БИОГЕНЕЗ МНОГОСЛОЙНЫХ МЕМБРАННЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ (МИЕЛОИДНЫХ ТЕЛ) В ПИГМЕНТНОМ ЭПИТЕЛИИ ЖЕЛТОЙ ПЕСТРУШКИ

Н.В.Самосудова, О.Ю.Орлов*, С.А.Голышев**

*Лаборатория № 12 (зав. — докт. биол. наук Ю.В.Панчин), *лаборатория № 8 (зав. — канд. биол. наук В.А.Бастаков) ФГБУН Институт проблем передачи информации им. А.А.Харкевича РАН, Москва; **Отдел электронной микроскопии (зав. — докт. биол. наук В.Ю.Поляков) НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, МГУ им. М.В.Ломоносова*

Выявлена общность ультраструктуры клеток пигментного эпителия желтой пеструшки (*Eolagurus luteus*) со структурой других млекопитающих, а также описаны ее особенности, характерные для данного вида. Рассмотрены разные этапы взаимодействия клеток пигментного эпителия и наружных сегментов палочек сетчатки. Прослежено поступление наружных сегментов в апикальную зону клетки пигментного эпителия, для которой характерно наличие сети тубулярного эндоплазматического ретикулума и электронно-плотной цитоплазмы с отростками, направленными в сторону сетчатки. Выявлены многослойные образования, которые мы рассматриваем как начальные стадии формирования миелоидных тел. Для обнаруженных структур определена характерная периодичность слоев ~4.2 нм и ~13.3 нм. Периодичность слоев в сформированном миелоидном теле составляет ~23 нм. Обсуждается взаимодействие наружных сегментов и клеток пигментного эпителия, ведущее к появлению миелоидных тел, и значение этого процесса для нормального функционирования элементов сетчатки.

Ключевые слова: *пигментный эпителий сетчатки, миелоидные тела, желтая пеструшка*

Желтая пеструшка *Eolagurus luteus* принадлежит к числу грызунов с дневным типом суточной активности. В сетчатке их глаз колбочки составляют заметную долю общей популяции фоторецепторов [2]. Такие животные привлекают внимание как возможный объект для экспериментальных исследований механизмов офтальмопатологии человека, в сетчатке которого также доминируют колбочки. С точки зрения офтальмопатологии важно, что рецепторы сетчатки и ее пигментный эпителий (ПЭ) представляют собой тесно связанный комплекс. Многие заболевания сетчатки с драматическим исходом начинаются с патологии именно ПЭ. Это служит основанием для исследования особенностей организации ПЭ тех видов животных, зрение которых, как и зрение человека, приспособлено к работе в условиях повышенной освещенности.

ПЭ разных позвоночных отличается по своей структуре, хотя есть черты, одинаковые для всех [11,12]. Он представляет собой слой гексагональных клеток, расположенный между фоторецепторами сетчатки и сосудистой оболочкой глаза. Характерными включениями клеток ПЭ являются гранулы меланина, которые придают ему темную окраску и частично изолируют фоторецепторы друг от друга, поглощая рассеянный на сетчатке свет. В ранних работах по изучению ультраструктуры ПЭ были описаны органеллы, получившие название миелоидных тел (МТ). Первоначально думали, что МТ характерны только для низших позвоночных [1,7,8,10-12], но позже они были обнаружены также у млекопитающих и птиц [4,5,7,9].

Адрес для корреспонденции: nsamos@iitp.ru. Самосудова Н.В.

МТ представляют собой продукт глубокой перестройки гладкого эндоплазматического ретикулума, в результате которого формируются компактные стопки плоских цистерн, которые множатся в числе и увеличиваются в размерах, не имея общей замыкающей мембраны [9]. По-видимому, внутренние стенки цистерн соединяются, цитоплазма между ними вытесняется, и образуется регулярная структура из плотно прилегающих друг к другу мембран. Рост этих структур происходит за счет материала, поступающего в цитоплазму в результате фагоцитоза наружных сегментов (НС) палочек, которые захватываются клетками ПЭ по мере их отлущивания (шеддинга) [3]. Однако фагоцитоз НС ведет к риску перегрузки цитоплазмы клеток ПЭ избытком липидов, белков и других веществ, и считается, что МТ играют роль депо этих материалов. В целом взаимодействие рецепторов ПЭ и НС важно для регенерации химических веществ, участвующих в процессе зрительного восприятия. При этом МТ принадлежит значимое место в этом круговороте.

