

До питання про вплив мютатіону, цистину й триптофану на ембріональний розвиток *triton taeniatus*.

Проф. Є. О. Фінкельштейн і Є. М. Шапіро.

Лабораторія механіки розвитку (зав.—проф. Є. О. Фінкельштейн) Українського
інституту експериментальної медицини (директор—проф. Я. І. Ліфшиц).

1918 року Spemann виявив, що верхня губа бластопора тритонової гастрুলи, імплантована під презумптивний епітелій, змінює напрям розвитку цієї ділянки ектодерми, утворюючи додаткову нервову трубку, а прилягаючі ділянки мезодерми утворюють додаткові соміти. У зв'язку з цим Spemann назвав верхню губу бластопора „організатором“ розвитку осьових органів зародку. Доведено, що гомологи верхньої губи бластопора амфібій — верхня губа бластопора костистих риб (Luther, 1935), передня частина первинної смужки птахів (Waddington, 1930) відзначаються таким же організуючим впливом, тобто індукують розвиток осьових органів зародку.

Проте дальші дослідження відкинули уявлення про „організатор“ у тому вигляді, як його напочатку висунув Spemann. Geinitz і Bautzmann (1925, 1926), Mangold (1927, 1928) і Spemann (1927) показали, що індукуючою здатністю відзначаються різні частини зародків хвостатих амфібій.

Уманський (1931, 1932) виявив індукуючий вплив регенераційної бластери. Дуже велике значення щодо цього має виявлення індукуючого впливу на зародків тритону тканин тварин, що належать до інших систематичних груп. Поруч не цілком вірогідних даних Woerdemann'a (1933) про індукуючий вплив на зародка тритону щурячої кардиноми*, тепер маємо безперечні праці Holtfreter'a (1933, 1934), які демонструють індукцію осьових органів зародків хвостатих амфібій тканинами різноманітних тварин — від червів до людини включно. Тим же часом після невдалих дослідів Spemann'a (1919) і Marx'a (1925) виявлено, що індукувати можуть не тільки живі, а й мертві тканини. Spemann (1932) досяг цього з допомогою роздавленої верхньої губи бластопора, а Holtfreter (1933, 1934) — з допомогою різних тканин, убитих нагріванням і висушуванням. Контрольні досліди із всаджуванням шматочків воску, агар-агару, коагульованого білка курячого яйця та інших механічних подразників дали негативні результати, призвівши до висновку, що „індукції“ не можна спричинити простими механічними подразниками, але тут беруть участь речовини, характерні для тваринних клітин**.

Принципіально важливий висновок із цього відкриття, якого, проте, не поділяє сам Holtfreter, є відмова від самого поняття „організатор“. Виявляється, що здатність до розвитку нервової трубки властива всій ектодермі, як і здатність розвитку сомітів — всій мезодермі. Індукуючі ж речовини „організатора“ лише збуджують цю здатність до активності.

* Досліди E. Wehmeier не потвердили цього (1934).

** J. Holtfreter. — W. Roux, Archiv für Entwicklungsmechanik. Bd. 132. H. 2-3, S. 348. 1934.

Цей вплив J. Needham, C. H. Waddington і D. M. Needham запропонували назвати *evocation*, а поняття „організатор“ замінити на *evocator**.

Отак постало питання, що це за речовини, які спричиняють розвиток осьових органів зародку? Spemann, Fischer та Wehmeier, виходячи з припущення, що формотворення пов'язане з гліколітичними процесами, пробували добути індукцію з допомогою глікогену. 1933 року вони повідомили про позитивні результати цих дослідів. Проте Holtfreter та інші автори спростували їхні дані.

