

О специфических и неспецифических липолитических ферментах крови при tbc.

Д-ра М. И. Аксянцева.

I.

Жиро-липидным субстанциям в области иммунодиагностики, иммунопрофилактики и иммунотерапии за последнее время уделяется все большее внимание.

По Bergel'ю tbc палочка обладает наружной кислотно—и спиртоупорной оболочкой из жировоска. Это вещество входит в состав не только наружной ее оболочки, но и в наружный покров лежащего внутри собственно туберкулезного зерна. Межоболочковый промежуток заполнен жирокислым липоидом. По Long'у и Campbell'ю высушенные tbc палочки содержат 20—35% липоида, в котором 60—77% составляют омыляемые воски.

На основании изучения физико-химического состава tbc вируса уже а priori можно допустить, что организм не остается безучастным к одному из главных химических ингредиентов tbc палочки. Более того,—первая реакция организма, инфицированного tbc, должна быть направлена именно против жирилопидов, так как, в силу вышеуказанной морфологии возбудителя tbc, первое, с чем организм встречается,—это с его жиро-липоидной частью.

Антигенные свойства жиро-липоидных субстанций tbc палочек были впервые доказаны Much'ом в 1908 г., путем получения соответствующих антител (против настина). Другие исследователи (Citron, Klinkert, Kleinschmidt) совершенно независимо от Much'a доказали антигенный характер других жирилопидов путем нахождения соответствующих противотел. Последующие работы Deuck'a, Much'a и Leschke с разделением tbc палочек на белковую и жировую фракции и иммунизацией ими показали невозможность иммунизировать одной белковой фракцией и необходимость для этой цели обязательного присутствия жиро-липоидной фракции. Напротив, материалом, содержащим и белковую, и жиро-липоидную фракцию у животных (морские свинки, козы, овцы) можно вызвать относительный иммунитет к tbc.—факт, впоследствии подтвержденный многочисленным рядом исследователей, (Löwenstein, Neufeld, Wassermann, Leschke и многие др.), хотя некоторые авторы (Uhlenhut, Pinner) и не смогли подтвердить этого.

Работы Deuck'a, Much'a, Hauek'a и др. исследователей, работавших с парциальными антигенами, отводят значительное место в тера-

пии жиро-липоидной фракции, т. наз. групп А, F и N. Горювиц-Власова сообщает о благоприятных результатах применения антигена Безредки, т. е., в сущности, богатого жиро-липоидом тbc материала. Применением жиро-липоидного материала самого разнообразного характера с иммуно-терапевтическими и иммуно-профилактическими целями занимался целый ряд и других авторов с весьма различными результатами. Если, однако, в области иммуно-профилактики и иммуно-терапии жиро-липоидами мы еще далеки от разрешения вопроса, то применение их в области иммуно-диагностики за последние годы дало значительные успехи.

После работ Much'a, Leschke и Dielman'a, доказавших антигенные свойства жиро-липоидов, и после обнаружения соответствующих антител путем связывания комплемента, а также методом интракутанного введения парциальных антигенов жиро-липоидных групп, исследования в этом направлении быстро пошли вперед. Ruck ставил реакцию связывания комплемента, употребляя в качестве антигена спирго-эфирные экстракты тbc бацилл, предварительно обработанных фенолом. При помощи полученных белковых и жировых фракций он произвел обследование 85 клинически здоровых, 94 подозрительных на тbc и 160 тbc детей, причем во всех его случаях преимущества оказались на стороне жиро-липоидных антигенов.

Впрочем работа Samus'a-Pagnier с применением реакции связывания комплемента по способу Bordet-Gengou и появившаяся вскоре после этого работа Wassermann'a и Bruck'a, применявших в качестве антигена эмульсию из тbc палочек, альт-туберкулин Koch'a и экстракты из пораженных тbc органов, большого применения в клинике не получили, и в таком неопределенном положении данный вопрос находился до 1913 года, когда появилось сообщение Безредки и Манухина об успешных результатах, полученных ими при применении, в качестве антигена, тbc бацилл, выращенных на среде из яичных желтков. Проверая это сообщение, Wassermann, Katz, Rabinovitsch, Kempner, Gutfeld, Weigert, Bonvier, Платонов и др. подтвердили ценность этой реакции. Менее ценным, с точки зрения специфического диагноза, является новейший антиген, предложенный Wassermann'ом, где к сложно обработанным тbc бациллам добавляются неспецифические жиро-липоиды (лецитин, холестерин).

