

ЛАМЕЛЛЯРНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГРЫЗУНОВ С ДНЕВНЫМ ТИПОМ СУТОЧНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2015 г. Н.В. Самосудова, О.Ю. Орлов, С.А. Гольшев*

*Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН,
127051, Москва, Большой Каретный пер., 19/1*

E-mail: nsamos@iitp.ru

**Институт физико-химической биологии им А.Н. Белозерского Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2*

E-mail: sergei.golyshov@genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 09.07.15 г.

Представлена ультраструктура пигментного эпителия полевки Брандта, грызуна с дневным типом суточной активности, соотносительно с известными процессами, происходящими в пигментном эпителии: 1) поступлением отделенных от фоторецепторных мембран наружных сегментов и 2) перевариванием их в фагосомах пигментного эпителия. Для выявления миелоидных тел была использована фаза смены светового режима: световой (200 лк, 4 ч) на темновую (0,1 лк, 1,5 ч). В цитоплазме пигментного эпителия полевки миелоидные тела не были найдены, однако были обнаружены так называемые ламеллярные включения, которые по своим размерам отличаются от миелоидных тел. Описана их структура, даны размеры (от 200 до 400 нм) и местоположение. Кроме того, выявлено наличие структур, предположительно отвечающих за транспорт переработанного материала. В пользу этого свидетельствует присутствие в апикальных отростках: 1) пигментного эпителия пузырьков с плотным, зернистым содержимым и 2) микротрубочек, осуществляющих транспорт «груза» в клетках.

Ключевые слова: пигментный эпителий сетчатки, мультиламеллярные включения, внутриклеточный транспорт, пузырьки, микротрубочки.

Пигментный эпителий (ПЭ), располагающийся между сетчаткой и хороидом, представляет собой монослой, состоящий, как и сетчатка, из клеток нейроэктодермального происхождения. Он выполняет множество функций, которые весьма существенны для работы сетчатки глаза в целом. Прежде всего, это транспорт электролитов и воды из сублатерального пространства в хороид, а также доставка глюкозы, аскорбиновой кислоты, ретинола, жирных кислот и ДНК к фоторецепторам, что важно для зрительной функции. Разные вещества переносятся разными транспортерами. К другим функциям, которые выполняет ПЭ, относятся: абсорбция света и защита сетчатки от фотоокисления; секреция нужных веществ для структурной целостности сетчатки; фагоцитоз отщепленных фоторецепторных мембран. По сути дела ПЭ является гематоретинальным барьером [1,2], который осуществляет контроль поступающих жидкостей, стабилизирует ионный состав в области фоторецепторов, что существен-

но для фоторецепторной возбудимости. Таким образом, ПЭ играет главную роль в поддержании нормальных функций сетчатки. Как транспортная функция ПЭ, так и фагоцитоз относятся к теме настоящей статьи, которая является продолжением нашей предыдущей работы [3], также касающейся зрения грызуна с дневным типом суточной активности (желтой пеструшки). Следует отметить, что этот тип зрения сходен с типом зрения человека.

Процесс регулярного отчленения пачек дисков наружных сегментов и переваривание их в фагосомах происходит в связи с суточным циклом светового режима и последующей транспортировкой внутрь клеток ПЭ. В цитоплазме ПЭ отчлененные наружные сегменты перевариваются в образующихся фагосомах с участием лизосомальных ферментов – кислой фосфатазы [4] и ферментов пероксисом [5]. Переработанный материал (в виде липидов и белков) подлежит обратной транспортировке из клеток ПЭ к фоторецепторам для образования новых дисков в основании наружных сегментов. Отдельные фазы этого цикла разнесены во времени, поэтому одной из проблем ПЭ является временное депониро-

Сокращение: ПЭ – пигментный эпителий.

