

ЦИТОЛОГИЯ

Н. К. КОЛЬЦОВ, член-корреспондент Академии Наук СССР

ПЕРВЫЕ РЕГУЛЯЦИЯ МЕЛАНОФОРОВ

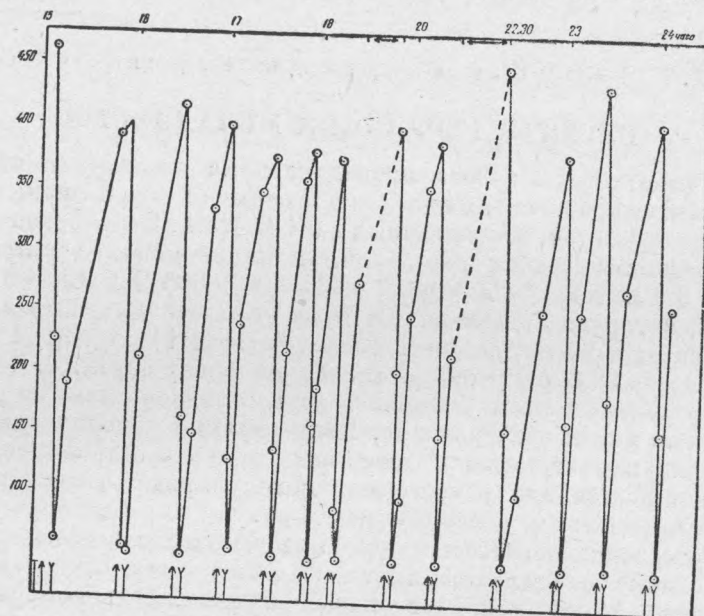
Экспериментальная работа проводилась на изолированных чешуях. Чешуи вынимались из своих влагаллиц и переносились в физиологический раствор электролитов, изотоничный с 0,1 M NaCl. Испробовав различные рецепты физиологических растворов, я остановился на смеси четырех хлоридов: 0,1 M NaCl—450+0,1 M KCl—10+0,066 M CaCl₂—10+0,066 M MgCl₂—10, которую в дальнейшем буду называть «тетралитом». В качестве буфера употреблялась смесь фосфатов (Na₂HPO₄ и NaH₂PO₄) в отношении 6 : 3 или 6 : 4; pH раствора колебался между 6,5 и 7,0. Этот раствор в опытах разбавлялся или замещался другими изотоничными растворами электролитов или неэлектролитов. Концентрация прибавляемых к тетралиту обычно в ничтожных количествах гормонов, алкалоидов и других веществ с высоким или неизвестным молекулярным весом определялась в весовых процентах к солевому раствору.

Для микроскопического исследования чешуи помещались на стеклянную пластинку с вделанными платиновыми электродами и покрывались покровным стеклом на восковых ножках. Под покровное стекло пропускался с одной стороны непрерывный ток испытуемого раствора из воронки, а с противоположной стороны отток регулировался свешивающейся с предметного столика фильтровальной бумажкой; измерялось число капель, протекавших под покровным стеклом в одну минуту, — обычно от 4 до 6. Сначала для регистрации я пользовался микрофотографиями, делая до 100 снимков в каждом дневном опыте, но последнее время предпочел зарисовку при помощи рисовального аппарата, что отнимало меньше времени и давало даже более надежные результаты.

Для получения количественных данных микрофотографии и рисунки обрабатывались следующим образом. Измерялись в миллиметрах по два перпендикулярных диаметра всех зарисованных или сфотографированных клеток (точнее их пигментированных частей), и затем диаметры всех клеток поля зрения складывались. Так как в течение опыта поле зрения не изменялось, то для каждого момента (с точностью до 1 мин.) получалось в мм число, характеризующее линейную контракцию или экспансию пигментированной киноплазмы. Полученные цифровые результаты наносились на кривую, по абсциссе которой откладывалось время с начала опыта в минутах и часах, а по ординатам — измеренная длина пигментированной киноплазмы. Таким образом эти кривые вполне соответствуют обычным кривым мускульного сокращения, так как и в последних измеряется линейное, а не объемное сокращение.

К сожалению, мне не удалось при моей методике изучать результаты непосредственного раздражения нервов, так как найти мельчайшие нервы, входящие в чешуйку, на живом объекте нельзя. При вырывании неповрежденной чешуйки происходит максимальная контракция киноплазмы, быстро сменяющаяся экспансией в физиологическом растворе. Я считаю, что это—реакция на единичное механическое раздражение нерва, соответствующая единичному сокращению мускульной клетки при перерезке нерва. Существенно, что эта реакция имеет такой же вид одиночного скачка.