Столь же успешные результаты, как и с антигеном Безредки, дает реакция связывания комплемента с антигеном Voquet-Negre'a. Работы Voquet-Negre'a еще более убеждают в исключительном значении жиро-липоидов при тbc, т. к. при этом употребляются одни жиро-липоидные группы тbc бацилл. Связывание комплемента при употреблении антигена Voquet-Negre'a, спирторастворимой фракции тbc палочек, предварительно обработанных ацетоном, дает, по мнению многих авторов, лучшие результаты, чем все предложенные до настоящего времени антигены. Исследованиями того же Voquet-Negre'a доказано, далее, что прибавление к его антигенам белка не играет какой-либо роли. Суммируя все исследования в области связывания комплемента различными антигенами, можно сказать, что чем богаче антиген жиро-липоидными группами, тем успешнее бывают результаты его применения.

Со взглядом на антигенный характер жиро-липоидов в данное время согласен целый ряд авторов: Warden, Cannel und Holly, Cal-

mette и др. Вместе с тем парциальные антигены, в частности их группы А, F и N, получили достаточно прочную основу в иммуно-диагностике, иммуно-профилактике, иммуно-терапии и прогностике.

Небезинтересны попытки отразить динамику процесса с партигенами в зависимости от выраженности тканевой реакции при введении (интрадермальном) парциальных антигенов А, F и N и взаимоотношения выраженности реакции между отдельными партигенами. Altstadt отмечает повышение жиролипоидной активной способности, когда процесс успокаивается. Polland, Kiene и Adam установили, что при волчанке реакции на жировые партигены бывают резко выражены. Müller'ом и Misch'ом доказана значительно большая (в десятки тысяч раз) чувствительность tbc организма к жиролипоидной фракции, чем к белковой. Веер и Неклюдов, работавшие с tbc жиром-воском, советуют употреблять миллиардные разведения.

Таким образом совершенно законно в практике, наряду с реакцией отклонения комплемента, как показателем гуморальных антител, укрепился метод интрадермального введения антигенов, как индикаторов тканевых, клеточных антител. При этом спор о большей или меньшей важности гуморальных и клеточных сил не меняет фактов—тем более, что чрезвычайно трудно провести грань перехода одних в другие, ибо в конечном счете откуда же кровь черпает свои силы, если не из тканей? Да и с точки зрения теоретических знаний (теория Ehrlich'a) спор об этом, как резонно указывает Наск, является бесплодным.

Не эти спорные вопросы нас, однако, интересуют. Конечно, все эти биологические объяснения защитных сил и реакций в значительной мере способствовали успеху наших знаний; но одновременно с этим нельзя не заметить, что все эти биологические реакции чрезвычайно капризны, и вполне законным является стремление подвести физико-химическое обоснование этих явлений и методов исследования. Надо думать, что именно по такому пути и пойдет дальнейшее развитие биологии. „Сведение капризного биологического явления на химический процесс, гораздо легче подчиняющийся воле человека, раскрывает в будущем новые горизонты“,—говорят К. Тимирязев.

Несмотря на, казалось-бы, убедительные доводы в пользу признания за жиролипоидами антигенных свойств, некоторые авторы несогласны с этим и появляющиеся при действии их антитела относят к жирорасщепляющим ферментам, отражающим их как количественно, так и качественно,—так называемые защитные или оборонительные ферменты Abderhalden'a. Источником их Abderhalden считает лейкоцитов. На внедрение инородного тела организм реагирует мобилизацией носителей этих ферментов, что морфологически выражается в лейкоцитозе.

Bergel и его сотрудники, а также многочисленные другие авторы, на основании экспериментальных исследований приписывают содержание жирорасщепляющих ферментов лимфоцитам, протеолитических—полинуклеарам. По этому вопросу возникла большая полемика между целым рядом исследователей с Aschoff'ом во главе с одной стороны и Bergel'ем—с другой. Возражения Aschoff'a все же неубедительны, ибо он вводил не чистый препарат жиролипоидов, а яичный желток, как известно, содержащий, наряду с высоким процентом жиролипоидов, также целый ряд самых разнообразных составных частей. Исследованиями

Цехновицера результаты, полученные Bergemann, вполне подтверждаются.