Велику роботу щодо цього провели J. Needham та його співробітники — Waddington і D. Needham. Вони виявили (1933, 1934), що індукуюча речовина переходить в ефірний екстракт і міститься в його фракції, що не змиляється. На думку цих авторів, вона має стериноподібну структуру. Перевірка цієї гіпотези шляхом введення синтетичних екстрогенних вуглеводів дала, на думку J. Needham'a (1933), позитивні результати. Виходячи з того, що в деяких випадках тканини набувають індукуючих властивостей тільки після смерті, Needham припускає, що „у всій ектодермі та ентодермі зародку є комплекс — організатор — глікоген-білок, аналогічний десмоглікогену, лецитин-вігелінам та астоцинові. Цей комплекс розпадається цілком або почасти тільки в дорозальній губі blastopora із звільненням активного організатора***. Далі він припускає, що таке звільнення організуючого фактора може статись під впливом гліколітичних або оксидативних процесів.

Отже J. Needham із своїх позицій приходить до уже висловленого Child'ом та його школою припущення про зв'язок між оксидативними і формотворними процесами.

Виходячи саме з припущення про зв'язок між розвитком організму та оксидативними процесами, що відбуваються в ньому, ми вирішили дослідити вплив глютаміну й цистину на розвиток зародка Triton taeniatum. За підставу для цього для нас правило виявлення багатьма авторами стимулюючого впливу глютаміну та інших SH-сполук на клітинний поділ і ріст організмів. White (1930) виявив, що меристема в рослин містить більше глютаміну, ніж інші тканини. Thompson і Voegtlin показали, що тканини зародків щурів містять більше глютаміну, ніж тканини дорослих тварин. Castle й Gregory (1931) виявили, що у великих порід кроликів дробіння яєць іде швидше, ніж у дрібних порід. Виходячи з цього, Gregory і Goss (1933, 1935) дослідили вміст глютаміну в новонароджених кроликів і показали, що його концентрація вища у великих порід. Звідси вони доходять висновку, що глютамін є стимулятор клітинного поділу й росту.

Деякі експериментальні дані підтверджують цей висновок. F. S. Hammett (1929) довів, що SH-сполуки стимулюють ріст коренів кукурудзи і поділ парамедій. Того ж таки року Baker стимулював поділ фібробластів in vitro доданням SH-сполук. 1930 року Voegtlin та Chalkley досягли того ж самого щодо Amoeba proteus. D. W. Hammett і F. S. Hammett (1932) показали, що додання SH-сполук до морської води різко прискорює розвиток деяких морських тварин. Jahn (1933), а також Mast і Pace (1935) під впливом SH-сполук досягли стимуляції поділу flagellates Chilomonas paramecium. Вони ж показали, що цей організм здатний використовувати сірку неорганічних сполук. Без сірки зменшується активність, припиняється поділ, нагромаджується жир. Нагромадження жиру автори зв'язують із зниженням оксидативних процесів. Нарешті, настає жирова дегенерація і смерть.

У світлі цих досліджень стає зрозумілим відкрите Coldwater'ом (1933) нагромадження глютаміну в регенератах Planaria maculata і прискорення регенерації у Tubifex під впливом глютаміну, цистину й тіоглікової кислоти.

Є також дані про те, що SH-сполуки не впливають на клітинний поділ і розвиток і навіть затримують їх. Sun (1930) не досяг підвищення швидкості дробіння яєць морського їжака з допомогою H_2S і сполук, якими користувався Hammett. У дослідях Mor-

* J. Needham, C. H. Waddington, D. M. Needham.—Proc. of the Royal Society. B. V. 114. 1934.

** Нидхем Дж.—XV міжнародний фізіологічний конгрес. Тезиси сообщений. 1935.

gulis і Green (1931) цистин не стимулював регенерації у *Podarke obscura*. У дослідях Gaunt'a (1931) яйця молюсків *Physa* і *Lymnaea* розвивались у розчинах цистину швидше, ніж у розчинах алаїну, але повільніше, ніж у проточній воді. Негативні результати цих дослідів можна пояснити або тим, що в даному разі дисиміляційні процеси такою мірою посилились, що виснаження затримало клітинний поділ і регенерацію, як це було в дослідях із впливом динітрофенолу*, або тим, що автори брали невідповідні концентрації. На цю останню думку пристають також Mast і Pace (1935).

