

## ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ ЦИСТАТИОНИН $\beta$ -СИНТАЗЫ, ЦИСТАТИОНИН $\gamma$ -ЛИАЗЫ, ГЕМОКСИГЕНАЗЫ-2 И NO-СИНТАЗЫ В СЕТЧАТКЕ ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2019 г. Н. Ю. Матвеева<sup>1,\*</sup>, С. Г. Калиниченко<sup>1</sup>, Е. П. Коцюба<sup>2</sup>,  
И. В. Ковалева<sup>1</sup>, С. С. Едранов<sup>1</sup>, Ю. А. Матвеев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

<sup>2</sup> Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, Владивосток, Россия

\*e-mail: nymatveeva@mail.ru

Поступила в редакцию 28.03.2018 г.

После доработки 25.01.2019 г.

Принята к публикации 20.02.2019 г.

Эндогенные газотрансмиттеры (ГТ): оксид азота (NO), монооксид углерода (CO) и сероводород (H<sub>2</sub>S) — формируют особую нейромодуляторную систему, опосредующую развитие, созревание и пластические модификации нервных центров. Мы исследовали иммунолокализацию ключевых ферментов синтеза ГТ: цистатионин  $\beta$ -синтазы (CBS), цистатионин  $\gamma$ -лиазы (CSE), гемоксигеназы-2 (HO-2) и конститутивной NO-синтазы (nNOS) — в развивающейся сетчатке глаза плодов человека на разных стадиях онтогенеза. CBS, CSE и HO-2 экспрессируются в фоторецепторных, биполярных и амакринных нейронах, количество которых возрастает в первом триместре и закономерно снижается в третьем триместре беременности. Количество nNOS-позитивных амакринных и ганглиозных нейронов демонстрирует обратную зависимость с максимальными значениями в третьем триместре. Неоднородное распределение изученных ферментов обсуждается в связи с модуляторной функцией ГТ в нейрогенезе сетчатки человека и их участием в цитопротективных механизмах.

**Ключевые слова:** нейрогенез, нейромодуляторы, цистатионин  $\beta$ -синтаза, цистатионин  $\gamma$ -лиаза, гемоксигеназа-2, конститутивная NO-синтаза

**DOI:** 10.1134/S0044452919030112

### ВВЕДЕНИЕ

Представление о газотрансмиттерах (ГТ) монооксиде углерода (CO), оксиде азота (NO) и сероводороде (H<sub>2</sub>S) возникло в середине 80-х годов прошлого столетия, когда были показаны их нейромодуляторные влияния в центральной и периферической нервной системе [1]. Прогресс в этом направлении исследований наметился после обнаружения ключевых ферментов синтеза ГТ, что дало возможность их топографического картирования. В мозге H<sub>2</sub>S синтезируется с помощью цистатионин  $\beta$ -синтазы (CBS; КФ 4.2.1.22) и цистатионин  $\gamma$ -лиазы (CSE; КФ 4.4.1.1), в образовании CO участвует гемоксигеназа-2 (HO-2; КФ 1.14.99.3), а в синтезе NO — различные изоформы NO-синтаз (NOS; КФ 1.14.13.39).

Методами биохимического анализа обнаружены высокие показатели активности ГТ в сетчатке обезьяны, крысы, черепахи и саламандры [2–5]. О распределении ГТ в стенке глаза человека судят, в основном, по активности конститутивной и ин-

дуцибельной NOS [6, 7]. Известно, что уровни выработки NO, H<sub>2</sub>S и CO являются критическими в развитии окислительного стресса при ретинальной дегенерации, глаукоме, атрофии оптического нерва и катаракты [8–11]. Однако топография CBS, CSE и HO-2 в сетчатке человека остается невыясненной.

Газообразные мессенджеры дополняют ГАМК/глутаматергическую нейротрансдукцию и выступают важным фактором дифференцировки нервных связей в онтогенезе [7, 8]. В сетчатке человека основной источник газотрансмиссии составляют NO-ергические фоторецепторы, амакринные и ганглиозные клетки [12]. Экспрессия NOS здесь имеет временной характер и меняется в течение эмбрионального развития. Данные относительно участия других ГТ в нейрогенезе сетчатки отсутствуют.

Цель настоящей работы состояла в исследовании иммунолокализации CBS, CSE, HO-2 и NOS в пренатальном онтогенезе сетчатки глаза человека.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследовали сетчатку 6 глаз от трех плодов человека 12–13 нед, 5 глаз от четырех плодов 21–22 нед и 5 глаз от трех плодов 30–31 нед развития. Плоды первого и второго триместра получали в результате самопроизвольного выкидыша и аборта, проведенного по медицинским показаниям (экстрагенитальное заболевание матери), третьего триместра – в результате интранатальной смерти плода (асфиксия) без врожденных пороков развития. Материал получали в КГБУЗ Владивостокском патологоанатомическом бюро согласно приказу МЗ России № 354н от 06.06.2013 г. “О порядке проведения патологоанатомических вскрытий”, приказу МЗ РФ № 179н от 24.03.2016 г. “О правилах проведения патологоанатомических исследований” и приказу Минздравсоцразвития РФ № 346н от 12.05.2010 г. “Порядок организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации”.

