

УДК 616.8-091.81:611.89:611.843.1-612.013

**ЦИТОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГАНГЛИОЗНЫХ НЕЙРОНОВ СЕТЧАТКИ ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ АПОПТОЗА****Каминский Ю.В., Матвеева Н.Ю., Калининченко С.Г.***ГБОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет»**Минздравсоцразвития Российской Федерации, Владивосток, e-mail: nymatveeva@mail.primorye.ru*

С помощью гистохимической реакции по Фельгену-Россенбекку и иммуноцитохимического метода TUNEL изучен ганглиозный слой сетчатки на разных стадиях апоптотического процесса в эмбриогенезе человека. Получены данные о качественных и количественных изменениях ганглиозных клеток, выделены два периода активной клеточной гибели, описаны структурные признаки апоптоза нейронов. К моменту рождения ганглиозные клетки достигают полной морфологической зрелости. Их положение неравномерно в различных зонах сетчатки и уменьшается от центра к периферии. Самые высокие показатели апоптотического индекса регистрировались в конце III триместра. Определена локализация TUNEL-позитивных нейронов преимущественно в наружном подслое ганглиозного слоя. Обсуждается роль апоптоза в поддержании гистогенетического постоянства ганглиозного слоя, его участие в отборе и элиминации избыточно образованных нейронов и нейрогенезе.

**Ключевые слова:** сетчатка, ганглиозные нейроны, апоптоз, нейрогенез сетчатки человека**CYTOMETRIC CHARACTERISTIC OF GANGLION NEURONS IN THE RETINA OF THE HUMAN FETAL EYE ON THE DIFFERENT STAGES APOPTOSIS****Kaminsky Y.V., Matveeva N.Y., Kalinichenko S.G.***Vladivostok State Medical University, Vladivostok, e-mail: nymatveeva@mail.primorye.ru*

Applying histochemical reactions on Felgen-Rossenbekk and immunocytochemical staining TUNEL in the retina of human fetuses collected during the first to third trimesters of pregnancy were studied. The data about qualitative and quantitative changes ganglion cells is obtained, the periods of active cellular destruction are allocated, and structural signs apoptosis neurons are described. TUNEL-immunopositive neuron nuclei with signs of apoptotic destruction were seen at 30–31 weeks of pregnancy. The greatest apoptotic index was seen in the ganglion cell population in the third trimesters of pregnancy. The role apoptosis in maintenance histogenesis a constancy ganglion a layer is discussed, its participation in selection and elimination is superfluous formed neurons and neurogenesis.

**Keywords:** retina, ganglion cells, apoptosis, human retinal neurogenesis

Ганглиозные клетки – эффекторные элементы сетчатки, транслирующие нервный импульс в зрительные центры мозга. В эмбриогенезе ганглиозные клетки дифференцируются первыми, а как самостоятельная структура, ганглиозный слой обособляется на 13-й неделе развития [3, 9]. В развивающейся сетчатке закладывается избыточное количество нейронов, основная масса которых подвергается апоптозу. Так, у плодов человека популяция ганглиозных клеток составляет 2,2–2,5 миллиона на 18–30 неделях развития, а к моменту рождения их количество снижается до 1,5–1,7 миллиона [13]. У человека пик физиологической гибели нейронов приходится на третий триместр беременности и именно в этот период происходит становление основного порядка внутри- и межслойных связей между локальными нейронами сетчатки [5, 8].

Цель настоящей работы состояла в исследовании количественных показателей популяционного состава ганглиозного слоя сетчатки на разных стадиях апоптотического процесса в эмбриогенезе человека.

**Материал и методы исследования**

Исследовали сетчатку 6 глаз от трех плодов человека 11–12 недель развития, 5 глаз от трех плодов 20–21 недель развития и 2 глаз от одного плода 30–31 недель развития. Плоды I триместра беременности

получали при медицинских абортках, II триместра – в результате самопроизвольного выкидыша и аборта, проведенного по медицинским показаниям (экстрагениальное заболевание матери), III триместра – в результате интранатальной смерти плода (асфиксия) без врожденных пороков развития.

Глаз извлекали на стекло, промывали дистиллированной водой и разрезали по лимбу. После удаления стекловидного тела сетчатку отделяли от задней стенки глаза с помощью кисти и стеклянных палочек, помещали в холодный 4% раствор параформальдегида, приготовленного на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) и фиксировали в течение 3–4 ч при 4 °С.

