

Т. С. ПАСХИНА

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЕЩЕСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОБРАЗОВАНИЕ ЭКСУДАТА И ЭМИГРАЦИЮ ЛЕЙКОЦИТОВ В ОЧАГАХ ВОСПАЛЕНИЯ

### НЕБЕЛКОВЫЕ ФРАКЦИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЭКСУДАТОВ

(Представлено академиком Н. Н. Анцичковым 19 V 1952)

Настоящее сообщение является первым в серии комплексных исследований, проводимых под руководством А. Е. Браунштейна и А. А. Вишневого в Институте биологической и медицинской химии и Институте хирургии АМН СССР по вопросу о взаимодействии между нервно-трофическими механизмами и химическими (гуморальными) факторами при патогенезе воспалительных процессов.

На основе своих классических работ по сравнительной патологии воспаления И. И. Мечников (1) пришел к представлению, что эмиграция лейкоцитов к очагу воспаления и фагоцитоз связаны с химиотактическим действием веществ, появляющихся в поврежденной и воспаленной ткани.

Начиная с 1936 г., В. Менкин (2, 3) в ряде работ пытается обосновать теорию воспаления, которая, хотя и исходит из основных представлений Мечникова, но развивает их с вирховианских позиций, давая механистическую трактовку патогенезу воспаления как чисто местному процессу. Менкин объясняет все фазы воспалительного процесса присутствием в очаге воспаления (в эксудате) специфически активных веществ полипептидной и белковой природы, которые он называет биохимическими агентами воспаления. К таким веществам Менкин относит так называемый «лейкотаксин», выделенный им из воспалительных эксудатов. По его данным, введение лейкотаксина в кожу животных вызывает характерное для воспалительной реакции повышение проницаемости капилляров и эмиграцию лейкоцитов. На основании мало убедительных экспериментальных данных Менкин считает лейкотаксин полипептидом. Полученные нами результаты, изложенные в настоящей работе, не подтверждают данных Менкина и других авторов (5-6) о роли полипептидов эксудата как факторов, вызывающих повышение проницаемости капилляров и лейкотаксис при воспалении.

### Экспериментальная часть

Исследуемым материалом служили серо-фибринозные слабощелочные (реже кислые, гнойные) эксудаты из плевральной полости собаки, вызванные инъекцией скипидара, а также асептические послеоперационные плевральные эксудаты от больных (серо-фибринозные, рН 6,5—7,3) \*.

Действие эксудатов и полученных из них препаратов на проницаемость капилляров и эмиграцию лейкоцитов мы испытывали по видоизмененному методу Менкина (5). Исследуемые вещества в физиологическом растворе вводились внутривожно кролику, непосредственно после

\* Эксудаты были нам предоставлены В. Г. Прокопенко, Е. А. Хрущевой и Э. Г. Ворониной (Институт хирургии АМН СССР), которым мы приносим глубокую благодарность.

внутривенного вливания 1% раствора трипановой сини. За единицу активности (по проницаемости) мы принимали такое количество вещества (в микрограммах), которое при инъекции в 0,2 мл физиологического раствора вызывает в течение 10—15 мин. отчетливое голубое окрашивание кожи в зоне диаметром 7—10 мм. Удельной активностью препарата мы считали число единиц в 1 мг сухого вещества. Эмиграция лейкоцитов исследовалась на гистологических срезах фиксированной формалином кожи кроликов, убитых через 30—40 мин. после постановки внутрикожных проб\*.

«Лейкотаксин» мы выделяли из экссудатов по методу Менкина. К бесклеточному центрифугату экссудатов мы добавляли один объем пиридина, тщательно перемешивали, оставляли на 1—2 часа, после чего двумя объемами ацетона осаждали белки, по данным Менкина, — неактивные. Из фильтрата, после сгущения его в вакууме досуха, получали фракцию неочищенного «лейкотаксина» (АП, т. е. растворимого в ацетон-пиридине), в виде бурой смолистой массы, пронизанной кристаллами солей, плохо растворимой в воде и физиологическом растворе. Эта фракция, по данным Менкина, преимущественно состоит из высокоактивного полипептида или «лейкотаксина».