Целью нашей работы являлось установление характерных особенностей ПЭ желтой пеструшки. Особое внимание обращалось на взаимодействие НС сетчатки и клеток ПЭ и образование МТ (большой интерес для нас представляют малоизученные начальные стадии образования МТ).

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Животных, полученных из виварной культуры Московского зоопарка (из числа животных, подлежавших выбраковке по показаниям, не имеющим отношения к их глазам), умерщвляли летальной дозой уретана.

Для световой микроскопии делали перфузию глаз 1% раствором параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7.2-7.4) с помощью шприца еще до экстирпации из головы. Это предохраняет сетчатку и ПЭ, крайне мягких у пеструшки и других полевок в отличие от крыс и мышей, от превращения в бесформенный комок. После дополнительной фиксации передние среды удаляются, а глазной бокал используется для дальнейшей препаровки.

Для электронной микроскопии препаровку глаза предваряли перфузией 2.5% раствором глутарового альдегида, приготовленного на 0.1 М Na-какодилатном буфере, с помощью шприца. Фиксацию (в течение 1 ч при 4°С) осуществляли также 2.5% раствором глутарового альдегида, приготовленном на 0.1 М Na-какодилатном буфере (pH 7.2), содержавшем 3% сахарозы. Затем материал фиксировали в 1% OsO_4 (pH 7.2) в том же буфере в течение 1 ч при 4°С. Материал обезвоживали в этиловом спирте возрастающей концентрации, абсолютном спирте и ацетоне и заключали в смесь эпон-аралдита. Срезы окрашивали уранил-ацетатом и цитратом свинца. Просмотр срезов делали на электронном микроскопе "JEM 100 SX" при ускоряющем напряжении 90 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Световая микроскопия. Максимальный диаметр глаза пеструшки равен 6 мм, максимальное (горизонтальное) протяжение сетчатки — 10 мм, а площадь составляет 55-57 мм². Естественная окраска ПЭ желтой пеструшки намного слабее практически черной окраски у мыши или лягушки. Клетки ПЭ не образуют четкой гексагональной мозаики, их большинство содержит два (реже три и четыре) ядра. Ядра округлой формы прилежат вплотную к базальной мембране [2].

Электронная микроскопия. Организация клеток ПЭ желтой пеструшки в целом сходна с таковой других грызунов. Это выраженная полярность клеток: плоская базальная сторона и крайне сложная апикальная, обращенная к фоторецепторам. Многочисленные митохондрии локализованы преимущественно вокруг ядра и в центре клетки. Глубокие впячивания базальной стороны цитомембраны в зоне контакта с мембраной Бруха свидетельствуют об интенсивности обменных процессов клеток ПЭ. На линии контакта соседних клеток наблюдаются межклеточные соединительные структуры — десмосомы.

Для выявления МТ в клетках ПЭ была установлена последовательность попадания отделившегося наружного сегмента в цитоплазму клеток ПЭ. Пограничная зона, в которую входят НС сетчатки и апикальная зона клетки ПЭ, представлена на рисунке 1, *а*. Отделившийся НС прежде всего попадает в апикальную часть ПЭ, для которой характерна особая структура цитоплазмы: наблюдается присутствие сильно развитого тубулярного эндоплазматического ретикулума (ЭР; рис. 1, *б*) и цитоплазмы более электронно-плотной, чем в других участках клетки ПЭ, с отходящими от нее отростками, направленными в сторону НС сетчатки (рис. 3, *б*). Содержимое отростков по своей структуре совпадает с цитоплазмой апикальной зоны. По своей структуре отростки похожи на такие же выросты клеток ПЭ белой крысы [5]. Отделившийся фрагмент НС, попавший в апикальную часть клетки ПЭ (рис. 1, *в*), подвергается переработке в образующейся фагосоме (рис. 1, *г*), в результате чего высвобождаются белки, липиды и другие вещества. Клетка