В качестве специфической пробы на ДНК использовали метод Фельгена и Россенбекка. Исследования проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином и по методу Ниссля. Апоптоз изучали с помощью иммуноцитохимического метода TUNEL, основанного на выявлении фрагментированных цепочек ДНК [11].

Апоптотический индекс (АИ) определяли как отношение общего числа TUNEL-позитивных ядер ( $N_{TUNEL}$ ) к количеству клеток, окрашенных толуидиновым синим и имеющих видимое непикнотизированное ядро ( $N_T$ ) по формуле  $АИ = (N_{TUNEL} \times 100) / N_T$  [2]. Данные обрабатывали методом вариационной статистики. Различия оценивали по критерию Стьюдента и считали значимыми при  $P < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение**

Ганглиозный слой сетчатки человека дифференцируется на 13-й неделе беременности. К моменту рождения ганглиозные

клетки достигают полной морфологической зрелости. Их положение неравномерно в различных зонах сетчатки и уменьшается от центра к периферии. В течение плодного периода она неизменно снижается (таблица). В I триместре (10–11 неделя) преобла-

дают клетки с четко дифференцированным округлым ядром, содержащим конденсированный хроматин. Также встречаются ядра с нарушением структуры и локализации хроматина. Среди них можно выделить четыре основных типа.

Морфологическая характеристика ганглиозного слоя сетчатки человека

Триместры	Плотность расположения ганглиозных клеток в 1 мм <sup>2</sup>		Ширина ганглиозного слоя (мкм)*	Апоптотический индекс (%) **
	центральная сетчатка	периферическая сетчатка		
I	683 ± 18	394 ± 11	199,4 ± 6,1	1,31 ± 1,3
II	537 ± 12	213 ± 12	127,9 ± 4,9	2,23 ± 1,1
III	371 ± 11	109 ± 5	79,3 ± 3,72	4,04 ± 1,2

**Примечания:**

\* – данные относятся к среднепериферической части сетчатки;

\*\* – данные относятся к центральной части сетчатки.

Первый тип клеток содержит интенсивно окрашенные глыбки хроматина, локализованные на полюсах ядра, при этом центральная часть ядра оставалась светлой. У второго типа клеток ядра светлые, набухшие, содержат слабо базофильный диспергированный хроматин. Ядра третьего типа имеют хорошо контурированную кариолемму и редкие мелкодисперсные зерна хроматина по ее периметру. Центральная часть ядра выглядит оптически пустой. Ядра четвертого типа пикнотические, интенсивно базофильные, с плотным хроматином, занимающим все ядро. Такие ядра встречались очень редко.

При реакции на ДНК по методу Фельгена-Россенбекка ядра с четкими границами и различной плотностью хроматина встречались реже, чем на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. При этом в одних ядрах хроматин в виде глыбок лежал на полюсах, в других – распределялся более или менее равномерно по всей кариоплазме. Встречались ядра, где хроматин занимал часть ядра и располагался в виде полулуний.

Ширина ганглиозного слоя колебалась в пределах 79,69–349,36 мкм и в среднем составляла 199,44 ± 6,1 мкм. Подсчет концентрации клеточных элементов на 1 мм<sup>2</sup> показал, что при реакции на ДНК их количество составило 312 ± 9. У плодов II триместра (20–21 неделя) при окраске гематоксилином и эозином в ганглиозном слое встречались клетки с округлыми и овальными ядрами неодинаковой величины и с разной плотностью хроматина. По сравнению с I триместром количество нейронов в ганглиозном слое значительно сократилось. У некоторых нейронов ядра довольно крупные, округлые, с низкой плотностью хроматина. Изредка регистрировались клетки с набухшими ядрами и со значительным содержанием мелкодисперсного хроматина.

При окраске по методу Фельгена и Россенбекка ДНК-позитивные структуры располагались вдоль ядерной мембраны в виде кольца или полукольца. В некоторых клетках конденсированный хроматин занимал всю площадь ядра. Ширина ганглиозного слоя составляла 65,49–272,4 мкм, в среднем 127,9 ± 4,98 мкм, а концентрация клеток на 1 мм<sup>2</sup> – 192 ± 8. У плодов III триместра (30–31 неделя) при окраске гематоксилином и эозином в ганглиозном слое идентифицировались клетки с различной плотностью хроматина. При реакции на ДНК ганглиозный слой содержал клетки с мелкими гиперхромными и с крупными гипохромными ядрами. Ширина слоя колебалась в пределах 49,36–131,8 мкм и в среднем составляла 79,3 ± 3,72 мкм. Концентрация клеток на 1 мм<sup>2</sup> – 108 ± 6 ядер.