Интересные данные получены путем пропускания через неповрежденную изолированную чешуйку переменного тока—обычно 2 V при расстоянии платиновых электродов около 12 мм. Немедленно вслед за замыка-



Фиг. 1. Опыт 531. При замыкании переменного тока 2 V (стрелка острием кверху) меланофоры контрагируют, при размыкании (стрелка острием книзу)—экспандируют. Чешуйка непрерывно промывается тетралитом.

нием тока начинается быстрая контракция пигмента, которая через 2—3 мм достигает максимума. Если в этот момент разомкнуть ток, тотчас же начинается экспансия, но она протекает медленнее и доходит до максимума лишь через 15—30 минут. Для завершения этой фазы требуется усиленный обмен веществ, и если ослабить или прекратить проток физиологического раствора под покровным стеклом, дальнейшее растекание пигмента приостанавливается. Таким образом реакция меланофора на замыкание переменного тока есть одиночный скачок. Эта реакция может быть повторена многократно, как видно из кривой (фиг. 1), и, если каждый раз давать клеткам достаточное время, чтобы оправиться от контракции, никаких признаков утомления в течение 10 и более часов не наблюдается.

Интересное изменение наблюдается при длительном действии переменного тока. Вслед за первой максимальной контракцией киноплазма, несмотря на продолжающееся действие электрического тока, начинает выпускать отростки и растекаться, но экспансия не успевает дойти до максимума и через $\frac{1}{2}$ —2 мин. происходит снова быстрая контракция, сменяю-

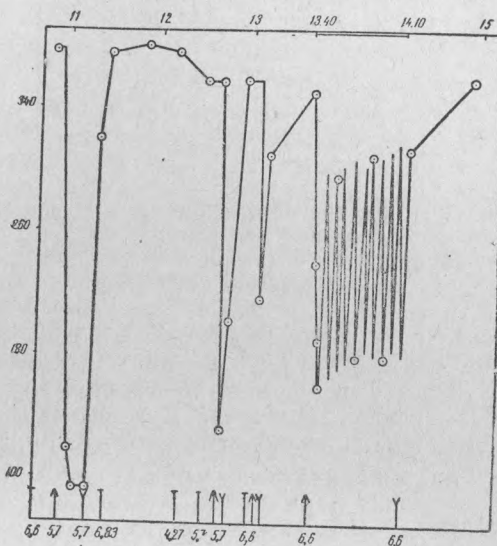
щаяся через $1/2$ —2 мин. новой экспансией. Такие периодические биения могут продолжаться довольно долгое время (30 мин. и более). Когда электрический ток размыкается, наступает спокойная полная экспансия (фиг. 2).

Вопрос о том, действует ли здесь электрический ток непосредственно на меланофор или через посредство нерва, решается достаточно определенно в последнем смысле. Чешуйки денервируются по методу, предложенному Гудричем, т. е. вырываются из кожи и немедленно вкладываются обратно в их собственное влагалище на несколько дней. При таких условиях они приживаются, в них восстанавливается кровообращение, но обрванные нервы дегенерируют, и уже через 1—2 суток меланофоры утрачивают чувствительность к раздражению переменным током, даже более высокого вольтажа (до 12 V). Ни единичной контракции, ни пульсаций таким путем получить не удастся. Но гормональное воздействие (адреналин) и в денервированной чешуйке неизменно вызывает стойкую контракцию без пульсаций. Отсюда приходится заключить, что электрическое раздражение действует на хроматофор только через посредство нервного синапса.

Можно привести и другое не менее убедительное доказательство того, что раздражение от замыкания электрического тока передается исключительно через посредство нервов. Кураре считается ядом, парализующим окончания двигательных нервов. Если в течение 10 и более минут промывать неденервированную и реагирующую на электрический ток чешуйку раствором кураре, то она теряет способность отвечать сокращением на замыкание электрического тока, хотя в ответ на действие адреналина хроматофоры нормально контрагируются.

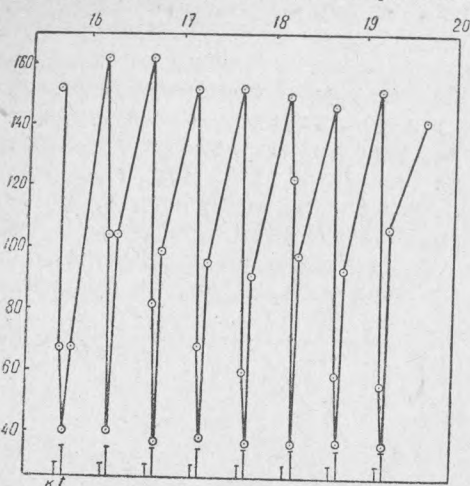
Мне часто приходилось брать для исследования чешуйку, по соседству с которой уже ранее было вынуто несколько чешуек. Чтобы проверить, сохранилась ли у этой чешуйки иннервация или она была нарушена предшествующими операциями, я всегда в начале нового опыта проверял ее на раздражимость электрическим током. Если реакции на замыкание тока не получалось, а в ответ на промывание адреналином меланофоры контрагировали, я считал такую чешуйку денервированной.

