

УДК612.843.114:618.29]:576.385

Н.Ю. Матвеева

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АПОПТОЗА ГАНГЛИОНАРНЫХ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

Владивостокский государственный медицинский университет

Ключевые слова: апоптоз, ультраструктура, ганглионарные клетки.

В онтогенезе образуется избыточное количество клеток, гибель которых рассматривается как механизм, необходимый для нормального формирования органов. Этот в сущности своей физиологический процесс обеспечивается апоптозом, который был описан в конце XIX века [12].

При формировании мозга погибает от 15 до 85% нейронов. Их массовая гибель продолжается и в постнатальном развитии. В мозжечке 70-летнего мужчины отмирает более 40% грушевидных клеток [6]. Для диагностики апоптоза наиболее объективным показателем является морфология погибающих клеток. Основные изменения при нем происходят в ядре, распознать их позволяет электронно-микроскопический метод [1, 14].

Цель работы заключалась в описании морфологии апоптоза в ганглионарных нейронах сетчатки глаза человека, сведения о котором в литературе отсутствуют.

Учитывая, что массовая гибель клеток происходит на ранних этапах развития, была выбрана сетчатка плодов I триместра развития. Использовался материал, полученный при медицинских абортах. Исследовано 10 глаз, взятых на 10-12-й неделях внутриутробного развития. Материал фиксировался в 10% нейтральном формалине 2-3 недели. Время фиксации определялось размерами глаза. Исследования проводились на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином. Морфометрический анализ изображения проводили посредством компьютерной программы Adobe PhotoShop 5.0. Ввод изображения осуществлялся через телевизионную систему на базе микроскопа Vickers M 85. Математическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета статистических программ BIOSTAT.

Фиксацию материала для ультратонких исследований проводили в 2,5% охлажденном растворе глutarового альдегида (pH7,3) на 0,1M буфере в течение 10 минут. Затем выделенные участки стенки глаза и его оболочек дофиксировали в перфузионном растворе в течение еще 3 часов. Затем материал отмывали 0,1M фосфатным буфером (pH 7,3) 18-20 часов в ледяной бане при +4°C. Материал дофиксиро-

вали в 1% растворе четырехоксида осмия по G. MSH-onig в течение 2 часов при температуре +4°C с последующей двойной промывкой в том же буфере по 10 минут. Затем ткань дегидрировали в спиртах возрастающей концентрации и в ацетоне. Материал заливали в смесь эпон 812 и аралдита. Поперечные ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB (Швеция), контрастировали в 2% спиртовом растворе уранилацетата и цитрата свинца по Reynolds и исследовали в электронном микроскопе при ускоряющем напряжении 75 кВ и увеличении от 10 000 до 60 000 раз.

На срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, ганглионарный слой имел вид довольно широкой ленты. В разных отделах сетчатки его ширина колебалась от 225,46 до 767,67 мкм (в среднем — 397,12±9,6 мкм). На 1 мм² приходилось 472±12 клеток. Встречались элементы с ядром, лишенным хроматина. Кроме того, попадались клетки с пикнотичным ядром, окруженным светлым ореолом. Полагают, что клетки первого типа подвергаются некрозу, а вторые, скорее всего, находятся в состоянии апоптоза [3,9, 15].

Под электронным микроскопом ядра нормальных нейронов имели сферическую форму, с четко дифференцированной кариолеммой. Хроматин мелкозернистой структуры был равномерно распределен по кариоплазме. Иногда ядро включало несколько более крупных гранул, расположенных центрально или ближе к ядрышку. Ядрышко крупное, электронно-плотное, с фестончатой поверхностью (рис. 1). В цитоплазме молодых нейронов эндоплазматический ретикулум был развит слабо, встречалось много свободных рибосом и мелких митохондрий (0,5-1 мкм), сосредоточенных в перинуклеарной зоне. Крупное ядрышко, обилие свободных рибосом и мелких митохондрий свидетельствовали о том, что эти клетки находились в периоде развития.

Довольно редко встречаются ганглиозные клетки с явно измененным ядром. Оно имело неправильную форму, кариолемма или выбухала, или, наоборот, была вдавлена в кариоплазму, местами отсутствовала, и ядро открывалось широкими порами в цитоплазму. Хроматин собран в грубые электронно-плотные гранулы и частично придвинут или вплотную соединен с оболочкой ядра (рис. 2).