Некоторые авторы идут дальше,—они склонны все явления иммунитета объяснять действием ферментов (Коршун, Much и др.) Насколько основательно такое мнение,—сказать трудно, но уже в настоящее время имеется много данных за то, что известная доля истины в нем, несомненно, есть: многочисленными работами с определенностью установлено, что различные инфекции и интоксикации значительно изменяют ферментативную функцию тканей и крови, и обратно—заметно влияние, оказываемое ферментами крови на характер и течение различных болезней (Carnier, Двужильный, Гринев, Алешин и др.).

В отношении к tbc взгляды Bergemann'a, Abderhalden'a и Much'a могут объяснить многое. Многочисленные наблюдения Rosenthal'a, Bergemann'a, Romberg'a, Mayer'a, Kleeman'a, Weber'a, Hosslin'a, Spithoff'a и др. устанавливают благоприятное значение лимфоцитоза при tbc; с другой стороны имеются наблюдения над благоприятным течением tbc процесса при высоком липолипидическом титре, и наоборот (Römer, Caro, Falkenheim, Gotlieb, Georgi, Demartini, Гринев, Кочнев, Песнер, Писнячевский, Битны й-Шляхто, Катеров и др.).

Учение о липолитической силе tbc организма объясняет многое в работах Мечникова, Fisinger'a и Метальникова, именно, в экспериментах их с гусеницей пчелиной моли, а также объясняет оно и невосприимчивость отдельных животных (собаки, суслики и др.) к tbc в соответствии с высокой липолитической силой их крови. Все же, однако, эти неспецифические липолитические ферментативные способности сыворотки, играющие, по видимому, немаловажную роль, как то видно будет и из наших опытов, не в состоянии объяснить явлений специфического иммунитета при tbc. Основательным возражением служат доводы, что ни лимфоцитоз, ни липолитическая сила сыворотки не являются чем-то особенным, свойственным только tbc, но сопутствуют и целому ряду патологических процессов нетуберкулезного характера.

Мы поставили своей задачей изучить липолитические свойства крови при экспериментальном и клиническом tbc. При этом, тогда как все авторы для воздействия ферментов применяли неспецифический жир—монобутирин, мы, исходя из идеи специфичности, при наших исследованиях кровяной липазы, помимо монобутирина применяли приготовленную нами по нижеописанному способу жиролипидную эмульсию из tbc палочек. Липолитический фермент сыворотки, расщепляющий только монобутирин, мы в данной работе называем „неспецифической липазой“, фермент же, расщепляющий нашу жиролипидную эмульсию—„специфической липазой“. В качестве опытных животных нам служили морские свинки и кролики, сыворотка которых исследовалась на содержание в ней обоюбого вида ферментов как до, так и после заражения животных туберкулезом.

Методика наших опытов была такова: несильно вирулентный штамм tbc палочки засеивался на обыкновенном мясо-пептонно-глицериновом бульоне с прибавлением к нему картофеля. Среда приготавливалась следующим образом: к мясо-пептонному бульону прибавлялся небольшими ломтиками очищенный картофель, смесь настаивалась на холоду в продолжении суток, затем фильтровалась, и фильтрат, с прибавкой 5% глицерина, нагревался в продолжении 10 мин. при 120° С;

