

Ш-23 5257

3771  
Ш-23

Изъ Гигіеническаго Института Императорскаго  
Юрьевскаго Университета проф. Е. А. Шепилевскаго

7- НОЯ 2012

О свойствахъ нѣкоторыхъ преципитиновъ,  
дѣйствующихъ на денатурированныя бѣлки.

ДИССЕРТАЦІЯ

НА СТЕПЕНЬ

ДОКТОРА МЕДИЦИНЫ РЕВЕРСНО

К. Н. Шапшева.

1936



Инв. НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА  
№ 1-го Харьк.-Мед. Института

Юрьевъ

Типографія К. Маттисена.

1913.

Перечень  
1966 г.

4422  
1911

64022

НБХ

1950

Перепечат-60

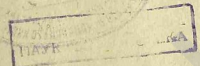
7 - МАЯ 1950

1950 г. 10 мая

Докторскую диссертацию доктора К. Н. Шапшева под заглавием „О свойствах некоторых преципитинов, действующих на денатурированные белки“ печатать разрешается с тем, чтобы по отпечатанн было представлено 400 экземпляров, ее в канцелярию Медицинского Факультета ИМПЕРАТОРСКОГО Юрьевского Университета.

Юрьевъ, 15-го октября 1913.  
№ 1971.

Декаль В. Афанасьевъ.



1950 г. 10 мая

### Оглавление.

#### Литературный обзор.

Стр.

Введение . . . . . 1

#### Глава I.

- Изменение у белков способности преципитироваться при нагревании их . . . . . 16
- А. Нагревание в сухом состоянии . . . . . 17
- Б. Нагревание в растворе . . . . . 19

#### Способы исследования нагретых мясных продуктов.

#### Глава II.

Изменение техники исследования . . . . . 27

#### Глава III.

Исследование при помощи преципитинов, полученных от нагретых белков. (Нitze-преципитины) . . . . . 32

#### Глава IV.

Исследование при помощи преципитинов, полученных от нагретых белков и щелочью белков (Nitze-Alkali-преципитины) . . . . . 53

#### Собственные опыты.

#### Глава V.

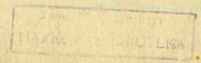
Общая методика . . . . . 65

#### Глава VI.

- Преципитины, полученные от введения нативных сывороток . . . . . 75
- А. Действие на нативные белки . . . . . 77
- Б. Действие на белки, обработанные по Schmidt'y . . . . . 83
- В. Действие на 100-белки . . . . . 85
- Г. Определение термостабильности преципитируемых веществ белка . . . . . 86
- Д. Стойкость преципитируемых веществ белка к щелочи . . . . . 88
- Е. Действие на экстракты из органов . . . . . 90
- Ж. Действие элективного насыщения на сыворотки . . . . . 98

#### Глава VII.

Преципитины, полученные от введения сыворотки, денатурированной по Schmidt'y . . . . . 103



	Стр.
А. Дѣйствіе на бѣзки, денатурированные по Schmidt'y	105
В. Дѣйствіе на нативные бѣзки	112
В. Дѣйствіе на бѣзки, обработанные щелочью при комнатной температурѣ	116
Г. Дѣйствіе на 70°-бѣзокъ	119
Д. Дѣйствіе на 100°-бѣзки	122
Е. Дѣйствіе на высушенный при 100° бѣзокъ	126
Ж. Дѣйствіе на экстракты изъ органовъ	128
И. Дѣйствіе элективного насыщения на сыворотки	134

## Глава VIII.

Преципитины, полученные отъ введенія нативныхъ мышечныхъ экстрактовъ	
А. Дѣйствіе на нативные бѣзки	139
Б. Дѣйствіе на бѣзки, денатурированные по Schmidt'y	149
В. Дѣйствіе на 100°-бѣзки	154
Г. Дѣйствіе на бѣзокъ, денатурированный щелочью при комнатной температурѣ и 70°	154
Д. Дѣйствіе на экстракты изъ органовъ	155
Е. Дѣйствіе элективного насыщения на сыворотки	156
Ж. Дѣйствіе элективного насыщения на сыворотки	158

## Глава IX.

Преципитины, полученные отъ введенія мышечныхъ экстрактовъ, денатурированныхъ по Schmidt'y	
А. Дѣйствіе на бѣзки, денатурированные по Schmidt'y	163
Б. Дѣйствіе на нативные бѣзки	165
В. Дѣйствіе на 100°-бѣзки	169
Г. Дѣйствіе на бѣзки, денатурированные щелочью при комнатной температурѣ	176
Д. Дѣйствіе на высушенный при 100° бѣзокъ	177
Е. Дѣйствіе на экстракты изъ органовъ	179

## Глава X.

Преципитины, полученные отъ введенія мясного сока и щелочныхъ мышечныхъ экстрактовъ, денатурированныхъ по Schmidt'y	
А. Дѣйствіе на бѣзки, денатурированные по Schmidt'y	183
Б. Дѣйствіе на нативные бѣзки	186
В. Дѣйствіе на 100°-бѣзки	190
В. Дѣйствіе на бѣзки, денатурированные щелочью при комнатной температурѣ	192
Г. Дѣйствіе на бѣзки, денатурированные щелочью при комнатной температурѣ	199
Д. Дѣйствіе на высушенный при 100° бѣзокъ	200
Е. Дѣйствіе на экстракты изъ органовъ	201

## Добавленіе.

Опредѣленіе содержанія бѣлковъ въ преципитируемыхъ растворяхъ химическимъ путемъ	205
Обзоръ результатовъ и оцѣнка ихъ	213
Выводы	222

## Введеніе.

Реакція преципитации, открытая Kraus'омъ въ 1897 году, кромѣ своего чисто теоретическаго интереса, какъ одна изъ реакцій иммунитета, имѣетъ и большое практическое значеніе. Примѣненіе этой биологической реакціи на практикѣ ограничивается главнымъ образомъ слѣдующими тремя областями: 1) діагностированіе болѣзней и бактерій, 2) дифференцированіе крови съ судебно-медицинскими цѣлями и 3) дифференцированіе мяса различныхъ видовъ животныхъ при контролѣ мясныхъ продуктовъ.

Результаты примѣненія преципитинной реакціи въ діагностикѣ инфекціонныхъ заболѣваній оказались далеко не во всѣхъ случаяхъ вполне удачными. Здѣсь надо упомянуть о брюшномъ тифѣ (Fornet, Meyer и др.) о сифилисѣ (Fornet и Шерешевскій, Eisengiesser and Rosenfeld), о туберкулезѣ (Bonome, Stoerk и др.) и объ эпидемическомъ цереброспинальномъ менингитѣ (Vincent и Bellot, Lemoine и др.). Большое значеніе имѣетъ эта реакція при діагностикѣ ветеринарныхъ заболѣваній; при сибѣ (Дедюлинъ, Коневъ, Владимировъ, Miessner и др.), сибирской язвѣ (Ascoli, Valenti), рожѣ свиней (Isabolinsky und Patzewitsch и др.). Для послѣднихъ двухъ заболѣваній Ascoli предложилъ въ послѣднее время т. наз. „термопреципитинную“ реакцію.

Несравненно большее значеніе приобрѣла преципитинная реакція при дифференцированіи крови; основанная на

работах Чистовича и Bordet и предложенная Uhlenhuth'ом въ 1901 году для судебно-медицинскихъ цѣлей, преципитинная реакція благодаря трудамъ Uhlenhuth'a, Jung'a, Beumer'a, Таранухина, Григорьева и мн. др. занимаетъ въ настоящее время прочное положеніе среди другихъ судебно-медицинскихъ методовъ постановки дифференціального діагноза крови.

Начало примѣненія биологическаго метода преципитации при контролѣ надъ фальсификаціями мясныхъ продуктовъ съ санитарной цѣлью надо считать съ 1901 года, когда Uhlenhuth въ № 45 Deutsche Medicin. Wochenschrift предложилъ преципитинную реакцію для опредѣленія происхожденія мышечныхъ бѣлковъ отъ того или другого вида животныхъ. Вслѣдъ за статьёй Uhlenhuth'a появился длинный рядъ работъ по этому вопросу (Jess, Piorkowski, Riegler, Nötel, Ruppin, Gröning и др.), которая вмѣстѣ съ появившимися за послѣднее время трудами Borchmann'a, Fiehe, Behre, Weidanz'a, Uhlenhuth'a, Fornet'a, Müller'a, Куррота и многихъ другихъ, выяснили пригодность этого метода для изслѣдованія мясныхъ продуктовъ, детально разработали технику примѣненія этого метода и выяснили степень вліянія тѣхъ или другихъ условий на теченіе и результатъ биологическаго изслѣдованія.

Вопросъ о пригодности этого биологическаго способа для опредѣленія видовъ мяса въ настоящее время настолько можетъ считаться рѣшеннымъ въ положительномъ смыслѣ, что имъ пользуются за границей городскія лабораторіи для открытія примѣсь малоцѣнныхъ видовъ мяса при санитарномъ контролѣ его, какъ это видно изъ отчетовъ нѣкоторыхъ городовъ Германіи, напр.: Stuttgart'a, Magdeburg'a и др., а въ Германскій законъ относительно осмотра убойнаго скота и мяса 3-го Іюня 1900 г. внесены были правила биологическаго изслѣдованія мяса, опубликованныя 22-го

февраля 1908 г. и вступившія въ силу 1-го апрѣля того же года (Centralbl. für das Deutsche Reich 1908 г. pag. 26), а затѣмъ такія же постановленія были произведены въ Пруссіи (Ministerialverfügung betr. Schlachtvieh- und Fleischschau vom 13. Okt. 1908. Ministerialbl. des Königl. Preuss. Verwaltung für Landwirtschaft usw. 1908) и въ Вürttemberg'ѣ 17-го декабря 1908 года (Amtsblatt des Königl. Württemb. Minist. des Inneren, pag. 377). Къ сожалѣнію, не такъ обстоитъ дѣло въ Россіи, гдѣ ни одна городская лабораторія такихъ крупныхъ центровъ, какъ Казань, Кіевъ, Харьковъ, Саратовъ, Одесса, Варшава и Иркутскъ, не пользуется преципитиннымъ методомъ для контроля надъ фальсификаціями мясныхъ продуктовъ<sup>1)</sup>.

Кромѣ мяса и мясныхъ продуктовъ съ помощью преципитации изслѣдовался съ различнымъ успѣхомъ цѣлый рядъ другихъ пищевыхъ продуктовъ и искусственныхъ питательныхъ препаратовъ, какъ животнаго, такъ и растительнаго происхожденія. Такъ Uhlenhuth<sup>2)</sup>, Schütze<sup>3)</sup>, Moro<sup>4)</sup>, Gengou<sup>5)</sup> изслѣдовали различныя сорта молока съ помощью реакціи преципитации и имъ удавалось дифференцировать ихъ, если только молоко было невареное и не отъ двухъ родственныхъ видовъ животныхъ, какъ напр.: овечье и козье молоко.

Положительный результатъ дали изслѣдованія веществъ, содержащихъ въ большомъ количествѣ жиръ, а именно:

- 1) Въ С.-Петербургѣ примѣняется изрядка; относительно Москвы свѣдѣній не имѣется.
- 2) Uhlenhuth „Zur Lehre von der Unterscheidung verschiedener Eiweissarten mit Hilfe spezifischer Sera“ — Festschrift für Robert Koch.
- 3) Schütze „Ueber ein biologisches Verfahren zur Differenzierung d. Eiweissstoffe verschiedener Milcharten“ — Zeitschr. für Hygiene 1901, Bd. 3.
- 4) Moro „Biolog. Beziehungen zwischen Milch und Serum“ — Wiener klin. Wochenschr. 1901, № 44.
- 5) Gengou „Sur les substances sensibilisatrices des sérums actifs contre les substances albuminoïdes“ — Annal. de l'Inst. Pasteur 1902, Bd. 16.

костного мозга (Uhlenhuth u. Weidanz<sup>1)</sup>, Beumer<sup>2)</sup> и Schütze<sup>3)</sup>), масла и маргарина (Schütze<sup>4)</sup> и Uhlenhuth) и жира (Fiehe<sup>5)</sup> и Hüne<sup>6)</sup>), при чем оказалось, что в виду малого содержания бѣлковъ въ этихъ веществахъ надо брать ихъ для изслѣдованія въ большемъ количествѣ, а изъ покусныхъ сортовъ сала, какъ показали Hüne, не все могутъ быть изслѣдованы биологическимъ способомъ: такъ бѣлые сорта сала, какъ вытапливаемые при незначительной температурѣ, годятся для биологическаго открытія бѣлка, и, наоборотъ, желтые сорта вытапливаются при такой высокой температурѣ, что все бѣлки разрушаются.

При помощи реакціи преципитации удалось Uhlenhuth<sup>1)</sup> доказать присутствіе коровьяго бѣлка въ Гематогенѣ Гоммея и гемоглобинѣ, а въ мясномъ сокѣ „Puro“ Horiuchi und v. Gruber<sup>7)</sup> было открыто куриный бѣлокъ и не обнаруженъ коровій, что вполне согласуется съ данными и Schmidt<sup>8)</sup>. Затѣмъ Uhlenhuth<sup>9)</sup> изслѣдовали на антисыворотку куринаго бѣлка различные питательные

1) Uhlenhuth und Weidanz „Praktische Anleitung zur Ausführung des biologischen Eiweissdifferenzierungsverfahrens“ 1909, Jena.

2) Beumer „Die Untersuchung der Menschen- und Tierknochen auf biolog. Wege“. — Zeitschr. für Medizinabente 1902, H. 23.

3) Schütze „Ueber die Unterscheidung von Menschen- und Tierknochen“. — Deutsche med. Wochenschr. 1903, № 4.

4) Schütze „Ueber einige praktische Anwendungen der Präzipitation in der Nahrungsmittelchemie“. — Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankh. Bd. LVII.

5) Fiehe „Ueber eine erweiterte Anwendung der Präzipitatreaktion“ — Zeitschr. für die Untersuchung der Nahrungs- u. Genussmittel 1908, Bd. 16.

6) Hüne „Die Anwendung des biologischen Verfahrens zum Eiweissnachweis im Fettgewebe und ausgearbeitetem Fett (Schmalz)“. — Arbeiten aus dem Kaiserlich. Gesundheitsamte 1908, Bd. 28.

7) Gruber und Horiuchi Münch. med. Wochenschr. 1908, № 17. Цитирую по „Praktische Anleitung“ Uhlenhutha и Weidanza.

8) Schmidt „Woraus besteht Fleischsaft „Puro“. — Medizinische Klinik 1908, № 21.

9) Uhlenhuth цитирую по „Praktische Anleitung“ Uhlenhutha и Weidanza.

препараты, имѣющіеся въ продажѣ, какъ Alkalialbuminat Deykesa, петухъ Rieglera, нутроза, сомотоза и др.

Изъ растительныхъ веществъ изслѣдовались альбумозы изъ пшеничной муки, ячменя, ржи, бобовъ, гороха, чечевицы и т. д., причемъ Kowarski<sup>1)</sup> и Bertarelli<sup>2)</sup>, получивъ выпрыскиваемъ тѣхъ или другихъ альбумозъ антисыворотку къ этимъ альбумозамъ, не могли добиться вполне специфичной антисыворотки, а потому приходять въ выводу, что растительные бѣлки не такъ отличаются другъ отъ друга, какъ бѣлки животныя; однако съ этимъ не вполне соглашаются другіе изслѣдователи (Gasis<sup>3)</sup> и др.

Наконецъ, преципитивной реакціей пользовались для изслѣдованія и другихъ веществъ: меда (v. Riegler<sup>4)</sup> различныхъ сортовъ дрожжей (Schütze) миндаля, маковыхъ, конопляныхъ и кокосовыхъ сѣмянъ (Uhlenhuth und Jung<sup>5)</sup>, Relander<sup>6)</sup>, Uhlenhuth und Haendel), грибовъ (Magnus und Friedenthal<sup>7)</sup>). Для большинства этихъ изслѣдованій биологическій способъ оказался мало пригоднымъ.

Относительно реакціи преципитации при изслѣдованіи вообще пищевыхъ продуктовъ въ настоящее

1) Kowarski „Ueber den Nachweis von pflanzl. Eiweiss auf biol. Wege“. — Deutsche med. Wochenschr. 1901, № 27.

2) Bertarelli „Die Verwendung der biol. Methode zur Auffindung und Diagnose der Hülsen-Früchtmehle mit besonderer Berücksichtigung der Wicke“. — Zentralbl. für Bakteriol. 2. Abt. 1903, Bd. 11, H. 38.

3) Gasis „Ueber die Unterscheidung verschiedener Pflanzeiweissarten mit Hilfe spezifischer Sera“. — Berlin. klin. Wochenschr. 1908, № 7.

4) v. Riegler „Die Serodiagnose in der Untersuchung der Nahrungsmittel“. — Oesterreich. Chemiker Ztg. 1902, № 5.

5) Uhlenhuth und Jung „Ueber ein Ausflockungsphänomen in künstlichem Serum normaler und vorbehandelter Tiere“. — Vortrag im Medizinischen Verein für Greifswald von 3. Decemb. 1904. — Ref. Deutsche med. Woch. 1905, № 14.

6) Relander „Kann man mit der Präzipitationreaktion Samen von verschiedenen Pflanzenarten und Abarten voneinander unterscheiden“ (Vorläufige Mitteilung). — Zentralbl. für Bakteriol. (II. Teil) 1908, Bd. 20.

7) Magnus und Friedenthal „Ein experimenteller Nachweis natürlicher Verwandtschaft bei Pflanzen“. — Berichte der Deutsch. Bot. Gesellsch. 1906, Bd. 24, H. 10.

время говорить еще рано, так как большинство этих исследований, в особенности продуктов растительного происхождения, дают еще очень неясные и неопределенные результаты, хотя и по достигнутым до сих пор данным можно предполагать, что этот биологический метод исследования будет играть большое значение при контроле и оценке пищевых продуктов, когда больше будут разработаны теоретические основы этой реакции, а вместе с тем выяснится большее применение ее на практике.

Иное положение занимает в данный момент эта реакция в методах исследования мяса и мясных продуктов. В пригодности ее и даже в преимуществе перед другими методами (преломление экстрагированного жира, определение iodного числа жира, определение содержания гликогена) для открытия примеси мяса других малоценных видов животных сходится почти все работавшие в этой области авторы; так напр. Baier und Reuchlin<sup>1)</sup> в концѣ своей работы „Über den Nachweis von Pferdefleisch mittels des biologischen-Verfahrens“ говорят, что видя в сывороточном методѣ давно искомое средство для борьбы со столь многочисленными фальсификациями колбас, и что этот способ должен быть внесен в число других методов по технике исследования пищевых продуктов. Такую же оценку биологическому методу дают в своей работѣ Uhlenhuth, Weidanz und Wedemann<sup>2)</sup>: „Dass die biologische Methode in der angegebenen Weise ausgeführt, sichere und einwandfreie Resultate liefert, steht ausser Zweifel“.

Таким образом мы видим, что биологический метод для исследования фальсификаций мяса и мясных продуктов вполне применим, при чем подвергаются исследо-

1) Baier und Reuchlin — Zeitschr. für Untersuchung der Nahrung- und Genussmittel 1908, Bd. 15, H. 9.

2) Uhlenhuth, Weidanz und Wedemann „Technik und Methodik des biologischen Verfahrens zum Nachweis von Pferdefleisch“, — Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte 1908, Bd. 28.

ванию редко цѣлая туша и куски мяса, а гораздо чаще такие мясные продукты, гдѣ возможно смѣшать различные сорта мяса, а именно: рубленное мясо (Hackfleisch) или колбасы. Примѣсь же чаще всего бывает лошадиное мясо и значительно рѣже мясо кошки, собаки или рыбы, а также, в зависимости от мѣстных условий, мясо оленя, верблюда, кита и т. д.

При болѣе близком знакомствѣ съ литературой о применении биологического метода для исследования колбас видно, что и при контроле над мясными продуктами реакция преципитации не всегда дает одинаково цѣнные результаты, а в иных случаях оказывается совершенно неприемлимой для практики. Это касается главным образом исследования мясных продуктов, подвергнутых тѣм или другим воздействиям, как-то: солению, копчению, высушиванию, замораживанию или гниению и, главным образом, варению.

Копченые, соленые и зачищенные мясные продукты при несоблюдшихъ измѣняющхъ техники могут еще исследоваться этимъ биологическимъ методомъ; что же касается вареныхъ, то все авторы удостоверяютъ, что нагревание препятствуетъ преципитинной реакціи, и расходятся только въ оценкѣ степени этого мѣшающаго влияния.

Fornet und Müller<sup>1)</sup> такимъ образомъ высказываются въ своей работѣ „Praktische und theoretische Präzipitin-untersuchungen“, что если материалъ, подлежащій исследованию, подвергается большому или меньшему нагреванию, то открытие бѣлковъ биологическимъ способомъ или затрудняется или совсемъ становится невозможнымъ, и тутъ же авторы приводятъ собственные исследования колбасъ изъ лошадиного мяса, при чемъ у нихъ оказалось, что все сорта колбасъ (Dauer- und Brüh-Würste), за исключеніемъ такъ

1) Fornet und Müller, — Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankheiten, 1910. Bd. 66.

называемой „Presskopf“, который при приготовлении слишком сильно кипятят, — дали при биологическом исследовании указания на лошадиное мясо.

Fische<sup>1)</sup> говорит, что „преципитная реакция дает возможность открывать даже незначительные количества лошадиного мяса с полным ручательством“ (mit völliger Sicherheit), — относительно же исследования вареных колбас высказывается, что в виду извлечения незначительного количества белка из вареных колбас „реакция получается сомнительная“.

Действительно из приводимой здесь таблицы, которая представляет из себя извлечение случаев с вареным лошадиным мясом (№№ 6 и 7) из 1-ой таблицы и (№№ 5 и 15) из 2-ой таблицы помещенных в работу Fische

Таблица № 1.

№№ таблиц. №№ случаев.	Обозначение колбасы или мяса	Реакция постл:			Заключение	Действительное содержание
		1—5 м.	30 м.	60 м.		
I 6	Mutzig	—	—	?	Лошад. мяса нет	Чистая вареная лошад. колбаса
7	Belchen	—	—	—	Лошад. мяса нет	50 % варен. лошад. мяса 50 % мяса рогатого скота
II 5	Cervelatwurst	—	—	Плюею кольцо	Подозрение на лошад. мясо	Вареная лошад. колбаса
15	Wurst aus Strassburg	—	—	Небольшое кольцо	Подозрение на лошад. мясо	Вареная лошад. колбаса

1) Fische „Ueber den Nachweis von Pferdefleisch in Fleisch- und Wurstwaren mittels der Präcipitat-Reaktion“ — Zeitsch. für Untersuchung der Nahrungs- und Genussmittel 1907. Bd. 13, N. 12.

видно, насколько мало достоверные результаты дает реакция преципитации при исследовании вареных продуктов.

Baier und Reuchlin также категорически высказываются относительно применения биологического способа для исследования неизмененных мясных продуктов: „Wir können vorausschicken . . . dass wir die brennende Frage des Pferdefleischnachweises mit Hilfe des biologischen Verfahrens für gelöst halten, soweit nicht Fleischwaren in Betracht kommen, die eine erhebliche Erhitzung bezw. Abkochung erlitten haben“.

Они также считают, что копчение, сушение, обработка консервирующими веществами, а также такие естественные изменения, как гниение и плесневение мясных продуктов не влияют на исследование по биологическому способу, и, наоборот, варение или жаренье сильно затрудняют („vollständig verhindert“) наступление сывороточной реакции.

Uhlenhuth, Weidanz und Wedemann считают, что применение биологического метода при исследовании вареного мяса не возможно; но если температура внутри куска мяса или колбасы не переходит 60°—70° C°, то реакция преципитации возможна, т. к. при этой температуре не все белки разрушаются и оставшиеся могут быть экстрагированы.

Наконец, и в Ministerialverfügung betr. Schlachtvieh- und Fleischbeschau von 13 Okt. 1908 (Preussen) так говорится о неприменимости этой реакции: „Nicht anwendbar ist es dann, wenn das Fleischeiweiss in unlöslichen Zustand übergeführt ist, wie es z. B. durch Kochen und scharfes Räuchern geschieht“.

Ф. А. Курроту<sup>1)</sup> также не удалось получить реакции с преципитирующей сывоткой в одном случае, где объектом была „чайная колбаса“ (№ 18 табл. VI).

Понятно, что раз все авторы сходятся, что нагревание

1) Ф. А. Куррот „Исследование мясных продуктов на фальсификацию их лошадиным мясом“. Дисс. Юрьев, 1912 г.

мясных продуктов является большим препятствием для применения биологического метода на практикѣ; но въ то же время, какъ видно это изъ мнѣнія отдѣльных авторовъ, препятствие это зависитъ всецѣло отъ температуры и продолжительности нагревания продуктовъ, — является необходимымъ выяснитъ, до какой температуры нагреваются колбасы и другіе мясные продукты, такъ какъ отсюда можно будетъ болѣе или менѣе близко подойти къ вопросу, применяли ли реакція преципитации для изслѣдованія вареныхъ колбасъ.

Дѣйствительно, большинство работавшихъ надъ применением преципитивной реакціи для контроля пищевыхъ продуктовъ касалось этого вопроса (Fornet, Müller, Schmidt, Behre, Uhlenhuth, Weidanz, Wedemann, Borchmann, Baier, Reuchlin, Fiehe и др.), рассматривая его съ двухъ главныхъ образомъ сторонъ: во-первыхъ, какова температура внутри колбасъ при различныхъ условияхъ нагреванія и, во-вторыхъ, даетъ ли реакція преципитации положительный результатъ при изслѣдованіи колбасъ, подвергнутыхъ тому или другому нагреванію при определенной продолжительности. Для рѣшенія вопроса, до какой температуры доходитъ нагреваніе внутри различныхъ сортовъ колбасъ при той обработкѣ, которой подвергаются обыкновенно эти сорта, Fornet und Müller даютъ въ своей работѣ такую таблицу.

Таблица № 2.

Сорта колбасъ.	Переме- ры и толщина кол- басы	Продолжит. обжариванія внутри кол- басъ	Т° кипятка	Максимумъ температуры внутри кол- басы	Продолж. экстрактр. блѣзковъ.	Биологич. испытыва- ніе	Ясная реакція послѣ:
Knackwurst . . .	2,0 см.	8 мин.	82,5	80,2	1 часъ	Полож.	1 часа
Fleischwurst . . .	5,4 "	45 "	82,5	74,8	1 "	"	30 мин.
Lyonerwurst . . .	7,8 "	1 час.	82,5	75,0	1 "	"	30 мин.

Для измѣренія температуры внутри колбасъ они помѣщали въ серединѣ ихъ максимальный термометръ; болѣе продолжительное время колбасы нагреванію не подвергались, такъ какъ иначе онѣ становятся вязкими и невкусными. Изъ этой таблицы видно, что при температурѣ воды равной 82,5°C. максимальная температура внутри колбасы (Knackwurst) 80,2°C. черезъ 8 минутъ отъ начала обжариванія, при чемъ поперечникъ этой колбасы = 2 см. Если же взять колбасу болѣе толстую, съ поперечникомъ въ 7,8 см. (Lyonerwurst), то максимальная температура даже черезъ 1 часъ будетъ только 75,0°C при одинаково нагрѣтой водѣ. Разъ наибольшая температура при этихъ условияхъ равняется 80,2°C, то можно ожидать, что и реакція преципитации дастъ благоприятные результаты, что и подтвердилось. Такъ какъ колбасы для этихъ опытовъ брались съ содержаніемъ  $\frac{1}{8}$ — $\frac{1}{4}$  лошадиного мяса, то реакція преципитации съ лошадиной антисывороткой получалась положительной всякій разъ; особенно же въ данныхъ опытахъ было то, что наступленіе ясной реакціи замедлялось (30—60 минутъ) по сравненію съ преципитацией неизмѣненныхъ блѣзковъ.

Очевидно, столь медленное повышеніе температуры внутри колбасъ объясняется плохой теплопроводностью колбасной массы, что и подтвердилъ съ ясностью проф. Schmidt<sup>1)</sup> въ работѣ „Studien über Präzipitinreaktion und erhitzte Eiweisstoffe“, при чемъ онъ бралъ свиную колбасу, открытую съ обѣихъ концовъ, въ 15 см. длиною и въ 4 см. въ поперечникѣ и, помѣстивъ внутри ея термометръ, погружалъ колбасу въ кипящую воду такъ, что вся она была покрыта водой. Повышеніе температуры внутри колбасы черезъ известные промежутки времени Schmidt представилъ въ видѣ слѣдующей таблицы (стр. 311).

1) Schmidt — Biochemische Zeitschr 1908, Bd. 14, H. 3 u. 4.

Таблица № 3.

Начальная t' — 22°	Послѣ 8 мин. — 58°	Послѣ 18 мин. — 92°
Послѣ 3 мин. — 28°	„ 10 „ — 68°	„ 20 „ — 95°
„ 4 „ — 34°	„ 12 „ — 77°	„ 25 „ — 99-100°
„ 6 „ — 46°	„ 15 „ — 86°	

Wir sehen hier, говорит проф. Schmidt, dass die Temperatur infolge des schlechten Wärmeleitungsvermögens des Fleisches nur langsam steigt. . .“

Къ сожалѣнію, проф. Schmidt не производитъ параллельно повышенію температуры внутри колбасъ биологической реакціи, а поэтому не извѣстно, при какой продолжительности нагрѣванія колбасы въ кипящей водѣ примѣненіе реакціи преципитации становится невозможнымъ. Другіе изслѣдователи также не даютъ такихъ систематическихъ опытовъ съ колбасами, изъ которыхъ можно было бы болѣе или менѣе точно установить границу примѣнимости преципитивной реакціи. Хотя почти всѣ изслѣдователи, одни болѣе опредѣленно, другіе менѣе, указываютъ ту температуру, выше которой биологическое открытіе бѣлковъ въ мясныхъ продуктахъ становится невозможнымъ.

Такъ Fiehe, Baier und Reuchlin и др. очень глухо говорятъ о вліяніи температуры на теченіе преципитации и ограничиваются только констатированіемъ самаго факта, безъ указанія болѣе точныхъ границъ.

Болѣе опредѣленно высказываются Fognet und Müller, которые ставили опыты преципитации съ лошадинымъ мясомъ, которое въ видѣ 6-ти угольныхъ кусковъ, вѣсомъ въ 25 гр., нагрѣвалось въ кипящей водѣ, а также съ содержимымъ лошадиныхъ колбасъ, и получали преципитацию только въ томъ случаѣ, если нагрѣваніе длилось не болѣе 10 минутъ. Это они объясняютъ тѣмъ, что вслѣдствіе плохой теплопроводности мясныхъ продуктовъ температура внутри

большихъ кусковъ не достигаетъ температуры кипѣнія, и такимъ образомъ сохраняется возможность биологического открытія бѣлковъ.

