднего мозга млекопитающих окружены NO-продуцирующими нейронами (Moreno-López et al., 2000; Romero-Grimaldi et al., 2008). Клетки, экспрессирующие nNOS, были выявлены среди клеток-предшественников зубчатой фассии гиппокампа морской свинки (Islam et al., 2003). Эти области мозга считаются зонами постэмбрионального нейрогенеза, в которых пролиферация клеток сохраняется в течение всей жизни млекопитающих животных и человека. Результаты наших исследований (рис. 13А, Б) позволяют предполагать, что в перивентрикулярной области продолговатого мозга симы, содержащей PCNA-ип пролиферирующие клетки, в разные возрастные периоды NO может выступать в качестве регулятора нейрогенеза, что подтверждает данные, полученные на млекопитающих.

В перивентрикулярной области продолговатого мозга, вентральной и латеральной зонах мозжечка карпа, считающихся матричными зонами мозга у данного вида (Extrom et al., 2001), выявлены высоко CBS-иммуногенные клетки, лишенные отростков (рис. 13В, Г). Размеры клеток, их местоположение в мозге и взаимоотношение с H₂S-продуцирующими нейронами указывают на наличие H₂S-продуцирующей глии в матричной зоне мозга карпа. В сходных областях мозга симы подобные клетки обнаружены не были. Поскольку в настоящее время участие газотрансмиттеров в регуляции постэмбрионального нейрогенеза млекопитающих показано (Zhou, Zhu, 2009), мы полагаем, что у карпа H₂S может выступать в качестве подобного агента, поскольку наличие CBS в клетках пролиферативных областей мозга мы рассматриваем, как одно из доказательств этого.

Одним из механизмов, регулирующих у рыб продуцирование большого числа клеток, образованных в том числе и в постэмбриональный период, является апоптоз (Zurupc, 2009). Исследование 60-дневной молоди осетра показало наличие интенсивно пролиферирующих зон, содержащих PCNA-ип клетки, в переднемозговом отделе. Активная пролиферация клеток в этот период развития осетра дополняется формированием вторичных нейрогенетических зон.

У 3-годовалых осетров зоны пролиферации и апоптоза в различных частях интактной ЦНС сохраняются (рис. 14А, Б). Наиболее высокая пролиферативная активность была выявлена в перивентрикулярной зоне продолговатого мозга, что позволяет рассматривать эту область как важнейшую зону постэмбрионального нейрогенеза (рис. 14А, 15Б). В медиальной ретикулярной формации, дорсальных

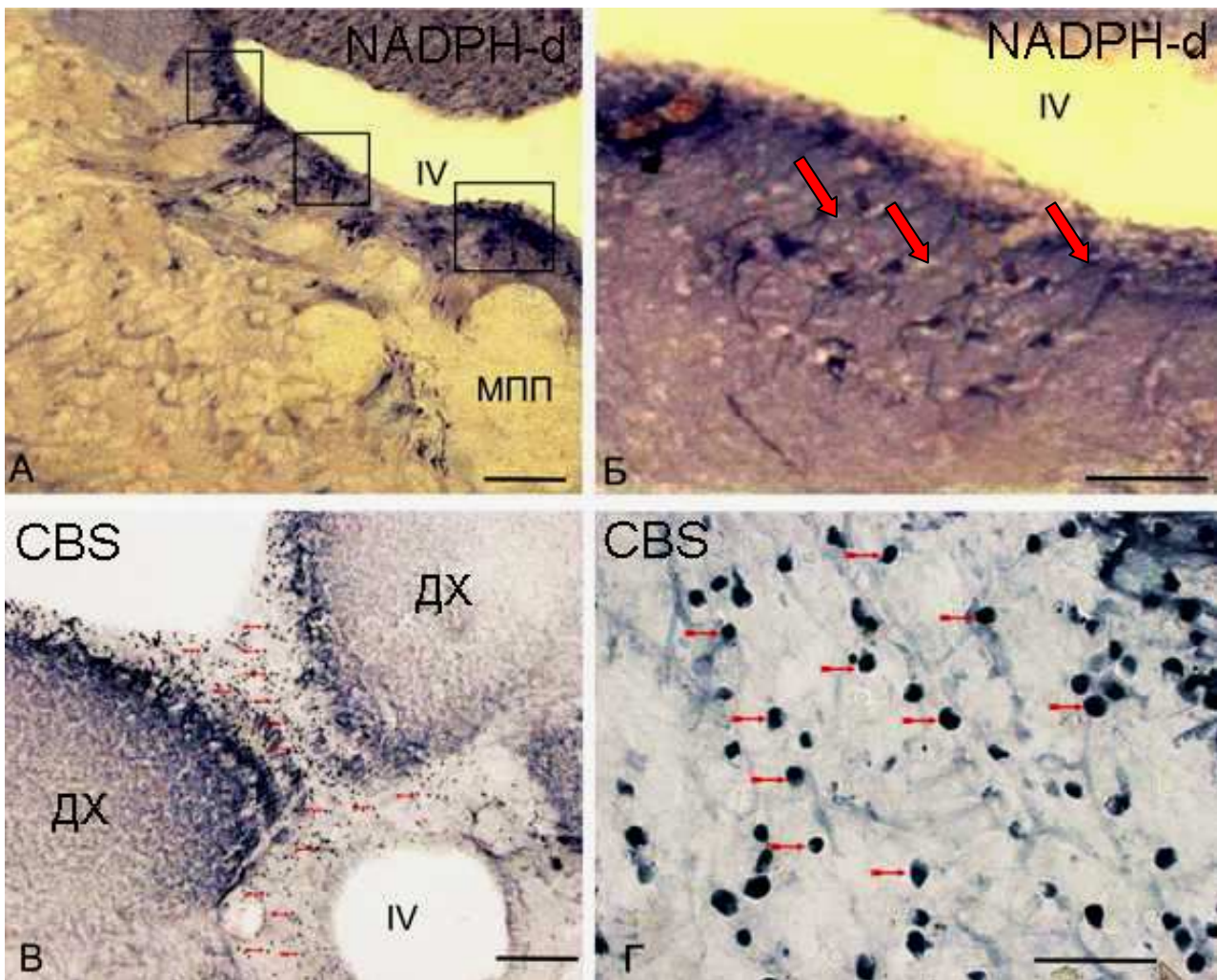


Рис. 13. NO-продуцирующие клетки в перивентрикулярной (матричной) области продолговатого мозга симы (А и Б) и сероводород-продуцирующие клетки в перивентрикулярной области карпа (В и Д). Масштаб: А, В – 200 мкм; Б, Г – 50 мкм.