вание продуктов фагоцитоза, а именно значительной массы липидной фракции в соответствии с доминированием этого основного компонента клеточных мембран. В клетках ПЭ низших позвоночных и отчасти у высших, наблюдается образование так называемых миелоидных тел, выполняющих роль структур, в которых временно депонированы липиды. Цитоплазма ПЭ млекопитающих изобилует разного рода включениями, но типичных миелоидных тел среди них фактически не найдено [6]. Поскольку липидная составляющая фагоцитоза остается главной и для млекопитающих, возникает вопрос о возможной форме временного депонирования липидов в пигментном эпителии грызунов.

В связи с этим задача данной работы состояла в поиске временных хранилищ продуктов фагоцитоза наружных сегментов: либо миелоидных тел, либо структур, эквивалентных им, при оптимальном для этой цели световом режиме эксперимента. Помимо этого, поскольку переработанный фагосомами материал наружных сегментов должен снова переправляться к фоторецепторам, возникает вопрос о его транспорте.

МЕТОДИКА

Живой материал (полевка Брандта) был отобран из животных виварной культуры. Известно, что световой режим влияет как на отделение наружных сегментов, так и на процессы, происходящие в апикальной зоне ПЭ, в частности на формирование миелоидных тел. Поэтому для повышения шансов обнаружить миелоидные тела использовали изменение светового режима: 4 ч животные находились на свету, а затем их помещали в темноту и через 1,5 ч фиксировали. Животных умерщвляли летальной дозой уретана. Затем с помощью шприца делали предварительную перфузию глаз 2,5% раствором глутарового альдегида, приготовленного на 0,1 М Na-какодилатном буфере. Это предохраняет сетчатку и ПЭ (крайне мягкие у полевок) от превращения их в бесформенный комок. После дополнительной фиксации передние среды удаляли, а глазной бокал использовали для дальнейшей обработки. Фиксацию глазного бокала (в течение 1 ч при 4°C) осуществляли также 2,5% раствором глутарового альдегида, приготовленном на 0,1 М Na-какодилатном буфере (pH 7,2), содержащем 3% сахарозы. Далее материал фиксировали в 1% OsO₄ (pH 7,2) в том же буфере, в течение 1 ч при 4°C. Материал последовательно обезжизивали в этиловом спирте возрастающей concentra-

ции, абсолютном спирте и ацетоне, а затем заключали в смесь эпон-аралдит. Срезы окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца. Просмотр срезов делали на электронном микроскопе JEM 100SX при ускоряющем напряжении 90 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В режиме изменения света на темноту пигментный эпителий грызуна был зафиксирован согласно приведенной методике. Известно [7], что миелоидные тела на свету очень быстро исчезают из цитоплазмы, поэтому многие исследователи проводили фиксацию в темноте. В нашем случае, несмотря на то что материал фиксировали в темноте, не удалось обнаружить «типичные» миелоидные тела. Однако в настоящей работе у полевки Брандта наблюдали в цитоплазме ПЭ спирально закрученные мембранные структуры с небольшим числом витков, которые напоминали мультиламеллярные тельца, ранее описанные у крыс [4].

На рис. 1а представлен общий вид среза части пигментного эпителия полевки. На нем среди меланосом видна полуразрушенная фаголизосома с двумя включениями. На рис. 1б показана та же фаголизосома при большем увеличении. В центре ее – два ламиллярных тельца. Более продвинута в своем развитии ламеллярная структура ЛТ-1. Ее образование происходит на основе мембранного материала цистерн гладкого эндоплазматического ретикулума; наложение мембран, по-видимому, осуществляется от края к центру. Второе тельце (ЛТ-2) – такое же по своей природе образование, также подтверждающее начало мембранного наложения от края к центру. При этом участие гладкого эндоплазматического ретикулума в формировании спиральной структуры подтверждает существующее в литературе представление об образовании мультиламеллярных тел на основе цистерн гладкого эндоплазматического ретикулума [8]. Размеры ЛТ-1 ~400 нм; а ЛТ-2 – ~300 нм. Рядом с ламеллярными тельцами видна лизосомальная гранула, присутствует шероховатый эндоплазматический ретикулум.