Реакция меланофоров на переменный ток оказывается совершенно тождественной с реакцией на некоторые изменения в составе физиологического солевого раствора. В моем обычном тетралите концентрация KCl равна 0,002 M. Если не изменяя осмотического давления раствора довести в нем содержание K^+ -ионов (за счет других катионов) до 0,02 M, то при промывании таким раствором нормальной снабженной нервами чешуйки можно наблюдать немедленную (обычно через 1—3 мин.) максимальную контракцию всех меланофоров. При замене в этот момент измененного солевого раствора нормальным тетралитом, содержащим 0,002 M KCl, начи-



Фиг. 2. Опыт 522. Вибрации при длительном воздействии переменного тока 2 V между 13.40 и 14.10. Изменение рН тетралита от 4,27 до 6,6 не оказывает влияния.

нается экспансия и через 20—30 мин. она достигает прежнего максимального уровня. В ряде опытов удавалось многократно вызывать ряд таких



Фиг. 3. Опыт 236. Контракция при замене тетралита *t* смесью тетралита и 0,1 KCl в отношении 3 : 1 (*k*). Экспансии в тетралите.

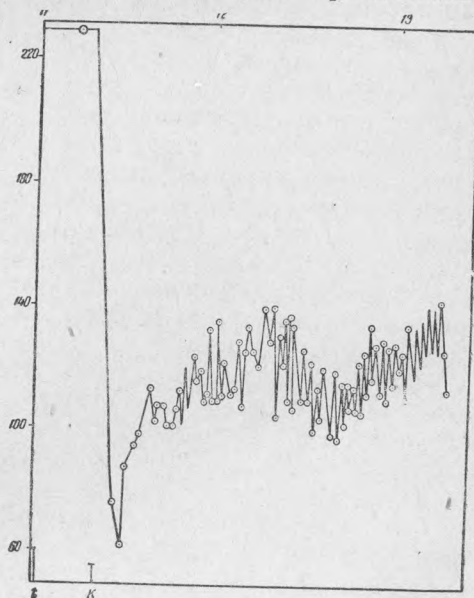
минут, то мы увидим, что вслед за начальной максимальной контракцией последует неполная экспансия, а затем ряд периодических пульсаций с промежутками около $1\frac{1}{2}$ —3 мин. (фиг. 4). При смене измененного физиологического раствора тетралитом с 0,002 M KCl происходит нормальная экспансия.

Реакция меланофоров на повышенное содержание K^+ имеет место лишь при целостности нервного синапса. После полной денервации или после кураризирования она исчезает, так же как реакция на электрический ток. Отсюда мы можем заключить, что обе реакции соответствуют нервному раздражению.

В настоящее время борются между собой два воззрения на природу нервного раздражения. Одни физиологи считают, что в основе нервного раздражения эффекторных органов лежит перемещение электрических потенциалов по нерву через синапс в реагирующую клетку. Другие устанавливают значительные химические медиаторы (ацетилхолина и адреналина), образующихся в синапсе*. Если мы признаем, что реакция на электрический ток и на нарушение равновесия электролитов тождественны и пол-

последовательных реакций, не упуская определенных меланофоров из поля зрения микроскопа, так как переменна протока растворов совершалась через капилляр без перемещения предметного стекла.

На фиг. 3 приведена кривая одного из многочисленных подобных опытов (№ 236), составленная на основании подсчета 33 микрофотографий. Эта кривая почти тождественна с кривою реакций на переменный ток (фиг. 1). Еще более наглядно сходство между кривыми раздражения электрическим током и измененным электролитным раствором при более длительном воздействии этих раздражителей. Если оставить чешуйку в физиологическом растворе с повышенным до 0,02 M содержанием KCl на несколько десятков



Фиг. 4. Опыт 459. Вибрации при длительном воздействии смесью тетралита и 0,1 KCl в отношении 1 : 1.

* См. последние выступления Дэля (1) и Кэннона (2).