Для иммунохимического исследования локализации CBS, CSE, NO-2 и нейрональной изоформы (nNOS) изолированный глаз фиксировали в течение 4 ч в 4%-ном растворе параформальдегида, приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.2) при 4°C. После фиксации материал промывали в фосфатном буфере с интервалом 5–8 ч в течение суток. После чего помещали на сутки в холодный 30% раствор сахарозы на 0.1 М фосфатном буфере. Далее готовили криостатные срезы толщиной 30–35 мкм. После ингибирования эндогенной пероксидазы в 1%-ном растворе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 1%-ной нормальной сыворотке козы, срезы инкубировали в течение 18 ч при 4°C с поликлональными первичными антителами против CBS (Abcam, Великобритания) в разведении 1:1000, против CSE и NO-2 (Santa Crus Biotechnology, Inc., США) в разведении 1:500, против nNOS (Abcam, Великобритания) в разведении 1:200. Срезы промывали в нескольких сменах 0.1 М фосфатно-солевого буфера (PBS) (рН 7.2) и инкубировали 2 ч в растворе вторичных биотинилированных антител (Vector Labs, США) в разведении 1:200. После промывания срезы инкубировали в течение 1 ч с авидин-биотин-пероксидазным комплексом (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, США) при температуре 22–24°C в темноте, после чего их трижды промывали в PBS. Продукты реакции визуализировали при помощи субстрата (Vector VIP Peroxidase (HRP) Substrate Kit, Vector Labs, США), контролируя процесс окраски под микроскопом. Затем срезы промывали в трех сменах PBS, обезвоживали по стандартной методике и заключали в канадский балъзам. В качестве контроля из среды исключали первичные антитела. Во всех случаях иммунопозитивная реакция отсутствовала. Часть срезов окрашивали по Фельгену и Россенбеку.

Препараты просматривали в световом микроскопе AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали с помощью цифровой камеры Axio-Cam ICc3 (Carl Zeiss, Германия). Морфометрию и количественный анализ проводили в центральной сетчатке, соответствующей центральной ямке и около 6 мм вокруг нее. Количественный подсчет иммунореактивных клеток проводили на 15 серийных срезах задней стенки глаза, полученных от 5–6 глаз первого, второго и третьего триместра на стандартной площади среза 0.016 мм<sup>2</sup> при увеличении объектива ×40. Морфометрическую обработку полученных фотографий проводили с помощью пакета программ AxioVision 4.8.1. Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ Statistica для Microsoft Windows, версия 6.0. Данные количественного анализа представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего, полученных при обработке 15 серийных срезов каждого глаза. Для оценки значимости полученных результатов применяли *t*-критерий Стьюдента, значение доверительного интервала  $p < 0.05$  считали статистически значимым.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

У плодов 12–13 нед в сетчатке четко определяются шесть слоев клеток, их общая ширина достигает  $374 \pm 2.3$  мкм. На 21–22-й неделе развития ширина сетчатки составляет  $353.9 \pm 5.0$  мкм, а в конце третьего триместра –  $119.5 \pm 3.7$  мкм. К моменту рождения наибольшей ширины достигают наружный ядерный и внутренний сетчатый слои, а ганглиозный слой представлен одним-двумя рядами нейроцитов (рис. 1). На всех стадиях развития сетчатки CBS, CSE, NO-2 и nNOS экспрессируются в нейронах, их волокнах и синаптических терминалях, а также в пигментном эпителии, фибробластах сосудистой оболочки и эндотелии микрососудов. Топография изученных маркеров значительно варьирует на разных стадиях онтогенеза сетчатки (таблица 1). Пиковые значения CBS- и CSE-иммунореактивности приходятся на первый триместр с постепенным снижением к концу 30-й недели развития. Аналогичное распределение показывают NO-2-иммунореактивные клетки, с незначительным повышением их количества на 22-й неделе. Совершенно иную динамику распределения демонстрирует nNOS. Незначительная экспрессия фермента отмечается уже на 12-й неделе беременности, затем монотонно возрастает к 22-й неделе и достигает максимума к концу третьего триместра.

CBS маркирует гетерогенную популяцию клеток во всех ядерных слоях сетчатки. Локализация и степень окрашивания соматодендритной кроны позволяют выделить три категории CBS-иммунопозитивных клеток. Нейроны первого типа демонстрируют высокий уровень активности фермента: интенсивно окрашенный преципитат плотно за-

полняет все профильное поле клетки, проникая в отростки. Эти клетки, как правило, небольшого диаметра и располагаются примерно по центру внутреннего ядерного слоя. Нейроны второго типа обнаруживаются на границе внутреннего ядерного и внутреннего сетчатого слоев, имеют округлую форму тела, крупное светлое ядро и среднюю степень активности фермента. Нейроны третьего типа с низкой активностью фермента наблюдаются на границе внутреннего ядерного и наружного сетчатого слоев. Их перикарионы содержат незначительное количество бледно окрашенного осадка реакции, маркирующего еле заметные первичные дендриты (рис. 2а, 2б).

