

К вопросу об эритропреципитинах и гэмоглобин-преципитинах.

(Предварительное сообщение).

Прив.-доцента **А. Д. Гусева.**

(Доложено в заседании Физиологической секции О-ва Врачей при Казанском Ун-те 4/IV 1927 г.).

В 1903 году А. Klein¹⁾ показал, что при иммунизации кроликов экстрактом эритроцитов в сыворотке их образуются преципитины, отличающиеся по своим свойствам от преципитинов Uhlenhuth'a. Klein назвал их эритропреципитинами, в отличие от серумпреципитинов, обычно применяющихся в практике. Для иммунизации кроликов Klein²⁾ пользовался экстрактами, приготовленными таким образом: красные кровяные тельца многократно промывались на центрифуге физиологическим раствором NaCl до тех пор, пока промывные воды не переставали давать реакцию на белок, затем физиологический раствор сливался с осадка эритроцитов, и последние разрушались четырехкратным объемом дистиллированной воды. После того к полученному лакловому раствору добавлялся 8,5% раствор NaCl в пропорции 1:9, и смесь вновь центрифугировалась до тех пор, пока помутившийся раствор не делался вновь прозрачным. Полученный таким образом раствор Klein вводил кроликам в брюшную полость 8 раз по 15 к. сант. В результате иммунизации Klein получил сыворотку, дающую приципитацию только с экстрактами эритроцитов, но не с сывороткой соответствующей крови. Наряду с образованием эритропреципитинов Klein получил также в сыворотке опытных животных и агглютинины.

Последний вывод Klein'a был проверен Кочкиным³⁾, который иммунизировал 1 морскую свинку экстрактом эритроцитов и, кроме того, 2 кроликов и 5 морских свинок—растворами кристаллического гэмоглобина. Выводы Кочкина были таковы, что ни экстракт эритроцитов, ни гэмоглобин не содержат в себе ни гэмолитических антигенов, ни гэмагглютининогенов.

Через год после диссертации Кочкина вышла работа Leers'a⁴⁾, иммунизовавшего 8 кроликов экстрактами эритроцитов человека по методу Klein'a, причем 6-ти кроликам он вводил экстракт в полость

1) Klein A. Wiener kl. Woch., 1903, №№ 5—6; Wiener kl. Rundschau, 1904, № 24.

2) Klein A. Centr. f. Bakter., Bd. XXXIX, Original; Wiener kl. Woch., 1905, № 41.

3) Кочкин В. П. Дисс., Казань, 1911.

4) Leers O. Centr. f. Bakt., Bd. LIV.

брюшины, а 2-м—в ушную вену. В результате Leers получил сыворотки, специфичные только для крови человека, титра от 1:100 до 1:1500, но большинство сывороток Leers'a давало преципитацию не только с экстрактами эритроцитов, но и с нормальной сывороткой человека. Особенно интересны были опыты Leers'a с кровью, смешанной со спермой и мокротой, где серумпреципитиновая реакция давала большой % ошибки, а эритроцитиновая—всегда давала правильный ответ.

После Leers'a вопрос об эритропреципитинах был почему-то забыт, и только в 1922 году Hektoen и Schulhof¹⁾ вполне подтвердили специфичность эритропреципитинов, но указали, что эритропреципитиновая сыворотка всегда содержит в себе небольшое количество серумпреципитинов, от которых может быть освобождена добавлением небольшого количества нормальной сыворотки соответствующего животного и последующим отцентрифугированием образовавшегося осадка.

Наконец, в 1923 г. Higaschi²⁾ иммунизировал кроликов кристаллическим гемоглобином собаки и лошади, полученным по способу Hoppe-Seyley'a и перекристаллизованным 1—2 раза. При этом Higaschi получил специфические сыворотки, которые давали с соответствующим антигеном реакции преципитации и связывания комплемента, но не давали ни гемолиза, ни агглютинации эритроцитов соответствующего животного. Higaschi вводил кролика интравенно 6—10 раз по 0,005—0,1 кристаллического гемоглобина с промежутками в 9—10 дней. При применении нечистых препаратов гемоглобина Higaschi получал, кроме гемоглобинпреципитинов, также агглютенины и лизины, почему он и считает эритропреципитины Klein'a не за самостоятельные антитела, а за смеси гемоглобинпреципитинов, лизинов и агглютининов.

Мои первые опыты с иммунизацией кроликов экстрактами эритроцитов человека относятся к периоду 1920-21 года, когда мною было иммунизировано 4 кролика, причем им делались инъекции внутривенно, по классическому методу Uhlenhuth'a, с промежутками в 5—6 дней. Эта первая попытка была неудачна,—два кролика погибли от анафилактики после 2-ой инъекции, 1 кролик не дал иммунной сыворотки, и 1 кролик дал сыворотку с титром 1:1000 как для нормальной сыворотки человека, так и для экстракта эритроцитов.

