

Т. С. ПАСХИНА

О СОДЕРЖАНИИ АДЕНИЛОВОЙ И АДЕНОЗИНТРИФОСФОРНОЙ КИСЛОТ В ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЭКСУДАТАХ

(Представлено академиком А. И. Опариным 15 IX 1952)

В ходе наших исследований по выяснению химической природы активных веществ экссудатов, ответственных за повышение проницаемости и эмиграцию лейкоцитов при воспалении (1), т. е. обладающих «лейкотаксиновым» действием (по Менкину (2)), мы встретились с необходимостью произвести определение порядка концентрации адениловых нуклеотидов и продуктов их расщепления в экссудатах. Мы определили также минимальные концентрации этих веществ, при которых они способны при внутрикожной инъекции повышать проницаемость капилляров и вызывать эмиграцию лейкоцитов.

Результаты наших опытов не согласуются с представлениями Д. Е. Альперна и Р. У. Липшиц (3, 7) о существенном значении адениловой и аденозинтрифосфатной кислот в явлениях повышенной проницаемости капилляров, химиотаксиса лейкоцитов и фагоцитоза при воспалении и позволяют со всей определенностью исключить роль производных аденина в качестве веществ, ответственных за повышение проницаемости и эмиграцию лейкоцитов.

Экспериментальная часть

Действие аденина, аденозина, аденозин-5-фосфорной (адениловой) и аденозинтрифосфорной кислот на проницаемость капилляров и эмиграцию лейкоцитов определялось по видоизмененному методу Менкина (4) путем введения растворов этих веществ в различных концентрациях внутрикожно кроликам непосредственно после внутривенной инъекции 1% раствора трипановой сини. За единицу активности (по проницаемости) мы принимали то количество веществ (в микрограммах) в 0,2 см³ физиологического раствора, которое в первые 10—15 мин. после инъекции вызывает отчетливое голубое окрашивание кожи в зоне диаметром 7—10 мм (1). Эмиграция лейкоцитов исследовалась на гистологических срезах из фиксированной формалином кожи кроликов, убитых через 30—40 мин. после внутрикожной инъекции испытуемых веществ*.

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, аденин и аденозин практически не действуют на проницаемость капилляров, адениловая кислота дает повышение проницаемости в концентрациях порядка 3%, а АТФ — при концентрации не ниже 1—1,5%. Если бы активность воспалительных экссудатов в отношении проницаемости и лейкотаксиса была обусловлена

* Гистологические исследования были произведены Р. А. Хургиной и А. П. Майсюк (Институт хирургии АМН СССР), которым мы приносим искреннюю благодарность.

присутствием адениловой кислоты или АТФ, то, как видно из приведенных выше данных, содержание этих веществ в эксудатах должно было бы быть весьма значительным.

Для обнаружения производных аденина и их полуколичественного определения мы воспользовались распределительной хроматографией на бумаге по методу Кона и Картера (5). При этом методе применяются одновременно две подвижные фазы, водная и неводная, что позволяет устранить смещающее действие солей на положение пуринов, нуклеозидов и нуклеотидов на хроматограммах. Мы пользовались для распределения на бумаге методом восходящей хроматографии, применяя для этой цели обыкновенный 2-литровый цилиндр, на дно которого наливали равные объемы водного и неводного растворителей. Расположение пуринов, нуклеозидов и нуклеотидов на бумаге устанавливалось по поглощению ультрафиолетовых лучей при помощи ультрахемоскопа Е. М. Брумберга и флуоресцирующего экрана, а также путем получения контактных отпечатков хроматограмм на бромосеребряной фотобумаге при освещении ультрафиолетовыми лучами*. Интенсивность поглощения ультрафиолета настолько высока, что позволяет легко обнаружить на бумажной хроматограмме пятна с содержанием 1—2 $\mu\text{г}$ аденина ($R_F = 0,38$), 3—5 $\mu\text{г}$ аденозина ($R_F = 0,49$), 5—7 $\mu\text{г}$ адениловой кислоты ($R_F = 0,72$) и 7—10 $\mu\text{г}$ АТФ ($R_F = 0,85$).

Для хроматографического исследования мы брали бесклеточный центрифугат эксудатов из плевральной полости собаки, вызванных инъекцией скипидара, или эксудатов от больных с асептическим серозным плевритом (послеоперационным). Центрифугаты содержали обычно одну единицу активности (по проницаемости) в 0,001—0,002 мл.