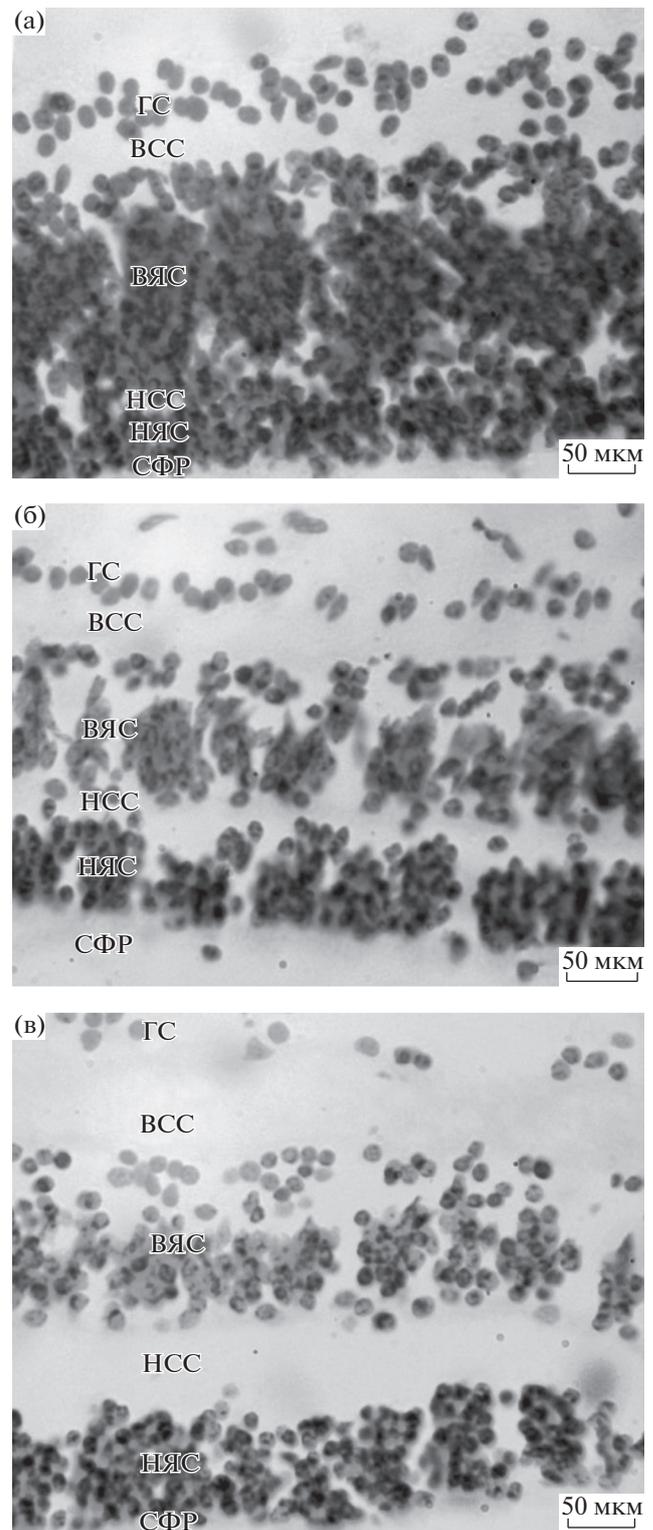
Нейроны ганглиозного слоя CBS не экспрессируют, однако, в нейропиле выявляется обилие точечных иммунореактивных структур, которые интерпретированы нами как синаптические терминалы интернейронов (рис. 2в). Синаптический характер распределения наблюдается и для CSE-иммунореактивных терминалов отростков фоторецепторов в наружном сетчатом слое (рис. 2г–2е). Фоторецепторы активно реагируют на NO-2. Фермент также выявляется в нейронах внутреннего ядерного и ганглиозного слоев (рис. 3а–3в).

NO-ергическую популяцию на всех стадиях развития сетчатки составляют клетки внутреннего ядерного и ганглиозного слоев. nNOS-позитивные клетки внутреннего ядерного слоя в основном крупного диаметра, локализуются на границе с внутренним сетчатым слоем (рис. 4а, 4б). Нейроны определяются по наличию единичного отростка, который продолжается в тонкий горизонтальный ствол, прослеживается на небольшой траектории, теряясь в нейропиле. Иммунореактивные нейроны ганглиозного слоя образуют небольшие кластеры из 3–6 клеток (рис. 4в). На остальном протяжении ганглиозного слоя nNOS не выявляется.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе установлена экспрессия CBS, CSE, NO-2 и nNOS в развивающейся сетчатке человека, которая характеризуется четкой пространственно-временной закономерностью и коррелирует с дифференцировкой ядерных слоев. Первые нейробласты у человека появляются во внутренней стенке глазного бокала в начале 7-й недели беременности. Сетчатка формируется в горизонтальном направлении от центра к периферии, а по вертикальной оси – от внутренних слоев к наружным. Организация дефинитивного порядка разных типов нейронов и их связей происходит асинхронно.

Зачаток сетчатки состоит из густого слоя нейробластов – источника дефинитивных нейронов [13]. В исследованный период развития мы наблюдали постепенное умножение слоев сетчатки. Этот



**Рис. 1.** Стратификация сетчатки плодов человека.

(а) 12–13-я неделя развития; (б) 21–22-я неделя развития; (в) 30–31-я неделя развития. СФР – слой фоторецепторов; НЯС – наружный ядерный слой; НСС – наружный сетчатый слой; ВЯС – внутренний ядерный слой; ВСС – внутренний сетчатый слой; ГС – ганглиозный слой. Метод Фельгена.

**Таблица 1.** Относительная плотность CSE-, CBS-, HO-2- и nNOS-иммунореактивных клеток в центральной сетчатке плодов человека в 0.016 мм<sup>2</sup> ( $M \pm m$ )

Ядерные слои сетчатки	Фермент	12–13-я неделя	21–22-я неделя	30–31-я неделя
Наружный ядерный слой	CSE	32.4 ± 2.7	23.1 ± 2.1	9.1 ± 1.8
	CBS	27.8 ± 2.2	18.8 ± 3.2	11.3 ± 1.6
	HO-2	29.2 ± 3.4	25.8 ± 2.1	8.5 ± 1.4
	nNOS	–	–	–
Внутренний ядерный слой	CSE	–	–	–
	CBS	38.7 ± 3.2	22.1 ± 2.2	9.9 ± 1.8
	HO-2	47.1 ± 3.,3	38.1 ± 1.3	10.1 ± 2.6
	nNOS	12.4 ± 2.5	21 ± 2.8	30 ± 1.1
Ганглиозный слой	CSE	–	–	–
	CBS	–	–	–
	HO-2	29.1 ± 2.7	17.5 ± 2.2	9.7 ± 1.3
	nNOS	15.3 ± 3.1	22.7 ± 2.1	34.1 ± 2.3

Примечание: CSE – цистатионин  $\gamma$ -лиаза; CBS – цистатионин  $\beta$ -синтаза; HO-2 – гемоксигеназа-2; nNOS – нейрональная NO-синтаза.

процесс инициируется закладкой примордиально-ганглиозного слоя и прохождением в глазной бокал провизорных ретинопетальных волокон. Последние создают направляющий “каркас” для первичного роста аксонов ганглиозных клеток [14]. После завершения миграции ганглиозных клеток последовательно дифференцируются колбочки, амакринные и горизонтальные нейроны. Позднее идет образование наружного и внутреннего ядерных слоев и наружного сетчатого слоя.

