

В. З. ГОРКИН

**О ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ГЕМОЛИЗИНА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ
ЭКСУДАТОВ (ГЕМОЛИЗИНА ТАРАСЕВИЧА)**

(Представлено академиком А. И. Опариным 7 IV 1953)

В своих классических исследованиях по фагоцитозу И. И. Мечников (1, 2) указывал, что протеиназа макрофагов (так называемый «макроцитаз») является «растворимым ферментом, относящимся к категории трипсинов» (1). И. И. Мечников и его сотрудники предполагали, что одним из частных проявлений ферментативной активности макроцитазы является гемолитическое действие, использованное ими для обнаружения макроцитазы в различных биологических материалах. Так, ученик Мечникова Л. А. Тарасевич (3) обнаружил гемолитическую активность в гнойных экссудатах, богатых макрофагами.

По нашим данным, полученным при исследовании воспалительных экссудатов (4), гемолитически активное вещество лишь сопровождает собственно макроцитаз (обладающий всеми свойствами протеиназы трипсинового типа), но не идентично ему. Макроцитаз, являющийся, как было установлено (4), псевдоглобулином, нам удалось отделить от гемолитина воспалительных экссудатов (гемолитина Тарасевича) путем обработки органическими растворителями.

Согласно нашим определениям, гемолитин содержится в экспериментальных и естественных (полученных от больных) гнойных экссудатах с кислой реакцией (рН 6,3—6,4). При фракционировании цельных (нецентрифугированных) экссудатов сернокислым аммонием гемолитин обнаруживается в первой белковой фракции, осаждающейся при насыщении на 0,30 и содержащей макроцитаз (4).

Изложенные ниже факты дают, как нам кажется, основание утверждать, что гемолитин Тарасевича является ненасыщенной жирной кислотой, что согласуется с данными последних лет о химической природе гемолитинов животных тканей (5). Осаждаемость гемолитина Тарасевича сернокислым аммонием при фракционировании цельных экссудатов можно объяснить соосаждением жирных кислот с белками или тем, что гемолитин связан со структурными элементами клеток экссудата.

Гемолитин Тарасевича появляется в экссудате, по всей вероятности, в результате действия липаз, которыми богаты макрофаги (6, 7), накапливающиеся на поздних стадиях воспаления. Появление гемолитина в экссудате, следовательно, зависит от «смены клеточных форм» в очаге воспаления, т. е. от процесса, находящегося под контролем нервной системы (8).

Как известно (6), липазы содержатся в лимфоцитах, но отсутствуют в полиморфноядерных лейкоцитах. Если появление гемолитина Тарасевича в экссудатах определяется действием липаз, то можно ожидать, что этот гемолитин имеется не только в гнойных (макрофагных) экссудатах с кислой реакцией, но и в серозных щелочных экссудатах, содержащих лимфоидные элементы. По нашим данным, в двух полученных от больных туберкулезом серозных экссудатах (рН 7,00 и 7,30), клеточные элементы которых состояли почти исключительно из лимфоцитов, содержа-

лось большое количество гемолизина, обладавшего всеми свойствами ненасыщенной жирной кислоты.

Нами показано также (⁴), что гемолизин воспалительных экссудатов оказывает *in vitro* не только гемолитическое, но и цитолитическое действие.

При оценке роли гемолизина Тарасевича в патогенезе воспаления следует учесть, что он в основной своей массе связан, повидимому, с нерастворимыми структурами клеточных обломков. Если некоторое количество гемолизина и попадает из очага воспаления в кровоток, он едва ли может оказать резорбтивное действие на органы и ткани, так как, подобно всем ненасыщенным жирным кислотам, связывается белками крови (⁵) и мн. др.), сильно тормозящими его действие. По всей вероятности, гемолизин Тарасевича в сочетании с другими факторами (в частности, с протеиназой макрофагов, накапливающимися в кислых экссудатах (⁴)), играет определенную роль в процессах самоочищения воспалительных очагов, что соответствует представлениям школы Мечникова по этому вопросу.

Экспериментальная часть

Гемолизин Тарасевича выделялся из экспериментальных экссудатов с кислой реакцией (рН 6,4 и ниже), полученных из плевральной полости и подкожной клетчатки собак после инъекции скипидара (⁴), а также из естественных экссудатов (полученных от больных в Институте хирургии им. А. В. Вишневского и МОНИТИ).

Методика. После измерения рН и специальной обработки, позволяющей удалить часть нуклеопротеидов (⁴), экссудаты фракционировались сернокислым аммонием. Полученные белковые фракции подвергались диализу до полного удаления ионов SO_4 , высушивались в вакууме при комнатной температуре и сохранялись на холоду.

Для испытания на гемолитическую активность препараты суспензировались в 5 мл 0,9% растворе NaCl, смешивались с 1 мл 5% суспензии отмытых эритроцитов кролика в физиологическом растворе, и пробы инкубировались в термостате при 37° в течение 90 мин. Затем эритроциты осаждались центрифугированием при 3000 об/мин, и центрифугаты фотометрировались в фотометре Пульфриха (зеленый светофильтр S_{53}).

