

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

А. СТРИГАНОВА

ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРОВ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ РЕГЕНЕРИРУЮЩЕГО ОРГАНА

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

Приведенные в предыдущем сообщении (3) данные показали, что наблюдаемые на различных стадиях регенерации изменения интенсивности протеолиза в регенерирующем органе, повидимому, не связаны со сдвигом оптимума действия для протеиназ тканей регенерата, а обуславливаются какими-то другими факторами.

Однако на основании этих данных нельзя еще заключить, что протеолитические свойства регенерата не изменяются по сравнению с нормальным органом. Как указывалось в предыдущем сообщении, для этого необходимо также сопоставить ткани регенерирующего и нормального органов в отношении способности содержащихся в них протеиназ активироваться под влиянием известных для них активаторов.

Для выяснения этого вопроса было проведено сравнительное изучение протеолитической активности ткани нормального и регенерирующего органов аксолотлей в присутствии активаторов (HCN и H₂S) и без активирования.

Исследование протеолитической активности тканей проводилось тем же путем и на том же объекте, как изложено в предыдущем сообщении (3).

HCN применялась в концентрации 0,25—0,5 см² 0,05 N раствора на 5 см³ перевариваемой смеси.

H₂S—по способу и в концентрации по Гольдштейну (4). Кроме того параллельно ставились опыты с H₂O₂ как окислителем, в концентрации 0,5—1,0 см³ 0,1 N раствора на 5 см³ смеси.

Наиболее отчетливые данные получены с HCN, опыты с H₂S в основном повторяли результаты опытов с HCN. Поэтому при изложении полученного материала мы ограничимся рассмотрением данных, полученных с HCN.

Опыты с H₂O₂ во всех случаях дали резкое торможение активности вытяжек как из нормальной ткани, так и регенерата.

Приводим ниже данные по определению интенсивности переваривания желатина и мышечного субстрата под воздействием вытяжек, полученных из тканей нормальных и регенерирующих аксолотлей, без активирования и в присутствии HCN, выраженные в см³ 0,05 N раствора KOH, пошедшего на титрование 1 см³ перевариваемой смеси. (pH=4,3; t°=37°; переваривание в течение 20 час.)

I. Активность вытяжки из тканей нормальных конечностей нормального аксолотля:

а) по отношению к желатине (среднее из 11 опытов)

без активирования	— 0,23
в присутствии HCN	— 0,35
» » H ₂ S	— 0,28
» » H ₂ O ₂	— 0,14

б) по отношению к мышечному субстрату (среднее из 6 опытов)

без активирования	— 0,09
в присутствии HCN	— 0,16
» » H ₂ S	— 0,15

II. Активность вытяжек из тканей регенерата и неповрежденной (нерегенерирующей) конечности «регенерирующих» аксолотлей по отношению к желатине и мышечному субстрату на различных стадиях регенерации:

