

УДК 598.1:591.484.6

**РАЗЛИЧИЯ В МОРФОЛОГИИ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА
И ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ У УЖЕОБРАЗНЫХ (COLUBRIDAE)
И ГАДЮКОВЫХ (VIPERIDAE) ЗМЕЙ
(на примере *Hierophis caspius*, *Natrix natrix* и *Pelias berus*)**

Р. В. Желанкин

*Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича РАН
Россия, 127051, Москва, Большой Каретный пер., 19, стр. 1
E-mail: littletick@ya.ru*

Поступила в редакцию 23.06.14 г.

Различия в морфологии сетчатки глаза и пигментного эпителия у ужеобразных (Colubridae) и гадюковых (Viperidae) змей (на примере *Hierophis caspius*, *Natrix natrix* и *Pelias berus*). – Желанкин Р. В. – Морфологию пигментного эпителия (ПЭ) и сетчатки глаза трех видов змей – ужа обыкновенного (*Natrix natrix* Linnaeus, 1758), желтобрюхого полоза (*Hierophis caspius* Gmelin, 1789) и гадюки обыкновенной (*Pelias berus* Linnaeus, 1758) исследовали средствами световой микроскопии на гистологических срезах и плоских препаратах сетчатки вместе с ПЭ. Средняя толщина сетчатки и большинства её слоёв у полоза в 1.8 раза больше, чем у гадюки. Фоторецепторы и клетки ПЭ гадюки мельче и расположены плотнее, чем у ужа. Ганглиозные клетки сетчатки гадюки крупнее, чем у ужа. Фоторецепторы у обоих видов можно условно разделить на крупные и мелкие ($p < 0.001$). Доля мелких у гадюки выше (27.7%) чем у ужа (15.4%). Значения плотности фоторецепторов у *P. berus* в среднем не отличались от таковых у *N. natrix*.

Ключевые слова: змеи, строение сетчатки, фоторецепторы.

Morphological distinctions of the retina and pigment epithelium in the Colubridae and Viperidae snake families (on examples of *Hierophis caspius*, *Natrix natrix*, and *Pelias berus*). – Zhelankin R. V. – The morphology of the pigment epithelium (PE) and the retina of three snake species: grass snake (*Natrix natrix*), large whip snake (*Hierophis caspius*), and common viper (*Pelias berus*) was investigated by light microscopy on histological sections and flat retina preparations with PE. The retina and the majority of its layers in the Colubrids (large whip snake) are 1.8 times thicker (on average) than in the Viperids (common viper). The photoreceptors and PE cells in *P. berus* are smaller and arranged more densely than in *N. natrix* while the retinal ganglion cells are larger. The photoreceptors in both the species can be divided into large and small ($p < 0.001$). The proportion of small ones in *P. berus* is higher (27.7%) than in *N. natrix* (15.4%). The photoreceptor densities in *P. berus* did not differ from those in *N. natrix* on average.

Key words: snakes, retina, photoreceptors.

ВВЕДЕНИЕ

Змеи – одни из наиболее специализированных хищников среди рептилий, большинство из которых в процессе охоты полагаются исключительно на зрение и обоняние. В сетчатке змей по современной классификации выделяют 10 слоёв: пигментный эпителий, наружные сегменты фоторецепторов, наружная пограничная мембрана, наружный зернистый слой, наружный сетчатый слой, внутренний зернистый слой, внутренний сетчатый слой, слой ганглиозных клеток, слой нервных