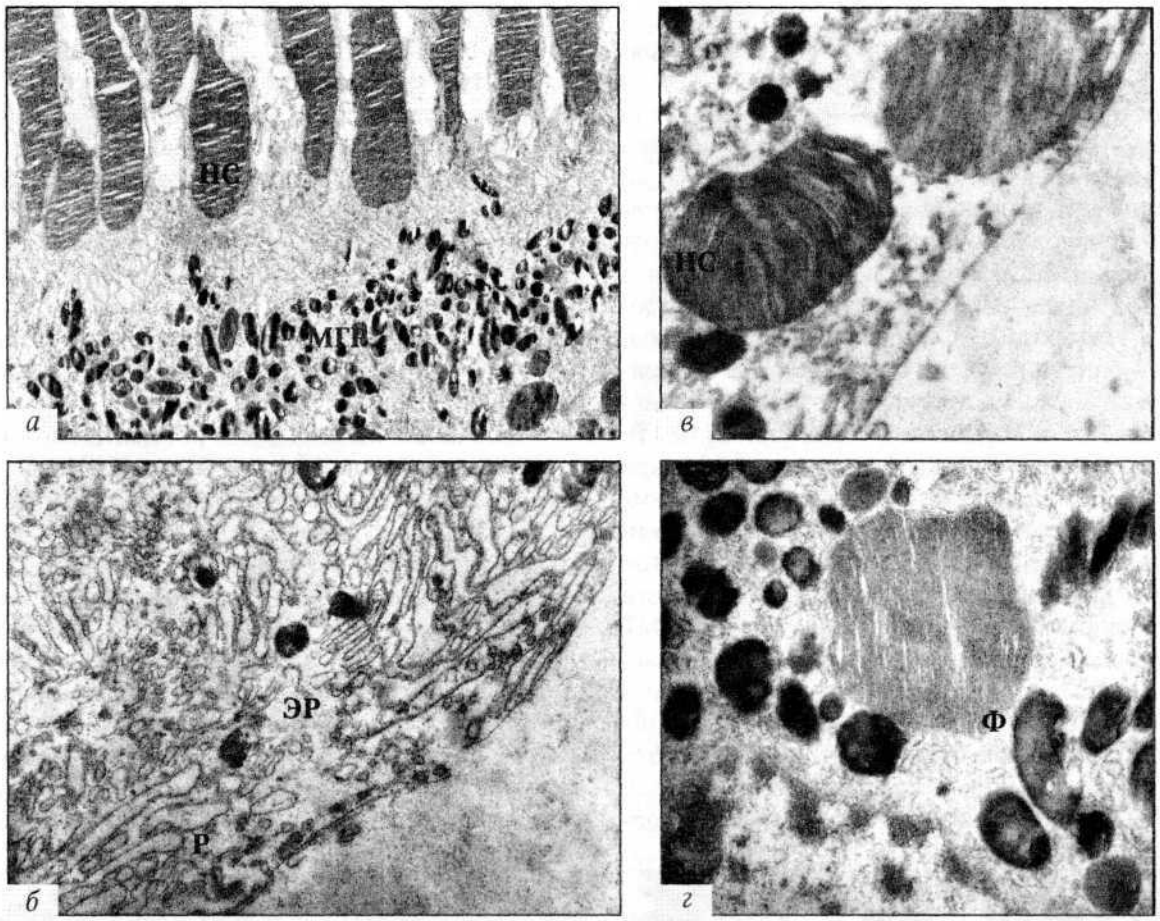


Рис. 1. Пограничная зона между НС сетчатки и клетками ПЭ, ×15 000 (*а*), ×22 000 (*б*), ×45 000 (*в*), ×60 000 (*г*). *а* — НС, прилегающий тубулярный ЭР и часть клетки ПЭ с меланиновыми гранулами (МГР); *б* — апикальный край клетки ПЭ: тубулярный ЭР, рибосомы на наружной мембране тубул (Р); *в* — два отщепленных НС в апикальной зоне цитоплазмы ПЭ; *г* — фагосома (Ф) в клетке ПЭ.

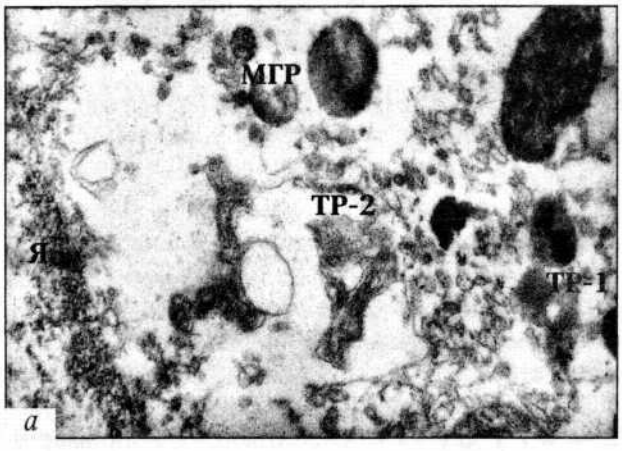
ПЭ отвечает на это формированием МТ, как это показано в ряде работ, выполненных на других млекопитающих [4,5,7,9].