ядрах таламуса, внутреннем волокнистом слое тектума и латеральном гипоталамусе было обнаружено максимальное количество апоптотических элементов. Это обстоятельство позволяет полагать, что данные зоны в мозгу осетра соответствуют областям локализации постмитотических нейробластов. В сенсорных центрах (тектуме и ядрах V, VII и X нервов) были выявлены вариабельные соотношения процессов пролиферации и апоптоза (рис. 15А), что указывает на различные темпы роста и дифференциации зрительных и хемосенсорных центров в мозге осетра. В отличие от млекопитающих, у которых центральные отделы сенсорных систем к моменту рождения и/или вскоре после него уже полностью сформированы и находятся в соответствии с количеством сенсорных рецепторов, у рыб рост и развитие сенсорных проекций в мозге могут продолжаться в течение всей жизни. Такая особенность рыб связана с необходимостью адаптации организации ЦНС рыб к непрекращающемуся значительному увеличению размеров тела и, соответственно, повышению объема входящей сенсорной информации. Результаты наших исследований проекций сомато- и висцеросенсорных ядер продолговатого мозга и зрительного тектума трехлетнего осетра в целом подтвердили предположения о

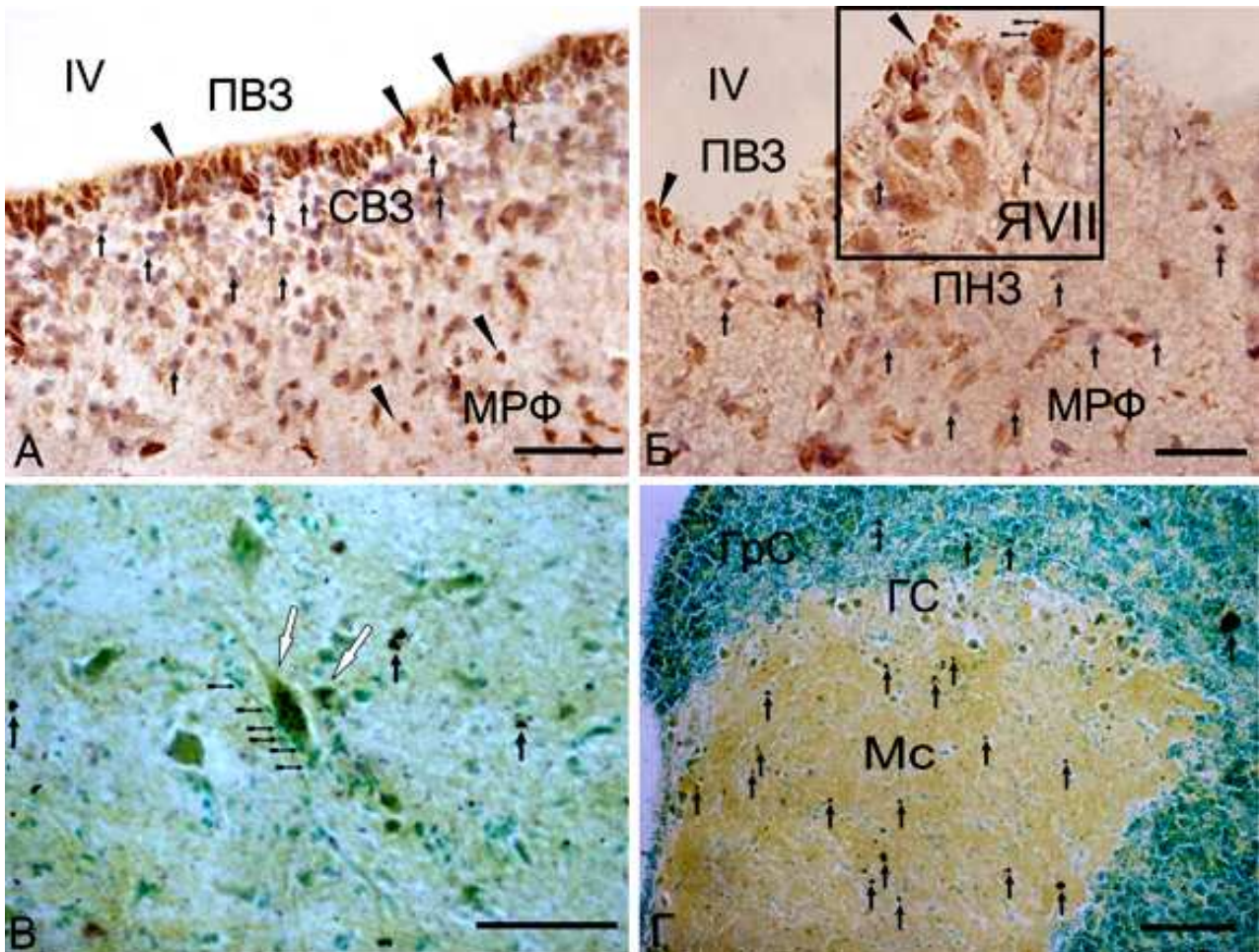


Рис. 14. Проллиферативная активность (А и Б) и апоптоз (В и Г) в мозге трехлетнего осетра *A. schrenckii*. PCNA-ип клетки показаны треугольными стрелками, TUNEL-маркированные элементы – черными стрелками. Масштаб: А – 100 мкм; Б, В – 50 мкм; Г – 200 мкм.

влиянии постэмбрионального нейрогенеза и апоптоза на особенности постнатального развития сенсорных систем. Наши результаты согласуются с данными об усилении дифференциального роста в первичных сенсорных областях доли *nucl. vagus* у карпа, а также сетчатки и тектума у данио по сравнению с таковым в других регионах мозга (Brandstätter, Kotrschal, 1990; Marcus et al., 1999).