Мы нашли, что фракция АП не имеет ясно выраженных пептидных свойств и представляет собой грубую смесь минеральных солей и органических экстрактивных веществ экссудата (липоиды, аминокислоты, пептиды). Неорганические соли, составляющие до 50% от сухого веса препарата АП, дают при высушивании кристаллы, которые принимались Менкиным за кристаллы собственно «лейкотаксина». Фракции АП содержат от 8 до 10% неактивных липоидов, удаляемых при экстракции препаратов смесью эфира и ацетона. Общее содержание азота (микроркельдаль) колеблется от 1,5 до 2,0% для фракции АП из экссудатов человека и от 2,5 до 3,5% — для препаратов из экссудатов собак. Азот полипептидов определяли газометрическим методом Ван-Сляйка в трихлоруксусном фильтрате фракции АП, предварительно освобожденной от липоидов (по разности между величинами  $\text{NH}_2\text{-N}$  до и после 24-часового гидролиза фракции АП в кипящей 6*N*  $\text{HCl}$ ). Было найдено, для препаратов АП из экссудатов человека, что  $\text{NH}_2\text{-N}$  равняется 0,17% до гидролиза и 0,41% — после гидролиза. Для препаратов АП из экссудатов собак, соответственно, 0,65% и 1,02%. Содержание пептидов во фракции АП, рассчитанное из этих данных, равнялось лишь 1,50% ( $0,24 \times 6,25$ ) для экссудатов человека и 2,31% ( $0,37 \times 6,25$ ) — для экссудатов собак.

При испытании биологической активности препаратов АП различного происхождения было найдено, что они вызывают лишь слабое повышение проницаемости капилляров и не вызывают эмиграции лейкоцитов. Удельная активность фракции АП (см. табл. 1) по проницаемости оказалась в  $2\frac{1}{2}$  раза ниже удельной активности цельного экссудата. Наблюдаемое действие препаратов АП на проницаемость капилляров быстро терялось при хранении их в вакуум-эксикаторе над серной кислотой.

Мы пытались, далее, очистить фракцию АП от балластных веществ посредством адсорбции ее из водного раствора активированным древесным углем, что по литературным данным<sup>(6)</sup> значительно повышает активность неочищенного «лейкотаксина». Адсорбированные вещества снимали с угля последовательными порциями 20% водного раствора пиридина и полученные фракции обозначали как  $A'_1$ ,  $A'_2$  и  $A'_3$ . При работе с различными сортами угля полной адсорбции активных веществ за одну операцию получить не удавалось, поэтому процесс адсорбции повторяли, и полученные фракции обозначали как  $A''_1$ ,  $A''_2$  и т. д. Фракции А содержали больше азота (4,0—5,0%) и лучше растворялись, чем исходные фракции АП. Однако концентрирования собственно «лейкотаксинового» начала не было

\* Гистологические исследования были проведены Р. А. Хургиной и А. П. Майсюк.

## Сравнение „лейкотаксиновой“ активности эксудата и его „небелковых“ фракций

Название фракции	Сухого вещества в мг на 100 мл эксудата	Действие на проницаемость			Действие на эмиграцию лейкоцитов	
		в разведен.	удельная активность	число единиц на 100 мл эксудата	в разведен.	число единиц на 100 мл эксудата
Эксудат от собаки (терпентиновый)	6000	1:1666	8,3	50000	1:330	10000
Неочищен. „лейкотаксин“ <sup>66</sup> (Фр. „АП“)	1050	1:660	3,3	3500	не вызывает в разведении 1:200	—
Очищенный „лейкотаксин“ Фр. А' <sub>1</sub>	140	1:500	2,5	360	не вызыв. в разведении 1:200	—
Фр. А' <sub>2+3</sub>	28	1:605	2,8	80	—	—
Фр. А' <sub>3+4</sub>	6	1:1000	5,0	30	—	—
Фр. А'' <sub>1+2</sub>	60	1:1500	6,6	450	—	—

обнаружено ни в одной из них, так как их удельная активность (по проницаемости) была равна или ниже удельной активности цельного эксудата (см. табл. 1). Фракции А'<sub>1</sub> и А'<sub>2+3</sub> в концентрациях от 400 до 100  $\mu$ г на 0,2 мл не вызывали эмиграции лейкоцитов из сосудов.

Для получения более активных фракций мы пытались использовать метод противоточной экстракции несмешивающимися с водой органическими растворителями (8). В качестве растворителей были выбраны *n*-бутанол и фенол, насыщенные водой при комнатной температуре. При фракционировании препаратов АП или А' между водой и водонасыщенным *n*-бутанолом активное начало, вопреки указаниям Менкина о растворимости лейкотаксина в бутаноле, всегда оставалось вместе с солями в первых (водных) фракциях, в то время как в последующие (гидрофобные) фракции, извлеченные бутанолом, переходили только неактивные пептиды и аминокислоты (валин, лейцины). Удельная активность веществ, остающихся в первых водных фракциях, не превышала удельной активности взятого для фракционирования препарата АП. При противоточном распределении препарата АП между водой и водонасыщенным фенолом активное начало переходило во фракции фенола. Полученные из этих фракций препараты были почти полностью освобождены от солей, но имели пониженную активность, вероятно, за счет инактивации. Водные, неактивные фракции содержали все соли исходного препарата.

