

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА
И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 591

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ И НАКОПЛЕНИЯ КЛЕТОК
В S-ФАЗЕ В СЕТЧАТКЕ ГЛАЗА ТРИТОНА *Pleurodeles waltlii*
ПОСЛЕ ИСКУССТВЕННОЙ ОТСЛОЙКИ
ОТ ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ¹

© 2008 г. Ю. П. Новикова, В. А. Поплинская, К. С. Алейникова, Э. Н. Григорян

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д.26

E-mail: novikovayulia@gmail.com

Поступила в редакцию 18.12.06 г.

Окончательный вариант получен 11.07.07 г.

Работа является продолжением исследований пролиферативных возможностей клеток в сетчатке глаза взрослого тритона. Используются модель отслойки сетчатки от пигментного эпителия и два приема насыщения тканей глаза *in vivo* предшественниками синтеза ДНК: 1) метод многократного мечения ³H-тимидином с последующим анализом радиоавтографов на полутонких срезах и 2) новый, разработанный нами способ непрерывного мечения аналогом тимидина бромдеоксиуридином с дальнейшим иммунохимическим определением его антигена. Полученные сведения подтверждают и дополняют наши ранние данные о локализации ДНК-синтезирующих клеток внутри нейральной сетчатки, а также информируют о паттерне накопления клеток в S-фазе по мере отслойки для каждой из способных к пролиферации клеточных популяций. Показано, что помимо клеток ростовой зоны сетчатки, клеток мюллеровской глии, микроглии и минорной популяции клеток в витреальной части слоя интернейронов способными к синтезу ДНК являются астроциты зрительного нерва и клетки его сосудистой сети. Определено, что спустя 4 нед после отслойки число клеток в S-фазе в ростовой области может достигать 15–20%, тогда как в дифференцированной части сетчатки отмеченные выше, способные к синтезу ДНК клетки обладают низкой скоростью воспроизведения и за то же время могут дать только одно поколение потомков.

Ключевые слова: хвостатые амфибии, сетчатка, повреждение, регенерация, клетки-предшественники, ³H-тимидин, бромдеоксиуридин, насыщение, синтез ДНК.

Длительная отслойка сетчатки глаза у животных является моделью для получения информации, необходимой для лечения этого нарушения у человека. С другой стороны, поведение клеток сетчатки в ситуации разобщения с клетками пигментного эпителия позволяет судить о регенеративных возможностях этой нейральной ткани.

Известно, что у млекопитающих, в том числе и у человека, в результате отслойки происходят клеточные изменения, приводящие к “ремоделированию” ткани сетчатки (Fisher et al., 2005). Показано, что при этом происходят гибель наружных сегментов и сокращение аксонов фоторецепторных клеток, рост нейритов ганглиозных и горизонтальных клеток, изменение паттерна экспрессии белков цитоскелета в фоторецепторах и глиальных клетках и другие клеточные, не связанные с пролиферацией, изменения (Sethi et al., 2005). Однако известно так-

же, что отслойка сетчатки у млекопитающих приводит к инициации пролиферации отдельных ее клеточных типов. Так, исследование включения ³H-тимидина в сетчатке кошки продемонстрировало способность синтезировать ДНК для всех нейральных клеток: макроглиальных клеток Мюллера, астроцитов, эндотелиальных клеток хороида, микроглиальных клеток и макрофагов (Fisher et al., 1991).

Для выявления восстановительных способностей сетчатки низших позвоночных модель отслойки сетчатки применяется редко. В немногочисленных работах исследована сборка и слушивание фоторецепторных дисков в зависимости от аппозиции сетчатки и пигментного эпителия у *Xenopus laevis* (Kaplan et al., 1990; Defoe et al., 1992; Kaplan, 1998), а также изменения глутаматергической системы при отслойке сетчатки саламандры (Sherry, Townes-Anderson, 2000). Пролиферативной активности клеток сетчатки в условиях разобщения с

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 04-04-48044).

пигментным эпителием посвящена только одна работа, выполненная *in vitro* на тканях глаза эмбрионов шпорцевой лягушки для решения вопроса о влиянии пигментного эпителия на выход клеток сетчатки из пролиферативной фазы (Stiemke, Hollyfield, 1995).