Так как присутствие белка мешает хроматографическому исследованию адениловых производных данным методом, из эксудатов двумя путями приготавливались безбелковые фильтраты. При первом способе эксудат (5 мл) разбавляли тройным объемом воды, подкисляли уксусной кислотой до рН 5,2 и кипячением в течение 2—3 мин. свертывали белки. После охлаждения центрифугировали, осадок белка дважды промывали подкисленной водой, фугат и промывные воды сгущали в вакууме при 30° до $\frac{1}{5}$ исходного объема эксудата (до 1 мл). По второму способу разведенный эксудат (1 : 3) осаждали трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация 2,5%), осадок белка отделяли и два раза промывали 2,5% Cl_3COOH . Объединенные центрифугаты повторно извлекали эфиром для удаления трихлоруксусной кислоты и сгущали в вакууме до $\frac{1}{5}$ исходного объема эксудата. На бумагу в обоих случаях наносили по 10—20 $\mu\text{л}$ вытяжки, что соответствовало 0,05—0,1 мл эксудата, или 25—50 единицам активности по проницаемости. Для того чтобы учесть возможное разрушение или адсорбцию адениловых производных при осаждении белков, точно так же обрабатывали порции эксудата с добавленной Na-АТФ (3,5 мг) и на бумагу наносили по 5—15 $\mu\text{л}$ безбелковой вытяжки, содержащей 15—45 $\mu\text{г}$ добавленной АТФ.

Рядом с испытуемыми вытяжками на бумагу наносились эталонные растворы аденина, ксантина, аденозина, адениловой кислоты и Na-АТФ. Исползованный нами продажный препарат АТФ, переосажденный в лаборатории, содержал примесь адениловой кислоты и аденозиндифосфорной кислоты ($R_F = 0,80$) и давал вследствие этого на хроматограммах три пятна с соответствующими константами движения.

На хроматограммах 6 исследованных нами различных эксудатов мы обнаружили только одно слабое пятно, поглощающее ультрафиолетовые лучи с $R_F = 0,38$, что соответствует положению аденина. По интенсивности поглощения количество аденина в 0,1 мл эксудата составляет около 2—5 $\mu\text{г}$. Аденозина, адениловой кислоты, АДФ или АТФ мы не обнару-

* За указания по фотографированию хроматограмм в ультрафиолетовых лучах приношу благодарность А. В. Котельниковой.

жили ни на одной хроматограмме*. В тех же условиях всегда удавалось обнаружить 75—90% добавленной к эксудату АТФ (иногда при этом пятно АТФ было ослаблено с одновременным усилением пятна АДФ за счет частичного разложения при обработке). В пробах, обработанных трихлоруксусной кислотой, добавленная АТФ давала три пятна с тем же расположением, что и в эталонном растворе (пробы 2 и 3 на рис. 1). В хроматограммах фильтратов, из которых белки удалялись подкислением и кипячением, добавленная АТФ давала одно смещенное кверху и сильно вытянутое пятно ($R_F=0,63$), вследствие чего мы предпочитали пользоваться трихлоруксусными фильтратами.

В табл. 1 приведены, наряду с активностью адениловых производных по проницаемости и эмиграции лейкоцитов, концентрации их в эксудатах по данным хроматографического исследования.

Таблица показывает, что все количество сухого остатка дозы эксудата, соответствующее одной единице активности, в несколько раз меньше того количества адениловой кислоты или АТФ, которое необходимо, чтобы вызвать повышение проницаемости. Содержание адениловых производных в этой дозе эксудата (0,005—0,01 мл) практически равно нулю или (при учете порога чувствительности хроматографического метода) меньше $1/2000$ (для АТФ), $1/6000$ (для адениловой кислоты) от дозы этих веществ, содержащей одну единицу активности.

Помимо хроматографического метода, мы попытались определить наличие АТФ (или АДФ) в воспалительных эксудатах различного происхождения по величинам легко гидролизующего фосфора (P_7^1) в бариевом осадке их трихлоруксусных фильтратов. Чтобы исключить действие аденозинтрифосфатазы, эксудат в количестве 50—200 мл подвергался обработке холодной 5% трихлоруксусной кислотой тотчас же после пункции. Дальнейшее выделение АТФ в виде Ва-соли и определения неорганического фосфора в полученной соли (методом Фиске — Суббароу) до и после 7-минутного гидролиза в 1 N HCl проводились обычными способами (6). Полученные результаты приведены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, содержание АТФ и АДФ в исследованных эксудатах, определенное указанным способом, равно нулю или настолько низко, что лежит в пределах погрешности метода. Эти результаты полностью согласуются с данными хроматографического анализа и резко расходятся с данными Р. У. Липшиц (7), определявшей содержание АТФ в трихлоруксусном фильтрате эксудатов от морских свинок без выделения фракции нерастворимых Ва-солей.