волокон, внутренняя пограничная мембрана (Walls, 1963). Ультраструктура фоторецептора змей в целом подобна таковой у других позвоночных животных, но наблюдается отсутствие жировых капель, в отличие от дневных ящериц, черепах и птиц (Давыдова, 1993). Функция жировых капель в фоторецепторах указанных позвоночных – поглощение отдельных световых волн, за счет чего достигается восприятие цветов при изменении интенсивности освещенности. На данный момент в свободном доступе существуют статьи и тезисы, в которых рассматривается только строение и физиолого-биохимическое описание фоторецепторов змей. Так, у дневных высших змей (Caenophidia) имеется большое разнообразие колбочек – до 4 типов, содержащих различные типы пигментов, а палочки имеются не у всех представителей, и в частности их нет у змей семейства ужеобразных (Colubridae). Только у одного из типов фоторецепторов ужеобразных (тип С) наблюдается структура и функции, подобные колбочкам удавообразных змей (Boidae); и этот тип присутствует только в небольшом количестве. У представителя семейства ужеобразных (Colubridae) – обыкновенной подвязочной змеи (*Thamnophis sirtalis*) – имеется 4 типа колбочковых фоторецепторов: 45.5% двойных колбочек, 40% больших единичных колбочек и 14.5% малых единичных колбочек (Sillman et al., 1997).

У гадюковых (Viperidae) и ямкоголовых змей (Crotalidae) чисто дневной «колббридный» тип колбочек, полученный независимо от ужеобразных предков, снова развился и вторично преобразовался путем превращения колбочки типа С в палочку. Так, сетчатка рогатой гадюки (*Cerastes cerastes*) включает два типа колбочек: большие одинарные колбочки и малые одинарные колбочки, а также палочки – наиболее мелкие из фоторецепторов (Khattab Fairuze et al., 2004). Сетчатки двух видов гадюковых змей – гадюки обыкновенной (*Pelias berus*) и гюрзы (*Vipera lebetina*) – были изучены с помощью световой и электронной микроскопии и микроспектрофотометрии Говардовским и Чхеидзе (Govardovskii, Chkheidze, 1989). У этих змей в сетчатке обнаружены палочки, двойные колбочки, большие и малые одинарные колбочки. Из приведенных данных видно, что сетчатка гадюковых змей (Viperidae) более адаптирована к сумеречным условиям обитания, а ужеобразных (Colubridae) – к дневным условиям.

В настоящем исследовании сделана попытка сравнения морфологии сетчатки глаза обыкновенного ужа (*Natrix natrix* Linnaeus, 1758), желтобрюхого полоза (*Hierophis caspius* Gmelin, 1789) и обыкновенной гадюки (*Pelias berus* Linnaeus, 1758). Эти змеи принадлежат к разным семействам, и нашей задачей было сравнение морфологии сетчатки этих групп и обоснование сходств и различий с учетом литературных данных по морфологии, эволюции и образу жизни змей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Под световым микроскопом (Axioplan, Carl Zeiss) исследовали готовые окрашенные гематоксилин-эозином поперечные срезы глазных бокалов желтобрюхого полоза и обыкновенной гадюки (из коллекции постоянных препаратов, изготовленных ранее И. А. Кнорре), а также временные плоские препараты сетчатки с пигментным эпителием обыкновенного ужа и обыкновенной гадюки (по две особи).