Въ той же работѣ авторы ставятъ преципитацию съ бѣлками, нагрѣтыми при другихъ условіяхъ, а именно: они подвергали колбасы, лишеныя лошадиного мяса, но заключенныя въ лошадиныя кишки, нагрѣванію въ 80°-ной водѣ въ теченіи 1 часа и получали съ лошадиной антисывороткой положительный результатъ. Такимъ образомъ при нагрѣваніи при 100° въ теченіи 10 минутъ и при 80° въ теченіи 1 часа реакція еще можетъ получаться положительной.

Behre<sup>1)</sup> говоритъ только, что нагрѣтая въ теченіи 15 минутъ при 95° С. лошадиная колбаса давала еще ясную реакцію; отвѣтить же на вопросъ, можно-ли открыть лошадиное мясо въ сильно нагрѣтыхъ или сильно копченыхъ колбасахъ, — авторъ на основаніи своихъ опытовъ не можетъ. Weidanz und Borchmann<sup>2)</sup> изслѣдовали, желая выяснитъ, какая изъ реакцій: преципитация или отклоненіе комплемента, имѣеть преимущество при изслѣдованіи мясныхъ продуктовъ, — слѣдующіе объекты: 1) сырую колбасу, 2) сильно копченую, въ теченіи 1—2 час. при 70—90° надъ открытымъ огнемъ (heiss geräuchert . . . 1—2 Stunden bei etwa 70—90° C. über offenem Feuer“), 3) сильно копченую и 6 минутъ, какъ это обыкновенно дѣлается, вареную въ кипящей водѣ, и 4) также копченую и 15 мин. (болѣе обыкновеннаго) вареную въ кипящей водѣ. Результатъ изслѣдованія этого матерьяла реакціей преципитации

1) Behre „Der Nachweis von Pferdefleisch in der Wurst“. — Zeitschr. für Untersuchung der Nahrungs- und Genussmittel 1908, Bd. 15, H. 9.

2) Weidanz und Borchmann „Vergleichende Untersuchungen über die praktische Verwertbarkeit der Präzipitationreaktion und der Komplementbindungsmethode zum Nachweis von Pferdefleisch“. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 1908, Bd. 28, H. 3.

изложены в таблицѣ, при чемъ крестики указываютъ на силу реакціи.

Таблица № 4.

Исследуемый материал — колбаса состоящая изъ лошадиного мяса + 25% коров. сала	Преципитация			
	Дѣйствіе 0,1 к. с. лошадиной антисыворотки		Дѣйствіе 0,1 к. с. коровьей антисыворотки	
	Лошади.	Рогат. скота	Лошади.	Рогат. скота
1. Сырая колбаса . .	++++	—	—	++
2. Сильно копченая .	++	—	—	+
3. Сильно копченая и 6 мин. вареная . .	+	—	—	—
4. Сильно копченая и 15 мин. вареная . .	—	—	—	—

Такимъ образомъ изъ этихъ опытовъ выходитъ, что колбасы одинаково копченая, но вареная 6 мин. и 15 мин. разнятся въ томъ, что съ первой реакціи преципитации удалась, тогда какъ съ вареной въ теченіи 15 мин. получился отрицательный результатъ.

Изъ таблицы видно также, что сила реакціи убываетъ параллельно большому нагреванію колбасы и, наконецъ, совсѣмъ не получается реакціи; при чемъ это прекращеніе реакціи зависитъ не только отъ продолжительности и температуры нагреванія колбасы, но также и отъ первоначальнаго количества бѣлковъ въ этихъ продуктахъ, что ясно видно изъ сравненія силы реакціи и болѣе скорого прекращенія ея при дѣйствіи коровьей антисыворотки съ тѣми же явленіями при дѣйствіи лошадиной.

Къ сожалѣнію, и опыты Weidanz и Borchmann'a не даютъ возможности установить предѣлы нагреванія для реакціи преципитации, такъ какъ и время нагреванія здѣсь довольно неопредѣленное и температура сильно колеблется „1—2 Stunden bei etwa 70°—90° C. über offenem Feuer,“ не

указана толщина колбасъ; наконецъ, и само нагреваніе здѣсь двоякаго рода: копченіе и вареніе, а между тѣмъ извѣстно, что бѣлки въ сухомъ состояніи способны переносить значительно большее нагреваніе безъ потери биологическихъ свойствъ. Относительно температуры внутри колбасы при такомъ копченіи такъ говорятъ проф. Uhlenhuth и Weidanz: „Welcher Temperatur das Wurstinere bei dem Heissräuchern ausgesetzt ist, müsste allerdings noch durch entsprechende Versuche ermittelt werden (стр. 152).

Проф. Uhlenhuth, Weidanz und Wedemann въ 1908 году въ своей работѣ „Technik und Methodik des biologischen Verfahrens zum Nachweis von Pferdefleisch“ очень неопредѣленно говорятъ объ отношеніи реакціи преципитации къ нагреванію: „Вареное мясо по биологическому методу не опредѣлимо, если способные къ реакціи бѣлки полностью разрушены кипяченіемъ. Если же температура внутри мяса не переходитъ 60°—70° C., то преципитинная реакція еще возможна“.

Въ 1909 году Uhlenhuth und Weidanz<sup>1)</sup> въ своей книгѣ болѣе опредѣленно высказываются о стойкости преципитинной реакціи къ нагреванію: „Bei einer Temperatur von 85—90° sind wir aber ausserdem schon so ziemlich an der Grenze der Reaktionsfähigkeit des Eiweisses angelangt“ (стр. 152).

Изъ всего этого перечня литературы видно, что вообще исследованія о возможности примѣненія реакціи преципитации для контроля надъ фальсификаціей мясныхъ продуктовъ, денатурированныхъ нагреваніемъ, не обильны; что не имѣется систематическихъ наблюденій надъ измѣненіемъ силы преципитации въ связи съ увеличивающимся нагреваніемъ этихъ продуктовъ и надъ опредѣленіемъ границы нагреванія, при которой уже реакція не получается;

1) Uhlenhuth und Weidanz см. выше „Praktische Anleitung“.

а имѣющіяся данныя получены при настолько разнообразныхъ условіяхъ опыта (степень, продолжительность и видъ нагрѣванія, температура внутри мясныхъ продуктовъ и т. д.), что дѣлать какіе-либо выводы о стойкости преципитионныхъ свойствъ бѣлковъ къ денатурированію нагрѣваніемъ — не возможно.

Остается только доказаннымъ тотъ фактъ, что установленіе фальсификаціи мясныхъ продуктовъ біологическимъ способомъ затрудняется по мѣрѣ все большаго и большаго денатурированія нагрѣваніемъ и, наконецъ, совсѣмъ становится невозможнымъ.

## Глава I.

### Измѣненіе у бѣлковъ способности преципитироваться при нагрѣваніи ихъ.

Значительно больше и полеѣе разработанъ теоретическій вопросъ о способности вообще бѣлковъ и, главнымъ образомъ, сывороточныхъ бѣлковъ послѣ опредѣленнаго нагрѣванія преципитироваться нативными антисыворотками. Еще первые изслѣдователи реакціи преципитации обращали вниманіе на этотъ вопросъ и старались такъ или иначе его разрѣшить, то опредѣляя температуру, при которой бѣлки уже не образуютъ съ нативной антисывороткой преципитата, то опредѣляя температуру, которую бѣлки еще переносятъ безъ потери біологическихъ свойствъ.

Разсматривая вопросъ о способности денатурированныхъ нагрѣваніемъ бѣлковъ преципитироваться нативными сыворотками, надо прежде всего различать нагрѣваніе бѣлковъ въ сухомъ состояніи и въ растврѣ.

### А. Нагрѣваніе въ сухомъ состояніи.

Nuttall<sup>1)</sup>, Ferrai<sup>2)</sup>, Biondi<sup>3)</sup>, Modica<sup>4)</sup>, Uhlenhuth und Beumer<sup>5)</sup> и Schmidt<sup>6)</sup> примѣняли въ общемъ одинаковую методику: подвергали высушенный бѣлокъ кровяной сыворотки нагрѣванію и затѣмъ, переводя его въ растворъ, опредѣляли, даетъ-ли соответствующая нативная антисыворотка преципитацию съ этимъ растворомъ или нѣтъ. Первый авторъ показалъ, что такой бѣлокъ не теряетъ способности преципитироваться и послѣ 30 минутнаго нагрѣванія при 100° С. Ferrai же бралъ болѣе высокія температуры и опредѣлялъ, что способность бѣлковъ кровяной сыворотки къ реакціи преципитации полностью разрушается, если нагрѣвать при 130° — 1 часъ, или при 140° — 20 минутъ, или при 150° — 10 минутъ и, наконецъ, при 160° — 5—10 минутъ. Эти данныя находятъ подтвержденіе и у другихъ изслѣдователей (Biondi не получалъ реакціи съ кровью нагрѣтой до 160°), но и Ferrai не опредѣлялъ точно границы нагрѣванія, по одну сторону которой бѣлокъ еще способенъ къ реакціи, а по другую — эта способность уже разрушена.

Этотъ пробѣлъ старался заполнить Schmidt, который производилъ систематическіе опыты для выясненія этого во-

- 1) Nuttall „Blood immunity and blood relationship etc.“ — Cambridge 1904, University Press.
- 2) Ferrai „Sulla diagnosi speciѣ del sangue col metodo biologico in medicina legale“. — Estrato del Bollettino della R. Accademia Medica di Genova Ann. 1901, Bd. 16, № 7. Цитирую по „Studien über Präcipitation“ Schmidt'a.
- 3) Biondi „Beitrag zum Studium der biolog. Methode für die spez. Diagnose des Blutes“. — Vierteljahrscr. für gerichtl. Med. und öffentl. Sanitätsw. 1902, 3. Folge, Bd. 23.
- 4) Modica „Nuovo ricerche sul metodo biologico par la diagnosi di specie del sangue“. — Arch. Farm. 1907, 5. Цитир. по „Studien über Präcipitationreaktion“ Schmidt'a.
- 5) Uhlenhuth und Beumer „Praktische Anleitung zur gerichtl. ärztlichen Blutuntersuchung mittels der biologischen Methode“. — Zeitschr. für Med. Beamte 1903, № 5 u. 6.



ПЕРЕВІРНО  
1936

проса. Для этого онъ бралъ вполне высушенную, растертую въ мелкій порошокъ лошадиную сыворотку, запаивалъ ее въ тонкія стеклянныя трубочки и нагрѣвалъ въ парафиновой банѣ при 110°, 130° и 150°. Нагрѣтую такимъ образомъ сыворотку онъ растиралъ съ физиологическимъ растворомъ поваренной соли въ ступкѣ и прозрачную отфильтрованную жидкость испытывалъ на способность ея къ преципитации нативной лошадиной антисывороткой.

Оказалось, что реакціонная способность бѣлка не уничтожается послѣ 2-хъ часового нагрѣванія при 110°, при чемъ реакція наступаетъ быстро, какъ и съ нативными бѣлками; а количество преципитата немного меньше, что Schmidt объясняетъ не вполне полной растворимостью нагрѣтыхъ бѣлковъ. 1/2 и 1 часовое нагрѣваніе при 130° тоже еще не уничтожаетъ биологическихъ свойствъ бѣлковъ, но преципитация получается уже значительно слабѣе, особенно послѣ 1 часового нагрѣванія, что надо объяснять не только трудной растворимостью бѣлковъ, но и наступающимъ измѣненіемъ преципитируемыхъ веществъ. И только послѣ 30 и 60 минутнаго нагрѣванія сухой лошадиной сыворотки при 150° реакція преципитации съ этими сыворотками не удавалась, несмотря на то, что въ виду трудной растворимости нагрѣтой сыворотки она оставалась на сутки со стерильнымъ физиологическимъ растворомъ поваренной соли; при чемъ растворъ послѣ суточнаго стоянія довольно сильно пѣнился и по химической пробѣ содержалъ приблизительно столько бѣлка, сколько его въ 1:400 разбавленной обыкновенной сывороткѣ.

Значитъ, по опытамъ Schmidt'a видно, что у сухихъ бѣлковъ способность къ образованию преципитата уничтожается при нагрѣваніи въ теченіи 1/2—1 часа отъ 130° до 150°. Эти результаты указываютъ на большую стойкость биологическихъ свойствъ сухихъ бѣлковъ, чѣмъ это находилъ Ferrai, такъ какъ у него 1 часовое нагрѣваніе при

130° уже уничтожаетъ способность къ преципитации, тогда какъ у Schmidt'a бѣлки и послѣ этого еще не теряютъ этой способности.

### Б. Нагрѣваніе въ растворѣ.

Вопроса о способности бѣлковъ въ растворѣ переносить нагрѣваніе безъ потери биологическихъ свойствъ касался цѣлый рядъ исследователей; сводку всѣхъ полученныхъ по этому вопросу данныхъ сдѣлалъ въ своей работѣ Nuttall, который даетъ такую таблицу (№ 5).

Таблица № 5.

Вліяніе нагрѣванія на преципитируемое вещество.

Нагрѣваемое вещество	Температура нагрѣванія		Замѣчанія	Авторы
	Разрушается при	Переводитъ		
Сыворотка утря . . . . .	80°	58°	Пезнач. реакція	Чистовичъ <sup>1)</sup>
Куриный бѣлокъ . . . . .	—	56°	1/2 ч. вліяетъ незначит.	Meyers <sup>2)</sup>
Растворъ глобулина коровьей и бараньей сыворотки . . . . .	—	50°	1/2 ч. вліяетъ незначит.	Meyers <sup>2)</sup>
Куриная сыворотка . . . . .	—	70°	1/2 часа	Bordet <sup>3)</sup>
Моча содержащая бѣлокъ . . . . .	—	58°	2 часа	Leclainche et Vallée <sup>4)</sup>
Молоко . . . . .	100° — 1/2 часа	—	Никакой реакціи	Schütze <sup>5)</sup>
Молоко . . . . .	—	100°	1/2 ч. еще реагируетъ	Müller <sup>6)</sup>
Яичный бѣлокъ . . . . .	78° — 1—1 1/2 ч.	—	Никакой реакціи	Eisenberg <sup>7)</sup>
Сыворотка 1:100 . . . . .	100° — 5 мин.	55°	1/2 ч. безъ вліянія	Nuttall <sup>8)</sup>
Сыворотка 1:10 . . . . .	65° — 24 часа	60°	4 дн. безъ вліянія	Linossier et Lemoine <sup>9)</sup>

1) Чистовичъ „Etudes sur l'immunisation contre le sérum d'anguille“. — Ann. de l'Inst. Pasteur 1899, T. 13, pag. 406.

Так как Nuttall видѣлъ, что изъ этой таблицы нельзя сдѣлать никакихъ опредѣленныхъ выводовъ, потому что авторы брали различные объекты или одинаковые объекты, но въ различныхъ разведеніяхъ, не производили полныхъ систематическихъ опытовъ, а самые результаты часто противорѣчили результатамъ другихъ авторовъ, то Nuttall предложилъ Graham-Smith'y произвести систематическіе опыты надъ термостабильностью преципитируемыхъ веществъ кровяной сыворотки.

Для этого Graham-Smith<sup>10)</sup> бралъ неразведенную козью сыворотку въ трубкѣ въ 1 к. с. и подвергалъ въ теченіи 3-хъ минутъ нагреванію въ водяной банѣ при температурѣ отъ 40° до 75°. Затѣмъ нагрѣтая сыворотка разводилась 1:21 въ физиологическомъ растворѣ поваренной соли и испытывалась антисывороткой рогатого скота. Количество преципитата обозначалось въ процентахъ по отношенію къ осадку ненагрѣтой сыворотки. Результаты приведены въ таблицѣ № 6.

Отсюда выходитъ, что 3-хъ минутное нагреваніе при 55° ослабляетъ преципитинную реакцію, а нагреваніе такой же продолжительности при 64° С уничтожаетъ совсѣмъ эту реакцію. Такимъ образомъ Graham-Smith устанавливаетъ

2) Meyers цитирую по „Studien über Präcipitinreaktion“. . . . Schmid'ta.

3) Bordet Bull. Soc. Royal. Science Med. et Nat. Bruxelles. Vol. LIX.

4) Leclainche et Vallée. Compt. rend. de la soc. de biol. 1901.

5) Schütze. „Ueber ein biologisches Verfahren zur Differenzierung der Eiweissstoffe verschiedener Milcharten“. — Zeitschr. für Hygiene 1901. Bd. 36.

6) Müller — Archiv für Hygiene 1902, Bd. 14.

7) Eisenberg „Beiträge z. Kenntnis der spez. Präzipitativvorgänge“. Bull. acad. de soc. de biol. Mai 1902.

8) Nuttall „On the formation of specific antibodies etc.“ Journ. of Hyg. 1901, Vol. I.

9) Linoisier et Lemoine — Compt. rend. de la soc. de biol. 1902, T. LIV., pag. 85, 322, 369—372, 415—417. Цитиру по „Studien über Präcipitinreaktion“. . . Schmid'ta.

10) Graham-Smith „The Biological or Precipitin Test for Blood considered mainly from its medicolegal aspect“. — Journ. of Hyg. 3, 1903.

Т а б л и ц а № 6.

t°	Колич. преципитата въ %	t°	Колич. преципитата въ %	t°	Колич. преципитата въ %
Ненагр.	100	38°	82	65°	0
40°	100	59°	74	66°	0
45°	100	60°	71	67°	0
50°	100	61°	71	68°	0
55°	85	62°	71	69°	0
56°	85	63°	46	70°	0
57°	85	64°	0	75°	0

точную границу инактивированія сыворотки, взятой въ неразведенномъ видѣ.

Уже опять другую границу инактивированія сыворотки даютъ Obermayer und Pick<sup>1)</sup>. Они говорятъ, что при нагреваніи до 60—70° замѣчается ослабленіе преципитированія нативной сывороткой, а при кипяченіи сыворотки, но когда она еще не свернулась, эта способность совсѣмъ исчезаетъ. Значитъ, по ихъ мнѣнію, инактивированіе происходитъ при 100°-номъ нагреваніи, при чемъ о продолжительности нагреванія они не говорятъ; а о точной границѣ инактивированія въ противоположность Graham-Smith'y высказываются такъ: „Eine scharfe Grenze für die „Inaktivierung“ kann nicht gezogen werden“.

Въ 1908 году Schmidt опубликовалъ свои изслѣдованія по этому вопросу. Въ общемъ его результаты о термостабильности преципитируемыхъ веществъ сыворотки сходятся съ результатами Obermayer'a und Pick'a; достоинствомъ

1) Obermayer und Pick. Offizielles Protokoll der K. K. Gesellschaft der Aerzte in Wien. Sitzung von 22. Mai 1903. — Wien. klin. Wochenschr. 1903, № 22.

же опытов Schmidt'a является то, что имъ выработана методика исследования нагрѣтыхъ сыворотокъ; при чемъ не только обращалось вниманіе на продолжительность нагрѣванія, но учитывались и болѣе мелкіе факторы, могущіе вліять на точность опредѣленія.

Нагрѣванію подвергалась неразбавленная сыворотка и въ разведеніяхъ 1:1 и 1:10, при этомъ гораздо чаще именно разведенная; время нагрѣванія было 30—60 минутъ, а температура 70°, 75°, 80°, 85°, 90° и 100°. Послѣ нагрѣванія сыворотки доводились до разведенія 1:56 и 1:100 и къ 2 к. с. этихъ растворовъ прибавлялось по 10 капель нативной преципитирующей сыворотки. Высота образовавшагося черезъ 24 часа преципитата измѣрялась въ миллиметрахъ.

Опыты Schmidt'a надъ преципитинной реакціей съ лошадиной сывороткой представлены имъ въ видѣ таблицы (№ 7).

Таблица № 7.

Растворы сыворотки нагрѣтой въ разведеніи 1:1	Количество осадка	Растворы сыворотки нагрѣтой въ разведеніи 1:10	Количество осадка.
1:100 ненагрѣтой сыворотки	около 10 мм.	1:100 ненагрѣтой сыворотки	около 10 мм.
" 30 мин. 70°	" 10 "	" 30 мин. 70°	" 7 "
" 60 " 70°	" 7 "	" 60 " 70°	" 7 "
" 30 " 75°	" 5 "	" 30 " 75°	" 6 "
" 60 " 75°	" 4 "	" 60 " 75°	" 5 "
" 30 " 80°	" 4 "	" 30 " 80°	" 4 "
" 60 " 80°	" 4 "	" 60 " 80°	" 4 "
" 30 " 85°	" 3 "	" 30 " 85°	" 3 "
" 60 " 85°	" 2—3 "	" 60 " 85°	" 2 "
" 30 " 90°	" 1—2 "	" 30 " 90°	" 1—2 "
" 60 " 90°	" 1—2 "	" 60 " 90°	" 1—2 "
" 30 " 100°	0	" 30 " 100°	0

Такимъ образомъ изъ этихъ опытовъ Schmidt'a выходить, что лошадиная сыворотка можетъ переносить довольно

значительное по температурѣ и продолжительности нагрѣваніе безъ потери способности преципитироваться нативной антисывороткой, и только при нагрѣваніи до 100° въ теченіи 30 минутъ сыворотка послѣ прибавленія преципитина не даетъ опредѣленнаго осадка, хотя помутнѣніе при этомъ и получается: „Das auf 100° erhitzte Serum wurde nach Zusatz von Nativ-Präcipitin nicht mehr gefällt, noch konnte eine Trübung mit Sicherheit festgestellt werden“.

Дѣйствительно Schmidt'у легко удавалось дифференцировать съ помощью нативнаго преципитина сыворотку, которая нагрѣвалась въ теченіи 1 часа при 90°. Что же касается ослабленія преципитации, то оно замѣчается уже при нагрѣваніи около 70°, при чемъ, какъ выяснилось, здѣсь играетъ роль то или иное разведеніе нагрѣваемой сыворотки, а также продолжительность нагрѣванія. Это видно изъ сравненія количества осадковъ при нагрѣваніи въ теченіи 30 минутъ при 70° сыворотки, разведенной 1:1 и 1:10; въ то время какъ количество осадка перваго разведенія (10 мм.) не измѣняется по сравнению съ осадкомъ ненагрѣтой сыворотки, количество осадка развенія 1:10 уменьшается на 30% (7 мм.), отсюда выходитъ, что чѣмъ болѣе разбавлена сыворотка, тѣмъ легче она инактивируется. Изъ сравненія же нагрѣванія при 70° въ теченіи 30 и 60 минутъ одного и того же развенія сыворотки (1:1) видно, что послѣ 1/2 часового нагрѣванія ослабленія биологическихъ свойствъ не замѣтно, а послѣ 1 часового оно появляется; хотя не во всѣхъ случаяхъ замѣчается такая разниа отъ продолжительности нагрѣванія; изъ чего можно заключить, что продолжительность нагрѣванія не играетъ уже такой большой роли въ денатурированіи бѣлковъ.

Почти такіе же результаты съ денатурированіемъ бѣлковъ получали Fernet und Müller въ 1910 г., только опыты ихъ были менѣе систематичны: они брали лошадиную сыворотку въ развеніи 1:1000 и нагрѣвали въ теченіи



различного времени въ кипящей водяной банѣ, а затѣмъ испытывали эти нагрѣтые сывороточные бѣлки нативной лошадиной антисывороткой. Оказалось, что при нагрѣвании въ теченіи 15 минутъ и болѣе реакція преципитации съ этими бѣлками не получалась.

Такимъ образомъ Fornet und Müller, взявъ въ своихъ опытахъ постоянную температуру, измѣняли время нагрѣвания, т. е. какъ разъ тотъ факторъ, которому наименьшую роль приписываетъ Schmidt, и получали, увеличивая время нагрѣвания, инактивированіе бѣлковъ.

Разсматривая всѣ до настоящаго времени полученныя данныя о способности бѣлковъ, денатурированныхъ нагрѣваніемъ, преципитироваться соотвѣтствующей нативной антисывороткой, надо, дѣйствительно, дѣлать большую разницу между нагрѣваніемъ бѣлковъ въ сухомъ состояніи и въ растврѣ. Сухіе бѣлки обладаютъ значительно большей сопротивляемостью къ нагрѣванію безъ потери ихъ биологическихъ свойствъ. Такъ, въ то время какъ бѣлокъ въ растврѣ теряетъ способность преципитироваться уже при 100°-номъ нагрѣваніи въ теченіи 30 минутъ обязательно, а по мнѣнію многихъ авторовъ (Linossier et Lemoine, Eisenberg, Чистовичъ и др.) даже еще раньше (отъ 65° до 80°); сухіе бѣлки по мнѣнію почти всѣхъ изслѣдователей переносятъ безъ потери способности преципитироваться температуры отъ 100° и выше, а по даннымъ Schmidt'a теряютъ эту способность послѣ 30 мин. нагрѣванія при 150° С.

Мнѣнія большинства авторовъ относительно стойкости къ нагрѣванію сухихъ бѣлковыхъ тѣлъ сходятся, отличаясь незначительно въ опредѣленіи болѣе или менѣе точной границы этой сопротивляемости. Этого нельзя сказать относительно опредѣленія болѣе важнаго для практики вопроса о стойкости къ нагрѣванію бѣлковъ въ растврѣ, такъ какъ здѣсь нѣтъ согласія между результатами отдѣльныхъ авторовъ кк. въ вопросѣ о границѣ разрушенія биологическихъ

свойствъ бѣлковъ, такъ и въ вопросѣ о той температурѣ, которую еще можетъ переносить бѣлокъ въ растврѣ.

Нагрѣваніе въ кипящей банѣ (100°) большинство изслѣдователей считаетъ разрушающимъ преципитируемые вещества бѣлковъ въ растврѣ, но и они расходятся въ вопросѣ о времени, которое необходимо для этого:

Schütze считаетъ необходимымъ 1/2 часа, также и Schmidt, Nuttall — 5 мин., Fornet und Müller — 15 минутъ, а Obermayer und Pick совсѣмъ не упоминаютъ о времени нагрѣванія. Другая же часть изслѣдователей держится того мнѣнія, что денатурированіе бѣлковъ происходитъ при болѣе низкой температурѣ: такъ Graham-Smith считаетъ, что это происходитъ въ теченіи 3-хъ минутъ при 64°, Linossier et Lemoine — при 65° въ теченіи 24 часовъ; Eisenberg — при 78° въ теченіи 1-1/2 часовъ и Чистовичъ — при 80° безъ опредѣленія времени.

Это различіе можно бы было объяснить тѣмъ матеріаломъ (бѣлкомъ), который подвергался изслѣдованію, но если взять самыя противоположныя мнѣнія (Graham-Smith — 64° и 3 минуты и Schmidt — 100° и 30 минутъ), то въ обоихъ случаяхъ изслѣдуемый матеріалъ былъ одинъ и тотъ же — сывотка. Очевидно, что причина этого кроется въ чемъ-то другомъ, и скорѣе всего въ методѣ изслѣдованія.

Что же касается ослабленія, но не полного разрушенія, преципитируемыхъ веществъ бѣлковъ, то и тутъ нѣтъ согласія между мнѣніями отдѣльныхъ авторовъ, хотя въ общемъ здѣсь меньше противорѣчій между полученными результатами; такъ большинство сходитя на томъ, что ослабленіе биологическихъ свойствъ бѣлковъ уже замѣчается при нагрѣваніи между 55° и 60°, нѣкоторые же замѣчали это при 70° нагрѣванія: Meyers 56°-1/2 часа, Graham-Smith — 55°-3 мин., Чистовичъ 58° (не обозначая времени), Obermayer und Pick — 60°-70° (тоже безъ обозначенія времени) и Schmidt 70°-30-60 мин. Только

одинъ Müller находилъ, что бѣлокъ (молоко) послѣ  $\frac{1}{2}$  часового нагреванія при  $100^{\circ}$  еще реагируетъ безъ замѣтныхъ измѣненій съ нативной антисывороткой; однако это изслѣдованіе пока остается въ единственномъ числѣ.

Но въ то же время есть и другіе довольно рѣзко противорѣчащіе результаты; такъ Linossier et Lemoine нагревали сыворотку, разведенную 1:10, до  $60^{\circ}$  въ теченіи 4 дней и не находили никакой разницы въ реакціи съ нативной антисывороткой; а Bordet нагревалъ съ тѣмъ же отрицательнымъ результатомъ куриную сыворотку  $\frac{1}{2}$  часа при  $70^{\circ}$ .

Поэтому если дѣлать какія-нибудь обобщенія изъ существующей литературы о термостабильности преципитируемыхъ веществъ бѣлковъ, то ихъ надо дѣлать съ большой осторожностью и съ оговоркой, что выводы дѣлаются на основаніи результатовъ большинства изслѣдователей, при чемъ не надо забывать, что результаты меньшинства могутъ довольно рѣзко противорѣчить дѣлаемому выводу; а объяснить въ настоящее время такое несогласіе въ выводахъ представляется невозможнымъ.

Оговорившись такимъ образомъ, мнѣ представляется наилучшимъ сдѣлать изъ литературы по этому вопросу слѣдующія заключенія: 1) Сухой бѣлокъ способенъ переносить значительно большее нагреваніе, чѣмъ бѣлокъ въ растворѣ; 2) Границей нагреванія, у которой сухой бѣлокъ теряетъ способность преципитироваться нативной антисывороткой, является температура около  $150^{\circ}$ ; 3) Таковой же границей для бѣлка въ растворѣ является  $100^{\circ}$ . 4) Ослабленіе въ образованіи преципитата въ бѣловыхъ растворахъ замѣчается уже при нагреваніи до  $55-60^{\circ}$ ; 5) Въ ослабленіи играетъ значеніе отчасти болѣе трудная растворимость нагрѣтыхъ бѣлковъ, а главное денатурированіе самой бѣлковой частицы.

## Способы изслѣдованія нагрѣтыхъ мясныхъ продуктовъ.

### Глава 2.

#### Измѣненіе техники изслѣдованія.

Итакъ въ настоящее время можно считать установленнымъ, что реакціей преципитации исполнѣ можно пользоваться для контроля надъ фальсификаціей мясныхъ продуктовъ, кромѣ продуктовъ подвергнутыхъ болѣе или менѣе продолжительному нагреванію, гдѣ преципитинная реакція даетъ менѣе вѣрные результаты. Между тѣмъ такихъ продуктовъ (подвергнутыхъ нагреванію), въ особенности колбасъ, поступаетъ въ продажу довольно много.

