

И. В. БУРОВИНА, В. И. ГОВАРДОВСКИЙ, А. Ф. СИДОРОВ

**ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ К, Са, Р и Na В СЕТЧАТКЕ
ЛЯГУШКИ ПРИ СВЕТОВОЙ И ТЕМНОВОЙ АДАПТАЦИИ**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 22 XII 1971)

Сетчатка глаза позвоночных содержит четкие слои однородных клеток, отличающихся по своим электрофизиологическим характеристикам. Обычно внимание исследователей привлекает измерение ионных соотношений в фоторецепторах, и часто исследования проводятся на выделенных фракциях наружных сегментов палочек, методика получения которых хорошо разработана. Однако при использовании биохимических методик получения фракций происходит значительная потеря водорастворимых веществ, в том числе ионов натрия и калия (1). Кроме того большой интерес представляют данные о распределении натрия, калия, кальция, фосфора и других элементов не только в самих фоторецепторах, но и в остальных клетках сетчатки, как в связи с проблемой передачи возбуждения, так и в связи с проблемой избирательного накопления этих элементов различными клетками.

Чтобы избежать потерь и перераспределения ионов, мы изучали распределение элементов в слоях сетчатки на срезах ткани, быстро замороженной, высушенной в вакууме и залитой в эпоксидную смолу (2). Срезы анализировали методом рентгеноспектрального микроанализа, который в принципе позволяет измерять концентрации всех элементов, начиная с бора, в участках поверхности порядка $1 \mu^2$ и с чувствительностью около 0,01% (3, 4). Принцип метода и конструкции микроанализаторов описаны в литературе (5), так же как и некоторые аспекты применения этого метода в биологии (6).

Объектом исследования служили сетчатки лягушек *Rana temporaria*, адаптированных к темноте или к обычному комнатному свету (500 лк). После удаления передней половины глаза отсасывали стекловидное тело, глазной бокал замораживали в изопентане, охлажденном жидким азотом до температуры -150° , высушивали в вакууме при температуре -15° и заливали в эпон-812. После полимеризации нарезали на ультрамикротоме сухим стеклянным ножом срезы толщиной 5–10 μ , пинцетом переносили их на алюминиевую подложку, покрытую тонким подсушенным слоем клея 88, распределяли на ней и напыляли в вакууме слой углерода толщиной 100–200 Å для придания электропроводности. Такая методика позволяет избежать потерь и перераспределения водорастворимых ионов и получить препараты с ровной поверхностью и хорошей сохранностью ткани (2).

Препараты изучали в рентгеноспектральном микроанализаторе MS-46 фирмы «САМЕСА» (Франция) при ускоряющем напряжении 20 кВ, токе образца 60 нА и диаметре зонда порядка 1 μ . Кривые распределения калия, натрия, кальция и фосфора записывали при движении электронного зонда поперек сетчатки. Слои клеток недостаточно хорошо видны на неокрашенных анализируемых препаратах, поэтому точная идентификация слоев проводилась по фотографиям, полученным с параллельных срезов, окрашенных метиленовым синим. На рис. 1 и 2 приведены фотографии окрашенных срезов и кривые распределения Са, К, Р и Na в темноадаптированной и светлоадаптированной сетчатке. Скорость счета в импуль-

сах в секунду, отложенная по оси ординат, прямо пропорциональна концентрации исследуемого элемента в расчете на влажный вес ткани ⁽²⁾. Все изученные элементы распределены по слоям сетчатки неравномерно. Внутри отдельных слоев также наблюдается определенный разброс скорости счета, так как диаметр электронного зонда меньше размера клеток, и при своем движении зонд может попадать на разные участки клеток. Для того чтобы получить результаты, усредненные по многим клеткам слоя, мы применяли развертку зонда на 50—70 μ в направлении, параллельном слоям сетчатки. При таком способе записи общий характер распределения элементов по слоям сохраняется, но кривые получаются более плавными и границы слоев смазываются, так как невозможно добиться полного совпадения направления развертки зонда с направлением всех слоев сетчатки. На рис. 1 приведены кривые распределения при использовании точечного зонда. Резкие границы структур, обогащенных водорастворимыми ионами (например, границы стекловидного тела и сосудистого слоя, богатых натрием), указывают на отсутствие перераспределения этих ионов в процессе приготовления образца.

