

Морфофункциональные особенности клеток Мюллера при восстановлении фоторецепторных клеток сетчатки в эксперименте

1. Кутузова Лилиана Алексеевна

Доцент, кандидат медицинских наук. Медицинская Академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО КФУ им. В.И. Вернадского. Россия, г. Симферополь

2. Колодина Мария Ивановна

Студент 2 курса 2-ого медицинского факультета. Медицинская Академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО КФУ им. В. И. Вернадского. Россия, г. Симферополь

3. Марусева Анастасия Александровна

Студент 2 курса 2-ого медицинского факультета. Медицинская Академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО КФУ им. В. И. Вернадского. Россия, г. Симферополь

Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И.

Вернадского»; Российская Федерация, Республика Крым, 295051, г. Симферополь

В современном мире около 1,3 млрд. людей имеют аномалии и заболевания органа зрения. По предварительным прогнозам учёных - ситуация крайне неутешительная, т.к. в последующие десятилетия будет отмечаться значительный рост данной патологии [5, 6]. По результатам исследований большее количество информации об окружающем мире воспринимается через орган зрения, поэтому люди, которые имеют аномалии и заболевания зрительного анализатора, сталкиваются с проблемами как социального, так и физиологического характера. В результате, им сложнее адаптироваться в современном мире. И как следствие, целью нашего исследования явилось проведение обзора литературы по изучению исследований в разработке лечения по восстановлению зрения. Решение этой проблемы стало актуальной в современной действительности. Учёные провели множество исследований по изучению морфофункциональных особенностей клеток Мюллера, являющихся основным типом глиальных клеток сетчатки глаза. Данные клетки при повреждении сетчатки способны приобретать свойства стволовых клеток и воспроизводить мультипотентные клетки для восстановления ткани [2, 7, 8, 11]. Исследования ученых морфофункциональной значимости клеток Мюллера позволят в будущем создать хирургический и консервативный метод лечения людей с патологиями органа зрения. Ключевые слова: патологии зрения; клетки Мюллера; фоторецепторные клетки; восстановление сетчатки.

Morphological and functional features of Müller cells in the recovery of photoreceptor cells of the retina in the experiment

1. Kutuzova Liliانا Alekseevna

Associate Professor, Candidate of Medical Sciences. Medical Academy named after SI

Georgievsky FGAOU VO KFU them V.I. Vernadsky. Russia, Simferopol 2. Maruseva Anastasia Alexandrovna

Second year student of the 2nd medical faculty. Medical Academy named after SI Georgievsky FGAOU VO KFU them V.I. Vernadsky. Russia, Simferopol

3. Kolodina Maria Ivanovna

Second year student of the 2nd medical faculty. Medical Academy named after SI Georgievsky
FGAOU VO KFU them V.I. Vernadsky. Russia, Simferopol.

About 1.3 billion people have anomalies and diseases of the organ of vision in modern times. According to preliminary forecasts of scientists, the number of people with this pathology will increase in the coming decades [5, 6]. According to the results of research, the organ of vision allows to perceive a greater amount of information about the world. Therefore, people who have anomalies and diseases of the visual analyzer have a large number of problems. A large number of problems arise in people who have anomalies and diseases of the visual analyzer, so these people find it harder to adapt in the modern world. And as a result, a review of the literature on research into the development of treatment for the restoration of vision has become the goal of our research. The solution to this problem has become relevant in modern reality. Scientists have conducted many studies on the study of the morphological and functional features of Muller cells, which are the main type of glial cells of the retina. These cells acquire the properties of stem cells when the retina is damaged and they reproduce multipotent cells for tissue repair [2, 7, 8, 11]. Research scientists morphofunctional significance of Muller cells will allow in the future to create a surgical and conservative method of treating people with pathologies of the organ of vision.

Key words: pathology of vision; Müller cells; photoreceptor cells; retinal recovery.