Микрохирургическая отслойка сетчатки у тритонов оказалась удобной моделью для выявления обладающих потенциями к пролиферации клеток сетчатки у низших позвоночных (Григорян, 1995; Григорян и др., 1996). Опыты с полной отслойкой сетчатки у тритона *Pl. waltil.* показали, что у этих животных она остается жизнеспособной на всех сроках наблюдения (около 2 мес). В результате предпринятой нами ³H-тимидиновой импульсной радиоавтографии в разные сроки после отслойки на полутонких серийных срезах удалось выявить несколько типов клеток, включающих меченый предшественник синтеза ДНК. В S-фазе были обнаружены клетки ростовой зоны глаза, макро- и микроглии, а также мелкие овальные клетки витреального ряда слоя интернейронов (Григорян, Поплинская, 1999).

Настоящая работа является продолжением исследований пролиферативных возможностей клеток нейральной сетчатки глаза взрослого тритона. Использована модель отслойки сетчатки и два приема насыщения тканей глаза *in vivo* предшественниками синтеза ДНК: 1) метод многократного мечения ³H-тимидином с последующим анализом радиоавтографов на полутонких срезах и 2) новый, разработанный нами способ непрерывного мечения аналогом тимидина бромдеоксиуридином (BrdU) с дальнейшим иммунохимическим определением BrdU-антигена. Полученные сведения подтвердили и дополнили наши ранние данные о локализации ДНК-синтезирующих клеток, а также проинформировали о паттерне накопления клеток в S-фазе по мере отслойки для каждой из способных к пролиферации клеточных популяций.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Радиоавтографическое исследование с насыщением клеток сетчатки тритона меченым по тритию тимидином на разных стадиях регенерации после отслойки проводили следующим образом. В эксперименте использовали взрослых тритонов *Pl. waltil.*, у которых после анестезии (MS 222, 1 : 1500) на обоих глазах была произведена операция по методу, разработанному нами ранее (Григорян, 1995; Григорян и др., 1996). В результате операции сетчатка теряет свою топологическую и функциональную связь с пигментным эпителием и располагается свободно в полости глаза, образуя складки. На 7, 14 и 28-е сут

после операции тритонам трижды внутрибрюшинно инъецировали ³H-тимидин (“Изотоп”, Москва) из расчета 18.5×10^4 Бк/1 г веса. Инъекции проводили с интервалом от 3 до 6 ч. Через 3–4 ч после последней инъекции глаза животных фиксировали (по четыре на каждый срок). Для фиксации использовали глутаровый альдегид на какодилатном буфере, фиксированные образцы обрабатывали по стандартному протоколу приготовления полутонких (1 мкм) срезов. Процедура получения радиоавтографов включала заливку срезов в эмульсию (тип “М”, НИИХимФото), экспозицию при +4°C в течение 60 сут, проявление радиоавтографов (Д-19 “Sigma”, США, 3.5 мин, +19°C), фиксирование, окраску толуидиновым синим и заключение в бальзам под покровные стекла.

Длительную доставку BrdU обеспечивали следующим образом. Оперированных животных на весь срок эксперимента размещали на подложке из поливинилформала, пропитанной 0.5%-ным раствором BrdU, “Sigma”. Недавно мы показали, что при такой инкубации предшественник проникает через кожные покровы не только в наружные, но и во внутренние ткани тритона (Almeida et al., 2006; Grigoryan et al., 2006). Для исследования включения BrdU в отслоенную сетчатку тритона на 7, 14 и 28-е сут после операции по четыре глаза на каждый срок были фиксированы в 4%-ном формалине на буфере. Затем материал отмывали, дегидратировали и заключали в парафин. Срезы (6 мкм) наклеивали на стекла, депарафинировали, дегидратировали и обрабатывали реагентами BrdU кита (“Zymed”, США), включающего анти-BrdU-моноклональные и вторичные HRP-конъюгированные антитела. Затем срезы заключали в бальзам под покровные стекла либо в смесь Crystal/Mount (“Biomed”, США). При иммунохимическом выявлении мечения BrdU в качестве контролей использовали позитивный (мечение эпителия тонкого кишечника) и негативный (только вторые антитела). Анализ включения тимидиновой и BrdU-метки в клетки сетчатки проводили с помощью микроскопов Zeiss MC80DX и Olympus AH-3, Германия, а приготовление изображений – с помощью цифровой камеры и компьютера, оснащенного программами пакета Lite. Поскольку исследование включения меченого по тритию тимидина проводили на срезах толщиной 1 мкм, а определение включения BrdU – при использовании иммунохимических реакций, число проанализированных срезов было хотя и большим, но ограниченным. По этой причине работа дает точное определение локализации, но только примерную оценку пулов ДНК-синтезирующих клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование локализации и накопления ДНК-синтезирующих клеток в сетчатке тритона с использованием многократного мечения ³H-тимидином. В неоперированных глазах тритонов *Pt. waltil* клетки, включившие ³H-тимидин, были обнаружены только в ростовой части сетчатки, где индекс меченых ядер не превышал 3%. В ядерных слоях сетчатки нормального глаза обнаружить меченые клетки не удалось.

