

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

Д. Е. РЫВКИНА

**СОДЕРЖАНИЕ РЕДУЦИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В ТКАНЯХ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ**

(Представлено академиком И. И. Шмальгаузенем 20 II 1940)

При изучении протеолитической активности тканей во время регенерации конечности аксолотля обнаружено понижение протеолитической активности на стадии образования бластемы, значительное повышение по сравнению с нормой на стадии внутренней дифференцировки и торможение протеолиза на стадии роста вновь сформированной конечности.

Возникает вопрос о том, какие факторы обуславливают эти изменения? В опытах *in vitro* с протеолитическими ферментами доказано, что редуцирующие вещества, как сульфгидрильные соединения и аскорбиновая кислота, обладают активирующим действием. Эти вещества всегда содержатся в тканях, и согласно мнению многих авторов они являются естественными внутриклеточными регуляторами активности протеиназ и белкового метаболизма. Регулирующее действие редуцирующих веществ на активность протеиназ в тканях связано с их способностью обратимо окисляться и восстанавливаться. При падении оксидо-редукционного потенциала преобладают редуцированные формы и наступает автоматическое повышение активности катепсина. Таким образом уменьшение окисленных форм редуцирующих веществ связано с усилением протеолитического распада в тканях; напротив, увеличение их связано с ослаблением распада и образованием белка [Grassmann (6), Waldschmidt-Leitz (16), Mothes (8-9), Schultze (13), Гольдштейн (1)]. Был поставлен вопрос, какое значение имеют редуцирующие вещества в том изменении направления протеолиза, которое имеет место при регенерации?

В тканях регенерата и отдельных конечностей аксолотля на разных стадиях регенерации определялись общий и восстановленный глутатион по способу Quansel и Wachholder'a (11) и аскорбиновая кислота по способу Birch, Harris и Ray (4).

Для характеристики окислительно-восстановительных свойств тканей была проведена серия опытов с определением окисляемости глутатиона по Hopkins и Elliot (7) для того, чтобы иметь представление о степени белкового распада в тканях, в части опытов было произведено определение содержания аминок-N<sub>2</sub> по Folin'у. В основном же полученные данные должны быть сопоставлены с кривой протеолитической активности тканей, приведенной в предыдущей работе [Рывкина и Стриганова (2)].

Ряд авторов указывает на повышение содержания восстановленного глутатиона перед началом клеточного деления и в начальных стадиях роста [Murray (10), Voegtlin (14), Vivario (15), Binet (3), Coldwater (5) Rapkine (12)].

Содержание глутатиона. В тканях нормальных конечностей (среднее из 16 опытов): общего глутатиона 52 мг%; восстановленного глутатиона 42 мг%; окисленного 10 мг%; % окисленного к общему 19,2

	Регенерат				Отделенная конечность			
	Общий глют.	Восст. глют.	Окисл. глют.	% окисл. к общему	Общий глют.	Восст. глют.	Окисл. глют.	% окисл. к общему
Начало образования бластемы	55,2	55,2	0	0	54	40	14	25,9
Почка	37,4	37,4	0	0	55,8	40,7	15,7	28,1
Внутренняя дифференцировка	36,8	36,8	0	0	51,9	38,7	13,2	25,4
Внешняя дифференцировка	51	42,6	8,4	16,7	57,4	40,9	16,5	28,8
Рост сформированной конечности	50,3	41,5	8,8	17,5	52,9	39,2	13,7	25,9

Из приведенных цифр видно, что в начале образования бластемы также имеется отчетливое увеличение восстановленного глутатиона по сравнению с остальными цифрами для тканей регенерата и по сравнению со средней величиной для нормальных тканей и тканей отделенных конечностей. Наиболее интересным в приведенной таблице представляется устойчивое исчезновение окисленного глутатиона в тканях регенерата на ранних стадиях регенерации, начиная с образования бластемы до окончания внутренней дифференцировки. На этих стадиях было поставлено 14 опытов, и ни в одном опыте не было обнаружено окисленного глутатиона. На стадиях внешней дифференцировки и роста сформированной конечности всего проделано 11 исследований. Окисленный глутатион имелся во всех случаях, доходя в отдельных опытах до 21,8, 27,3 и 31% по отношению к общему. В тканях отделенных, неповрежденных конечностей, которые брались от тех же животных в то же время, всегда содержание окисленного глутатиона—до 28% по отношению к общему—несколько превышало норму.