На наших препаратах среди большинства нормальных ядер, содержащих равномерно рассеянный мелкозернистый хроматин, мы наблюдали ядра с нарушенной структурой и локализацией. В одних ядрах хроматин был собран в грубые глыбки, находящиеся на его полюсах. В других ядерный хроматин формировал сплошное кольцо по периметру кариолеммы. Центральная часть ядра выглядела оптически пустой. Встречались пикнотические ядра с конденсированным хроматином. Подобные изменения характеризовали раннюю стадию апоптоза. Также мы наблюдали апоптотические тельца, свидетельствующие о завершении процесса.

Активность апоптоза не одинакова на разных стадиях развития сетчатки. Самые высокие показатели апоптотического индекса регистрируются на 30-й неделе пренатальной жизни (см. таблицу). TUNEL-позитивные нейроны локализуются преимущественно в наружном подслое ганглиозного слоя, иногда объединяются в кластеры из 2–3 ядер. В глубоком подслое

ганглиозного слоя TUNEL маркирует очень редкие единичные ядра апоптотических клеток. В этом случае ядра апоптотических нейронов выглядят как интенсивно окрашенные точки, которые, сливаясь, образуют кольца, полукольца, а также сплошные однородные конгломераты.

### Заключение

В сетчатке человека выделяют два периода клеточной гибели. Первый период устанавливается на 14–16 день эмбриогенеза и совпадает с началом пролиферации, миграцией нейронов и прорастанием их первичных отростков [4, 6]. У мышей, по данным Valenciano с соавт. [14], это происходит на 15–17 день эмбриогенеза. Второй период естественной (физиологической) гибели нейронов сопряжен с анатомической перестройкой локальных систем нейрорегуляции между сетчаткой и ядрами мозгового ствола, а также переводом «молчащих» синапсов в функционирующие [7, 10].

Апоптоз синхронизирован с пролиферацией и миграцией постмитотических нейронов [12]. В плодном и постнатальном периодах развития апоптоз обусловлен специализацией синаптических мишеней и рассматривается как элемент пластичности формирующихся нервных связей [2, 7, 13]. Наши наблюдения показали, что количество апоптотических клеток преобладает в третьем триместре. Активация апоптоза перед рождением, очевидно, связана с развитием конкурентных отношений между развивающимися нейронами при формировании синапсов, то есть, нейроны, не способные устанавливать связи, подвергаются гибели [1, 7, 15].

Таким образом, созревание ганглиозных клеток включает период значительной апоптотической гибели, которую можно рассматривать как стадию развития сетчатки человека. Как основной механизм поддержания гистогенетического постоянства ганглиозного слоя, апоптоз обеспечивает отбор и элиминацию избыточно образованных нейронов, сокращает их содержание до физиологической нормы, способствует адекватному нейрогенезу, обеспечивает формирование дефинитивных нейронов и селекционирование межнейронных связей.

### Список литературы

1. Калиниченко С.Г., Матвеева Н.Ю. Морфологическая характеристика апоптоза и его значение в нейрогенезе // *Морфология*. – 2007. – Том 131, № 2. – С. 16–28.
2. Лущников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). – М.: Медицина, 2001. – 190 с.
3. Матвеева Н.Ю. Ультраструктурная характеристика апоптоза ганглиозных клеток сетчатки плодов человека // *Тихоокеанский медицинский журнал*. – 2004. – № 3. – С. 21–23.
4. Роль оксида азота в апоптозе нейронов сетчатки глаза плодов человека / Н.Ю. Матвеева, С.Г. Калиниченко, И.И. Пушин, П.А. Мотавкин // *Морфология*. – 2006. – Т. 129, № 1. – С. 42–49.
5. Матвеева Н.Ю. Апоптоз и оксид азота в развитии нейронов сетчатки. – Владивосток: Медицина ДВ, 2006. – 216 с.

6. Школьник-Ярос Е.Г., Калинина А.В. Нейроны сетчатки. – М.: «Наука», 1986. – 204 с.

7. Adler R. Challenges in the study of neuronal differentiation: a view from the embryonic eye // *Dev. Dyn.* – 2005. – Vol. 234. – P. 454–463.