Для изготовления этих препаратов животных предварительно наркотизировали уретаном и оставляли на 30 минут на ярком свете для лучшей связи ПЭ с сетчаткой. Глазные яблоки умерщвленных животных перфузировали 10% раствором параформа и оставляли *in situ* на 30 мин до их извлечения из головы, чтобы придать нежным тканям консистенцию, необходимую для дальнейших манипуляций с материалом. После удаления передних сред, дно глаза вместе со склерой надрезали на несколько лепестков (с центром у выхода зрительного нерва), сохраняя отметку его естественной ориентации, и сетчатку с пигментным эпителием отделяли от склеры с хороидом. Покрытые покровным стеклом препараты изучали визуально, а подсчет размеров и плотности клеток сетчатки и пигментного эпителия делали по цифровым изображениям, полученным с помощью камеры Olympus – C 70-70, 7.1 мегапикселей с помощью графических модулей VitPolygone и Cell Count, любезно предоставленных В. Ф. Гнубкиным и П. В. Максимовым (Программа CellCount, 2014). Размеры клеток и их плотность оценивали посредством пересчета числа пикселей (поперечников клеток и выделенных для подсчета областей изображения) в их линейные размеры (модуль VitPolygone), и путем визуального подсчета клеток в выделенных участках (модуль Cell Count). Для оценки статистической значимости результатов использовалась программа IBM SPSS Statistics version 21.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение постоянных гистологических препаратов поперечных срезов сетчатки *H. caspius* и *P. berus*, окрашенных гематоксилин-эозином, показывает их значительные морфологические отличия. Средняя толщина сетчатки полоза в 1.8 раза больше таковой у обыкновенной гадюки (206.29 ± 6.67 и 114.26 ± 3.83 мкм, $p < 0.001$). Соответственно различается толщина большинства её слоёв (рис. 1, 2). Особенно выражено различие внутреннего ядерного слоя (рис. 1, 8), а также наружного (рис. 1, 7) и внутреннего сетчатого слоев. Эти морфологические показатели очень важны для сравнительной функциональной оценки совершенства сетчатки, поскольку большое относительное число интернейронов внутреннего ядерного слоя в расчете на число фоторецепторов служит свидетельством многообразия способов обработки входного изображения нервной сетчаткой. Этот показатель высок у животных с совершенным зрением, например, у птиц, и мал у животных с ночным типом зрения, когда главной задачей является суммация сигнала от множества фоторецепторов меньшим числом интернейронов и еще того меньшим числом ганглиозных клеток (так называемая воронка суммации, обычная у животных с палочковой сетчаткой). Так, на одном из участков сетчатки полоза насчитывается 10% ядер фоторецепторов, 82% ядер интернейронов и 8% ганглиозных клеток против 20, 62 и 18% у гадюки. Из этих цифр самым показательным является число интернейронов на один фоторецептор; оно равно 8 у полоза и всего 3 у гадюки. Даже с учетом того, что в подсчет могли быть включены ядра клеток мюллеровской глии, эти различия очень значительны и говорят в пользу представителя семейства ужей.

Очень значимы также различия в толщине синаптических слоев, которые, по сути, являются областями переработки изображения интернейронами разных функциональных классов, благодаря специфике их цитоархитектоники – устройства зоны синаптического переключения сигналов. В наружном синаптическом слое полоза, благодаря упорядоченной мозаике фоторецепторов, при удачной ориентации плоскости среза сетчатки видны регулярные ряды синаптических комплексов (см. рис. 1, 7).

Размер ганглиозных клеток у гадюки в 2 раза больше, чем у полоза (16.22 ± 2.03 и 8.08 ± 1.34 мкм, $p < 0.001$), но у полоза они расположены более упорядоченно. Ядра фоторецепторов у полоза крупнее (в 1.57 раза), чем у гадюки (9.32 ± 1.26 и 5.92 ± 0.49 мкм, $p < 0.001$). Расстояние от ядер фоторецепторов до ядер пигментных клеток у полоза превышает таковое у гадюки в 2.85 раза (58.1 ± 6.36 и 20.37 ± 6.23 мкм соответственно), но при этом и фоторецепторы у полоза расположены более упорядоченно, чем у гадюки.

При исследовании пигментного эпителия на плоских препаратах *N. natrix* клетки пигментного эпителия можно разделить на 2 группы: крупные и мелкие ($p = 0.007$). У *P. berus* наблюдались схожие различия между этими клетками ($p = 0.039$). Размер крупных клеток пигментного эпителия сетчатки обыкновенной гадюки составлял 90% от такового у ужа (21.42 ± 3.6 мкм и 23.79 ± 0.38 мкм соответственно), а мелких – 78.66% (15.63 ± 1.28 мкм и 19.87 ± 0.87 мкм), т.е. достоверных различий между ними не было (рис. 3, 4). Клетки пигментного эпителия сетчатки ужа имеют шестигранную форму и более упорядоченную гексагональную упаковку. По краям сетчатки (на границе с роговицей) они имеют меньшие размеры и более высокую плотность. При этом расположение пигментных клеток у гадюки хаотично, а число крупных клеток на единицу площади больше, чем малых.

