

И. Ф. ЛЕОНТЬЕВ и М. П. ЗНАМЕНСКАЯ

### ВОССТАНОВЛЕННЫЕ ПРОТЕИНЫ КАК АНТИГЕНЫ

(Представлено академиком А. Д. Сперанским 4 III 1948)

Авторам данной статьи при изучении антигенных свойств протеинов растений (1) удалось установить, что этерификация глицинина (2) не изменяет его анафилактогенной активности (3). Этот факт рассматривался как доказательство того, что глицинин не претерпевал при метоксилировании больших пертурбаций в своей химической структуре.

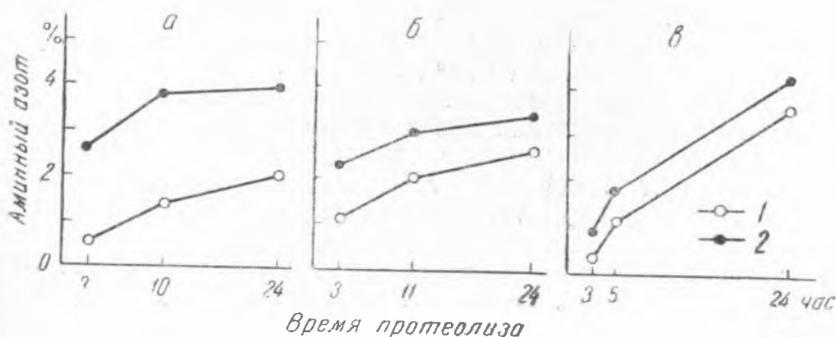


Рис. 1. а — эдестин, б — глицинин, в — легумин. 1 — естественный, 2 — восстановленный

Позднее было обнаружено (4), что восстановление глицинина (водородом *in situ nascendi*) приводит к совершенно явному извращению некоторых его физико-химических показателей. Например, естественный глицинин, т. е. только что изолированный из соевых бобов и не подвергавшийся затем какой-либо химической или физической обработке, обладал изоэлектрической точкой при водородном числе 5,2, а восстановленный глицинин — при 4,9. Вместе с тем, восстановленный глицинин быстрее распадался в присутствии протеокастических ферментов, имел большее число окисления и значительно сильнее связывался с хлорофиллом (5), чем естественные препараты этого глобулина.

Подобное явление наблюдалось и у эдестина — глобулина из семян конопли (4, 5).

Отсюда возникла идея испытать антигенные свойства не только восстановленного глицинина, но и других гомологичных протеинов.

Для решения этой задачи были приготовлены три препарата растительных глобулинов: 1) глицинин из бобов сои (*Glycine hispida* Max.); 2) легумин из семян гороха (*Pisum sativum* L.); 3) эдестин из семян конопли (*Cannabis sativa* L.).

Извлечение названных протеинов производилось в полном соответствии с техникой, предложенной для этих случаев (6). Полученные препараты глобулинов были рыхлыми порошками белого цвета.

Процесс восстановления испытуемых протеинов выполнялся в воде амальгамой натрия при постоянном значении водородного числа (4).

В табл. 1 и на рис. 1 представлены данные, относящиеся к химической характеристике глицинина, легумина и эдестина в их естественных и восстановленных формах.

Таблица 1

Протейн	Общий N в %	Амидный N в %	Триптосфан в %	Число окисления	Изэлектр. точка
Глицинин естествен. . . . .	17,15	—	1,59	7,7	5,2
» восстановл. . . . .	16,89	—	1,33	8,0	4,9
Эдестин естествен. . . . .	18,26	1,25	3,21	7,6	—
» восстановл. . . . .	18,06	1,64	1,84	7,8	—
Легумин естествен. . . . .	18,04	—	1,27	—	4,8
» восстановл. . . . .	17,79	—	1,00	—	4,6

Для определения антигенной активности восстановленных глобулинов был использован, как это было сделано и с метоксилированным глицинином, метод прямой анафилактики у морских свинок, позволяющий, как известно, очень хорошо дифференцировать различные протеиновые вещества ((7), (8), стр. 161).

Перед постановкой описанных ниже опытов были сделаны наблюдения над морскими свинками при нагрузке их кровотока раствором восстановленных глобулинов. Эти наблюдения показали, что инъекции растворов (в 0,01 N NaOH, pH = 7,3) восстановленных протеинов из расчета 0,5 г/кг в шейные вены животных, весящих 200—300 г, не дают каких-либо видимых патологических эффектов.

Об условиях испытаний восстановленных глобулинов как антигенов и о результатах этих испытаний можно получить представление по табл. 2 и 3.