Величина гемолиза в процентах вычислялась по формуле: $a = \frac{u \cdot 100}{n}$, где a — величина гемолиза в процентах, n — отсчет фотометра для пробы с полным гемолизом (вызванным дистиллированной водой), u — отсчет фотометра для исследуемой пробы. Минимальное количество вещества (в мг), вызывающее в этих условиях гемолиз на 50%, условно названо «гемолитической единицей» (ГЕ).

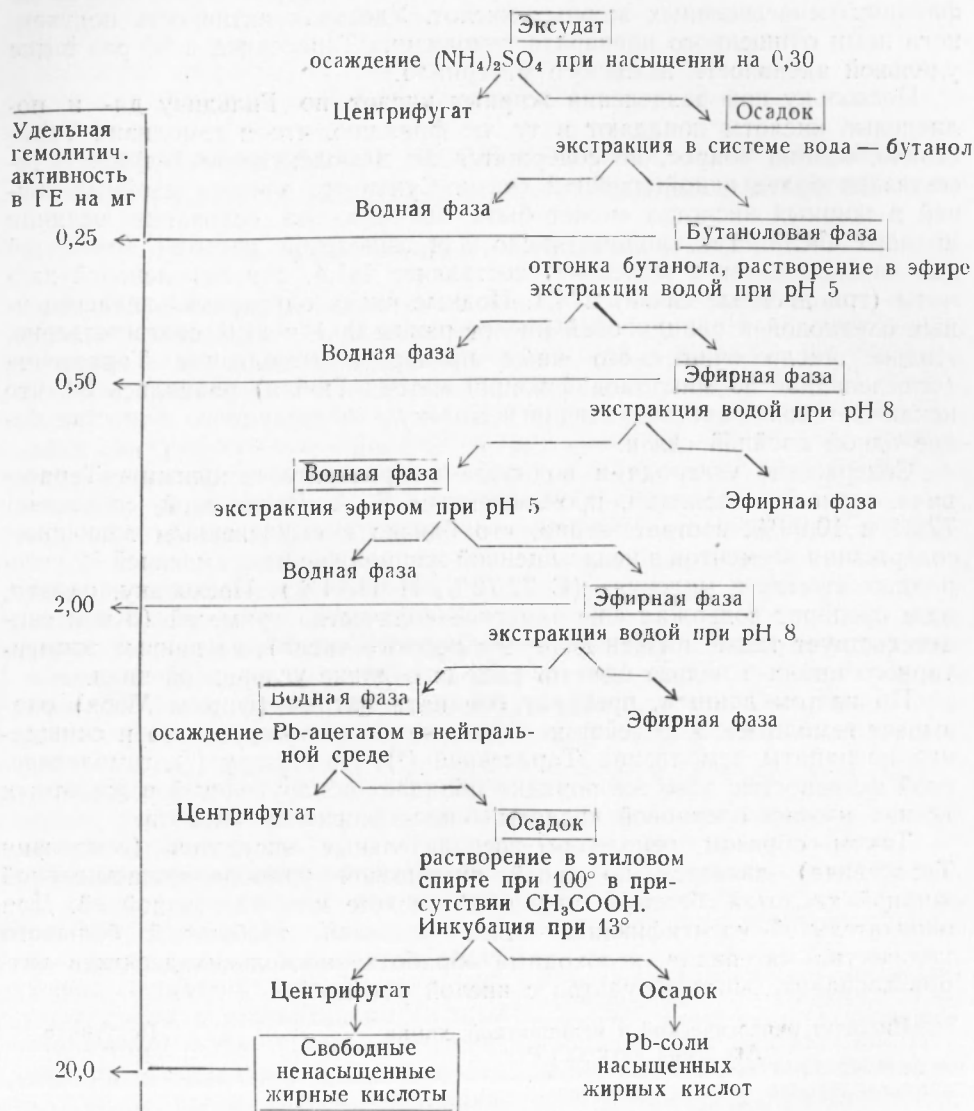
Результаты опытов. Гемолизин воспалительных экссудатов термостабилен (не инактивируется при 100° в течение 2 час). Из водных суспензий эвглобулинов кислых экссудатов гемолитически активное вещество при экстракции бутанолом количественно переходит в бутаноловую фракцию, не содержащую белков (полное отсутствие помутнения при добавлении сульфосалициловой и трихлоруксусной кислот).

Гемолизин Тарасевича не имеет, таким образом, ничего общего с белками. Он не является также лизолецитином, от которого отличается хорошей растворимостью в эфире и тем, что не содержит фосфора (определение по Фиске — Суббароу) и азота (микрокельдаль).

