

ЦИТОЛОГИЯ

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

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МЕЛАНОФОРОВ

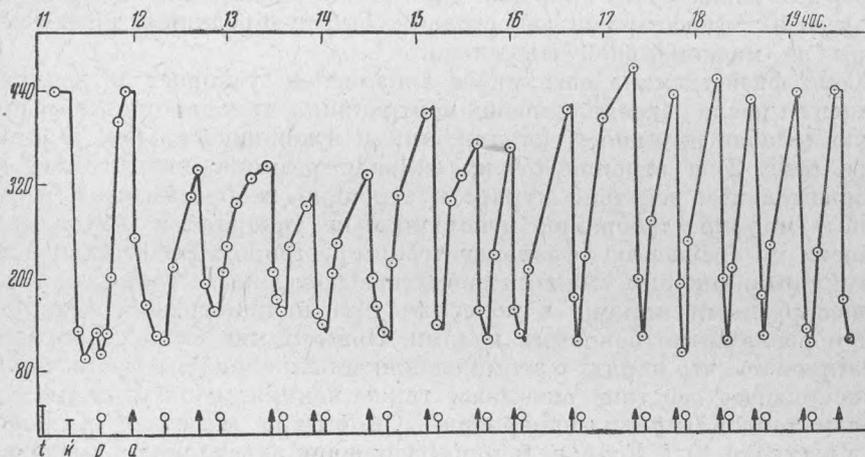
Деятельность хроматофоров костистых рыб управляется двумя системами регуляторов: с одной стороны,—нервными, с другой,—гормональными, кровяными. Внешние раздражения воспринимаются, конечно, органами чувств—зрительными или кожными, но к хроматофорам они могут передаваться или непосредственно через нервно-эффекторные окончания, или предварительно возбуждая работу желез внутренней секреции и изменяя таким образом состав крови. Одни исследователи приписывают главную роль в регуляции окраски у живой рыбы преимущественно нервно-эффекторной системе, другие—преимущественно гормональной. Надо думать, что у разных рыб может преобладать то та, то другая регуляция. В тех случаях, если одновременно реагируют все хроматофоры, естественно заключить, что раздражение приносится к ним общим током крови; но когда на коже возникает определенный рисунок, состоящий из пятен и полос разной величины и формы, часто имитирующих расцветку дна (камбаловых), приходится говорить уже о нервно-эффекторной регуляции.

Какие именно гормоны выделяются у живой рыбы из эндокринных желез крови в качестве регуляторов, нам до сих пор в точности неизвестно. На основании опытов с искусственной инъекцией гормонов, извлечением или пересадкой эндокринных желез, а также по опытам на изолированных чешуях большинство исследователей полагает, что гормоном, вызывающим контракцию, является адреналин, а его антагонистом, вызывающим экспансию,—какой-то гормон гипофизы, может быть «интермидин» (из средней лопасти). Однако в последних работах Хогбена и его сотрудников^(1, 2) обе функции приписываются гормонам под мозговой железы, один из которых помещается в передней лопасти, а другой в задней.

На изолированных чешуях карася я изучал действие гормонов, извлеченных из эндокринных желез млекопитающих. Адреналин (раствор 1 : 1000 фабрики эндокринных препаратов НКЗ) быстро вызывает максимальную концентрацию меланофоров, даже будучи применен в очень больших разведениях в тетралите. Уже раствор 10^{-9} в большинстве случаев (однако не всегда) дает полную быструю контракцию, такую же, как растворы 10^{-6} (продажный адреналин, разведенный в 1000 раз), 10^{-7} и 10^{-8} . Но и более слабые растворы иногда дают контракцию, однако не полную и задержанную. В некоторых случаях наблюдалась заметная слабая контракция даже от раствора 10^{-12} . Здесь мы видим ясное нарушение закона «все или ничего», но ведь это—гормональная функция, совершенно не связанная с нервным раздражением. Действие адреналина не зависит от сохранности иннервации: реакция протекает одинаково как при полной сохранности синапса, так и на денервированных или кураризированных чешуйках, меланофоры которых не отвечают ни на электрический ток, ни на избыток K^+ ионов в тетралите. Еще одной особенностью адреналиновой контракции является отсутствие характерных для нервного раздра-

жения пульсаций при длительном воздействии гормона. Даже через несколько часов максимальной контракции в адреналине она не ослабляется и не сменяется экспансией. Повидимому, при такой контракции не возникает и периодических колебаний потенциала токов действия.