При анализе радиоавтографов на всех сроках наблюдения выявлены меченные ³H-тимидином клетки в ростовой зоне, во внутреннем ядерном слое сетчатки, зрительном нерве и пигментном эпителии. По срокам наблюдения в целом число ³H-тимидинмеченных клеток в сетчатке было максимальным на 28-е сут и превышало таковое, выявленное ранее при однократном мечении. Новым наблюдением явилось более частое появление меченых клеток во внутреннем ядерном слое вблизи складок сетчатки, образованных в результате отслойки на 14- и 28-е сут после операции. В складках сетчатки из-за ишемических условий и нарушения трофики происходит более значительная гибель клеток по сравнению с другими областями. По-видимому, по этой причине пролиферативный ответ клеток в прилежащих областях был выше по сравнению с более удаленными или сохранившими связь с пигментным эпителием сетчатки областями.

На ранних сроках после операции (7 сут) пролиферирующими оказались отдельные клетки в ростовой зоне сетчатки и пигментном эпителии; 14 сут после операции были отмечены появлением единичных клеток с мечеными ядрами во внутреннем ядерном слое. Эти клетки отличались от соседних (амакриновых) значительно меньшими размерами перикарионов и строгой локализацией на границе с внутренним сетчатым слоем. Такие клетки в эксперименте с однократным мечением встречались крайне редко. Многократное мечение ³H-тимидином позволило выявить во внутреннем ядерном слое на одном (но не каждом) полутонком срезе центральной сетчатки увеличение их числа до двух-трех на один локус обнаружения (рис. 1, а). Морфологически эти клетки имели размер ядер в 1.5–2 раза меньше тел амакриновых клеток. Часто окружением таких клеток являлись амакриновые клетки, отростки интернейронов и длинный отросток мюллеровской клетки. Морфология, расположение этих клеток в определенной нише и редкие деления являются свойствами, позволяющими расценивать их в качестве предшественников и резерва для регенерации. Это предположение может

быть проверено путем анализа дальнейшей судьбы клеток с помощью маркеров как пролиферации, так и клеточного фенотипа. Существование предшественников во внутреннем ядерном слое сетчатки низших позвоночных, в частности у рыб, активно обсуждается в литературе (Otteson et al., 2001; Wu et al., 2001; Григорян, 2003).

На 14–28-е сут после операции к числу включающих ³H-тимидин добавлялись меченые клетки мюллеровской глии. На полутонких срезах они имели характерную морфологию: большое ядро неправильной формы, очень крупное ядрышко и длинные толстые радиальные отростки. В дифференцированной части сетчатки при многократном введении ³H-тимидина меченые клетки часто встречаются на границе с ростовой зоной в средней части внутреннего ядерного слоя (рис. 1, б). Это говорит о том, что здесь на периферии сетчатки возможно воспроизведение этих клеток и их более высокая концентрация. То же самое явление было отмечено и для других животных – у взрослых рыб, птиц на ранних сроках после вылупления, а также вскоре после повреждения сетчатки птиц нейротоксинами (Reh, Fisher, 2001). После многократного введения ³H-тимидина мы смогли обнаружить две дочерние меченые клетки Мюллера со смещением одной в сторону наружного ядерного слоя (рис. 1, в). Это свидетельствовало как о возможности деления клеток макроглии, так и миграции дочерних клеток, однако максимальное число меченных ³H-тимидином клеток на один локус их выявления не превышало двух. Миграция ядер дочерних клеток мюллеровской глии в антериальном направлении была отмечена ранее в поврежденной сетчатке рыб (Braisted et al., 1994) и птиц (Fisher, Reh, 2000; 2001).

На 28-е сут после отслойки клетки в фазе синтеза ДНК мы впервые обнаружили пучок аксонов ганглиозных клеток в области выхода зрительного нерва, среди длинных волокон (рис. 1, г). Меченые ядра располагались по одиночке или группами, чаще всего вблизи оболочки зрительного нерва. Известно, что в этой локализации находятся клетки астроглии – еще один тип глиальных клеток, способных к синтезу ДНК. Меченые ³H-тимидином клетки располагались и в выстилающей нерв сосудистой сети. Эти клетки имели длинные отростки, были пигментированы и на полутонких срезах по морфологии напоминали меланоциты. Было бы очень интересным в перспективе определить роль этих клеток и астроцитов зрительного нерва в регенерации последнего после повреждения у *Urodela*.