На рис. 2 показано формирование спирально закрученного ламеллярного тельца внутри вакуоли. Рис. 2а представляет общий вид цитоплазмы ПЭ: видны меланосомы, вакуоль, внутри которой происходит зарождение ламеллярного тельца (ЛТ-3). В основе его образования также гладкий эндоплазматический ретикулум, располагающийся по краю вакуоли. Из цистерн этого ретикулума образуется структура, похожая на «ленту» (рис. 2б), которая закру-

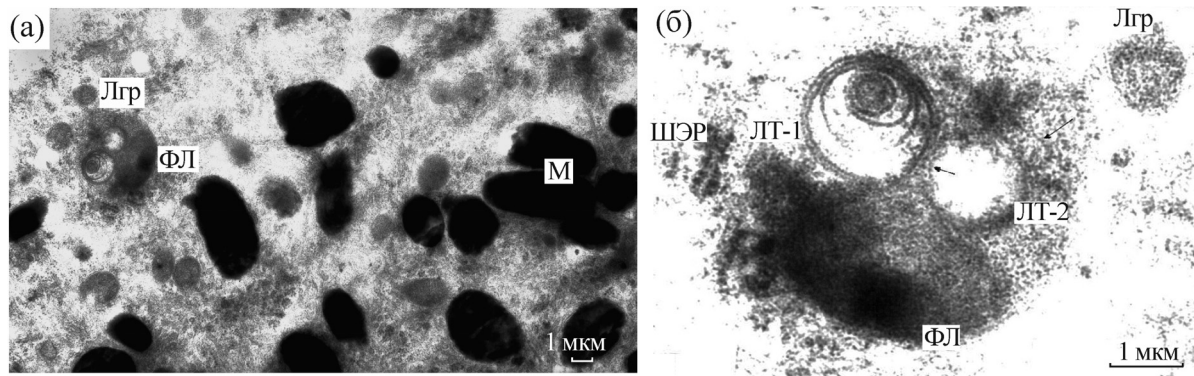


Рис. 1. Цитоплазма пигментного эпителия. (а) – Общий вид части цитоплазмы ПЭ: фаголизосома (ФЛ) с двумя ламеллярными тельцами (ЛТ), меланосомы (М), лизосомальная гранула (Лгр). (б) – Фаголизосома с ламеллярными тельцами при большем увеличении: ЛТ-1 – спиральная структура, закрученная от края к центру, размер ~ 400 нм; ЛТ-2 – начало образования спирали, размер ~300 нм. В основе спиралей – преобразованные цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума (стрелки). Рядом с фаголизомой – шероховатый эндоплазматический ретикулум (ШЭР).

чивается в спираль. Рис. 2в (при большем увеличении) также демонстрирует спираль, образующую ламиллярное тельце ЛТ-3. Размер ламеллярного тельца ~200 нм, размер вакуоли, в котором развивается ламеллярная структура, – от ~700 до 600 нм. Сравнение наших данных с литературными показывает, что у белой крысы [4] также были найдены подобные мультиламеллярные тела разной формы и размера (от 2 мкм до 400 нм в диаметре) при фиксации материала 1 ч спустя после наступления темноты.

Кроме ламеллярных телец в цитоплазме ПЭ были выявлены структуры, которые могут являться «транспортными средствами», осуществляющими перенос веществ, образующихся после переваривания наружных сегментов в фагосомах (рис. 3). Эти вещества представляют собой плотный осадок, наблюдаемый в цитоплазме апикальных отростков. Кроме того, осадок концентрируется в пузырьках, также располагающихся в апикальных отростках, где они собраны вместе и «плотно» окружены мембраной апикальных отростков, напоминая «мешки». На рис. 3а при малом увеличении видны три таких «мешка»: № 1, № 2 и № 3. В «мешке» №3 при более высоком увеличении видны пузырьки, наполненные плотным материалом; рядом с ними находятся микротрубочки. Как известно, именно микротрубочки отвечают за перенос «груза» в клетках. Возможно, что и сами пузырьки могут переносить свой груз (плотный осадок) из апикальной зоны к фоторецепторным мембранам. Их мембрана напоминает мембрану «окаймленных» везикул. Однако размер пузырьков значительно превышает размер «окаймленных» везикул. Мы полагаем, что на-