Если сопоставить содержание окисленного глутатиона в тканях регенерата с полученными нами величинами содержания в них аминок-N<sub>2</sub>, получится следующее:

	Амино-N <sub>2</sub>	Окислен. глутатион
Стадия почки	66,8 мг%	0 мг%
Внутрен. дифференц.	57,0 мг%	0 мг%
Внешняя дифференц.	42,5 мг%	8,4 мг%
Рост конечности	42,0 мг%	8,8 мг%

Из приведенной таблицы видно, что при нарастании протеолитической активности ткани и увеличении продуктов распада белка окисленного глутатиона не содержится. На стадии внешней дифференцировки и роста сформированной конечности протеолитическая активность тканей понижается, появляется окисленный глутатион, распад белка уменьшается.

В соответствии с этими данными анализа тканей находятся результаты опытов с азрацией.

В ткани нормальных конечностей аксолотля через 2 часа азрации оказывается окисленным 40% глутатиона, т. е. вдвое больше, чем имелось первоначально. При этом происходит некоторое понижение общего и восстановленного глутатиона. Например:

Общий глутатион	. . . 50,6 мг%	Через 2 часа азрации	. . . 46,0 мг%
Восст.	» . . . 38,1 мг%	То же	. . . 27,4 мг%
Окисл.	» . . . 12,5 мг% (24,6%)	То же	. . . 18,4 мг% (40%)

В тканях регенерата на стадии почки и внутренней дифференцировки никакого окисления при аэрации не происходит. Например:

4 XI. Почки			
Общий глутатион . . .	40 мг%	Через 2 часа аэрации . . .	35 мг%
Восст. » . . .	40 мг%	То же . . .	35 мг%
Окисл. » . . .	0 мг%	То же . . .	0 мг%
40 XI. Почки			
Общий глутатион . . .	40 мг%	Через 2 часа аэрации . . .	40 мг%
Восст. » . . .	40 мг%	То же . . .	40 мг%
Окисл. » . . .	0 мг%	То же . . .	0 мг%
19 XI. Внутренняя дифференцировка			
Общий глутатион . . .	40 мг%	Через 2 часа аэрации . . .	36,8 мг%
Восст. » . . .	40 мг%	То же . . .	33,7 мг%
Окисл. » . . .	0 мг%	То же . . .	3,1 мг%
22 XI Внутренняя дифференцировка			
Общий глутатион . . .	36,8 мг%	Через 2 часа аэрации . . .	33,7 мг%
Восст. » . . .	36,8 мг%	То же . . .	33,7 мг%
Окисл. » . . .	0 мг%	То же . . .	0 мг%
8 XII. Внутренняя дифференцировка			
Общий глутатион . . .	43 мг%	Через 2 часа аэрации . . .	40,0 мг%
Восст. » . . .	43 мг%	То же . . .	40,0 мг%
Окисл. » . . .	0 мг%	То же . . .	0 мг%

На стадии внешней дифференцировки имеет место окисление глутатиона:

46 XII			
Общий глутатион . . .	39,8 мг%	Через 2 часа аэрации . . .	38,3 мг%
Восст. » . . .	38,3 мг%	То же . . .	25,5 мг%
Окисл. » . . .	1,5 мг%	То же . . .	12,6 мг% (33,4%)

На стадии роста сформированной конечности во всех опытах окисляется до 40% глутатиона. В тканях отделенных конечностей на всех стадиях имеется также нормальная окисляемость, т. е. до 40% всего глутатиона.

При аэрации происходит окисление молекулярным кислородом редуцированного глутатиона и перевод его в дисульфидную форму. Степень окисления GSH является результатом двух противоположных процессов окисления GSH и восстановления S-S. Если окисления не происходит, значит, оно уравновешивается восстановлением.

Следовательно, при аэрации в нормальных тканях конечностей аксолотля происходит значительное окисление глутатиона, на ранних стадиях регенерации повышаются процессы восстановления и уравновешивают окисление. На стадии внешней дифференцировки восстановленный глутатион начинает окисляться.

Таким образом исследования глутатиона показывают, что на ранних стадиях регенерации и до окончания внутренней дифференцировки, когда повышено переваривающее действие вытяжек из тканей регенерата, полностью исчезает окисленный глутатион, т. е. имеется сдвиг окислительно-восстановительного равновесия в сторону ослабления окисления. Из предыдущей работы (2) было видно, что на стадии начала образования blastемы ослаблено переваривающее действие вытяжки. Так как условия среды благоприятствуют протеолизу, следует допустить, что на этой стадии в молодых клетках фермента еще не содержится.