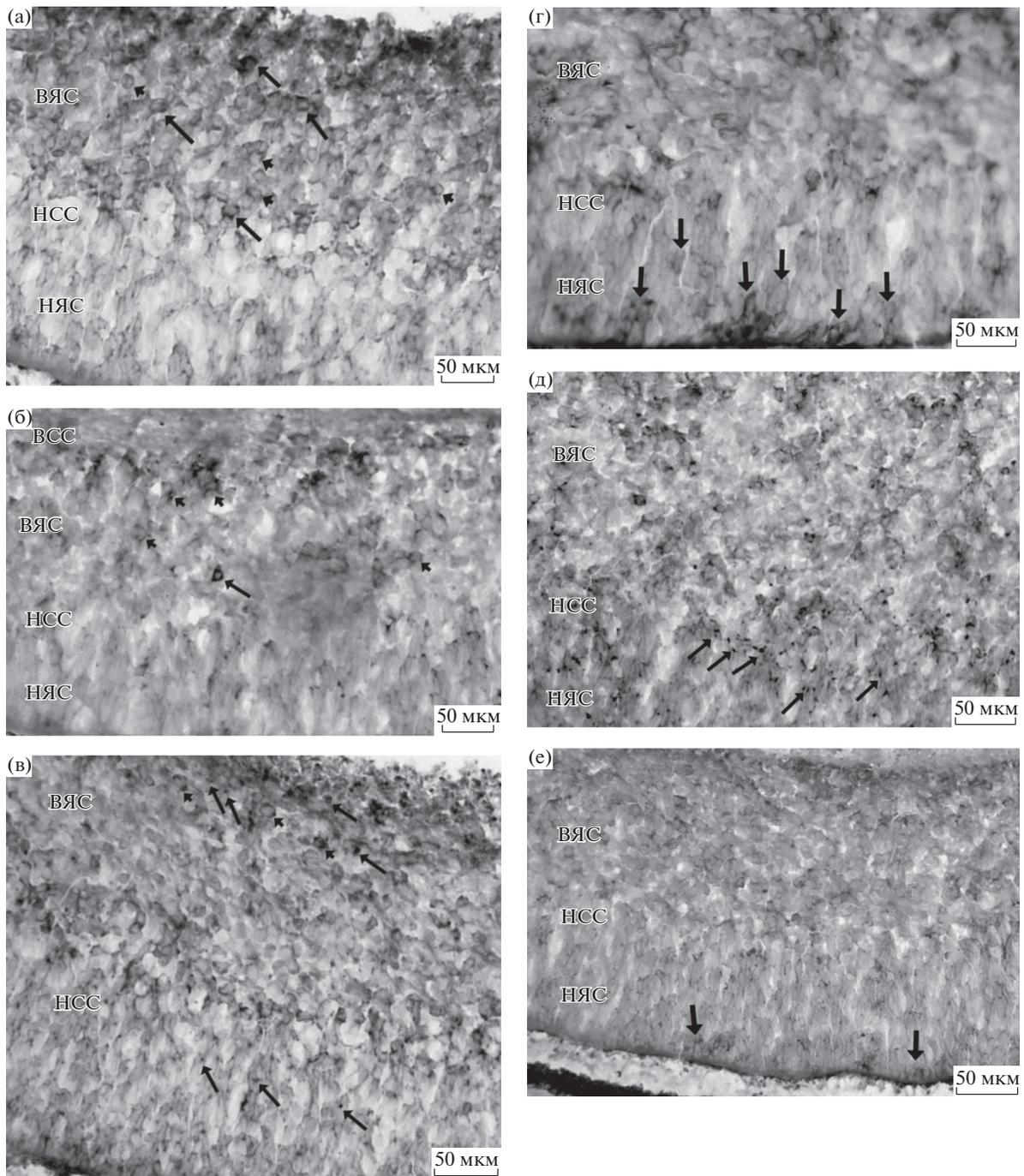
Твердо установлено определяющее значение NO в онтогенезе сетчатки человека [7]. Основным источником NO в развивающейся сетчатке человека являются фоторецепторы, амакринные и ганглиозные клетки [12, 15]. Соответствующий характер локализации NOS обнаруживается в постнатальном периоде развития человека, а также у птиц, грызунов и обезьян [2, 3, 7]. Это сходство позволяет рассматривать NO как универсальный фактор, регулирующий функцию нейронной сети в онтогенезе животных и человека.

Установленная нами иммунолокализация ферментов синтеза ГТ в онтогенезе человека повторяет принципиальный характер их распределения в сетчатке млекопитающих. При этом на ранних этапах развития проявляются черты, свойственные топографии ГТ у низших позвоночных. Например, у черепахи и саламандры антитела к HO-2 маркируют все типы фоторецепторов, биполярные и ганглиозные нейроны, а также небольшую популяцию амакринных клеток [2]. Такая же ситуация наблюдается у человека в первом триместре беременности. На поздних сроках беременности количество HO-2-позитивных фоторецепторов кардинально снижается, а популяции интернейронов и ганглиозных клеток начинают доминировать. Подобная

картина описана в сетчатке взрослых обезьян и крыс [2, 3].

В филогенезе млекопитающих обнаруживается неоднородная экспрессия CBS. Высокие уровни фермента экспрессируются в тканях глаза человека и свиньи [16]. В сетчатке мышей, по данным одних авторов, фермент полностью отсутствует [3], по мнению других – сосредоточен преимущественно в мюллеровской глии [17]. На пренатальном материале человека мы не смогли идентифицировать CBS в ганглиозных нейронах. Однако временное отсутствие CBS в развивающихся нейронах могут компенсировать другие ферменты синтеза H<sub>2</sub>S. На роль кандидатов здесь предлагается рассматривать цистеинаминотрансферазу и 3-меркаптопируват-сульфуртрансферазу [18]. Отметим, что CSE имеет преимущественно синаптическую локализацию, что может указывать на различные компартменты механизмов выработки H<sub>2</sub>S.

Ганглиозные клетки – единственный тип нейронов, которые синтезируют наиболее полный спектр ГТ в течение всего пренатального онтогенеза у человека. С учетом ранней закладки ганглиозных клеток можно предполагать инструктивную функцию ГТ в процессах нейрогенеза и миграции клеток к их надлежащим позициям в слоях сетчатки. Например, NO облегчает развитие конусов роста растущих ретиноктальных проекций [7]. Однако при гиперпродукции газа отмечается обратный эффект: NO блокирует започный цикл незрелых нейронов сетчатки и запускает их апоптоз [12, 19]. Это явление также описано в постнатальном онтогенезе и рассматривается как фактор селекции и специализации уже установленных связей [20].