Древнегреческий ученый Аристотель, живший с 384 по 322 года до н. э., создал традиционную классификацию органов чувств. К ней относятся зрение, запах, вкус, осязание и слух. А в 1760-х годах философ Иммануил Кант, пытаясь решить проблему обоснования научного знания, сделал вывод, что понимание внешнего мира зависит от наших форм восприятия [1]. Информация окружающего мира может быть получена через обонятельные, осязательные, зрительные, аудиальные, вкусовые анализаторы. Большое количество информации воспринимается с помощью органа зрения. Поскольку примерно 30% коры больших полушарий отвечает за обработку информации, полученной через зрительный анализатор, а через осязательный и аудиальный всего 8% и 2% соответственно [3]. У людей, родившихся слепыми или потерявшими зрение в течение жизни, лучше развито осязательное восприятие, но так как осязание является контактным анализатором, то оно не позволяет воспринимать предметы одновременно и на расстоянии. В результате, в поле восприятия попадает гораздо меньше деталей, поэтому людям с дефектами зрения сложнее воспринимать информацию. Тем более эта проблема становится актуальнее, так как по оценке ВОЗ около 1,3 млрд людей имеют проблемы со зрением [4]. При близорукости легкие нарушения есть у 188,5 млн. человек, от умеренных до тяжелых – у 217 млн. человек. С дальнозоркостью живут 826 млн. человек. Люди, имеющие полную слепоту, составляют 36 млн. С 1990 года 2015 количество имеющих нарушение зрения увеличилось с 159,9 млн. до 216,6 млн., а слепых с 30,6 млн. до 36 млн [5, 6]. По прогнозам ученых на 2020 год количество слепых будет равняться 38, 5 млн., а людей с умеренными и тяжелыми нарушениями зрения 237,1 млн. из общего населения мира 7,75 миллиардов. В 2050 соответственно 114,6 млн. и 587,6 млн. из общего количества людей на земле 9,96 миллиардов (таб.1.) [6].

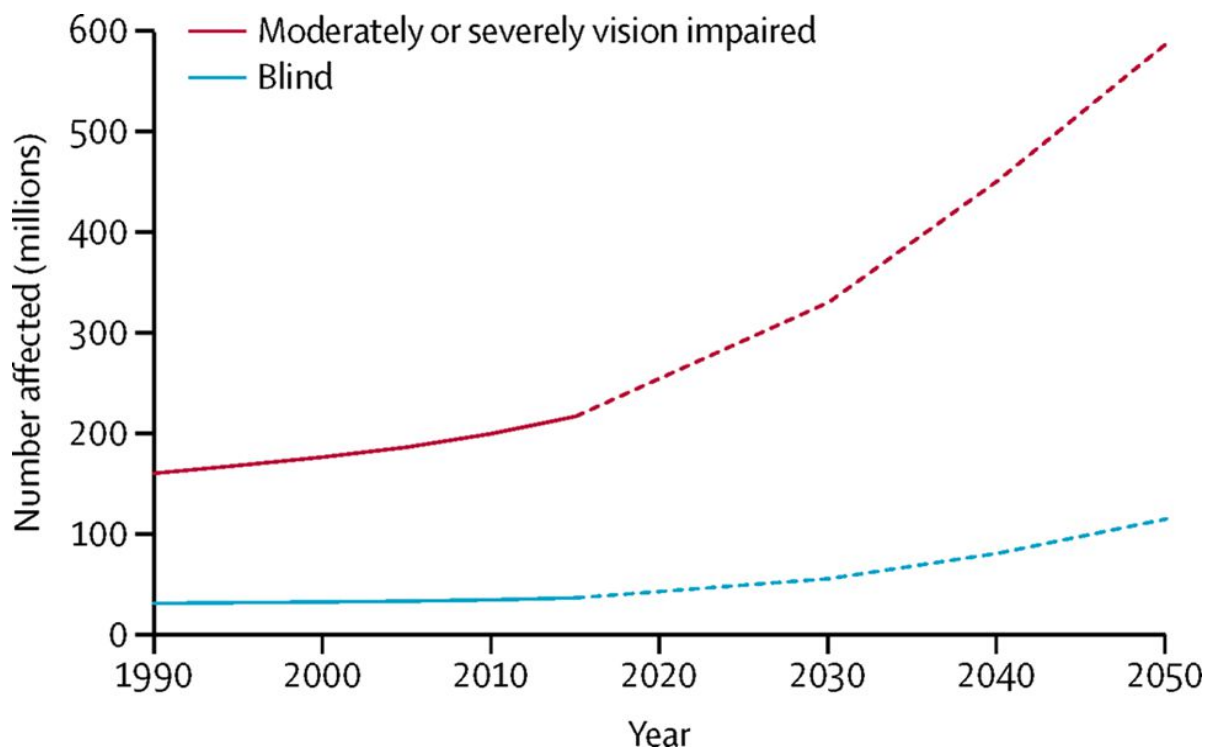


Таблица 1. Статистика количества людей, которые являются слепыми или имеют проблемы со зрением с 1990-2050 года.