Судя по состоянию хроматина, его агрегация продолжалась. Глыбки уплотнялись и смешались к извитой кариолемме, принимая ее форму (рис. 3). В других клетках можно было видеть широкие разрывы кариолеммы и выход крупных хроматиновых конгломератов в цитозоль (рис. 4). Эти конгломераты, очевидно, совместно с фрагментами цитоплазмы формировали апоптозные тельца. На одной и той же клетке можно было проследить последовательность их образования. Часть ядерного материала, покрытого кариолеммой, с прилегающей цитоплазмой подвергалась аутолизации. Затем формировалась

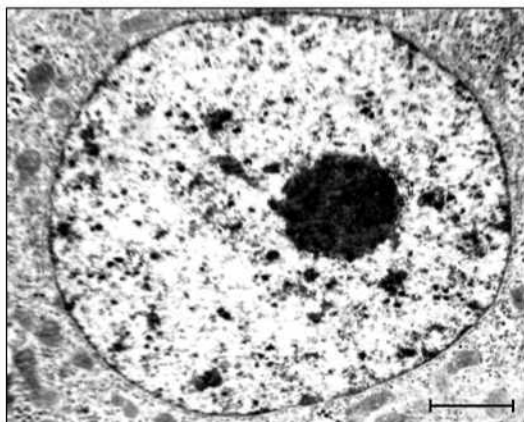


Рис. 1. Плод 10 недель. Ядро нормального ганглионарного нейрона сетчатки. Масштаб 1 мкм.

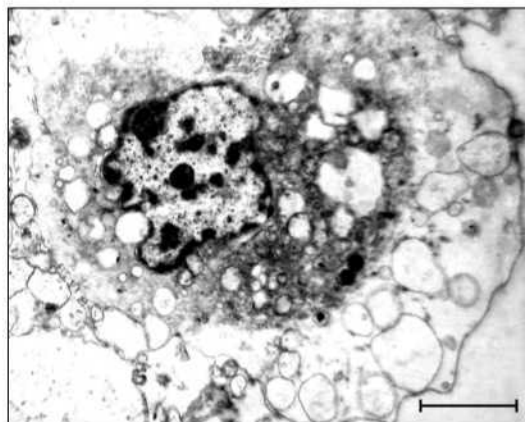


Рис. 2. Плод 10 недель. Ганглионарная клетка с ядром неправильной формы, хроматин в виде глыбок, периферия клетки пузырчатой формы (блеббинг). Масштаб 1 мкм.

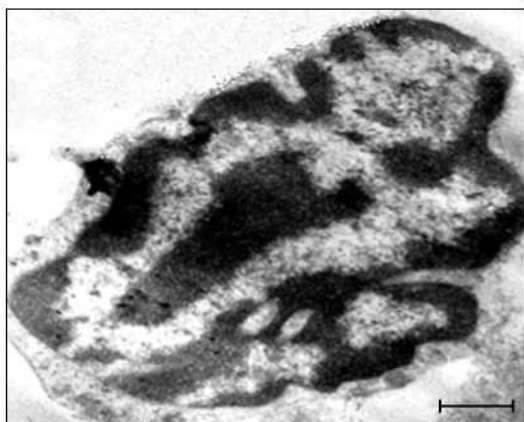


Рис. 3. Плод 11 недель. Хроматин ядра ганглионарной клетки агрегирован и придвинут к кариолемме. Масштаб 1 мкм.

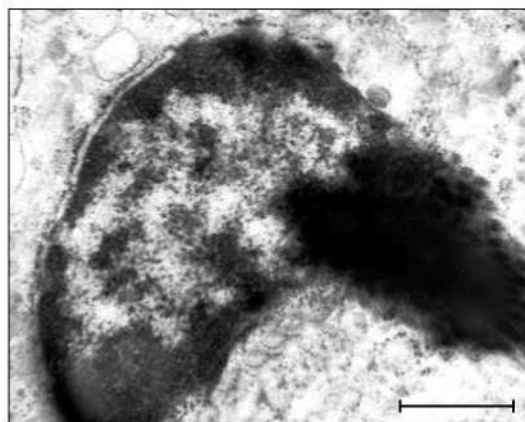


Рис. 4. Плод 12 недель. Разрыв кариолеммы и экструзия хроматина. Масштаб 1 мкм.