Наибольший интерес представляют данные о распределении кальция, калия и фосфора в слое наружных сегментов фоторецепторов и в прилегающих к ним клетках пигментного эпителия. В темноадаптированной сетчатке (рис. 1) меланиновые гранулы пигментных клеток располагаются в компактном слое у вершин наружных сегментов. Этому слою пигментных гранул соответствуют резкие пики концентрации кальция и калия на кривых распределения. Пик фосфора сдвинут влево от пика кальция и калия и соответствует ядросодержащим частям тел пигментных клеток. При световой адаптации меланиновые гранулы перемещаются в расположенные между наружными сегментами цитоплазматические отростки пигментных клеток, препятствуя рассеянию света между соседними фоторецепторами. Перемещение гранул пигмента сопровождается «расползанием» кальциевого пика на всю ширину слоя наружных сегментов. Подобным же образом, хотя менее отчетливо, «расползается» совпадающий с пигментными гранулами пик концентрации калия. Меньшая наглядность этого эффекта связана с более равномерным распределением калия по сетчатке. В отличие от кальция и калия, фосфор пигментных клеток не перемещается вместе с пигментными гранулами. Однако следует отметить снижение концентрации фосфора в пигментных клетках и в слое наружных сегментов при освещении. Возможно, этот эффект вызван расходом фосфатов и уходом продуктов их метаболизма из области наружных сегментов при возбуждении. Выход фосфора из наружных сегментов палочек при освещении показан биохимически ⁽⁷⁾.

Имеет ли значение изменение ионных соотношений при освещении в клетках, непосредственно соприкасающихся с наружными сегментами фоторецепторов, для процесса передачи возбуждения? На этот вопрос пока трудно ответить. Существует ряд данных о том, что пигментный эпителий является фотореактивной структурой ⁽⁸⁾ и принимает участие в генерации с-волны электроретинограммы ⁽⁹⁾. Его участие в процессах адаптации сетчатки также несомненно.

Концентрация кальция в пигментных клетках в десятки раз выше его концентрации в остальных слоях сетчатки. Можно достаточно уверенно говорить о высоком содержании кальция в самих меланиновых гранулах, так как пики концентрации кальция соответствуют гранулам пигмента, где бы они не находились — в клетках пигментного эпителия, сосудистой оболочки или склеры (рис. 1). Калий же может быть связан не обязательно с самими гранулами, но и с какими-то неизвестными пока структурами, ответственными за ретиномоторный эффект.

Концентрация калия в наружных и внутренних сегментах фоторецепторов довольно высока, хотя и ниже, чем в наружном ядерном слое, где расположены тела рецепторных клеток. Концентрация натрия в этих

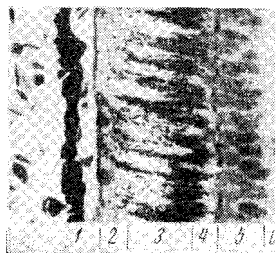
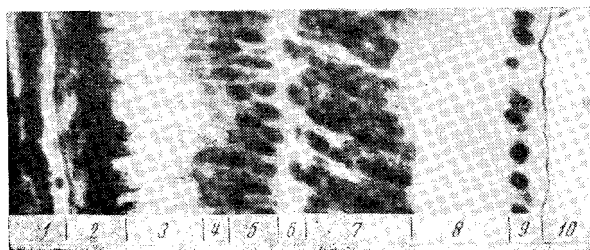
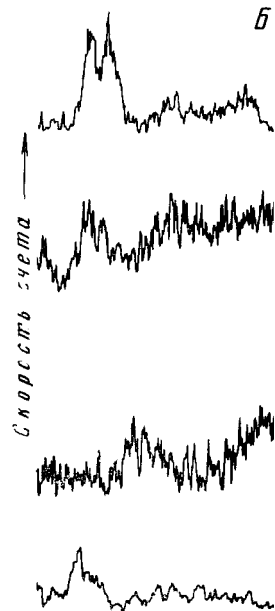
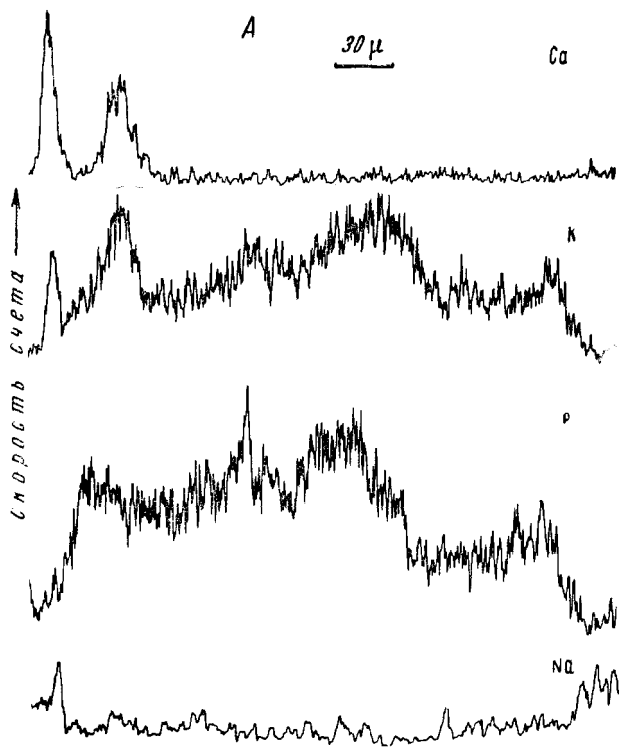




