Доклады Академии Наук СССР
1954. Том XCIX, № 5

ФИЗИОЛОГИЯ

М. С. РЕЗНИЧЕНКО, С. Е. ТУКАЧИНСКИЙ и В. Н. ТУГОЛУКОВ

О МЕТОДАХ ИССЛЕДОВАНИЯ ДИНАМИКИ ВЫВЕДЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ ИЗ КРОВЕНОСНОГО РУСЛА

(Представлено академиком А. И. Опариным 15 X 1954)

Вопрос о судьбе чужеродных белков в кровяном русле реципиента представляет большой теоретический и практический интерес.

Известно, что белковые плазмозамещающие растворы, благодаря своему высокому коллоидно-осмотическому давлению, продолжительное время удерживаются в кровеносном русле и поэтому являются более эффективными по сравнению с солевыми, не обладающими коллоидной природой препаратами. Практика применения коллоидных плазмозаменителей белковой природы (сухая плазма и сыворотка человека ([1]), сыворотка крупного рогатого скота ([2])) показала, что они являются в достаточной степени эффективными. Однако первые из них мало доступны, а последняя, видимо, не лишена полностью своей видовой специфичности. Белковые растворы, изготовленные на основе растительных протеинов, находятся еще в стадии разработки.

Между тем, растворы последнего типа приближаются по своим коллоидно-химическим свойствам и аминокислотному составу к плазменным белкам крови и оказываются, по нашим данным ([3]), весьма эффективными плазмозаменителями, лишенными (в опытах на животных) своей видовой специфичности.

Настоящее исследование было предпринято нами с целью разработки методики определения длительности пребывания растительного белка в системе кроветока. Так как обычные аналитические методы не дают возможности прямого количественного разделения плазменных и растительных белков и, следовательно, определения содержания растительного протеина в общем белковом балансе сыворотки крови, нами был применен метод радиоактивной метки исследуемого протеина. При этом мы использовали метод иодирования протеина, позволяющий получить устойчивую радиоактивную метку за счет включения J^{131} ([4, 5]) в оксифенильные радикалы белковой молекулы.

Методика иодирования заключалась в обработке растительного белка элементарным иодом с последующим диализом не вошедшего в реакцию иода. Для этой цели к препарату белка, полученному из гороха путем экстракции протеинов децинормальным едким натром, после двукратного его переосаждения в изоэлектрической точке ([3]), прибавлялся раствор J^{131} с добавкой инертного носителя (5 мг на 1 мл) в иодистом кали из расчета 1 мл на 100 мл 1% белкового раствора. Обработка велась при периодическом перемешивании в прохладном помещении в течение 2 суток. По окончании иодирования избыток несвязанного иода удалялся путем диализа против исходного раствора растительного белка с многократной сменой диализирующей жидкости. Полнота диализа определялась по снижению радиоактивности диализирующего белкового раствора.

Степень включения иода в состав иодируемого белка после окончания

диализа контролировалась путем осаждения обработанного белкового препарата трихлоруксусной кислотой с последующим определением радиоактивности осадка и фильтрата. Полнота отмывания несвязанного радиоактивного иода проверялась путем промывания осадка свежими порциями трихлоруксусной кислоты, в которых также производилась проверка радиоактивности. Остаточная радиоактивность этих безбелковых фракций в наших опытах не превышала 1—2% от активности иодированного белка.

Для выяснения вопроса о продолжительности циркуляции остаточного свободного иода в кровяном русле нами был поставлен ряд опытов на кроликах по изучению скорости его выведения из кровеносной системы. С этой целью кроликам внутривенно вводился физиологический раствор с соответствующим количеством радиоактивного иода, эквивалентным его содержанию в иодированном белке, вводимом в последующих опытах. Кривые выведения неорганического иода, представленные на рис. 1, показывают, что радиоактивный небелковый иод чрезвычайно быстро, в течение первых минут, почти нацело выводится из кровяного русла животного.

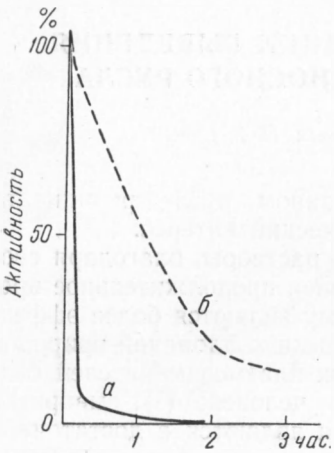


Рис. 1. Выведение иода и иодированного растительного белка из кровеносного русла. *а* — раствор иода в KJ, *б* — иодированный белок

Исходя из этих предварительных экспериментов, мы приступили к основным опытам, полагая, что наличие небольшого количества не связанного с белком иода не сможет исказить результаты исследования ввиду достаточно быстрого выведения его из системы кроветока. В связи с этим меченый по иоду раствор растительных белков вводился кроликам внутривенно из расчета 15 мл 1% раствора на 1 кг веса животного. Непосредственно после вливания раствора из ушной вены бралась первая проба крови в количестве 4 мл. Последующие пробы брались через 1, 2, 3, 24 и 48 час. после начала эксперимента. После свертывания крови сыворотка отделялась центрифугированием, и из нее приготовлялись образцы для определения радиоактивности. С этой целью 1 мл сыворотки наносился на алюминиевую чашечку. Пробы высушивались под инфракрасной лампой и исследовались на степень радиоактивности при помощи торцевого счетчика. Снижение радиоактивности в исследуемых образцах крови представлено на рис. 1.