Свою неудачу я мог объяснить главным образом тем, что в моем распоряжении тогда не было соответствующего оборудования, и я не мог тогда получить эритроцитов, вполне отмытых от сыворотки. Что же касается большого % гибели животных, то это обстоятельство наблюдалось и у Klein'a, и у Leers'a.

В прошлом году в нашей лаборатории вновь начато было иммунизирование кроликов, и не только экстрактом эритроцитов, но и кристаллическим гемоглобином. К изложению этих опытов я теперь и перехожу.

До настоящего времени нами иммунизировано 4 кролика экстрактом эритроцитов человека и 6 кроликов—растворами кристаллического гемоглобина лошади.

Техника приготовления экстракта эритроцитов нами применялась та же, что и у Klein'a, за тем исключением, что эритроциты растворялись не в 4-кратном,

¹⁾ Hektoen L. and Schulhof K. Реф. в Zent. f. gericht. Med., 1925, Bd. V, H. 2.

²⁾ Higaschi S. Реф. ibidem.

а в 3-кратном объеме воды, и, вместо разведения экстракта эритроцитов 8,5% раствором NaCl, нами просто прибавлялась к полученному раствору эритроцитов кристаллическая поваренная соль до содержания ее, соответствующего содержанию в физиологическом растворе. Кровь человека нами получалась из родильного приюта (послеродовая).

Что касается хода иммунизации, то кролику № 1 17/XI 1926 было введено интравенозно 3 к. с. экстракта эритроцитов, 24/XI—10 к. с. и 1/XII—10 к. с. После третьей инъекции exitus letalis при явлениях анафилаксии. Испытание сыворотки этого кролика показало полное отсутствие в ней как эритро-, так и серумпреципитинов.

Кроликам №№ 2—4 вводились меньшие дозы того же антигена, из-за боязни тоже вызвать у них явления анафилаксии. Всем этим 3 кроликам инъекции делались одновременно, причем всем им вводилось одинаковое количество экстракта эритроцитов. Всем им было сделано по 5 инъекций, а именно, 12/II 1927 по 2 к. с. экстракта эритроцитов, 15/II—по 2,5 к. с., 20/II—по 3 к. с., 23/II—по 3,5 к. с. и 28/II—по 4 к. с. Все три кролика перенесли инъекции хорошо, явлений анафилаксии у них не наблюдалось. Через 12 дней, т. е. 13 III, от всех трех кроликов взяты пробы крови (из ушной вены), и, после отстаивания сыворотки, поставлены пробы на преципитацию как растворов экстракта эритроцитов, применявшегося для иммунизации, так и растворов нормальной сыворотки человеческой крови.

Так как предполагалось произвести вторичную иммунизацию этих кроликов, то для пробы у всех их были взяты лишь небольшие количества крови, почему и произведено было собственно не испытание титра полученных сывороток, а только испытание их активности.

Практика Klein'a и Leers'a показала, что эритропреципитиновые сыворотки вообще имеют невысокий титр, почему для пробы нами были взяты только слабые растворы как экстракта эритроцитов, так и нормальной сыворотки, а именно: 1:100, 1:200 и 1:300.

Сыворотки всех трех кроликов дали со всеми этими растворами преципитацию, т. е. все полученные сыворотки содержали как эритропреципитины, так и серумпреципитины; другими словами говоря, результаты у нас были те же, что и полученные Нектоен'ом и Schulhof'ом. Более интересные результаты получены были нами при иммунизации гэмоглобином.

Для иммунизации мы применяли кристаллический гэмоглобин лошади, полученный из Лаборатории биологической химии и хранившийся около года. Гэмоглобин этот был перекристаллизован 5 раз. Из него готовился 1% раствор в дистиллированной воде, затем этот раствор центрифугировался от 3 до 6 часов, причем на дне пробирок получался осадок, над которым был совершенно прозрачный раствор. Раствор этот осторожно снимался пипеткой, к нему добавлялась поваренная соль до физиологического содержания, и затем раствор вводился кроликам в ушную вену.

При иммунизации кролика № 5 была сделана попытка фильтровать раствор гэмоглобина через свечу Silberstein'a, но это было сделано только раз, причем только через сутки было получено 5 к. с. прозрачной, соломенно-желтой жидкости. При остальных инъекциях растворы не фильтровались, из-за опасения порчи раствора при длительном стоянии.

При каждой инъекции 1 к. с. применявшегося раствора гэмоглобина высушивался на часовом стекле и взвешивался на химических весах; путем такого определения сухого остатка гэмоглобина точно высчитывались количества гэмоглобина, введенные кроликам. Перед началом иммунизации сыворотки всех опытных кроликов были испытаны на преципитацию растворов гэмоглобина лошади, причем все дали отрицательные результаты.

