

К методике реакции Abderhalden'a.

(Предварительное сообщение).

О. Г. Аунапу.

Осенью 1924 года проф. М. С. Малиновский предложил мне заняться определением патологического химизма желез с внутренней секрецией при некоторых гинекологических заболеваниях при помощи реакции Abderhalden'a. Как известно, самим Abderhalden'ом были с самого начала указаны два способа производства этой реакции: диализационный и оптический. Но первый из них был вскоре оставлен Abderhalden'ом, который нашел, что употребляемые при этом методе гильзы дают около 30% брака. Кроме того новейшие исследования Lüttge и Mez'a показали, что сама гильза может удерживать продукты расщепления белка,—факт, который в значительной мере обесценивает всю методику реакции.

По мнению Abderhalden'a более точным методом для его реакции является оптический способ. Принцип его основан на том, что при помощи поляризационного аппарата в оптически-активных субстратах можно устанавливать различные степени вращения плоскости поляризации, в зависимости от изменения этих субстратов под действием ферментов. Исходным веществом при данном методе является пептон. Раствор последнего должен быть по возможности высокого молекулярного состава, так как было установлено, что некоторые сыворотки на более расщепленные белки совершенно не действуют. В деле применения оптического метода в биологии главнейшей задачей была разработка метода приготовления такого высокомолекулярного пептона, который стоял-бы возможно ближе к нерасщепленному белку. Такой метод был выработан Abderhalden'ом и опубликован в его известном труде „Abwehrfermente“, вышедшем в свет в 1913 г.

Для решения поставленной предо мною задачи,—изучения при помощи метода Abderhalden'a патологического химизма органов внутренней секреции,—требовалось приготовление пептона из мозгового придатка, щитовидной железы, надпочечника, яичника, плаценты и друг. органов. Прежде всего, чтобы овладеть самой техникой дела, я решила приготовить пептон из плаценты так, как это рекомендует сам Abderhalden. Вся процедура приготовления пептона состоит при этом в следующем:

Берет я свежая плацента и промывается водой через сосуды втечении $1\frac{1}{2}$ часов. Затем плацента разминается, пропускается через мясорубку

и растирается в ступке, причем тщательно удаляются все прослойки соединительной ткани. Все это продельвается под непрерывным током воды в течение $2\frac{1}{2}$ —3 час. с той целью, чтобы удалить из органа все малейшие следы крови. Затем плацентарная масса помещается ровно на трое суток в 70% раствор серной кислоты уд. в. 1,84. По прошествии трех суток приступают к осаждению растворенного в серной кислоте пептона едким баритом. Количество последнего, необходимое для нейтрализации, высчитывается по количеству взятой серной кислоты. Самый процесс нейтрализации бывает очень кропотлив, так как очень трудно уловить границу действительной нейтрализации. По окончании нейтрализации раствор фильтруют и приступают к его выпариванию. В виду того, что растворы пептона очень пенятся при выпаривании, полученную жидкость приходится выпаривать в особом аппарате, при помощи которого раствор пептона можно выпарить почти досуха при температуре около 40° . Через капельную воронку раствор пептона поступает в колбу по каплям и здесь тотчас испаряется, не образуя пены. Если жидкости имеется 2— $2\frac{1}{2}$ литра, то выпаривание длится около двух суток. Оставить прибор все это время без наблюдения нельзя ни на одну минуту, — приходится строго следить за температурой раствора, за разделительной воронкой, за водяным насосом и пр.; приостановить же процесс перегонки также нельзя, в виду возможного наступления аутолиза. После выпаривания сгущенный пептон, в количестве 5—10 куб. сант., разбавляется 100 кратным количеством метилового спирта и кипятится. Затем кипящий раствор фильтруется в этиловый спирт, который берется в пятерном, против кипящего раствора, количестве и который должен быть предварительно охлажден при помощи льда. Чтобы ускорить осаждение пептона в этиловом спирте, сюда прибавляют тройное количество эфира и приступают к фильтрации, как только пептон начнет собираться в хлопья. Полученное огромное количество смеси этилового, метилового спиртов и эфира обыкновенно профильтровывается в течение 8—10 час. Фильтр, на котором получается осадок пептона, тотчас переносится в вакуум-экзикатор. Через 1—2 дня пептон в последнем высыхает и может быть взвешен.