Досліди по вивчання впливу глютатіону (відновленої форми) й цистину ми поставили на весні 1934 і 1935 рр. Проте деякі несприятливі умови 1934 року дозволили тоді зробити порівняно мало операцій; до того ж смертність у післяопераційний період була дуже велика. А тому ми користуємося тільки матеріалом весни 1935 року. За експериментальний матеріал ми брали тільки зародків *Triton taeniatus* на стадії ранньої гастрული. Операції ми провадили за рекомендованим Spremann'ом способом з допомогою тонких пінцетів, волосяних петель, волосяних і скляних голок.

Спочатку ми робили операції в 0,2% фізіологічному розчині з дальшим перенесенням оперованих зародків у профільтовану через Шамберленівську свічку воду. Далі ми переконалися, що без шкоди для зародків і без додаткових технічних труднощів можна робити операції прямо у фільтрованій воді, отож перестали користуватися фізіологічним розчином.

Велика смертність оперованих зародків стосується до початку весни 1936 року, коли ми їх, як звичайно, держали у ванночках з восковим дном. Мабуть через те, що до тієї сторони зародків, яка стикається з воском, не припливає вода, там дуже часто поставали явища мацерації, які поступово призводили до загибелі цілого зародку. Пізніше, довідавшись про те, що Bautzmann за „ложе“ для оперованих зародків амфібій користується натягнутим шовком, ми самі вирішили використовувати цей спосіб. Для цього ми брали скляні кільця заввишки приблизно в 1 см і діаметром в 2,5 см, які ми добували при зрізанні верхньої частини широких пробірок. На обвідку таких кілець ми натягували млиновий шовк і вміщали їх у воду (шовком догори). Тоді вода, що циркулювала навколо зародку, легко постачала йому кисень і звільняла його від продуктів дисиміляції. Такий спосіб утримання зародків певною мірою вигідний тим, що дає змогу легко стерилізувати і кільця з млиновим шовком і посудини, в які вони вміщуються.

Ми брали 0,5% розчин речовин, з якими ставились досліди, в 3% розчині агару на 0,2% фізіологічному розчині. Щоб полегшити маніпуляції, ми слабо забарвлювали розчин нілбляусульфатом. Шматочки такого застиглої розчину ми всаджували під ектодерму вентральної та бокової частин зародку (іноді вони були й на спинній стороні його, а далі безпосередньо стикалися з нервовою трубкою). Частина речовини лишалася в агарі у вигляді кристаликів. Через 2-3 дні після всаджування, коли зародок фіксувався, кристаликів уже не було. Це свідчить за те, що речовина легко дифундувала із агара в тканини зародку.

Фіксацію ми провадили за способом Voyn'a, а забарвлювання — борним карміном і пікро-індигокарміном.

Спинімося спочатку на дослідях з цистином. Всього проведено 124 операції. Із оперованих зародків загинуло 62, тобто 50%, решта 62 зародки розподілялись ось як: 27 (43%) не дали помітної реакції, 12 (20%) оперованих мали великі сферичні здуття найчастіше на черевній стороні. У живих зародків ці здуття були напівпрозорі. На зрізах вони мали вигляд порожніх міхурців, оточених зовні тонким шаром ектодерми, а на внутрішній стороні — переважно жовтковою масою.

* Б. О. Фінкельштейн і Р. А. Коварська, „Експериментальна медицина“, 1936. № 7.

Можна припустити, що такі здуття утворилися наслідком набрякання шматочків агару. Нарешті, 23 зародки (37%) виявили реакцію ектодерми. Вони утворили на своїй поверхні типові вирости, найчастіше витягнуті. Іноді такі вирости мали поліповидний характер, іноді вони своїм зовнішнім виглядом деякою мірою нагадували індуковані „організатором“ нервові трубки. Проте гістологічні дослідження таких виростів не potwierдили індукції. Ці утвори ані формою, ані розміщенням клітин не нагадували нервової трубки, але вони являли собою значні скупчення клітин, утворених в результаті їх посиленої проліферації під впливом всадженої речовини.