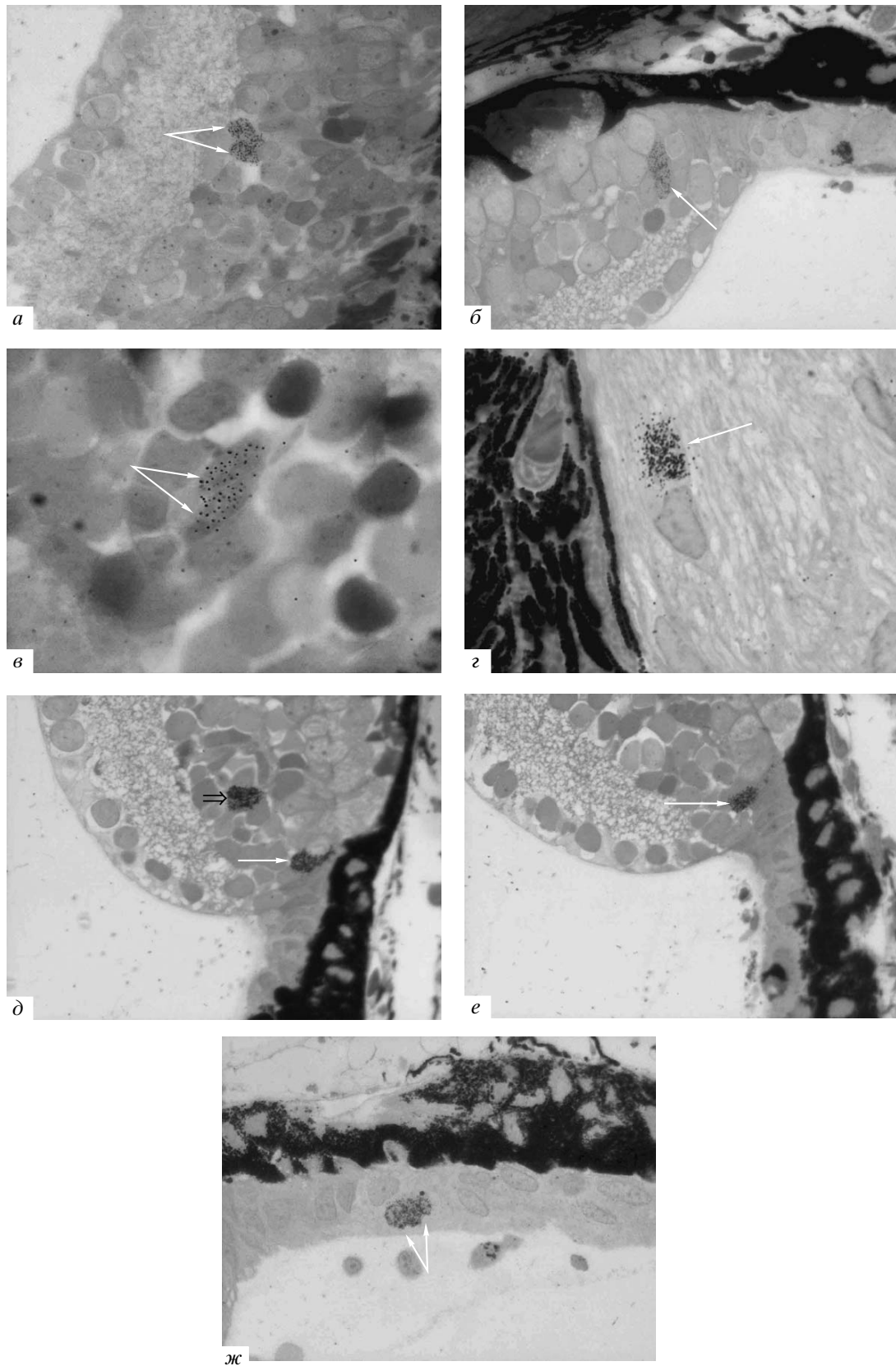


Рис. 1. Включение ^3H -тимидина в клетки сетчатки глаза тритона (\longrightarrow) после отслойки: *a* – витреальная часть внутреннего ядерного слоя; *б* – клетки Мюллера вблизи ростовой зоны; *в* – клетки Мюллера в центральной области сетчатки; *з* – зрительный нерв; *д*, *е* – клетки ростовой зоны (ora serrata), (\Rightarrow) – клетка Мюллера; *ж* – внутренний слой цилиарной области. Увел.: *a*, *ж* – ок. $\times 10$, об. $\times 40$; *б*, *д*, *е* – ок. $\times 10$, об. $\times 20$; *в*, *з* – ок. $\times 10$, об. $\times 100$.