Данные показатели настораживают, т.к. в настоящее время не существует лечения, которое бы позволило полностью восстановить зрение. Возникает вопрос: есть ли шанс у будущего поколения на восстановление зрения и полноценное качество жизни? И как следствие, целью нашего исследования явилось проведение обзора литературы по изучению исследований в разработке лечения по восстановлению зрения.

Было известно, что только три класса позвоночных могут восстанавливать клетки сетчатки при их повреждении, это амфибии, рыбы и птицы. На периферии сетчатки, содержится область клеток, которые дают начало дифференцированным нейронам. У амфибий и рыб нейрогенез длится всю жизнь, у птиц только часть [7].

Некоторое время не было точно известно, какие именно клетки осуществляют восстановление сетчатки глаза. Ученые знали, что клетки Мюллера являются основным типом глиальных клеток сетчатки, однако восстановительная способность клеток была доказана лишь при углубленном изучении их морфофункциональных свойств. Данные клетки поддерживают гомеостаз и метаболизм нейронов сетчатки. За счет переноса ионов, молекул воды и бикарбонатов они контролируют состав внеклеточной жидкости. Обеспечивают питание фоторецепторов и нейронов. Регулируют герметичность гематоэнцефалического барьера. Защищают нейроны от механических повреждений. В результате того, что они поглощают глутамат, они могут непосредственно участвовать в регуляции синаптической активности во внутреннем слое сетчатки. Клетки Мюллера

выделяют нейроактивные сигнальные молекулы, которые модулируют активность нейронов [2, 7, 8, 10].

Восстановительная способность клеток MG было доказана, при проведении опыта на рыбках-зебрах. Сначала рыба была обезболена, затем на сетчатке правого глаза сделали 4 разреза иглой, которая вводилась примерно на 5 мм, левый глаз не трогали. Для более тщательного изучения пролиферации клеток, через 24 часа после повреждения ткани рыбка получала разовую дозу BrdU- это синтетический нуклеозид. Обладает возможностью в процессе репликации ДНК заменять тимидин, поэтому при его использовании можно выявить пролиферирующие клетки, так как он встраивается в ДНК. Лишь через 4 часа после введения отпрепарированные глаза рыбы были изучены. Таким образом, было доказано, что все клетки, образовавшиеся при регенерации, являлись клетками MG. Из них был получен белок GFP⁺, который мигрировал по всей поверхности сетчатки, тем самым продемонстрировав возможность восстановления клеток сетчатки во всех слоях. Клетки, которые были помечены BrdU, дифференцировались в фоторецепторы и биполярные клетки [10]. Через некоторое время было выяснено, что эти клетки есть и у млекопитающих. Но они не могут, как клетки MG рыб, при повреждении приобретать свойства стволовых клеток и воспроизводить мультипотентные клетки для восстановления ткани. Так же оказалось, что при разрушении нейронов в сетчатке рыб выделяются различные цитокины и факторы роста, стимулирующие пролиферацию клеток Мюллера. Такое происходит и у птиц, и у млекопитающих, но их активационная способность не высока, поэтому образованные нейроны погибают [11].

При дальнейших исследованиях ученые пытались активировать клетки Мюллера у мышей, так как у них пролиферационная способностью ниже по сравнению с крысами. Они использовали миогенные факторы роста и белки Wnt, которые являются внеклеточными лигандами и участвуют в процессах морфогенеза, формообразования, клеточной пролиферации, и необходимы для правильного эмбрионального развития. Благодаря свойствам данных органических соединений деление клеток MG было активировано. Так же оказалось, что Ascl1, в сочетании с эпидермальным фактором роста, тоже может стимулировать деление клеток Мюллера и осуществлять дифференцировку нейронов у молодых мышей [11, 12, 13].

Ученые из школы медицины Икана центра Маунт-Синай в Нью-Йорке пытались образовать из клеток MG фоторецепторы –палочки у слепых мышей с рождения без повреждения сетчатки, и у них это получилось. Эксперимент состоял из двух стадий. Первая стадия заключалась в введении GFAP-β-катенина, GFAP-GFP, Rhodopsin-tdTomato. Через две недели, как началась генерация клеток, была проведена вторая стадия опыта. Она

заклучалась в введении ShH10- GFAP и гены *Otx2*, *Crx* и *Nrl*. Ещё через 2 недели для активации пролиферации клеток Мюллера вводилась интравитреальная инъекция ShH10- GFAP- β -catenina (рис.1).