В плотности клеток ПЭ ужа нет заметных различий, (2415 ± 469 клеток / мм²). В верхнем крае, где клетки мельче, наблюдается наибольшая плотность (2969 клеток / мм²), а минимальная же – в центре сетчатки (1644 клеток / мм²), тогда как у гадюки клетки в среднем мельче, поэтому даже их средняя плотность составляет

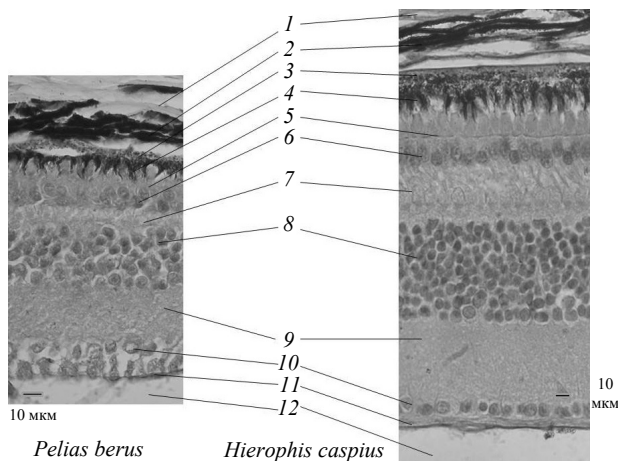


Рис. 1. Сравнение поперечных срезов сетчатки желтобрюхого полоза (*H. caspius*) и обыкновенной гадюки (*P. berus*): 1 – склера, 2 – хороид, 3 – пигментный эпителий, 4 – внутренние сегменты фоторецепторов, 5 – наружная пограничная мембрана, 6 – ядра фоторецепторов, 7 – синаптические структуры аксонов, 8 – внутренний ядерный слой, 9 – внутренний сетчатый слой, 10 – слой ганглиозных клеток, 11 – волокнистый слой, 12 – стекловидное тело

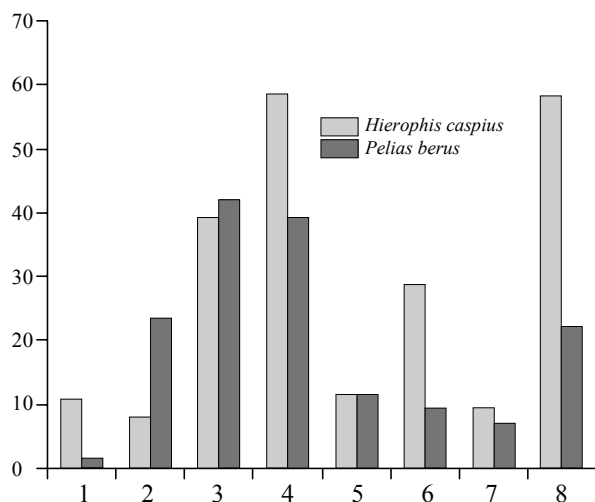


Рис. 2. Средние размеры отделов сетчатки желтобрюхого полоза (*H. caspius*) и обыкновенной гадюки (*P. berus*), мкм: 1 – волокнистый слой, 2 – слой ганглиозных клеток, 3 – внутренний синаптический слой, 4 – внутренний ядерный слой, 5 – синаптические структуры аксонов, 6 – расстояние от ядерного слоя до ядер фоторецепторов, 7 – ядра фоторецепторов, 8 – расстояние от ядер фоторецепторов до ядер пигментных клеток

ки – примерно в 2.3 раза больше (соответственно 74.7 и 25.3%). Эти клетки у ужа располагаются особым образом – одна мелкая клетка окружена 5 – 7 крупными, в

2995±560 клеток / мм², причем число крупных клеток на единицу площади больше, чем малых.