Таким образом при этой процедуре лишь на восьмые сутки от начала обработки последа и после того, как было затрачено 300,0 едкого барита, 1 кило метилового спирта, 5 кило этилового спирта и 100,0 фосфорного ангидрида, получается всего 0,1 пептона, какого количества бывает достаточно только на одно исследование.

В цитированной выше работе *Abderhalden's*, к сожалению, не указано, какое количество пептона удавалось ему самому добывать из одной плаценты. Считаясь с возможностью какой либо погрешности в обработке последа, я обратилась к проф. В. С. Гулевичу с просьбой проконтролировать весь процесс добывания мною плацентарного пептона. В нескольких опытах, сделанных в лаборатории проф. В. С. Гулевича, которому я приношу здесь искреннюю, глубокую благодарность, под его контролем я получила те же результаты, т. е. 0,1 пептона из одной плаценты, причем и здесь были израсходованы те же громадные количества материалов, о которых я говорила выше.

Таким образом оптический метод оказался не только громоздким, но и непосильно для меня дорогим, вследствие чего, затратив на его

проверку около 9 мес., я в конце концов должна была от него совершенно отказаться.

Кроме этих двух первоначальных методов *Abderhalden*'ом были предложены еще два видоизменения его реакции, — это т. наз. рефрактометрический и интерферометрический методы. *Hirsch* горячо рекомендует этот последний способ, указывая, что при его помощи ему удавалось получить хорошие результаты при исследовании патологического химизма органов внутренней секреции. Для меня, однако, этот метод был недоступен, так как в моем распоряжении не было необходимого для него прибора, т. е. интерферометра. Что же касается рефрактометрического метода, то мне удалось познакомиться с ним, благодаря любезности проф. *Б. М. Краснушкина*, которому я также приношу здесь искреннюю признательность. Метод этот заключается в следующем:

Берется свежая плацента и точно так же, как и для оптического метода, промывается водой через сосуды в течение $1\frac{1}{2}$ —2 час. Растертая, промытая, обескровленная и освобожденная от соединительной ткани плацентарная масса вываривается в дистиллированной воде и кипятится 6 раз по 10 минут с 100-кратным количеством дистиллированной воды. После каждого кипячения масса промывается в течение 5 мин. дистиллированной водой. В седьмой раз эта масса кипятится с 5-кратным количеством воды, после чего последняя отфильтровывается. Затем к 5 куб. сант. фильтрата прибавляют 1 куб. сант. 10% раствора нивгидрина и кипятят эту смесь ровно одну минуту. Если по прошествии $\frac{1}{2}$ часа в фильтрате не появится фиолетовой окраски, то субстрат считается годным к употреблению. Приготовленную таким образом плаценту помещают в сухую стерильную банку с притертой пробкой и заливают толуолом. Для производства самой реакции берется кусочек вываренной таким образом плаценты и помещается в необходимое количество сыворотки от испытуемой больной. Обыкновенно берут 10 кап. сыворотки и оставляют ее стоять 10 мин. при комнатной t^0 , после чего встряхивают, центрифугируют в течение 5 мин. на ручной центрифуге и из прозрачной сыворотки берут по одной, средней величины, капле для определения во вспомогательной призме рефрактометра. Последний помещается при этом в ванну, температура которой должна быть 17.5^0 . До отсчета капля остается в рефрактометре 5 мин., чтобы принять t^0 ванны, — иначе от меняющейся температуры получается неясная теневая граница в рефрактометрической шкале. Определение делается всегда не менее двух раз. После этого пробирки с органом и с сывороткой, равно как и контрольные пробирки с одной сывороткой, активной и инактивированной, оставляются на 16 час. в термостате при 34 — 35^0 . По истечении этого времени пробирки хорошо встряхиваются, центрифугируются в течение 5 мин., и снова определяется показатель преломления. Разница в показателях преломления до и после стояния пробирки в термостате и укажет на результаты реакции.

По описанному сейчас способу мною была исследована сыворотка трех заведомо беременных женщин, причем из этих трех случаев положительный результат получился только в двух. Очень может быть, что отрицательный результат в третьем случае следует отнести за счет недостатка в технике. Но даже и допустив это предположение, мне придется, на основании своих проверочных опытов, высказаться против хотя-бы практической ценности

рефрактометрического метода, в описанном виде, в деле распознавания беременности.