Если сопоставить данныя, добытыя работавшими теоретически надъ вопросомъ о термостабильности преципитируемыхъ веществъ, съ тѣми данными, которыя имѣются относительно обработки мясныхъ продуктовъ различнымъ нагреваніемъ той или иной продолжительности, то можно увидѣть, что денатурированные мясные продукты или достигаютъ температуры, при которой ослабляются биологическія свойства бѣлковъ —  $55^{\circ}$  и выше, или той, при которой образованіе преципитата съ помощью нативной сыворотки полностью становится невозможнымъ.

Понятно поэтому желаніе цѣлага ряда изслѣдователей сдѣлать способъ преципитации примѣнимымъ для изслѣдованія подвергнутыхъ нагреванію мясныхъ продуктовъ.

Работы для разрѣшенія этого вопроса велись въ двухъ направленіяхъ: съ одной стороны, старались сдѣлать продукты, подвергнутые не чрезмѣрно сильному нагреванію, доступными изслѣдованію сывороткой, полученной отъ нативныхъ бѣлковъ, измѣнивъ для этого методику изслѣдо-

ванія, съ другой стороны, для продуктовъ, лишенныхъ совершенно возможности преципитироваться такими антисыворотками, стремились получить спеціальныя антисыворотки, годныя для изслѣдованія нагрѣтыхъ бѣлковъ (Hitze Präcipitin).

Что касается тѣхъ измѣненій въ методикѣ изслѣдованія нагрѣтыхъ мясныхъ продуктовъ, которыя необходимы, чтобы сдѣлать эти продукты доступными изслѣдованію наивными сыворотками, то почти все они вытекаютъ изъ того факта, что при нагрѣваніи бѣлковая вещества становятся менѣе растворимыми, а потому легко получить отрицательный результатъ не оттого, что въ данномъ случаѣ не имѣется бѣлка искомаго вида животнаго, а просто отъ слишкомъ малаго содержанія вообще бѣлка въ экстрактѣ. Такъ какъ вслѣдствіе плохой теплопроводности мяса наименьшаго измѣненія бѣлковъ можно ждать внутри мясныхъ продуктовъ, и колбасъ въ частности, то правило: брать необходимое количество матерьяла изъ середины продукта, особенно точно должно исполняться при изслѣдованіи вареныхъ и копченыхъ продуктовъ (Uhlenhuth, Weidanz, Baier, Reuchlin и др.). Въ то время какъ Uhlenhuth, Weidanz und Wedemann говорятъ, что для биологическаго изслѣдованія достаточно имѣть мяса съ булавочную головку, этого нельзя сказать при изслѣдованіи мясныхъ продуктовъ, подвергнутыхъ нагрѣванію, такъ какъ здѣсь надо брать большее количество матерьяла, чтобы получить экстрактъ болѣе концентрированный (Fische и др.).

Для этой же цѣли авторы, работавшіе съ нагрѣтыми мясными продуктами, предлагаютъ экстрагировать болѣе продолжительное время, такъ какъ только при такихъ условіяхъ все бѣлковая вещества, способная еще реагировать съ антисыворотками, могутъ перейти въ экстрактъ.

Напримѣръ: Fernet und Müller совѣтуютъ такъ приготовить экстрактъ: они берутъ кусокъ варенаго мяса (около 25 гр.), растираютъ его съ 60 к. с. физиологическаго раствора

повареной соли въ ступкѣ и сохраняютъ въ ледяномъ шкафу, а передъ опытомъ его фильтруютъ и испытываютъ антисывороткой. Для того чтобы избѣгнуть процессовъ разложенія въ экстрактѣ, авторы работаютъ по возможности стерильно, прибавляютъ нѣсколько капель хлороформа и сохраняютъ экстрактъ на холоду; наконецъ, для сокращенія времени экстрагирования примѣняютъ Schüttelapparat.

Примѣняя такую методику, авторамъ удалось получить реакцію съ лошадиной антисывороткой въ такихъ случаяхъ, въ которыхъ безъ примѣненія этихъ предосторожностей реакція не удавалась.

Weidanz und Borchmann для лучшаго экстрагирования изъ копченыхъ и вареныхъ колбасъ существующихъ еще тамъ растворимыхъ бѣлковъ растираютъ 30 гр. колбасной массы съ 50 к. с. физиологическаго раствора въ ступкѣ стеклянной палочкой, ставятъ на 1 часть въ Schüttelapparat, а потомъ на 2 дня на ледъ. Затѣмъ смѣсь центрифугируютъ, отсасываютъ пипеткой съ осадка и фильтруютъ до прозрачности или черезъ бумагу или черезъ фильтръ съ порошкомъ инфузорной земли.

Uhlenhuth, Weidanz und Wedemann въ своей работѣ „Technik und Methodik des biologischen Verfahrens zum Nachweis von Pferdefleisch“ прямо указываютъ, что экстрагировать вареные продукты надо 24 часа; а въ „Praktische Anleitung zur Ausführung“ и т. д. авторы говорятъ, что въ то время, какъ для сываго мяса экстрагировать надо около  $\frac{1}{4}$  часа, для варенаго необходимо „много часовъ“. Экстрактъ послѣ такого экстрагирования даже при повторномъ фильтрованіи черезъ бумагу не становится прозрачнымъ, а потому приходится фильтровать его съ порошкомъ инфузорной земли.

Обязательнымъ, наконецъ, требованіемъ для экстракта изъ денатурированныхъ продуктовъ является изслѣдованіе его до постановки опыта преципитации химически на бѣлкахъ,

так как в этих случаях особенно легко может зависить отрицательный результат от отсутствия вообще бѣлковъ.

Наконецъ, чтобы сдѣлать реакцію преципитации болѣе чувствительной, что необходимо для исследования денатурированныхъ нагрѣваемъ бѣлковъ, рекомендуется пользоваться при самой постановкѣ опыта преципитации способомъ „переслаивания жидкостей“ (Schicht-probe).

Дѣло въ томъ, что первоначально при постановкѣ реакціи преципитации прямо смѣшивали бѣлковый растворъ и иммунную сыворотку и о результатѣ судили по получению или неподучению осадка, при чемъ такъ описываютъ Fornet и Müller картину при положительномъ результатѣ „eine über die ganze Flüssigkeit verteilte, ganz dichte, feinste, gleichmässige Körnung“, а черезъ 24 часа при стоянн въ ледяномъ шкафу на днѣ пробирки образуется „ein sehr charakteristischer landkartenförmig begrenzter Bodensatz“.

Первымъ примѣнилъ другой способъ преципитации Ascoli<sup>1)</sup>, который, наливая въ капиллярныя трубочки жид-Ascoli<sup>1)</sup>, который, наливая въ капиллярныя трубочки жид-

кости для открытія незначительныхъ количествъ крови въ судебно-медицинскихъ цѣляхъ, невольно получалъ не смѣшеніе жидкостей, а переслаиваніе. Также работала и Hauser<sup>2)</sup>. Но у этихъ авторовъ переслаиваніе происходило вслѣд-ствие капиллярности трубокъ; сознательно примѣнять такое переслаиваніе жидкостей въ болѣе широкихъ пробиркахъ стали Fornet и Müller, при чемъ они замѣтили, что черезъ одинъ часъ реагировала только часть жидкости, а остальная оставалась прозрачной. Такимъ образомъ на мѣстѣ соприкосновения двухъ жидкостей получалось помутнѣніе въ

1) Ascoli „Neue Tatsachen und neue Ausblicke in die Lehre der Ernährung“. — Münch. med. Wochenschr. 1903, S. 201—204.

2) Hauser „Ueber einige Erfahrungen bei Anwendung der serodiagnostischen Methode für gerichtliche Blutuntersuchungen“. — Münch. med. Wochenschr. 1904, № 7.

видѣ кольца (отсюда второе названіе этой пробы — „Ringprobe“), что даетъ преимущество въ смыслѣ болѣе легкаго опредѣленія появленія преципитата, какъ это получается и при опредѣленн бѣлка по способу Heller'a. Опубликована была эта проба съ разрѣшенія авторовъ Fiehe<sup>1)</sup> и цѣнность ея подтверждена работами Carnwath<sup>2)</sup> Gaehlgens'a<sup>3)</sup> и Miessner'a<sup>4)</sup>. Хотя затѣмъ и появились указанія (Fuhukara<sup>5)</sup> и др.), что при примѣненн переслаиванія страдаетъ специфичность реакціи, но Fornet и Müller<sup>6)</sup> цѣлымъ рядомъ работъ доказали какъ специфичность этой пробы, такъ и чувствительность ея.

Такимъ образомъ въ замѣнъ прежней „Mischprobe“ появилась „Schicht oder Ringprobe“, которая теперь вошла вообще въ технику реакціи преципитации и въ особенности рекомендуется при исследованн вареныхъ и копченыхъ продуктовъ, чтобы сдѣлать реакцію болѣе чувствительной.

При сужденн о результатахъ исследования нагрѣтыхъ продуктовъ надо имѣть въ виду еще то обстоятельство, что образованіе преципитата въ этихъ случаяхъ наступаетъ значительно позже, чѣмъ это бываеетъ при преципитации нативныхъ бѣлковъ: въ то время какъ съ нативными бѣлками

1) Fiehe см. выше.

2) Carnwath „Zur Technik der Untersuchung kleiner Blutspuren“. — Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheits. 1908, Bd. 27.

3) Gaehlgens „Ueber die Typhusanfänge u. ihre Antikörper“. — Zentralbl. für Bakter. 1909, Abt. I, Bd. XLVIII.

4) Miessner „Die Verwendung der Präzipitation in Form der Schichtungsmethode zur Diagnose der Rotzkrankheit“. — Zentralbl. für Bakter. Or. Abt. I, Bd. LI.

5) Fuhukara „Ueber Beziehungen der Bakterienpräzipitine zu den Agglutininen“. — Zeitschr. für Immunitätsforsch. und experim. Ther. 1909, Bd. II, H. 3.

6) Fornet „Ueber moderne Serodiagnostik mit besonderer Berücksichtigung der Präzipitine und Oponine“. — Münch. med. Wochenschr. 1908, № 4.

О нь-же „Le serodiagnostic de la syphilis“. — Semaine medicale 6. Mai 1908.

преципитатъ появляется сразу или черезъ весьма непродолжительное время, смотря по концентраціи бѣлковаго раствора, а черезъ 5—10 минутъ образуются хлопья преципитата, — при нагрѣтыхъ бѣлкахъ помутнѣніе наступаетъ значительно позднѣе (большинство авторовъ считаетъ, что черезъ 10—20 минутъ), а также происходитъ задержка въ образованіи хлопьевъ и въ просвѣтленіи вышестоящей жидкости. Этотъ фактъ подтверждаютъ какъ работавшіе практически съ вареными колбасами, такъ и теоретически изслѣдовавшіе отношеніе нагрѣтыхъ бѣлковъ къ нативнымъ антисывороткамъ (Weidanz, Borchmann, Uhlenhuth, Schmidt и др.). Пользуясь всѣми этими измѣненіями и дополненіями въ методикѣ изслѣдованія мясныхъ продуктовъ, авторамъ и удавалось, какъ мы видѣли изъ обзора литературы о примѣнности преципитинной реакціи при изслѣдованіи нагрѣтыхъ бѣлковъ, открывать лошадиное мясо въ копченыхъ и вареныхъ колбасахъ при помощи нативныхъ антисыворотокъ, при чемъ нагрѣваніе иногда бывало довольно значительное.

### Глава 3.

#### Изслѣдованіе при помощи преципитиновъ, полученныхъ отъ нагрѣтыхъ бѣлковъ (Hitze-преципитины)<sup>1)</sup>.

Но все же остается еще цѣлый рядъ мясныхъ продуктовъ, открытіе въ которыхъ присутствія бѣлка того или иного вида животнаго съ помощью нативной антисыворотки не удастся вслѣдствіе слишкомъ сильнаго денатурированія этихъ бѣлковъ. Для разрѣшенія этого вопроса и ведисъ

1) Въ дальнѣйшемъ изложеніи для краткости я буду называть эти преципитины Hitze-преципитинами.

изслѣдованія въ другомъ направленіи, а именно: стремились получить преципитины къ нагрѣтымъ бѣлкамъ, такъ называемые Hitze-преципитины.

Hitze-преципитинами называются тѣ иммунныя тѣла, которые вырабатываются въ организмѣ животнаго при вприскиваніи имъ тѣхъ или иныхъ бѣлковъ, подвергнутыхъ денатурированію нагрѣваніемъ. Выприскивая такимъ образомъ уже нагрѣтый до опредѣленной температуры преципитиногенъ, можно думать, что въ организмѣ животнаго образуются иммунныя тѣла — преципитины, которые преимущественно будутъ дѣйствовать на бѣлковые растворы, нагрѣтые до такой же температуры. Такимъ образомъ для практики явилась бы возможность при помощи этихъ Hitze-преципитиновъ изслѣдовать настолько измѣненные нагрѣваніемъ мясные продукты, опредѣлить которые съ помощью нативныхъ антисыворотокъ уже является невозможнымъ.

Къ сожалѣнію, опытовъ полученія Hitze-преципитиновъ было произведено очень немного и всѣ они не выходятъ пока изъ области теоретической разработки.

При полученіи Hitze-преципитиновъ обращалось вниманіе главнымъ образомъ на два вопроса: съ одной стороны, изслѣдовали, до какой температуры нагрѣванія бѣлковая тѣла не теряли еще своихъ преципитиногенныхъ свойствъ, т. е. не теряли способности вызывать въ организмѣ животныхъ образованіе иммунныхъ тѣлъ; съ другой стороны, стремились изучить свойства полученныхъ Hitze-преципитиновъ, ихъ отличіе отъ нативныхъ преципитиновъ, специфичность, способность ихъ реагировать съ бѣлками, нагрѣтыми до еще болѣе высокой температуры, и характеръ преципитинной реакціи съ Hitze-преципитинами.

Сколько-нибудь систематическихъ опытовъ для выясненія вопроса о способности бѣлковъ, нагрѣтыхъ до той или иной температуры, быть преципитиногенами не имѣется. Одни изъ первыхъ пробовали получить Hitze-пре-

ципитинъ Obermayer und Pick, сдѣлавше докладъ о своихъ опытахъ на засѣданіи врачей въ Вѣнѣ 22-го мая 1903 года. Они иммунизировали кроликовъ подкожно коровьей сывороткой, которая въ теченіи нѣкотораго времени подвергалась варенію, но еще не свернулась („eines durch einige Zeit gekochten, nicht koagulierten Rindereserums“). Эта сыворотка не реагируетъ уже съ нативными антисыворотками, но вызываетъ въ организмѣ животного соответствующую, отличную отъ нативной, иммуническую сыворотку. Эта антисыворотка, дѣйствительно, реагировала съ сывороткой, обработанной какъ инъекционный матеріалъ, т. е. содержала Hitze-преципитины.

Еще раньше Obermayer'a und Pick'a въ 1901 году вышла работа Schütze<sup>1)</sup> „Weitere Beiträge zum Nachweis verschiedener Eiweissarten auf biologischen Wege“, въ которой онъ сравнительно кратко и не точно говоритъ, что ему удавалось получать, впрыскивая животнымъ молоко кипятившееся въ теченіи  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1, 2,  $2\frac{1}{2}$  и 3 часовъ, преципитирующую сыворотку, которая дѣйствовала какъ сыворотка отъ впрыскиванія сырого молока.

Гораздо подробнѣ имъ разработанъ вопросъ о полученіи мясной антисыворотки, при чемъ Schütze приготовлялъ для иммунизованія мышечный препаратъ, бѣлки котораго подвергались не только нагреванію, но и химическому воздѣйствію. Авторъ бралъ 1 фунтъ человѣческихъ мышцъ, по возможности лишенныхъ жира, отъ трупа чезъ нѣсколько часовъ послѣ смерти; мясо рубилось и кипятилось въ теченіи  $\frac{1}{2}$  часа въ одномъ литрѣ воды. Послѣ этого вода сливалась, а осадокъ выжимался для полнаго выдѣленія нуклеопроteidовъ. Остатокъ вносился въ 500 к. с. кипящей  $\frac{1}{2}$ % натронной щелочи, а черезъ 5 минутъ жидкость сливалась съ остатка и горячая смѣшивалась съ ук-

1) Schütze. Zeitschr. für Hygiene. Bd. 38.

сусной кислотой до тѣхъ поръ, пока выдѣляется еще осадокъ, который отфильтровывался, промывался еще влажной водой, затѣмъ алкоголемъ и эфиромъ; и высушенный растирался въ ступкѣ. Тогда онъ представляетъ тонкій, какъ песокъ, желтый или слегка буроватый порошокъ. Растворя нѣсколько крупинокъ его при подогрѣваніи въ содовомъ растворѣ, можно опредѣлить химически большое содержаніе бѣлка. Такой препаратъ вводился чаще интравенозно кроликамъ и давали сыворотку, которая обладала преципитирующимъ свойствомъ по отношенію къ инъекцируемому матеріалу.

Такимъ образомъ и здѣсь оказывается, что бѣлокъ, денатурированный не только нагреваніемъ, но и щелочью ( $\frac{1}{2}$ % растворъ NaOH), могъ еще вызывать въ животномъ организмѣ преципитины.

Въ 1904 году Loeffler<sup>1)</sup> также получалъ двоякимъ путемъ Hitze-преципитины, для этого онъ нагревалъ бѣлокъ или въ сухомъ состояніи или же въ растворѣ. Въ первомъ случаѣ онъ высушивалъ въ эксикаторѣ при низкой температурѣ до постояннаго вѣса или куриный бѣлокъ или кровь различныхъ животныхъ. Затѣмъ сухой бѣлокъ въ теченіи  $\frac{1}{2}$  часа подвергался нагреванію въ сушильномъ шкафу при  $150^{\circ}$  C. Наконецъ, такой денатурированный бѣлокъ смѣшивался съ 0,9% растворомъ поваренной соли и впрыскивался кроликамъ. Получалась сыворотка, которая преципитировала какъ растворъ нагреятаго, такъ и не нагреятаго бѣлка. Параллельно Loeffler иммунизировалъ кроликовъ бѣлкомъ, который нагревался нѣкоторое время въ автоклавѣ при  $150^{\circ}$  C., при чемъ онъ превращался въ густое, жидкое, въ водѣ растворимое вещество. Сыворотка, полученная отъ инъекцій такого бѣлка, преципитировала только растворы матеріала, применявшагося для инъекцій,

1) Loeffler. „Ueber ein neues Verfahren zur Gewinnung von Anti-Körpern“. — Deutsch. med. Wochenschr. 1904, № 52.

по не реагировала съ растворами бѣлка ненагрѣтаго или нагрѣтаго въ сухомъ состояніи до 150° С. Въ обоихъ случаяхъ получались преципитины къ нагрѣтымъ бѣлкамъ, но различающиеся въ своихъ свойствахъ.

Въ 1908 году Schmidt въ работѣ „Studien über Präzipitinreaktion und erhitzte Eiweissstoffe“ описываетъ поставленные имъ опыты съ иммунизированіемъ кроликовъ, при чемъ одинъ кроликъ получали сыворотку, которая въ разведеніи 1:1 послѣ прибавленія 2%/100 кристаллической соды нагрѣвалась въ теченіи 1/2 часа при 70° С, а другіе кролики получали также обработанную сыворотку, но безъ прибавленія соды. Обѣ серіи кроликовъ дали сыворотку съ Hitze-преципитинами, которые преимущественно реагировали съ нагрѣтыми бѣлками, такъ что Schmidt такъ высказывается: „Es ist dies ein Beweis dafür, dass das durch Hitze veränderte Eiweiss Antikörper erzeugt hat, welche diesem erhitzten Eiweiss in ähnlicher Weise entsprechen wie Nativ-Präzipitin dem nativen Eiweiss“ (стр. 323).

Изъ болѣе позднихъ изслѣдователей получали преципитины къ нагрѣтымъ бѣлкамъ Fernet und Müller<sup>1)</sup>, которые въ 1908—1909 г. только вскользь упоминаютъ въ своей работѣ, что имъ удавалось, впрыскивая нагрѣтый до 75° мышечный сокъ кроликамъ, получать отъ нихъ сыворотку титра 1:80000, которая была въ состояніи преципитировать кипяченые растворы лошадиной сыворотки въ разведеніи 1:8000. Больше о полученіи преципитиновъ авторы въ этой работѣ не упоминаютъ.

Гораздо подробнѣе останавливаются они на этомъ вопросѣ въ другой своей работѣ<sup>2)</sup>, появившейся въ 1910 году.

1) Fernet und Müller. „Zur Herstellung und Verwendung präzipitierender Sera insbesondere für den Nachweis von Pferdefleisch“ — Zeitschr. für biologische Technik und Methodik Bd. I. 1908—1909.

2) О н и ж е „Praktische und theoretische Präzipitinuntersuchungen“ (II. Mitteilung) — Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankh. 1910. Bd. 66.

Здѣсь они посвящаютъ цѣлую главу выясненію вопроса, при какой температурѣ бѣлки теряютъ способность вызывать въ организмѣ животного специфическіе преципитины и въ какомъ отношеніи полученная отъ впрыскиванія нагрѣтыхъ бѣлковъ сыворотка отличается отъ сыворотокъ, полученныхъ отъ нативныхъ бѣлковъ. Для рѣшенія перваго вопроса Fernet und Müller брали эмульсии изъ лошадиного, коровьяго и свиного мяса и подвергали нагрѣванію въ теченіи 5 минутъ при различныхъ температурахъ, а затѣмъ эти эмульсии впрыскивали кроликамъ интраперитонеально. Надо еще прибавить, что температура нагрѣванія измѣрялась внутри самаго матерьяла.

Результаты представлены въ видѣ таблицы (№ 8), изъ которой видно, что при 5 минутномъ нагрѣваніи до 86° эмульсія теряетъ способность вызывать преципитины; при 84° получалась очень слабодѣйствующая сыворотка, и только при впрыскиваніи матерьяла, нагрѣтаго при 80° и ниже, сыворотка получается съ высокимъ титромъ.

При этомъ авторы указываютъ, что мышечной бѣлокъ, нагрѣтый до 86°, теряетъ способность вызывать специфическія тѣла въ организмѣ, тогда какъ нагрѣтый до 100° въ

Таблица № 8.

	Получение лошадиной антисыворотки отъ инъекцій нагрѣтаго лошадиного бѣлка при слѣд. t°					
	72°	80°	84°	86°	90°	100°
Результатъ преципитации	+	+	+	0	0	0
Титры сыворотокъ . . .	1:12.000	1:10.000	1:100	—	—	—

теченіи 10 минутъ бѣлокъ можетъ еще in vitro реагировать со специфической сывороткой.

Если сопоставить всѣ эти главнѣйшія работы по полученію преципитиновъ къ нагрѣтымъ бѣлкамъ, то надо придти къ неутѣшительному выводу, что вопросъ о стойко-

сти къ нагрѣванію преципитиногенныхъ веществъ бѣлка остается совершенно неизмѣненнымъ; а тѣмъ болѣе нелзя болѣе или менѣе точно говорить о температурѣ нагрѣванія, зная которую, можно было бы заранѣе предполагать, будутъ ли обладать бѣлокъ, нагрѣтый до той или иной температуры, способностью вызывать преципитины или нѣтъ. Всѣ опыты въ этой области поставлены очень несистематично, при совершенно различныхъ условияхъ, при чемъ о нѣкоторыхъ авторы упоминаютъ совсѣмъ вскользь, не указывая даже, какъ они ставили опыты и совершенно неясно высказываются о достигнутыхъ ими результатахъ.

Такъ Obermayer und Pick впрыскивали матерьялъ обработанный при весьма неопредѣленныхъ условияхъ: „eines durch einige Zeit gekochten, nicht koagulierten Rinderserums“, а Fernet und Müller не упоминаютъ совсѣмъ въ теченіи какого времени они нагрѣвали мышечный сокъ, когда получали 75°-сыворотку. Только въ другой работѣ авторы производили систематическіе опыты и пришли къ выводу, что бѣлокъ, нагрѣтый при 86° въ теченіи 5 минутъ, уже теряетъ способность быть преципитиногеномъ, а нагрѣтый такое же время при 84° еще сохраняетъ эту способность.

Однако эти результаты стоятъ въ противорѣчій съ результатами другихъ изслѣдователей: такъ Obermayer und Pick, Loeffler und Schütze получали преципитины къ нагрѣтымъ до 100° бѣлкамъ и даже къ 150° и только Schmidt получалъ 70° антисыворотку, но онъ и не дѣлалъ опытовъ для получения антисыворотокъ отъ впрыскиванія болѣе нагрѣтыхъ бѣлковъ.

Затѣмъ результаты Fernet'a und Müller'a противорѣчатъ результатамъ Obermayer'a und Pick'a и въ другомъ отношеніи, а именно: сыворотка послѣ 5 минутнаго нагрѣванія при 86° оказывалась непреципитиногенной, но въ то же время была еще способна преципитироваться специфической сывороткой. Какъ разъ противоположно

явленіе отмѣчаютъ Obermayer und Pick; у нихъ инъекціонный матерьялъ не способенъ преципитироваться сывороткой, но можетъ еще вызывать реакцію образованія иммунныхъ тѣлъ *in vivo*.

Изъ этихъ краткихъ указаній видно, насколько расходятся одиѣ данныя съ другими въ вопросѣ о стойкости преципитиногенныхъ веществъ бѣлковъ, такъ что надо считать этотъ вопросъ по прежнему нерѣшеннымъ и можно только думать, что бѣлокъ, довольно сильно нагрѣтый, способенъ еще вызывать преципитины въ животномъ организмѣ.

Что же касается второго вопроса, возникающаго при изученіи преципитиновъ къ нагрѣтымъ бѣлкамъ, а именно: вопроса о свойствахъ получаемыхъ отъ впрыскиванія такихъ бѣлковъ сыворотокъ, то здѣсь обращалось вниманіе главнымъ образомъ на слѣдующія три стороны его: во-первыхъ, реагируютъ ли получаемые Hitze-преципитины только съ инъекціоннымъ матерьяломъ или же и съ нативными и болѣе нагрѣтыми бѣлками; во-вторыхъ, не теряется ли специфичность такихъ иммунныхъ сыворотокъ, и, въ третьихъ, какъ протекаетъ реакція преципитации съ этими сыворотками. Всѣ авторы, получавшіе Hitze-преципитины, касались той или другой стороны этого вопроса, но все же и здѣсь единства во мнѣніяхъ не получено.

Антисыворотка Schütze, полученная впрыскиваніемъ мышечнаго бѣлка, денатурированнаго нагрѣваніемъ и щелочью, была испытана самимъ изслѣдователемъ только по отношенію къ растворамъ этого же мышечнаго препарата; Piorkowski<sup>1)</sup> также работалъ съ препаратомъ Schütze, при чемъ не только подтвердилъ результаты его, но и нашелъ, что при помощи сыворотки, полученной по Schütze, можно дифференцировать и свѣжіе бѣлки.

1) Piorkowski „Die spezifischen Sera“. Eine zusammenfassende Uebersicht der bis Anfang 1902 erschienenen diesbezüglichen Arbeiten. — Zentralbl. für Bakteriol. 1902, Bd. 31. № 18 Ref.

Съ этимъ не соглашается Schmidt<sup>2)</sup>, который получаетъ очень слабую сыворотку, выпрыскивая мышечный препарат Schütze, но реакціи преципитации съ нативными бѣлками получить не могъ.

Изъ наиболѣе позднихъ авторовъ, работавшихъ съ препаратомъ по Schütze, Курротъ опять даетъ результаты, сходные съ результатами Schütze и Piorkowski. На стр. 68 и 69 своей диссертации онъ даетъ таблицы иммунизации 2-хъ кроликовъ мышечнымъ препаратомъ по Schütze. Сыворотки ему удается получить довольно высокаго титра: 1:10000 и 1:15000 по отношенію къ раствору препарата Schütze. Къ сожалѣнію, онъ только одну антисыворотку изслѣдуетъ параллельно и на растворъ лошадиной сыворотки и получаетъ титръ 1:20000 (а она же относительно раствора препарата 1:10000); но уже одно то, что онъ обѣими антисыворотками пользуется для изслѣдованія колбасъ, показываетъ, что онѣ дѣйствуютъ и на нативные бѣлки. Другими словами, Курротъ получалъ отъ выпрыскиванія мышечнаго препарата Schütze, въ противоположность Schmidt'у, сыворотки и достаточно высокаго титра и дѣйствующія на нативные бѣлки.

Относительно полученныхъ Schütze антисыворотокъ къ кипяченю въ теченіи  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1, 2,  $2\frac{1}{2}$  и 3 часовъ молоку сказать что-либо трудно, такъ какъ авторъ кратко говорить, что обѣ дѣйствовали, какъ сыворотки отъ выпрыскиванія сырого молока.

Obermayer und Pick получали антисыворотку, выпрыскивая вареную, но не свернувшуюся сыворотку, реакціонная способность которой по мѣрѣ удлиненія срока иммунизации животнаго увеличивалась, при чемъ сначала она реагировала только съ вареной сывороткой, затѣмъ по-

2) Schmidt, „Untersuchungen über die Erzeugung hochwertiger Muskeleiweiss-Antisera für die Fleischdifferenzierung“. — Biochem. Zeitschr. 1907. Bd. 5.

являлась способность реагировать съ коровьей сывороткой, которая нагрѣвалась при 60°—80°, но не реагировала еще съ ненагрѣтой неизмѣненной сывороткой; и, наконецъ, послѣ еще болѣе долгаго иммунизирования появлялась и эта способность. Авторы такъ высказываются: „Wird zur Herstellung des Immunserums ein Rinderserum gewählt, das durch  $\frac{1}{2}$  Stunde auf 70° bei leicht alkalischer Reaktion erhitzt worden war, so dass die Immunreaktion mit dem Normalimmunserum bereits stark abgeschwächt, so erhält man eine dritte Art Immunserums, das sowohl auf das bei 70° veränderte, als auch auf das gekochte und nicht minder auf das normale, genuine Rinderserum reagiert. Man erzeugt auf diese Weise ein Immunserum, das für die ganze Breite der Zustandsänderungen, welche das Rinderserum unter dem Einflusse der Erhitzung durchmacht, reaktionsfähig bleibt, also eine Art polyvalenten Serums“.

Въ слѣдующемъ году въ другой своей работѣ „Beiträge zur Kenntnis der Präzipitinbildung“ Obermayer und Pick<sup>1)</sup> иммунизировали кроликовъ варенымъ кристаллическимъ эдестиномъ и варенымъ ягичнымъ бѣлкомъ и получали сыворотку, которая преципитировала какъ нативные, такъ и измѣненные нагрѣваніемъ бѣлки. Авторы считаютъ, что такая широкая преципитирующая способность этихъ сыворотокъ подобна какъ-бы преципитирующей способности сыворотки, полученной введеніемъ смѣси нормальной и вареной сыворотокъ: „Etwas Ähnliches lässt sich auch in der Weise erzielen, dass man ein Kaninchen mit einem Gemisch eines Normalserums und eines gekochten Serums vorbehandelt“.