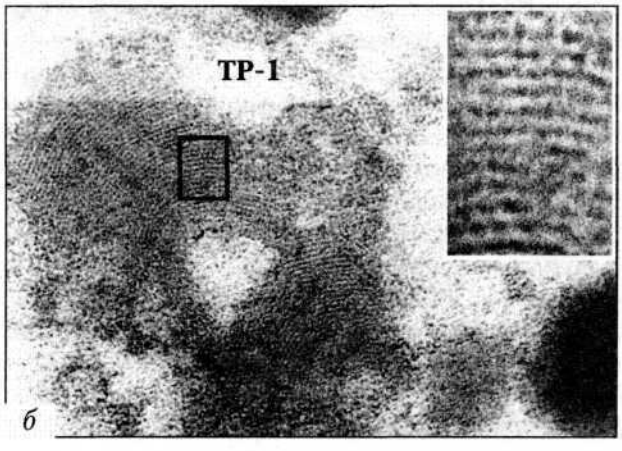
В нашей работе показано формирование начальных и промежуточных стадий МТ у желтой пеструшки (рис. 2). Этот процесс, как и у других позвоночных, происходит на основе гладкого эндоплазматического ретикулума (ЭР). Однако у пеструшки мы обнаружили некоторые особенности образования МТ. На первой стадии образования МТ (рис. 2, *а*, ТР-1) при большом увеличении (от 250 тысяч и выше; рис. 2, *б*) наблюдается параллельное расположение очень тонких, электронно-плотных линий, образование которых, по-видимому, тесно связано с мембранами ЭР. Совокупность этих линий идет или параллельно одной из сторон наблюдаемого в центре треугольника, или окружает его. Период расположения линий составляет ~4.2 нм. На вставке при очень большом увеличении (1 000 000) период виден очень четко. На второй стадии формирования МТ (рис. 2, *а*, *в*, ТР-2) можно видеть образование уже более грубых, вытянутых параллельно друг другу структур с периодом ~13.3 нм в сочетании с ЭР, которые похожи на структуры, формирующие МТ у других млекопитающих, например у белки [9]. Практически сформированное МТ с периодом ~23 нм локализуется среди меланиновых гранул в центре клетки (рис. 3, *а*). "Зрелое" МТ почти не отличается от меланиновых гранул по размеру, но отличается по форме: меланиновые гранулы похожи на веретена, а МТ остается больше похожим на треугольник. МТ при большем увеличении с периодичностью ~23 нм представлено на рисунке 3, *б*.

Следует отметить, что накопилось достаточно данных, касающихся формирования, структуры и функции МТ. Так, их появление в цитоплазме ПЭ связано с темновым, а не световым периодом суточного цикла [9]. Известно также, что МТ

удаляются из цитоплазмы ПЭ метаболическими процессами, которые активны всегда, но ускоряются при повышении температуры и в присутствии света [13]. Согласно данным [3,4], появлению МТ предшествует формирование плоских цистерн ЭР, являющихся как бы шаблоном для укладки липидов, накапливающихся в клетке ПЭ в результате переработки отщепленных НС. Эти преобразованные структуры ЭР увеличиваются в размере и числе по мере поступления переработанного материала НС: прежде всего липидов, а также белков и других соединений. В литературе по этому вопросу причастность МТ к липидному обмену не подвергается сомнению [10,11]. Тонкости ультраструктуры МТ меняются по мере их развития и зависят от участия специфических липидов, которые могут отличаться у разных животных [10-12]. Перегрузка цитоплазмы клеток ПЭ избытком липидов, белков и других веществ ведет к формированию МТ. Таким образом, МТ как бы защищает клетки от этой избыточной массы, одновременно играя роль депо тех материалов, которые клетки ПЭ поставляют палочкам для построения новых дисков. В нашей работе были выявлены новообразованные структуры, которые не упоминаются в имеющейся литературе и, предположительно, могут рассматриваться как последовательные начальные стадии формирования МТ. Так, в районах присутствия ЭР мы наблюдали структуры, имеющие треугольные очертания. В таких треугольниках при достаточно большом увеличении видна тонкая периодичность с интервалом ~4.2 нм. Наблюдающийся второй треугольник — подобие первого, имеет уже другую периодичность — ~13.3 нм. Возможно, что средняя промежуточная стадия похожа на типичные снимки формирующихся МТ белки [9]. Уже сформированное МТ в нашей работе имеет период ~23 нм.

