

Из наблюдений над гемоглобином голубиной крови.

А. Н. Полякова.

(С табл. рис.).

I. О содержании фосфора в гемоглобине голубиной крови.

Норре-Seyler ¹⁾ по отношению к гемоглобину из крови гуся нашел, что фосфор является постоянной его составной частью. В среднем гемоглобин гусиной крови, по этому автору, содержит 0,77% PO_5 или 0,22% Р. Объяснение этому было найдено в том, что красные кровяные шарики птиц содержат ядра. Jaquet ²⁾ в гемоглобине из куриной крови нашел 0,197% Р. Gscheiden ³⁾ подтверждает наблюдение Норре-Seyler'a, хотя и предполагает, что присутствие Р в гемоглобине из крови других животных является результатом загрязнения препарата. Только что указанное предположение было высказано и Kühne ⁴⁾, который говорит, что ему „не удавалось еще из взбитой крови получить таких чистых кристаллов, чтобы в их золе не было фосфорной кислоты“. Причина—бесцветные кровяные шарики.

Если обратимся к литературе по данному вопросу, то мы найдем здесь указания, что гемоглобин, полученный и не из птичьей крови, содержит Р. Так, Böttcher ⁵⁾ приводит анализы C. Schmidt'a, который нашел в гемоглобине из собачьей крови 0,91% PO_5 или 0,4% Р; Jaquet в собачьем же гемоглобине нашел следы Р, которые количественно не определялись: Zinowsky в гемоглобине лошади нашел в среднем 0,0134% Р. Таким образом выходит, что как будто действительно и не из птичьей крови трудно получить гемоглобин свободный от Р.

Инокс ⁶⁾ пытается объяснить содержание Р в птичьем гемоглобине соединением гемоглобина с нуклеиновой кислотой, но Abderhalden и Medigresan ⁷⁾ подтверждают давнее предположение о загрязнении препарата Р.

Так как вопрос о содержании Р в гемоглобине птичьей крови остается еще не решенным окончательно, аналитические данные, полученные Норре-Seyler'ом и Jaquet, остаются в силе, а новых исследований не опубликовано, то мы и сочли своей обязанностью, работая с гемоглобином из крови голубя, исследовать последний на содержание Р.

Для исследования мною брались навески 5 раз перекристаллизованного гемоглобина, высушенного до постоянного веса в сушильном шкафу при t^0 100—110°C и досушенного окончательно в сушильнике Abderhalden'a. Так как наша методика кристаллизации гемоглобина несколько разнится от общепринятого способа Норре-Seyler'a, то мы считаем необходимым описать здесь ее.

В виду того, что от каждого отдельного голубя можно получить лишь немного крови, дефибрирование последней было затруднительно, и мы брали оксалатную кровь. Взятая порция крови (около 500 куб. сант.) оставлялась до другого дня в узком, высоком стакане для оседания красных кровяных шариков, на другой день плазма осторожно сливалась сифоном, шарики переменялись с 2—3-кратным объемом 1% раствора NaCl для промывания их, отцентрифуговывались и еще 2 раза промывались тем же 1% раствором NaCl (конечно, новыми порциями) на центрифуге. Промытые таким образом шарики, после сливания промывной жидкости, переносились путем смывания водой в колбу (воды при этом тратилось не более полуторного объема по сравнению с шариками), обрабатывались эфиром для получения лакового раствора, последний профильтровывался через полотно, фильтрат взмешивался, охлаждался до t° не выше 0° , и в него медленно, почти по каплям, добавлялась $\frac{1}{4}$ объема (фильтрата лаковой крови) 95% этилового спирта, тоже охлажденного предварительно. Затем весь раствор ставился при t° не ниже -10° C для кристаллизации, каковая большею частью наступала часов через 10¹).

Выпавшие кристаллы отцентрифуговывались и, после сливания маточного раствора, дважды промывались на центрифуге охлажденной смесью из 1 ч. спирта и 4 ч. воды, смывались в стакан и растворялись при t° в $+40^{\circ}$ на водяной бане в возможно наименьшем количестве воды. Полученный таким образом раствор кристаллов профильтровывался через бумажный фильтр, охлаждался, как указано выше, и обрабатывался спиртом в количестве $\frac{1}{4}$ объема затраченной на растворение кристаллов воды.

Здесь уместно будет указать, что с чистотой препарата несколько уменьшалась и его растворимость. Так как общепринятая трехкратная перекристаллизация, судя по литературным данным, недостаточна для полной очистки препарата, то мы перекристаллизовывали последний 5 раз.

Проба на присутствие Р производилась после третьей и пятой кристаллизаций²⁾. Для этого сухое вещество озолалось по Нейманн'у, и осаждение фосфатов производилось $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ в присутствии HNO_3 и NH_4NO_3 .