постепенно углубляющаяся борозда, ампутирующая апоптотное тельце. Кроме ядерного материала апоптотные тельца содержали цитоплазматические органеллы (рис. 5).

Клетка как целостная система реагировала и изменениями цитоплазмы (рис. 6). Канальцы эндоплазматического ретикулума, включая аппарат Гольджи, неравномерно расширились и заполнялись электронно-прозрачным материалом. Сходные изменения гладкого ретикулума описаны при апоптозе: считается, что они переполнены жидкостью [7, 10, 13].

Для апоптоза весьма характерна реакция со стороны клеточной поверхности. Она приобретает пузырчатый вид за счет процесса, названного в литературе блеббингом (от англ. blebby — пузырчатый). Нейроны соответствующего вида встречались в исследуемом материале (рис. 2).

Данные литературы последних лет свидетельствуют о том, что апоптоз может быть инициирован цитоплазматическими факторами, в частности, протеазой AIF и цитохромом C, которые образуются митохондриями [2, 4, 8]. На собственном материале также была отмечена реакция со стороны этих органелл, однако развивается ли она в результате повреждения ядра или первично — неясно.

Нормальные митохондрии ганглионарных клеток, как и аксонов, имевшихся в срезах, имели поперечник от 2 до 2,5 мкм. Их поверхность была ограничена двумя мембранами и светлым промежутком между ними. От внутренней мембраны начинались хорошо просматривавшиеся кристы (рис. 7, а). В апоптотных клетках митохондрии уплотнялись, местами вакуолизировались, кристы не просматривались или выглядели разрушенными (рис. 7, б, в). Среди явно поврежденных органелл встречались гигантские митохондрии (10–12 мкм) без видимых структурных изменений. Материал электронно-микроскопических исследований подтвердил общий тезис о наиболее ярких морфологических изменениях при апоптозе в ядре [5, 11]. Согласно полученным данным, процесс развивался по следующей схеме:

- 1) агрегация хроматина по всему ядру с образованием грубых глыбок разной величины и формы;
- 2) смещение хроматина к внутренней поверхности кариолеммы, приобретение последней фестончатого вида с расширением пор и нарушением (местами) ее целостности;
- 3) миграция крупных агрегатов хроматина в цитоплазму или формирование ими совместно с ядерной оболочкой цитоплазматических выпячиваний;

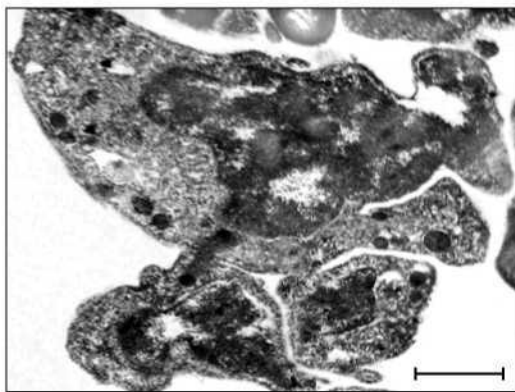


Рис. 5. ПЛОД 12 недель. Образование апоптозных телец. Масштаб 6 мкм.

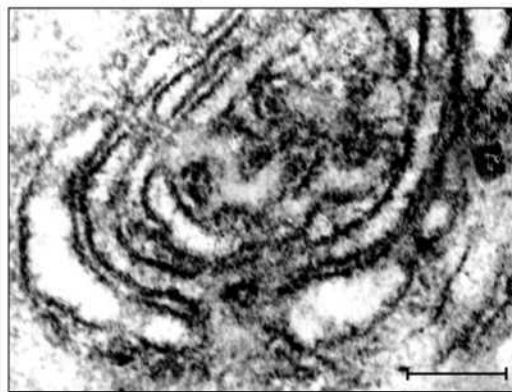


Рис. 6. Плод 10 недель. Вакуолизация эндоплазматических канальцев с образованием цистерн. Масштаб 1 мкм.