До настоящего времени неизвестно, все ли типы нейронов возникают и интегрируются в соответствующие сети в растущем мозгу рыб. Возможно, что некоторый начальный уровень организации нейронных сетей у рыб устанавливается уже во время выклева личинки, и нейроны лишь некоторых типов образуются и интегрируются в существующие сети в течение последующей жизни.

Считается, что слабая способность к замещению или продуцированию новых нейронов в мозге млекопитающих связана с ограниченной способностью таких клеток интегрироваться в зрелые нейронные сети (Rakic, 2004). Существует предположение, что нейроны, образованные *de novo* у взрослых животных, отличаются более высокой пластичностью по сравнению с предсуществующими (Song et al., 2005; Lledo et al., 2006). Такая точка зрения хорошо согласуется с результатами наших исследований на осетре и позволяет предполагать, что постэмбриональный нейрогенез связан с координированным ростом сенсорных

систем и сенсорных областей мозга; таким образом, данный феномен может обеспечивать возможности для обработки нового онтогенетического опыта. Внедрение новых клеток в ранее существовавшие нейронные сети в составе сенсорных областей, видимо, связано прежде всего с увеличением размеров мозга в ходе роста особи. Однако необходимо учитывать то, что у рыб к моменту выклева личинки имеются уже относительно сформированные сенсорные и двигательные системы, благодаря которым животные способны достаточно быстро приобретать сложные поведенческие навыки, например активное схватывание пищи и избегание хищников. Это свидетельствует о том, что некоторые части ЦНС рыб, обеспечивающие обработку информации и реализацию необходимых в данный период жизни функциональных потребностей организма, начинают функционировать еще перед выклевом. Более поздний же постэмбриональный рост может рассматриваться как отсроченное развитие, которое связано с обеспечением функций, необходимых в дальнейшем, например, для установления зоосоциальных связей или полового поведения. Следовательно, некоторые части мозга осетра фактически остаются в *неотеническом* состоянии в течение долгого времени после эмбриогенеза. Это предположение объясняет высокие показатели пролиферативной активности в некоторых областях мозга осетра. Особую актуальность полученные результаты приобретают в связи регуляторными функциями оксида азота и сероводорода, рассматриваемыми нами в качестве регуляторов постэмбрионального нейрогенеза в мозге рыб. Обнаруженные нами pNOS-ип волокна варикозного типа в субвентрикулярной зоне спинного мозга, а также наличие PCNA- и pNOS-ип клеток в составе перивентрикулярной области промежуточного и продолговатого отделов мозга осетра и симы свидетельствует о наличии NO-продуцирующих элементов в зонах содержащих пролиферирующие клетки. С другой стороны, обнаружение нитроксидергической активности в TUNEL-позитивных областях мозга осетра указывает на участие оксида азота в

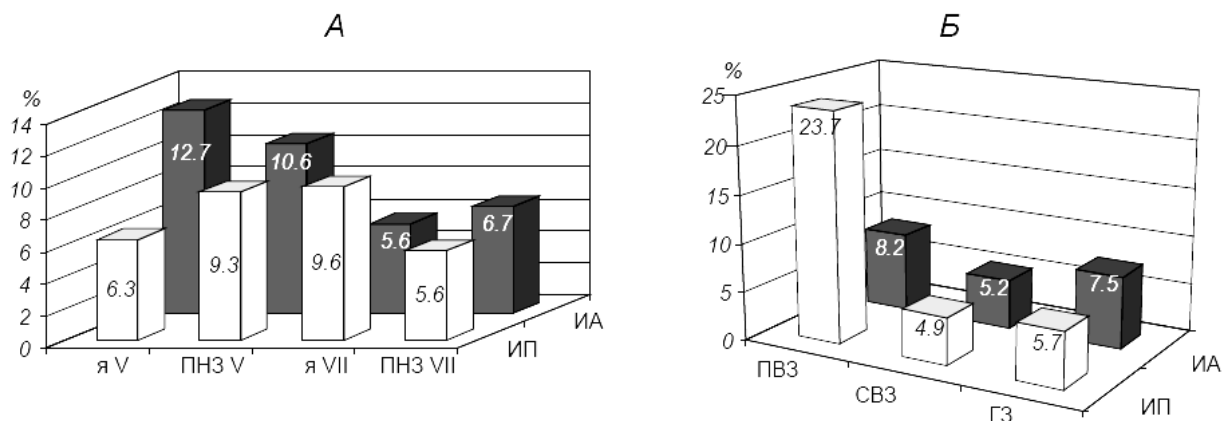


Рис. 15. Интенсивность процессов пролиферации и апоптоза в различных участках продолговатого мозга осетра: А – в ядрах тройничного (яV) и лицевого (яVII) нервов и прилежащих к ним перинуклеарных зонах (ПНЗ V, ПНЗ VII); Б – в доле блуждающего нерва. По оси ординат – значение индекса пролиферации (ИП, белые столбцы) и индекса апоптоза (ИА, темные столбцы).

регуляции апоптоза. Таким образом, возможно, что в мозге осетра NO является как проапоптогенным, так и регулирующим пролиферацию фактором, осуществляющим поддержание баланса между двумя этими процессами. Цитотоксические и нейропротективные эффекты NO можно рассматривать как взаимосвязанные

элементы одного действия: если избыточное образование NO потенцирует механизмы апоптоза в зонах локализации постмитотических нейробластов, то факторы, снижающие выработку NO, можно считать компенсаторными.