Но съ этимъ мнѣніемъ совершенно не соглашается

1) Obermayer und Pick, „Beiträge zur Kenntnis der Präzipitinbildung“. — Über den Begriff der Art- und Zustandspezifität (originäre und konstitutive Gruppierung) und die Beeinflussung der chemischen Eigenart des Tierkörpers. — Wiener klin. Wochenschr. 1904. № 10.

Schmidt, который доказал это экспериментально, иммунизируя кроликов смесью из нативной и нагретой от 85° до 90° сыворотками и определяя затем преципитирующую ширину сыворотки — „Reaktionsbreite“, думая, что она будет аналогична ширине сыворотки, полученной от впрыскивания 70° белка.

„Шириной реакции“ (Reaktionsbreite) обозначается большая или меньшая способность иммунных сывороток реагировать с белками, денатурированными нагреванием при различной температуре. Поэтому антисыворотка, имеющая границы своей реакционной способности с одной стороны ненагретый белок, а с другой — 70—75° белок, обладает меньшей „шириной реакции“, чем сыворотка реагирующая и с неизменным и с 100° белком.

Чтобы избежать свертывания сыворотки при нагревании до 85—90°, так как свернувшаяся сыворотка значительно медленнее всасывается в организм, чем также нагретая, но несвернувшаяся, Schmidt разбавлял сыворотку шестью объемами физиологического раствора; тогда после нагревания гомогенная, слегка густая, белая масса, уже охлажденная, смешивается с равным объемом нативной сыворотки и впрыскивается по 40 к. с. (20 к. с. внутривенно и 20 к. с. подкожно). Иммунная сыворотка бралась после 4—5 недельного иммунизирования. Но между „Gemisch“-преципитином и 70°-преципитином оказалась существенная разница, которая заключается в том, что в то время как 70°-преципитин реагирует и с нагретой до 100° сывороткой, преципитин, полученный от впрыскивания смеси сывороток, не дает с 100°-сывороткой реакции. Значит, „ширина реакции“ „Gemisch“-антисыворотки гораздо меньше ширины 70°-антисыворотки.

Что же касается самой реакции преципитации, то она, по наблюдениям авторов, течет медленнее, осадки получаются скудные, подобные преципитатам в фильтрах бактерий.

У Löffler'a два рода сывороток отличаются друг от друга по ширине своей реакционной способности, так как 150°-преципитин сухого белка обладает большой шириной, преципитируя и нативные белки, а 150°-преципитин белка в растворе реагирует только с белком обработанным как выпрыскиваемая жидкость. Объяснения этому явлению автор не дает.

Проф. Schmidt, работая над получением Hitze-преципитинов, подверг наиболее обстоятельному анализу получаемая антисыворотки, стараясь не только констатировать существующие отклонения Hitze-преципитинов от нативных преципитинов (преципитинов полученных введением неизменных белков), но и объяснить причину этих отклонений. В настоящее время надо считать, что работы проф. Schmidt'a есть единственные обстоятельные работы по вопросу о нагретых белках и преципитинной реакции; поэтому на них приходится остановиться подробнее.

Как было уже упомянуто, Schmidt нагревал сыворотку в разведении 1:1 в течение 1/2 часа на водяной бане при 70° С и затем впрыскивал эту жидкость 2 раза в неделю по 10 к. с. подкожно и внутривенно; при чем половина кроликов (4 штуки) иммунизировалась таким образом обработанной сывороткой, а другие 4 такой же сывороткой, к которой перед нагреванием прибавлялось 2% кристаллической соды (раствор получался 1/71 норм. по отношению к соде). Проба крови бралась уже после 4-го впрыскивания. Полученные антисыворотки параллельно с нативными антисыворотками испытывались на их действие на нативную и нагретую сыворотки. Опыт ставился так, что сыворотка в разведении 1:10 нагревалась до определенной температуры, при этих условиях не происходит свертывания сыворотки; затем эта нагретая сыворотка разводилась 1:100, бралось ее 2 к. с. прибавлялось 10

капель преципитирующей сыворотки. Через 24 часа замечалась высота осадка в миллиметрах. Эти опыты собраны в табл. № 9.

Из этой таблицы видно, что главное различие между нативным преципитином и 70° преципитином заключается в том, что в то время как при действии на 70—75° сыворотку нативный преципитин дает уже более слабую реакцию, 70° преципитин дает самую сильную реакцию.

Таблица № 9.

Растворъ 1:100	Нативный преципитинъ	70° преципитинъ (съ содой)		70° преципитинъ (безъ соды)	
		4 впрыск.	8 впрыск.	4 впрыск.	6 впрыск.
Неагр. сыв.	окол. 9 мм.	1—2 мм.	5 мм.	4 мм.	8 мм.
30 мин. 70° сыв.	" 7 "	4 "	6 "	6 "	10 "
60 " 70° "	" 7 "	5 "	6 "	6 "	10 "
30 " 75° "	" 6 "	6 "	6 "	8 "	12 "
60 " 75° "	" 5—6 "	6 "	5 "	8 "	11 "
30 " 80° "	" 2—3 "	5 "	4 "	7 "	10 "
60 " 80° "	" 2 "	5 "	4 "	6 "	8 "
30 " 100° "	0	3—4 "	3 "	1 "	6 "
60 " 100° "	0	3—4 "	3 "	1 "	5 "

Второе огромное различие между этими антисыворотками заключается в том, что 70° преципитин обладает большей „шириной реакции“ по сравнению с нативным преципитином. Действительно, из этой таблицы видно, что нативный преципитин не дает реакции с сывороткой нагретой до 100° в теченіи 30 минут, тогда как 70° — преципитин (какъ съ содой, такъ и безъ соды) реагируетъ и еще

довольно сильно, с сывороткой, которая нагрывалась при 100° в теченіи 1 часа. Ослабленіе преципитирующей силы нативной антисыворотки сравнительно съ силой 70° — антисыворотки замечается уже, какъ было упомянуто, при действии на сыворотку, нагретую до 70—75°, но особенно резко это ослабленіе выступаетъ при реакціи съ 80°-ной сывороткой: нативный преципитинъ даетъ осадокъ черезъ 24 часа вышиной въ 2 мм, а 70° — преципитинъ черезъ то же время вышиной отъ 4 до 10 мм, т. е. вполне ясную и сильную реакцию.

Загѣмъ одной изъ характерныхъ чертъ Hitze-преципитиновъ является постепенное увеличеніе ширины реакціонной способности этихъ преципитиновъ при удлиненіи срока иммунизированія животного; это видно изъ сравненія вылить осадковъ какъ при реакціи съ неагретой сывороткой, такъ и съ 100° — сывороткой послѣ 4-хъ впрыскиваній и послѣ 6-го и 8-го впрыскиванія. Были поставлены опыты съ періодическимъ взятіемъ пробъ крови во время иммунизированія и при этомъ было замѣчено, что въ началѣ иммунизации антисыворотка проявляла преципитирующее дѣйствіе почти исключительно на сыворотку нагретую до 70°—80°, а при дальнѣйшемъ иммунизированіи появлялась способность преципитировать какъ 100° сыворотку, такъ и нативную сыворотку, при чемъ эта способность въ дальнѣйшемъ усиливалась, что сказывалось въ увеличеніи величины преципитатовъ. Это вполне сходится съ наблюденіями Obermayer'a und Pick'a, которые тоже отмѣтили постепенное нарастаніе реакціонной способности по мѣрѣ удлиненія срока иммунизированія.

Obermayer и Pick объясняютъ это явленіе тѣмъ, что впрыскиваемый ими матеріалъ, т. е. сыворотка вареная, но не свернувшаяся, содержитъ еще слѣды нативной сыворотки, которые только послѣ болѣе длительного иммунизированія могутъ вызвать появленіе и накопленіе въ сыво-

роткъ животного достаточнаго для реакціи количества нативнаго преципитина.

Что же касается Schmidt'a, то онъ даетъ другое объясненіе этому явленію. Возможно, что вареный бѣлокъ содержитъ небольшое количество такихъ промежуточныхъ продуктовъ, которые хотя близко стоятъ къ инактивированному бѣлку, но все же еще слабо преципитируются нативнымъ преципитиномъ и при долгой иммунизации вызываютъ образование въ сывороткѣ нативныхъ преципитиновъ. Какъ то, такъ и другое объясненіе не основано ни на какихъ фактическихъ данныхъ и является вполнѣ гипотетичнымъ.

Относительно теченія самой реакціи преципитации при дѣйствіи Hitze-преципитиновъ Schmidt отмѣчаетъ слѣдующую разницу между Nativ- и Hitze-преципитинами: нативная сыворотка, реагируя съ нагрѣтыми бѣлками, даетъ почти такое же быстрое помутнѣніе, какъ и съ нативными бѣлками, но зато образованіе хлопьевъ замедляется и вся вышестоящая жидкость еще черезъ 24 часа остается мутной. Hitze-преципитины же, вступая въ реакцію съ нагрѣтыми бѣлками, даютъ совершенно нормальную картину преципитации: помутнѣніе образуется быстро, хлопья преципитата появляются скоро и вышестоящая жидкость просвѣтляется. Такимъ образомъ, если признать нормальнымъ теченіе реакціи при дѣйствіи нативныхъ антисыворотокъ на нативный бѣлокъ, то такое же нормальное теченіе получается и при дѣйствіи 70° — антисыворотки на 70°—75° бѣлокъ.

Наконецъ въ своей работѣ Schmidt касается и вопроса о специфичности этихъ реакцій. Хотя авторъ работаетъ съ довольно сильно концентрированными растворами (1:100), однако гетерологическихъ помутнѣній у него никогда не наблюдалось при дѣйствіи 70° — преципитина ни съ нативнымъ, ни съ нагрѣтымъ бѣлкомъ. Для контроля

Schmidt ставилъ рядъ такихъ же разведеній съ бѣлками другихъ видовъ животныхъ. Относительно родственныхъ реакцій авторъ нашелъ, что 70° — лошадиная преципитирующая сыворотка реагируетъ съ нагрѣтой сывороткой осла въ такихъ же отношеніяхъ, какъ нативная лошадиная антисыворотка съ нативной кровяной сывороткой осла. Другими словами, Schmidt признаетъ, что преципитирующая сыворотка, полученная впрыскиваніемъ нагрѣтыхъ до 70° бѣлковъ, также специфична, какъ и антисыворотка отъ впрыскиванія неизмененныхъ бѣлковъ.

Болѣе подробно останавливаются на вопросѣ о специфичности Hitze-преципитиновъ Fernet und Müller, которые въ своей болѣе поздней работѣ ставятъ рядъ опытовъ для выясненія специфичности и на основаніи этихъ изслѣдованій даютъ таблицу, изъ которой видно, что преципитинъ съ гетерологическими бѣлковыми растворами реагируетъ только въ крѣпкихъ растворахъ этихъ бѣлковъ (1:10 и 1:100), которые далеко отстоятъ отъ титра этихъ антисыворотокъ; второе же отличіе заключается въ томъ, что реакція съ гетерологическими растворами получается не сразу, какъ съ гомологическими, а черезъ 10—15 минутъ и получается въ общемъ значительно слабѣе (табл. № 10).

Таблица № 10.

Родъ бѣлковъ, растворовъ	65° лошадиная антисыворотка реагируетъ съ:											
	Лошадин. сыворотка			Свиная сыворотка			Сывор. рогатаго скота			Сывор. ро. скота + свиная яѣ		
Разведенія . . .	100	1000	10000	10	100	1000	10	100	1000	10	100	1000
Результатъ реакціи . . .	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+	0
Наступленіе реакціи . . .	тот-часъ	тот-часъ	тот-часъ	черезъ 10 мин.	черезъ 15 мин.	—	—	—	—	черезъ 30 мин.	черезъ 60 мин.	—

Самую же реакцію Nitze-преципитиновъ съ гомологическими бѣлками они характеризуютъ только какъ реакцію наступающую медленнѣе и болѣе слабую по сравненію съ реакціей нативныхъ преципитиновъ. Хотя если сравнить дѣйствіе Nitze и — Nativ-преципитиновъ на растворъ нагрѣтыхъ бѣлковъ, то реакція первыхъ, т. е. Nitze-преципитиновъ, течетъ лучше, чѣмъ реакція съ нативной преципитирующей сывороткой.

Подводя итогъ всей литературѣ по получению преципитиновъ къ нагрѣтымъ бѣлкамъ и изученію свойствъ этихъ преципитиновъ, можно сказать, что въ вопросѣ объ отношеніи преципитинной реакціи къ нагрѣтымъ бѣлковымъ веществамъ, какъ въ вопросѣ безусловно трудномъ, требующемъ для разрѣшенія сложной методики, и имѣющемъ сравнительно мало изслѣдователей, нѣтъ полной согласованности въ результатахъ отдѣльныхъ авторовъ, но все же надо признать, что большинствомъ авторовъ установлены болѣе или менѣе опредѣленно слѣдующіе факты:

1) Не только нативный бѣлокъ, вводимый тѣмъ или инымъ путемъ въ организмъ животнаго, можетъ вызывать образование преципитирующихъ веществъ въ сывороткѣ этого животнаго, но и бѣлки, денатурированные нагрѣваніемъ, вызываютъ такое же явленіе, при этомъ получаемыя иммунныя сыворотки обладаютъ уже нѣсколько другими свойствами. 2) Специфичность этихъ антисыворотокъ приблизительно такая же, какъ и специфичность нативныхъ антисыворотокъ. 3) Способность этихъ антисыворотокъ реагировать съ бѣлками, находящимися въ различныхъ степеняхъ денатурированія нагрѣваніемъ, значительно болѣе, чѣмъ у нативныхъ антисыворотокъ, т. е. онѣ обладаютъ болѣе широкою „Reaktionsbreite“, при чемъ

эта ширина реакціонной способности и сила самой реакціи увеличивается сообразно удлинению срока иммунизации животнаго. 4) Сама же реакція съ Nitze-преципитинами течетъ медленнѣе и слабѣе, чѣмъ съ нативными преципитинами, но зато, повидимому, имѣетъ нормальное теченіе, т. е. вслѣдъ за помутнѣніемъ идетъ образование хлопьевъ, осѣданіе ихъ на дно и просвѣтленіе выстоящей жидкости, чѣмъ эта реакція рѣзко отличается отъ реакціи нативныхъ преципитиновъ съ растворами нагрѣтыхъ бѣлковъ, гдѣ образование хлопьевъ и просвѣтленіе жидкости задерживается или совсѣмъ не происходитъ.

Совершенно особнякомъ стоятъ въ вопросѣ о специфичности антисыворотокъ, полученныхъ отъ денатурированныхъ бѣлковъ, работы Obermayer'a und Pick'a. Эти авторы, изслѣдуя Nitze-преципитины, подтверждаютъ способность ихъ реагировать какъ съ нативными, такъ и съ нагрѣтыми бѣлками, находя все же, что съ измѣненными нагрѣваніемъ бѣлками Nitze-преципитины реагируютъ сильнѣе. Что же касается специфичности Nitze-преципитиновъ, то Obermayer und Pick находятъ уменьшеніе ея по сравненію со специфичностью нативныхъ преципитиновъ и для объясненія этого факта предлагаютъ свою теорію.

На основаніи своихъ опытовъ они предлагаютъ различать двѣ специфичности: одна зависитъ отъ происхожденія бѣлка отъ того или иного вида животнаго, это такъ называемая „видовая специфичность“ или „специфичность происхожденія“ („originäre oder Art-Spezifität“), а другая зависитъ отъ фазы состоянія бѣлка, получившейся подъ влияніемъ физико-химическихъ влѣдствій, — это „специфич-

ность конституции" или "специфичность состояния". ("Konstitutions- oder Zustandsspezifizität").

Эти специфичности сильно отличаются друг от друга. Относительно "видовой специфичности" надо сказать, что она не изменяется ни от каких физико-химических воздействий, пока разрушение белка не заходит далеко. Наоборот, "специфичность конституции" легко изменить.

И так как под влиянием физико-химических воздействий вызывается не одна фаза состояния белка, а несколько вместе находящихся фаз, то в результате и получается при иммунизации животных такими изменчивыми белками большая ширина реакционной способности сывороток. В течении иммунизации в сыворотке животного сначала получают преципитины к тем веществам, которых содержит много в антиген; а затем постепенно и преципитины к веществам, которых мало в антиген. Таким образом антисыворотки, полученные от недолгого иммунизирования и от более продолжительного одним и тем же изменчивым белком, отличаются друг от друга. Этим нарастаем реакционной способности преципитирующих сывороток Obermayer und Pick объясняют тот факт, что сыворотки, полученные от иммунизации нагретой до 70° коровьей сывороткой, действуют не только на многочисленные продукты распада от действия пепсина и трипсина коровьей сыворотки, фибрина, мышц и других белков, но также на белковые дериваты от действия перекиси марганца.

Затем Obermayer und Pick иммунизировали кроликов смесью коровьей нормальной сыворотки то с Witte-пептоном или с пепсинными и трипсинными продуктами переваривания свернутой коровьей сыворотки, то, наконец, с вареной коровьей сывороткой и Witte-пептоном вместе. Все эти вещества в отдельности, т. е. Witte-пептон, пепсинные и трипсинные продукты, а

также вареная сыворотка, не могли вызвать реакции в организм животного, а в соединении с нормальной кровяной сывороткой давали антисыворотки, которая были в состоянии действовать не только на нативную коровью сыворотку, но при достаточно долгой обработке кролика и на вареную коровью сыворотку и на продукты переваривания пепсином и трипсином и от действия перекиси марганца.

Видя, что Witte-пептон вызывает образование соответствующего преципитина, авторы решили исследовать, зависит ли это от "оригинальной группы" пептона. Для этой цели кроме Witte-пептона (или что тоже самое Rinderfibrinpepsinalbumosen) применялась для иммунизации кроликов пепсинная альбумоза (Pepsinalbumosen) из свернутой лошадиной сыворотки. Опыты показали весьма интересное явление, что лошадиная альбумоза вызывает также образование преципитинов рогатого скота, как и коровья альбумоза. Получающаяся в результате иммунная сыворотка реагирует не только с натуральной лошадиной сывороткой, но с вареной и с продуктами переваривания трипсином коровьей сыворотки, и также реагирует на вареную лошадиную сыворотку и на ее продукты трипсинного переварения. Отсюда выходит, что образование преципитинов можно вызвать и определенным неспецифическим раздражителем.

Таким образом в этих опытах сыворотка обладала так называемой "Zustandsspezifizität", благодаря которой она могла реагировать с денатурированными белками коровьей сыворотки, хотя вводился денатурированный белок лошадиной сыворотки.

Разрабатывая далее свое учение о существовании кроме "видовой специфичности" еще "специфичности состояния", Obermayer und Pick<sup>1)</sup> иммунизировали животных йодо-

1) Obermayer und Pick. "Ueber die chemischen Grundlagen der Arteigenheit der Eiweisskörper" — Wien. klin. Wochenschr. 1908.

нитро и диазо-соединениями бѣлковъ. При этомъ они нашли, что, напримѣръ, соединеніе бѣлка коровьей сыворотки съ іодомъ вызываетъ въ организмѣ кролика образованіе преципитиновъ, которые обладаютъ свойствомъ реагировать не только съ однимъ соединеніемъ коровьяго бѣлка съ іодомъ, но съ такими же соединеніями (іодистыми) бѣлковъ всѣхъ млекопитающихъ, птицъ и даже растений; однако здѣсь реакція съ коровьимъ бѣлкомъ рѣче выражена, чѣмъ съ другими, т. е. сохраняется еще и „видовая специфичность“. Соединеніе бѣлка куриного яйца съ іодомъ не даетъ уже совсѣмъ „видовой специфичности“; также и нитро-соединеніе коровьяго бѣлка теряетъ свою „видовую специфичность“ и даетъ преципитинъ, реагирующий съ нитро-соединеніями всѣхъ бѣлковъ.

Freund<sup>1)</sup>, повторяя работы Obermaier'a und Pick'a, подтвердилъ въ общемъ ихъ результаты съ іодистыми соединеніями бѣлковъ.

Въ общемъ ученіе Obermaier'a und Pick'a сводится къ тому, что преципитиногенъ при денатурированіи его можетъ обладать наряду съ „видовой специфичностью“ и „специфичностью состоянія“; при болѣе же сильномъ денатурированіи преципитиногенъ можетъ полностью лишиться „видовой специфичности“ и останется только „специфичность состоянія“.

Я остановился подробнѣе на ученіи Obermaier'a und Pick'a, такъ какъ въ дальнѣйшемъ своемъ изложеніи мнѣ часто придется сослаться на него.

1) Freund. „Das biologische Verhalten jodierter Eiweisskörper“ — Biochem. Zeitschr. 1909, Bd. 20.

## Глава 4.

### Изслѣдованіе при помощи преципитиновъ, полученныхъ отъ измѣненныхъ нагреваніемъ и щелочью бѣлковъ (Hitze-Alkali-преципитины<sup>1)</sup>).

Казалось-бы, что разъ нативный преципитинъ можетъ еще реагировать съ сывороткой, которая нагревалась при 90° въ теченіи 1 часа; а Hitze-преципитинъ реагируетъ также съ сывороткой, нагреваемой такое же время при 100°, то вмѣстѣ съ этими теоретически разрѣшенными вопросами о возможности дифференцировать нагрѣтую сыворотку различныхъ видовъ животныхъ представляется разрѣшеннымъ и для практики важный вопросъ о примѣнности биологической реакціи преципитации при опредѣленіи фальсификаціи вареныхъ и копченыхъ мясныхъ продуктовъ. Дѣйствительно, трудно предположить, чтобы при какой-либо примѣняемой въ технику обработкѣ нагреваніемъ температура внутри мясныхъ продуктовъ превосходила эти цифры, въ особенности принимая во вниманіе плохую теплопроводность мясныхъ продуктовъ.

Но не надо упускать изъ вида одно очень важное обстоятельство, а именно, то, что всѣми авторами опыта ставились при соблюденіи одного условія: растворы бѣлковъ брались всегда въ такихъ разведеніяхъ, чтобы даже при нагреваніи до 100° въ теченіи продолжительнаго времени не происходило свертыванія бѣлка, такимъ образомъ бѣлковыя вещества всегда оказывались растворенными, а вслѣдствіе этого отпадала необходимость перевода измѣненныхъ бѣлковыхъ веществъ въ растворъ.

Не такъ обстоитъ дѣло на практикѣ, гдѣ на ряду съ такими случаями, когда часть бѣлковъ въ мясныхъ продуктахъ послѣ нагреванія сохраняютъ еще способность раство-

1) Въ дальнѣйшемъ изложеніи для краткости такіе преципитины я буду называть Hitze-Alkali-преципитинами.

ряться в физиологическом растворе поваренной соли, часто бывают другие случаи, когда фиблок после нагревания перевести в раствор не представляется уже возможным, не прибегая к каким-либо более сильным химическим растворителям. Случаи с растворимыми еще после нагревания фибками представляются миф на основании теоретически добытых результатов, а также на основании имеющейся литературы по исследованию нагретых мясных продуктов, еще годными для применения биологического метода определения видов фибла, пользуясь вышеуказанными изменениями в технике производства этой реакции.

Наоборот, в тех случаях, когда фибки становятся совершенно нерастворимыми, прямое precipitation делается невозможным, так как растворение свернувшихся фиблов с помощью химических реактивов настолько денатурирует эти фибки, что precipitation их, хотя бы и Hitze-precipитивами, не удается.

Проф. Schmidt<sup>1)</sup> исследовал, как быстро теряет фиблок способность precipitation натурными precipitationами, если этот фиблок подвергать действию различных щелочей в различных концентрациях. Опыты главным образом ставились с 1% натральной щелочью и содой. Так как безусловно денатурация фибла зависит от действия OH-ионов, то можно предположить заранее, что гидраты щелочей значительно сильнее денатурируют, чем меньше содержание OH-ионов в растворе аммиака, соды, буры, дивуофосфорнатриевой соли и т. д.

Опыты с 1% щелочью ставились так: сыворотка всегда имела разведение 1:10; концентрация 1% щелочи, в смеси уже, варьировала от 1/2 норм. до 1/100 норм. Эти смеси оставались при 25—30° температур и через

известные промежутки времени 10 к. с. сыворотки брались, разбавлялись 9-кратным количеством физиологического раствора (получалось разведение 1:100) и этот раствор после neutralization разбавленной уксусной кислотой до слабо-щелочной реакции испытывался precipitationом, причем к 2 к. с. этого раствора прибавлялось 10 капель precipitationирующей сыворотки. Результаты сравнивались на основании количества осадков, которые обозначались в процентах к таковому же осадку раствора сыворотки 1:100 без 1% щелочи.

Из этих опытов выяснилось, что инactivation сывороточных фиблов 1% натральной щелочью идет очень быстро и при комнатной температур: так 1/2 норм. NaOH (= 2%) разрушает способность сыворотки к реакции почти моментально: через 15 минут действия щелочи осадка, через 1 час реакции уже не получается, и вся жидкость остается прозрачной; 1/20 норм. NaOH (= 0,2%) через один час дает только 20% осадка, а через 7 часов только 5%. 1/40 норм. NaOH (= 0,1%) через час сокращает осадок на 50%, через 16 часов дает 15% и через 24 часа 5%. 1/100 норм. NaOH (= 0,01%) при комнатной температур действует слабо, так что через 24 часа получается еще осадок, который представляет 80% сравнимого осадка. Однако при более высокой температур необходимы значительно меньшая концентрация 1% NaOH, чтобы сыворотка полностью инactivationировалась в короткое время: так та же 1/100 норм. щелочь при нагревании до 70° в течение 15 минут настолько сильно инactivationирует, что реакционная способность падает до 10%.

Параллельно ставились опыты с инactivationированием содой, при чем оказалось, что 1/2 норм. раствор соды при комнатной температур действует слабее, чем 1/100 раствор NaOH, и через 24 часа количество precipitationа = 90%.

<sup>1)</sup> Prof. Schmidt. „Einige Versuche über die Geschwindigkeit der Inaktivierung (Denaturierung) der präcipitablen Substanz durch Alkalien“ — Biochem. Zeitschr. Bd. 24. 1910 r.

Значительно сильнее инактивирует сода при нагревании: так ставились опыты с различными концентрациями соды, действующими на сыворотку при 70° в течение 30 минут, при этом оказалось, что в то время как 1/2 норм. соды в течение 24 часов едва денатурирует при температурах 20—30°, при 70° уже 1/14 и 1/28 норм. раствор соды значительно денатурирует фиброк в течение этих 30 минут, так что при 1/14 норм. раствора осадок равнялся нулю; а при 1/28 — 10—20%.

Таким образом видно, что достаточно самой незначительной концентрации щелочи, чтобы фиброк так денатурировался, что способен преципитироваться нативной сывороткой почти полностью исчезает. Значит, на основании этих данных можно сказать, что нечего и думать преципитировать нативной антисывороткой свернувшиеся от нагревания фибры мясных продуктов, воспользовавшись для растворения их хотя бы щелочными растворами.

В 1912 году проф. W. A. Schmidt<sup>1)</sup> опубликовал работу под заглавием: „Ueber ein Präcipitin, welches es ermöglicht, auch gekochtes (unlösliches) Eiweiss zu differenzieren“, в которой он, убдившись на основании литературы и, главным образом, на основании своих работ в невозможности преципитировать нагретые до нерастворимости фибры предложенными до сих пор преципитинами, предлагает полученный им самим преципитин, с помощью которого можно дифференцировать нерастворимые от нагревания фибры.

4 года до этого в другой своей работе Schmidt говорит, что практика выдвигает необходимость иметь преципитин, действующий на нерастворимые фибры.

В последней своей работе Schmidt исходил из

1) Prof. W. A. Schmidt „Ueber ein Präcipitin, welches es ermöglicht, auch gekochtes (unlösliches) Eiweiss zu differenzieren“. — Zeitschr. für Immunitätsforsch. und experim. Therapie. 1912. Bd. 13. N. 2.

тѣхъ соображеній, что наилучшимъ растворителемъ свернувшихся фиброкъ является натронная щелочь, такъ какъ сода слишкомъ слабый растворитель, хотя натронная щелочь, какъ это видно изъ его работы, значительно сильнее денатурируетъ, чѣмъ сода. Но такъ какъ свернувшійся фиброкъ, растворенный въ щелочномъ растворѣ, уже не въ состоянн преципитироваться обыкновенными преципитинами, то необходимо получить особый, годный для этой цѣли, преципитинъ.

Schmidt'у удалось это сдѣлать, вводя животному въ качестве преципитиногена сыворотку, которая сначала нагревалась, а потомъ обрабатывалась фибкимъ натромъ до потери реакціонной способности.

Schmidt получил такой преципитинъ ошущью, причѣмъ сначала онъ, вводя нагреваніемъ и щелочью денатурированную сыворотку, не могъ получить никакого преципитина; впоследствии онъ нашелъ объясненіе этому факту: оказалось, что сыворотка подвергалась слишкомъ сильной обработкѣ щелочью, отъ которой фиброкъ терялъ свой антигенный характеръ. Измѣнивъ обработку щелочью, Schmidt впадалъ въ другую крайность, а именно: онъ получалъ преципитинъ, реагирующій только съ фибкомъ нагрѣтымъ, но не реагирующій съ нагрѣтымъ и обработаннымъ щелочью; это объяснялось тѣмъ, что обработка преципитиногена щелочью была слишкомъ слабая, а потому такой преципитиногенъ далъ только Nitze-преципитинъ. И только послѣ цѣлаго ряда неудачныхъ опытовъ Schmidt'у удалось, наконецъ, получить преципитинъ, реагирующій съ фибкомъ, который нагреваніемъ сдѣлался нерастворимымъ и только при помощи щелочи переведенъ въ растворъ. Преципитинъ съ такими свойствами названъ имъ „Nitze-Alkali-Präcipitin“.