Фоторецепторные клетки *N. natrix* можно было объективно разделить на 2 группы: крупные и мелкие ($p < 0.001$), так же, как и у гадюки ($p < 0.001$) (рис. 5). Диаметр крупных фоторецепторных клеток сетчатки *P. berus* составил 95.54% от такового у ужа (9.42±0.95 мкм и 9.86±1.12 мкм соответственно). Диаметр мелких фоторецепторных клеток сетчатки гадюки составлял 92.78% от таковых у ужа (6.04±0.37 и 6.51±0.71 мкм соответственно). Крупных фоторецепторных клеток (КФР) у ужа в 7.5 раза больше (88.2%), чем мелких клеток (МФР) (11.8%), а у гадюки – примерно в 2.3 раза больше (соответственно 74.7 и 25.3%). Эти клетки у ужа располагаются особым образом – одна мелкая клетка окружена 5 – 7 крупными, в

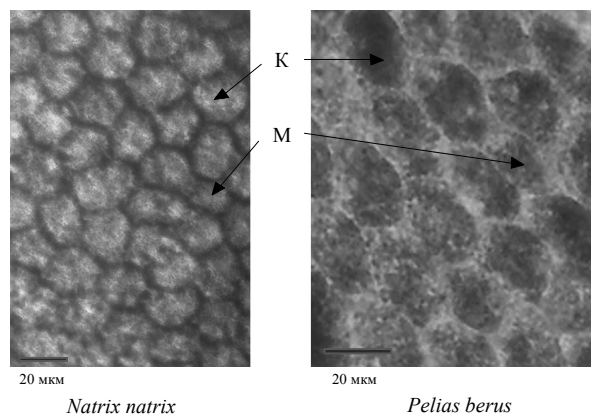


Рис. 3. Плоские препараты клеток пигментного эпителия (К – крупные, М – мелкие) сетчатки змей под световым микроскопом

У гадюки также в некоторых локусах наблюдается окружение мелкой фоторецепторной клетки в виде «цветка» 4 крупными, но чаще крупные и мелкие расположены хаотично. В некоторых фоторецепторах (27.59%) были обнаружены прозрачные включения, а 10.07% включений светились в ультрафиолетовом свете.

Наибольшая плотность фоторецепторов у ужа наблюдалась в центре и с темпоральной стороны сетчатки (12580 – 15475 клеток / мм²); немного меньшая – в вентральном (13681 кл / мм²), центральном дорсальном (12151 кл / мм²) и назальном (11020 кл / мм²) локусе; наименьшая плотность обнаружена в вентральном назальном крае (7062 кл / мм²) (рис. 6, слева). У гадюки максимальная плотность фоторецепторов наблюдалась в вентральном отделе сетчатки (18745 кл/мм²), немного меньшая – в центральном (в среднем 16087 кл/мм²) и темпоральной его части (17652 кл/мм²), а минимальная – в дорсальном крае (13223 кл/мм²) (рис. 6, справа). В назальном локусе наблюдалась плотность 16712 кл/мм². Среди фоторецепторов преобладали крупные клетки, а мелких фоторецепторов у ужей было в центре, сверху от слепого пятна – 20.8%, снизу – 7.7%; в верхнем крае сетчатки – около 15%, в нижнем крае – 22.8%, но ближе к центру соотношение резко снижалось – наблюдалось только 6.67% мелких клеток. У гадюки общее соотношение мелких фоторецепторов составляло 32.37% от общего количества. Наименьшее их количество наблюдалось в дорсальной области – 13.59%, а наибольшее – 37.19% – в вентральной области.