* * *

Таким образом, мы считаем, что особенности распределения исследованных нами систем синтеза классических нейромедиаторов (ГАМК, катехоламинов), а также газотрансмиттеров (NO и H₂S) напрямую связаны со способностью головного мозга рыб к росту в течение всей жизни. Мы интерпретировали полученные нами результаты именно в данном контексте. Это привело нас к заключению, что некоторые классические нейротрансмиттеры (дофамин, ГАМК), а также газообразные посредники (NO и H₂S) являются не только регуляторами функциональной активности нейронов и модуляторами синаптической передачи в зрелых нейронных сетях, но и рассматриваются в качестве индукторов развития (морфогенетических факторов) мозга в постэмбриональном онтогенезе рыб. Доказательством этому является обнаружение фенотипических незрелых элементов в мозге симы трехлетнего возраста, экспрессирующих вышеуказанные молекулы в пролиферативных зонах мозга, а также элементов, имеющих морфологию радиальной глии. Наличие маркеров газообразных посредников в областях, экспрессирующих пролиферативный ядерный антиген (PCNA), доказывает участие газотрансмиттеров в регуляции постэмбрионального нейрогенеза. У рыб с пролонгированным циклом развития (сима и карп) такие маркеры (NO и H₂S) в перивентрикулярных пролиферативных областях мозга могут отличаться, что согласуется с представлением о том, что в функционально сходных комплексах у животных могут быть задействованы различные сигналтрансдукторные системы. Развитие нервной системы лососей и осетров, в отличие от широко распространенной нейрогенетической модели *D. rerio*, происходит в течение длительного периода времени. По нашим данным, развитие различных структур ЦНС симы характеризуется выраженной гетерохронией, т.е. клетки каудальных отделов мозга значительно раньше, чем нейроны переднемозговых отделов, приобретают черты фенотипической специализации. Мы убеждены в том, что мозг этих животных долгое время сохраняет признаки фетальной организации, и наличие в течение первого и второго годов жизни малодифференцированных фенотипически незрелых клеточных форм, подтверждает эту гипотезу.

Настоящая работа открывает новое направление исследований клеточных механизмов формирования структурной организации в постэмбриональном мозге рыб, и изучения морфофункциональных проявлений гистогенетических процессов в разные периоды постнатального онтогенеза. Получены новые приоритетные данные, касающиеся процессов развития нервной ткани у осетровых и лососевых рыб, динамики формирования отделов головного мозга и особенностей распределения классических нейротрансмиттеров и газообразных посредников с учетом данных о непрекращающемся постэмбриональном нейрогенезе.

ВЫВОДЫ

1. Медиаторно-специфические системы ЦНС рыб характеризуются морфологической и нейрохимической гетерогенностью. Хемоархитектоническая структура мозга рыб, обеспечивающая функциональную специализацию сенсорных двигательных и интеграционных систем, имеет адаптационную направленность. Взаимодействие между различными по степени фенотипической зрелости клетками, соотношение которых динамически изменяется в различные периоды постэмбрионального онтогенеза, осуществляется одновременно существующими формами нейрохимической сигнализации – паракринной и синаптической.
2. В перивентрикулярных пролиферативных зонах выявлена экспрессия тирозингидроксилазы, ГАМК, NO и H₂S, участвующих в регуляции базовых гистогенетических процессов в качестве морфогенетических факторов, осуществляющих паракринную и аутокринную регуляцию пролиферации клеток-предшественников, миграцию дифференцирующихся нейронов и экспрессию специфических генов и синтезов.
3. Паттерны распределения тирозингидроксилазы, ГАМК-, Pax6, PCNA-экспрессирующих перивентрикулярных клеточных зон в различные периоды постэмбрионального морфогенеза маркируют нейромерную структуру мозга симы. Экспрессия транскрипционного фактора Pax6 детерминирует процессы регионализации мозга не только в ранний постэмбриональный (3 и 6 мес), но и в более поздний (1–3 года) периоды, контролируя региональную специализацию клеток-предшественников в переднемозговом и ромбоэнцефалическом отделах мозга.
4. Ядра прегломерулярного комплекса (ПГК) симы формируют реципрокные связи со зрительным (тектум) и механосенсорным (полулунный валик) центрами среднего мозга и проецируются в паллиальную зону конечного мозга. Установлена высокая морфологическая и нейрохимическая гетерогенность клеточного состава ПГК. Высказаны предположения, что: 1) ПГК является релейным таламическим центром, проводящим сенсорную информацию в конечный мозг от стволовых нитроксидаергических ядер; 2) в зонах ПГК симы, экспрессирующих Pax6, происходит дифференцировка интернейронов, проводящих различные типы сенсорной информации; 3) ПГК содержит популяцию мигрировавших из перивентрикулярной зоны клеток, находящихся на различных стадиях дифференцировки.
5. В заднетуберальной области горчака *Rhodeus sericeus* установлено наличие катехоламинергических нейронов, модулируемых оксидом азота. Показаны связи ТН-продуцирующих клеток заднетуберальной области и вентральной части конечного мозга, которые рассматриваются нами как функциональные аналоги мезостриатарной и мезо-лимбической модуляторных систем мозга млекопитающих.
6. В ядрах перешеечной области (перешейка, вторичного вкусового ядра) и черепно-мозговых нервов продолговатого мозга, медиальной ретикулярной формации, вентральной спинномозговой колонне симы NO является модулятором холинергических сомато-, висцеросенсорных и висцеромоторных систем.
7. У молоди осетра *Acipenser schrenckii* выявлены пролиферативные зоны (морфогенетические поля), ассоциированные с перивентрикулярными областями дорсального и вентрального теленцефалона, преоптической областью (P5), вентральным (P3) и дорсальным таламусом (P2), эпителиальным (P2), претектумом (P3), задним бугорком (P3) и гипоталамусом (P5). В областях с повышенной пролиферативной активностью: теленцефалоне, претектуме, вентральном таламусе,

сосудистом сплетении гипоталамуса и полулунном валике выявлены зоны вторичного нейрогенеза.

8. В сенсорных и двигательных центрах мозга 3-летнего осетра сохраняется высокий уровень пролиферации и апоптоза, указывающий на неотеническое состояние данных структур. В сенсорных центрах: тектуме и проекциях ядер V, VII и X нервов установлены отличающиеся соотношения между уровнем пролиферации и апоптоза, свидетельствующие о различных темпах роста и дифференцировки зрительных и хемосенсорных центров в мозге осетра.