выпадавший осадок затем отфильтровывался, фильтрат разливался по колбам, стерилизовался, и после этого производился посев. При желании ускорить процедуру настаивания, бульон с прибавленным картофелем можно нагреть в продолжении 5 минут при 100° С, после чего он отстает, фильтруется и т. д. Нужно при этом заметить, что получающиеся культуры чрезвычайно капризны, — они значительно медленнее растут на разваренном картофеле, если привыкли к настою картофеля, и наоборот. Засеянные колбы ставились в термостат и держались там до пышного роста (обыкновенно срок этот равнялся 4—5 неделям). По образовании массивной, волнистой пленки, ползущей по стенкам колбы, культура фильтровалась через обыкновенный бумажный фильтр, затем высушивалась в водяном или сухо-воздушном шкафу при t° не более 100° С. Излишек фильтровальной бумаги удалялся, сухой комок культуры измельчался на мелкие кусочки и экстрагировался в аппарате Soxhlet'a в продолжении 2—3 дней до полного извлечения жира-липидных и восковых веществ. Наилучшим экстрактором в наших опытах оказался эфир; спиртовая, ацетоновая и хлороформная фракции, после обработки материала эфиром, давали ничтожные количества экстракта и, согласно нашим опытам, повидимому, не вносили ничего особо-существенного в ход реакции в нашей обстановке. Признаком такого извлечения мы считали прозрачность экстрагирующего вещества после 20 часов контакта в цилиндре аппарата Soxhlet'a.

Таким образом у нас всегда получался желтый насыщенный раствор. Последний выпаривался досуха, и выпаренный осадок оставался в той же колбе в виде застывшей массы абрикосово-апельсинового цвета с ароматным запахом; интенсивность его окраски, повидимому, зависела от степени окисления при выпаривании. Экстракт этот, помимо водно-эмульгируемых жира-липидных групп, всегда содержал еще и нерастворимые и неэмульгируемые воски, количественно составлявшие до 1/4 по весу экстракта. Эмульсия всегда приготавливалась в нагретой до 80° С дистиллированной воде и в остывшем состоянии применялась для опытов.

Постановка последних была такова: у кроликов и у свинок добывалось из сердца 3 1/2—4 к. с. крови; приблизительно через 1/2—1 ч. кровь стерильно обводилась в пробирке и ставилась на холоду на 20—24 часа, причем получалась совершенно прозрачная сыворотка. Для каждого опыта бралось по 4 стерильных пробирки: две, опытная и контрольная, — для определения неспецифических липолитических ферментов и две — для определения таковых же специфических ферментов. Во все эти пробирки разливалась дистиллированная стерильная вода, по 4,75 к. с. в каждую пробирку, после чего к ней прибавлялось по 0,25 к. с. сыворотки.

Контрольные пробирки кипятились в продолжении 3 минут, причем выкипавшая при кипячении вода дополнялась до первоначального (5 к. с.) объема. В пробирки, служившие для определения неспецифических липолитических ферментов, добавлялось по 5 к. с. 1% раствора эмульсии монобутирина, в пробирки же для исследования специфических липолитических ферментов добавлялось по 5 к. с. эмульсии жира-липоида в разведении 1:500. Затем в каждую пробирку прибавлялось по 3 капли толуола, и пробирки ставились в термостат на 12 час. Определение ферментативной силы производилось по удобному и простому методу титрования образовавшейся при расщеплении жира кислоты 1% - нормальным раствором NaOH в присутствии фенолфталеина, причем ферментативная липолитическая сила данной сыворотки определялась по разнице затраченной щелочи для нейтрализации кислот в опытной и контрольной пробирках. Полученные данные переводились затем на 1 к. с.

Всего нами было произведено таким образом 30 опытов — 24 на морских свинках и 6 — на кроликах. Результаты этих опытов приведены на прилагаемых таблицах.

Как видно из таблиц №№ 1 и 2, при предварительном, до заражения tbc, обследовании (у большинства животных повторном) ни одна свинка, ни один кролик не обнаружили в их сыворотке специфических липолитических ферментов в то время, как неспецифическая липаза у всех без исключения животных была определена в весьма значительном количестве, — в среднем 25,35 у свинок и 18,8 у кроликов.

Затем 19 свинок из 24 и 4 кролика из 6 были в различное время заражены tbc, свинки же №№ 18, 19, 20, 22 и 24 и кролики №№ 5 и 6

ТАБЛИЦА № 1.

Морские свинки.

ТАБЛИЦА № 3.