ностью соответствуют нервному раздражению, а, с другой стороны, что химическим медиатором первого порядка являются K^+ или другие катионы, то этим противоречие между двумя на первый взгляд противоположными теориями снимается. Перемещение электрического потенциала по нерву через синапс в эффекторную клетку должно сопровождаться перемещением несущих заряд ионов, а, с другой стороны, перемещение заряженных ионов не может не вызывать изменения потенциалов. Работами Леви, Дэля, Кэннона и их сотрудников установлено возникновение в синапсах ганглиозных и мускульных клеток ацетилхолина и адреналина. Весьма вероятно, что эти мимолетно возникающие и быстро разрушающиеся вещества играют существенную роль в передаче нервного раздражения на такие органы, реакции которых отличаются особенной быстротой. В таком случае эти вещества должны быть признаны химическими медиаторами второго порядка. Сотрудники Дэля Броун и Фельдберг ⁽³⁾ определенно высказали мысль, что изменение содержания K^+ в синапсе влечет за собой возникновение ацетилхолина из его неактивного предшественника, а Бак ⁽⁴⁾ распространяет такой же взгляд и на происхождение в синапсе активного адреналина под воздействием K^+ на неактивный хинон.

Весьма вероятно, что участие медиаторов второго порядка в передаче нервного раздражения через синапс является вторичным приспособлением тех эффекторных клеток, реакции которых подобно реакциям мускулов (в особенности поперечно-полосатых) и ганглиозных клеток отличаются особой быстротой. Меланофоры костистых рыб не относятся к таким быстро реагирующим органам, отличаясь низкой хронаксией, и поэтому их деятельность может обходиться без участия медиаторов второго порядка. У меня нет никаких данных, которые говорили бы о наличии такого участия. Ацетилхолин вообще не действует на работу меланофоров, а адреналин несомненно очень активен, энергично вызывая контракцию. Но для такого воздействия наличие нервной иннервации и неповрежденных синапсов не является необходимым, так как денервированные и кураризированные чешуйки совершенно одинаково отвечают на действие адреналина. Это, конечно, не исключает возможности, что и при нервном раздражении адреналин в синапсах меланофоров под влиянием K^+ образуется как медиатор второго порядка. Но чтобы доказать это, следовало бы попытаться извлечь адреналин из меланофоров или из отекающей от чешуи крови во время контракции после нервного раздражения; однако такой анализ по техническим причинам очень затруднителен.

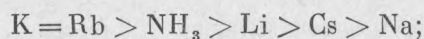
Еще более трудно технически определить частоту колебаний потенциала в эффекторных нервах и получить кривые этих колебаний параллельно с кривыми сокращений меланофоров, как это делается в физиологических работах по нервно-мышечным эффекторам. Наличие вибраций при длительном нервном раздражении показывает, что и здесь, как в мускулах, мы имеем прерывистый процесс, который стоит в связи с сохранностью нервно-эффекторного аппарата, так как в денервированных или кураризированных чешуйках таких прерывистых сокращений от действия адреналина или его заменителей мною не наблюдалось.

В ряде опытов мною определено достаточно точно, насколько надо повысить содержание K^+ в физиологическом растворе, чтобы получить контракцию меланофоров. Содержание $0,02 M K^+$ в растворе дает максимальную быструю контракцию; содержание $0,01 M K^+$ не дает никакой реакции, а растворы промежуточной концентрации дают не полную и замедленную контракцию, несколько различную в разных случаях. Как будто это противоречит закону «все или ничего». Но ведь раздражение K^+ -ионами не является все-таки нервным раздражением. Возможно, что при нервном или электрическом раздражении в синапсе выделяется всегда

определенное количество К-ионов, соответствующее 0,02 *M* раствору, и именно этим обеспечивается сохранение закона «все или ничего». Только в искусственном эксперименте мы можем заменить нервное раздражение воздействием на синапс более слабых концентраций К⁺, а потому здесь и возможно кажущееся нарушение этого закона.

При дальнейшем повышении содержания К⁺ в физиологическом растворе сначала не было отступлений, и для получения быстрых максимальных сокращений и периодических вибраций я часто брал тетралит, в котором половина Na-ионов была заменена К-ионами (0,05 *M* KCl). Но при дальнейшем повышении содержания К и в чистом 0,1 *M* растворе KCl, происходит изменение: периодические вибрации ослабевают или вовсе не возникают, и сокращение переходит в стойкую, а затем необратимую контрактуру.

В моем распоряжении имеется большой экспериментальный материал по замене избыточных К⁺ другими катионами, а также замене Cl⁻ другими анионами. По силе действия одновалентные катионы располагаются в следующий ряд:



а двувалентные катионы в ряд: Ba > Ca > Mg.