Ни после третьей, ни после пятой кристаллизаций нам не удалось открыть даже следов фосфора. Таким образом мы считаем себя вправе утверждать, что *чистый гемоглобин голубиной крови фосфора не содержит*.

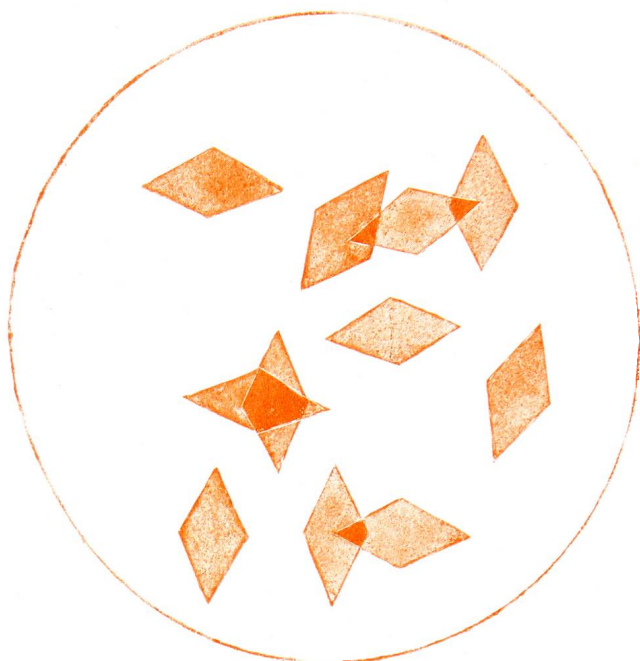
Литература: 1) Hoppe-Seyler. Med.-chem. Untersuchungen, S. 366.—2) Böttcher. Цит. по Hoppe-Seyler'y.—3) Jaquet. Zeit. f. phys. Ch., Bd. 14.—4) Gscheid. Pflüg. Arch., Bd. 16.—5) Kühne. Учебник физиологической химии. СПб, 1866, стр. 246.—6) Inoko. Zeit. f. phys. Chem., Bd. 18.—7) Abderhalden und Medigreceanu. Ibid., Bd. 59.

II. О полиморфизме кристаллов гемоглобина голубиной крови.

О форме кристаллов гемоглобина из крови голубя имеются указания в работах Воjanowsk'ого, Kunde, Funke, Preyera и др., которые считают характерной формой этих кристаллов сфеноиды. В позднейшее время Friebochs наблюдал при кристаллизации гемоглобина голубиной крови образование сначала пуговицеподобных фигур, которые потом, после

¹⁾ Вопреки заявлению Funke⁸⁾, что голубиный гемоглобин кристаллизуется трудно, мы должны сказать, что кристаллизация его наступает чрезвычайно легко.

²⁾ Во взятой небольшой пробе профильтрованного лакового раствора присутствие Р было обнаружено.



1. Ромбические кристаллы,
 t° от -5 до -10° C.



2. Призматические кристаллы и тетраэдры,
 t° от $+5$ до $+10^{\circ}$ C.

долгого стояния, превращались в палочкообразные кристаллы; кроме того он видел в своих препаратах шестигранные пластинки. Swantke дал весьма обстоятельное описание полученных им кристаллов голубиногo гeмoглобина, представлявших собою комбинации ромбических призм с тетраэдрами; при этом он отмечает, что кристаллизация велась при $t^0 + 5^0 - 10^0$ C.

Отмечая такие разноречивые данные по поводу формы кристаллов голубиногo гeмoглобина, мы должны указать, что и из крови других животных были получены различной формы кристаллы гeмoглобина. Еще Rollet наблюдал в крови морских свинок ромбические пирамиды, тетраэдры и сфеноиды, а в крови человека, кролика и собаки — ромбические призмы и комбинационные формы. В 1904 г. Uhlik опуликовал весьма интересные наблюдения над кристаллическими формами лошадиного гeмoглобина с указанием на возможность перехода одной формы в другую; он наблюдал, кроме обычной формы — больших призматических кристаллов, кристаллы в виде шестигранных таблиц. Такой переход одной формы в другую этот автор ставит в зависимость от t^0 , при которой шла кристаллизация, и редукции гeмoглобина. Таким образом в крови лошади, человека, кролика и морской свинки мы имеем дело с полиморфизмом кристаллов гeмoглобина ¹⁾.

При перекристаллизациях голубиногo гeмoглобина мы наблюдали различные формы кристаллов: шестигранные таблицы, призматические, подобные описанным Swantke, тетраэдры и ромбические кристаллы в виде табличек. Полагая что в настоящем случае имеется полиморфность кристаллов, мы предприняли ряд опытов для выяснения истинной формы кристаллов голубиногo гeмoглобина. Для опыта был взят чистый, 5 раз перекристаллизованный препарат последнего.