1

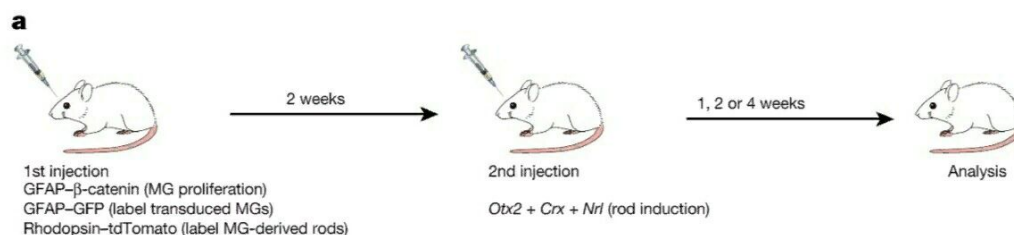
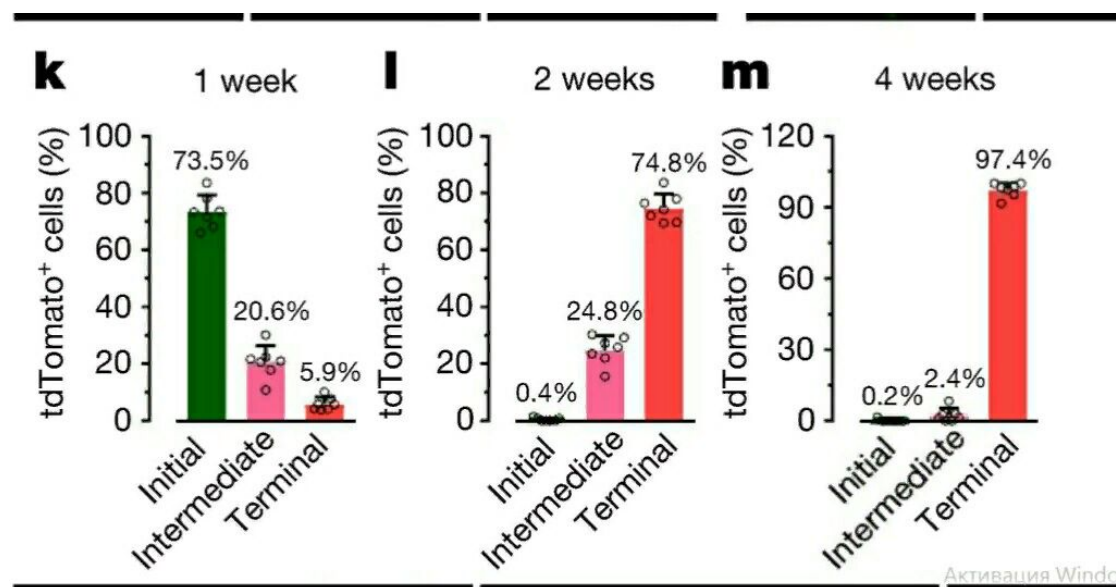


Рис.1. Схематическое изображение стадий проведенного опыта.

Для более тщательного наблюдения MG были маркированы 5-этинил-2-дезоксисуридином (EdU) через 10 дней после инъекции, ShH10-GFAP- β -catenin и 5-бром-2-дезоксисуридином (BrdU) через 24 часа после S-фазы. Через 4 дня после того, как провели все манипуляции, сетчатку изучили. Лишь небольшое количество клеток имели маркировку как EdU, так и BrdU. Это указывало на то, что подавляющее большинство клеток Мюллера после введения β -catenin подвергается только одному делению. Клетки, образовавшиеся в дальнейшем, были похожи на палочконесущие фоторецепторы. На основании морфологических изменений, наблюдаемых из различных образцов сетчатки, взятых после введения второй инъекции, был сделан вывод, что прогрессирование в дифференцировке полученных клеток MG палочек было замечено на начальной, промежуточной и конечной стадиях (таб.2).



Таб.2. Представлены стадии прогрессирования и дифференцировки полученных MG палочек.