блюдаемый нами плотный, зернистый осадок в цитоплазме апикальных отростков и в пузырьках (возможно, белок) является результатом переваривания наружных сегментов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Имеющиеся сведения [9] о появлении мультиламеллярных телец в цитоплазме клеток ПЭ можно сопоставить с биохимическими данными, касающимися темного и светового периода в жизнедеятельности фоторецепторных мембран. Во время светового периода идет синтез витамина А из его альдегида [7,10]. На свету витамин А высвобождается из фоторецепторных мембран наружных сегментов и мигрирует в ПЭ, где и хранится. При этом имеет место обесцвечивание родопсина – белка, входящего в состав фоторецепторных мембран. Во время темного периода витамин А уходит обратно в фоторецепторную мембрану, где восстанавливается под воздействием света, а родопсин ресинтезируется при участии 11-*цис*-ретинала. Имеются данные о связи витамина А с образованием миелоидных тел. Показано, что при дефиците витамина А прекращается образование миелоидных тел [9]. Миелоидные тела появляются вновь после устранения дефицита витамина А.

В работах [7,11,12] было показано, что в пигментный эпителий попадают наружные сегменты как палочек, так и колбочек. При этом имеет значение фаза (светлая или темная), во время которой происходит отделение и попадание наружных сегментов в цитоплазму ПЭ. Было установлено [11], что отделение наружных сегментов палочек происходит в начале свето-

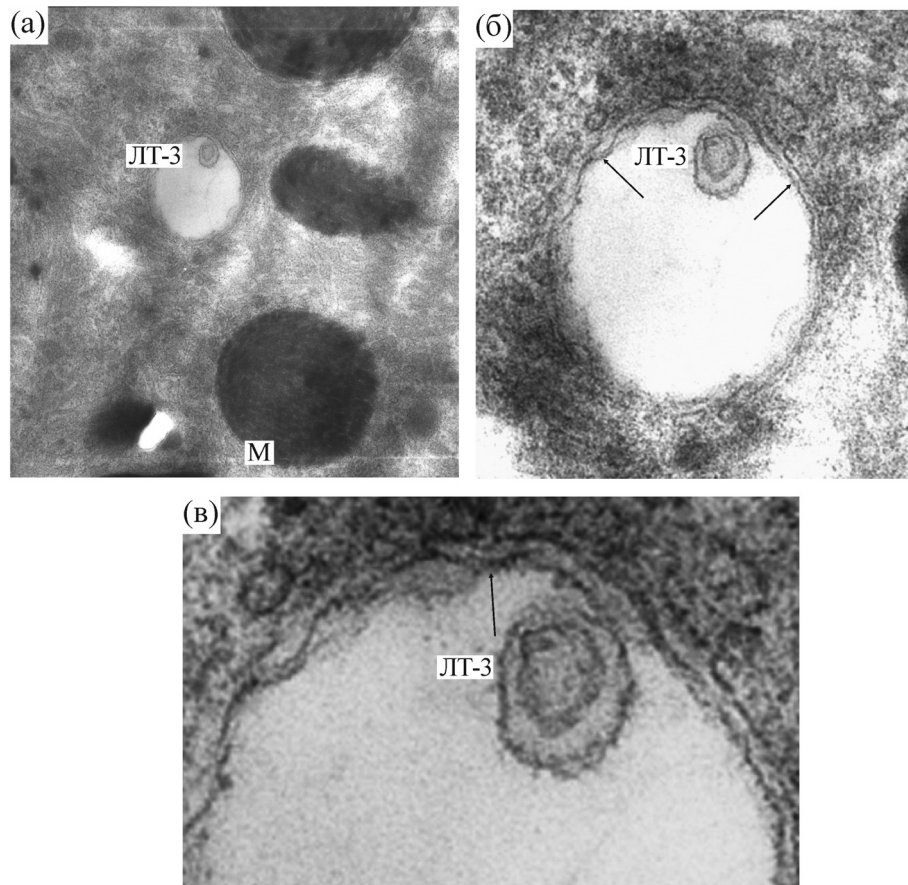


Рис. 2. Ламеллярное тельце (ЛТ-3), находящееся внутри вакуоли и связанное с внутренней частью стенки. (а) – Общий вид вакуоли с ламеллярным тельцем при малом увеличении; М – меланосомы. (б) – Начало образования спирали при большем увеличении. Стрелки указывают на образование «ленты» из цистерн гладкого эндоплазматического ретикулума. (в) – Связь ламеллярного тельца с «лентой» гладкого эндоплазматического ретикулума (стрелка); размер ЛТ-3 ~200 нм.