Если контракция в адреналине удерживается более 5 мин., то адреналин не всегда легко отмыть током тетралита; притом же экспансия в тетралите протекает медленно, затягиваясь иногда дольше, чем на 30—60 минут, и обычно не доходит до максимума. Быстрее происходит экспансия в питуитрине. Я употреблял Pituitrin Park & Davis, растворяя содержимое ампулы (1 см³) в 100—10 000 см³ тетралита. На фиг. 1 представлена кривая опыта 481, поставленного на денервированной и реагирующей на избыток К⁺ чешуйке. Вслед за сокращением в тетралите с избытком К⁺ меланофоры дали последовательно в течение восьми часов 14 контракций в адреналине 10⁻⁶, сменявшихся 14 экспансиями в питуитрине (10⁻⁴). Отметим, что последующие контракции и



Фиг. 1. Опыт 481. Неденервированные меланофоры, контрагирующие при избытке К (к). Последовательные экспансии от 1% питуитрина в тетралите (р) и контракции от 10⁻⁶ адреналина в тетралите (а).

экспансии протекали быстрее, чем первые, и размахи были очень крупными. Это — общее явление, свидетельствующее о каком-то постепенном налаживании контракционно-экспансионной реакции на гормоны.

Заменители питуитрина. Pituitrin P. & D., имевшийся в моем распоряжении, был большой давности, хранился у меня более 10 лет и естественно, что не во всех ампулах он сохранил полную активность. Довольно активным оказался препарат Vaporol (Burroughs Wellcome & Co) (1% раствора в тетралите), также свыше 10-летней давности. Несколько слабее действует 0,1%-ный Pituglandol La Roche, также очень старый препарат. Другие бывшие у меня экстракты и лизаты гипофизы оказались недействительными и не отличались по своему действию на контрагированные хроматофоры от тетралита, которым они разбавлялись.

Каков химический состав гормонов гипофизы, вызывающих экспансию меланофоров, нам не известно, а потому мы и не можем понять механизма их действия. Но мы знаем, что для многих изученных лучше гормонов, в частности для эстрогенных, найдены заменители, обладающие порою даже более высокой активностью, хотя нередко совершенно иной молекулярной структуры, даже без фенантренового ядра (например, производные стильбена). Поэтому у меня естественно возникла мысль поискать таких заменителей питуитринового гормона, которые вызывали бы экспансию меланофоров после адреналина, когда тетралит не в состоянии вымыть

адреналин или дает лишь слабую экспансию. Чтобы подойти к пониманию того, чем именно вызывается экспансия, я выбирал преимущественно такие вещества, молекулярная формула которых хорошо изучена. Прежде всего я остановился на тех алкалоидах, которые применяют физиологи при изучении нервных процессов.

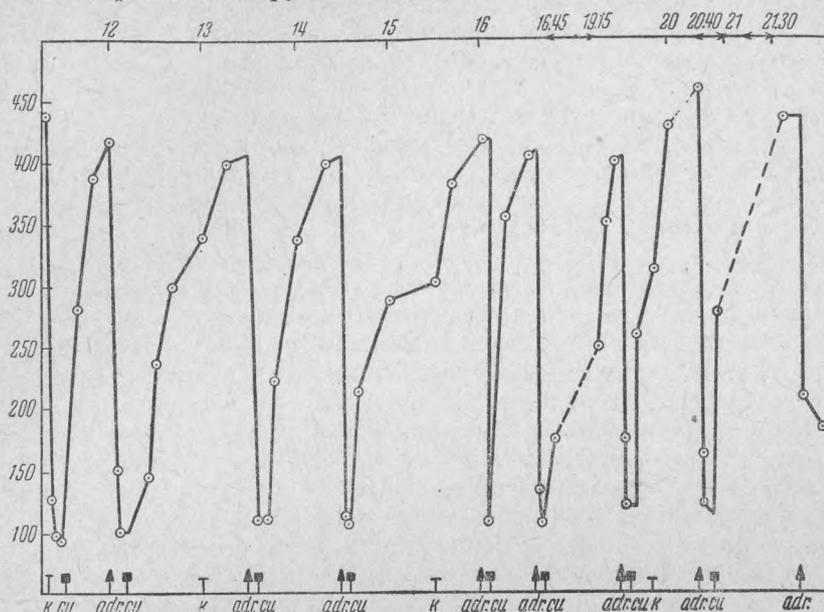
Ацетилхолин $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{CH}_3]$ считается медиатором нервного раздражения и в известной мере антагонистом адреналина. Я брал различные свежеприготовленные растворы ацетилхолина *May & Baker L^{td}* в тетралите (от 10^{-7} до 10^{-3}), но почти никакого действия на меланофоры обнаружить не удалось. Как слабые, так и крепкие растворы действовали так же, как тетралит. Предполагая, что ацетилхолин может быстро разлагаться холин-эстеразой, я прибавлял к его растворам 10^{-4} физостигмина (= эзерина). Такие растворы оказались сильно активными, превышающими по своей активности экспансирующее действие питуитрина. Однако выяснилось, что прибавка ацетилхолина здесь излишня, так как и без него 10^{-4} физостигмин дает столь же быструю реакцию, доводя меланофоры до максимальной экспансии.