Близьку до цього картину дали наші досліди з відновленням глютацією. Із 106 оперованих зародків загинули 41 (щось із 39%), 49 (74% тих, що лишилися) не дали реакцій. Зародків із здуттями без проліферації не було зовсім, зародків із виростами наслідком посиленої проліферації клітин ектодерми було 16 (26% тих, що лишилися).

Контрольні досліди із чистим розчином агар-агару без додання інших органічних речовин дали такі результати. З 37 оперованих зародків загинуло 18 (49%), 5 (26% тих, що лишилися) розвивалися нормально, 14 (74% тих, що лишилися) утворили сферичні здуття без проліферації. Виростів із розмножених клітин ектодерми не утворилось.

Отже, добуті результати, гадаємо, свідчать за те, що сульфгідрильні амінокислоти, не будучи „організуючими“ речовинами в прямому розумінні цього слова, все ж є стимулятори клітинної проліферації.

Щоб перевірити це припущення, ми вирішили діяти амінокислотою, що не містить сірки. Ми провели 60 операцій всаджування агара з триптофаном. Із оперованих зародків 17 (22%) загинули; із тих, що лишилися, 20 (47%) не дали помітної реакції, 12 (27% тих, що лишилися) утворили здуття без проліферації, нарешті, 11 (26% тих, що лишилися) утворили такі ж вирости із розмножених клітин ектодерми, як це сталося під впливом цистину та глютацію.

Щодо цього дуже цікаво зіставити наші останні результати з недавно опублікованими даними F. S. Hammett'a і його співробітників M. L. Elliot і Chatallash (1935). Вони діяли розчинами гістидину, триптофану й аргініну в різних концентраціях на гідратів *Obelia geniculata*, щоб з'ясувати вплив цих амінокислот на ріст і розвиток. Їхні експерименти показали, що названі амінокислоти в певних концентраціях можуть стимулювати ріст і проліферацію мабуть не безпосередньо, а через зміни, що вони їх створили в обміні речовин.

Отже, працюючи над зовсім іншими організмами і користуючись іншою методикою, ми дійшли висновків, дуже близьких до тих, які добули F. S. Hammett і його співробітники.

1. Амінокислоти, що містять сірку, стимулюють розмноження клітин, але не беруть прямої участі у формоутворенні.

2. Амінокислоти, які не містять сірки (триптофан), справляють аналогічний вплив.

3. Такий вплив не є результат механічного діяння, а, мабуть, є наслідок змін в обміні речовин, спричинених цими амінокислотами.

Література.

Bautzmann N.—W. Roux'Archiv f. Entwicklungsmechanik. Bd. 119. 1929.

Bautzmann H.—Die Naturwissenschaften. H. 51. 1932.

Castle W. E. and Gregory P. W.—The Journ. of exp. Zool. V. 66. No. 2. 1931.