вого периода, а наружных сегментов колбочек – в начале темнового. Мы проводили фиксацию в начале темнового периода, спустя 1,5 ч после наступления темноты. При этом «классические» миелоидные тела обнаружены не были. Предположительно, в нашем случае отделялись именно наружные сегменты колбочек. Известно, что отделенные наружные сегменты составляют около 2% от колбочек и около 80% от палочек. Можно предположить, что после переваривания «палочковых» наружных сегментов количество липидов в цитоплазме ПЭ значительно превосходит количество белков, что, вероятно, и служит причиной появления миелоидных тел как возможных хранилищ липидов. В нашей работе обнаружение мелких ламеллярных тел может быть связано с отщеплением именно наружных сегментов колбочек и, как следствие, не с таким значительным количеством липидов в цитоплазме, которое поступает от наружных сегментов палочек и требуется для образования миелоидных тел. Од-

нако в любом варианте, даже при отщеплении наружных сегментов от колбочек, происходит их переваривание в фагосомах ПЭ и разложение на белки и липиды, которые должны где-то временно храниться. Предположительно, образующиеся ламеллярные тельца в цитоплазме ПЭ можно рассматривать как временные хранилища липидов, вместо миелоидных тел.

Полученные нами результаты можно сопоставить с данными работы [13], касающейся образования упорядоченных структур – «завитков» из «свободных» трубочек гладкого эндоплазматического ретикулума. По свидетельству авторов, эукариотические клетки способны к упорядочиванию размеров, молекулярного состава и архитектуры их мембранных органелл для скорейшей адаптации при изменении окружающей среды. Имеется в виду трансформация гладкого эндоплазматического ретикулума из сети разветвляющихся трубочек в упорядоченные мембранные образования, обозначен-