9. В мозге осетра апоптоз обеспечивает элиминацию избыточного количества постмитотических нейробластов в различных центрах мозга: ретикулярной формации, дорсальном таламусе, внутреннем волокнистом слое тектума и латеральном гипоталамусе, обеспечивая процессы морфогенеза в сенсорных и двигательных областях мозга в постэмбриональный период.

10. В вентральной спинномозговой колонне, продолговатом мозге, мозжечке, тектуме и конечном мозге симы *Oncorhynchus masou* и карпа *Cyprinus carpio* установлено наличие нейронов и волокон, положительно реагирующих на цистатианин β -синтазу (CBS). Показано наличие варикозной и гладкой микроцитоскульптуры CBS-продуцирующих афферентов и окончаний. Высказано предположение об использовании рыбами разнообразных (NO- и H₂S-продуцирующих) сигналтрансдукторных систем для передачи нейрохимической информации в функционально сходных комплексах.

11. CBS-, ГАМК- и парвальбумин-продуцирующие популяции клеток симы принадлежат к различным нейрохимическим и электрофизиологическим системам мозга. Плотность распределения CBS-, парвальбумин и ГАМК-иммунопозитивных элементов у симы наиболее высока и постоянна в каудальных крупноклеточных системах: ретикуло-спинальных, маутнеровских клетках и вентральной спинномозговой колонне. Предполагается, что экскреция ГАМК данными клетками, содержащими повышенную концентрацию внутриклеточного Ca²⁺, модулируется с помощью сероводорода.

12. NO- и H₂S-продуцирующие системы: 1) в мозге симы представляют отдельные не перекрывающиеся между собой системы внутри- и межклеточного сигналинга; 2) участвуют в регуляции постэмбрионального нейрогенеза симы и карпа; 3) формируют дискретные нейронные комплексы, выполняющие специализированные функции в работе местных нейронных сетей.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. **Пущина Е.В.**, Вараксин А.А. Аргирофильные и нитроксидергические биполярные нейроны (клетки Люгаро) в мозжечке опистоцентра *Pholidapus dybowskii* // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2001. Т. 37, № 5. С. 437–441.
2. **Puschina E.V.**, Varaksin A.A. Morphological organization of large Golgi neurons in the cerebellum of the opisthocentrid *Pholidapus dybowskii* // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2002. V. 32, № 4. P. 341–345.
3. **Пущина Е.В.**, Вараксин А.А. Особенности морфофункциональной организации перинейрональных сателлитов зрительного нерва опистоцентра *Pholidapus dybowskii* // Цитология. 2003. Т. 45, № 8. С. 733–745.
4. **Пущина Е.В.**, Вараксин А.А., Романов Н.С. Нейронная организация конечного мозга кеты *Oncorhynchus keta* // Биология моря. 2003. Т. 29, № 6. С. 409–414.
5. Исаева В.В., **Пущина Е.В.**, Каретин Ю.А. Квазифрактальная организация нейронов головного мозга рыб // Биология моря. 2004. Т. 30, № 2. С. 143–151.
6. **Пущина Е.В.**, Дюйзен И.В. Структура и нейрохимические особенности ядер шва костистых рыб // Морфология. 2004. Т. 125, № 2. С. 32–37.
7. Исаева В.В., **Пущина Е.В.**, Каретин Ю.А. Изменения морфометрических показателей и фрактальной размерности нейронов спинного мозга в онтогенезе симы *Oncorhynchus masou* // Биология моря. 2006. Т. 32, № 2. С. 125–133.
8. **Пущина Е.В.**, Флейшман М.Ю., Тимошин С.С. Пролиферативные зоны мозга молоди амурского осетра. Взаимоотношение с нейромерами и миграцией вторичных матричных зон // Онтогенез. 2007. Т. 38, № 5. С. 345–354.
9. **Пущина Е.В.**, Карпенко А.А. Распределение холинацетилтрансферазы в ядрах перешейка и продолговатого мозга у костистой рыбы *Oncorhynchus masou*. Исследование восходящей мезопонтинной холинергической системы с помощью карбоцианинового красителя DiI // Цитология. 2007. Т. 49, № 7. С. 581–593.
10. **Пущина Е.В.** Нитроксидергическая организация ядер краниальных нервов продолговатого мозга костистых рыб // Цитология. 2007. Т. 49, № 6. С. 471–483.
11. **Пущина Е.В.**, Вараксин А.А., Калинина Г.Г. Цитоархитектоника и особенности нитроксидергической организации спинного мозга костистых рыб // Цитология. 2007. Т. 49, № 6. С. 460–469.
12. **Пущина Е.В.** Тирозингидроксилаза в ядрах конечного и промежуточного мозга горчака *Rhodeus sericeus* (Cyprinidae) // Цитология. 2009. Т. 51, № 1. С. 63–77.
13. Обухов Д.К., Обухова Е.В., **Пущина Е.В.** Сравнительный анализ структурно-функциональной организации головного мозга лососевых рыб. Сообщение I. Атлантический лосось *Salmo salar* L. // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3: Биология. 2010. Вып. 2. С. 7–12.
14. **Пущина Е.В.**, Обухов Д.К. NADPH-диафораза, нейрональная NO-синтаза и тирозингидроксилаза в ядрах промежуточного мозга горчака *Rhodeus sericeus* (Cyprinidae: Teleostei) // Цитология. 2010. Т. 52, № 9. С. 739–748.
15. Обухов Д.К., Обухова Е.В., **Пущина Е.В.**, Королева Т.В. Сравнительный анализ структурно-функциональной организации головного мозга лососевых рыб. Сообщение II. Строение и развитие головного мозга симы *Oncorhynchus masou* Drev. // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3: Биология. 2010. Вып. 4. С. 13–22.