На основании анализа представленных кривых можно констатировать, что в течение первого часа выводится суммарно около 45% исходного количества чужеродного белка. В дальнейшем скорость выведения этих белков заметно снижается. Через 24 часа после начала эксперимента в кровяном русле остается от 3 до 4% всего введенного меченого белкового препарата. Во всех проведенных нами опытах скорость выведения чужеродных белков оставалась примерно одинаковой. Гибели животных не отмечалось. Повторные введения изучаемых нами белковых препаратов не вызывали никаких анафилактоидных реакций.

Учитывая возможность частичного деиодирования белка за время пребывания его в кровяном русле реципиента, мы поставили несколько экспериментов с вивидиффузией, для чего к периферическому и центральному концам сонной артерии кролика присоединялись две стеклянные канюли, соединенные между собой коллодионной трубочкой, погруженной в подогретый до 37° физиологический раствор. При анализе радиоактивности внешнего физиологического раствора, взятого после 60-минутной вивидиффузии, было установлено в нем наличие весьма небольшой радиоактивности, не превышающей 0,01% от общей активности введенного

препарата. Эти данные позволяют исключить процесс деиодирования, при продолжительности опыта порядка 3—5 час., при количественной оценке скорости выведения растительного белка из системы кроветока. Учитывая это обстоятельство, можно полагать, что полученные в наших опытах показатели скорости выведения растительных белков практически не являются завышенными.

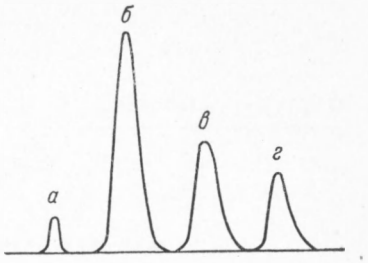


Рис. 2. Электрофореграммы γ-глобулиновых фракций сыворотки крови. *а* — до опыта, *б* — сразу после введения растительного белка, *в* — через 1 час после введения белка, *г* — через 2½ часа после введения белка

Одновременно с изотопным методом, с целью дополнительного контроля и уточнения полученных материалов, нами был использован для разрешения поставленного вопроса недавно разработанный метод электрофоретического определения фракций белка на бумаге ([6]). Основываясь на полученных нами ранее данных ([3]), говорящих о γ-глобулиноподобной природе белков, полученных из семян гороха, был разработан метод определения скорости их выведения из кроветока по снижению содержания γ-глобулиновой фракции в исследуемых образцах сыворотки. Исследование производилось по методике, описанной ранее ([6]). Ввиду того что нас интересовала только γ-глобулиновая фракция сывортки, количественного разделения α- и β-глобулинов и альбумина не производилось.

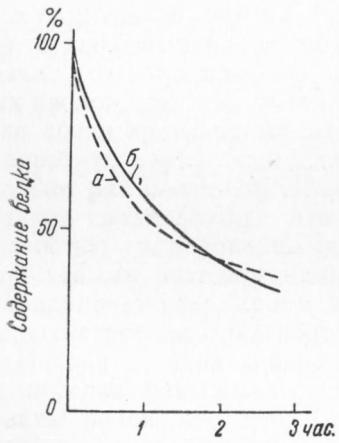


Рис. 3. Сопоставление данных по выведению растительного белка, полученных методом электрофореза на бумаге (*а*), и растительного белка, меченого J^{131} (*б*)

Результаты исследования представлены на рис. 2. Количественное определение площадей фотометрических кривых, соответствующих различным образцам сыворотки, взятым через определенные промежутки времени позволяет оценить количества введенного чужеродного белка, остающегося в крови реципиента, и сопоставить эти величины с данными, полученными при помощи метода меченых атомов.

Как видно из кривых, представленных на рис. 3, данные по выведению белка из кровеносного русла полученные двумя различными методами, практически совпадают в пределах погрешности измерения.

На основе проведенных опытов можно считать, что растительные белки, полученные по вышеописанной методике ([3]), несмотря на сравнительно хороший гемодинамический эффект, относительно быстро выводятся из кровяного русла реципиента.

Разработанный в данном исследовании метод может быть применен также для оценки времени нахождения в кровеносном русле и других белковых препаратов.

Ленинградский научно-исследовательский институт переливания крови

Поступило 2 VII 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Багдасаров, М. С. Дульцин и др., Клинич. мед., **22**, № 10—11, 15 (1944). [2] Н. Г. Беленький, Парэнтеральное белковое питание человека и животных, М., 1950. [3] М. С. Резниченко, В. Н. Туголуков, Акт. вопр. перелив. крови, **2** (1954). [4] F. Haurowitz, Th. Grampton, J. Immunol., **68**, 73 (1952). [5] L. Melcher, S. Masouredis, ibid., **67**, 393 (1951). [6] А. П. Вишняков, Д. С. Добровольский, Н. В. Ермаков, С. Б. Тукачинский, ДАН, **87**, 1035 (1952).