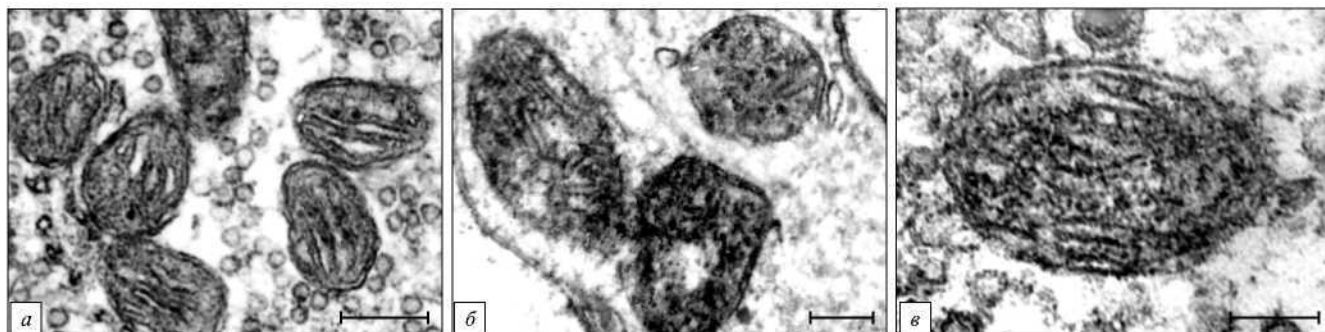


Рис. 7. Плод 12 недель. Структура митохондрий ганглионарной клетки.

а - нормальные митохондрии; *б* - уплотнение матрикса митохондрий, разрушение крист, вакуолизация; *в*) гипертрофия митохондрии. Масштаб: *а*— 1 мкм, *б*, *в* — 0,5 мкм.

4) аутолизация указанных выпячиваний с образованием апоптозных телец.

Фагоцитоза апоптозных тел на собственном материале не зарегистрировано. Однако рядом с пораженными нейронами определялись клетки величиной 10-15 мкм, в цитоплазме которых имелись крупные электронно-плотные лизосомы. Возможно, это были макроглиоциты. Изменения митохондрий, эндоплазматического ретикулаума и поверхности клетки наблюдались, как правило, в нейронах с первоначально поврежденным ядерным аппаратом. Видимо, их следует рассматривать как второй этап реакции нейрона.

Литература

1. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В.// *Росс. онкол. журн.* - 1996. - №1. - С. 58-61.
2. Белушина Н.Н., Хасан Х.А., Северин С.Е.// *Вопросы биологической медицины и фармацевтической химии.* - 1998. - №4. - С. 15-23.
3. Волянский Ю.Л., Колотова Т.Ю., Васильев Н.В.// *Успехи совр. биол.* - 1994. - Вып. 6. - С. 679-692.
4. Демин С.Ю.// *Цитология.* - 1999. - №1. - С. 66-86.
5. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. *Гибель клетки. Апоптоз.* — М.: Медицина, 2001.
6. Мотавкин П.А. *Введение в нейробиологию.* — Владивосток: Медицина ДВ, 2003.
7. Новиков В.С., Цыган В.С.// *Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова.* - 1997. - № 4. - С. 13-32.
8. Новиков В.С. *Программированная клеточная гибель.* - СПб.: Наука, 1996.
9. Пальцев М.А.// *Вестник РАМН.* - 2002. - № 1. - С. 13-21.
10. Цыпенкова В.Г.// *Архив патологии.* — 1996. — №5. - С. 71-74.
11. Ярилин А.А.// *Цитология.* - 1996. - №2. - С. 10-21.
12. Bardales R.H.// *American J. Clin. Pathol.* - 1997. - Vol. 107. - P. 332-336.
13. Kerr J.F.R., Willer A.N., Currie A.R.// *Brit. J. Cancer.* - 1972. - Vol. 26. - P. 239-257.
14. Olave I.// *Genes. & Develop.* - 2002. - Vol. 16. - P. 2509-2517.
15. Pimentel B., Sanz C.// *Journal of Neuroscience.* — 2000. - Iss. 20. - P. 3254-3262.

Поступила в редакцию 11.10.04.

ULTRASTRUCTURAL DESCRIPTION OF APOPTOSIS OF RETINA GANGLIONARY CELLS OF HUMAN FOETUSES

N. Yu. Matveeva

Vladivostok State Medical University

Summary — Using general morphologic methods, electron microscopy, and morphometry, the author has studied ten eyes of human foetuses (a 10-12 weeks' intrauterine development material received in the course of therapeutic abortions), detected some changes confirming ganglionary neurons death in ontogenesis by means of apoptosis, and described stages in the course of apoptosis bodies' generation.

Pacific Medical Journal, 2004, No. 3, p. 21-23.