При использовании конфокальной микроскопии и иммуногистохимии, было доказано содержание в палочковидных нейросенсорных клеток, дифференцированных из клеток MG, родопсина. Индуцированные фоторецепторные палочковидные клетки, полученные из клеток Мюллера были ультроструктурно схожи с нативными нейросенсорными палочками. Внешний сегмент палочковидной нейросенсорной клетки состоял из плотно упакованных мембранных дисков. Внутренний сегмент фоторецептора был заполнен длинными тонкими митохондриями, которые являлись основным источником энергии для удовлетворения высоких метаболических потребностей палочки. Синтезированные белки перемещались из внешнего сегмента во внутренний через соединительную ресничку, структуру, располагающуюся на основании микротрубочек. Палочковидные фоторецепторные клетки устанавливали синаптическую связь с биполярными нейронами и горизонтальными клетками.

В процессе наблюдения за животными, получившими лечение, ученые установили, что было восстановлено 0,2% от всех не функционирующих рецепторов, и в их зрительной коре появилась активность, что доказывало поступление сигнала от сетчатки в зрительную область коры больших полушарий и осуществление синтеза и анализа визуальной информации. После гистологического исследования выяснилось, что превращение прошло успешно, и новые фоторецепторные клетки устанавливали синаптические связи с другими нейронами в сетчатке глаз мышей [14].

Выводы. Ученые путем внедрения генов в сетчатку глаз мышей активировали способность клеток Мюллера дифференцироваться в палочковидные фоторецепторные клетки, что позволит в офтальмологической отрасли найти способ лечения патологий органа зрения.

Список литературы:

1. Иммануил Кант // Философский труд // Критика чистого разума // Перевод с немецкого Н. Лосского. Сверен и отредактирован Ц. Арзаканяном и М. Иткиным. Примечания Ц. Арзаканяна // «Издательство «Эксмо», 2015 -880с.
2. Тихонович Марина Валерьевна, Иойлева Е.Э., Гаврилова С.А. Роль воспаления в развитии пролиферативной витреоретинопатии // Клиническая медицина. 2015. №7. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rol-vospaleniya-v-razvitii-proliferativnoy-vitreoretinopatii> (дата обращения: 15.12.2018).
3. Шевелев И.А//Нейроны зрительной коры. Адаптивность и динамика рецептивных полей// М: Наука, 1984. 232 с.
4. Информационная бюллетень// Нарушения зрения и слепота//11 октября 2018 г.// 2018 ВОЗ// URL:<https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/blindness-and-visual-impairment> (дата обращения: 15.12.2018).
5. Stevens G, White R, Flaxman SR et al., for the Vision Loss Expert Group. Global prevalence of visual impairment and blindness: magnitude and temporal trends, 1990–2010. *Ophthalmology* - 2013; 120: 2377-238. Epub 2013 Jul 10. DOI: 10.1016/j.ophtha.2013.05.025.
6. Bourne RRA, Flaxman SR, Braithwaite T. Cicinelli MV, Das A, Jonas JB, et al.; Vision Loss Expert Group. Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2017 August 02;5(9):e888–97. DOI: 10.1016/S2214-109X(17)30293-0
7. Hitchcock P, Ochocinska M, Sieh A, Otteson D (2004) Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Prog Retina Eye Res* 23:183–194. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2004.01.001
8. Guidry Clyde. The role of Müller cells in fibrocontractive retinal disorders. *Prog. Retin. Eye Res*. 2005; 24 (1): 75—86. DOI:10.1016 / j.preteyeres.2004.07.001
9. Reichenbach A, Bringmann A. New functions of Müller cells. Epub 2013 Feb 26. DOI: 10.1002/glia.22477
10. Fausett, B. V. & Goldman, D. A role for α 1 tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *J. Neurosci*. 26, 6303–6313 (2006). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0332-06.2006
11. Goldman D. Muller glial cell reprogramming and retina regeneration. *NAT Rev Neurosci*. 2014;15(7):431–42. DOI: 10.1038/nrn3723.
12. Matthew S. Wilken, Thomas A. Reh. Retinal regeneration in birds and mice. *Current Opinion in Genetics & Development*. Volume 40, October 2016, Pages 57-64. DOI:10.1016/j.gde.2016.05.028
13. Nikolas L. Jorstad, Matthew S. Wilken, William N. Grimes, and all. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. *Nature*. 2017 Aug 3;548(7665):103-107. DOI: 10.1038/nature23283.

14. Bo Chen. Restoration of vision after de novo genesis of rod photoreceptors in mammalian retinas/Bo Chen, Kai Yao and all. Published 15 August 2018. DOI: 10.1038/s41586-018-0425-3