Нами были приготовлены из него 3 порции возможно насыщенного раствора голубиногo гeмoглобина, из коих две для кристаллизации обрабатывались, как обычно, спиртом и ставились одна при $t^0 - 5^0 - 8^0$, другая при $t^0 + 5^0$; третья порция, без спирта, ставилась для кристаллизации при $t^0 0^0$. Через 10—12 часов во всех порциях можно было видеть кристаллы гeмoглобина.

При этом в первой порции мы имели кристаллы в виде ромбических таблиц довольно значительной величины, во второй — призматические кристаллы с значительной примесью мелких тетраэдров. Перекристаллизовав, после центрифугирования, обе порции еще раз в тех же условиях t^0 , мы имели тот же результат. Дробным центрифугированием нам удалось отделить значительную часть тетраэдров от призматических кристаллов, которые при перекристаллизации при той же t^0 дали опять-таки призматические кристаллы и тетраэдры.

Далее нами был поставлен еще такой опыт: растворы кристаллов первой и второй порции мы разделили на две части и одни части поставили кристаллизоваться (обработав спиртом) при $t^0 - 5^0 - 8^0$, другие же — при $t^0 + 5^0$. Результат: при -5^0 образовались ромбические кристаллы, при $+5^0$ же — призматические и тетраэдры.

Кроме влияния на кристаллизацию температуры, нами было еще прослежено влияние на нее количества спирта. С этой целью мы произво-

¹⁾ К сожалению, все перечисленные авторы (кроме Uhlik'a) вели свои наблюдения над Plattenkrystall'ами, полученными непосредственно из капли крови.

дили кристаллизацию при одинаковых температурах, но для одних опытов брали 25% (по объему) спирта, для других—15%, 20%, 30% и 35%. Оказалось, что при более высоких концентрациях (35%) и при t^0 выше 0 произошло частичное осаждение гемоглобина в виде аморфного осадка, терявшего способность растворяться (свертывание).

Здесь надо указать, что прибавка спирта в 15% уже вызывала кристаллизацию, хотя с трудом (кристаллы выпадали после долгого стояния). При этом на форму кристаллов концентрация влияния не оказывала, но ускоряла процесс выпадения кристаллов.

Кристаллы, полученные нами из третьей порции, оказались кубами; к сожалению, они были крайне нестойки, и наблюдать их возможно было лишь охладивши предметное и покрывное стекла и самый микроскоп,— иначе они быстро расплывались.

Таким образом нам удалось получить при кристаллизации голубиного гемоглобина три вида стойких и один вид нестойких кристаллов, причем два из этих видов оказались соответствующими описаниям Swantke, Bojanowskiego, Kunde, Funke. Форм, описанных Friebochs'ом, нам видеть ни разу не удалось.

Стараясь уяснить причину этого полиморфизма, мы попытались определить в полученных нами ромбических и призматических кристаллах кристаллизационную воду и N. К сожалению, при определении кристаллизационной воды мы натолкнулись на полную невозможность отжать кристаллы от воды, так как при отжимании получилась липкая масса, прожать которую было невозможно. Все же приводим здесь данные наших анализов: 1) ромбические кристаллы—вещества 2,4842, воды 1,1717 (47,16%); 2) призматические кристаллы—вещества 1,2312, воды—0,5596 (45,4%).

N определялся нами по Kjeldal'ю, причем гемоглобин высушивался при t^0 100—110° в сушильном шкафу и досушивался до постоянного веса в аппарате Abderhalden'a. Результаты:

- 1) 0,2728 ромбических кристаллов дали 0,045376 N (16,7%);
- 2) 0,2026 призматических кристаллов дали 0,03258 N (16,8%).

Прямого ответа на интересовавший нас вопрос данные анализа, т. о., не дали, но все же нам думается, что причиной полиморфизма является выпадение кристаллов с разным количеством кристаллизационной воды подобно тому, как, напр., бура в зависимости от t^0 кристаллизации дает кристаллы с разным содержанием кристаллизационной воды.

Литература: 1) Bojanowski. Zeit. f. wiss. Zool., Bd. XII.—
 2) Kunde. Zeit. f. rat. Med., Bd. XXV.—3) Funke. Ibid., Bd. II.—
 4) Preyer. Die Blutkrystalle. Jena. 1871.—5) Swantke. Zeit. f. phys. Chemie. Bd. 29.—6) Rollet. Sitz. d. Kaiserl. Akad. d. Wissensch. Wien. Bd. 46.—7) Uhlik. Pflüg. Arch., Bd. 104.—8) Friebochs. Pflüg. Arch., Bd. 98.