В мае месяце 1925 г. появилась работа Lüttge и Merz'a, ассистентов проф. Sellheim'a, которым удалось значительно упростить реакцию Abderhalden'a. Принципы методики названных авторов заключается в осаждении высокомолекулярных белков, которые находятся в растворенном состоянии, при помощи алкоголя определенной концентрации, а именно, 96°. Что касается техники, то, к сожалению, в имеющихся в моем распоряжении сообщениях как самих Lüttge и Merz'a, так и Sellheim'a говорится только, что исследование по их способу должно производиться со специально изготовленным субстратом, а как нужно готовить последний, — нигде не указано. В виду этого я решила попробовать изготовить субстрат таким образом, как он готовится Abderhalden'ом для рефрактометрического метода, и как он мною только что описан выше.

Если исключить вопрос о приготовлении субстрата, то выполнение реакции по Lüttge и Merz'у очень просто: берется один куб. сант. стерильной, свободной от гемоглобина сыворотки и вместе с кусочком субстрата ставится на 24 часа в термостат при 37°. По прошествии суток к сыворотке прибавляется 10 куб. с. 96° спирта, и смесь фильтруется. В освобожденном при помощи алкоголя от белков фильтрате продукты расщепления обнаруживаются цветовой реакцией на нингидрин.

Кроме цветовой реакции Lüttge и Merz предложили еще определять количество расщепленного белка по количеству остаточного азота по микро-Kjeldahl'ю. По наблюдениям их количество остаточного азота, которое получается в этом случае, должно равняться 16 мгр. в 1 куб. сант. сыворотки.

По способу Lüttge и Merz'a мною было до настоящего времени обследовано 40 женщин большей частью с различными заболеваниями полового аппарата (в том числе 5—с инфантилизмом, 12—с нормальной беременностью, 1—с внематочной беременностью, 3—с эклампсией, 2—с миомами матки, 1—с раком маточной шейки, 1—с отсутствием яичников после двусторонней овариотомии, 1—с бесплодием, 2—с morbus Basedowi, 4—с аменореей, 2—с геморрагическим эндометритом и пр.). У каждой из этих женщин сыворотка исследовалась на способность расщеплять hypophysin, щитовидную железу, надпочечник и яичник, а у некоторых—и плаценту. В каждом случае, понятно, исследовалась для контроля и сыворотка той же женщины, но без субстрата. В некоторых случаях я ставила также параллельные опыты с инaktivированной сывороткой.

Я далека от мысли делать на основании своих немногочисленных исследований какие-либо выводы, не буду даже говорить о том впечатлении, которое сложилось у меня в результате проделанных до сих пор наблюдений, — это дело будущего (о полученных мною результатах мною будет сделан специальный доклад на ближайшем Съезде гинекологов в Ленинграде), теперь же я позволю себе только отметить, что у некоторых из исследованных мною женщин мне удалось получить ясную реакцию сыворотки на определенные органы внутренней секреции. Так, напр., в случаях эклампсии всегда получалась положительная реакция на яичник; все случаи беременности давали положительную реакцию на плаценту;

все случаи с проявлением базедовизма давали реакцию на щитовидную железу и т. д. Это дает известное право думать, что с помощью реакции Lüttge и Merz'a удастся, может быть, подойти к разрешению вопроса об участии органов внутренней секреции при некоторых физиологических и патологических состояниях женщины.

Dr. O. G. Annan (Moskau). Zur Methode der Reaktion von Abderhalden.

Der Autor hatte an 40 Schwangeren und gynaekologischen Kranken die Reaktion von A. in der Modifikation von Lüttge und Merz angewendet; das Substrat dazu wurde ebenso, wie es seiner Zeit von Abderhalden für die refraktometrische Methode empfohlen war, vorbereitet. Bei jeder von den untersuchten Frauen wurde das Serum auf die Zerspaltungsfähigkeit in Bezug zu Hypophysis, Gl. thyreoidea, Gl. suprarenalis und Ovarium, bei manchen Placenta, geprüft. Der Autor bekam dabei deutliche Reaktion des Serums auf bestimmte Organe mit innerer Sekretion. So wurde in allen Fällen der Eklampsie positive Reaktion auf Ovarium, bei Schwangeren—positive Reaktion auf Placenta u. a. erhalten.