Кроме физостигмина еще много алкалоидов ускоряет и усиливает экспансию после адреналиновой контракции: пилокарпин, кофеин и никотин (слабая реакция); хинолин, хинин и кокаин (сильная реакция); кураре (фиг. 2) и атропин (очень сильная реакция, иногда при более продолжительном действии кураре и атропина необратимая). С другой стороны, морфин, теобромин и колхицин не ускоряют и не усиливают экспансии по сравнению с физиологическим раствором. Все эти алкалоиды являются иминами или аминами ароматического ряда с очень сложными и разнообразными ядрами в молекуле при наличии 2—5 замкнутых колец с различными боковыми цепями. Поэтому мне было очень важно констатировать, что наряду с этими сложными алкалоидами очень сильное экспансирующее действие оказывает также конинин, один из самых простых алкалоидов (пропил-пиперидин). Он быстро вызывает экспансию даже в растворе 10^{-5} . Если, не меняя содержания адреналина в вызвавшем максимальную контракцию растворе, прибавить к этому раствору 10^{-5} конинина, то начинается немедленная быстрая экспансия.

Структурная формула конинина обладает свойствами, характерными для молекул так называемых дитерженгов (омылителей, эмульгаторов); в одном из шести углов бензольного кольца помещается гидрофильная группа NH, а остальные заняты гидрофобными группами (CH_2 и C_4H_8). Повидимому, с таким распределением гидрофобных и гидрофильных групп в структуре молекулы стоят и условия растворимости конинина: слабая растворимость в воде при значительной в органических растворителях. Вследствие этого конинин должен легко адсорбироваться на поверхности соприкосновения между водой или водным раствором и липоидами и обладать «омыляющими» свойствами, стабилизировать эмульсию и этим, по моей гипотезе, вызывать дисперсию киноплазматических капелек, содержащих отдельные зерна пигмента, т. е. экспансию меланофоров.

Хинолин по структуре своей молекулы близок к конинину. Ее формула $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}$. Стереоскопически эта структура, вероятно, имеет также два полюса: гидрофобный и гидрофильный. Растворимость хинолина аналогична растворимости конинина. Этим объясняется, что хинолин также обладает эмульгирующими свойствами и вызывает экспансию пигмента. Большинство алкалоидов, несмотря на сложную структуру их молекул, может быть сопоставлено по своим гидрофобно-гидрофильным свойствам с конинином и хинолином. Их молекулы имеют иминную гидрофильную группу в одном из колец и большое количество гидрофобных углеводородных групп, обеспечивающих растворимость в органических растворителях (липоидах),

С другой стороны, можно понять, почему среди алкалоидов имеются и такие, которые не вызывают экспансии пигмента. В молекуле морфина имеются две фенольные группы ОН, а в одно из замкнутых колец вставлен



Фиг. 2. Опыт 517. Неденервированные меланофоры в начале опыта контрагируют от избытка K^+ (k), после кураризации (cu) перестают реагировать на K^+ . Но кураре не останавливает реакции на адреналин (adr.) и после контракции в адреналине (adr. cu) вызывает быструю экспансию.

О. Этим существенно нарушается осевая асимметрия молекулы, определяющая омыляющие свойства дитержентов. В молекуле колхицина атом N помещается не в кольце, а в боковой цепи, как у адреналина, и, кроме того, имеется несколько метокси- и оксигрупп. В молекуле теобромина четыре разбросанных по двум кольцам иминных атома N и две кетогруппы CO. Он слабо растворяется в воде и спирту и не растворим в эфире. Провести одну ось в этой молекуле затруднительно.