№№ опытов	Вес живот. в грм.	Неспециф. липолит. ферменты.	Специф. липолит. ферменты.	Вес живот. в грм.	Неспециф. липолит. ферменты.	Специф. липолит. ферменты.
1	405	23,41	0	495	20,8	0
2	440	22,23	0	Погиб.	—	—
3	325	16,0	0	390	20,8	0
4	510	24,0	0	575	22,8	0
5	440	25,6	0	545	21,0	0
6	495	24,8	0	550	22,4	0
7	585	23,2	0	700	22,4	0,3
8	535	24,0	0	655	21,6	0,3
9	640	26,4	0	620	24,8	0,5
10	455	24,6	0	565	21,6	0,8
11	435	27,2	0	—	23,6	0,4
12	585	25,6	0	635	24,0	0,5
13	450	25,2	0	570	24,0	0,3
14	415	22,8	0	510	21,6	0,3
15	520	24,2	0	—	20,45	0
16	480	24,8	0	—	24,8	0,4
17	490	28,2	0	—	25,1	0,5
18*)	510	30,2	0	—	30,6	0
19*)	495	29,8	0	—	30,2	0
20*)	520	—	0	—	26,0	0
21	500	27,6	0	—	18,0	0,4
22*)	510	28,0	0	—	22,4	0
23	485	25,0	0	—	16,8	0,4
24*)	495	28,4	0	—	26,4	0

Средн. 25,35 Средн. 0

Средн. 20,1

ТАБЛИЦА № 2.

Кролики.

ТАБЛИЦА № 4.

№№ опытов	Вес животн. в грм.	Неспециф. липолит. ферменты.	Специф. липолит. ферменты.	Вес животн. в грм.	Неспециф. липолит. ферменты.	Специф. липолит. ферменты.
1	1550	18,2	0	—	22,0	2,0
2	1650	16,4	0	—	20,8	1,8
3	1600	24,0	0	—	Погиб.	Погиб.
4	1420	19,2	0	—	Погиб.	Погиб.
5*)	—	18,0	0	—	18,6	0
6*)	—	17,2	0	—	17,0	0

Средн. 18,8 0

оставались в качестве контрольных. В среднем кровь на содержание ферментов исследовалась у них через 4—6 недель, а у свинок №№ 15,24, кроме того, и спустя 5—6 месяцев после заражения.

*) Звездочкой отмечены контрольные животные.

Таблицы №№ 3 и 4 иллюстрируют изменения в липолитических свойствах крови у свинок и кроликов, происшедшие за 4—6 недель после их заражения. Как правило, у всех свинок после их инфицирования неспецифическая липаза дала понижение, в среднем на 10%, — факт вполне совпадающий с данными других авторов, занимавшихся этим вопросом на экспериментальном и клиническом материале. Только у 2 кроликов (другие 2 погибли вскоре после их заражения) количество неспецифической липазы, давшей некоторое понижение в первые 2—3 недели после заражения, в дальнейшем повысились на 20%.

Что касается специфической липазы, то она была обнаружена нами у 12 свинок из 19 и у 2 кроликов (т. е. у обоих из 4 оставшихся в живых после заражения). Титр ее оказался во много раз ниже титра липазы неспецифической, причем у кроликов он был приблизительно в 4 раза выше, чем у свинок.

Из таблицы № 3 видно также, что первые 6 свинок не обнаружили в их крови специфической липазы после их заражения. По отношению к этим 6 животным нам необходимо сделать некоторую оговорку. Дело в том, что в процессе работы нам представлялось также интересным выяснить вопрос, какое влияние оказывают на течение инфекции и на появление в крови специфических липолитических ферментов факторы, повышающие неспецифическую ферментативную функцию. Для этой цели первые две свинки получили, с перерывами в несколько дней, за 2 недели до заражения, в общей сложности по 12 куб. сант. нейтрального жира в полость брюшины, а следующие 4 свинки—2 раза по 5 к. с. того же жира.

Выше нами уже было указано отмеченное некоторыми авторами повышение липолитической силы сыворотки под влиянием введения нейтрального жира. И действительно, у наших свинок, получивших предварительное введение такового, количество неспецифической липазы в крови значительно повысилось; так, напр., у свинки № 1 количество это повысилось с 23,41 до 26,6, а у свинки № 3—с 22,23 до 24,8. Но ни у одной из этих свинок мы не могли обнаружить в сыворотке, после их заражения, специфической липазы. Отмечая данное явление, мы не беремся в настоящее время дать ему то или иное истолкование.