Клетки ростовой зоны сетчатки (*ora serrata*) хорошо идентифицируются на полутонких срезах и имеют характерную морфологию. Это вытянутые, неправильной формы клетки, с крупными ядрами и высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. Меченные ^3H -тимидином ядра составляют примерно 20% от общего числа клеток зоны и находятся в различной локализации относительно дифференцированной части сетчатки – часто на ее границе, реже – вблизи цилиарной области радужки (рис. 1, д, е). Иногда можно наблюдать митозы клеток в *ora serrata* с радиальной ориентацией веретена деления. Число меченых клеток в цилиарной зоне после многократного мечения оказалось также выше, чем при однократном введении предшественника, и составляло 15–17%. В цилиарной зоне радужки ^3H -тимидинмеченные клетки иногда располагались группами, чаще парами, расположенными в обширной цитоплазме (рис. 1, ж). Иногда вблизи цилиарной области в полости глаза, а также в толще сетчатки наблюдали включающие ^3H -тимидин мелкие клетки, описанные нами ранее (Григорян и др., 1996), – микроглиальные или перициты (рис. 1, ж). Опираясь на данные по пролиферативной активности в ростовой зоне глаза, можно сказать, что при регенерации сетчатки после отслойки у взрослых тритонов эта область играет более существенную роль по сравнению с другими внутренними источниками. По-видимому, это необходимо не только для восполнения потери клеток в результате отслойки, но и для пополнения пулов способных к синтезу ДНК клеток Мюллера и предшественников, локализующихся среди амакриновых клеток.

Изучение пролиферирующих клеток в сетчатке тритона после отслойки in situ с помощью насыщения BrdU. BrdU вносили в раствор, которым была пропитана подложка из поливинилформала и где были размещены тритоны в течение 7, 14 и 28 сут после операции. Следует отметить, что данный подход мы использовали впервые, в результате чего удалось увидеть увеличение числа BrdU-позитивных (ДНК-синтезирующих) клеток. На ранних сроках (7 сут) после отслойки мы наблюдали значительно увеличение окрашенных BrdU клеток в тканях с высоким клеточным воспроизведением – роговице и коже века глаза тритона. Здесь уже через 7 сут инкубации с предшественником были выявлены группы BrdU-позитивных клеток, очень хорошо заметные на фоне непигментированных роговицы и дермы (рис. 2, а, б). В сетчатке наблюдали единичные BrdU-позитивные клетки в пигментном эпителии и ростовой зоне. Позже, через 14–28 сут после отслойки и инкубации животных в присутствии предшественника, число меченых клеток в сетчатке увеличивалось. В

пигментном эпителии на одном срезе это могли быть цепочки BrdU-позитивных ядер (рис. 2, в), в ростовой зоне сетчатки (*ora serrata*) – две-четыре клетки (15–20% от всех клеток этой зоны) (рис. 2, з), а в витреальной части внутреннего ядерного слоя до двух групп по две клетки на срез (рис. 2, д, е). Так же как и при анализе с помощью ^3H -тимидина, было обнаружено, что включение BrdU в сетчатке происходит только в ядра расположенных рядом клеток. Это позволяет предположить, что за период наблюдения внутри центральной области внутреннего ядерного слоя отслоенной сетчатки происходит не более чем одно-два деления этих клеток. Эти данные, во-первых, подтверждают локализацию ДНК-синтезирующих клеток в сетчатке взрослого тритона и, во-вторых, говорят о том, что при разобщении сетчатки с ее пигментным эпителием темп пролиферативной активности ДНК-синтезирующих клеток внутри сетчатки не высок.

В результате общей оценки включения BrdU во времени мы установили, что в сетчатке число меченых клеток, относящихся к перечисленным выше категориям, к 28-м сут после отслойки увеличивается почти вдвое. Это означает, что использованный прием непрерывной доставки предшественника синтеза ДНК к клеткам в течение 4 нед, по сути, подтверждает выводы, сделанные при многократном мечении на трех отдельных сроках отслойки, в том числе и позднем. В обоих случаях только ростовая зона глаза и пигментный эпителий в условиях отслойки сетчатки демонстрировали существенное накопление пула пролиферирующих клеток, т.е. относительно высокую пролиферативную активность клеток, которая, однако, была ниже, чем выявляемая при других способах повреждения сетчатки у тритона, например при перерезке зрительного нерва (Миташов, 1970, 1980). Это свидетельствует о том, что способные к синтезу ДНК клетки сетчатки обладают низкой скоростью воспроизведения, которая, однако, может быть необходимой и достаточной для восстановления клеточной численности после отслойки в совокупности со вкладом ростовой зоны сетчатки.