- Coldwater K. B.—The Journ. of exp. Zool. V. 65. No. 1. 1933.
 Фінкельштейн Є.—Вісті Укр. акад. наук. № 4. 1934.
 Fischer F. G. und Wehmeier. E.—Die Naturwissenschaften H. 27. 1933.
 Gregory P. W. and Castle W. E.—The Journ. of exp. Zool. V. 59. No. 2. 1931.
 Gregory P. W. and Goss. H.—Amer. Naturalist. V. 67. 1933.
 Gregory P. W. and Goss H.—The Journ. of exp. Zool. V. 66. No. 1, 3. 1933.
 Goss H. and Gregory P. W.—The Journ. of exp. Zool. V. 71. No. 2. 1935.
 Hammett F. S.—Protoplasma. Bd. 7 H. 3. 1929.
 Hammett F. S. and Hammett D. W.—Protoplasma. Bd. 15. H. 1. 1932.
 Hammett F. S.—Protoplasma. Bd. 23. H. 3. 1935.
 Hammett F. S. and Elliot M. L.—Protoplasma. Bd. 23. H. 4. 1935.
 Hammett F. S. and Chatalash N.—Protoplasma. Bd. 23. H. 4. 1935.
 Holtfreter J.—Die Naturwissenschaften. H. 51. 1932.
 Holtfreter J.—W. Roux'Archiv f. Entwicklungsmechanik. Bd. 128. H. 3. 1933.
 Holtfreter J.—W. Roux'Archiv f. Entwicklungsmechanik. Bd. 129. H. 4. 1933.
 Holtfreter J.—Die Naturwissenschaften. H. 43. 1933.
 Holtfreter J.—W. Roux'Archiv f. Entwicklungsmechanik. Bd. 132. H. 2-3. 1934.
 Ицксон И.—Врачебное дело № 12. 1935.
 Колдаев Б. М.—Укр. біохімічний журнал. Т. 7. 82. 1935.
 Колдаев Б. М.—Глютаціон, його властивості та роль у фізіології й патології.
 Київ. 1935.
 Luther W.—Biol. Zentralblatt. Bd. 55. H. 3/4. 1935.
 Mangold O.—Ergebnisse der Biologie. Bd. 3. 1928.
 Mangold O.—Die Naturwissenschaften. H. 51. 1932.
 Mangold O.—Die Naturwissenschaften. H. 43. 1933.
 Mast S. O. and Pace D. M.—Protoplasma. Bd. 23. H. 3. 1935.
 Morgulis S. and Green D. E.—Protoplasma. Bd. 14. H. 1. 1931.
 Морозов Б. Д.—Успехи совр. біології, Т. 4. В. 1. 1935.
 Needham J., Waddington C. H., Needham D. M.—Proc. of the Royal Society. B. V.
 V. 114. 1934.
 Нидхем Дж.—XV межд. физиологич. конгресс. Тезисы сообщений. 1935.
 Нидхем Дж.—Успехи совр. біології, т. 4. В. 4-5. 1935.
 Spemann H.—Die Naturwissenschaften. H. 51. 1932.
 Spemann H.—Die Naturwissenschaften. H. 27. 1933.
 Waddington C. H., Needham J., Needham D. M.—Die Naturwissenschaften, H. 43.
 Wehmeier E.—W. Roux'Archiv f. Entwicklungsmechanik. Bd. 132. H. 2-3. 1934.
 White V. B.—Science. V. 71. 1930.

К вопросу о влиянии глютамина, цистина и триптофана на эмбриональное развитие *triton taeniatus*.

Проф. Е. А. Фінкельштейн и Е. М. Шапиро.

Лаборатория механики развития (зав.— проф. Е. А. Фінкельштейн)
 Украинского института экспериментальной медицины
 (директор — проф. Я. И. Лифшиц).

В нашей работе мы исходили из теории Child'a о связи между градиентом метаболизма и формообразовательными процессами. Опыты Holtfreter'a и других авторов показали, что свойствами „организатора“ Spemann'a обладают некоторые ткани зародышей и взрослых животных различных систематических групп как в живом, так и в мертвом состоянии.

Это свидетельствует о том, что индукция, или, как вполне основательно предлагают обозначать данное явление J. Needham, C. H. Waddington и D. M. Needham — evocation, является результатом действия каких-то химических веществ.

Исходя из предположения, что evocator'ом могут быть вещества, участвующие в окислительных процессах, мы всаживали под эктодерму ранней гаструлы *Triton taeniatus* кусочки агар-агара, содержащие восстановленный глутатион или цистин, которые мы брали в количестве 0,5% на 3% раствор агар-агара в 0,2% физиологическом растворе. Контрольным животным всаживались кусочки 3% раствора агар-агара в 0,2% физиологическом растворе.

Индукции осевых органов зародышей получить не удалось. Однако получались значительные выросты эктодермы, явившиеся результатом усиленной клеточной пролиферации.

Контроль (раствор агар-агара без аминокислот) таких результатов не дал. Здесь имели место только вздутия, образовавшиеся в результате набухания агар-агара.