На 1 пигментную клетку у гадюки (средняя площадь 291.56±12.1 мкм²) приходится в среднем 3.29 крупных и 7.99 мелких фоторецепторных клеток; тогда как у ужа на 1 пигментную клетку (421.07±8.67 мкм²) – 3.75 крупных и 8.72 мелких клеток.

В данном исследовании мы не дифференцировали фоторецепторы на палочки и колбочки. Структуры, подобные палочкам, были обнаружены в сетчатке гадюки в промежутках между колбочковыми фоторецепторами, но ввиду малых размеров и многочисленности, их количество не было посчитано. О строении и количестве палочек в сетчатке гадюковых

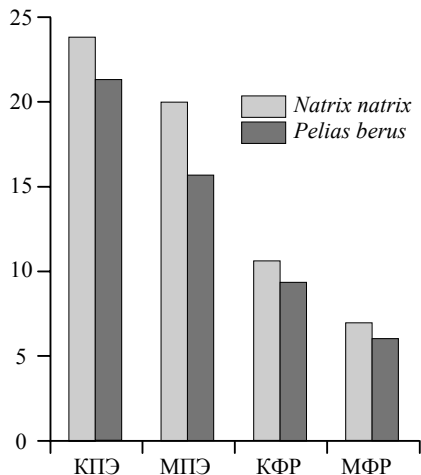


Рис. 4. Размеры клеток пигментного эпителия и фоторецепторов на плоских препаратах сетчатки ужа обыкновенного (*N. natrix*) и гадюки обыкновенной (*P. berus*), мкм: КПЭ – крупные пигментные клетки, МПЭ – мелкие пигментные клетки, КФР – крупные фоторецепторы, МФР – мелкие фоторецепторы

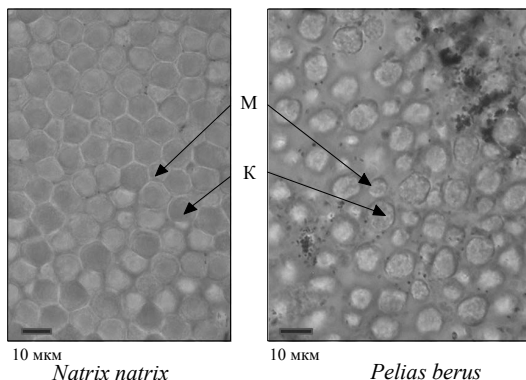


Рис. 5. Плоские препараты фоторецепторов сетчатки (К – крупные, М – мелкие) змей под световым микроскопом

можно судить, наблюдая электронные микрофотографии сетчатки рогатой гадюки (*Cerastes cerastes*), сделанные египетскими исследователями (Khattab Fairuze et al., 2004), на которых различимы три морфологических типа фоторецепторов: большие одинарные колбочки, малые одинарные колбочки и палочки, имеющие наименьшие размеры.

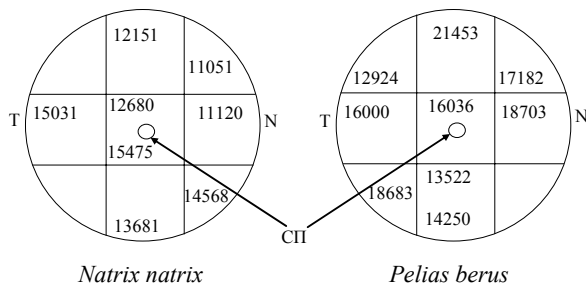


Рис. 6. Схема сетчатки ужа обыкновенного и гадюки обыкновенной. В разных локусах сетчатки указана плотность фоторецепторов, клеток / мм²; СП – слепое пятно, N – назальная область; Т – темпоральная область сетчатки. Дорсальная область – сверху, вентральная – снизу