При сравнении полученных нами данных на модели отслойки сетчатки у тритонов с результатами пролиферативной активности клеток после экспериментальной отслойки у млекопитающих (Fisher et al., 1991, 2005) выявились значительные отличия. По данным работ Фишера, очень низкой пролиферативной активностью в сетчатке в условиях отслойки обладают только ненеуральные клетки, а именно микро- и макроглия, а также макрофаги и васкулярные клетки. Таким образом, становится понятным, за счет каких клеток происходило ограничение регенерационных потенциалов от взрослых

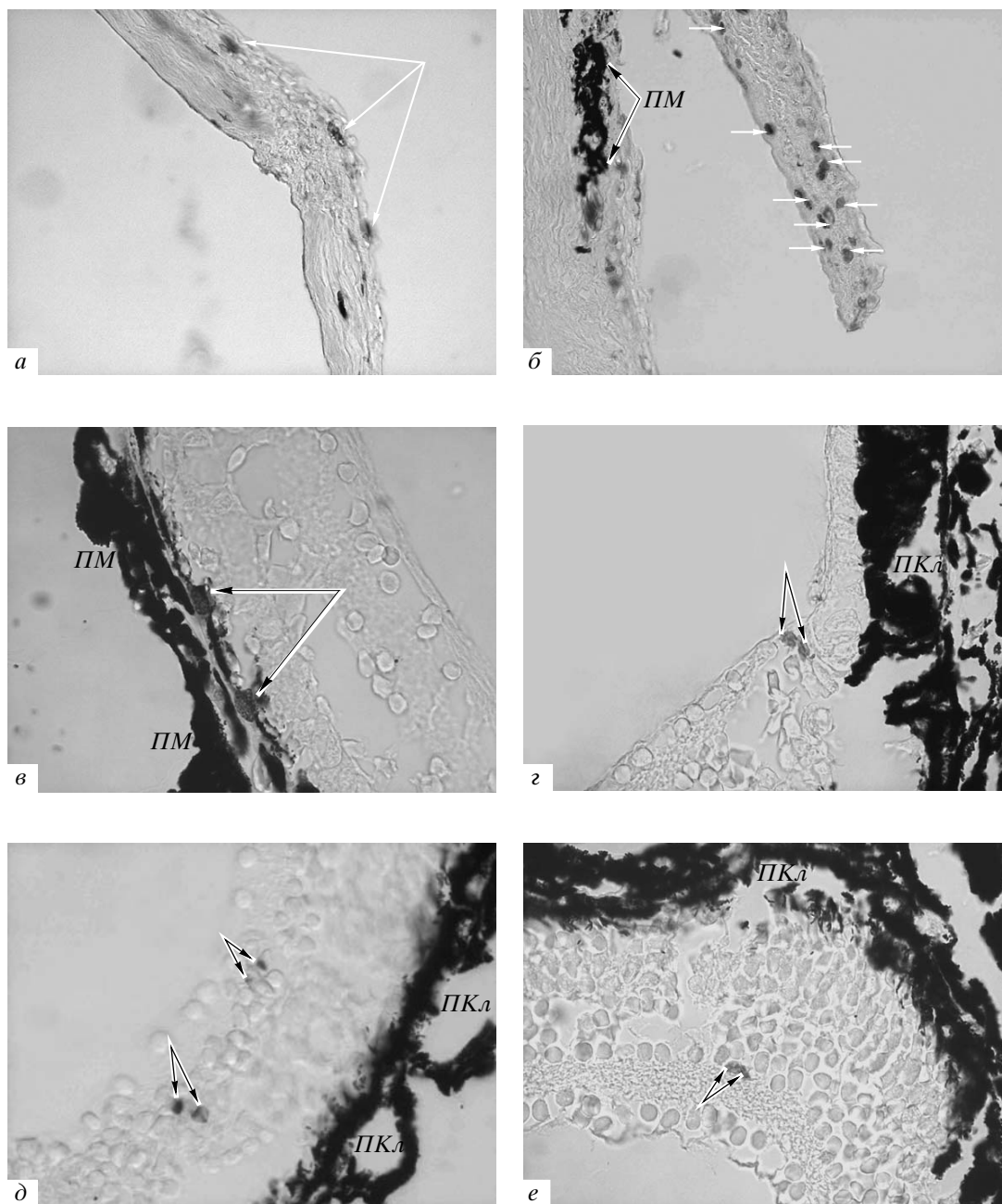


Рис. 2. Включение бромдеоксиуридина в клетки сетчатки после отслойки и в клетки наружных тканей глаза тритона (→): *а* – роговица, *б* – ткани века, *в* – пигментный эпителий; *г* – ростовая область сетчатки; *д*, *е* – витреальная часть внутреннего ядерного слоя сетчатки. *ПМ* – пигментированные меланоциты, *ПКл* – пигментированные клетки эпителия и сосудистой оболочки глаза. Увел.: ок. $\times 10$, об. $\times 40$.

низших к взрослым высшим позвоночным животным. Модели отслойки сетчатки у тритона и кошки демонстрируют “запрет” на пролиферацию, дедифференцировку и нейральную конверсию таким клеткам, как пигментный эпителий сетчатки, *ora-serrata* и исследуемые в настоящее время у низших позвоночных внутренние клетки-источники в слое интернейронов.

Сравнить полученные нами данные по пролиферации клеток сетчатки взрослого тритона с таковыми для рыб не просто, так как в исследованиях на рыбах такая модель повреждения не используется. Однако известны многочисленные работы по цитотоксическому, лазерному и криповреждениям сетчатки рыб (Hitchcock, Raymond, 1992; Raymond, Hitchcock, 1997; Cameron, 2000; Vihtelic, Hyde, 2000;