Методика, выработанная Schmidt'омъ для получения его преципитина, сдѣлующая: каждый разъ передъ впрыскиваніемъ готовится инъекціонный матеріалъ. Для этого бралось 60 к. с. лошадиной сыворотки и разбавлялось та-

ким же количеством физиологического раствора поваренной соли, затѣмъ эта смѣсь нагревалась въ 70°-водной банѣ въ теченіи 30 минутъ, при этомъ вслѣдствіе разведенія сыворотки 1:1 не наступало свертыванія ея, а только она превращалась въ болѣе густую, но жидкую, сѣрую массу. Затѣмъ въ смѣсь вливалось 10 к. с. нормального раствора ѣдкой натрѣнной щелочи и она опять подвергалась нагреванію въ водной банѣ при той же температурѣ въ теченіи 15—20 минутъ. Во время этого нагреванія можно замѣтить отщепленіе амміака, что говоритъ за молекулярныя измѣненія бѣлковъ, и жидкость опять становится легко подвижной и прозрачной. Наконецъ къ жидкости прибавляется 7—8 к. с. нормального раствора соляной кислоты для удаленія избытка щелочи, отчего выпадаетъ незначительный осадокъ свернушагося бѣлка; послѣ охлажденія эта жидкость вмѣстѣ съ осадкомъ вводится кроликамъ по 20 к. с. внутривенно. Вслѣдствіи Schmidt пересталъ нейтрализовать избытокъ щелочи, такъ какъ убѣдился, что онъ не вреденъ для кроликовъ, и въ то же время жидкость безъ прибавленія кислоты можетъ вводиться въ вены, какъ неизбѣжная осадка бѣлковъ.

Послѣ 5—10 вырыскиваній получалась сыворотка, содержащая Hitze-Alkali-преципитинъ; при этомъ авторъ замѣтилъ, что послѣ первыхъ вырыскиваній получается сыворотка, дѣйствующая только на нагрѣтый бѣлокъ, а послѣ дальѣйшей иммунизации появляется преципитинъ и къ денатурированнымъ щелочью бѣлкамъ.

Hitze-Alkali-преципитинъ, по наблюденію Schmidt'a, обладаетъ слѣдующими главными свойствами: 1) онъ не реагируетъ съ нативной сывороткой, чѣмъ отличается отъ преципитина, полученнаго введеніемъ только нагрѣтаго бѣлка; 2) реагируетъ съ нативной сывороткой, но обработанной на холоду ѣдкой натрѣнной щелочью, чѣмъ также отличается отъ Hitze-преципитина, который, какъ и нативный преципитинъ, не реагируетъ съ такой сывороткой; 3)

вступаетъ въ реакцію, какъ и Hitze-преципитинъ, съ нагрѣтой сывороткой, какъ до 70° такъ и до 100°, безъ обработки этой сыворотки щелочью; 4) реакція Hitze-Alkali-преципитина съ 100°-сывороткой такая же сильная („Starke Reaktion“), какъ и съ 70°-сывороткой, въ чемъ отличается отъ Hitze-преципитина, который съ 100°-сывороткой даетъ болѣе слабую реакцію („gute Reaktion“) 5) реагируетъ съ сывороткой, которая послѣ нагреванія растворялась только въ щелочномъ растврѣ, чего не дѣлаетъ Hitze-преципитинъ.

Всѣ реакціи Hitze-Alkali-преципитина параллельно съ реакціями Nativ- и Hitze-преципитиновъ приведены въ таблицѣ № 11.

Для испытанія, насколько способенъ Hitze-Alkali-преципитинъ реагировать съ бѣлкомъ, который послѣ нагреванія совершенно не растворимъ въ обыкновенныхъ растворителяхъ, т. е. въ физиологическомъ растврѣ безъ прибавленія соды и съ прибавленіемъ ея, Schmidt ставилъ опыты преципитации полученной имъ преципитирующей сывороткой съ лошадиной сывороткой, которая три часа нагревалась въ кипящей водной банѣ до полного высушиванія, а затѣмъ растворялась въ натрѣнной щелочи (подробнѣе методика будетъ описана ниже). Съ такой сывороткой Hitze-Alkali-преципитинъ давалъ быстро помутнѣніе, а черезъ нѣсколько часовъ и образованіе хлопьевъ. Специфичность такой антисыворотки, по словамъ Schmidt'a, была одинакова со специфичностью нативной антисыворотки: „Es scheint somit, dass, solange ein mit Chemikalien misshandeltes Eiweiss überhaupt noch antigenen Charakter besitzt, auch die Artspezifität erhalten bleibt“.

Изъ свойствъ Hitze-Alkali-преципитина Schmidt обратилъ особенное вниманіе на отсутствіе реакціи съ нативной сывороткой, такъ какъ это противорѣчило, какъ было сказано, результатамъ Schütze, Piorkowski и др., работавшихъ съ препаратомъ Schütze.



остается таковым больше 4-х часов. За этот промежуток времени преципитат, полученный от действия нативного преципитина на обрабатываемую щелочью сыворотку падает с 15% до 0. Продержавшись некоторое время на maximum'е, реакция с Hitze-Alkali-преципитином начинает падать, но очень медленно, так что через 4 суток действия 1-дкого натра количество получающегося преципитата равняется 5% максимального преципитата. Интересно отметить, что 5% максимального осадка дает нативный преципитин уже через час действия щелочи, а через 2 часа осадок равняется 3%, а потом падает до 0. Падение реакции с Hitze-Alkali-преципитином зависит от слишком продолжительного действия щелочи на сыворотку и соответствует тому явлению, что при слишком длительном действии щелочи теряется и антигенное свойство сыворотки, как это наблюдал Schmidt при получении своего преципитина.

Касаясь вопроса, что за продукты вызывают образование Hitze-Alkali-преципитинов, Schmidt предполагает, что при обработке сыворотки щелочью образуется целый ряд щелочных альбуминатов, различных друг от друга, и только при осторожной обработке образуются альбуминаты, которые не теряют своих преципитиногенных свойств. В образовании же Hitze-Alkali-преципитина, по мнению Schmidt'a, участвуют две части сыворотки: одна — еще свертывающаяся часть сыворотки, вызывает в организм животного после нескольких первых инъекций преципитин, который реагирует только с нагретым блячком; другая часть сыворотки, уже более несвертывающаяся, обладает меньшей преципитиногенной способностью, а потому только после более длительной иммунизации дает преципитин, действующий и на обработанный 1-дким натром блячок.

Полученному Hitze-Alkali-преципитину Schmidt при-

дает большое значение при применении реакции преципитации на практике, а именно, в тех случаях, когда реакция с помощью нативной сыворотки не удается или вследствие слишком длительного нагревания материала, подлежащего исследованию, хотя блячки еще и растворимы в физиологическом растворе, или же вследствие полной нерастворимости блячков в обыкновенных растворителях.

Во всех случаях Schmidt пробует растворить исследуемый объект в физиологическом растворе поваренной соли и затем преципитировать нативной антисывороткой; если реакция с нативным преципитином не удается, то прямо исследовать с помощью Hitze-Alkali-преципитина, не пробуя Hitze-преципитина, так как Hitze-Alkali-преципитин также хорошо, и даже еще лучше, чем Hitze-преципитин, реагирует с нагретыми блячками.

Вообще, имя Hitze-Alkali-преципитин Schmidt не считает нужным иметь Hitze-преципитин: „Durch das Hitze-Alkali-Präcipitin ist das Hitze-Präcipitin somit ganz überflüssig geworden“. В случае же, если блячок объекта полностью не растворим в физиологическом растворе, то растворяют его в  $\frac{1}{10}$  норм. растворе 1-дкого натра с нагреванием в водяной бане при 70° в течение 15—20 минут и затем прямо исследуют Hitze-Alkali-преципитином после нейтрализации. Способность Hitze-Alkali-преципитина реагировать при вышеописанных условиях с совершенно нерастворимым в обычных растворителях блячком и представляется, по мнению Schmidt'a, самое главное преимущество этого преципитина на практике, в чем убедился сам Schmidt, получив указания на лошадиное мясо, пользуясь этим преципитином при исследовании колбасы с 25% лошадиного мяса, нагревавшейся в кипящей бане в течение 45 минут. Суповое же мясо („Suppenfleisch“) определять с помощью Hitze-Alkali-преципитина Schmidt'у не удалось.

Признавая, что биологический преципитинный способ открытия мяса различных видов животных должен иметь большое значение при контроле над мясными продуктами, как единственно верный метод среди известных до сих пор, главным образом, химических методов, и в то же время вполне соглашаясь с мнением других исследователей, что применение биологического метода часто встречается на практике непреодолимое препятствие, если подвергаются исследованию нагретые мясные продукты, необходимо согласиться с Schmidt'ом, что предлагаемый им Hitze-Alkali-преципитин, если подтвердится способность этого преципитина реагировать с измененным щелочью бычком, должен значительно расширить область применения биологического метода на практике.

В виду всего этого профессор Евгений Алексеевич Шепилевский предложил мне заняться изучением свойств различных преципитинов, полученных по способу Schmidt'a, в предположении, что таким образом можно бы нащупать основу для применения биологической пробы и к денатурированным бычкам.

Одним из существенных недостатков обеих работ Schmidt'a о преципитинах к измененным бычкам [„Studien über Präcipitinreaktion und erhitzte Eiweissstoffe“ и „Ueber ein Präcipitin, welches es ermöglicht, auch gekochtes (unlösliches) Eiweiss zu differenzieren“] является полное отсутствие каких-либо цифровых данных: так Schmidt не показывает, с каким титром получаются у него сыворотки к измененным бычкам, а в последней работе, приводя таблицу, где сравнивается действие 3-х различных преципитинов (Nativ-Hitze und Hitze-Alkali-Präcipitin), он дает такие обозначения получаемым результатам: „gute Reaktion“, „starke Reaktion“; не давая никаких цифровых измерений этих преципитинов, Schmidt тем самым лишает возможности дальнейшим исследова-

телям сравнить получаемые ими результаты с его собственными данными.

Таким образом моей задачей было также всё исследовать вестн возможно точно, пользуясь всюду цифровыми, а вместе с тем и вполне сравнимыми, данными.

## Собственные опыты.

### Глава 5.

#### Общая методика.

Мной всего было иммунизировано 33 кролика, причем иммунизация производилась сыворотками и мышечными экстрактами, как нативными, так и денатурированными по Schmidt'y, а также выжатым мясным соком, щелочным и содовым экстрактами из мяса.

Я иммунизировал только кроликов, как животных наиболее пригодных для выработки преципитирующих сывороток, и которыми почти исключительно пользуются все работающие с реакцией преципитации; так как опыты с иммунизированием более крупных животных — как лошадей, ослон, баранов, коз и собак (Uhlenhuth, Wassermann, Schüller, Schütze и др.) не дали благоприятных в смысле получения преципитирующих сывороток результатов, а введение бычковых морским свинок дает очень слабо действующую сыворотку. Кролики получались из г. Юрлова, г. Вендена и из Кёльнской губернии; какой-либо существенной разницы в способности кроликов, полученных из различных мест, вырабатывать специфические сыворотки, кроме обычных индивидуальных колебаний этой способности, не замечалось. Кро-

лики взвѣшивались передъ началомъ иммунизации, а затѣмъ ежедневно, и въ дни вырѣскивания взвѣшивались передъ вырѣскиваніемъ, такимъ образомъ можно было наблюдать за малѣйшими колебаніями въ вѣсѣ животныхъ, при чемъ на другой день послѣ вырѣскиванія вѣсъ ихъ въ большинствѣ случаевъ болѣе или менѣе падалъ, но на 2-ой — на 3-ий день опять достигалъ прежняго и даже превосходилъ его, такъ что къ концу иммунизации вѣсъ большинства животныхъ или оставался такимъ же, какимъ былъ до начала иммунизации, или же даже повышался; и только нѣскольکو кроликовъ отъ тѣхъ или другихъ причинъ, главнымъ образомъ, отъ развитія гнойниковъ въ брюшной стѣнкѣ дали паденіе вѣса, а одинъ кроликъ во время иммунизации погибъ.

Имунизировались всѣ животныя интраперитонеально въ виду того, что этотъ способъ является однимъ изъ лучшихъ въ смыслѣ всасыванія вводимыхъ бѣлковъ; другіе способы менѣе пригодны, такъ какъ при подкожномъ введеніи иммунизирующаго матеріала вообще часто получаютъ гнойники въ подкожной кѣтъчаткѣ, а въ данномъ случаѣ, вводя щелочную жидкость, можно ожидать особенно частаго развитія ихъ и даже смертвенія копки; что же касается интравенозныхъ вырѣскиваній, то ими нельзя было пользоваться, такъ какъ сыворотка, обработанная по Schmidt'y, давала иногда небольшой осадокъ, повидимому, бѣлка и безъ нейтрализации соляной кислотой.

Для внутрѣбрюшинныхъ вырѣскиваній помощникъ держалъ кролика впизъ головой, захвативъ одной рукой переднія лапы, другой — заднія, отъ чего исчезала опасность пораненія кишечныхъ стѣнокъ, затѣмъ передъ 1-мъ вырѣскиваніемъ выривалась шерсть въ задней части брюшной стѣнки, мѣсто это вымывалось каждый разъ спиртомъ, захватывалось въ складку указательнымъ и большимъ пальцами лѣвой руки, стараясь захватить въ складку и пристѣ-

ночный листокъ брюшины, и затѣмъ иммунизирующая жидкость вводилась съ помощью шприца съ слегка затупленной иглой. Мнѣ никогда не приходилось прибѣгать къ разрѣзамъ кожи и подкожной кѣтъчатки, какъ это рекомендуютъ для облегченія введенія затупленной иглы Uhlenhuth und Weidanz, Julius Citron<sup>1)</sup>, P. Müller<sup>2)</sup> и др., такъ какъ слегка затупленная игла при небольшомъ усилии довольно легко проникаетъ черезъ неповрежденную брюшную стѣнку (большее усиліе необходимо при болѣе толстой кожѣ у сѣрыхъ и черныхъ кроликовъ).

Такія вырѣскиванія кролики получали: меньшая часть черезъ 4 дня въ 5-ый, а большая — чаще, черезъ 2 дня въ 3-ий, какъ это рекомендуетъ Schmidt, при чемъ частое введеніе бѣлковъ оказалось болѣе пригоднымъ, такъ какъ, не уменьшая способности животныхъ вырабатывать иммунныя тѣла, этотъ способъ значительно сокращаетъ время иммунизации. Пользоваться же предложеннымъ Fornet und Müller'омъ „Schnellimmunisierungsmethode“ мнѣ не пришлось, такъ какъ съ одной стороны этотъ методъ далеко не всѣми признается годнымъ для получения антисыворотокъ, напримѣръ: Bonhoff<sup>3)</sup>, Tsuzuki<sup>4)</sup>, Miessner und Trapp<sup>5)</sup>, Wiedenmann<sup>6)</sup> и др. не только подтверждаютъ результаты Forneta und Müller'a, но нѣкоторые (Bonhoff und Tsuzuki) находятъ даже, что получаемыя

1) Julius Citron. „Die Methoden der Immunodiagnostik und Immunotherapie und ihre praktische Verwertung“. Leipzig 1910.

2) Paul Th. Müller. „Technik der serodiagnostischen Methoden“ — Jena 1909.

3) Bonhoff und Tsuzuki. „Über die Schnellimmunisierungsmethode von Fornet und Müller“. — Zeltschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap. 1909. Bd. 4.

4) Tsuzuki. „Über die Schnellimmunisierungsmethode nach Fornet und Müller“. Zeltschr. für Immunitätsforsch. u. exper. Therapie 1909 Bd. 4.

5) Miessner und Trapp. „Die Komplementbildung bei Rotz und ihre Beziehung zur Syphilisreaktion“ — Zentralbl. für Bakter. 1909 Bd. LII.

6) Wiedenmann. „Über die aktive Immunisierung von Kaninchen gegen Drusestreptokokken“ Inaug.-Diss. Bern. 1909.

этим способом сыворотки больше специфичны; в то же время ряд работ, вышедших из Гигиенического Института при Страсбургском Университете (Haendel, Trommsdorf, Steffenhagen<sup>1)</sup>), не подтвердил пригодности этого метода; с другой же стороны, если даже признать годность этого способа, применение его в моих случаях было невозможно, так как для получения Nitze-Alkali-преципитина по Schmidt'y надо отъ 5 до 10 вырыскиваний.

Взятие пробы крови для определения титра сыворотки производилось на 5—6 день послѣ 4—5 вырыскивания у кроликов, иммунизируемых нативной сывороткой и нативным мышечным экстрактом, и послѣ 6—7 вырыскивания у кроликов, подвергавшихся иммунизированію денатурированными бѣлками. Иногда пробное взятие крови приходилось повторять послѣ нѣсколькихъ добавочныхъ вырыскиваний, когда при первомъ взятіи титръ сыворотки оказывался недостаточно высокимъ.

Кровь бралась изъ краевой вены уха; для этого на мѣстѣ взятія крови шерсть выстригалась, ухо вымывалось сулемовымъ растворомъ и обсушивалось, а затѣмъ острыми крошечными ножницами вырѣзался кусочекъ кожи надъ краевой веной, при чемъ или сразу же перерѣзалась и вена, или же она перерѣзывалась вслѣдъ за вырѣзаніемъ куска кожи. Необходимо пользоваться при этомъ обязательно острыми ножницами, такъ какъ тупыми легко получается раздавливаніе стѣнокъ вены и тогда получить необходимое количество крови не удается. Для вскрытія вены и для полученія достаточнаго кровотока необходимо бываетъ получить гиперемію уха и вмѣстѣ съ тѣмъ набухлость краевой вены. Для этого рекомендуются различные способы: опусканіе кролика головой внизъ, вложеніе ватнаго шарика, смоченнаго горячей водой, на корень уха, натираніе ушной

<sup>1)</sup> Цитирую по Uhlenhuth und Weidanz „Praktische Anleitung“ и т. д.

лопасти ксилоломъ, легкое поколачиваніе по уху ножницами и т. д. Уже одно вымываніе уха сулемовымъ растворомъ даетъ нѣкоторую гиперемію его, но главное къ чему я прибѣгалъ для полученія гипереміи, это было возможно больше близкое приближеніе уха къ Ауэровской горлякѣ, которой я пользовался какъ источникомъ свѣта.

Мнѣ хотѣлось бы особенно рекомендовать этотъ способъ вызванія гипереміи, какъ весьма дѣятельный, постоянно имѣющийся подъ рукой и въ то же время весьма удобный. Дѣятельно, гиперемія вызывается здѣсь отчасти свѣтовыми лучами, но главнымъ образомъ тепловыми; наступаетъ она довольно быстро, продолжительность дѣйствія этого агента всецѣло зависитъ отъ экспериментатора, такъ какъ по мѣрѣ устраненія надобности въ гипереміи достаточно отнести кролика дальше отъ горляки и ранку зажать ватнымъ шарикомъ, тогда на глазахъ быстро происходитъ сжатіе всей кровеносной сѣти уха и очень скорая остановка кровотока. Надо еще указать на слѣдующее обстоятельство, что гиперемію такимъ способомъ надо получить до вскрытія вены, т. е. въ противномъ случаѣ, т. е. когда вена вскрыта, но гипереміи нѣтъ, а вслѣдствіе этого нѣтъ и достаточнаго кровотока, вызваніе этого кровотока приближеніемъ уха къ источнику свѣта встрѣчаетъ одно неблагоприятное обстоятельство, а именно: засыханіе медленно выступающей крови въ корку и тромбозированіе тѣмъ вены.

Этотъ способъ вызванія набуханія венъ уха кролика не новыя; о немъ вскользь говоритъ Paul Müller на своей книгѣ „Technik der serodiagnostischen Methoden“ на стр. 2: „Noch zweckmässiger ist es jedoch, das Ohr während der ganzen folgenden Prozedur aus nächster Nähe mit einer elektrischen Glühbirne zu bestrahlen...“ и на эти же слова Müller'a указываютъ Uhlenhuth und Weidanz на стр. 196: „Um während der ganzen Dauer der Operation eine starke

Schwellung der Blutgefäße zu haben, ist es zweckmässig, das Ohr des Tieres aus nächster Nähe mit einer elektrischen Birne zu bestrahlen (P. Th. Müller) . . .“

Но Müller предлагает этот способ при производствѣ интравенозныхъ вырскиваний въ ухо кролика. На основаніи же своихъ опытовъ я могу рекомендовать этотъ способъ для вызванія гипереміи и при взятіи пробъ крови изъ уха.

Въ началѣ своихъ изслѣдованій я пользовался нѣсколько разъ вытираніемъ уха ватнымъ шарикомъ съ ксилоломъ и остался недоволенъ полученными результатами, такъ какъ гиперемія, дѣйствительно, получалась сильная, но остановить кровотеченіе, когда набрано достаточное количество крови, очень трудно вслѣдствіе длительного дѣйствія ксилола, такъ что напрасно терялось каждый разъ по нѣсколько кубиковъ крови. Точно также, по моему мнѣнію, излишняя потеря крови получается при перерѣзкѣ ушной лопасти (Fiehe и др.), такъ какъ и здѣсь остановка кровотечения болѣе затруднительна. Получая же гиперемію отчасти вытираніемъ уха сулемовымъ растворомъ и главнымъ образомъ нагрѣваніемъ горькой, я останавливалъ кровотеченіе легко, относю кролика, какъ было сказано, отъ горькой и прижимая ранку ватнымъ шарикомъ, при чемъ не надо было наложенія пинцета.

Вытекающая кровь въ количествѣ отъ 2 до 5 к. с. собиралась въ стерильныя маленькія пробирки, которыя затѣмъ ставились на 1 часъ въ термостатъ при 37°, образовавшійся кровяной свертокъ отдѣлялся платиновой иглой отъ стѣнокъ пробирки, и онѣ ставились на 24 часа на холодъ; по прошествіи этого времени отдѣлившаяся сыворотка отсасывалась тонкими шпешками, какъ это практикуется въ Гигіеническомъ Институтѣ проф. Е. А. Шенілевскаго, въ пробирки для центрифугированія и затѣмъ центрифугируется для удаленія случайно могущихъ попасть

форменныхъ элементовъ крови; потомъ сыворотка опять отсасывается и употребляется для изслѣдованія на опредѣленіе титра ея и, если хватитъ количества ея, специфичности.

Когда предварительнымъ изслѣдованіемъ пробы крови было установлено, что сыворотка имѣетъ достаточно высокій титръ, кроликъ обезкровливался мною по способу Ziemke; при чемъ, чтобы избѣжать опалесценціи сыворотки, животное послѣдніе 24 часа оставлялось безъ пищи. Для вантія всей крови кроликъ укладывался въ станокъ, шерсть на шеѣ коротко обстригалась, кожа вымывалась послѣдовательно спиртомъ, обильно эфиромъ и смазывалась іодной пастойкой. Такъ какъ есть указанія, что при хлороформированіи кролика сыворотка получается окрашенной въ красноватый цвѣтъ, а благодаря этому появленіе реакціи въ такихъ сывороткахъ менѣе замѣтно (Hauser<sup>1)</sup>, Kister und Wolff<sup>2)</sup>, я не хлороформировалъ кроликовъ; къ тому же не было особой необходимости, потому что кролики совершенно спокойно переносили всю послѣдующую операцію, что происходило, возможно, отъ мѣстного анестезированія эфиромъ кожи шеи. Затѣмъ стерилизованными инструментами дѣлался продольный разрѣзъ на шеѣ, отступя на  $\frac{1}{2}$ —1 с. отъ средней линіи въ ту или другую сторону; когда мышцы шеи оказывались обнаженными, то пинцетомъ они раздвигались и изопрывалась отъ окружающей клетчатки и блуждающаго нерва сонная артерія, на которую накладывалось близко другъ отъ друга двѣ лигатуры; часть сонной артеріи, лежащая центральнѣе (ближе къ сердцу) лигатуръ, захватывалась осторожно за одну стѣнку ея и окружающую клетчатку пеаномъ; артерія между лигатурами перерѣзалась, затѣмъ центральный конецъ ея направлялся въ отвер-

1) Hauser см. выше.

2) Kister und Wolff. „Zur Anwendbarkeit des serodiagnost. Blutprüfungsverfahrens“ — Zeitschr. f. Hygiene 1902. Bd. 41.

Онъ же. „Zur Anwendung der Uhlenhuthschen Reaktion“. — Zeitsch. für Med. Beamte 1902. N. 7.

стие широкой и большой пробирки и, наконец, артерия вторично перерезалась между центральной лигатурой и пеоном. Кровь сильной струей попадала в пробирку, при чем изменив своего направления она не может, так как артерия удерживается пеоном. В большинстве случаев вся кровь вытекала через эту артерию, но иногда вследствие тромбоза ее или от другой причины ток крови прекращался.

Вскрытие сонной артерии другой стороны давало возможность получить тогда еще 5—15 к. с. крови, поэтому не лишне бывает на всякий случай вскрыть потом и другую артерию, в особенности если экспериментатор заинтересован получить возможно больше крови и если кровоотечение из первой артерии остановилось, а деятельность сердца, хотя бы слабая, еще есть. В таких случаях можно еще перед вскрытием второй артерии отрезать дальше кусочки первой артерии, так как тромбозирование и спадение стенок ее происходит чаще у самого места разреза. Надавливание на брюшную и грудную полости дает возможность вытечь и остаткам крови. Таким образом удавалось получить от 60 до 100 к. с. крови, смотря по величине кролика.

Кровь для образования хорошего плотного свертка ставилась на 1—1½ часа в термостат при 37° С., затем образовавшийся сверток платиновым шпательком отделялся от стенок пробирки, которая ставилась на 24 часа в холодное место. Отделившаяся сыворотка отсаживалась осторожно илнеткой и подвергалась центрифугированию.

Нѣкоторыя сыворотки получались слегка окрашенными въ красноватый цвѣтъ. При взятіи крови отъ каждаго кролика я пользовался двумя пробирками; въ первую — собиралась ббльшая часть сыворотки, а когда первая оказывалась наполненной, то оставшаяся еще сыворотка собиралась во вторую пробирку; при этомъ было замѣчено, что сыворотка

въ первой пробиркѣ получалась желтоватаго цвѣта, безъ красноватаго оттѣнка, а сыворотка во второй пробиркѣ красноватаго цвѣта. Чѣмъ объяснить это явленіе, не знаю. Мною обѣ части сыворотокъ отъ трехъ кроликовъ, т. е. сыворотка изъ 1-ой пробирки и изъ 2-ой, были испытаны отдѣльно на ихъ титръ и специфичность и разницы между ними не было найдено; поэтому во всѣхъ такихъ случаяхъ съ неодинаковой окраской сыворотки въ 1-ой и во 2-ой пробиркахъ, обѣ части сыворотки сливались вмѣстѣ.

Опалесцирующая сыворотка получена была одинъ разъ отъ кролика № 19, а потому была профильтрована черезъ фильтръ Berkefeld'a. Всѣ остальныя сыворотки фильтровать не приходилось. Сыворотки наливались въ бутылочки оранжеваго стекла, въ 10—15 к. с. вмѣстимостью, съ притертыми пробками, которыя послѣ прибавленія 3—4 капель хлороформа на 10 к. с. сыворотки плотно закупоривались и обвязывались пергаментной бумагой. Держались онѣ въ прохладномъ мѣстѣ безъ доступа свѣта. Почти во всѣхъ сывороткахъ черезъ нѣкоторое время послѣ прибавленія хлороформа получалось помутнѣніе, которое въ видѣ незначительнаго осадка осѣдало на дно, а вся остальная сыворотка оставалась прозрачной. Это образование осадка не вліяло на титръ сыворотки; требовалось только болѣе осторожное взятіе жидкости сверху, чтобы не поднять осадка и не получить мутноватой сыворотки.

Полученныя преципитирующія сыворотки исследовались для опредѣленія титра ихъ и специфичности по способу Uhlenhuth'a und Beumer'a<sup>1)</sup>. Подробнѣе методика этихъ исследований будетъ описана при изложеніи полученія и испытанія отдѣльныхъ антисыворотокъ. Здѣсь надо еще упомянуть о томъ, что примѣняемая для реакціи по-

1) Uhlenhuth und Beumer. „Praktische Anleitung zur gerichtsarztlichen Blutuntersuchung mittels der biologischen Methode“. Zeitsch. f. Mediz. Beamte. 1903, № 5 и 6.

суда должна быть безусловно чистой, а некоторая и стерильной.

Для опыта precipitation употреблялись пробирки 6—7 мм. в диаметре и 11 ст. высоты, которые помещались в соответствующие штативы. Для разведения разведенной сыворотки или экстракта применялись стерильные пипетки, при чем для каждой сыворотки и экстракта необходима отдельная стерильная пипетка.

При постановках опытов как с нативными, так и с денатурированными белками я пользовался переслаиванием жидкостей (Schicht-probe Forneta u. Müllera), как более точным методом, при чем сначала в пробирку вливал 0, 1 к. с. иммунной сыворотки, как более тяжелой, а затем сверху, держа пробирку наклонно и осторожно спуская каплю за каплей по стенок ее, переслаивал 1 к. с. разведенной сыворотки или экстракта. При таких условиях мне удавалось почти всегда получать резкую границу между сывороткой и выше находящейся жидкостью. В последнее время появилась работа Pfeiffera<sup>1)</sup> „Ein neues Präzipitationsröhrchen“, где автор предлагает для precipitation вместо пробирок Uhlenhutha свои: 3 см. высоты и 3 мм. ширины с широким и плоским ободком. Пробирки ставятся в штативы и резкое переслаивание жидкостей достигается тем, что жидкость копаётся на ободок, а оттуда постепенно спускается по стенок пробирки, благодаря чему граница получается резкая. Сначала закапывается сыворотка, а потом исследуемая жидкость. Однако, далеко не все исследователи в такой последовательности переслаивают жидкости; так P. Müller, Citron, Uhlenhuth, Weidanz, Wedemann, проф. А. В. Григорьев<sup>2)</sup> и другие сначала наливают в пробирки раз-

1) Pfeiffer. „Ein neues Präzipitationsröhrchen“ — Zentrabl. für Bakter. Orig. 1913. Bd. 70 H. 5 и 6.

2) Проф. А. В. Григорьев. „К методам применения реак-

ведение сыворотки или экстракта, а затем, держа пробирку в наклонном положении, по стенок ее спускают иммунную сыворотку, которая, будучи тяжелее, опускается на дно пробирки; наоборот, Fornet und Müller, Baier und Reuchlin, Fiehe, Pfeiler и др. переслаивают в таком порядке, как это делал я.

Легче всего заметить только что появляющееся мутнение, если рассматривать пробирки при падающем свете на черном фоне, т. е. поместив зади пробирок черную бумагу.

## Глава 6.

### Преципитины, полученные от введения нативных сывороток.

Неизменными (нативными) сыворотками мною было иммунизировано 6 кроликов: по 2 кролика лошадиной, коровьей и свиной (кролики №№ 1—6).

Лошадиная сыворотка получалась мной из крови, которая стерильным путем, введя канюлю с резиновой трубкой в vena jugularis, собиралась в большую Эрленмейеровскую колбу, в 500—1000 к. с. вместимостью, от лошадей в Юрьевском Ветеринарном Институте. Коровья кровь добывалась на бойне г. Юрьева из перерезанных шейных сосудов коров и быков в таких же колбах. Там же я получал и свиную кровь из больших сосудов сердца или из самого сердца.