**Рис. 2.** Типология CBS- и CSE-иммунореактивных нейронов в сетчатке глаза плодов человека.

(а) CBS-позитивные нейроны внутреннего ядерного слоя с высокой (длинные стрелки) и средней (короткие стрелки) степенью активности фермента; преципитат реакции локализуется в цитоплазме клеток и отростках; 12–13-я неделя развития.

(б) CBS-иммунореактивный нейрон внутреннего ядерного слоя с интенсивно окрашенным перикарионом (длинная стрелка); крупные нейроны с большим светлым ядром и радиальными отростками (короткая стрелка); 21–22-я неделя развития.

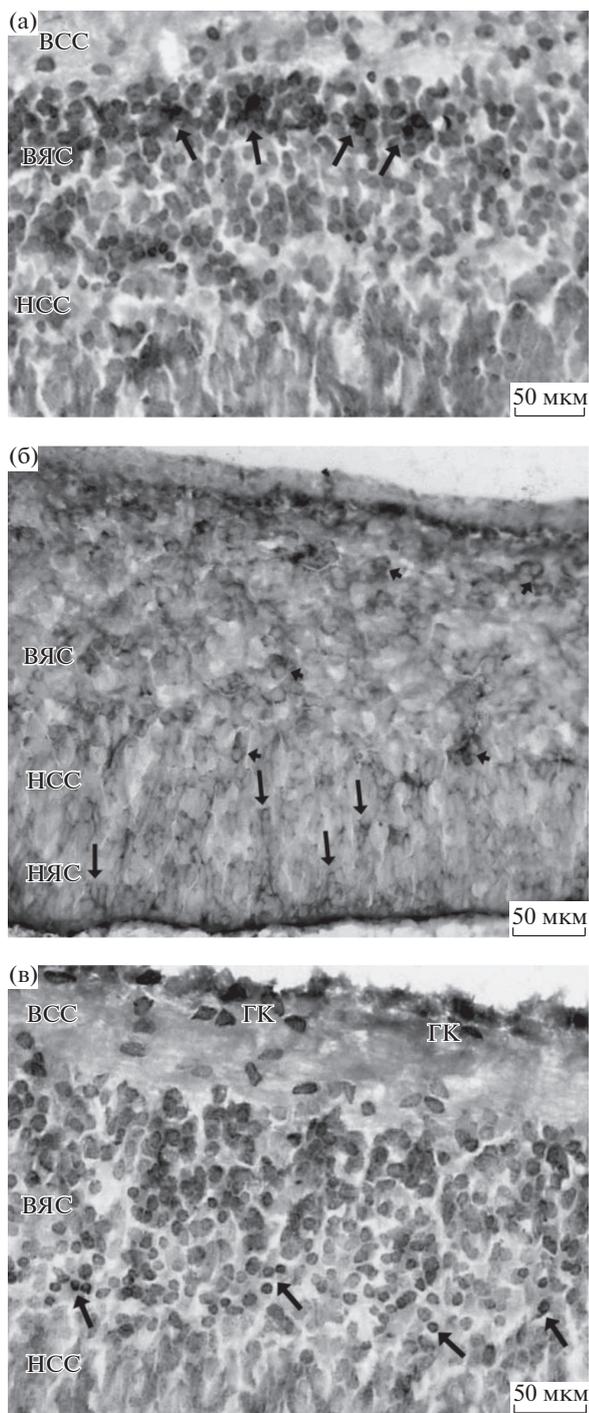
(в) CBS-позитивные нейроны на границе внутреннего сетчатого и внутреннего ядерного слоев (короткие стрелки). В наружном и внутреннем сетчатых слоях маркируются точечные структуры, имеющие признаки синаптических терминалей (длинные стрелки); 30–31-я неделя развития.

(г) CSE-иммунолокализация во внутренних сегментах фоторецепторных клеток (стрелки); 12–13-я неделя развития.

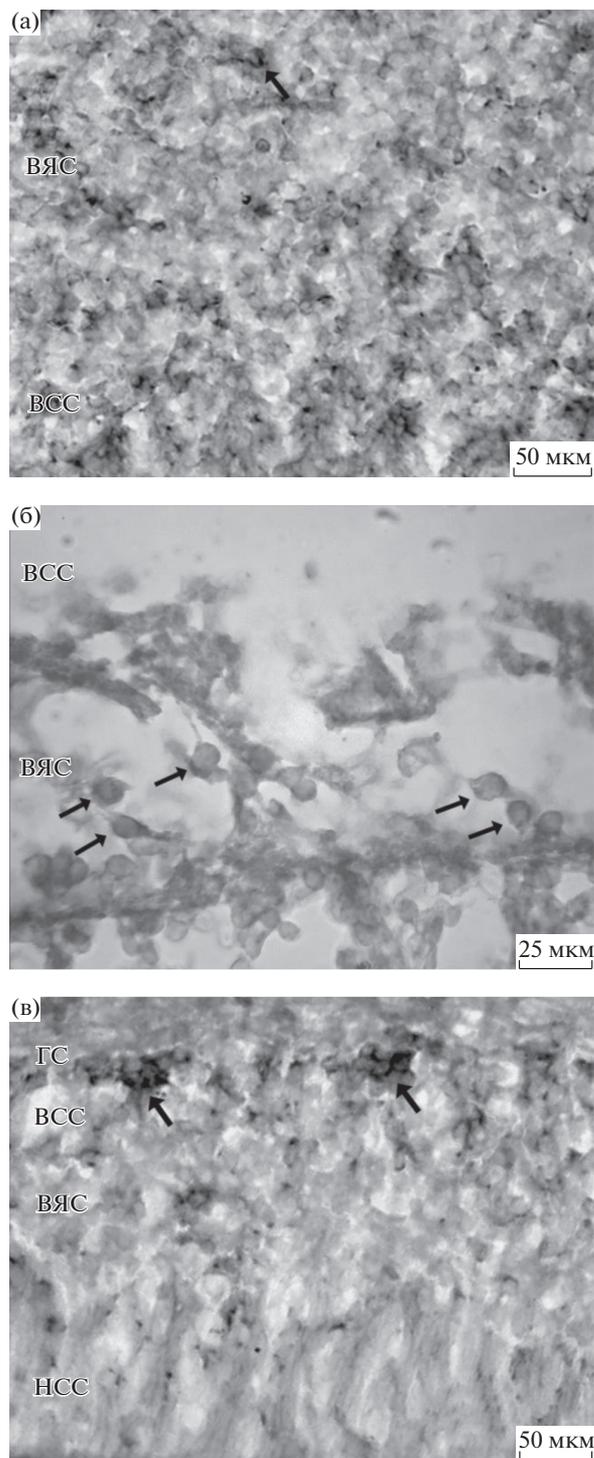
(д) CSE-иммунореактивные синаптические терминали фоторецепторов в наружном сетчатом слое (стрелки); 21–22-я неделя развития.