8. Buss R.R., Sun W., Oppenheim R.W. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2006. – Vol. 29. – P. 1–35.

9. Cellerino A., Bähr M., Isenmann S. Apoptosis in the developing visual system // *Cell Tissue Res.* – 2000. – Vol. 301. – P. 53–69.

10. Farah M.H. Neurogenesis and cell death in the ganglion cell layer of vertebrate retina // *Brain Res. Rev.* – 2006. – Vol. 52. – P. 264–274.

11. Guerin M.B., Mckernan D.P., O'Breien C.J., Cotter T.G. Retinal ganglion cells: dying to survive // *Int. J. Dev. Biol.* – 2006. – Vol. 50. – P. 665–674.

12. Lossi L., Merighi A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS // *Progr. In Neurobiol.* – 2003. – Vol. 69. – P. 287–312.

13. Martinez-Morales J.R., Wittbrodt J. Shaping the vertebrate eye // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2009. – Vol. 19. – P. 511–517.

14. Valenciano A.I., Boya P., De La Rosa E.J. Early neural cell death: numbers and cues from the developing neuroretina // *Int. J. Dev. Biol.* – 2009. – Vol. 53. – P. 1515–1528.

15. Vecino E., Hernández M., Garcia M. Cell death in the developing vertebrate retina // *Int. J. Dev. Biol.* – 2004. – Vol. 48. – P. 965–974.

### References

1. Kalinichenko S.G., Matveeva N.Ju. Morfoloģicheskaĭa karakteristika apoptoza i ego znachenie v nejroģeneze // *Morfologija*. – 2007. – Tom 131, no. 2. pp. 16–28.

2. Lushnikov E.F., Abrosimov A.Ju. Gibel' kletki (apoptoz). M.: Medicina, 2001. 190 p.

3. Matveeva N.Ju. Ul'trastruktural'naja karakteristika apoptoza ganglioznyh kletok setchatki plodov cheloveka // *Tihookeanskij medicinskij zhurnal*. 2004. no. 3. pp. 21–23.

4. Matveeva N.Ju., Kalinichenko S.G., Puwin I.I., Motavkin P.A. Rol' oksida azota v apoptoze neyronov setchatki glaza plodov cheloveka // *Morfologija*. 2006. Tom 129, no. 1. pp. 42–49.

5. Matveeva N.Ju. Apoptoz i oksid azota v razvitii neyronov setchatki. – Vladivostok: Medicina DV, 2006. 216 p.

6. Shkol'nik-Jarros E.G., Kalinina A.V. Nejrorny setchatki. M.: «Наука», 1986. 204 p.

7. Adler R. Challenges in the study of neuronal differentiation: a view from the embryonic eye // *Dev. Dyn.* 2005. Vol. 234. pp. 454–463.

8. Buss R.R., Sun W., Oppenheim R.W. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development // *Annu. Rev. Neurosci.* 2006. Vol. 29. pp. 1–35.

9. Cellerino A., Bähr M., Isenmann S. Apoptosis in the developing visual system // *Cell Tissue Res.* 2000. Vol. 301. pp. 53–69.

10. Farah M.H. Neurogenesis and cell death in the ganglion cell layer of vertebrate retina // *Brain Res. Rev.* 2006. Vol. 52. pp. 264–274.

11. Guerin M.B., Mckernan D.P., O'Breien C.J., Cotter T.G. Retinal ganglion cells: dying to survive // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. Vol. 50. pp. 665–674.

12. Lossi L., Merighi A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS // *Progr. In Neurobiol.* 2003. Vol. 69. pp. 287–312.

13. Martinez-Morales J.R., Wittbrodt J. Shaping the vertebrate eye // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2009. Vol. 19. pp. 511–517.

14. Valenciano A.I., Boya P., De La Rosa E.J. Early neural cell death: numbers and cues from the developing neuroretina // *Int. J. Dev. Biol.* 2009. Vol. 53. pp. 1515–1528.

15. Vecino E., Hernández M., Garcia M. Cell death in the developing vertebrate retina // *Int. J. Dev. Biol.* 2004. Vol. 48. pp. 965–974.

### Рецензенты:

Дюйзен И.В., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологии Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток;

Евдокимов В.В., д.б.н., профессор, заведующий сектором размножения промысловых гидробионтов ТИНРО-центра, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 06.06.2012.