

Ф. Б. ШАПИРО

К ВОПРОСУ О ВОЗМОЖНОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КУРИНЫЙ ЗАРОДЫШ ЧЕРЕЗ ЛАТЕБРУ

(Представлено академиком А. И. Опариным 7 IX 1953)

Методика, позволяющая менять питание куриного зародыша на ранних стадиях развития, открывает возможности направленного изменения эмбрионального развития. Задавшись целью разработать такую методику, мы обратились к простейшему способу воздействия на зародыш — к введению веществ в развивающееся яйцо. Для достижения максимальной эффективности введения желательно было вводить вещества в латэбру или непосредственно связанную с ней подзародышевую полость, т. е. в ту часть желтка, которая подстилает развивающийся зародыш и, очевидно, непосредственно участвует в его питании на самых ранних этапах развития. Прежде всего надлежало решить следующие вопросы:

1. Переносит ли развивающийся зародыш механическое травмирование, связанное с введением в желток яйца (в латэбру) посторонних веществ.

2. Будут ли вещества, введенные в латэбру, оказывать действие на развивающийся зародыш.

Для ответа на первый вопрос мы до инкубации яйца стерильно вводили в латэбру витальные красители — метиленовую синьку и толуидиновую синюю (0,2—0,5 см³). Использование красителей позволяло контролировать точность введения. Красители вводились в буферном растворе с рН 6,4. рН было выбрано на основании данных Е. И. Третьяковой по изменению активной реакции яйца во время инкубации. Оказалось, что после введения красителя зародыши продолжали нормально развиваться и вылуплялись здоровые цыплята. Таким образом, выяснилось, что введение в латэбру небольших количеств посторонних веществ не нарушает нормального зародышевого развития.

Для того чтобы ответить на второй вопрос, нужно было выбрать для введения такое вещество, которое: 1) действует достаточно быстро и 2) оказывает совершенно определенное действие, или, другими словами, реакция на которое хорошо известна. Этим требованиям вполне удовлетворяют вещества, обладающие способностью связывать сульфгидрильные группы реактивных белков и тем самым вызывающие целый ряд определенных, уже достаточно изученных реакций. Одной из таких обратимых реакций, наступающих вследствие связывания сульфгидрильных групп на целом животном, является остановка дыхания и прекращение сердцебиения. Мы и использовали изменение сердечной деятельности в качестве показателя связывания сульфгидрильных групп функциональных белков развивающегося куриного зародыша при введении тиоловых ядов в латэбру.

Деятельность сердца изучалась при помощи методики прижизненного наблюдения за зародышем через специально проделанное в скорлупе яйца «окошко». В скорлупе, ближе к тупому концу яйца, выпиливается

квадрат, и выпиленный участок скорлупы снимается вместе с подскорлупной оболочкой. На его место вставляется покровное стекло, укрепляемое на скорлупе яйца парафином. Во избежание присыхания зародыша к стеклу желательна класть стекло на достаточно толстый слой парафина. Пропиливать «окошки» лучше всего после 3-дневной инкубации яиц — в этом случае, как правило, процент выживаемости зародышей после операции наиболее высок. Если операция сделана с соблюдением достаточной стерильности и зародыш остался совершенно неповрежденным, нормальное развитие продолжается и можно до самого вылупления следить через стекло за развивающимся цыпленком. Сокращения сердца через «окошко» лучше всего наблюдать на 4—5-суточных зародышах, так как позднее у зародыша сердце начинает закрываться оболочкой и кожей.

Работа проводилась на яйцах кур породы белый леггорн. «Окошки» пропиливались после 3-суточной инкубации яиц, а самый эксперимент (т. е. введение вещества) проводился спустя 1—2 суток. Этим достигалась возможность, во-первых, проводить операцию и эксперимент в оптимальные сроки и, во-вторых, не работать с не выдержавшими операции, замирающими зародышами (что резко искажало бы результаты опыта), ибо именно в первые сутки после операции наблюдается наибольшая гибель зародышей (примерно 8—10%). Реакцией на состояние сульфгидрильных групп служили как частота, так и ритмичность сердечных сокращений. Сердцебиения подсчитывались с помощью секундомера за 30 сек., счет велся с 10—30-минутными интервалами. Яйца во время эксперимента находились в инкубаторе для того, чтобы избежать охлаждения, которое сразу же отражается на сердечной деятельности зародыша. Все манипуляции с яйцами на рабочем столе проводились на нагревательном столике. Растворы вводились в яйцо шприцем с тонкой иглой непосредственно в латекру или подзародышевую полость.