(е) Единичные CSE-позитивные внутренние сегменты фоторецепторных нейронов; 30–31-я неделя развития.

НЯС – наружный ядерный слой; НСС – наружный сетчатый слой; ВЯС – внутренний ядерный слой; ВСС – внутренний сетчатый слой.



**Рис. 3.** Топохимия NO-2 в сетчатке глаза плодов человека. (а) NO-2-позитивные нейроны внутреннего ядерного слоя (стрелки); 12–13-я неделя развития. (б) Экспрессия NO-2 во внутренних сегментах и терминалях фоторецепторов (длинные стрелки) и нейронах внутреннего ядерного слоя (короткие стрелки); 21–22-я неделя развития. (в) Локализация NO-2 в ганглиозных клетках (ГК) и интернейронах на границе внутреннего ядерного и наружного сетчатого слоев (стрелки); 30–31-я неделя развития. НЯС – наружный ядерный слой; НСС – наружный сетчатый слой; ВЯС – внутренний ядерный слой; ВСС – внутренний сетчатый слой.



**Рис. 4.** NO-ергические нейроны сетчатки плодов человека. (а) Во внутреннем ядерном слое определяется nNOS-позитивная клетка с горизонтально ветвящимся отростком (стрелка); 12–13-я неделя развития. (б) nNOS-позитивные клетки внутреннего ядерного слоя с крупным светлым ядром (стрелки); 21–22-я неделя. (в) Кластеры nNOS-иммунореактивных нейронов ганглиозного слоя (стрелки); 30–31-я неделя развития. НСС – наружный сетчатый слой; ВЯС – внутренний ядерный слой; ВСС – внутренний сетчатый слой; ГК – ганглиозный слой.

Гетерогенное и гетерохронное созревание газотрансмиттерных систем сопряжено, вероятно, с формированием медиаторной функции некоторых типов нейронов. Имеются данные о том, что в развивающейся сетчатке позвоночных медленные и быстрые нейротрансмиттеры модулируют пролиферацию клеток-предшественников. При этом ГАМК и глутамат оказывают взаимоисключаемое влияние на клеточный цикл мигрирующих нейробластов [15]. Не исключено, что подобные отношения складываются и между различными ГТ.

Сетчатка имеет плотно упакованный нейропил с обилием синаптических и щелевых контактов между нейронами. На всех стадиях онтогенеза выявляется одновременная экспрессия всех изученных ферментов, что указывает на сочетанное воздействие ГТ на клетки-мишени. Так, в сетчатке саламандры суммарное воздействие NO и CO проявляется в значительном увеличении уровня цГМФ [4]. Диффузия и физиологические эффекты ГТ распространяются как минимум на 100 мкм от источника и наверняка имеют зоны взаимного влияния. Предполагается [21], что CO способствует выделению монооксида азота и сенсибилизирует различные домены гуанилатциклазы к связыванию молекул NO. H<sub>2</sub>S не воздействует напрямую на гуанилатциклазу, но может модифицировать цГМФ-зависимые механизмы косвенно. H<sub>2</sub>S усиливает динамику ионов кальция и индуцирует их высвобождение из внутриклеточных депо [22–24]. Хотя нарастание Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме является непременным условием активации NOS, H<sub>2</sub>S может ингибировать NO-зависимую аккумуляцию цГМФ [5, 25].

Следует отметить, что газообразные мессенджеры имеют широкое представительство в пигментных, фибробластах сосудистой оболочки и эндотелии микрососудов, что указывает на участие их в регуляции практически всех компонентов стенки глаза. Так, возникновение пигментного эпителия является индуцирующим стимулом для дифференцировки нейромезенхимы и корректной ориентации наружных сегментов фоторецепторов. Не исключено, что ГТ могут опосредовать эти сигнальные процессы. Во всяком случае, такая функция показана для молекул NO в формирующейся сетчатке птиц и земноводных [3]. Активность CBS и CSE в тканях глаза часто коррелирует с нейропротективным действием H<sub>2</sub>S. Доноры H<sub>2</sub>S ингибируют АТФ-зависимые K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-каналы и положительно влияют на биосинтез глутатиона – важнейшего элемента антиоксидантной защиты [26]. Активная выработка H<sub>2</sub>S угнетает симпатические влияния на мышечные клетки сосудистой оболочки глаза, а в сетчатке ограничивает распространение глутаматергической трансмиссии и связанные с ней цитотоксические эффекты [27, 28]. Однако в зависимости от концентрации и типа клеток-мишеней ГТ могут менять свое протективное дей-

ствие на противоположное [29]. Взаимосвязь выработки ГТ и окислительного стресса в результате накопления свободнорадикальных форм активного кислорода рассматривается как рекапитуляция эволюционного процесса при переходе анаэробного метаболизма на кислородные формы клеточного дыхания [30].