Для получения из этой крови сыворотки колбы ставились на 1—1½ часа в термостат и, по образовании свертка, он отделялся от стенок колбы платиновым

дн Uhlenhutha в судебно-медицинской практик\*. Русск. Врач. 1913 № 34.

шпателькомъ, постѣ чего колбы ставились въ холодное мѣсто. На другой день сыворотка отсаживалась большой пипеткой, центрифугировалась и хранилась въ темныхъ стеклянкахъ съ притертой пробкой съ прибавленіемъ хлороформа въ прохладномъ мѣстѣ.

Передъ впрыскиваніемъ необходимое количество сыворотки наливалось въ стерильныя небольшія чашки Петри и ставились на 15—20 минутъ въ термостатъ при 37° для улечиванія хлороформа и нагрѣванія самой сыворотки. Впрыскивалась сыворотка 4-мъ кроликамъ черезъ 2 дня въ 3-ій, а 2-мъ черезъ 4 дня въ 5-ый; при чемъ заразѣ вводилось въ брюшную полость по 5 к. с. сыворотки; при первомъ же впрыскиваніи вводилось меньше: отъ 2 $\frac{1}{2}$  до 4 к. с. Исключеніе представляетъ только кроликъ № 3, который 3 раза получалъ меньше 5 к. с., что объясняется вообще незначительной величиной этого кролика и сильнымъ паденіемъ вѣса его. Этотъ кроликъ погибъ послѣ 6 впрыскиваній, точной причины на вскрытіи установить не удалось. Впрыскиваній каждый кроликъ получалъ 6—8.

Опредѣленіе титра и специфичности нативныхъ антисыворотокъ, какъ было уже сказано, производилось по способу Uhlenhuth'a und Beumer'a. Для этого приготавлились слѣдующія разведенія той сыворотки, которая вводилась данному кролику (гомологической сыворотки), съ 0,85% растворомъ поваренной соли: 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10000, 1:15000, 1:20000 и 1:30000; а затѣмъ слѣдующія разведенія гетерологическихъ сыворотокъ 1:50, 1:100 и 1:200; при чемъ если изслѣдовалась лошадиная преципитирующая сыворотка, то обязательно она непыталась на ея специфичность и съ коровьей и со свиной сывороткой и, наоборотъ, коровья антисыворотка — на лошадиную и свиную, а свиная антисыворотка — на лошадиную и коровью. Въ случаѣ, если бы данныхъ разведеній оказалось мало, и преципитация съ гетерологическими сыворотками получалась

еще въ разведеніи 1:200, то дополнительно дѣлались разведенія 1:500 и 1:1000, какъ это было съ сывороткой крол. № 1. Всѣ эти разведенія переслаивались съ 0,1 к. с. испытуемой иммунной сыворотки и, наконецъ, въ одной пробиркѣ переслаивали антисыворотку съ чистымъ 0,85% растворомъ Na Cl.

Такой длинный рядъ пробирокъ давалъ полную картину постепеннаго убыванія силы реакціи по мѣрѣ разведенія сыворотокъ. Конечно такой опытъ ставился только съ иммунной сывороткой, окончательно полученной отъ кролика, т. е. при обезкровливаніи его по окончаніи иммунизации. Что же касается испытанія сыворотки при взятіи пробы крови изъ уха кролика во время иммунизации, то здѣсь я слѣдовалъ точно указаніямъ Uhlenhuth'a und Beumer'a, ставя рядъ только изъ 6 пробирокъ въ виду незначительнаго количества сыворотки: развенія соотвѣтствующей сыворотки 1:1000, 1:10000 и 1:20000 и развенія чужой сыворотки 1:200, 1:500 и 1:1000.

#### А. Дѣйствіе на нативные бѣлки.

Опредѣленіе титра и специфичности 5 нативныхъ антисыворотокъ приведены въ таблицѣ № 13.

Такимъ образомъ полученныя нативныя преципитирующія сыворотки обладали титромъ 1:10000—1:20000. Специфичность же ихъ была различна: въ то время какъ сыворотки №№ 2 и 5 были вполнѣ специфичны и не давали съ чужими сыворотками реакціи и въ разведеніи 1:50; сыворотка № 1 давала реакцію съ коровьей сывороткой 1:500 и со свиной 1:200, т. е. обладала сравнительно небольшою специфичностью; двѣ остальные сыворотки №№ 4 и 6 помѣщались по своей специфичности по серединѣ: сывор. № 4 давала реакцію съ лошадиной кровяной сывороткой въ развеніи 1:100 и со свиной 1:50; а сив. № 6 съ лошадиной и коровьей 1:50.

Таблица № 13<sup>4</sup>).

№ Кровити	Антисыворот.	Лошадн. сыворотка						Корова сыворотка						Свиная сыворотка								
		50	100	200	500	1000	5000	50	100	200	500	1000	5000	50	100	200	500	1000	5000			
1	Лошад.	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	—	—	—	—
2	"	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
4	Коров.	+	+	0	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—
5	Свиная	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	0	—	—	—	+	+	+	+
6	"	+	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	+	0	0	—	—	—	+	+	+	+

Это явление нормальное, так как специфичность сывороток только количественная. Об этом так говорит проф. А. В. Григорьев<sup>2)</sup>: „Как известно, частичные преципитины содержатся во всякой реактивной сыворотке, но в очень малом количестве, так что присутствие их не обнаруживается даже при продолжительном сроке наблюдения за ходом сывороточной реакции; однако, в редких случаях, под влиянием пока совсем еще не изученных причин, они вырабатываются в организмах животного в гораздо большем количестве, чем обыкновенно, как о том имеются указания в литературе<sup>3)</sup>, и тогда реактивная сыворотка, приготовленная против одного рода крови, начинает давать реакцию, лишь в более слабой форме и через более долгий промежуток времени, и со многими другими родами крови“... Способствующими условиями для полу-

1) Обозначение в этой таблице, как и в последующих, такое: — реакция не делалась; 0 — реакция не получалась; ? — слабая реакция; + реакция ясная и ++ реакция очень рязкая.

2) Проф. А. В. Григорьев. „Новые простые практические приемы приготовления и хранения сплюскающей реактивной сыворотки Uhlenhutha“. — Русский Врач. 1911 г. № 36.

3) Leers. „Die forensische Blutuntersuchung“. 1910.

чения неспецифических осадков, как говорит проф. А. В. Григорьев в своей последней статье (Русский Врач. 1913 г. № 34, стр. 1191), является крепость изследуемого блывкового раствора и высокая чувствительность преципитирующей сыворотки.

Что касается получающихся реакций, то резко отличаются реакции с гомологической и гетерологической сыворотками: в первом случае реакция в разведениях 1:500, 1:1000 и даже 1:5000 получается сразу, при чем помутнение ясно видно, когда еще пробирка только ставится в штатив, через 3—5 минут это помутнение превращается в ясную муть, а через 10 минут в хлопьевидный осадок. С разведением сыворотки 1:10000 и дальше реакция наступает медленнее, но через 20 минут наблюдение вполне можно прекратить, так как все помутнение уже появляется за это время. В общем можно сказать, что эти реакции вполне удовлетворяли требованиям Uhlenhutha.

Не так обстояло дело со реакциями с чужими сыворотками: здесь реакции появлялись значительно позже, иногда через 10—15 минут и бывали очень незначительны. При насаивании на специфическую сыворотку физиологического раствора реакции ни разу не получались.

Эти же антисыворотки изследовались для определения титра их по отношению к мышечным экстрактам, которыми иммунизировалась другая серия кроликов. Экстракты готовились следующим образом: бралось свежее мясо лошади, коровы и свиньи и пропускалось через котлетную машинку, затем бралось равная по весу количества рубленого мяса и физиологического раствора и помещались в кофбы, которая подвергалась 24-х часовому выбалтыванию в Schüttelapparat для лучшего извлечения блывковых веществ. После этого экстракт выжимался руками через бумажный платок и фильтровался через обыкновенный фильтр, смоченный физиологическим раствором; полу-

ченный прозрачный экстракт нейтральной или слабо-кислой реакции сохранялся также, как сыворотка, тоже давая через некоторое время выпадение незначительного, но большого, чем у сывороток, осадка. С этими экстрактами ставилась реакция преципитации; разведения этих вытяжек с физиологическим раствором всегда давали нейтральную реакцию. Приготавливались разведения с таким же расчетом, как и сыворотки, т. е. разведение мышечного экстракта 1:10 обозначало, что был взят 1 к. с. неразбавленного экстракта и прибавлено 9 к. с. физиологического раствора.

Из таблицы № 14 видно, что преципитирующая сыворотка животных, иммунизированных нативными сыворотками, реагирует с экстрактами из мяса животных только в сравнительно небольших разведениях; так одна только сыворотка № 4 реагировала в разведении экстракта 1:1000; все же другие сыворотки реагируют или в раз-

Таблица № 14.

№№ сыворотки.	Антисыворотка	Лошад. экстр.				Коровий экстр.				Свиной экстр.				
		50	100	500	1000	50	100	500	1000	50	100	500	1000	
1	Лошад. . .	+	+	+	0	0	+	0	0	—	0	0	0	—
2	" . . .	+	+	+	0	0	0	0	0	—	0	0	0	—
4	Коров. . .	?	0	0	—	—	+	+	+	+	0	0	0	—
5	Свиная . .	0	0	0	—	—	0	0	0	—	+	+	0	0
6	" . . .	0	0	0	—	—	0	0	0	—	+	+	0	0

денн 1:500 или 1:100. Значит, если бы определять титр этих антисывороток по мышечным экстрактам, то все они имели бы титр значительно меньший, чем они имеют по отношению к сывороточным растворам. Подобно тому как уменьшается способность этих антисывороток реагировать с более высокими разведениями экстрактов из мяса своего вида животных, такое же уменьшение замечается и по отношению к растворам экстрактов из

мяса других видов животных, напр. сывор. № 1 давала гетерологическое помутнение с коровьей сывороткой в разведении 1:500, а со свиной 1:200; с мышечным коровьим экстрактом дает только в разведении 1:50, а со свиным даже при этом разведении (1:50) не дает никакого помутнения. Те же антисыворотки, которые давали реакцию с растворами чужих сывороток в разведении 1:50 и 1:100 (№№ 4 и 6) становились почти совсем специфичными. Другими словами, эти преципитирующая сыворотки при реагировании с мышечными экстрактами становятся как-бы менее чувствительными, но зато более специфичными, по сравнению с действием их на растворы своих антигенов, т. е. неизменных сывороток.

Объяснение этому факту может быть двойное: или как полагает Schmidt в своей работе „Untersuchungen über die Erzeugung hochwertiger Muskeleiweiss-Antisera für die Fleischdifferenzierung“, блок сывороточный отличается биологически от мышечного бляка, а потому преципитирующая сыворотка, полученная от введения сывороточных бляков, реагирует с растворами выжатого мышечного сока значительно слабее, чем преципитирующая сыворотка, полученная введением животному выжатого мышечного сока. Отрицать существование биологической разницы между сывороточным и мышечным бляком не возможно; но какова эта разница и как она влияет на выработку преципитинов — в настоящее время сказать нельзя.

Вообще же на выработку специфических преципитинов в органах животного теперь имеется такой взгляд: при введении кролику сывороточных бляков получают преимущественно сывороточные преципитины, т. е. реагирующие только с сывороточными бляками; этих преципитинов вырабатывается больше всего, но рядом с ними вырабатываются и так называемые общие преципитины, которые реагируют с бляками других органов того же вида

животных, но их значительно меньше; а потому реакция преципитации съ другими бѣлками получается слабѣе. Въ данномъ случаѣ одно изъ объясненій этому пониженію чувствительности антисыворотокъ надо искать въ незначительномъ содержаніи въ нихъ такихъ общихъ преципитиновъ, которые могли бы вызывать реакцію съ мышечными бѣлками. Поэтому Schmidt и даетъ въ своей работѣ таблицу, гдѣ ясно видна разница въ дѣйствіи сывороточныхъ и мышечныхъ преципитиновъ на одинъ и тотъ же мышечный бѣлокъ (табл. № 15).

Таблица № 15.

№ 1	+ Menschen-Presssaft-Antiserum.	Моментальная очень сильная реакция. Выс. осадка чер. 24 ч. — 6 mm.
2%) растворъ выжатаго сока изъ человеческого мяса		
№ 2	+ Menschen-Blut-Antiserum.	Очень слабое помутнѣніе. Высота осадка — 0,5 mm.
Тоже		

Другое объясненіе такому пониженію преципитирующей способности полученныхъ мною антисыворотокъ можно искать въ значительно меньшемъ содержаніи бѣлковъ въ мышечныхъ экстрактахъ по сравнению съ сыворотками. Такъ Uhlenhuth, Weidanz und Wedemann рекомендуютъ при приготовленіи мышечнаго экстракта изъ изслѣдуемаго матерьяла получать разведеніе мышечнаго бѣлка 1:300, что будетъ соответствовать разведенію сыворотки 1:1000. Я также ниже приведенными опытами химическаго опредѣленія бѣлка въ сывороткахъ и экстрактахъ могу подтвердить, что экстракты содержатъ значительно меньше бѣлка и уже разведенія экстрактовъ 1:500 даютъ только намекъ на существованіе бѣлка, тогда какъ въ сывороткѣ, разведенной 1:5000, химически бѣлокъ еще опредѣлимъ. Если теперь принять во вниманіе, что содержаніе бѣлка въ испытуемыхъ

растворахъ играетъ большую роль въ реакціи преципитации, при чемъ незначительное содержаніе бѣлка уменьшаетъ чувствительность реакціи, а слишкомъ большое содержаніе его увеличиваетъ чувствительность и способствуетъ появленію гетерологическихъ помутнѣній, то находимое нами явленіе уменьшенія чувствительности и увеличенія специфичности при дѣйствіи антисыворотокъ на мышечные экстракты можетъ быть объяснено незначительнымъ содержаніемъ бѣлковъ въ этихъ экстрактахъ, а также содержаніемъ небольшого количества общихъ преципитиновъ въ антисывороткахъ.

### Б. Дѣйствіе на бѣлки, обработанные по Schmidt'y.

Дальѣйшее испытаніе антисыворотокъ, полученныхъ введеніемъ нативныхъ сыворотокъ, производилось для рѣшенія вопроса, получается ли реакція преципитации при дѣйствіи этихъ антисыворотокъ на кровяную сыворотку, обработанную по Schmidt'y нагреваніемъ при 70° въ теченіи 30 минутъ и щелочью при той же температурѣ въ теченіи 15 минутъ. Полученная послѣ такой обработки щелочная жидкость нейтрализовалась осторожнымъ прибавленіемъ нормальнаго раствора соляной кислоты, при этомъ по мѣрѣ нейтрализаціи образовывался въ жидкости небольшой осадокъ. Когда реакція становилась совѣмъ слабо-щелочной (осадокъ въ то время еще незначительный), нейтрализація прекращается; жидкость, ставшая послѣ фильтрованія прозрачной, разводилась физиологическимъ растворомъ отъ 1:50 и выше; реакція этихъ разведеній всегда бывала нейтральной. Затѣмъ преципитирующія сыворотки испытывались на этотъ антигенъ по Schmidt'y. Нейтрализація щелочной жидкости передъ постановкой опыта преципитации производилась на томъ основаніи, что всѣми авторами, изучившими вліяніе химическихъ агентовъ на реакцію преципитации, было установлено, что щелочъ мѣшаетъ реакціи, такъ какъ, повидимому, растворяетъ преципитатъ (Biondi,

Ferrai, Linossier et Lemoine, Vincent<sup>1)</sup> Аксенов<sup>2)</sup> и др.). Поэтому работающие с преципитинной реакцией (Uhlenhuth, Weidanz und Wedemann, Forneret und Müller, Schmidt и др.) высказываются, что реакция растворов должна быть нейтральной или слабощелочной или слабо-щелочной.

Результаты исследования всех 5 преципитирующих сывороток были отрицательны даже в разведении 1:50; помутнения не было ни со своими, ни с чужими сыворотками, обработанными по Schmidt'у. Время наблюдения за ходом этой реакции продолжалось 1½ часа, так как имются указания, что реакция съ денатурированными бляками течет значительно медленнее, чем с нативными. Однако и при таком продолжительном наблюдении реакция оставалась безусловно отрицательной.

Объяснить это надо только денатурированием бляков сыворотки при обработке их нагреванием и щелочью, так что бляки уже теряют способность преципитироваться нативными преципитинами. Объяснить же отрицательный результат отсутствием или недостатком бляков нельзя, так как химически блячок был определен еще в разведениях нейтрализованного антигена Schmidt'a 1:1000 (см. добавление, таблица № 81), реакция же с сывороткой не получалась и в разведении 1:50.

Такой же отрицательный результат получился при действии нативных антисывороток на мышечные экстракты, обработанные тоже по Schmidt'у с последующей нейтрализацией. И здесь наблюдение продолжалось 1½ часа. Химическое определение бляка давало еще указание на присутствие его в разведении 1:100, (см. табл. № 81), а реакция

1) Vincent. „Le diagnostic medico-legale du sang humain“. — Ann. d'hygiene et med. leg. 1904 № 1.

2) Л. В. Аксенов. „Экспериментальное изучение различных влияний на течение и исход реакции Uhlenhuth'a применительно къ судебно-медицинскимъ случаямъ.“ Дисс. СПб 1913 г.

съ антисыворотками уже в разведении 1:50 была отрицательна.

### В. Действие на 100° — блячок.

Исследование антисывороток на кипяченую сыворотку дало тоже отрицательный результат. Для этого опыта сыворотка обрабатывалась следующим образом: разведение сыворотки брали 1:50, этот раствор наливался в небольшую колбочку, которая помещалась в кипящую водяную баню так, чтобы уровень раствора был на 5 см. ниже уровня воды в бане, таким образом достигалось равномерное нагревание всей массы жидкости. Первые 3—5 минут клались на нагревание раствора до желаемой температуры, а затем нагревание продолжалось 30 минут. Такие предосторожности, как они указаны у Schmidt'a, соблюдались во всех случаях нагревания какого либо матерьяла. При нагревании же до температуры меньше 100° еще соблюдались следующие условия: чтобы получить желаемую температуру в нагреваемом растворе, температура бани держалась на 1° выше желаемой, т. е. при нагревании раствора до 70° баня держалась на 71°, при тем колебания допускались не больше ± 1°. Полученная после ½ часового кипячения сыворотка в разведении 1:50 представлялась слегка опалесцирующей, поэтому она подвергалась фильтрации через двойной фильтр и делялась из нея разведения 1:100 и 1:500.

Оказалось, что после ½ часового наблюдения никакого помутнения в растворе сыворотки 1:50 не было. Исследование же на блячок дало положительный результат. Таким образом и здесь отсутствие преципитации надо объяснять таким изменением от нагревания бляков, что реакция их с нативными преципитинами становится невозможной.

Так же отрицательные результаты получились и при действии антисывороток на мышечный экстракт, нагретый до 100° в течение 30 минут.

Установивъ, что бѣлки, нагрѣтые до 100°, а также обработанные по Schmith'y, не могутъ преципитироваться нативными преципитинами, я кипятивъ въ теченіи 30 минутъ сывортку въ 0,1% растворѣ соды, что давало возможность мнѣ брать болѣе крѣпкіе растворы сывортки, а а именно: 1:25, безъ боязни получить свертываніе ея. Растворъ содовый былъ такого состава: *natrii bicarbonici* 1,0; *natrii chlorati* 8,5; *aquae destillatae* 1000 к. с. Дѣйствительно, послѣ 1/2 часового нагрѣванія въ кипящей банѣ растворъ оставался совершенно прозрачнымъ. Послѣ незначительнаго прибавленія для нейтрализаціи раствора соляной кислоты, при чемъ осадка не образовывалось, ставилась реакція преципитациі съ сывортками отъ кроликовъ №№ 1, 2, 4, 5 и 6. Реакція получалась отрицательная. Химически же бѣлокъ былъ опредѣлимъ. Значитъ, все же денатурированіе при этихъ условіяхъ было настолько сильное, что полное устраненіе свертыванія при кипяченіи бѣлка, а также болѣе крѣпкіи растворъ его, не измѣнили отрицательнаго результата преципитациі нативными преципитинами.

#### Г. Опредѣленіе термостабильности преципитируемыхъ веществъ бѣлка.

Желая выяснитъ, при какой же температурѣ нагрѣванія бѣлки теряютъ способность преципитироваться, были поставлены слѣдующіе опыты съ постепеннымъ нагрѣваніемъ разведенія сывортки 1:100 съ физиологическимъ растворомъ до различныхъ температуръ въ теченіи 30 и 45 минутъ и съ послѣдующимъ испытаніемъ ихъ на преципитацию нативными преципитинами. Такимъ образомъ, были испытаны всѣ 5 антисывортокъ, и всѣ онѣ дали вполнѣ согласные результаты, которые можно представить въ видѣ таблицы № 16, гдѣ количество крестовъ указываетъ на силу реакціи. При этомъ надо замѣтить, что замѣтной разницы между нагрѣваніемъ въ теченіи 30 и 45 минутъ не наблюдалось.

Таблица № 16.

Развед. сыв-ки	Продол. нагрѣв.	° нагрѣв.	Результ. реакціи съ нативн. антисыв.	Развед. сыв-ки	Продол. нагрѣв.	° нагрѣв.	Результ. реакціи съ нативн. антисыв.
1:100	45 м.	65°	+++	1:100	45 м.	84°	+
"	"	70°	+++	"	"	85°	+
"	"	75°	++	"	"	86°	0
"	"	80°	+	"	"	87°	0
"	"	82°	+	"	"	88°	0

Отсюда видно, что при нагрѣваніи раствора сывортки 1:100 въ теченіи 45 минутъ при температурѣ 85° сыворточные бѣлки сохраняютъ еще способность давать преципитатъ при дѣйствіи на нихъ нативныхъ преципитиновъ; при нагрѣваніи же до 86° эта способность бѣлковъ пропадаетъ, и реакція даетъ отрицательный результатъ даже черезъ 1/2 часа стоянія. Надо еще замѣтить, что чѣмъ выше нагрѣвается растворъ сывортки, тѣмъ меньше образуется осадка и тѣмъ медленнѣе появляется онъ, такъ что при нагрѣваніи до 85° осадокъ появляется только черезъ 10—15 минутъ и очень незначительный, но еще ясно видный.

Такимъ образомъ, изъ этихъ опытовъ можно признатъ, что сыворточный бѣлокъ только при 45-ти минутномъ нагрѣваніи при 86° теряетъ способность реагировать съ нативными преципитинами.

Полученные результаты показываютъ, что при моихъ условіяхъ опыта, т. е. при разведеніи 1:100 и нагрѣваніи въ теченіи 45 минутъ, разрушеніе преципитируемыхъ веществъ сыворточного бѣлка происходитъ при 86°, т. е. болѣе согласуется съ данными Чистовича (80°), Eisenberg'a (78°) и др. и, наоборотъ, довольно рѣзко отличается отъ результатовъ Schütze, Nuttall, Fornet, Müller, Schmidt, Obermayer und Pick и др., которые для денатурированія бѣлка считают необходимымъ температуру ки-

ция и некоторые даже в течение продолжительного времени. Сравнивая эти результаты с результатами, помещенными в таблицу № 8, мы замечаем необычайное сходство, но только Fernet und Müller нашли, что при 86° флок теряет способность вызывать образование антигена в сыворотке животного, а в моих опытах при 86° флок теряет способность преципитироваться нативными антисыворотками.

Таким образом из моих результатов можно сделать вывод, что отрицательная реакция нативных преципитинов с антигеном Schmidt'a зависит не от нагревания сыворотки в течение 45 минут при 70°, так как после этого нагревания получается еще достаточно резкая реакция, а от какой-то другой причины.

#### Д. Стойкость преципитируемых веществ флок к щелочи.

Так как флок при обработке по Schmidt'y подвергается еще денатурации щелочью, то мною исследовано влияние одной только щелочи, в условиях обработки по Schmidt'y, на сывороточный флок. Для этого я брал 15 к. с. сыворотки и разводил ее равным количеством физиологического раствора, к этому раствору прибавлял 2,5 к. с. нормального раствора флора натра и затем половину этого раствора оставлял стоять в течение 15 мин. при комнатной температуре, другую половину подвергал нагреванию в водяной бане при 70° в течение тех же 15 минут. Другими словами, соблюдалась и пропорция при разведениях и продолжительность действия щелочи, как это делает Schmidt для получения своего антигена, но только одна часть подвергалась действию щелочи при комнатной температуре, другая при 70°. Через 15 минут эти растворы нейтрализовались нормальным раствором соляной кислоты до слабо-щелочной реакции, фильтровались и делялись разведения, с которыми ставилась реакция преци-

питации. Такой обработке подвергались все три кровяные сыворотки: лошадиная, коровья и свиная; так что нативные преципитины исследовались на свою сыворотку и на чужие. Наконец, ставился опыт с действием сыворотки немунцированного кролика на сыворотки, подвергнутые обработке щелочью, для решения вопроса, не вызывают ли денатурация флора натром сыворотки помутнения со всякой, даже неспецифической, сывороткой; результат был отрицательный.

Из этого опыта видно, что обработка флора натром по Schmidt'y, но при комнатной температуре, денатурирует сыворотку не до полной потери преципитации и замечается только некоторое ослабление преципитации таким образом обработанной сыворотки, выражающееся в том, что преципитат получается в меньших разведениях. Точно также обработка щелочью не вызывает особых изменений в появлении гетерологических помутнений.

Таблица № 17.

№ кролика	Антисыворотка	Сыв-ка обработ. флором натром — 15 мин. комн. т°																	
		Лошадиная					Коровья				Свиная								
		50	100	500	1000	10000	50	100	500	1000	5000	10000							
1	Лошад.	-	+	+	+	?	0	+	+	0	-	-	-	+	0	0	-	-	-
2	"	-	+	+	+	0	0	0	0	0	-	-	-	+	0	0	-	-	-
4	Коров.	+	+	0	-	-	-	+	+	+	?	0	+	0	0	0	-	-	-
5	Свиная	0	0	0	-	-	-	0	0	0	-	-	-	+	+	?	0	0	0
6	"	0	0	0	-	-	-	0	0	0	-	-	-	+	+	+	0	0	0

Эти результаты совершенно не сходятся с результатами, полученными Schmidt'ом, так как он при действии нативного преципитина на обработанный щелочью на холоду флок реакции не получал. Возможно, что обработка его была совершенно другая; это не известно, так как в своей работе он говорит, что реакция была

отрицательна съ „nativem Serum in der Kälte mit NaOH behandelt“. Но сколько было прибавлено щелочи и сколько времени дѣйствовало ея, онъ не говоритъ. Поставленные же мною опыты въ условияхъ денатурированія по Schmidt'y, во при комнатной температурѣ, дали только уменьшеніе реакціи.

Совсѣмъ другіе результаты получаются, когда сыворотка обрабатывается щелочью при 70°. Ни одна изъ 5 антисыворотокъ, а также и нормальная кроличья сыворотка, не дали помутнѣнія даже въ разведеніи 1:50 этой денатурированной щелочью при 70° сыворотки. Такимъ образомъ въ то время, какъ опредѣленная обработка щелочью при комнатной температурѣ даетъ только незначительное пониженіе преципитируемыхъ свойствъ сывороточнаго бѣлка, такая же обработка при 70° полностью денатурируетъ бѣлокъ сыворотки, такъ что тотъ даже въ крѣпкихъ растворахъ не преципитируется больше нативными преципитинами.

Что же касается измененія бѣлка сыворотки при приготовленіи антигена по Schmidt'y, то, зная теперь отдѣльно дѣйствіе нагреванія и щелочи при этихъ условіяхъ, можно думать, что главную роль въ денатурированіи бѣлка играетъ щелочь при 70°, но, конечно, не остается безъ вліянія и столь продолжительное нагреваніе бѣлка передъ прибавленіемъ щелочи.

#### Е. Дѣйствіе на экстракты изъ органовъ.

Затѣмъ было испытано дѣйствіе преципитирующихъ сыворотокъ на экстракты изъ почекъ, печени и селезенки. Приготовленіе этихъ экстрактовъ было обычное: брались по возможности обезкровленные органы лошади, коровы и свиньи, пропускались черезъ котлетную машинку, прибавлялось равное по вѣсу количество физиологическаго раствора, смѣшивалось и ставилось въ колбѣ въ Schüttelapparat на

сутки, затѣмъ процеживалось черезъ бумажную ткань и черезъ фильтръ. Такъ какъ полной прозрачности экстракта такимъ путемъ добиться не возможно, и кромѣ того въ немъ легко выпадаетъ осадокъ, то передъ опытомъ экстракты подвергались фильтрованію съ кизельгуромъ по 2 способамъ. Или экстрактъ изъ органа взбалтывался съ небольшимъ количествомъ прокаленной инфузорной земли и затѣмъ фильтровался черезъ обыкновенный фильтръ, смоченный физиологическимъ растворомъ (Салакингъ, Курротъ, Thierfeld и др.). Или же я покрывалъ бумажный фильтръ на воронкѣ кашицеобразной массой изъ кизельгура и физиологическаго раствора и черезъ него пропускалъ экстрактъ, пользуясь для ускоренія фильтрованія разряжающимъ насосомъ. Въ результатъ получался совершенно прозрачный, болѣе или менѣе окрашенный экстрактъ, съ которымъ и ставилась реакція преципитации.

Результаты приведены въ табл. №№ 18, 19 и 20.

Первый выводъ, который можно сдѣлать при разсмотрѣніи этихъ таблицъ, тотъ, что всѣ 5 преципитирующихъ сыворотокъ, полученныхъ введеніемъ нормальныхъ сыворотокъ, реагируютъ, только въ различныхъ степеняхъ, со всѣми экстрактами. И тутъ же надо отмѣтить, что реакція специфичная, такъ какъ ни разу не было помутнѣнія съ экстрактами изъ органовъ другого вида животнаго.

Преципитация же съ гомологическими экстрактами далеко не достигаетъ титра антисыворотокъ, такъ какъ наибольшее разведеніе экстракта, съ которымъ получалась еще преципитация, было 1:1000; но значительно чаще преципитация не шла дальше 1:500 и даже 1:100. Рѣже всего реакція получалась съ почечнымъ экстрактомъ, затѣмъ съ селезеночнымъ и слабѣе всего съ печеночнымъ. Что же касается отдѣльныхъ антисыворотокъ, то найти въ ихъ дѣйствіи на отдѣльные экстракты какую-либо согласованность довольно трудно: такъ сыворотки №№ 1 и 2 вообще обла-

Таблица № 18.