У 4—5-суточных куриных зародышей в норме число сердечных сокращений достигает 120—150 в минуту, причем колебания в частоте сердцебиений у одного зародыша не превышают 10—15 ударов в минуту. Наличие резких колебаний в частоте сердцебиений указывает на нарушение нормального состояния и, как правило, является одним из симптомов близкой гибели зародыша. Сердцебиение нормального зародыша характеризуется не только постоянством частоты сокращений, но и их ритмичностью — наличие перебоев указывает на глубокие нарушения, приводящие, обычно, к гибели зародыша.

В качестве вещества, связывающего сульфгидрильные группы, мы использовали один из тиоловых ядов — хлористый кадмий. До введения в яйцо CdCl_2 мы уточняли характер сердцебиений каждого зародыша. Для этой цели в течение 10—40 мин. регистрировалась частота сердечных сокращений и отмечалась их ритмичность.

Для связывания сульфгидрильных групп были испробованы растворы CdCl_2 двух концентраций: $1 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-3}$ г/см³. Для таких кратковременных опытов удобнее пользоваться раствором концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ г/см³. При введении 0,2 см³ раствора такой концентрации реакция наблюдалась уже через 30—40 мин., в то время как такое же количество раствора концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ г/см³ не вызвало заметной реакции в течение многих часов.

Хотя опыты по введению красителей в латекру показали, что незначительное механическое травмирование яйца не нарушает зародышевого развития цыпленка, мы для контроля, параллельно с введением CdCl_2 , ввели в несколько яиц равное количество дистиллированной воды. Как и следовало ожидать, введение дистиллированной воды не вызвало никаких нарушений сердечной деятельности, и эмбрион продолжал нормально развиваться.

Реакция на введение хлористого кадмия протекает обычно следующим образом: примерно через 30—40 мин. начинаются перебои в сердцебие-

нии, чередующиеся с тахикардией, так что среднее число сокращений в минуту в первое время значительно не изменяется, а иногда на фоне перебоев за счет тахикардии число сердечных сокращений в минуту даже возрастает. Перебои, вначале слабые, с течением времени настолько усиливаются, что даже в тех случаях, когда наблюдается и тахикардия, средняя частота сердцебиений постепенно уменьшается. В конце концов сокращения сердца становятся очень медленными и затрудненными, и, как правило, через 3—4,5 часа сердце останавливается и зародыш замирает. На рис. 1 показана характерная картина изменения сердечной деятельности 4-суточного куриного зародыша после введения в латекс 0,2 см³ раствора CdCl₂ концентрации 1 · 10⁻³ г/см³.

Снижение частоты сердцебиений, при наличии перебоев, до 100 ударов в минуту является доказательством глубоких нарушений, заканчивающихся, как правило, гибелью зародыша. Поэтому мы рассматриваем эту частоту, сопровождающуюся аритмией, как критическую и при вычерчивании кривых считаем возможным не наносить на график остальную часть нисходящей ветви кривой.

Получив эффект связывания сульфгидрильных групп путем введения в латекс тиолового

яда, мы попытались с помощью цистеина — донатора сульфгидрильных групп, вводимого тоже в латекс, снять этот эффект. При этом преследовалась двоякая цель: во-первых, отвергнуть возможное возражение, что реакция на хлористый кадмий еще не является доказательством возможности воздействия на зародыш через латекс, ибо CdCl₂ представляет собой сильный яд. Снятие же эффекта от тиолового яда путем введения с цистеином свободных сульфгидрильных групп, несомненно, должно было свидетельствовать о реальности этого пути воздействия на зародыш. Во-вторых, представляло интерес наблюдать на курином зародыше то, что наблюдалось рядом авторов на других объектах. Цистеин вводился в количестве 0,2 см³ (концентрация 1 · 10⁻³ г/см³) в латекс, обычно после того, как начинало сказываться действие CdCl₂ (замедление сердцебиения, появление перебоев). Одновременно для контроля в другие яйца, после введения CdCl₂, вводилось 0,2 см³ дистиллированной воды. Частоту сердцебиений продолжали регистрировать каждые 10—30 мин.