Табл. 1 показывает результаты опытов:

Табл. 1.

Введенное вещество	Всего опери- ровано	Из них погибло	С о х р а н и л о с ь			
			Всего	Без измене- ний	С пролифе- рацион- ными выро- стами	Со взду- тиями без пролифе- рации
Восстановленный глю- татион	106	41	65	49	16	—
Цистин	124	62	62	27	23	12
Контроль	37	18	19	5	—	14

Для решения вопроса, не влияют ли здесь аминокислоты независимо от содержащейся в них серы, мы поставили аналогичные опыты с триптофаном.

Результаты даны в табл. 2.

Табл. 2.

Всего опери- ровано	Из них погибли	С о х р а н и л и с ь			
		Всего	Без измене- ний	С пролифе- рацион- ными выро- стами	Со взду- тиями без пролифера- ции
60	17	43	20	11	12

Таким образом, мы приходим к выводу, что аминокислоты как таковые так изменяют процессы метаболизма, что стимулируют пролиферацию. Это совпадает с результатами опытов F. S. Hammett, M. L. Elliot, N. Chatallash, стимулировавших рост при развитии developmental growth гидроидов *Obelia geniculata* действием растворов гистидина, триптофана и аргинина.

A study of the effect of glutathione, cystine and tryptophane on the embryonic development of triton taeniatus.

Prof. E. A. Finkelstein and E. M. Shapiro.

The Laboratory of the Developmental Mechanism (chief — prof. E. A. Finkelstein) of the Ukrainian Institute of Experimental Medicine (directeur — prof. J. I. Lifshitz).

In this study we based on Child's theory of the relation existing between a metabolism gradient and the formative processes. The researches by Holtfreter and other authors showed that the „organisator“ properties (Spemann) are common to certain tissues of the embryos and adult animals belonging to various systematic groups, either dead or alive. This would indicate, that the induction, or, as J. Needham, C. H. Waddington and D. M. Needham propose, quite soundly, to designate this phenomenon,—the evocation, is the result of action of certain chemical substances.

Basing on the surmise that the substances, participating in the oxidation processes, can act as evocators, we implanted in the ectoderm of the early gastrulae Triton Taeniatus pieces of agar-agar, containing reduced glutathione or cystine; these were taken in the amount 0,5% on 3% agar-agar solution in 0,2% physiologic solution. To the control animals we implanted pieces of 3% -agar-agar solution in 0,2% physiologic solution.

We failed to obtain the induction of the axis organs of the embryos. However, we obtained considerable size growth of the ectoderm, as the result of increased cell proliferation. The control (agar-agar solution without the amino-acids) did not give the same results. Instead we observed inflations caused in the result of agar-agar inflation. Table 1 shows the results of the experiences.

Substance introduced	Total operated	Of them perished	C o n s e r v e d			
			Total	Without changes	Size growth with proliferation	With inflations without proliferation
Reduced glutathione	106	41	65	49	16	—
Cystine	124	62	62	27	23	12
Control	37	18	19	5	—	14

In order to determine if we do not have here the influence of the amino-acids acting independently of the sulphur contained in them, we made analogical experiences with tryptophane. The results of these experiences are given in table 2.

Total operated	Of them perished	C o n s e r v e d			
		Total	Without changes	Size growth with proliferation	With inflations without proliferation
60	17	43	20	11	12

Thus, we come to the conclusion that the amino-acids, as such, are changing the metabolism processes to such an extent, as to stimulate the proliferation. This would coincide with the results of the researches by S. Hammett, M. S. Elliot, N. Chatallash, who stimulated the developmental growth of the hydroids *Obelia geniculata* by the action of histidine, tryptophane and arginine solutions.

~~1789~~
1748784

Народний Комісаріат Охорони Здоров'я УСРР
Український Інститут Експериментальної Медицини

Експериментальна Медицина

Щомісячний журнал

№ 9

Вересень
Septembre
1936

La médecine
expérimentale

Держмедвидав

68