16. **Пущина Е.В.** Морфофункциональные и ходологические особенности восходящей дофаминергической системы горчака *Rhodeus sericeus* (Cyprinidae) // Морфология. 2011. Т. 139, № 1. С. 26–31.
17. **Пущина Е.В.**, Вараксин А.А., Обухов Д.К. Цистатинин β -синтаза в ЦНС симы *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) и обыкновенного карпа *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) // Нейрохимия. 2011. Т. 28, № 1. С. 30–41.
18. Вараксин А.А., **Пущина Е.В.** Сероводород как регулятор системных функций у позвоночных // Нейрофизиология. 2011. Т. 43, № 1. С. 73–84.
19. **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.
20. **Пущина Е.В.**, Обухов Д.К. Процессы пролиферации и апоптоза в головном мозгу амурского осетра // Нейрофизиология. 2011. Т. 43, № 4. С. 313–329.
21. **Пущина Е.В.** Нейрохимическая организация и связи прегломерулярного комплекса мозга лосося-симы // Нейрофизиология. 2011. Т. 43, № 6. С. 511–526.
22. **Пущина Е.В.**, Обухов Д.К., Вараксин А.А. Нейрохимические маркеры клеток перивентрикулярной зоны мозга симы *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) // Онтогенез. 2012. Т. 43, № 1. С. 35–48.
23. **Пущина Е.В.**, Вараксин А.А., Обухов Д.К. Газообразные посредники в головном мозге симы *Oncorhynchus masou* (Salmonidae, Teleostea) // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2012. Т. 48, № 1. С. 85–95.
24. Вараксин А.А., **Пущина Е.В.** Значение сероводорода в регуляции функций органов // Тихоокеанский медицинский журнал. 2012. № 2. С. 27–36.
25. **Pushchina E.V.**, Obukhov D.K. Medullar catecholaminergic system of cyprinoid fishes *Rhodeus sericeus* (Teleostea) // Neurophysiology. 2012. V. 44, № 4. P. 275–285.

Работы, опубликованные в материалах международных конференций и всероссийских конференций с международным участием:

26. **Пущина Е.В.** Пролиферация и апоптоз в нейронах спинного мозга амурского осетра *Acipenser schrenckii* // Нейронаука для медицины и психологии: 3-й международ. междисциплинарный конгресс. Судак, Крым, Украина, 12–20 июня 2007 г. М.: МАКС Пресс, 2007. С. 191–193.
27. **Пущина Е.В.** Дофаминергическая иннервация винтрального теленцефалона у костистых рыб // Механизмы нейроэндокринных регуляций: Материалы всероссийской конф. с международ. участием. Москва, 24–26 ноября 2008 г. М.: Фирма «Слово», 2008. С. 90–91.
28. Обухов Д.К., Обухова Е.В., **Пущина Е.В.** Конечный мозг – как интегративный центр нервной системы рыб // Проблемы регуляции висцеральных функций: Сб. науч. статей (материалы Международ. науч. конф., Минск, 23–24 окт. 2008 г.). Минск: РИВШ, 2008. Кн. 1. С. 121–126.
29. **Пущина Е.В.**, Обухов Д.К. Нейрохимические особенности ретикулярной формации продолговатого и спинного мозга костистых рыб // Проблемы регуляции висцеральных функций: Сб. науч. статей (материалы Международ. науч. конф., Минск, 23–24 окт. 2008 г.). Минск: РИВШ, 2008. Кн. 1. С. 167–171.
30. **Puschina E.V.**, Karpenko A.A. The relationships between neurons containing dopamine and nitric oxide synthase in the encephalon of cyprinid teleost // Proceedings of the 11-th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry

Conference «Stress and Behavior» (1st ISBS Conference), St-Petersburg, Russia, May 16-20, 2008. St-Petersburg. 2008. P. 62.

31. **Пущина Е.В.**, Флейшман М.Ю., Тимошин С.С. Влияние регуляторных пептидов на NO-зависимые процессы в головном мозге молоди амурского осетра *Acipenser schrenckii* // Функциональные системы организма в норме и при патологии: Сб. науч. тр. Минск: РИВШ, 2008. С. 419–424.

32. **Пущина Е.В.**, Флейшман М.Ю., Цыганков В.И., Обухов Д.К., Тимошин С.С. Влияние дерморфинов на нейрональную пластичность и пролиферативную активность NO-продуцирующих нейронов головного мозга молоди амурского осетра *Acipenser schrenckii* // Актуальные вопросы функциональной межполушарной ассиметрии и нейропластичности: Материалы Всерос. конф. с международ. участием. М.: Научный мир, 2008. С. 613–617.

33. Обухов Д.К., Крючков В.И., Обухова Е.В., **Пущина Е.В.** Эффект матроклинной (материнской) наследственности на морфо-функциональную организацию мозга // Актуальные вопросы функциональной межполушарной ассиметрии и нейропластичности: Материалы Всерос. конф. с международ. участием. М.: Научный мир, 2008. С. 492–496.

34. **Пущина Е.В.** Нейрохимические и ходонологические аспекты эволюции переднемозгового отдела костистых рыб // Современные взгляды на эволюцию органического мира: Программа и тез. докл. Международ. науч. конфер. (18-20 ноября 2009 г., г. Киев, Украина). Киев, 2009. С. 65.

35. Обухов Д.К., Крючков В.И., Обухова Е.В., **Пущина Е.В.** Влияние неблагоприятных факторов среды на развитие ЦНС рыб // Закономерности развития патологических состояний и их коррекция. Минск, 27-28 окт., 2009: Сб. науч. статей. Минск: Бизнесофсет, 2009. С. 187–190.

36. **Пущина Е.В.**, Обухов Д.К. Локализация NADPH-диафоразы в ЦНС симы *Onchorhynchus masou* в норме и при острой гипоксии // Закономерности развития патологических состояний и их коррекция. Минск: Сб. науч. статей. Минск: Бизнесофсет, 2009. С. 217–221.

37. **Puschina E.V.**, Obukhov D.K. Aromatase immunoreactivity in the young pacific salmon brain *Oncorhynchus masou*: Immunolocalisation and coregionalization with NADPH-diaphorase and tyrosine hydroxylase // Proceedings 12-th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry: Conference «Stress and Behavior» (St-Petersburg, Russia, May 16-20, 2009). St-Petersburg, 2009. P. 46.

38. **Пущина Е.В.**, Обухов Д.К. Экспрессия регуляторных генов в конечном мозге телеостей как инструмент сравнительного анализа фенотипической дивергенции мозга // Нейронаука для медицины и психологии: 5-ый Международ. междисциплинарный конгресс. Судак, Крым, Украина, 3-13 июня 2009 г.: Тр. конгресса и школы М.: МАКС Пресс, 2009. С. 187–188.