Образование МТ можно рассматривать как защитную реакцию клеток ПЭ на избыток липидов, высвобождающихся из фагосом [6]. Это дает основание полагать, что МТ принимают участие в круговороте липидов [5,10], сначала накапливая и сохраняя их избыток, а затем по мере надобности отдавая их сетчатке через апикальные отростки; в пользу этого говорит электронная плотность цитоплазмы в отростках. Постоянный круговорот липидов вследствие шеддинга НС и их переработки в цитоплазме ПЭ с последующим образованием МТ, по-видимому, необходим для формирования новых дисков НС в зоне контакта





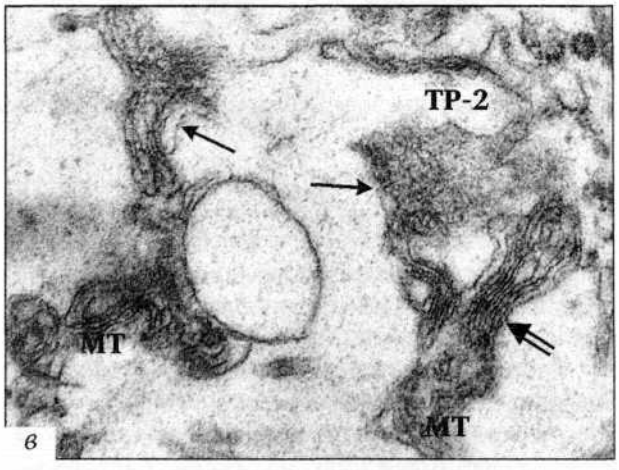
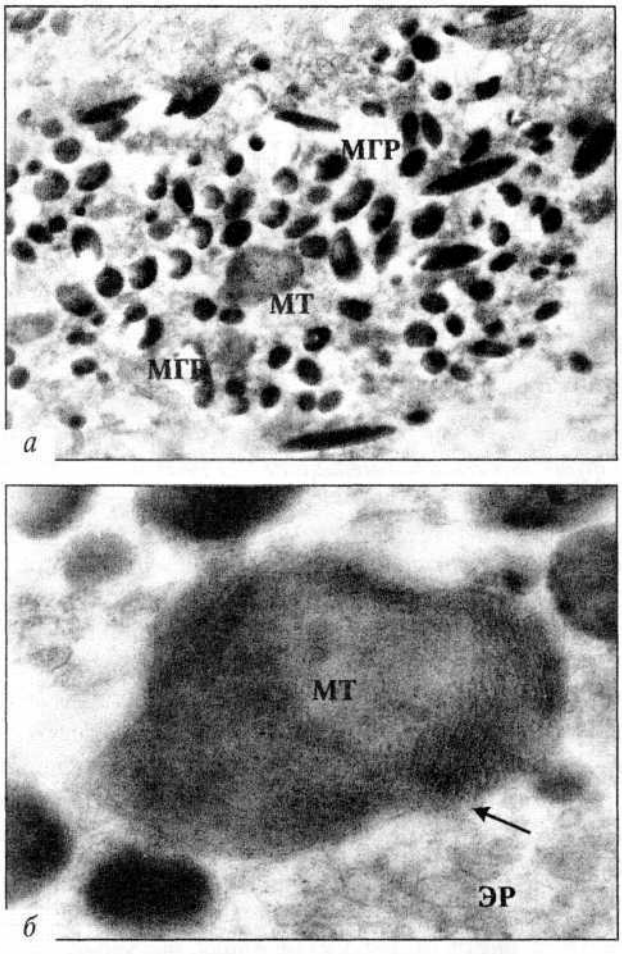


Рис. 2. Образование МТ, ×20 000 (*а*), ×40 000 (*б*), ×250 000 (*в*).
а — первая стадия: треугольник (ТР-1) и вторая стадия (ТР-2) образования МТ; *б* — ТР-1 при большом увеличении: видна тонкая периодичность (рамка) ~4.2 нм; вставка — тот же период, выделенный в рамке, при увеличении 1 000 000; *в* — вторая стадия формирования МТ при большом увеличении: цистерны гладкого ЭР (стрелки), плотная укладка липидных мембран на цистернах ЭР с периодом ~13.3 нм (двойная стрелка).