Wu et al., 2001). В целом эти исследования продемонстрировали наличие клеток-предшественников палочек в наружном ядерном слое, присутствие вероятного источника этих клеток во внутреннем ядерном слое, возможное участие их в регенерации клеток мюллеровской глии, а также постоянный приток клеток из ростовой зоны в процессе регенерации сетчатки у изученных животных. Эти сведения сближают типы клеток сетчатки у хвостатых амфибий и рыб. Такие клетки способны к синтезу ДНК и, как следствие, являются потенциальными источниками для регенерации сетчатки как после отслойки, так и при других типах повреждений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Григорян Э.Н. Полная отслойка сетчатки вызывает изменения экспрессии цитокератинов в клетках пигментного эпителия сетчатки у тритонов // Изв. АН. Сер. биол. 1995. № 4. С. 412–421.
- Григорян Э.Н. Сетчатка позвоночных: внутренний клеточный резерв для регенерации // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 6. С. 417–431.
- Григорян Э.Н., Поплинская В.А. Обнаружение внутренних источников регенерации нейральной сетчатки после ее отслойки у тритонов. II. Радиоавтографическое исследование // Изв. АН. Сер. биол. 1999. № 5. С. 583–591.
- Григорян Э.Н., Иванова И.П., Поплинская В.А. Обнаружение новых, внутренних источников регенерации нейральной сетчатки после ее отслойки у тритонов. I. Морфологическое и количественное исследования // Там же. 1996. № 3. С. 319–332.
- Мутаилов В.И. Динамика синтеза ДНК в клетках пигментного эпителия взрослых тритонов при восстановлении глаза после перерезки зрительного нерва и кровеносных сосудов // Цитология. 1970. Т. 12. № 12. С. 1521–1529.
- Мутаилов В.И. Закономерности изменений митотических циклов при клеточной трансформации и регенерации у низших позвоночных животных // Там же. 1980. Т. 22. № 4. С. 371–380.
- Almeida E.A.C., Roden C., Phillips J.A. et al. Analysis of cell proliferation in newt (*Pleurodeles waltl*) tissue regeneration during spaceflight in Foton M-2 // J. Gravitat. Physiol. 2006. V. 13. № 1. P. 185–188.
- Braisted J.E., Essman T.F., Raymond P.A. Selective regeneration of photoreceptors in goldfish retina // Development. 1994. V. 120. P. 2409–2419.
- Cameron D.A. Cellular proliferation and neurogenesis in the injured retina of adult zebrafish // Vis. Neurosci. 2000. V. 17. № 5. P. 789–797.
- Defoe D.M., Matsumoto B., Besharse J.C. Reconstitution of the photoreceptor – pigment epithelium interface: L-glutamate stimulation of adhesive interactions and rod disk shedding after recombination of dissociated *Xenopus laevis* eyecups // Exp. Eye Res. 1992. V. 54. P. 903–911.
- Fisher A.J., Reh T.A. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in the postnatal chicken retina // Devel. Biol. 2000. V. 220. P. 197–210.
- Fisher A.J., Reh T.A. Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken // Nat. Neurosci. 2001. V. 4. P. 247–252.
- Fisher S.K., Erickson P.A., Lewis G.P., Anderson D.H. Intra-retinal proliferation induced by retinal detachment // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1991. V. 32. № 6. P. 1739–1748.
- Fisher S.K., Lewis G.P., Linberg K.A., Verardo M.R. Cellular remodeling in mammalian retina: results from studies of experimental retinal detachment // Prog. Retin. Eye Res. 2005. V. 24. № 3. P. 395–431.
- Grigoryan E., Almeida E., Domaratskaya E. et al. Experiment “Regeneration” performed aboard the Russian spacecraft Foton M-2 in 2005 // J. Gravitat. Physiology. 2006. V. 13. № 1. P. 189–192.