Таким образом, формирование газообразной трансмиссии представляет важный компонент дифференцировки ранних нейронных систем в онтогенезе сетчатки глаза человека. ГТ модулируют становление надлежащих связей, обеспечивают их жизнеспособность и адаптацию к различным пластическим перестройкам.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Материал получали в КГБУЗ Владивостокском патологоанатомическом бюро согласно приказу МЗ России № 354н от 06.06.2013 г. “О порядке проведения патологоанатомических вскрытий”, приказу МЗ РФ № 179н от 24.03.2016 г. “О правилах проведения патологоанатомических исследований” и приказу Минздравсоцразвития РФ № 346н от 12.05.2010 г. “Порядок организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусакова С.В., Ковалев И.В., Смаглий Л.В., Бирулина Ю.Г., Носарев А.В., Петрова И.В., Медведев М.А., Орлов С.Н., Реутов В.П. Газовая сигнализация в клетках млекопитающих. Успехи физиол. наук. 46 (4): 53–73. 2015. [Gusakova S.V., Kovalev I.V., Smaglyi L.V., Birulina Y.G., Nosare A.V., Petrova I.V., Medvedev M.A., Orlov S.N., Reutov V.P. Gas Signalling in Mammalian Cells. Uspekhi fiziologicheskikh nauk. 46 (4): 53–73. 2015. (In Russ.)].
2. Cao L., Blute T.A., Eldred W.D. Localization of heme oxygenase-2 and modulation of cGMP levels by carbon monoxide and/or nitric oxide in the retina. *Vis. Neurosci.* 17: 319–329. 2000.
3. Ma N., Ding X., Doi M., Izumi N., Semba R. Cellular and subcellular localization of heme oxygenase-2 in monkey retina. *J. Neurocytol.* 33 (4): 407–415. 2004.
4. Pong W.W., Stouracova R., Frank N., Kraus J., Eldred W.D. Comparative localization of cystathionine  $\beta$ -synthase and cystathionine  $\gamma$ -lyase in retina: differences between amphibians and mammals. *J. Comp. Neurol.* 505: 158–165. 2007.
5. Pong W.W., Eldred W.D. Interactions of the gaseous neuromodulators nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the salamander retina. *J. Neurosci. Res.* 87: 2356–2364. 2009.
6. Socodato R., Portugal C.C., Encarnação T.G., Domith I., Cossenza M., Paes-de-Carvalho R. Studying nitric oxide in the developing retina: neuromodulatory functions and signaling mechanisms. *The Open Nitric Oxide J.* 4: 1–15. 2013.

7. Lima M.G., Maximino C., Matos Oliveira K.R., Brasil A., Crespo-Lopez M.E., Batista Ede J., Rocha F.A., Picanço-Diniz D.L., Herculano A.M. Nitric oxide as a regulatory molecule in the processing of the visual stimulus. *Nitric Oxide*. 36: 44–50. 2014.
8. Сукманский О.И., Реутов В.П. Газотрансмиттеры: физиологическая роль и участие в патогенезе заболеваний. *Успехи физиол. наук*. 47 (3): 30–58. 2016. [Sukmansky O.I., Reutov V.P. Gasotransmitters: Physiological Role and Involvement in the Pathogenesis of the Diseases. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 47 (3): 30–58. 2016. (In Russ.)].
9. Kraus J.P., Kozich V. Cystathionine  $\beta$ -synthase and its deficiency. Homocysteine in health and disease / Eds R. Carmel, D.W. Jacobsen. Cambridge University Press. 223–243. 2001.
10. Mudd S.H., Levy H.L., Kraus J.P. Disorders of trans-sulfuration. The metabolic and molecular bases of inherited disease / Eds C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, B. Childs, K. Kinzel, B. Vogelstein. McGraw-Hill, New York. 2007–2056. 2001.
11. Fernandes K.A., Harder J.M., Williams P.A., Rausch R.L., Kiernan A.E., Nair K.S., Anderson M.G., John S.W.M., Howell G.R., Libby R.T. Using genetic mouse models to gain insight into glaucoma: past results and future possibilities. *Exp. Eye Res*. 141: 42–56. 2015
12. Матвеева Н.Ю., Калинин С.Г., Пуцин И.И., Мотавкин П.А. Роль оксида азота в апоптозе нейронов сетчатки глаза плодов человека. *Морфология*. 129 (1): 42–49. 2006. [Matveyeva N.Yu., Kalinichenko S.G., Pushchin I.I., Motavkin P.A. Role of nitric oxide in apoptosis of retinal neurons in human fetuses. *Morphology*. 129 (1): 42–49. 2006. (In Russ.)].
13. Reichenbach A., Robinson S.R. Phylogenetic constraints on retinal organization and development. *Prog. Retin. Eye Res*. 15 (1): 139–171. 1995.
14. Миташов В.И. Мультипотентные и стволовые клетки в развивающемся, сформированном и регенерирующем глазу позвоночных животных. *Изв. РАН. Сер. биол.* 6: 717–727. 2001. [Mitashov V.I. Multipotent and stem cells in the developing, definitive, and regenerating vertebrate eye. *Izvestiya rossijskoj akademii nauk. Seriya biologicheskaya*. 6: 717–727. 2001. (In Russ.)].
15. Martins R.A., Pearson R.A. Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res*. 1192: 37–60. 2008.
16. Persa C., Osmotherly K., Chao-Wei Chen K., Moon S., Lou M.F. The distribution of cystathionine beta-synthase (CBS) in the eye: implication of the presence of a trans-sulfuration pathway for oxidative stress defense. *Exp. Eye Res*. 83 (4): 817–823. 2006.
17. Markand S., Tawfik A., Ha Y., Gnana-Prakasam J., Sonne S., Ganapathy V., Sen N., Xian M., Smith S.B. Cystathionine beta synthase expression in mouse retina. *Curr. Eye Res*. 38 (5): 597–604. 2013.
18. Mikami Y., Shibuya N., Kimura Y., Nagahara N., Yamada Y., Kimura H. Hydrogen sulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *J. Biol. Chem*. 286 (45): 39379–39386. 2011.
19. Калинин С.Г., Матвеева Н.Ю. Морфологическая характеристика апоптоза и его значение в нейрогенезе. *Морфология*. 131 (2): 16–28. 2007. [Kalinichenko S.G., Matveyeva N.Yu. Morphological characteristic of apoptosis and its significance in neurogenesis. *Morphology*. 131 (2): 16–28. 2007. (In Russ.)].
20. Калинин С.Г., Мотавкин П.А. Кора мозжечка. М.: Наука, 2005. [Kalinichenko S.G., Motavkin P.A. Кора мозжечка [Cerebellar cortex]. М.: Наука, 2005.]
21. Zhao W., Wang R. H<sub>2</sub>S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am. J. Physiol*. 283: 474–480. 2002.
22. Матвеева Н.Ю. Нейрохимическая специализация нейронов сетчатки. *ТМЖ*. 2: 66–70. 2012. [Matveyeva N.Yu. Neurochemical specialisation of retinal neurons. *Tikhookeanskij medicinskij zhurnal*. 2: 66–70. 2012. (In Russ.)].
23. Nagai Y., Tsugane M., Oka J., Kimura H. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB J*. 18: 557–559. 2004.
24. García-Bereguiaín M.A., Samhan-Arias A.K., Martín-Romero F.J., Gutiérrez-Merino C. Hydrogen sulfide raises cytosolic calcium in neurons through activation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Antioxid. Redox Signal*. 10 (1): 31–42. 2008.
25. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Швалев В.Н., Космачевская О.В., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Свинов М.М., Косицын Н.С. Возможная роль диоксида азота, образующегося в местах бифуркации сосудов, в процессах их повреждения при геморрагических инсультах и образовании атеросклеротических бляшек. *Усп. физиол. наук*. 43 (4): 73–93. 2012. [Reutov V.P., Sorokina E.G., Shvalev V.N., Kosmachevskaya O.V., Krushinsky A.L., Kuzenkov V.S., Svinov M.M., Kositsyn N.S. The Possible Role of Nitrogen Dioxide Produced in the Field of Bifurcation of Vessels, in the Processes of Their Damage in Hemorrhagic Strokes, and the Formation of Atherosclerotic Plaques. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 43 (4): 73–93. 2012. (In Russ.)].
26. Osborne N.N., Ji D., Abdul Majid A.S., Fawcett R.J., Sparatore A., Del S.P. ACS67, a hydrogen sulfide-releasing derivative of latanoprost acid, attenuates retinal ischemia and oxidative stress to RGC-5 cells in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 51: 284–294. 2010.
27. Гусакова С.В., Смаглий Л.В., Бирулина Ю.Г., Ковалев И.В., Носарев А.В., Петрова И.В., Реутов В.П. Молекулярные механизмы действия газотрансмиттеров NO, CO и H<sub>2</sub>S в гладкомышечных клетках и влияние NO-генерирующих соединений (нитратов и нитритов) на среднюю продолжительность жизни. *Усп. физиол. наук*. 4 (1): 24–52. 2017. [Gusakova S.V., Smaglyi L.V., Birulina Y.G., Kovalev I.V., Nosarev V., Petrova I.V., Reutov V.P. Molecular Mechanisms of Action of Gas Transmitters NO, CO and H<sub>2</sub>S in Smooth Muscle Cells and Effect of NO-generating Compounds (Nitrates and Nitrites) on Average Life Expectancy. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 4 (1): 24–52. 2017. (In Russ.)].
28. Njie-Mbye Y.F., Opere C.A., Chitnis M., Ohia S.E. Hydrogen sulfide: role in ion channel and transporter modulation in the eye. *Front. Physiol*. 2012. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00295>