* АДФ и АТФ не обнаруживались на хроматограммах и при исследовании сконцентрированной до $1/25$ исходного объема фракции Ва-нерастворимых фосфорных соединений, осажденных из безбелкового фильтрата эксудатов.

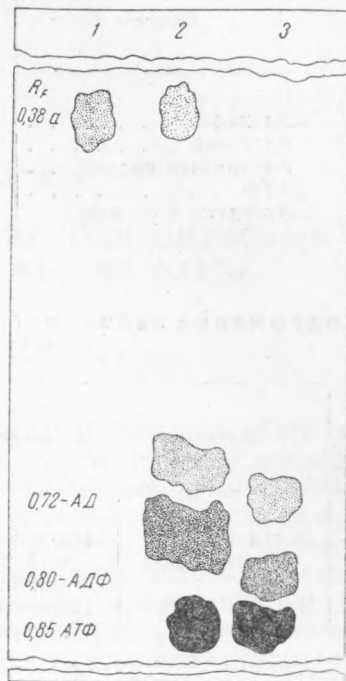


Рис. 1. Схематический рисунок нижней части хроматограммы № 11. Густота окраски пятен на рисунке соответствует интенсивности поглощения ультрафиолетовых лучей на хроматограмме. Пробы, нанесенные на хроматограмму: 1 — эксудат № 53 0,06 мл (трихлоруксусный фильтрат); 2 — эксудат № 53 0,02 мл + 70 мкг АТФ (трихлоруксусный фильтрат); 3 — продажный препарат АТФ 40 мкг. Обозначения на рисунке: *a* — аденин, АД — адениловая кислота, АДФ — аденозиндифосфорная кислота, АТФ — аденозинтрифосфорная кислота

Таблица 1

Активность адениловых производных по проницаемости и эмиграции лейкоцитов и найденное содержание их в экссудатах

Вещество	R_F	Содерж. в 0,1 мл экссудата в $\mu\text{г}$	Един. активности в μ	
			по проницаемости	по эмиграции лейкоцитов
Аденин	0,38	2—5	≥ 1000	Не активен.
Аденозин	0,49	следы ($< 1 \mu\text{г}$)	> 1000	" "
Адениловая кислота . .	0,72	0	500—600	" "
АТФ	0,85	0	200—250	" "
Экссудаты (сух. вещ.) . .	—	7000	70—140	≥ 350

Таблица 2

Содержание лабильного фосфора (P_1) в Ва-осадке безбелковых фильтратов экссудатов

№№ опы- тов	Экссудат	Происход. экссудата	Активн. един. (по проницае- мости) в $\mu\text{г}$	Неорган. P в мг%		P_1 в мг%
				до гидролиза	после гидролиза	
1	Экссудат № 62 (от человека)	Интраперитонеаль- ный (цирроз пе- чени)	80—160	1,87	1,83	0
2	Экссудат № 66 (от собаки)	Плевральный (ски- пидарный) . . .	150—300	2,28	2,33	0,05

З а к л ю ч е н и е. Способность воспалительных экссудатов человека или собаки повышать проницаемость капилляров кожи кроликов и вызывать в ней эмиграцию лейкоцитов не может быть отнесена за счет действия адениловых производных, так как содержание адениловой кислоты, АТФ и аденозина в экссудатах практически равно нулю, а аденин присутствует в концентрации, которая ниже его активной дозы в 3000—5000 раз.

Поступило
15 IX 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Т. С. Пасхина, ДАН, 86, 609 (1952). ² В. Менкин, Динамика воспаления, 1948. ³ Д. Е. Альперн, Р. У. Липшиц, ДАН, 80, 489 (1951). ⁴ E. S. Duthie, E. Chain, Brit. J. Exp. Path., 20, 417 (1939). ⁵ W. E. Sohn, S. E. Carter, J. Am. Chem. Soc., 72, 4273 (1950). ⁶ Н. П. Мешкова, С. Е. Северин, Практикум по биохимии животных, 1950. ⁷ Р. У. Липшиц, Диссертация, Харьков, 1949.