синезычного сцинка (*Tiliqua rugosa*) в 4.7 раза превышает наибольшую плотность таковых у обыкновенного ужа и в 4.6 раза превышает таковую у гадюки обыкновенной (New et al., 2012). Меньшая плотность фоторецепторов у обыкновенной гадюки, по сравнению с таковой у ужа, может свидетельствовать о менее четком восприятии цветовой зрительной информации. В то же время увеличенный размер ганглиозных клеток в сетчатке гадюки может способствовать суммации сигналов от большего числа фоторецепторов, что повышает световую чувствительность. Эти факты, а также особенности образа жизни гадюковых змей, которые нередко охотятся при малой освещенности или в сумерках, дают возможность предположить, что у них может быть развито скотопическое зрение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведя поверхностное изучение сетчатки гадюковых и ужеобразных змей двумя методами, можно сделать следующие выводы.

1. Средняя толщина сетчатки желтобрюхого полоза в 1.8 раза превышает таковую у обыкновенной гадюки и, соответственно, превышает толщину большинства её слоёв.
2. Размер ганглиозных клеток у *P. berus* в 2 раза превышает таковой у *H. caspius*.
3. Ядра фоторецепторов у *H. caspius* в 1.57 раза крупнее, чем у *P. berus*.
4. Размер (ширина) крупных клеток пигментного эпителия сетчатки гадюки составляет 90% от такового у обыкновенного ужа, а мелких – 79%.
5. Диаметр крупных фоторецепторных клеток сетчатки *P. berus* составляет 96% от такового у *N. natrix*, а мелких – 89%.

6. Значения плотности фоторецепторов у гадюки в среднем были близки к таковым у *N. natrix*, но имели сильный разброс данных в зависимости от локуса сетчатки (12696 ± 4354 и 12126 ± 3073 клеток/ мм^2 соответственно).

7. Наибольшая плотность фоторецепторов у *N. natrix* наблюдалась в центре и с темпоральной стороны сетчатки; немного меньшая – в вентральном, центральном дорсальном; наименьшая плотность обнаружена в назальном крае, что наблюдается и у *P. berus*.

8. У *P. berus* максимальная плотность фоторецепторов наблюдалась в вентральном отделе сетчатки и темпоральной её части, а минимальная – в дорсальной области.

Автор выражает благодарность кандидату биологических наук О. Ю. Орлову за значительную помощь в выполнении работы, в приготовлении препаратов, а также кандидату биологических наук В. А. Бастакову за ценные указания по выполнению работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Давыдова Т. В. Особенности ультраструктуры сетчатки, зрительного нерва и крыши среднего мозга амурского полоза *Elaphe schrenki* // Цитология. 1993. Т. 35, № 2. С. 32 – 36.

Программа CellCount // Ин-т проблем передачи информации им. А. А. Харкевича РАН [Электрон. ресурс]. М., 2014. URL: <http://www.iitp.ru/ru/userpages/91/133.htm> (дата обращения: 07.03.2014).

Govardovskii V. I., Chkheidze N. I. Retinal photoreceptors and visual pigments in certain snakes // Biol. Abstr. 1989. Vol. 90. P. 1036.

Khattab Fairoze, Khattab Fahmy I., Fares Nagui, Zaki Aman. Retinal Photoreceptor Fine Structure in some reptiles // Egyptian J. of Hospital Medicine. 2004. Vol. 17. P. 167 – 186.

New S. T. D., Hemmi J. M., Kerr G. D., Bull C. M.. Ocular Anatomy and Retinal Photoreceptors in a Skink, the Sleepy Lizard (*Tiliqua rugosa*) // Anatomical Record. 2012. Vol. 295, № 10. P. 1727 – 1735.

Sillman A. J., Govardovskii V. I., Rohlich P., Southard J. A., Loew E. R. The photoreceptors and visual pigments of the garter snake (*Thamnophis sirtalis*) : a microspectrophotometric, scanning electron microscopic and immunocytochemical study // J. Comp. Physiol. A. 1997. Vol. 181. P. 89 – 101.

Walls G. L. The vertebrate eye and its adaptive radiation. New York ; London : Hafner Publishing Company, 1963. 785 p.