29. Охотин В.Е., Калинин С.Г., Дудина Ю.В. NO-ергическая трансмиссия и NO как объемный нейротрансмиттер. Влияние NO на механизмы синаптической пластичности и эпилептогенез. Усп. физ. наук. 33 (2): 41–55. 2002. [Okhotin V.E., Kalinichenko S.G., Dudina Yu.V. NO-ergic transmission and NO as a volume transmitter. effect of no on mechanisms of synaptic plasticity and epileptogenesis. Uspekhi fiziologicheskikh nauk. 33 (2): 41–55. 2002. (In Russ.)].
30. Olson K.R., Donald J.A., Dombkowski R.A., Perry S.F. Evolutionary and comparative aspects of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide. Resp. Physiol. Neurobi. 184 (2): 117–129. 2012.

## Immunolocalization of Cystathionine $\beta$ -Synthase, Cystathionine $\gamma$ -Lyase, Heme Oxygenase-2, and Nitric Oxide Synthase in the Human Fetal Retina in Different Gestational Trimesters

N. Yu. Matveeva<sup>a,#</sup>, S. G. Kalinichenko<sup>a</sup>, E. P. Kotsyuba<sup>b</sup>, I. V. Kovaleva<sup>a</sup>,  
S. S. Edranov<sup>a</sup>, and Yu. A. Matveev<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

<sup>b</sup> A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

<sup>#</sup>e-mail: nymatveeva@mail.ru

The endogenous gaseous transmitters (GTs), nitrogen oxide (NO), carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), make up a special neuromodulatory system which mediates the development, maturation and plastic modification of nervous centers. We addressed immunolocalization of the key enzymes of GT synthesis, cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS), cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE), heme oxygenase-2 (HO-2) and constitutive NO synthase (nNOS), at different ontogenetic stages of the human fetal retina. CBS, CSE and HO-2 were found to be expressed in photoreceptor, bipolar and amacrine neurons, the number of which increases in the first and decreases in the third semesters of pregnancy. The number of nNOS-immunopositive amacrine and ganglion neurons demonstrates inverse dynamics with maximal values in the third semester. Uneven distribution patterns of the marker enzymes are discussed in the light of the modulatory function of GTs in neurogenesis of the human retina and their involvement in cytoprotective mechanisms.

**Keywords:** neurogenesis, neuromodulators, cystathionine  $\beta$ -synthase, cystathionine  $\gamma$ -lyase, heme oxygenase-2, constitutive NO-synthase