Таблица 2

Число морских свинок . . . . .	92
Вес животных при реинъекции . . . . .	250—325 г
Пол морских свинок . . . . .	Самцы и самки
Доза сенсibilизирующей инъекции (под кожу)	5 мг глобулина (в 1 мл раствора, pH = 7,3—7,4)
Преанафилактический период . . . . .	14—16 дней
Температура свинок перед реинъекцией . . . . .	37,8—39,0°C
Доза реинъекции (шейные вены) . . . . .	40 мг протеина (в 2 мл раствора pH = 7,3—7,4)

Анализ общих результатов испытания (табл. 3) антигенных качеств восстановленных растительных глобулинов как при непосредственных (A + A, B + B и т. д.), так и перекрестных (A + B, B + A и т. д.) операциях позволяет утверждать, что восстановленные протеины в значительной мере теряют свою иммунобиологическую активность.

Это допущение наиболее четко подтверждается теми экспериментами, когда морские свинки получали восстановленные глобулины в качестве сенсibilизаторов. При этих опытах у тест-объектов наблюдались всегда лишь симптомы анафилактики, причем они были слабо выражены и быстро исчезали.

	II	A	B	C	D	E	F
A		+++	+	-	-	-	-
B		+	+	-	+	-	-
C		-	-	+++	+++	-	-
D		-	-	+	+	+	+
E		-	-	-	-	+++	+
F		-	-	-	-	+	+++

Примечание. А—глицин естественный, В—восстановленный; С—легумин естественный, D—восстановленный; Е—эдестин естественный, F—восстановленный. I—сенсibilизирующая инъекция. II—разрешающая (реинъекция). +++ резкие симптомы анафилаксии и гибель (шок) животных в течение 1—2 мин.; ++ нарастающие симптомы анафилаксии и гибель морских свинок в течение 5—20 мин.; + слабые симптомы анафилаксии при отсутствии шока; — отсутствие как симптомов анафилаксии, так и анафилактического шока.

Опыты по испытанию на одном животном нескольких препаратов, вводимых в вены друг за другом через короткие перерывы по такой схеме, как, например, A + C + D + A или E + A + D + F, дали результаты, однозначные результатам, приведенным в табл. 3, т. е.

$$\begin{array}{c}
 \underbrace{(-)} \\
 \underbrace{A + C + D + A} \\
 \underbrace{(-)} \\
 \underbrace{(+ + +)}
 \end{array}
 \quad \text{или} \quad
 \begin{array}{c}
 \underbrace{(-)} \\
 \underbrace{E + A + D + F} \\
 \underbrace{(-)} \\
 \underbrace{(+ +)}
 \end{array}$$

В связи с вышеизложенным следует упомянуть, что сравнительно давно были описаны<sup>(8)</sup> опыты по восстановлению кристаллического альбумина лошадиной сыворотки и по измерению его преципитирующей активности. Этими опытами было открыто, что восстановление альбумина тиогликолевой кислотой приводит к ослаблению его антигенных свойств, так как восстановленная форма этого протеина давала определенно меньший выход общего азота в преципитатах, особенно полученных при перекрестных реакциях.

Эксперименты с восстановленным сывороточным альбумином согласуются с результатами опытов по восстановлению аморфных и кристаллических препаратов инсулина<sup>(9—11)</sup>, когда этот протеин после редукции различными реактивами полностью инактивировался, не обнаруживая своего фармакодинамического действия при многократных анализах.

Интересно, что другой гормон протеиновой природы — пролактин из передней доли гипофиза — ведет себя подобно инсулину. Обработка пролактина редуцирующими соединениями также приводит к потере им всей его гормональной активности<sup>(12)</sup>.

Следовательно, на основании выполненных экспериментов и литературных справок законно предположить, что при соответствующих условиях путем восстановления возможно превращать протеины в иммунобиологически неактивные препараты. А эта возможность может стать в дальнейшем интересным объектом различных исследований<sup>(13)</sup>.

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> И. Леонтьев и М. Знаменская, Тр. Лабор. по изуч. белка, ВАСХНИЛ, в. 4, 136 (1936). <sup>2</sup> М. Знаменская, там же, в. 5, 3 (1933). <sup>3</sup> И. Леонтьев и М. Знаменская, Журн. микробиологии и иммунологии, 13, 376 (1934). <sup>4</sup> М. Знаменская, Биохимия, 6, 365 (1941). <sup>5</sup> М. Знаменская и О. Осипова, ДАН, 57, 705 (1947). <sup>6</sup> Т. Осборн, Растительные белки, М., 1935. <sup>7</sup> Г. Уэллс, Химия иммунитета, М., 1929, стр. 260. <sup>8</sup> D. Blumenthal, J. Biol. Chem., 113, 433 (1936). <sup>9</sup> K. Freudenberg, Z. physiol. Chem., 187, 89 (1930); 202, 128 (1931). <sup>10</sup> V. Vigneaud et al., J. Biol. Chem., 94, 233 (1931/32). <sup>11</sup> O. Wintersteiner, *ibid.* 102, 473 (1933). <sup>12</sup> H. Fraenkel-Conrat, *ibid.* 142, 107, 119 (1942). <sup>13</sup> И. Леонтьев, Тезисы сообщений 15-го Международн. конгресса физиологов, М., 1935, стр. 248.