Кролику № 5 23/X 1926 введено 5 к. с. раствора гэмоглобина, профильтрованного через свечу Silberstein'a, причем количество введенного гэмоглобина не было определено взвешиванием. 28/X—вторая инъекция 5 к. с. раствора, содержащего в себе 0,0441 гэмоглобина, 5/XI—третья инъекция 10 к. с., или 0,107 гэмоглобина, 12/XI—четвертая инъекция 10 к. с., или 0,061 гэмоглобина, и 20/XI—пятая инъекция 10 к. с., или 0,074 гэмоглобина. Всего в первую серию кролику было введено

немного более 0,2861 гемоглобина. Испытание сыворотки на 12-й день после пятой инъекции показало, что сыворотка совершенно неактивна.

Через 2 месяца тому же кролику начата вторая серия инъекций: 22/1 1927—первая инъекция 3 к. с. раствора, или 0,0221 гемоглобина, 25/1—вторая инъекция 8 к. с., или 0,0592 гемоглобина, 28/1—третья инъекция 10 к. с., или 0,172 гемоглобина, и 9/II—пятая инъекция 10 к. с., или 0,058 гемоглобина. Таким образом за вторую серию кролику было введено 0,4058 гемоглобина, а всего в обе серии—несколько более 0,6919 гемоглобина.

Немного ранее была закончена первая серия иммунизации кроликов №№ 6, 7 и 8. Инъекции этим кроликам делались в одни и те же дни, причем почти всегда им вводилось одинаковое количество раствора гемоглобина.

Ход иммунизации этих кроликов был следующий: 16/1 первая инъекция—всем трем кроликам введено по 3 к. с. раствора, или по 0,07215 чистого гемоглобина; 19/1—вторая инъекция по 5 к. с., или по 0,0455 гемоглобина; 22/1—третья инъекция по 5 к. с., или по 0,0385 гемоглобина; 25/1—четвертая инъекция по 8 к. с., или по 0,0592 гемоглобина; 28/1—пятая инъекция кроликам № 6 и № 8 по 9 к. с., или по 0,0945 гемоглобина, а кролику № 7—8,5 к. с., или 0,08925 гемоглобина. Таким образом, кролики №№ 6 и 8 за 5 инъекций получили по 0,30985 гемоглобина, а кролик № 7—0,3046 гемоглобина.

Кролики №№ 9 и 10 иммунизировались тоже одновременно, а именно: 17/III—первая инъекция по 3 к. с. раствора, или по 0,0405 гемоглобина, 20/III—вторая инъекция по 4 к. с., или по 0,034 гемоглобина, 25/III—третья инъекция по 5 к. с., или по 0,0505 гемоглобина, 30/III—четвертая инъекция по 6 к. с., или по 0,0606 гемоглобина, и 2/IV—пятая инъекция по 7 к. с., или по 0,1169 гемоглобина. Таким образом кролики №№ 9 и 10 за пять инъекций получили всего по 0,3025 гемоглобина.

Испытание сывороток всех кроликов, иммунизированных гемоглобином, было произведено через 12 дней после пятой инъекции, причем все сыворотки были испытаны на их активность не только по отношению к растворам гемоглобина лошади и растворам нормальной сыворотки лошади, но и по отношению к сыворотке и крови человека и крови коровы.

Испытание полученных сывороток и здесь имело целью не точное установление титра их, а только решение вопроса о возможности получения гемоглобинпреципитиновых сывороток и специфичности этих сывороток. Поэтому растворы испытуемых веществ были взяты в пределах от 1:10 до 1:200—для сывороток первых четырех кроликов и в пределах от 1:10 до 1:500—для двух последних кроликов.

Все сыворотки оказались не только вядоспецифичны, но и строго органоспецифичны и давали преципитацию исключительно только в растворах гемоглобина лошади, в остальных же растворах, в том числе и в растворах нормальной сыворотки лошади, преципитации не было.

Из шести кроликов, иммунизированных гемоглобином, кролики №№ 5, 7 и 8 дали преципитацию всех растворов гемоглобина, примененных для определения титра (т. е. растворов от 1:10 до 1:200), кролик № 6 дал преципитацию только при разведении основного раствора гемоглобина в пропорции 1:10, кролик № 9 дал тоже преципитацию всех применявшихся растворов гемоглобина (в данном случае от 1:10 до 1:500), и кролик № 9 преципитировал разведения основного раствора гемоглобина до 1:300.

В качестве основного раствора гемоглобина, из которого готовились все разведения, при испытании сывороток кроликов №№ 5, 6, 7 и 8 был взят такой раствор, 1 к. с. которого содержал 0,0039 гемоглобина, а при испытании сывороток кроликов №№ 9 и 10—основной раствор заключал в 1 к. с. 0,0105 гемоглобина.