39. Каретин Ю.А., **Пущина Е.В.**, Исаева В.В. Фрактальная размерность как количественный показатель пространственной сложности и возрастных изменений морфологии нейронов ЦНС рыб // Материалы XV Международ. конф. по нейрокибернетике. 23-25 сент., 2009. Т. 1. Секционные доклады. Ростов-на-Дону, 2009. С. 16–19.

40. **Пущина Е.В.**, Обухов Д.К. Роль радиальной глии в гистогенезе нервной системы // Нейронаука для медицины и психологии: 6-й Международ. междисциплинар. конгр. Судак, Крым, Украина, 5-15 июня 2010 г. М.: МАКС Пресс, 2010. С. 242–243.

41. **Пущина Е.В.**, Обухов Д.К. Особенности катехоламинергической системы головного мозга рыб // Тезисы докладов VIII Всероссийской конференции «Нейроэндокринология-2010» (Санкт-Петербург, 20-22 апр. 2010 г.). СПб.: Изд-во «Олимп-СПб», 2010. С. 120–122.
42. Обухов Д.К., **Пущина Е.В.** Участие радиальной глии в постнатальном нейрогенезе как механизм морфофункциональной пластичности мозга // Современные направления исследований функциональной межполушарной асимметрии и пластичности мозга. Экспериментальные и теоретические аспекты нейропластичности: Материалы Всерос. конф. с международ. участием. Москва, 2-3 дек. 2010 г. М.: Научный мир, 2010. С. 435–439.
43. **Пущина Е.В.**, Обухов Д.К. Сероводород как модулятор ГАМК-эргической нейротрансмиссии в ЦНС карпа *Cyprinus carpio* // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Материалы III Международ. конф. с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов (22-26 июня 2010 г., Петрозаводск). Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2010. С. 148–149.
44. **Пущина Е.В.**, Обухов Д.К. Сероводород эндогенный газообразный регулятор сосудов головного мозга у костистых рыб // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Материалы III Международ. конф. с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов (22-26 июня 2010 г., Петрозаводск). Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2010. С. 145–147.
45. **Пущина Е.В.**, Обухов Д.К. Нейрохимическая пластичность ГАМК- и парвальбуминергических систем мозга у костистых рыб // Современные направления исследований функциональной межполушарной асимметрии и пластичности мозга. Экспериментальные и теоретические аспекты нейропластичности: Материалы Всерос. конф. с международ. участием. Москва, 2-3 дек. 2010 г. М.: Научный мир, 2010. С. 452–457.
46. **Пущина Е.В.**, Обухов Д.К. Оксид азота как регулятор постэмбрионального нейрогенеза и апоптоза в мозге амурского осетра, *Acipenser schrenckii* // Тезисы докладов и лекций четырнадцатого международного совещания и седьмой школы по эволюционной физиологии. Санкт-Петербург, 24-29 окт. 2011 г. СПб.: ВВМ, 2011. С. 162.
47. **Пущина Е.В.** Эволюционная пластичность катехоламинергических систем продолговатого мозга костистых рыб // Материалы II Всероссийской конференции с международным участием "Современные проблемы эволюционной морфологии животных" к 105-летию со дня рождения академика А.В. Иванова. Санкт-Петербург, 17-19 окт. 2011 г. СПб.: ЗИН РАН. 2011. С. 281–284.
48. Обухов Д.К., Обухова Е.В., **Пущина Е.В.** Эволюционная морфология конечного мозга лучеперых рыб. // Материалы II Всероссийской конференции с международным участием "Современные проблемы эволюционной морфологии животных" к 105-летию со дня рождения академика А.В. Иванова. Санкт-Петербург, 17-19 октября 2011 г. СПб.: ЗИН РАН. 2011. С. 250–253.
49. **Pushchina E.V.**, Obukhov D.K., Varaksin A.A. Hydrogen sulfide as regulator functional activity in teleost fishes brain // Proceedings of the First European Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide, Institute of Molecular Physiology and Genetics Department of Cell Physiology and Genetics Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia, June 15-18, 2012. P. 116–117.
50. **Pushchina E.V.**, Varaksin A.A., Obukhov D.K. Adult neurogenesis and neurochemical signaling in fish brain // Proceedings of the II International Neural Regeneration

Symposium. Chinese Academy of Sciences The University of Shenyang; Spinal Cord and Brain Injury Research Group Indiana University School of Medicine. China. 2012. P. 130–131.

Работы, опубликованные в научных журналах, сборниках трудов и материалах конференций:

51. **Пущина Е.В.**, Вараксин А.А. Локализация оксида азота в ядрах шва костистых рыб // Современные проблемы физиологии и экологии морских животных. Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 2003. С. 106–117.
52. **Пущина Е.В.**, Вараксин А.А. Структурная организация и нейрохимические свойства ядер перигломерулярного комплекса окунеобразных рыб // Современные проблемы физиологии и экологии морских животных. Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 2003. С. 117–131.
53. Каретин Ю.А., **Пущина Е.В.**, Исаева В.В. Изменения морфологической сложности нейронов спинного мозга в онтогенезе симы *Oncorhynchus masou* // VII Региональная конференция по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии студентов, аспирантов, молодых преподавателей и сотрудников вузов и научных организаций Дальнего Востока России, 18-20 ноября 2004 г., г. Владивосток: Тез. докл. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2004. С. 60–61.
54. **Пущина Е.В.**, Флейшман М.Ю., Тимошин С.С. Влияние морфиноподобных пептидов на нитроксидагическую и катехоламинергическую активность нейронов головного мозга молоди симы *Oncorhynchus masou* // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов – 2: Расширенные материалы Международ. науч.-практ. конф., Борок, 17-20 июля 2007 г. М.: Россельхозакадемия, 2007. С. 76–81.
55. Сторожева Е.В., **Пущина Е.В.** Особенности организации катехоламинергических ядер гипоталамуса и ствола горчака *Rhodeus sericeus* (Cyprinidae) // Вопросы морфологии XXI века. Вып. 1. Сборник научных трудов, посвященный 100-летию кафедры медицинской биологии СПбГМА им. И.И. Мечникова. СПб.: Изд-во ДЕАН, 2008. С. 275–281.
56. **Пущина Е.В.** Основы функциональной нейроморфологии: учебно-методическое пособие к курсу «Эволюционная морфология нервной системы позвоночных». Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2008. 96 с.
57. **Пущина Е.В.** Катехоламинергическая система спинного мозга амурского осетра *Acipenser schrenckii* // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2009. № 10. С. 39–47.
58. **Пущина Е.В.** Распределение ГАМК- и холинергических нейронов в конечном мозге тихоокеанского лосося *Oncorhynchus masou* // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2009. № 10. С. 30–38.
59. **Пущина Е.В.** Тирозингидроксилаза в промежуточном мозге амурского осетра *Acipenser schrenckii* // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2009. № 10. С. 47–56.
60. Обухов Д.К., Королева Т.В., Обухова Е.В., **Пущина Е.В.** Формирование структуры ЦНС в ранний этап постнатального развития симы *Oncorhynchus masou* // X научная сессия Морской биологической станции Санкт-Петербургского государственного университета. 9 февраля 2009 г.: Тез. докл. СПб., 2009. С. 66–67.