Каждый следующий член ряда дает более медленную кривую сокращения по сравнению с предыдущей и более длительный период скрытого раздражения. Этот последний всего ниже для К⁺, в избытке которого сокращение начинается через 1—2 мин., а самый длинный для Na⁺: в 0,1 *M* растворе NaCl сокращение наступает лишь через 1½—3 часа. Эти ряды несколько отличаются от классических рядов катионов, установленных Гофмейстером для разбухания белков и от порядка их действия на стебелки *Zoothamnium* [Кольцов (5)], а также от ряда Гёбера (6) по влиянию на гемолиз. Но так как и эти ряды не вполне точно совпадают друг с другом, приходится признать, что кроме чисто аддитивной обусловленности в основе этих рядов лежат и какие-то специфические химические особенности, которые по-разному проявляются в разных физико-химических и биологических реакциях. Качественное отличие воздействия пограничного избытка Ca⁺⁺ и Mg⁺⁺ выражается нередко в том, что при этом не все пигментные зерна скатываются в центральную каплю киноплазмы, а значительная часть их остается рассеянными в отростках. Может быть, это является доказательством того, что именно К-ионы, а не Ca⁺⁺ и не Mg⁺⁺ сопровождают естественное нервное возбуждение. Что же касается остальных рассматриваемых здесь катионов, за исключением Na⁺, то они встречаются в организме в незначительном количестве, и вряд ли могут считаться естественными возбудителями нервного раздражения хроматофоров; это только экспериментальные заменители К⁺-ионов.

Из двувалентных ионов Ca⁺⁺ и Mg⁺⁺ действуют несколько слабее К⁺, а Ba⁺⁺, наоборот, сильнее, так как уже прибавка 0,0066 *M* BaCl₂ вызывает сразу максимальную сокращение, а 0,013 *M* — уже стойкую контрактуру. Но в 0,0033 *M* BaCl₂ наблюдаются пульсации.

Все рассмотренные катионы сходны между собою в том отношении, что вызывают реакцию лишь в неповрежденной чешуйке: при полной денервации и при кураризации сокращение не наступает даже при замене физиологического раствора 0,1 *M* растворами солей одновалентных катионов или в 0,066 *M* растворов бивалентов. Отсюда вытекает, что все эти катионы проникают не через общую поверхность эктоплазмы меланофора, а только через неповрежденный синапс. Все перечисленные катионы сходны с К-ионами также в том отношении, что будучи применены не в слишком высоких концентрациях, они вызывают при длительном воздействии также

и периодические вибрации, частота и размахи которых несколько различны для разных катионов.

В своей работе о физиологическом ряде катионов [Кольцов (⁵)] я показал, что нельзя говорить только об антагонизме между группой одновалентных катионов и группой бивалентов, так как каждый последующий член в ряду катионов является в большей или меньшей степени антагонистом предшествующего. Это в особенности ясно в том случае, когда скрытый период для данного катиона-антагониста значительно превышает скрытый период для сравняемого с ним катиона. Катион Na^+ с его особенно длинным скрытым периодом раздражения является весьма сильным антагонистом для всех остальных и одно- и двухвалентных катионов. После контракции в растворах последних почти все соли Na вызывают быструю экспансию.

Интересно отметить, что активная реакция—содержание водородных ионов в физиологическом электролитном растворе—не оказывает заметного влияния на работу хроматофоров, как неповрежденных, так и денервированных. На кривой фиг. 2, где показаны вибрации при длительном действии электрического тока в тетралите, видны также результаты изменения рН в широких пределах от 4,47 почти до 7 при применении фосфатного буфера. Едва заметные колебания размеров меланофоров в ту или иную сторону не превышают тех, которые наблюдаются порою при простом кратковременном перерыве тока, даже без всякого изменения солевого раствора. 0,05 *M* растворы одноосновного и двуосновного фосфатов Na являются, подобно большинству солей Na , антагонистами для вызывающих контракцию солей других катионов. Повидимому, собственная буферная система меланофора и его синапса очень высока.

Поступило
25 VI 1940

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. H. Dale, Science, 90, 393 (1939). ² W. B. Cannon, Science, 90, 521 (1939). ³ G. L. Brown a. W. Feldberg, J. of Physiol., 86, 291 (1936). ⁴ Z. M. Bacq L'acetylcholine et l'adrenaline, Paris, Masson (1937). ⁵ N. K. Koltzoff, Pflugers Archiv, 149, 327—363 (1912). ⁶ R. Höber, Biochem. Z., 14, 209, (1908).