На рис. 2 представлены результаты типичного эксперимента, проведенного на 4-суточных зародышах. Как видно из графика, введение цистеина временно снимает эффект, полученный от действия тиолового яда, и тем самым увеличивает продолжительность жизни зародышей. В то время как 4-суточный куриный зародыш после введения в латекс 0,2 см³ раствора CdCl₂ живет в среднем 3—4,5 часа, такой же зародыш, получивший, кроме CdCl₂ 0,2 см³ раствора цистеина, живет 6—10 час. (для 5-дневных зародышей соответствующие цифры будут 4—5 и 7—10 час.). Введение вместо цистеина дистиллированной воды не оказывало никакого действия. На рис. 2 видно также, что после введения цистеина сердечная деятельность зародышей временно нормализуется — исчезают перебои, восстанавливается частота сокращений.

Действие хлористого кадмия удается снимать также введенным мочевины — вещества, высвобождающего резервные сульфгидрильные группы.

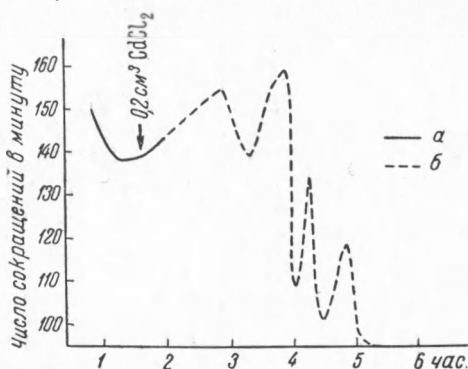


Рис. 1. Изменение частоты сердечных сокращений у 4-суточного куриного зародыша после введения в латекс CdCl₂. а — равномерное сердцебиение, б — сердцебиение с перебоями

В этом случае, как и при введении цистеина, сердечная деятельность зародыша временно возвращается к норме. Продолжительность жизни зародыша после введения мочевины равнялась 6—7 час.

В наших опытах цистеин и мочевина оказывали временное действие, и зародыши в конце конгов погибали. Очевидно, это являлось следствием

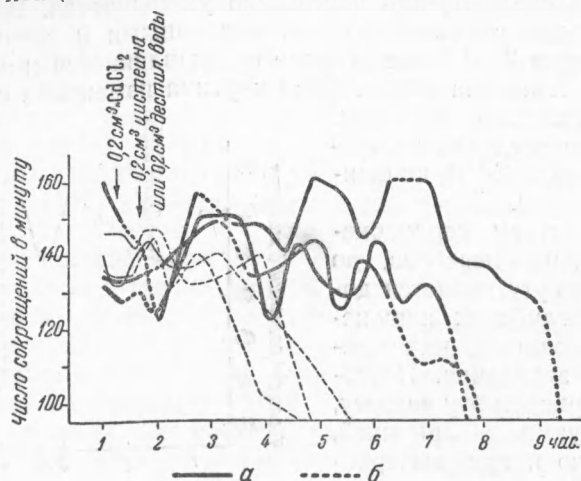


Рис. 2. Изменение частоты сердечных сокращений у 4-суточных куриных зародышей после введения в латектру CdCl_2 и CdCl_2 + цистеин. Кривые, обозначенные тонкой линией, показывают изменения после введения CdCl_2 , жирной — после введения CdCl_2 + цистеин. а — равномерное сердцебиение, б — сердцебиение с перебоями

слишком большой токсичности употреблявшегося нами раствора хлористого кадмия.

Таким образом, можно прийти к выводу, что нам удалось подтвердить возможность воздействия на зародыш через латектру.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
10 XII 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Х. С. Коштоянц, Белковые тела, обмен веществ и нервная регуляция, изд. АН СССР, 1951. ² Н. П. Третьяков, Инкубация яиц сельскохозяйственных птиц, 1951.