Минимальные количества гемоглобина, входившего в реакцию с преципитирующими сыворотками, были определены путем вычисления. Оказалось, что таким

минимальным количеством гемоглобина для сыворотки № 5 было 0,00001755, для сыворотки № 6—0,000855, для сывороток кроликов №№ 7 и 8—0,00004275, для кролика № 9—0,0000189 и для кролика № 10—0,0000315 гемоглобина.

Несмотря то, что опыты нами пока еще не окончены, выводы из них ясны,—при иммунизации гемоглобином, перекристаллизованным даже не 1—2 раза, каковой применял Higaschi, а перекристаллизованным 5 раз и сохранявшимся после этого долгое время,—получаются специфические гемоглобинпреципитины.

Эти гемоглобинпреципитины не только видоспецифичны, но и органоспецифичны, так как они оказываются недейственными даже по отношению к сыворотке крови.

Иммунизация же по Klein'у,—экстрактом эритроцитов,—вызывает образование не только эритропреципитинов, но и серумпреципитинов. Кроме того, иммунизация по Klein'у имеет еще и чисто-технические неудобства: получать экстракт эритроцитов можно только зимой, так как летом почти невозможно предупредить быстрое загнивание крови, почему и экстракт будет негоден для применения, иммунизировать же раствором гемоглобина можно всегда, так как для приготовления такого раствора не требуется значительного времени.

Теперь остается только решить вопрос о том, почему же у нас получается такое резкое расхождение с мнением Кочкина, что гемоглобин не содержит специфических антигенов? Ответ на этот вопрос, на мой взгляд, становится ясным, если рассмотреть опыты Кочкина.

Он иммунизировал одного кролика и одну морскую свинку нефилтрованным 5% раствором гемоглобина внутривентриально и только 2 и 3 раза, что, конечно, недостаточно. Остальных двух морских свинок Кочкин иммунизировал не 5% раствором гемоглобина, как он это указывает, а, повидимому, очень слабыми растворами,—в этих двух случаях Кочкин фильтровал растворы гемоглобина через каолиновую свечу и после фильтрации не определял концентрации раствора, принимая, что она остается неизменной.

Между тем это совершенно неправильно. Насколько уменьшается концентрация раствора гемоглобина после фильтрации, видно из опыта, поставленного мною 20/III: мною был приготовлен 1% раствор гемоглобина (0,01 на 1 к. с. воды); через сутки—центрифугирование раствора в продолжение 1/2 часа, после чего 1 к. с. был взят на часовое стекло № 1 для определения остатка; оставшийся раствор профильтрован через свечу Chamberland'a F, и 1 к. с. профильтрованного раствора тоже взят на часовое стекло № 2 для высушивания; взвешивание сухих остатков показало, что на стекле № 1 имеется 0,0056 гемоглобина, а на стекле № 2—0,0004 гемоглобина. Следовательно, после центрифугирования осталось только 56%, а после фильтрации—только 4% взятого гемоглобина.

С другой стороны Higaschi указывает, что сыворотка животного, иммунизированного гемоглобином, не содержит ни агглютининов, ни лизинов, каковые искал Кочкин; но этому как будто несколько противоречат опыты Кочкина, получившего слабые гемолизины при иммунизации нефилтрованным гемоглобином.

Таким образом на основании еще пока небольшого числа поставленных нами опытов можно считать вполне выясненным, что иммунизация гемоглобином ведет к образованию органоспецифических гемоглобинпреципитинов, вопрос же о практическом применении гемоглобинпреципити-

новой сыворотки может быть разрешен только дальнейшими исследованиями этой сыворотки, каковые и будут нами продолжаться.

Если в дальнейшем нам удастся получить сыворотку высокого титра, на что я вполне надеюсь при применении нескольких повторных серий иммунизации, то этим будет разрешен вопрос нового пути судебно-медицинского исследования крови,—мы будем ставить только одну гемоглобин-преципитиновую пробу и на основании этой пробы будем делать заключение о нахождении в исследуемом материале человеческой крови: все же остальные пробы на кровь, как, напр., реакция *Teichmann'a*, получение форменных элементов и спектральное исследование крови,—станут излишними.

Такая экономия исследуемого материала чрезвычайно важна, так как, несомненно, в ближайшем будущем придется коренным образом изменить весь ход судебно-медицинского исследования крови, ибо нам уже недостаточно будет только решить вопрос о том, не принадлежит ли исследуемая кровь человеку, а необходимо будет определить и пол, а может быть—и возраст, и национальность этого человека.

При такой экспертизе главная масса исследуемого материала будет расходоваться на решение этих последних вопросов, на доказательство же того, что этот материал заключает в себе кровь, и именно кровь человека, можно будет расходовать только минимальное количество материала. Мы должны заранее подготовить новые пути для такой возможности.