Из патентованных «дитержентов», применяемых в технике, я испробовал «Некаль» (изопропил-нафталин-сульфокислоту), обладающий ясной одноосной гидрофильно-гидрофобной структурой молекулы. Раствор «Некаля» в тетралите (10^{-4}) даже в присутствии 10^{-6} адреналина вызывает максимальную экспансию меланофоров, и при длительном воздействии эта экспансия оказывается уже необратимой: так прочно адсорбируются молекулы дитержента к поверхности капелек киноплазмы с пигментными зернами.

Из соединений жирного ряда я установил диспергирующее действие диэтиламина $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_3 \end{matrix} > \text{NH}$, а также типичных омылителей с длинными парафиновыми цепями: лауриновой кислоты ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$), миристиновой кислоты ($\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$), пальмитиновой кислоты ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$) и стеариновой кислоты ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$). Насыщенные в тетралите растворы этих трудно растворимых кислот быстрее, чем тетралит, вызывают экспансию меланофоров после контракции в адреналине, а первые две мыльные кислоты ослабляют контракцию, даже будучи прибавлены к вызвавшему контракцию адреналину.

Этими экспериментами подтверждается достаточно прочно моя рабочая гипотеза, что процесс экспансии меланофоров в своей основе имеет эмульгацию капелек киноплазмы, нагруженных пигментными зернами.

З а м е н и т е л и а д р е н а л и н а. Экстракты и лизаты различных органов млекопитающих при том или ином разведении тетралитом оказывают такое же контрагирующее действие на меланофоры, как адреналин. Мною были изучены в этом отношении различные препараты надпочечника—как советские, так и заграничные, частью очень старые. Паранефрин Мерка оказался почти не утратившим своей активности, несмотря на 25-летнюю давность. Из органотерапевтических препаратов адреналино-подобное действие обнаружили: симпатомиметин д-ра Чукичева, оказавшийся, таким образом, вполне оправдывающим свое название, также фибролизин Мерка, эpineфрин по Кравкову (слабое действие) и несколько неожиданно кортин (фабрики эндокринных препаратов им. Н. А. Семашко). Может быть, не следует называть все эти препараты «заменителями» адреналина, так как они по всей вероятности действительно содержат адреналин. Во всяком случае для точной стандартизации органотерапевтических препаратов на симпатомиметическое действие я могу очень рекомендовать метод изолированных чешуй карася: на одной чешуйке, наряду с растворами адреналина определенной концентрации, можно проверить действие разных концентраций исследуемого препарата.

Формула молекулы адреналина хорошо известна. Ядро ее—двуатомный фенол с двумя фенольными группами в орто-положении (катехол) и метиловой боковой цепью, один водород которой замещен гидроксилом, а другой—аминогруппой ($C_6H_3(OH)^2-NH_2$).

Существенным отличием в структуре молекулы адреналина от молекул тех алкалоидов, которые вызывают экспансию меланофоров, является наличие двух феноловых групп катехолового кольца. Естественно было исследовать действие самого катехола [пирокатехина $C_6H_4(OH)^2$ ortho]. Оказалось, что и пирокатехин дает полную и быструю контракцию меланофоров как на денервированных, так и на нормальных чешуйках (фиг. 3), однако в концентрациях более высоких, чем адреналин: 10^{-3} и выше, тогда как 10^{-4} и 10^{-5} дают неполную контракцию. Изомер пирокатехина—резорцин, в котором феноловые группы находятся в мета-положении, и в концентрации 10^{-2} дает лишь неполную контракцию, а пара-соединение (гидрохинон) вообще не дает контракции и при концентрации 10^{-2} и 10^{-3} делает экспансию необратимой: после гидрохинона пирокатехин и адреналин не вызывают контракции, и клетка кажется убитой.