61. **Пущина Е.В.** Участие радиальной глии в процессах неэмбрионального нейрогенеза у костистых рыб // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2010. № 1. С. 10–14.
62. Обухов Д.К., Королева Т.В., Обухова Е.В., **Пущина Е.В.**, Салман Асмаа. Формирование структуры ЦНС на раннем этапе постнатального развития кижуча *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792) // XI научная сессия Морской биологической станции Санкт-Петербургского государственного университета 5 февр. 2010 г.: Тез. докл. СПб., 2010. С. 62–64.
63. Обухов Д.К., **Пущина Е.В.**, Вараксин А.А. Газообразные медиаторы в ЦНС позвоночных животных // Успехи соврем. естествознания. 2011. № 12. С. 49–51.
64. Обухов Д.К., Обухова Е.В., **Пущина Е.В.**, Мартынова О.В. Сравнительный анализ цитоархитектоники конечного мозга лососеобразных рыб // Тезисы докладов XII научной сессии МБС СПбГУ. СПб., 2011. С. 76–77.
65. **Пущина Е.В.**, Обухов Д.К. Катехоламин- и нитроксидергическая системы спинного мозга амурского осетра *Acipenser schrenckii* // Журн. теоретич. и практич. медицины. 2011. Т. 9. С. 46–56.
66. Обухов Д.К., Обухова Е.В., **Пущина Е.В.** Современные представления об эволюции конечного мозга позвоночных животных // Международ. журн. эксп. образования. 2012. № 6. С. 19–21.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.

IV – четвертый желудочек, R1 – ростральный ромбомер, Ак – ансулярная комиссура, АП – *area postrema*, БСТ – бульбоспинальный тракт, Вв, Вд, Вл, Вс – вентральная, дорсальная, латеральная и супракомиссуральная зоны вентральной области, ВВТ – вторичный вкусовой тракт, ВВЯ – вторичное вкусовое ядро, ВДВ – внутренние дугообразные волокна, Вмтя – вентромедиальное таламическое ядро, ВСМК – вентральная спинномозговая колонна, Вт – вентральный таламус, ГК – горизонтальная комиссура, ГПК – гломерулоподобные комплексы, ГрС – гранулярный слой, Гц – центральный гипоталамус, Гя – гломерулярное ядро, ДVII – доля лицевого нерва, ДХ – доля блуждающего нерва, Дд, Дл, Дм, Дц – дорсальная, латеральная, медиальная и центральная зоны дорсальной области, ДЛЯТ – дорсолатеральные ядра тегмента, Дт – дорсальный таламус, ДТЯ – дорсальное таламическое ядро, Зж – задний желудочек, ЗК – задняя комиссура, ЗТЯ – заднетуберальное ядро, ЗХ – зрительная хиазма, Инф – инфундибулум, КГ – гранулярные клетки, КМ – клетки молекулярного слоя, КЭ – катехоламинергические, КЯ – ядро Кахаля, ЛГ – латеральный гипоталамус, Лж – латеральный желудочек, ЛТ – латеральный торус, М – мозжечок, МВП – медиальный волокнистый пучок, МЗ – мозжечковая заслонка, МК – мозжечковый крест, МПГЯ – медиальное прегломерулярное ядро, МПП – медиальный продольный пучок, МРФ – медиальная ретикулярная формация, МС – молекулярный слой, МТ – мамиллярное тело, Нтр – нисходящий путь тройничного нерва, ОЛЭН – октаво-латеральные эфферентные нейроны, ОПМ – отогнутый пучок Мейнерта, ПВ – полулунный валик, ПВЗ – перивентрикулярная зона, ПВО – паравентрикулярный орган, ПГК – прегломерулярный комплекс, ПК – передняя комиссура, ПМТ – претекто-мамиллярный тракт, ПНЗ – перинуклеарная зона, ПОк – крупноклеточное преоптическое ядро, ПОм – мелкоклеточное преоптическое ядро, ППГЯ – переднее прегломерулярное ядро, ППЯ – перивентрикулярные претектальные ядра, ПС – перивентрикулярный слой, Пт – претектум, ПТ – продольный торус, ПТбЯ – переднетуберальное ядро, Птя – претектальное ядро, Р1-Р3 – дорсальные прозомеры, РГ – радиальная глия, РФ – ретикулярная формация, ТеО – зрительный тектум, ТН – тирозингидроксилаза, Ха – хабенула, ЦК – центральный канал, ЦКС – центральный клеточный слой, ЦС – центральный серый слой, Э – эпифиз, Яп – ядро перешейка, яIII – ядро глазодвигательного нерва, яIV – ядро блокового нерва, яIX-X – ядра языкоглоточного и блуждающего нервов, яV – ядро тройничного нерва, яVII – ядро лицевого нерва, ЯЗТп – перивентрикулярное ядро заднего бугорка.