Для выяснения вопроса о присутствии активных пептидов в препаратах АП и степени их активности нами был использован метод распределительной хроматографии на бумаге. Для препаративного разделения на одномерной бумажной хроматограмме с *n*-бутанолом, насыщенным 25% уксусной кислотой, было взято 70 мг фракции А<sub>1</sub> (уд. акт. 10) из эксудата № 9 (от больного). На хроматограмме было обнаружено 9 веществ, дающих реакцию с нингидрином. Действие на проницаемость капилляров было обнаружено у четырех веществ ( $R_F = 0,01; 0,06; 0,11$  и  $0,48$ ). Эти вещества давали на бумаге, кроме нингидриновой реакции, реакции Паули на гистидин ( $R_F = 0,06$  и  $R_F = 0,48$ ), Сакагучи — на аргинин ( $R_F = 0,01$  и  $0,06$ ) и реакцию с *n*-диметиламинобензальдегидом на триптофан ( $R_F = 0,11$  и  $R_F = 0,48$ ), т. е. являлись, очевидно, пепти-

дами. Свободные аминокислоты, дающие эти реакции, имеют иное значение  $R_F$ . Гидролиза выделенных фракций мы не проводили.

Удельная активность веществ с  $R_F = 0,01$  и  $0,06$  оказалась в два раза ниже удельной активности исходной фракции, а удельная активность веществ с  $R_F = 0,11$  и  $0,48$  — в 5—6 раз ниже исходной. Суммарная активность всех четырех пептидных фракций составляла только 10% активности взятого для фракционирования препарата.

Если исходить из данных Менкина и других исследователей (5, 6), утверждающих, что свойства эксудатов повышают проницаемость капилляров и вызывать эмиграцию лейкоцитов всецело определяются присутствующими в них активными пептидами («лейкотаксинами»), последние должны были бы иметь чрезвычайно высокую активность (больше 1000 ед. в 1 мг), так как общее содержание пептидов в эксудатах по нашим определениям не превышает 15—25 мг%. Порядок активности пептидов, выделенных нами из бумаги, оказался в 200—300 раз ниже рассчитанного, вследствие чего присутствием пептидов можно было бы объяснить не более 0,5—1,0% активности эксудата (по повышению проницаемости).

Для выделения небелковой фракции эксудата мы решили найти другую методику, поскольку фракция АП, полученная по методу Менкина, содержала не больше 7—8% от общей активности эксудата, несмотря на применение различных приемов для ее фракционирования и очистки. При этом мы обнаружили, что в совершенно свободных от белка фильтрах и в ультрафильтрах эксудатов человека или собаки сохраняется не более 1—2% активности эксудата по проницаемости и полностью отсутствует активность по эмиграции лейкоцитов. Белковая фракция, напротив, сохраняет эти свойства эксудата полностью, если при ее выделении не произошло денатурации белка. Значительной денатурацией при выделении и сушке объясняется потеря биологической активности белковым осадком, полученным при добавлении к эксудату пиридина и ацетона, т. е. при выделении «лейкотаксина» по Менкину. Это обстоятельство, незамеченное Менкиным, привело его к ошибочному представлению о неактивности белковых фракций эксудата. В то же время «небелковая» фракция эксудата («лейкотаксин»), полученная по Менкину, могла содержать активные белки вследствие сольватирующего (и стабилизирующего) влияния пиридина на белки (7).

Мы проверили это предположение и действительно обнаружили во всех препаратах АП и А' белки, осаждающиеся трихлоруксусной (3%) или сульфосалициловой (4%) кислотами. Азот белкового осадка составлял не менее 12% от общего азота фракции АП. Освобожденные от белка препараты АП сохраняют лишь очень незначительную долю своей биологической активности.

Наши дальнейшие исследования показали, что свойство эксудатов вызывать повышение проницаемости капилляров и эмиграцию лейкоцитов при внутрикожной инъекции кролику связано с одной из глобулиновых фракций эксудата (вероятно  $\beta$ -глобулиновой).

Институт биологической и медицинской химии и  
Институт хирургии им. А. В. Вишневского  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
19 V 1952

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> И. И. Мечников. Лекции по сравнительной патологии воспаления, 1892, М., 1937. <sup>2</sup> В. Менкин, Динамика воспаления. Анализ механизма инфекц. процессов, М., 1948. <sup>3</sup> V. Menkin, J. exp. Med., 64, 485 (1936); 67, 129 (1938). <sup>4</sup> V. Menkin, Science, 105, 538 (1947). <sup>5</sup> E. S. Duthie, E. Chain, Brit. J. exp. Path., 20, 417 (1939). <sup>6</sup> H. Collumbine, H. N. Rydon, ibid., 27, 33 (1946). <sup>7</sup> В. А. Виленский, Сольватация белков в двухкомпонентных растворителях. Докт. дисс., М., 1947. <sup>8</sup> Аминокислоты и белки, Сборн. под ред. А. Г. Пасынского, М., 1951, стр. 32.