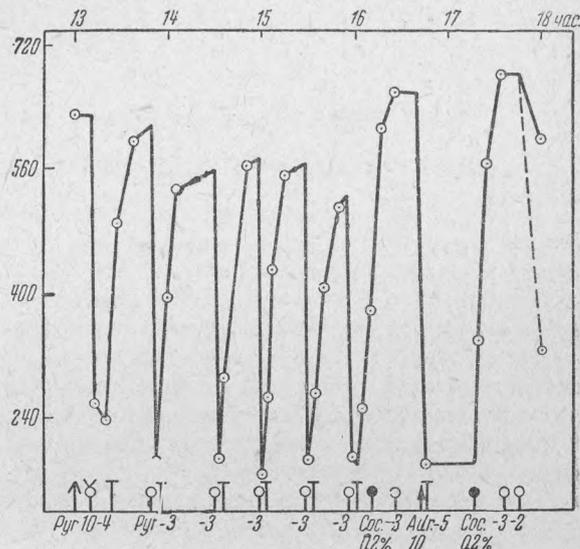
К чему может быть сведено различие между этими тремя изомерами по их действию на меланофоры? Все они благодаря наличию двух феноловых групп являются восстановителями и, отдавая свой H, превращаются в хиноны, подобно адреналину, который при этом теряет свою биологическую активность. Вряд ли здесь может играть роль различная растворимость этих фенолов в воде, а стало быть, и распределение между липоидной и водно-белковой фазами в меланофоре. По своей высокой растворимости резорцин занимает первое место, гидрохинон значительно меньше растворим в воде, а пирокатехин имеет среднюю величину растворимости по сравнению с двумя своими изомерами; порядок же этих изомеров по действию на меланофоры совершенно иной. Молекула орто-изомера строго одноосна с двумя различными полюсами, у пара-соединения оба полюса одинаковы, а молекула резорцина занимает промежуточное место по этому признаку. Поэтому можно думать, что различная биологическая активность этих трех изомерных фенолов зависит от распределения полюсов в их молекулах. Этим может определяться их адсорбция на поверхности между липоидной киноплазмой и водной текоплазмой; при адсорбции феноловые группы обращены, по видимому, к киноплазме, а гидрофобные—к текоплазме, отталкиваясь от последней. Одноатомный фенол C_6H_5OH в 10^{-3} растворе вызывает легкую контракцию пигмента, и приблизительно

такое же действие оказывает 10^{-3} пирогаллол, но в обоих случаях действие это менее интенсивно по сравнению с пирокатехином и адреналином.

Я исследовал также ряд других органических соединений, содержащих феноловые группы. Довольно сильным контрактором является тимол ($C_6H_3 \cdot CH_3 \cdot C_3H_7 \cdot OH$) в концентрированном растворе (около 1 : 1200). Несколько неожиданным оказалось, что аскорбиновая кислота [витамин С ($C_6H_8O_6$)] в растворе 10^{-4} — 10^{-5} дает хрошую контракцию. Молекула ее состоит из пятичленного углеродного кольца с двумя феноловыми гидроксильными в орто-положении, одной кетогруппой рядом и гидрофобной цепью $C_2H_5O_2$, так что она также может быть представлена одноосной с двумя полюсами.

В алкоголях жирного ряда гидроксил в противоположность фенольному не имеет кислого характера, и, вероятно, в связи с этим молекулы здесь не приобретают свойств диполя: этиловый алкоголь в слабых концентрациях не вызывает реакции меланофоров. Но при замещении трех гидроксильных групп хлором получается, по видимому, асимметрия молекулы, так как хлороформ $CHCl_3$ вызывает сильную, быструю обратимую контракцию. Среди алкалоидов я пока нашел только два, вызывающих контракцию в противоположность большинству алкалоидов—эмульгаторов: вератрин и секакорнин (La Roche) из спорыньи; структура молекул этих коллоидов неизвестна, но возможно, что они содержат феноловую группу. Среди анилиновых красок, содержащих феноловый гидроксил, я исследовал только дибромтимол-сульфон-фтаlein, едва растворимый в тетралите, и получил довольно сильную контракцию меланофоров.

Когда адреналин и его заменители отмываются сильными эмульгаторами, процесс отмывания, по видимому, не доходит до конца, а эмульгаторы, адсорбируемые киноплазмой, накладываются на слой контрактора. Этим объясняется, что при отмывании тетралитом меланофоров, расширившихся до максимальной экспансии, они сначала контрагируют—очевидно, до полного очищения от поверхностного слоя эмульгаторов; лишь позднее, когда начинает отмываться более глубокий слой адреналина и др., меланофоровы начинают снова экспандировать. Но так как тетралит нелегко отмывает адреналин, то экспансия по большей части долго не доходит до максимальной.



Фиг. 3. Опыт 582. Денервированные меланофоровы не контрагируют от переменного тока (стрелка острием вверху). Быстрая контракция от пирокатехина (Pyr. 10^{-4} и 10^{-3}) и адреналина (adr. 10^{-5}). Экспансия в тетралите и в кокаине (Coc. 0,2%). После кокаина реакция от пирокатехина задерживается.

Поступило
25 VI 1940

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Hogben, T. Lancelot, The Pigmentary Effector System, London, 1—152 (1924). ² H. Waring, Proc. R. Soc., 128 : 115 (1939).