- Hitchcock P.F., Raymond P.A. Retinal regeneration // Trends Neurosci. 1992. V. 15. P. 103–108.
- Kaplan M.W. Exposure of rod outer segments to serum is not responsible for abnormal disk membrane morphogenesis in a model of retinal detachment // Curr. Eye Res. 1998. V. 17. № 8. P. 793–797.
- Kaplan M.W., Iwata R.T., Sterrett C.B. Retinal detachment prevents normal assembly of disk membranes in vitro // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1990. V. 31. № 1. P. 1–8.
- Knight J.K., Raymond P.A. Retinal pigment epithelium does not transdifferentiate in adult goldfish // J. Neurobiol. 1995. V. 27. № 4. P. 447–456.
- Otteson D.C., D’Costa A.R., Hitchcock P.F. Putative stem cells and the lineage of rod photoreceptors in the mature retina of the goldfish // Devel. Biol. 2001. V. 232. P. 62–76.
- Raymond P.A., Hitchcock P.F. Retinal regeneration: common principles but diversity of mechanisms // Advan. Neurol. 1997. V. 72. P. 171–184.
- Reh T.A., Fisher A.J. Stem cells in the vertebrate retina // Brain Behav. Evol. 2001. V. 58. P. 296–305.
- Sethi C.S., Lewis G.P., Fisher S.K. et al. Glial remodeling and neural plasticity in human retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2005. V. 46. № 1. P. 329–342.
- Sherry D.M., Townes-Anderson E. Rapid glutamatergic alterations in the neural retina induced by retinal detachment // Ibid. V. 41. № 9. P. 2779–2790.
- Stiemke M.M., Hollyfield J.G. Cell birthdays in *Xenopus laevis* retina // Differentiation. 1995. V. 58. P. 189–193.
- Vihetic T.S., Hyde D.R. Light-induced rod and cone cell death and regeneration in the adult albino zebrafish (*Danio rerio*) retina // J. Neurobiol. 2000. V. 44. № 3. P. 289–307.
- Wu D.M., Schneiderman T., Burgett J. et al. Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2001. V. 42. P. 2115–2124.

A Study of the Localization and Accumulation of S-Phase Cells in the Retina of Newt *Pleurodeles waltl* after Experimental Pigment Epithelial Detachment

Yu. P. Novikova, V. A. Poplinskaya, K. S. Aleinikova, and E. N. Grigoryan

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119991 Russia
e-mail: novikovayulia@gmail.com*

Abstract—This work continues the studies of the proliferative ability of cells in the adult newt retina. The model of experimental detachment of the retina from pigment epithelium and two techniques to saturate the ocular tissues *in vivo* with precursors of DNA synthesis were used: (1) the method of repeated [³H]-thymidine labeling and subsequent autoradiographic analysis of semithin sections and (2) an original method for continuous labeling of thymidine analog bromodeoxyuridine and subsequent immunochemical detection. The data obtained confirm and extend our previous data on the localization of DNA-synthesizing cells in the neural retina and expose the pattern of S-phase cell accumulation after retinal detachment for each proliferation-competent cell population. In addition to cells in the growth zone of the retina, Muller glia, microglia, and minor cell population in the vitreal part of interneurons, DNA-synthesizing cells included astrocytes of the optic nerve and cells of its vascular network. Four weeks after detachment, the number of S-phase cells in the growth zone could reach 15–20%, while the above-mentioned DNA-synthesizing cells in the differentiated retina have low reproductive rate and could produce only one generation within the same period.

Key words: urodeles, retina, damage, regeneration, precursor cells, [³H]-thymidine, bromodeoxyuridine, saturation, DNA synthesis.