Рис. 1. Распределение кальция, калия, фосфора и натрия в сетчатке лягушки в состоянии темновой (А) и световой (Б) адаптации. По горизонтали — расстояние по линии сканирования. 1 — сосудистая оболочка, 2 — пигментный эпителий, 3 — слой наружных сегментных палочек, 4 — слой внутренних сегментов, 5 — наружный ядерный слой, 6 — наружный сетчатый слой, 7 — внутренний ядерный слой, 8 — внутренний сетчатый слой, 9 — слой ганглиозных клеток и волокон внутреннего нерва, 10 — стекловидное тело

слоях значительно ниже, чем в стекловидном теле или сосудистой оболочке. Это противоречит модели Бонтинга и Бангхама (¹⁰), предполагавших, что междисковые промежутки наружных сегментов палочек, а следовательно, и цитоплазма этих клеток имеют состав, приближающийся к составу межклеточной среды. Наши данные показывают, что фоторецепторы являются обычными «калиевыми» клетками, хотя наружные и внутренние сегменты богаче натрием и беднее калием по сравнению с телами фоторецепторов и остальными клетками сетчатки. Сравнительно высокое содержание натрия и низкое калия характерно для клеток, богатых мембранными структурами, основными компонентами которых являются фосфолипиды (¹¹). В случае палочек сетчатки мы наблюдаем такую же корреляцию между распределением натрия и калия и мембранных структур в пределах одной клетки.

В остальных слоях сетчатки калий и фосфор также распределены неравномерно. Максимальная концентрация калия приходится на внутренний ядерный слой, в котором находятся тела биполярных, горизонтальных и амакриновых клеток и мюллеровых волокон. Ганглиозные клетки также богаты калием, тогда как в наружном и внутреннем сетчатом слое, содержащем отростки нервных клеток, концентрация калия значительно ниже. Кажется, что при освещении концентрация калия во внутреннем сетчатом слое увеличивается (рис. 1), однако этот эффект нуждается в дальнейшем изучении. Во всех слоях сетчатки, за исключением областей меланиновых гранул, наблюдается положительная корреляция между содержанием калия и фосфора. Такая корреляция отмечена ранее Лехли (¹²) в растительных клетках, а также авторами этой работы в нейронах ганглиев моллюска *Planorbis corneus* (¹³).

Концентрация кальция во всех слоях сетчатки, кроме пигментных клеток, очень низка, так что скорость счета в образце соизмерима со скоростью счета фона. Для более подробного изучения распределения этого элемента необходимо повысить чувствительность анализа, увеличив время счета. Для получения данных о внутриклеточном распределении натрия также необходимо повысить время счета и отмыть сетчатку от внеклеточного иона. Большой интерес представляет изучение распределения магния и хлора. Затруднения в анализе вызваны лишь тем, что примененная заливающая среда содержит много этих элементов.

Таким образом рентгеноспектральный микроанализ позволяет получить данные о распределении в ткани практически всех биологически важных элементов, и его применение для дальнейшего исследования как нервных, так и других клеток и тканей представляется чрезвычайно перспективным.

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
3 XII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. N. Etingof, A. L. Berman et al., *Biochem. et biophys. acta*, **205**, 459 (1970).
- ² И. В. Буровина, Э. Н. Гахова и др., *Цитология*, **14**, № 8 (1972). ³ И. Б. Боровский, Н. П. Ильин, *ДАН*, **106**, 655 (1956). ⁴ R. Castaing, *Advances Electron. and Electr. Phys.*, **13**, 317 (1960). ⁵ Л. С. Биркс, *Рентгеновский микроанализ с помощью электронного зонда*, М., 1966. ⁶ C. A. Andersen, *Methods of Biochem. Anal.*, **15**, 148 (1967). ⁷ M. Kato, I. Oki, *Ann. Rep. Sci. Works, Fac. Sci. Osaka Univ.*, **7**, 183 (1959). ⁸ М. А. Островский, В сборн. *Физиология зрения в нормальных и экстремальных условиях*, «Наука», 1969, стр. 107. ⁹ W. K. Noell, *J. Opt. Soc. Am.*, **53**, 20 (1963). ¹⁰ S. L. Bonting, A. D. Bangham, *Exp. Eye Res.*, **6**, 400 (1967). ¹¹ И. А. Скульский, В. Г. Леонтьев, И. В. Буровина, *Изв. АН СССР, сер. биол.*, № 6, 831 (1968). ¹² A. Läuchli, H. Schwander, *Experientia*, **22**, 503 (1966). ¹³ И. В. Буровина, А. Ф. Сидоров, *Журн. эволюционной биохимии и физиологии*, **7**, 576 (1971).