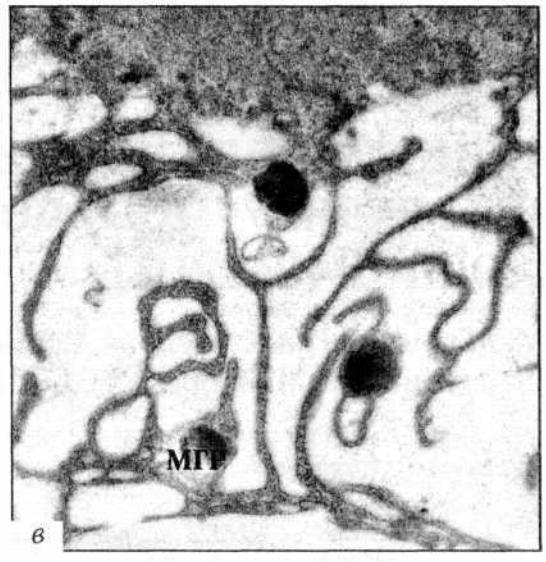


Рис. 3. Сформированное МТ, ×9600 (*а*), ×57 500 (*б*), ×36 000 (*в*).
а — МТ в центре клетки среди меланиновых гранул (МГР) при малом увеличении, *б* — МТ при большом увеличении, видна периодичность ~23 нм (стрелка), *в* — апикальный край клетки ПЭ: электронно-плотная цитоплазма с отростками и включением в них меланиновых гранул (МГР).

наружного и внутреннего сегментов [6]; какие-либо отклонения в этом цикле нарушают работу сетчатки. Известно, что для формирования новых дисков нужны полиненасыщенные жирные кислоты с длинными цепями, которые доставляются именно МТ [3]. Формирование МТ связывается с защитой цитоплазмы клеток ПЭ от избыточной и опасной концентрации не только липидов, но и ретиноидов [11]. В нашей работе различие величины периода может свидетельствовать о различии упаковки липидных молекул на последовательных стадиях формирования МТ. Заметим, что форма "треугольника" сохраняется даже в уже сформированном МТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Давыдова Т.В.* // Цитология. 1985. Т. 27, № 5. С. 523-527.
2. *Орлов О.Ю., Подгорный О.В.* // Сенсорные системы. 2009. Т. 23, № 4. С. 318-326.
3. *Abran D., Dickson D.H.* // Cell Tissue Res. 1992. Vol. 268, N 3. P. 531-538.
4. *Dickson D.H., Harvey H.L.* // Curr. Eye Res. 1992. Vol. 11, N 2. P. 147-152.
5. *Dowling J.E., Gibbons I.R.* // J. Cell Biol. 1962. Vol. 14, N 3. P. 459-474.
6. *Cai F., Dickson D.H.* // Curr. Eye Res. 1993. Vol. 12, N 1. P. 61-68.
7. *Nilsson S.E.* // Acta Ophthalmol. (Copenh). 1978. Vol. 56, N 6. P. 883-900.
8. *Porter K., Yamada E.* // J. Biophys. Biochem. Cytol. 1960. Vol. 8, N 1. P. 181-205.
9. *Tabor G.A., Fisher S.K.* // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1983. Vol. 24, N 3. P. 388-391.
10. *Yorke M.A., Dickson D.H.* // Cell Tissue Res. 1984. Vol. 235, N 1. P. 177-186.
11. *Yorke M.A., Dickson D.H.* // Cell Tissue Res. 1985. Vol. 240, N 3. P. 641-648.
12. *Yorke M.A., Dickson D.H.* // Cell Tissue Res. 1985. Vol. 241, N 3. P. 623-628.
13. *Young R.W., Bok D.* // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1970. Vol. 9, N 7. P. 524-536.

Получено 29.11.12