При экстракции эфирного раствора гемолизина подщелоченной водой (при рН 8) активное вещество количественно переходит в водную фазу. При рН 5 гемолизин не извлекается водой. Повторное переведение гемолизина из эфирной фазы в водную повышает его удельную активность (см. схему). Таким образом, исследуемый гемолизин обла-

дает свойствами кислоты, растворимой в органических слабо полярных растворителях. Содержание углерода и водорода в очищенном препарате гемолизина Тарасевича приближается к процентному отношению элементов в высших жирных кислотах. Все эти данные свидетельствуют о том, что гемолизин Тарасевича является высшей жирной кислотой. При исследовании свойств этой кислоты было предпринято разделение по Гильдичу⁽⁹⁾, основанное на растворимости свинцовых солей ненасыщенных жирных кислот в подкисленном этиловом спирте.

Схема очистки гемолизина Тарасевича



Для осуществления этого разделения гемолизин Тарасевича осаждается из нейтрализованного водного раствора добавлением 5% раствора $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; осадок свинцовых мыл растворяют в кипящем этиловом спирте, содержащем 1,5% уксусной кислоты. После 20-часовой инкубации при 13° выпадает смолистый осадок свинцовых солей насыщенных жирных кислот, который еще раз подвергается описанной обработке. Отстой, содержащий свинцовые соли ненасыщенных жирных кислот, представляет собой прозрачный спиртовый раствор. После от-

гонки из него спирта (в вакууме) сухой остаток растворяют в эфире, промывают водой, и свинцовые соли ненасыщенных жирных кислот разлагают разведенной HCl. Эфирный раствор свободных ненасыщенных жирных кислот промывают водой, эфир удаляют испарением и препарат высушивают над P₂O₅ в вакууме. Препарат насыщенных жирных кислот готовится по такой же схеме, но разложение свинцовых мыл производится с помощью разведенной HNO₃. Перед испытанием на гемолитическую активность водные растворы жирных кислот нейтрализуют.

Как видно из схемы, активное вещество обнаруживается только во фракции ненасыщенных жирных кислот. Удельная активность полученного нами очищенного препарата гемолизина Тарасевича в 80 раз выше удельной активности исходного материала.

Поскольку при разделении жирных кислот по Гильдичу ди- и полиеновые кислоты попадают в ту же фракцию, что и гемолизин Тарасевича, возник вопрос, не содержится ли в молекуле исследуемого гемолизина более одной двойной связи. Суждение о числе двойных связей в жирных кислотах может быть вынесено на основании величин иодного числа. Так, иодное число для линолевой кислоты (имеющей две двойные связи в молекуле) составляет 181,4, для линоленовой кислоты (три двойные связи) 274,1. Иодные числа однократно ненасыщенных олеиновой и элаидиновой кислот равны 90,1 и 81,6, соответственно. Иодное число очищенного нами препарата гемолизина Тарасевича (определенное по микромодификации метода Гюбля) равнялось 50, что исключает возможность наличия в молекуле исследуемого вещества более одной двойной связи.

Содержание углерода и водорода в препарате гемолизина Тарасевича, согласно анализам, произведенным Е. А. Игнатьевой, составляет 72,34 и 10,99%, соответственно, что близко к вычисленным величинам содержания элементов в ненасыщенной жирной кислоте, имеющей 12 углеродных атомов в молекуле (С 72,72%, Н 11,11%). Поскольку, однако, наш препарат содержал еще заметное количество примесей (о чем свидетельствует также низкая величина иодного числа), из данных элементарного анализа нельзя сделать вывода о длине углеродной цепи.

По нашим данным, препарат олеината натрия (фирмы Мерк) оказывает гемолитическое действие в тех же концентрациях, что и очищенные препараты гемолизина Тарасевича (4). По Лазеру (5), гемолитической активностью того же порядка обладает обнаруженный в животных тканях изомер олеиновой кислоты — цис-вакценовая кислота.

Таким образом, гемолизин воспалительных экссудатов (гемолизин Тарасевича) является по своей химической природе ненасыщенной жирной кислотой, близкой олеиновой кислоте или идентичной ей. Для окончательной идентификации этого вещества, требующей большого количества материала, необходима обработка нескольких десятков литров воспалительных экссудатов с кислой реакцией.

Институт биологической и медицинской химии
Академии наук СССР

Поступило
19 II 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. И. Мечников, Невосприимчивость в инфекционных болезнях, изд. 2, М., 1947. ² И. И. Мечников, Вопросы иммунитета, М., 1951. ³ Л. А. Тарасевич, К учению о гемолизинах, Одесса, 1902; Ann. Inst. Pasteur, 16, 127 (1902). ⁴ В. З. Горкин, Диссертация, М., 1952. ⁵ H. Laser, J. Physiol., 110, 338 (1950); E. Ponder, J. Gen. Physiol., 34, 551 (1951). ⁶ В. Н. Шредер, Тр. Ин-та цитол., гист. и эмбр. АН СССР, 2, 129 (1948); Усп. совр. биол., 27, 461 (1949). ⁷ Г. К. Хрущев, Роль лейкоцитов крови в восстановительных процессах в тканях, М., 1945. ⁸ В. Г. Елисеев, Тр. Омского мед. ин-та, 11, 105 (1949); 17, 3 (1950); Арх. пат., гист. и эмбр., 29, 70 (1952). ⁹ T. P. Hilditch, Chemical Constitution of Natural Fats, N. Y., 1947.