Стадии регенерации	№ опытов, возраст регенерата, месяц *	Желатина				Мышца			
		Регенерат		Неповр. кон.		Регенерат		Неповр. кон.	
		б/акт.	с HCN	б/акт.	с HCN	б/акт.	с HCN	б/акт.	с HCN
1. Первоначальн. стадия образ. бластемы	№ 28, 8 дн. Окт.	0,39	0,39	0,27	0,32	—	—	—	—
	№ 35. 10 дн. Нояб.	0,21	0,23	1,24	0,32	—	—	0,07	0,12
2. Стадия регенерирующей почки	№ 43. 12 дн. Янв.	0,40	0,11	0,35	0,50	0,02	0,03	0,05	0,27
	№ 40. 12 дн. Дек.	0,39	0,14	0,18	0,22	0,08	0,08	0,06	0,12
	№ 44. 17 дн. Янв.	0,33	0,22	0,34	0,39	0,03	0,14	0,19	0,18
	№ 33. 18 дн. Окт.	0,21	0,11	0,40	0,54	—	—	0,12	0,22
3. Стадия зачатка органа	№ 21. 13 дн. Июль	0,43	0,46	0,52	0,58	—	—	—	—
	№ 30. 23 дн. Окт.	0,44	0,47	0,46	0,44	—	—	0,18	0,20
	№ 46. 20 дн. Янв.	0,32	0,35	0,44	0,50	0,15	0,13	0,24	0,24
	№ 41. 22 дн. Янв.	0,47	0,33	0,50	0,49	0,15	0,19	0,14	0,33
4. Стадия начала внешней дифференцировки (зачатки пальцев до прорез.)	№ 20 18 дн. Июль	0,36	0,18	0,48	0,48	—	0,08	0,17	0,20
	№ 22 20 дн. Авг.	0,24	0,36	0,38	0,51	—	—	0,12	0,15
	№ 42 32 дн. Дек.	0,37	0,16	0,46	0,44	0,14	0,11	0,20	0,19
5. Стадия скон. внешн. диффер. (после прорез. пальцев)	№ 36. 25 дн. Нояб.	0,10	0,05	0,36	0,18	0,01	0,06	0,16	0,11
	№ 34. 37 дн. Окт.	0,07	0,13	0,28	0,28	0,03	0,03	0,14	0,12
	№ 38. 37 дн. Нояб.	0,19	0,13	0,34	0,17	—	—	—	—
	№ 31. 50 дн. Нояб.	0,25	0,11	0,51	0,24	0,01	0,02	0,15	0,19
6. Полностью оформ. молод. орг.	№ 45.3 мес. регенерат.	0,17	0,21	0,16	0,22	0,11	0,13	0,09	0,15

* Разные возрасты регенератов на одной и той же стадии объясняются разной температурой в помещении, где содержались подопытные аксолотли.

Как показывает таблица, активность вытяжки из тканей нормальной конечности под влиянием активаторов (HCN и H_2S) значительно возрастает. Ни в одном случае из всех опытов с нормальными конечностями не было получено не только обратной картины, но даже отсутствия стимулирующего действия активаторов. Совсем другие результаты получены в опытах с вытяжкой из регенерата. Если в первые дни образования blastемы влияние активаторов неотчетливо выражено (опыты 28 и 35), то на стадии регенерационной почки уже ясно видно отсутствие стимулирующего действия HCN. Активность вытяжки на мышечный субстрат как без активирования, так и с HCN выражается весьма незначительной величиной, лежащей ниже уровня, установленного для нормы. По отношению к желатине обнаруживается даже обратное действие, т. е. торможение под влиянием HCN (см. опыты 43, 40, 44, 33). В это время и у тех же аксолотлей активность вытяжки из неповрежденных конечностей отчетливо возрастает под влиянием HCN. Следует отметить, что наблюдаемая различная переваривающая способность вытяжки из регенерационной почки по отношению к двум различным субстратам (повышение активности по сравнению с нормой на желатину и понижение—на мышечный субстрат) полностью повторяет наши предыдущие данные и, как мы указывали в прошлой работе, повидимому, находит свое объяснение в данных Бергмана о специфичности субстратов (3). Угнетающее действие HCN на активность вытяжки из регенерационной почки по отношению к желатине, возможно, указывает в данном случае на наличие значительного количества в регенерационной почке дипептидаз (ферментов, катализирующих дальнейший распад продуктов гидролиза белков), на которое HCN оказывает не активирующее, а угнетающее действие. Это предположение находит подтверждение и в данных Ореховича (7) о значительном повышении активности дипептидаз вытяжки из регенерирующего хвоста аксолотлей, именно, в первые дни после ампутации (на 2—4-й день).

На стадии образования зачатка органа, характеризуемой согласно нашим предыдущим и настоящим данным наиболее высокими показателями протеолитической активности, HCN не оказывает никакого влияния. Как без активирования, так и с HCN высокие уровни активности для регенерата почки совпадают.

В это время и активность вытяжки из тканей неповрежденной конечности, достигая максимального повышения без активирования, колеблется в пределах того же уровня и в присутствии HCN.