№№ кролик.	Антисыворотка	Натуральный экстракт из печени															
		Лошади				Коровы				Свиньи							
		50	100	500	1000	50	100	500	1000	50	100	500	1000				
1	Лошад.	+	+	0	0	0	0	0	—	—	—	0	0	—	—	—	—
2	"	+	+	?	0	0	0	0	—	—	—	0	0	—	—	—	—
4	Коров.	0	0	—	—	—	+	+	?	0	0	0	0	—	—	—	—
5	Свиная	0	0	—	—	—	0	0	—	—	—	+	+	0	0	0	0
6	"	0	0	—	—	—	0	0	—	—	—	+	+	?	0	0	0

Таблица № 19.

№№ кролик.	Антисыворотка	Натуральный экстракт из почки															
		Лошади				Коровы				Свиньи							
		50	100	500	1000	50	100	500	1000	50	100	500	1000				
1	Лошад.	++	+	+	?	0	0	0	—	—	—	0	0	—	—	—	—
2	"	++	+	+	0	0	0	0	—	—	—	0	0	—	—	—	—
4	Коров.	0	0	—	—	++	+	+	?	0	0	0	0	—	—	—	—
5	Свиная	0	0	—	—	—	0	0	—	—	—	+	+	?	0	0	0
6	"	0	0	—	—	—	0	0	—	—	—	+	+	0	0	0	0

Таблица № 20.

№№ кролик.	Антисыворотка	Натуральный экстракт из селезенки															
		Лошади				Коровы				Свиньи							
		50	100	500	1000	50	100	500	1000	50	100	500	1000				
1	Лошад.	++	+	+	0	0	0	0	—	—	—	0	0	—	—	—	—
2	"	++	+	+	?	0	0	0	—	—	—	0	0	—	—	—	—
4	Коров.	0	0	—	—	—	+	?	0	0	0	0	0	—	—	—	—
5	Свиная	0	0	—	—	—	0	0	—	—	—	+	+	0	0	0	0
6	"	0	0	—	—	—	0	0	—	—	—	+	+	?	0	0	0

давать довольно сильным преципитирующим действием во все экстракты; сыворотки же №№ 4 и 5 сильнее дей-

ствуют на почечный экстракт, но одинаково на печеночный и селезеночный, и, наконец, сыворотка № 6 сильнее всего реагирует с селезеночным экстрактом и слабее всего с почечным. С нормальной сывороткой кролика реакции не получалось.

Объяснить получение реакции только в крепких растворах экстрактов, а также отсутствие закономерности в этих реакциях, одним только недостаточным содержанием белка в экстрактах не возможно, тем более, что содержание белков во всех экстрактах, как это показали мои химические исследования, приблизительно одинаково, при чем часто еще химически белок определяли в тех разведениях, где реакция преципитации дает уже отрицательный результат. (Сравни. таблицы №№ 18, 19, 20 и № 81). Очевидно, что объяснение всему этому, также как и вообще появления реакции с экстрактами из органов, надо искать в существовании „общих преципитинов“.

Здесь необходимо подробнее рассмотреть литературу по этому вопросу.

Подобно тому, как целый ряд исследователей (Strube<sup>1)</sup>, Kister and Wolff<sup>2)</sup>, Hamburger<sup>3)</sup>, Ide<sup>4)</sup>, Kratter<sup>5)</sup>, Таранухин<sup>6)</sup>, Uhlenhuth and Beumer<sup>7)</sup>, и др.), работавших над вопросом о „биологиче-

1) Strube. „Beitrag zum Nachweis von Blut und Eiweiss auf biologischen Wege“. — Deutsche med. Wochenschr. 1902, № 24.

2) Kister and Wolff. „Zur Anwendbarkeit des seradiagnost. Blutprüfungsverfahrens“. — Zeitschr. f. Hygiene 1902, № 41.

3) Hamburger. „Zur Differenzierung des Blutes (Eiweiss) biologisch verwandter Tierespezies“. — Deutsch. med. Wochenschr. 1905, № 6.

4) Ide. Bulletin de l'Académie royale de médecine de Belgique 1903.

5) Kratter. „Über den forensisch. Wert der biolog. Methode zur Unterscheidung von Tier- und Menschenblut“. Wien. klin. Wochenschr. 1901.

6) Таранухин. „Къ вопросу о распознавании видовъ крови на основании сывороточной пробы“. Вестник Общества. Гигиены. 1906. Январь.

7) Uhlenhuth and Beumer. см. выше.

ской" (Michaelis und Oppenheimer<sup>1)</sup>) или „видовой“ специфичности преципитинной реакции (Obermayer und Pick<sup>2)</sup>), отвергнуть существование абсолютной специфичности этой реакции; точно также большинство авторов, занимавшихся вопросом о „химической“ специфичности или об „областной“ специфичности (regionäre Spezifität Grund'a<sup>3)</sup>) пришло к такому выводу, что полной специфичности нет, и сыворотка, полученная от кролика, иммунизированного выделенным чистым бълкомъ, всегда, правда, въ болѣе слабой степени, реагируетъ съ растворами другого химически чистаго бълка.

Надъ полученіемъ сыворотокъ, специфичныхъ для изолированныхъ химически чистыхъ бълковъ, работали Nolf<sup>4)</sup>, Rostowski<sup>5)</sup>, Landsteiner und Calvo<sup>6)</sup>, Linossier et Lemoine<sup>7)</sup>, Michaelis<sup>8)</sup>, Michaelis und Oppenheimer, Fuhrmann<sup>9)</sup> и др. и всѣ они сходятся въ томъ, что полученныя специфическія сыворотки образуютъ преципитатъ не съ однимъ только бълкомъ, служившимъ для иммунизации. Кромѣ того становились опыты для рѣшенія

1) Michaelis und Oppenheimer. „Ueber Immunität gegen Eiweisskörper“. Arch. für Anat. und Phys. 1902.

2) Obermayer und Pick. „Beiträge zur Kenntnis d. Präzipitinbildung“. Wien. klin. Wochenschr. 1904 № 10.

3) Grund. „Über organspezifische Präcipitine und ihre Bedeutung“. — Deutsch. Archiv für klin. Medizin 1906. Bd. 87.

4) Nolf. „Contribution à l'étude des sérums antihématiques“. — Annal. de l'Inst. Pasteur 1900, Bd. 14.

5) Rostowski. „Zur Kenntnis der Präcipitine“. Würzburg 1902.

6) Landsteiner und Calvo. „Zur Kenntnis der Reaktionen des normalen Pferdeserums“. Zentralbl. f. Bakter. 1902, Bd. 31, № 15.

7) Linossier et Lemoine. „Sur les substances précipitantes des albumines (précipitins contenus dans certains sérums spécifiques)“. Compt. rend. de la soc. de biol. 1902. T. LIV.

8) Michaelis. „Untersuchungen über Eiweisspräcipitine“. — Verhandl. d. Vereins f. inn. Med. 1901/1902. Zentr. f. Bakter. Bd. 32, № 6; Deutsche med. Woch. 1902, № 41; Berl. klin. Woch. 1902, № 21.

9) Fuhrmann. „Ueber Präcipitine und Lysine“, Hofmeisters Beitr. z. chem. Phys. und Pathol. 1903, Bd. 3.

вопроса, насколько можетъ быть специфична сыворотка по отношенію къ бълкамъ различныхъ органовъ одного и того же вида животныхъ („regionäre Spezifität“), такъ Artus und Vansteenberghe<sup>1)</sup> получили преципитинъ върыскиваемъ асцитической жидкости, который реагировалъ и съ кровяной сывороткой; Butza<sup>2)</sup> однимъ преципитиномъ дѣйствовалъ и на кровяную сыворотку и на плевроитическій экссудатъ; Schlossmann und Moro<sup>3)</sup> и др. доказали преципитинной реакціей идентичность кровяной сыворотки и альбумина молока и т. д. Особенно же подробные опыты съ полученіемъ преципитирующихъ сыворотокъ при върыскиваніи экстрактовъ изъ различныхъ органовъ поставили Grund и Forssner<sup>4)</sup>. И всѣ эти исследователи пришли къ тѣмъ же результатамъ, какъ и работавшіе надъ полученіемъ антисыворотокъ отъ введенія чистыхъ бълковъ, что получающіяся преципитирующія сыворотки реагируютъ не только со своимъ бълкомъ, но и съ бълками изъ другихъ органовъ.

Объяснякомъ стоятъ исследованія Uhlenhuth'a<sup>5)</sup> надъ бълкомъ хрусталика, которому удалось получить, вводя экстрактъ изъ хрусталика, вполне специфическую сыворотку, не реагирующую ни съ кровяной сывороткой, ни съ экстрактами изъ органовъ, ни съ бълкомъ стекловиднаго

1) Artus und Vansteenberghe. Compt. rend. de la soc. de biol. 1902, № 8. Refer. Zeitschr. f. Medizinalbeamte 1902, № 13.

2) Butza. „Un nouveau moyen pratique pour distinguer le sang de l'homme“. Compt. rend. de la soc. de biol. T. LIV, 1902. Refer. Zeitschr. f. Medizinalbeamte 1903, № 13.

3) Schlossmann und Moro. „Zur Kenntnis der Artelgenheit der verschiedenen Eiweisskörper in der Milch“. — Münch. med. Woch. 1903, № 14.

4) Forssner. „Ueber die Möglichkeit isolierte Eiweisskörper bezw. eiweisshaltige Flüssigkeiten, welche aus einem und demselben Organismus stammen, durch die Präcipitineaktion zu differenzieren“. — Münch. med. Wochenschr. 1903, № 19.

5) Uhlenhuth. „Zur Lehre von der Unterscheidung verschiedener Eiweissarten mit Hilfe spezifischer Sera“. Festschrift für Robert Koch 11. Dezemb. 1903.

тѣла, но зато эта сыворотка давала реакцію съ экстрактами изъ хрусталика другихъ видовъ животныхъ.

Отсутствие полной специфичности этихъ преципитирующихъ сыворотокъ объясняютъ тѣмъ, что впрыскиваніе какихъ-либо бѣлковыхъ тѣлъ вызываетъ въ организмѣ животного образованіе различныхъ преципитиновъ, изъ которыхъ одни строго специфичны, т. е. реагируютъ только съ вводимымъ животному бѣлкомъ, а остальные — общіе для другихъ бѣлковыхъ тѣлъ, которые и обуславливаютъ появленіе преципитации съ растворами бѣлковъ, неупотреблявшихся для иммунизации животныхъ. Чѣмъ больше въ организмѣ животного образуется специфичныхъ преципитиновъ, тѣмъ специфичнѣе получится иммунная сыворотка, и, наоборотъ, чѣмъ больше общихъ къ различнымъ бѣлкамъ преципитиновъ въ сывороткѣ, тѣмъ менѣе она специфична.

Однако, если примѣнять способъ элективного насыщѣнія, какъ это показали Ascoli<sup>1)</sup>, Michaelis<sup>2)</sup>, Weichardt<sup>3)</sup>, Maragliano<sup>4)</sup>, Strube, Mertens<sup>5)</sup>, Grund, Forssner и др., то удастся получать сыворотки специфичныя для тѣхъ или другихъ бѣлковъ. Объ этомъ такъ говоритъ въ своей работѣ Forssner: „Ziemlich allgemein nimmt man an, dass dies darauf beruht, dass die einzelnen Eiweisskörper teils gemeinsame, teils spezifische Partialpräcipitine erzeugen“.

При элективномъ насыщѣніи происходитъ связываніе общихъ преципитиновъ, благодаря чему иммунная сыворотка перестаетъ реаги-

1) Ascoli. „Zur Kenntnis der Präzipitinwirkung und der Eiweisskörper des Bluteserums“. — München. medic. Wochenschr. 1902 № 34.

2) Michaelis. „Weitere Untersuchungen über Eiweisspräcipitin“. — Deutsch. med. Wochenschr. 1904 № 34.

3) Weichardt. „Ueber die Synechiotoxine.“ — Hygien. Rundschau 1903.

4) Maragliano. Berlin. klin. Wochenschr. 1904 № 27.

5) Mertens. Deutsch. med. Wochenschr. 1904 № 6.

ровать съ тѣми бѣлками, общіе преципитины которыхъ тѣмъ связаны.

Полное насыщѣніе иммунной сыворотки къ чужому экстракту или чужому бѣлку не даетъ насыщѣнія по отношенію къ своему экстракту или своему бѣлку, такъ какъ преципитатъ получается, но немного слабѣе. Но если попробовать насыщать антисыворотку къ своему экстракту (сывороткѣ или бѣлку), то здѣсь насыщѣнія и специфичные и всѣ общіе преципитины и реакція ни со своими, ни съ чужими бѣлками уже болѣе не получается.

Заслуга Forssner'a заключается еще въ томъ, что онъ свои опыты поставилъ такъ, что исключалась всякая возможность приписывать образованіе и существованіе общихъ преципитиновъ нахожденію во всякомъ органѣ крови. Это было подтверждено и Grund'омъ.

Переходя теперь къ своимъ опытамъ преципитации экстрактовъ почки, печени и селезенки антисыворотками, полученными иммунизацией кроликовъ нормальными сыворотками, можно при помощи ученія объ общихъ преципитинахъ вполнѣ ясно объяснить всѣ особенности этихъ реакцій.

Такъ какъ всегда общихъ преципитиновъ образуется въ сывороткѣ значительно меньше, чѣмъ специфичныхъ, то и преципитирующая сила сыворотки по отношенію къ экстрактамъ значительно слабѣе. Затѣмъ, въ виду того, что реакція съ растворами экстрактовъ изъ органовъ зависитъ не только отъ количества бѣлка въ растворахъ, а также отъ количества общихъ преципитиновъ, реагирующихъ съ этимъ экстрактомъ, въ антисывороткѣ, то этимъ и объясняется фактъ, когда разведенія экстрактовъ изъ органовъ, химически еще содержація бѣлокъ, даютъ отрицательный результатъ при биологической реакціи. Наконецъ, способностью сыворотокъ вырабатывать различное количество общихъ преципитиновъ къ тѣмъ или другимъ экстрактамъ изъ органовъ и объясняется, что одна сыворотка сильнѣе

реагирует съ однимъ экстрактомъ, а другая — съ другимъ. Напримѣръ: сыворотки №№ 4 и 5 содержатъ больше общихъ преципитиновъ къ почечнымъ бѣлкамъ и меньше къ печеночнымъ и селезеночнымъ, а потому сильнѣе реагируютъ съ первымъ экстрактомъ; и, наоборотъ, сыворотка № 6, очевидно, содержитъ больше общихъ преципитиновъ къ селезеночнымъ экстрактамъ, а потому сильнѣе и реагируетъ съ нимъ, чѣмъ съ другими.

#### Ж. Дѣйствіе элективнаго насыщѣнія на сыворотки.

Для подтвержденія вышесказаннаго мною было поставлено нѣсколько опытовъ элективнаго насыщѣнія преципитирующихъ сыворотокъ по отношенію къ бѣлкамъ тѣхъ или иныхъ органовъ; результаты этихъ опытовъ вполне согласуются съ данными другихъ авторовъ и еще болѣе доказываютъ существованіе въ иммунныхъ сывороткахъ какъ специфичныхъ, такъ и общихъ преципитиновъ.

Сыворотка № 2 мною была насыщена въ различныхъ порціяхъ по отношенію ко всѣмъ 3-мъ экстрактамъ, сыворотка № 6 по отношенію къ почечному и печеночному экстрактамъ и сыворотка № 4 — къ селезеночному. Насыщеніе антисыворотокъ производилось слѣдующимъ образомъ: брались по 3 к. с. преципитирующей сыворотки въ пробирку для центрифугирования и прибавлялось по 0,3 к. с. того или иного экстракта, но всегда экстракта изъ органовъ того же вида животныхъ; эта смѣсь оставалась стоять приблизительно около 24 часовъ на холоду; иногда сразу послѣ прибавленія экстракта, иногда послѣ стоянія образуется помутнѣніе, которое и осѣдаетъ на дно. Черезъ 24 часа эта смѣсь въ этихъ же пробиркахъ подвергается центрифугированію, послѣ котораго прозрачная жидкость осторожно отсасывается въ другую пробирку, куда опять прибавляется 0,3 к. с. того же экстракта, и все опять оставляется на 24 часа на холоду; послѣ чего вторично отцентрифугирован-

ная и отсосанная прозрачная сыворотка испытывалась на кровяную сыворотку и на всѣ экстракты. Результаты испытанія преципитирующихъ сыворотокъ послѣ насыщѣнія тѣмъ или другимъ экстрактомъ представлены въ табл. № 21; здѣсь иммунная сыворотка изслѣдовалась только на гомологическіе экстракты изъ органовъ и на свою кровяную сыворотку.

Таблица № 21.

№№ сыворотки	Аппаратъ	Чѣмъ насыщались	Кол. анис.	Кол. эстр.	Экстрактъ изъ:						Кровяная сыворотка.							
					почки			печени			селезен.			100	500	1000	5000	10000
					25	50	100	25	50	100	25	50	100					
2	лош.	лош. почка	3,0	0,6	0	0	+	0	0	+	+	?	+	+	+	0	0	
"	"	" печень	"	"	+	+	+	?	0	0	0	+	+	+	+	0	0	
"	"	" селез.	"	"	+	+	0	?	0	0	0	0	+	+	+	0	0	
4	короп.	короп. селез.	"	"	+	+	0	?	0	0	0	0	+	+	+	0	0	
6	свиной	свиной почка	"	"	?	0	0	+	?	0	0	0	+	+	+	0	0	
"	"	" печень	"	"	+	?	0	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	

Такимъ образомъ выходитъ, что при насыщѣнии преципитирующихъ сыворотокъ прибавленіемъ 2 раза по 0,3 к. с. экстракта изъ того или другого органа получается сыворотка, дающая больше реакціи преципитации съ этимъ экстрактомъ.

Согласно ученію объ общихъ и специфичныхъ преципитинахъ это явленіе надо объяснить тѣмъ, что всѣ бывшіе въ сывороткѣ общіе преципитины для даннаго экстракта оказались связанными, а потому эта сыворотка теряетъ способность реагировать съ даннымъ экстрактомъ; только сыворотка № 6, которая насыщалась экстрактомъ изъ свиной почки, давала еще съ этимъ экстрактомъ въ разведеніи 1 : 25 слѣды реакціи.

Вмѣстѣ съ полнымъ уничтоженіемъ реакціи преципитации съ экстрактомъ, которымъ насыщались преципитиру-

\*) 1 : 250 . . . +; 1 : 500 . . . 0.

щая сыворотка, замѣчается довольно значительное ослабление реакціи и съ другими экстрактами и съ кровяной сывороткой, однако никогда не бываетъ, чтобы здѣсь реакція также полностью исчезала. Особенно рѣзкое ослабление реакціи замѣчается при насыщении антисыворотокъ №№ 2 и 4 селезеночнымъ экстрактомъ, и именно при дѣйствіи на кровяную сыворотку. Возможно, что это объясняется большимъ содержаниемъ крови въ селезеночномъ экстрактѣ, такъ что насыщая этимъ экстрактомъ, тѣмъ самымъ насыщаемъ къ кровяной сывороткѣ; но надо сказать, что наиболѣе неясные результаты съ получениемъ органопреципитирующихъ сыворотокъ, а также съ насыщениемъ ихъ, получались у Grund'a и Forssner'a съ селезеночнымъ экстрактомъ.

Такое ослабление преципитации съ другими экстрактами и сывороткой также объяснить можно, пользуясь ученіемъ обь общихъ преципитинахъ.

Forssner такъ говоритъ въ своей статьѣ о полученныхъ имъ результатахъ: введение экстракта печени морскихъ свинокъ вызываетъ въ сывороткѣ иммунизируемыхъ кроликовъ выработку различныхъ преципитиновъ; одни изъ нихъ реагируютъ какъ съ кровяной сывороткой, экстрактами почки и селезенки, такъ и съ экстрактомъ печени; другіе не реагируютъ съ кровяной сывороткой и экстрактомъ селезенки, а только съ экстрактами почки и печени; третьи были строго специфичны для печеночной ткани. Преципитины, получающіеся введеніемъ экстракта почекъ, оказываются такого же характера: часть ихъ была общая для всѣхъ 4-хъ растворовъ, другая — общая для печеночной и почечной ткани, а третья — строго специфична для почечной ткани.

Отсюда ясно, что, связывая преципитины къ какому-нибудь экстракту, мы тѣмъ самымъ связываемъ и часть преципитиновъ къ другимъ экстрактамъ, т. е. тѣмъ самымъ ослабляемъ преципитацию съ ними. Это признается всѣми авторами, работавшими надъ этимъ вопросомъ; и въ виду

ослабления вообще преципитирующей силы сыворотки при насыщении, Uhlenhuth такъ высказывается: „Wir sind der Ansicht, dass diese Methoden viel zu wenig exakt sind, um für die forensische Praxis in Betracht zu kommen; sie haben lediglich ein theoretisch-wissenschaftliches Interesse“.

И дѣйствительно, если мы сейчасъ еще далеки отъ примѣненія на практикѣ специфическихъ органопреципитирующихъ сыворотокъ, то все же надо признать, что разработка этого вопроса имѣетъ огромный интересъ какъ для ученія обь иммунитетѣ, такъ и для бѣлковой химіи и биологіи вообще.

Что же касается до существованія во всякой преципитирующей сывороткѣ общихъ преципитиновъ, а вълѣдствіе этого получение преципитации не только съ бѣлковымъ растворомъ, примѣнявшимся для иммунизации, но и съ другими бѣлковыми растворами того же вида животнаго, хотя и въ болѣе слабой степени, то, по моему мнѣнію, это имѣетъ большое значеніе для практики, такъ какъ даетъ возможность получать реакцію съ мясными продуктами, полученными изъ различныхъ органовъ животнаго.

Поставленные опыты съ дѣйствіемъ нативныхъ преципитиновъ на экстракты изъ органовъ или денатурированные по способу Schmidt'a или нагреваніемъ до 100° съ содой и безъ нея въ теченіи 30 минутъ — всѣ дали отрицательные результаты, зависяще, очевидно, отъ измѣненія бѣлковыхъ веществъ экстрактовъ.

Результаты всѣхъ изслѣдованій надъ реакціей преципитации нативныхъ преципитиновъ съ различными бѣлковыми растворами, какъ нативными, такъ и денатурированными, представлены въ видѣ слѣдующей таблицы.

Таблица № 22.

Антисыворотка, полученная от введения нативной сыворотки.

Растворы	Результат	Растворы	Результат	Растворы	Результат
Кровяя сывор.	++++	Мыш. экстр. 100° — 30°	0	Сыв-ка по Schm. комн. t°	+++
Нативн. мыш. экстракт	++	Сыв-ка + 0,1% соды 100° — 30°	0	Тоже - 70°	0
Сыворотка по Schmidt'y	0	Мыш. экстр. + 0,1% соды 100° — 30°	0	Экстр. печени	+
Мыш. экстр. по Schmidt'y	0	Сыв-ка - 70° — 45°	++	Экстр. почки	++
Сыв-ка 100° — 30°	0	Сыв-ка — 86° — 45°	0	Экстр. селез.	++

Въ этой таблицѣ 0 обозначаетъ отсутствіе реакціи; + — реакція въ разведеніяхъ ниже 1:500; ++ въ разведеніи 1:500 и выше, +++ въ разведеніи 1:1000 и выше, и ++++ 1:10000 и выше.

1. Реакція нативныхъ преципитирующихъ сыворотокъ съ неизмѣненнымъ бѣлкомъ подчиняется требованіямъ Uhlenhuth'a; но эти требованія не приложимы къ реакціямъ нативнаго преципитина съ нагрѣтыми бѣлками.
2. Большинство преципитирующихъ сыворотокъ специфичны только количественно.
3. Всѣ антисыворотки реагируютъ съ бѣлками другихъ органовъ (экстрактами органовъ), но въ болѣе слабой степени; примѣняя способъ элективного насыщенія по Weichardt'y, можно получать специфичныя для опредѣленнаго бѣлка сыворотки.
4. Нативный преципитинъ не реагируетъ съ бѣлками, подвергнутыми обработкѣ по Schmidt'y, а также нагрѣтыми до 100° съ содой и безъ нея, но реагируетъ при обработкѣ бѣлка щелочью при комнатной температурѣ.

5. Сыворотка при условіи нагрѣванія въ теченіи 45 мин. и при разведеніи 1:100 съ физиологическимъ растворомъ теряетъ способность преципитироваться нативнымъ преципитиномъ при 86°.

## Глава 7.

## Преципитины, полученные отъ введенія сыворотки, денатурированной по Schmidt'y.

По способу Schmidt'a для полученія согласно его результатамъ антисыворотокъ, дѣйствующихъ на нагрѣтый и обработанный щелочью бѣлокъ, мной было иммунизировано 10 кроликовъ (№№ 7—16), причемъ 2 иммунизировались свиной сывороткой и по 4 — коровьей и лошадиной сыворотками. Изъ 10 кроликовъ 8 дали достаточно высокой титръ, а 2 — слишкомъ низкій, несмотря на то, что иммунизация длилась одинаковое время.

Поэтому сыворотки этихъ 2-хъ кроликовъ (№№ 11 и 12), обработавшихся коровьей сывороткой, для изслѣдованія не применялись.

Матерьяломъ, служившимъ для иммунизации кроликовъ, была сыворотка, которая обрабатывалась точно по указаніямъ Schmidt'a.

Бралось равное количество по объему сыворотки и физиологическаго раствора поваренной соли и смѣсь нагрѣвалась въ водной банѣ при 70° въ теченіи 1/2 часа съ соблюденіемъ всѣхъ предосторожностей, при которыхъ сама нагрѣваемая смѣсь должна была имѣть эту температуру, т. е., какъ было уже указано, уровень смѣси держался на 5 ст. ниже уровня воды въ банѣ; t° бани держалась на 71°, съ колебаніемъ не больше одного градуса въ сторону плюса и минуса, и на нагрѣваніе смѣси до 70° добавлялось еще 3—5 минутъ. Постѣ 1/2 часового нагрѣванія смѣсь дѣлалась

густой и сбраго цвета; заѣмъ сюда прибавлялось нормального раствора натронной щелочи по такому расчету, что 10 к. с. ея прибавляется къ 120 к. с. смѣси, отъ чего жидкость при незначительномъ вбалтываніи дѣлалась опять легко подвижной и прозрачной. Эта смѣсь, уже съ натронной щелочью, опять подвергалась нагрѣванію при той же температурѣ въ теченіи 15 минутъ. Во время этого нагрѣванія замѣчается выдѣленіе амміака, что, по мнѣнію Schmidt'a, указываетъ на наступленіе молекулярныхъ измѣненій бѣлка. Послѣ охлажденія такимъ образомъ обработанной сыворотки я примѣнялъ ее, вводя по 20 к. с. заразъ внутривбрюшинно.

Schmidt предлагаетъ или нейтрализовать эту щелочную жидкость, прибавляя сюда 7—8 к. с. нормального раствора соляной кислоты, или же вводитъ безъ нейтрализаціи, такъ какъ вреда отъ такой щелочной жидкости для животныхъ онъ не видѣлъ. Я также долженъ согласиться, что введеніе щелочной жидкости не вызываетъ никакихъ болѣзненныхъ явленій у кроликовъ при жизни, а также и не вызываетъ измѣненій въ брошинѣ, въ чемъ я могъ убѣдиться, подвергая всѣхъ кроликовъ послѣ обезкровливанія вскрытію.

Поэтому я при своихъ опытахъ всегда вводилъ жидкость-антигенъ по Schmitz'у безъ нейтрализаціи. И самъ Schmidt рекомендуетъ вводить щелочную жидкость безъ нейтрализаціи, вида преимущество въ томъ, что щелочная жидкость, какъ совершенно прозрачная, можетъ вводиться даже внутривенно, тогда какъ при нейтрализаціи соляной кислотой выпадаетъ незначительный осадокъ бѣлка, который, конечно, мѣшаетъ инъекціямъ, но который необходимо вприскивать съ жидкостью („mit dem entstandenen Niederschlag sofort eingespritzt“). Мною было замѣчено, что не только при нейтрализаціи выпадаетъ осадокъ, но и безъ нея въ щелочной жидкости при полномъ охлажденіи выпадаетъ очень мелкій, незначительный, бѣловатого цвѣта осадокъ, который легко проходитъ даже черезъ самую тонкую иглу шприца.

Этотъ антигенъ приготавливался мною каждый разъ передъ самымъ вприскиваніемъ или передъ постановкой опыта преципитации съ нимъ и примѣнялся сразу послѣ охлажденія, что дѣлалось мною для полученія совершенно одинаковыхъ условий, такъ какъ при болѣе долгомъ стоянніи бѣлковой жидкости съ натронной щелочью возможны дальнѣйшія измѣненія бѣлковъ подъ вліяніемъ этой щелочи, какъ это было установлено Schmidt'омъ въ работѣ: „Einige Versuche über die Geschwindigkeit der Inaktivierung (Denaturierung) der präcipitablen Substanz durch Alkalien“. Каждый кроликъ получалъ отъ 10 до 11 вприскиваній, причемъ 8 кроликовъ получали эти вприскиванія черезъ 2 дня въ 3-й, а 2 — черезъ 4 дня въ 5-й. Переносили кролики, несмотря на то, что жидкость была щелочная и вводилась по 20 к. с. черезъ 2 дня въ 3-й, иммунизацию также легко, какъ и иммунизацию нормальными сыворотками.

Schmidt рекомендуетъ дѣлать каждому кролику 5—10 вприскиваній, потому что вообще, по его мнѣнію, имунитетъ къ нагрѣтымъ бѣлкамъ получается медленнѣе, а при полученіи Hitze-Alkali-преципитина онъ замѣтилъ, что послѣ первыхъ 3—5 вприскиваній сыворотка реагируетъ почти только съ нагрѣтой сывороткой и только послѣ дальнѣйшей иммунизации появляется реакція и съ обработаннымъ щелочью бѣлкомъ. Однако мною это явленіе не было подтверждено, такъ какъ повторныя взятія крови изъ уха кролика показали, что какъ въ началѣ иммунизации, такъ и въ концѣ ея сыворотка преципитируетъ антигенъ, но только по мѣрѣ удлиненія срока иммунизации возрастаетъ преципитирующая сила сыворотки, не измѣняясь качественно.

#### А. Дѣйствіе на бѣлки денатурированные по Schmidt'у.

Опредѣленіе титра антисыворотокъ по Schmidt'у производилось также по способу Uhlenhuth'a und Beumer'a

на свой антиген, при этом сразу послѣ обработки сыворотки щелочью она нейтрализовалась до слабо-щелочной реакции осторожным прибавлением нормального раствора соляной кислоты. Образующийся при нейтрализации хлопьевидный осадок отфильтровывался, послѣ чего дѣлались дальнѣйшія разведения съ физиологическим раствором.