Далее, при наших экспериментах нам совершенно случайно удалось подметить один не лишенный интереса факт. На опытном материале нам желательно было получить реакцию Mantoux, и для этой цели были взяты 4 свинки, в том числе и свинка № 15, у которой не было ранее обнаружено специфической липазы после заражения. Одна из этих свинок через 30 часов после введения А-туберкулина погибла. Взятая кровь у оставшихся 3 свинок показала явное повышение как неспецифических, так и специфических ферментов, причем эти последние были обнаружены теперь также и у указанной свинки № 15. Таким образом А-туберкулин даже в столь небольших дозах, каковые применяются при реакции Mantoux, в нашем случае сыграл роль как бы активатора ферментативных процессов. Чтобы проверить это явление, мы впрыснули подкожно свинкам №№ 1, 3, 15 и 16, а также контрольным №№ 18, 19 и 22, 0,5 А-туберкулина и спустя 15—20 часов взяли кровь для исследования.

Таблица № 5 показывает результаты этого опыта. Аналогичный опыт был проделан и на 4 кроликах (см. таблицу № 6).

ТАБЛИЦА № 5 (свинки).

№№ опытов	До введения А-туберкулина		После введения А-туберкулина.	
	Неспец. ферменты.	Специф.	Неспец. ферменты.	Специф.
1	20,8	0	22,4	1,4
2	20,8	0	21,6	1,2
3	20,45	0	24,3	0,8
4	24,8	0,4	25,6	1,2
5 *)	30,6	0	24,0	0
6 *)	30,0	0	25,9	0
7	25,1	0,5	Погибла	

ТАБЛИЦА № 6 (кролики).

1	22,6	2,2	28,0	3,2
2	20,6	1,2	24,0	1,8
3 *)	16,2	0	15,0	0
4 *)	17,6	0	17,0	0

При анализе данных этих опытов бросается в глаза резкая разница ферментативной функции у здоровых и инфицированных животных. Инфицированные свинки и кролики резко реагировали на введенный им туберкулин: очаговые железы у них придухали, животные становились скучными и пр. В ферментативной своей функции все животные, как правило, реагировали при этом мобилизацией как специфических, так и неспецифических ферментов, причем свинки №№ 1 и 3, получившие до инфекции нейтральный жир и не показывавшие специфических ферментов после инфекции (см. таблицу № 3) на инъекцию 0,5 А-туберкулина Кош'а также ответили появлением специфических ферментов в крови. Сказанное относительно свинок в равной мере относится и к кроликам.

Другое дело здоровые, не инфицированные животные,—внешняя реакция у них также как будто появлялась, животные становились скучноватыми, но оставались подвижными. В ферментативной своей функции животные при том же количестве А.-Т. Кош'а (0,5), как правило, реагировали понижением содержания в крови неспецифических ферментов, никогда, однако, не обнаруживая специфической липолитической ферментативной функции.

Не вдаваясь сейчас в подробную оценку факта появления в крови инфицированных тbc животных специфических по отношению к жиролипоидной эмульсии липолитических ферментов, мы укажем только, что склонны придавать ему большое иммуно-биологическое значение.

Суммируя данные наших экспериментов, мы можем установить нижеследующие положения:

1. Свободные от тbc животные не содержат в крови специфических противотуберкулезных ферментов.

*) Здоровые, не инфицированные животные.

2. Инфицированные тbc животные реагируют образованием специфических липолитических ферментов.

3. Предварительно „иммунизированные“ неспецифическим нейтральным жиром и после этого инфицированные животные не проявляют специфического ферментативного действия в своей крови, содержа, однако, специфическую липазу в скрытом состоянии, могущую быть проявленной при введении им А-туберкулина Кош'а.

4. Тbc инфекция вовлекает в процесс также и неспецифическую липолитическую ферментативную функцию, понижая ее во время инфекции.

5. Введение указанных в опыте доз А-туберкулина Кош'а тbc свинкам и кроликам, в случае их выживания, вызывает повышение как специфических, так и неспецифических ферментов.

6. Здоровые животные (свинки и кролики) в тех же условиях опыта реагируют понижением содержания в крови неспецифических липолитических ферментов, никогда, однако, не обнаруживая появления специфических ферментов.

(Окончание в следующем номере).