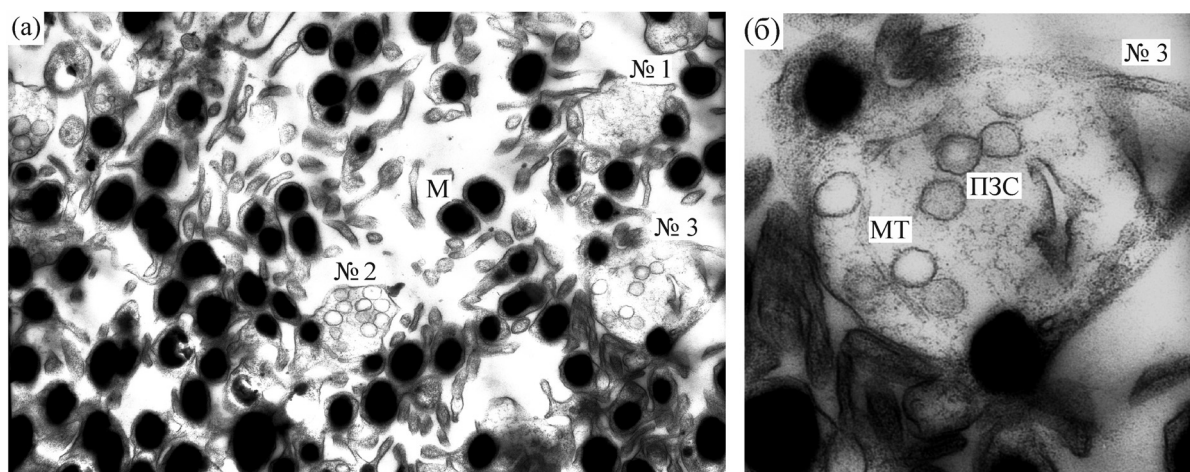


Рис. 3. Отростки апикального края цитоплазмы пигментного эпителия. (а) – Внутри отростков видны «мешки» с пузырьками (№№ 1–3), ограниченные мембраной и имеющие плотное зернистое содержимое; М – меланосомы. (б) – «Мешок» № 3 с пузырьками при большем увеличении. Пузырьки с плотным, зернистым содержимым (ПЗС); рядом с ним микротрубочки (МТ). Размер «мешка» ~ 1,7 мкм, размер пузырьков ~ от 150 до 180 нм.

ные как «организованный» гладкий эндоплазматический ретикулум. Изменения в реорганизации гладкого ретикулума могут происходить быстро в ответ на внешние воздействия. В нашем случае формирование ламеллярных структур может быть ответом на обработку наружных сегментов лизосомальными ферментами в фагосомах ПЭ и, соответственно, на появление белков и липидов в цитоплазме ПЭ. При этом, предположительно, ламеллярные тельца могут оказаться временными хранилищами липидов, которые затем переправляются к фоторецепторам, тогда как белки (в виде плотного зернистого осадка) находятся в апикальных отростках цитоплазмы ПЭ, в пузырьках и также могут транспортироваться обратно к фоторецепторам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. E. Nilsson, *Acta Ophthalmol.* **56** (4), 883 (1978).
2. R. Simo, M. Villarroel, L. Corraliza, et al., *J. Biomed. Biotech.* **2010**, 1 (2010).
3. Н. В. Самосудова, О. Ю. Орлов, и С. А. Голышев, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **156** (12), 843 (2013).
4. T. Ishikava and E. Yamada, *J. Electron Microsc.* **19** (1), 85 (1970).
5. A. Novikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** (8), 2781 (1976).
6. G. A. Tabor and S. K. Fisher, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **24** (3), 388 (1983).
7. M. A. Yorke and D. H. Dickson, *Cell Tissue Res.* **241**, 623 (1985).
8. A. Bairati and N. Orzalesi, *J. Ultrastruct. Res.* **9**, 484 (1963).
9. D. H. Dickson and H. Harvey, *Curr. Eye Res.* **11** (2), 147 (1992).
10. Г. Р. Каламкаров и М. А. Островский, *Молекулярные механизмы зрительной рецепции* (Наука, Москва, 2002).
11. M. M. La Vail, *Science* **194**, 1071 (1976).
12. R. W. Young, *J. Ultrastruct. Res.* **61**, 172 (1977).
13. E. L. Snapp, R. S. Hegde, M. Francolini, et al., *J. Cell Biol.* **163** (2), 257 (2003).

Lamellar Inclusion Bodies in the Retinal Pigment Epithelium of Diurnal Rodents

N.V. Samosudova*, O.U. Orlov*, and S.A. Golyshev**

**Kharkevich Institute of Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences,
Bolshoj Karetnyj per. 19/1, Moscow, 127051 Russia*

***Belosersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University,
Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia*

The ultrastructure of the retinal pigment epithelium of a diurnal rodent (Brandt's vole) was described taking into account 1) the functions of the pigment epithelium as a participant in the renewal of photoreceptor outer segment and 2) digestion of outer segment membranes into phagosomes of the retinal pigment epithelium. The myeloid bodies were observed after exposure of the pigment epithelium to light (200 lux, 4 hours) and darkness (0,1 lux, 1,5-hour). In the cytoplasm of the pigment epithelium of the vole no myeloid bodies were observed. Instead of it small lamellar bodies, which have the spiral form and size (from ~ 200 to 400 nm) were found. The structure of these lamellar bodies was described. Furthermore, the structures, which were presumably responsible for the transport of the digested material, were revealed. The evidence of it is the presence of 1) dense precipitate in the apical domain of the pigment epithelium and 2) microtubules which participate in transport of this precipitate.

Key words: retinal pigment epithelium, multilamellar inclusions, intracellular transport, precipitate, microtubules