Следует упомянуть, что вытяжка из опухолевой ткани по данным Kleinmann и Werr (6) также не стимулируется под влиянием HCN и H_2S и это по мнению Waldschmidt-Leitz (10), Rondoni (8) и др. объясняется тем, что фермент, содержащийся в вытяжке, в большей части является активным и потому добавление активаторов не сопровождается соответствующим эффектом.

Отсюда можно заключить, что и вытяжка из регенерата в стадию зачатка органа, повидимому, является полностью активной (по крайней мере в условиях опыта *in vitro*), и поэтому HCN не дает дальнейшего стимулирования.

К моменту окончания внешней дифференцировки активность вытяжки из регенерата без активирования резко снижается,—не возрастает и под влиянием HCN. Одновременно с этим согласно данным Рывкиной (2) в тканях регенерата на этой стадии наступает повышение окислительных процессов, окисленный глутатион после полного исчезновения на предыдущих стадиях ясно возрастает в этот период. Следовательно, если исходить из положения Bersin (4), Hellermann (5) и др., что активация энзима заключается в редукции энзима и что активный энзим, являясь сульфид-

рильным соединением, при окислении обратимо превращается в инактивную форму, то можно предположить, что угнетение протеолиза в тканях регенерата на стадии интенсивного роста находится в связи с наступающим повышением окислительных процессов. По мнению же Voegtlin⁽⁹⁾ и др. торможение протеолиза под влиянием окислителей в сущности есть не что иное, как синтез белка. Отсюда можно заключить, что угнетение протеолиза в стадию интенсивного роста обуславливается интенсивно протекающими процессами синтеза белка.

В период, когда ампутированный орган полностью восстановлен, активность вытяжки из тканей как вновь регенерированной, так и неповрежденной конечности колеблется в установленных для нормы пределах и стимулируется под воздействием HCN (см. опыт 45).

Таким образом полученные данные показывают, что в то время как активность вытяжки из тканей нормальной конечности значительно возрастает под влиянием HCN и H₂S, в опытах с вытяжкой из регенерата стимулирующее действие активаторов не обнаруживается совсем.

Эта специфическая особенность тканей регенерата по отношению к активаторам особенно ясно обнаруживается на фоне полученных с неповрежденной конечностью данных, где наблюдается отчетливо стимулирующее действие активаторов.

Сравнительное изучение протеолитической активности регенерата и неповрежденной конечности также показывает, что в то время как в регенерате обратимо изменяется в соответствии со стадиями развития органа направление протеолиза, в неповрежденной конечности у тех же аксолотлей смещается лишь уровень интенсивности его.

Следовательно, установленные в прошлой работе закономерные изменения показателей протеолиза в регенерирующем органе соответственно стадиям развития органа и обнаруженное в данном исследовании специфическое отношение вытяжек из тканей регенерата к активаторам дают основание заключить, что существует определенная зависимость между протеолитическими и морфогенетическими процессами при регенерации органа.

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

Поступило
22 II 1940

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. И. Гольдштейн, Биохимия тканевых протеиназ, Киев (1938).
² Д. Рывкина, ДАН, XXVII, № 4, 381 (1940). ³ А. Стриганова, ДАН, XXVII, № 4, 385 (1940). ⁴ Th. Bersin, *Ergebn. Ensymforsch.*, 4 (1935). ⁵ J. Hellermann u. M. Perkins, *Journ. Biolog. Chem.*, 107 (1934). ⁶ H. Kleinmann u. F. Werr, *Bioch. ZS.*, 241 (1931). ⁷ B. Orschowitsch, *Biochem. ZS.*, 286 (1936). ⁸ P. Rondoni u. L. Pozzi, *Hop-Seyl. ZS. physiol. Chem.*, 249 (1933). ⁹ C. Voegtlin, *Physiol. Rev.*, 17 (1937). ¹⁰ E. Waldschmidt-Leitz u. Mc. Donald, *Hop-Seyl. ZS. physiol. Chem.*, 244, 245, 249 (1933).