На поздних стадиях регенерации повышается окисление глутатиона, переваривающее действие вытяжек ослабевает; это, очевидно, связано с процессами синтеза белка во вновь сформированной конечности.

В отделенной конечности также повышается протеолитическая активность, но это повышение отличается от того, которое имеется в ткани регенерата. Оно происходит при нормальном содержании окисленного глутатиона и при нормальной его окисляемости на всех стадиях регенерации.

Содержание аскорбиновой кислоты. В тканях нормальных конечностей аксолотля содержится в среднем 6 мг% аскорбиновой кислоты (среднее из 10 опытов).

	Регенерат (в мг%)	Отделенная конечность (в мг%)
Стадия образования бластемы . . .	13,3	8,2
Почка . . . . .	12	7,8
	9,5	—
	11,1	—
	11,5	4
Внутренняя дифференцировка . . .	12,4	7,3
	7,47	6,6
	9,7	—
	11,7	6,7
Внешняя дифференцировка . . . . .	10,8	5,0
	7,8	4,5
	10	7,8
	9,5	2,4
Рост сформированной конечности .	8,4	4,2
	10,4	—
	9	—
	10	—
	12,3	4,5

Итак, на всех стадиях регенеративного процесса в тканях регенерата имеет место стабильное локальное увеличение содержания аскорбиновой кислоты, которое не возвращается к норме даже через 60 дней, когда конечность становится нормальной и отличается только меньшей величиной. В отделенной конечности содержание аскорбиновой кислоты не изменяется. Многие авторы рассматривают аскорбиновую кислоту, как внутриклеточный активатор протеолитической системы. Таким образом понятно ее повышение на ранних стадиях регенерации. Но она остается повышенной и тогда, когда протеолитическая активность тканей падает, глутатион начинает окисляться, происходит рост сформированной конечности.

Итак, имеется связь между стадиями регенерации и обратимостью протеолиза в тканях регенерата. Повышение протеолитической активности связано с исчезновением окисленных форм глутатиона и увеличением аскорбиновой кислоты. Понижение протеолитической активности на поздних стадиях регенерации связано с появлением окисленных форм глутатиона и указывает, вероятно, на синтез белка. Но аскорбиновая кислота повышена и на этих стадиях. Отсутствие переваривания в начале образования бластемы, когда увеличено содержание восстановленного глутатиона и аскорбиновой кислоты и нет окисленного глутатиона, объясняется, по видимому, отсутствием фермента в молодых клетках.

Лаборатория механики развития  
Института эволюционной морфологии  
им. ак. А. Н. Северцова  
Академия Наук СССР

Поступило  
22 II 1940

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Б. Гольдштейн, Биохимия тканевых протеиназ, Киев (1938). <sup>2</sup> Д. Рыбкина, А. Стриганова, Изв. Акад. Наук СССР, серия биол., № 5 (1939).  
<sup>3</sup> L. Binet et J. Magrou, C. R. Ac. Sc., v. 192, № 22—26 (1931). <sup>4</sup> T. Birch, Harris a. Ray, Biochem. Journ., 27 (1933). <sup>5</sup> K. Coldwater, Journ. exp. Zool., v. 65, № 1 (1933). <sup>6</sup> W. Grassmann, O. Schönebeck u. N. Eibeler, ZS. phys. Chem., 194 (1930). <sup>7</sup> F. Hopkins a. K. Elliot, Proc. Roy. Soc. (B), 109 (1931). <sup>8</sup> K. Mothes, Naturwissenschaft, H. 6 (1932). <sup>9</sup> K. Mothes, Ibid., 48 (1933). <sup>10</sup> H. Murray, Journ. of Gen. Physiol., 9 (1926). <sup>11</sup> W. Quansel u. K. Wachholder, ZS. phys. Chem., 231 (1935). <sup>12</sup> L. Rapkine, Ann. de physiol. et physioch. biol., v. 7, № 3 (1931). <sup>13</sup> T. Schultze, Planta, 16 (1931).  
<sup>14</sup> C. Voegtlin, J. Johnson a. L. Dyer, Journ. Pharm. a. Exp. Ther., 27 (1926). <sup>15</sup> R. Vivario et J. Leclout, Arch. internat. physiol., v. 32 (1930).  
<sup>16</sup> E. Waldschmidt-Leitz u. A. Purr, ZS. physiol. Chem., 214 (1933).