Необходимо обратить вниманіе на то, что при нейтрализации надо соблюдать осторожность, доводя реакцію до слабощелочной и прекращая нейтрализацию, какъ только появится первый незначительный осадокъ. Бояться, что реакція будетъ еще слишкомъ щелочная, нечего, такъ какъ при дальнѣйшемъ разведеніи физиологическимъ растворомъ она всегда будетъ нейтральная. Между тѣмъ если нейтрализовать соляной кислотой до полной нейтральной реакціи, то выпадаетъ очень обильный осадокъ бѣлка, растворъ становится очень бѣднымъ бѣлкомъ, а это рѣзко сказывается на опредѣленіи титра, какъ было мною уже разъ замѣчено. Поэтому я всегда прекращаю нейтрализацию при выпаденіи самаго незначительнаго осадка.

Титры всѣхъ 10 антисыворотокъ представлены въ таблицѣ № 23, въ которой указана и специфичность антисыворотокъ.

Такимъ образомъ изъ 10 сыворотокъ, полученныхъ иммунизацией кроликовъ по способу Schmidt'a, 2 имѣли титръ по отношенію къ своему антигену 1 : 15000, 6 — 1 : 10000, 1 — 1 : 1000 и 1 — 1 : 500. Въ виду незначительнаго титра двухъ послѣднихъ сыворотокъ дальнѣйшія изслѣдованія съ ними не производились.

Вообще же надо сказать, что титръ во всѣхъ сывороткахъ былъ средней величины, что, вѣроятно, объясняется вообще большою трудностью получения высокихъ по титру антисыворотокъ къ нагрѣтому бѣлку, какъ на это указывалъ и Schmidt.

Къ сожалѣнію самъ Schmidt въ своихъ работахъ съ

Таблица № 23.

№ сыворотки.	Антисыворотка	Антигенъ по Schmidt'у изъ сыворотки																			
		Лошади					Коровы				Свиньи										
		100	500	1000	5000	10000	100	500	1000	5000	10000	100	500	1000	5000	10000	15000	20000			
7	Лошад.	++	++	++	++	0	0	0	+	0	0	0	—	—	—	+	+	0	0	—	—
8	"	++	++	++	++	0	0	0	+	+	+	0	—	—	—	+	+	0	0	—	—
9	"	++	++	++	++	0	0	0	+	+	+	0	—	—	—	+	+	0	0	—	—
10	"	++	++	++	++	0	0	0	+	+	+	0	—	—	—	+	+	0	0	—	—
11	Коров.	+	0	0	0	—	—	—	+	+	+	0	0	0	0	+	+	0	0	—	—
12	"	+	0	0	0	—	—	—	+	+	+	0	0	0	0	+	+	0	0	—	—
13	"	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	—	—
14	"	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	—	—
15	Свинная	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0
16	"	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0

преципитивной реакціей нагрѣтыхъ бѣлковъ не указываетъ точно, какого титра сыворотки ему удавалось получить какъ при введеніи нагрѣтаго бѣлка, такъ и нагрѣтаго съ послѣдующей обработкой щелочью. Такъ, не указывая титра, Schmidt только говоритъ: „ergab nach 5—10 Injektionen brauchbare Sera“. Поэтому нельзя сказать, удавалось-ли Schmidt'у получать болѣе сильныя антисыворотки или нѣтъ.

Относительно специфичности своихъ антисыворотокъ Schmidt тоже говоритъ довольно неясно: „Besondere Versuche ergaben, dass die Reaktionen des Hitze-Alkali-Präcipitins in gleicher Weise artspezifisch sind, wie die des Nativ-Präcipitins“. А въ другомъ мѣстѣ такъ: „Artfremdes natives und erhitztes Serum wurde, wie die vielen Kontrollen ergaben, durch das 70°-Präcipitin nicht verändert; die Reaktionen sind somit — ebenso wie die des Nativ-Präcipitins — spezifisch“.

Изъ этихъ цитатъ, видно, что цифровыхъ данныхъ о специфичности Schmidt не даетъ, а потому трудно понять до какой степени специфичны полученные имъ сыворотки, такъ какъ и сравненіе его съ нативными сыворотками не рѣшаетъ вопроса въ виду отсутствія и здѣсь какого-либо

постоянства специфичности, а тѣмъ болѣе абсолютной специфичности. Между тѣмъ изъ этихъ фразъ можно даже вывести мнѣніе о полной специфичности этихъ антисыворотокъ, такъ какъ, не указывая разведенія гетерологическихъ сыворотокъ, можно думать, что вѣтъ реакціи и съ крѣпкими растворами ихъ.

Согласиться съ этимъ на основаніи своихъ опытовъ я никакъ не могу, такъ какъ если сравнить специфичность полученныхъ мной нативныхъ антисыворотокъ со специфичностью Hitze-Alkali-преципитина, то ясно видно, что послѣдній уступаетъ нативному преципитину. Действительно, большинство антисыворотокъ Schmidt'a реагировало еще съ разведеніями 1:500 чужихъ сыворотокъ, а нѣкоторыя и при разведеніи 1:1000, тогда какъ мои нативныя антисыворотки давали реакцію въ среднемъ въ разведеніи 1:50, и только одна (сывор. № 1) — 1:500. Такимъ образомъ, я не могу сравнивать специфичность антисыворотокъ по Schmidt'у со специфичностью нативныхъ антисыворотокъ.

Также довольно рѣзко отличается теченіе самой реакціи и образованіе преципитата при дѣйствіи сыворотокъ Schmidt'a и нативныхъ преципитиновъ. Такъ, при дѣйствіи послѣднихъ образованіе помутнѣнія начинается, особенно въ болѣе крѣпкихъ растворахъ, сразу послѣ приливанія преципитиногена къ сывороткѣ и можно считать, что 20 минутъ вполнѣ достаточно для наблюденія за ходомъ реакціи, какъ этого требовалъ Uhlenhuth, причемъ вѣдѣ за помутнѣніемъ наступаетъ образованіе хлопьевъ, а въ результатъ обильный осадокъ на днѣ пробирокъ. Не то мы видимъ при испытаніи антисыворотокъ Schmidt'a на свой антигенъ; здѣсь помутнѣніе даже въ разведеніяхъ 1:100 и 1:500 начинается появляться только черезъ 5—10 минутъ и въ теченіи 1 часа можно видѣть появленіе преципитата въ болѣе слабыхъ

растворахъ антигена; въ особенности же такое медленное появленіе преципитата наблюдается въ реакціяхъ съ гетерологическими растворами. Дальнѣйшее же теченіе реакціи обычно, т. е. вѣдѣтъ за появленіемъ помутнѣнія идетъ образованіе хлопьевъ и осѣданіе ихъ на дно, а вышестоящая жидкость просвѣтляется. Преципитатъ никогда не бываетъ здѣсь такимъ обильнымъ, какъ при нативномъ преципитинѣ.

Такимъ образомъ замѣчено Weidanz'омъ, Borchmann'омъ, Uhlenhuth'омъ, Wedemann'омъ, Schmidt'омъ и др., явленіе замедленнаго образованія осадка при дѣйствіи нативныхъ преципитирующихъ сыворотокъ на нагрѣтые бѣлки наблюдается и въ моихъ опытахъ при дѣйствіи Hitze-Alkali-преципитина на свой антигенъ. Даже относительно теченія реакціи нативныхъ преципитиновъ съ нативнымъ бѣлкомъ не всѣ авторы соглашаются съ Uhlenhuth'омъ (Таранухинъ, Fiehe, Müller und Fernet и др.); такъ напримѣръ, пр.-доц. Таранухинъ<sup>1)</sup> высказывается о требованіяхъ Uhlenhuth'a слѣдующимъ образомъ: „Такія строгія требованія можно предъявлять только при работѣ съ величинами постоянными“. А ни сыворотка, ни растворъ крови не постоянны. . . „Время реакціи приходится поэтому, соображаясь чаще всего съ качествомъ исследуемаго объекта, измѣнять и пользоваться Хленгутевскимъ росписаніемъ только какъ руководящей схемой. Для начала реакціи приходилось отводить до 10—20 минутъ, для послѣдующаго усиленія мути до  $\frac{1}{2}$ —1 часу и для конца реакціи (выпаденія осадка) отъ 1—2 часовъ“ . . .

Поэтому я считаю необходимымъ въ теченіи 1 часа наблюдать за ходомъ реакціи и только по истеченіи этого времени дѣлать тѣ или другіе выводы. У Schmidt'a опять же мы не нашли указаній, какъ протекаетъ у него эта реакція.

1) Таранухинъ. „Примѣненіе сывороточной пробы Хленгута въ Россіи съ практической цѣлью судебно-медицинской эксперта“. Вѣстникъ Обществъ Гигіены и т. д. Февраль 1911 г.

Значит, при исследовании антисывороток, полученных по способу Schmidt'a, на свой антиген оказалось, что антисыворотки обладают достаточно высоким титром; специфичность их менее резко выражена; образование осадка затягивается и самый осадок получается менее обильный, при чем вышестоящая жидкость просвѣтляется.

Кромѣ того при постановкѣ этого опыта каждая иммунная сыворотка переслаивалась съ физиологическимъ растворомъ поваренной соли и, наконецъ, всѣ 3 антигена: лошадиный, коровий и свиной, въ разведеніи 1:100 испытывались мной на нормальную кроличью сыворотку. Во всѣхъ случаяхъ результатъ былъ совершенно отрицательный.

Исследование преципитирующихъ сыворотокъ Schmidt'a на мышечные экстракты, обработанные также, какъ и сыворотки, нагриваніемъ и щелочью по Schmidt'у, дало слѣдующіе результаты:

Таблица № 24.

№№ кроликовъ	Антисыворотка	Экстракты изъ мышцъ обработ. по Schmidt'у											
		Лошадн				Коровы				Свиныя			
		20	60	100	200	20	60	100	200	20	60	100	200
7	Лошад.	+	+	0	0	0	0	—	—	0	0	—	—
8	"	+	+	0	0	0	0	—	—	0	0	—	—
9	"	+	+	0	0	0	0	—	—	?	0	—	—
10	"	+	+	0	0	?	0	—	—	0	0	—	—
13	Коров.	0	0	—	—	+	+	+	0	0	0	—	—
14	"	0	0	—	—	+	+	+	0	0	0	—	—
15	Свиная	0	0	—	—	0	0	—	—	+	+	0	0
16	"	0	0	—	—	0	0	—	—	+	+	0	0

При этихъ исследованияхъ брались разведенія мышечныхъ экстрактовъ 1:20, 1:60, 1:100 и 1:200, такъ какъ въ болѣе сильныхъ разведеніяхъ преципитация уже не получалась.

Объясненіе этому надо искать также, какъ и при дѣйствіи нативныхъ преципитиновъ на натуральные мышечные экстракты, въ черзчуръ незначительномъ содержаніи бѣлковъ въ экстрактѣ, а также въ выработкѣ слишкомъ незначительнаго количества общихъ преципитиновъ; при чемъ въ экстрактахъ, обработанныхъ по Schmidt'у, бѣлковъ еще меньше, чѣмъ въ неизмѣненныхъ мышечныхъ экстрактахъ, такъ какъ часть бѣлка теряется при нейтрализаціи послѣ обработки щелочью, что, дѣйствительно, и согласуется съ данными химическаго исследования бѣлка. Если сравнить по таблицамъ №№ 81 и 82 содержаніе бѣлковъ въ неизмѣненныхъ и денатурированныхъ по Schmidt'у мышечныхъ экстрактахъ, то въ первыхъ бѣлка по Эсбаху 7,9—9,9‰ и онъ опредѣлимъ въ разведеніяхъ 1:500, а въ денатурированныхъ по Schmidt'у — по Эсбаху 0,75—1,0‰ и опредѣляется въ разведеніи 1:100.

Изъ 8 антисыворотокъ 2 дали преципитацию со своимъ экстрактомъ въ разведеніи 1:100, а остальные только въ разведеніи 1:60. Преципитатъ въ этихъ опытахъ былъ еще болѣе незначителенъ и появленіе его тоже замедлялось; въ общемъ и здѣсь теченіе реакціи было обычное для нагрѣтыхъ бѣлковъ. Что же касается специфичности реакціи, то она была почти полная, такъ какъ только 2 сыворотки (№№ 9 и 10) дали съ чужими экстрактами въ разведеніи 1:20 слѣды реакціи. Это объясняется тоже незначительнымъ содержаніемъ бѣлковъ въ обработанныхъ по Schmidt'у экстрактахъ, такъ что здѣсь реакція съ чужими экстрактами не получается на томъ же основаніи, на какомъ она не получается въ большихъ разведеніяхъ антигена изъ чужой сыворотки.

Такимъ образомъ надо думать, что главное значеніе въ специфичности реакціи съ экстрактами по сравненію съ реакціей съ сыворотками играетъ недостаточное содержаніе бѣлковъ въ первыхъ.

### Б. Дѣйствіе на нативные бѣлки.

Далѣе преципитирующія сыворотки были изслѣдованы на разведенія нормальной кровяной сыворотки лошади, коровы и свиньи.

Изъ 8 антисыворотокъ 3 дали преципитацию въ разведеніяхъ своихъ сыворотокъ 1:1000, 2 — 1:5000 и 3 — 1:10000. Если будемъ сравнивать титръ каждой сыворотки съ ихъ способностью преципитировать нативную кровяную сыворотку (табл. №№ 23 и 25), то увидимъ, что кромѣ сыворотокъ №№ 9 и 10, которая въ обоихъ случаяхъ даютъ преципитацию при разведеніи 1:10000, всѣ другія сыворотки слабѣе реагируютъ съ нативной кровяной сывороткой, чѣмъ со своими антигенами; однако разница здѣсь незначительная: такъ, реагируя съ антигеномъ въ разведеніяхъ 1:10000 и 1:15000, съ нативной сывороткой онѣ реагируютъ въ разведеніи 1:1000 и 1:5000.

Относительно течения реакціи надо сказать, что являются помутненія въ общемъ скорѣе, чѣмъ при дѣйствіи на антигенъ, но по сравненію съ реакціей нативнаго преципитина на нативный бѣлокъ наступленіе реакціи медлен-

Таблица № 25.

№№ пробок.	Антисыворотка	Нативная кровяная сыворотка																
		Лошади				Коровы				Свиньи								
		100	500	1000	5000	10000	15000	20000	100	500	1000	5000	10000	15000	20000			
7	Лошад.	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	"	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	"	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	"	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	Коров.	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
14	"	+	0	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	0	+	0	0	0
15	Свинная	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	0
16	"	+	0	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0	+	+	+	+	0

нѣе; а преципитатъ получается такой же, какъ и при дѣйствіи на антигенъ.

Здѣсь можетъ быть рѣчь только о приблизительной величинѣ осадковъ, такъ какъ измѣреній преципитатовъ по вѣсу или по объему не производилось.

Эти результаты стоятъ въ полномъ противорѣчій съ результатами Schmidt'a, который, изслѣдуя полученный имъ Nitze-Alkali-преципитинъ на нативную сыворотку, такъ опредѣляетъ реакціонную способность: 0 (nur äusserst geringe Trübung); въ другихъ мѣстахъ онъ прямо указываетъ, что характерная черта этого преципитина та, что онъ не реагируетъ съ нативной сывороткой, а на стр. 176 той же работы Schmidt даетъ таблицу, гдѣ показываетъ, какъ постепенно увеличивается преципитирующая сила его антисыворотки при обработкѣ преципитиногена щелочью, причемъ и здѣсь этотъ преципитинъ не даетъ никакой реакціи съ нативной сывороткой.

Чѣмъ объясняется такая разница между результатами Schmith'a и нашими — не извѣстно, и здѣсь опять-таки приходится пожалѣть, что Schmidt не приводитъ въ своей работѣ ни одного протокола изслѣдованія его антисыворотокъ, давая только сводку ихъ и то безъ цифровыхъ данныхъ; такъ напримѣръ: не извѣстно даже сколько сыворотокъ, содержащихъ Nitze-Alkali-преципитинъ, было имъ изслѣдовано и какъ производились эти изслѣдованія.

Нужно еще сказать, что полученныя мною данныя не стоятъ особнякомъ въ литературѣ по изслѣдованію сыворотокъ кроликовъ, иммунизированныхъ денатурированными бѣлками. Schütze, Piorkowski и въ послѣднее время Курротъ, работая съ мышечнымъ препаратомъ Schütze, получали антисыворотки, которыя реагировали съ нативными бѣлками, съ чѣмъ также не могъ согласиться Schmidt. Затѣмъ Loeffler полученнымъ отъ впрыскиванія 150° сухого бѣлка

преципитиномъ вызывалъ осадокъ и въ растворѣ нативныхъ бѣлковъ. Obermayer und Pick введениемъ вареной сыворотки, варенаго яичнаго бѣлка и варенаго кристаллическаго эдестина получали сыворотки, которыя реагировали какъ съ растворами своихъ антигеновъ, такъ и нативныхъ бѣлковъ. Наконецъ, Hitze-Präcipitin Schmidt'a также реагировалъ съ нативными сыворотками, и только по отношенію къ иммуннымъ сывороткамъ, полученнымъ по его способу и по способу Schütze, Schmidt отрицаетъ способность къ реакціи съ нативными сыворотками. Мои же опыты, какъ было упомянуто, указываютъ, что такая способность у этихъ антисыворотокъ существуетъ.

Если разсматривать специфичность этихъ опытовъ, то видно, что только двѣ антисыворотки (№№ 14 и 16) даютъ съ гетерологическими растворами преципитацию въ разведеніи 1:100; остальные же 6 даютъ полную специфичность (самое меньшее разведеніе было 1:100). Такая специфичность тѣмъ болѣе интересна, что, если сравнить ее со специфичностью тѣхъ же сыворотокъ при дѣйствіи на антигены, то разница получается огромная: тамъ реакція съ гетерологическимъ антигеномъ получается еще въ разведеніи 1:500 и даже 1:1000; здѣсь же почти полная специфичность.

Точное объясненіе этому факту сейчасъ трудно найти, но если вспомнить вышеприведенное ученіе Obermayer'a und Pick'a, то въ этомъ ученіи можно найти болѣе или менѣе достовѣрное объясненіе такой разницѣ между специфичностью къ антигену и къ нативнымъ бѣлкамъ. На основаніи наблюденій, сдѣланныхъ Obermayer'омъ und Pick'омъ, способность сыворотокъ, полученныхъ по способу Schmidt'a, реагировать въ большихъ разведеніяхъ — 1:500 и 1:1000 съ антигеномъ изъ чужой сыворотки, нужно объяснить тѣмъ, что эти сыворотки кромѣ „специфичности происхожденія“ обладаютъ „специфичностью состоянія“ (Zu-

stands-Spezifität), благодаря которой онѣ реагируютъ и съ денатурированными бѣлками чужихъ сыворотокъ, находящимся въ тѣхъ же „фазахъ состоянія“. Преимущество же, которое онѣ выказываютъ по отношенію къ антигену своей сыворотки, надо объяснить „специфичностью происхожденія“.

Что же касается почти полной специфичности при реакціи съ нормальной кровяной сывороткой, то это основывается на томъ, что здѣсь дѣйствуетъ только „специфичность происхожденія“, и такъ какъ Zustands-Spezifität здѣсь проявляться не можетъ, то и получается такая разница при реакціи на антигенъ и на нативную сыворотку. У Obermayer'a и Pick'a также при иммунизации лошадиной пепсинной альбумозой антисыворотки реагируютъ только съ денатурированными бѣлками коровьей сыворотки, но не съ нативными.

И наоборотъ, при дѣйствіи на вареную сыворотку, гдѣ опять проявляется дѣйствіе „Zustands-Spezifität“, сыворотки реагируютъ съ чужими бѣлками въ большихъ разведеніяхъ, какъ это будетъ видно дальше. Наконецъ, по отношенію къ реакціи этихъ антисыворотокъ съ мышечнымъ экстрактомъ, обработаннымъ по Schmidt'u, большую специфичность почти всѣхъ антисыворотокъ въ этой реакціи надо объяснить слишкомъ незначительнымъ количествомъ бѣлка, отчего Zustands-Spezifität не можетъ проявиться.

Насколько правильно такое объясненіе и подтвердится ли оно въ будущемъ, сказать сейчасъ трудно; но надо признать, что въ настоящее время это одно изъ наиболѣе подходящихъ объясненій.

Затѣмъ были поставлены опыты съ преципитацией этими антисыворотками натурального мышечнаго экстракта.

Ведѣдствие небольшого содержанія бѣлковъ и въ натуральныхъ экстрактахъ антисыворотки реагировали только при разведеніи 1:250 и 1:500, специфичность при этихъ опытахъ оказалась полной, такъ что и тѣ 2 антисыворотки (№№ 14 и 16), которыя при реакціи съ натуральной кро-

вняной сывороткой давали еще преципитацию съ чужой сывороткой, въ этихъ опытахъ не давали реакціи, очевидно, вслѣдствіе малаго содержанія бѣлковъ, съ гетерологическими бѣлками. Преципитатъ былъ скудный, появлялся черезъ 5—10 минутъ.

Во всякомъ случаѣ изъ этихъ опытовъ видно, что сыворотки кроликовъ, иммунизированныхъ бѣлками, денатурированными нагреваніемъ и щелочью по способу Schmidt'a,

Таблица № 26.

№№ кролик.	Антисыворотка	Нативный мышечный экстрактъ											
		Лошади				Коровы				Свиньи			
		100	250	500	1000	100	250	500	1000	100	250	500	1000
7	Лошад.	+	+	0	0	0	—	—	—	0	—	—	—
8	"	+	+	0	0	0	—	—	—	0	—	—	—
9	"	+	+	+	0	0	—	—	—	0	—	—	—
10	"	+	+	+	0	0	—	—	—	0	—	—	—
13	Коров.	0	—	—	—	+	+	—	0	0	—	—	—
14	"	0	—	—	—	+	+	?	0	0	—	—	—
15	Свиная	0	—	—	—	0	—	—	—	+	+	?	0
16	"	0	—	—	—	0	—	—	—	+	+	0	0

реагируютъ не только съ натуральными сыворотками, но и съ неизмѣненнымъ мышечнымъ экстрактомъ.

#### В. Дѣйствіе на бѣлки, обработанные щелочью при комнатной температурѣ.

Подобно тому, какъ нативные преципитины, полученные иммунизированиемъ кроликовъ нормальной кровинной сывороткой, испытывались на сыворотку, которая при комнатной температурѣ обрабатывалась фдкимъ натромъ по Schmidt'у въ теченіи 15 минутъ, а затѣмъ нейтрализовалась нормальнымъ растворомъ соляной кислоты, точно также и Nitze-Alkali-преципитинъ изслѣдовался на такимъ образомъ обработанную сыворотку. Тѣмъ болѣе было интересно произ-

вести эти изслѣдованія, что въ работѣ Schmidt'a они измѣются, а потому необходимо было сравнить его результаты съ моими.

Таблица № 27.

№№ кролик.	Антисыворотка	Сыворотка + NaOH — 15 мин. при комнатной t°													
		Лошади					Коровы					Свиньи			
		50	100	500	1000	15000	50	100	500	1000	15000	50	100		
7	Лошад.	+	+	+	0	0	0	+	0	0	—	—	+	0	
8	"	+	+	+	+	+	+	+	+	?	—	—	+	0	
9	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	0	
10	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	0	
13	Коровы	+	+	0	—	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0
14	"	+	+	0	—	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0
15	Свиная	+	0	0	—	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0
16	"	+	0	0	—	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0

Реакція въ этихъ опытахъ протекала довольно быстро, такъ что черезъ 5—10 минутъ появлялся уже преципитатъ, который былъ въ разведеніяхъ со своей сывороткой 1:50, 1:100 и 1:500 въ большинствѣ случаевъ значительный и, наоборотъ, съ чужими сыворотками всегда не обильный. Преципитация со своими сыворотками получалась при разведеніяхъ 1:1000—1:10000 (5 антисыворотокъ 1:1000, 2 — 1:5000 и 1 — 1:10000), значить, давая приблизительно самыми высшими тѣ же разведенія, которыя получаютъ при дѣйствіи этихъ антисыворотокъ на нативную кровяную сыворотку (табл. № 25). По отношенію же къ результатамъ испытанія этихъ антисыворотокъ на свой антигенъ, оказалось, что реакція съ разведеніями антигена была болѣе чувствительная, т. е. антигенъ разводился больше, чѣмъ сыворотка, обработанная щелочью при комнатной температурѣ.

Schmidt опредѣляетъ силу этой реакціи въ своей таблицѣ какъ „starke Reaktion“.

Что же касается преципитации съ растворами чужихъ

сывороток, то видно изъ таблицы, что специфичность при этихъ опытахъ занимаетъ какъ бы середину между специфичностью при изслѣдованіи на антигенъ (при опредѣленіи титра сыворотокъ) и при изслѣдованіи на нативный сывороточный бѣлокъ (табл. №№ 23, 25 и 27). Дѣйствительно, въ этихъ опытахъ нѣтъ ни одной сыворотки, которая не реагировала бы съ чужими сыворотками; однако, нигдѣ эта реакція не получается въ такихъ сильныхъ разведеніяхъ, какъ это наблюдается при изслѣдованіи на антигенъ. Такъ наибольшее разведеніе чужой сыворотки, при которомъ получалась еще реакція въ видѣ слѣдовъ ея, было 1:500 (антисыв. №№ 8 и 10); остальные же давали въ разведеніяхъ 1:50 и 1:100. Тогда какъ при опредѣленіи титра нѣкоторыя антисыворотки давали еще въ разведеніи 1:1000 и большинство — 1:500.

Объясненіе этому факту тоже можно найти въ выводахъ изъ работъ Obermayer'a и Pick'a. Мы представляется, что въ сывороткѣ, обрабатываемой ѣдкимъ натромъ при комнатной температурѣ въ теченіи 15 минутъ, образуются различные продукты денатурированія бѣлковыхъ тѣлъ подъ влияніемъ щелочи. Не известно, будутъ-ли это уже щелочные альбуминаты или другіе промежуточные продукты, очень близко стоящіе къ неизмѣненнымъ бѣлкамъ, химически которые до сихъ поръ совершенно не выдѣлены. Tierfeld<sup>1)</sup> на стр. 413—414 такъ говоритъ о промежуточныхъ продуктахъ распада бѣлковъ подъ влияніемъ ферментовъ, воды и высокой температуры, минеральныхъ кислотъ, щелочей, окисляющихъ веществъ, бактерий и т. д. „Die Hauptmenge des Gemisches der Spaltungsprodukte, speziell die ganze Menge der Muttersubstanz noch näher stehenden und noch Eiweisscharakter zeigenden Produkte der

1) Felix Hoppe. Seyer's Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Bearbeitet von Dr. H. Tierfeld. 1909. 8 Auflage.

Hydrolyse, harrt trotz vielfacher Bemühungen noch der Ent-wicklung“.

Во всякомъ случаѣ можно предполагать, что таковые же промежуточные продукты въ связи съ другими образуются и при приготовленіи изъ сыворотки антигена. Отсюда ясно, что въ иммунной сывороткѣ получаютъ преципитины къ этимъ промежуточнымъ веществамъ, образовавшимся подъ влияніемъ щелочи. Значитъ, при дѣйствіи антисыворотокъ по Schmidt'у на сывороточный бѣлокъ, обработанный натроной щелочью при комнатной температурѣ, проявляется вторая специфичность этихъ сыворотокъ — „специфичность состоянія“, которая и обуславливаетъ образование преципитата съ хотя и чужими сыворотками, но содержащими одинаковые промежуточные продукты денатурированія бѣлка, безразлично какого вида животного. Но такъ какъ при такомъ дѣйствіи щелочи продуктовъ образуется безусловно меньше или что тоже: денатурированіе бѣлка не идетъ такъ далеко, какъ это бываетъ при полученіи антигена, то и преципитация получается въ болѣе крѣпкихъ разведеніяхъ чужихъ сыворотокъ.

При обилии могущихъ образоваться промежуточныхъ продуктовъ и въ виду недостаточности нашихъ знаній въ этой области нечего и думать выдѣлить тѣ продукты, которые вызываютъ неспецифическія помутненія и тѣмъ самымъ подойти ближе къ вопросу о специфичности.

#### Г. Дѣйствіе на 70° — бѣлокъ.

Далѣе сыворотки, полученные по способу Schmidt'a, изслѣдовались на кровяную сыворотку своего и чужого вида животныхъ, которая подвергалась нагрѣванію въ водяной банѣ при 70° въ теченіи 30 минутъ въ разведеніи 1:50 съ физиологическимъ растворомъ повареной соли; свертыванія при этомъ не происходило и по охлажденіи 70° — сыворотка приливалась къ преципитину.

Таблица № 28.

ММ. кролик.	Антисыворотка.	Сыворотка нагретая при 70° — 30 минут													
		Лошади				Коровы				Свиньи					
		50	100	500	1000	5000	10000	15000	30	100	500	1000	5000	10000	15000
7	Лошад.	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+	+	0	0	0
8	"	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	0
9	"	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	0
10	"	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	0
13	Коров.	+	+	0	—	—	—	—	—	+	+	+	0	0	0
14	"	+	+	?	—	—	—	—	—	+	+	+	0	0	0
15	Свинья	+	+	0	—	—	—	—	—	+	+	+	0	0	0
16	"	+	+	0	—	—	—	—	—	+	+	+	0	0	0

Появление преципитата в этих опытах было более медленное, так что наблюдение продолжалось 1 час; количество преципитата было довольно значительное, в особенности с крупными разведениями своей сыворотки.

Что же касается разведений, при которых получается еще реакция, так они приблизительно такие же, как и при исследовании антисывороток на сывороточный блясок, обработанный 1/2ной натронной щелочью в течение 15 минут при комнатной температурѣ (табл. № 27). Правда, в отбывших сыворотках замѣчается незначительное колебание то в сторону плюса, то в сторону минуса, по сравнению с теми опытами, при чем в иной сывороткѣ одинакова реакция со своим бляском, но различна с чужими; в другой сывороткѣ, наоборот, одинакова специфичность, но не одинакова реакция с гомологическим бляском. Однако, все эти колебания весьма не значительны, большинство из них в сторону плюса, и в общем эти опыты тоже надо поставить по своей специфичности между опытами с антигеном и с нативной кровяной сывороткой, а если сравнить с реакцией со щелочным бляском (табл. № 27), то надо сказать, что с

70°-сывороткой преципитация с гетерологическим бляском получается в больших разведениях; другими словами, здесь реакция менее специфична. Отсюда можно думать, что при нагревании до 70° в течение 30 минут бляски больше денатурируются, чем при дѣйствии щелочи в течение 15 минут при комнатной температурѣ; а потому в зависимости от существования специфичности состояния специфичность в этих опытах становится меньше.

Надо думать, что преципитины, которые вызывают здесь реакцию с гетерологическим бляском, уже иные, чем при реакции со щелочной сывороткой, а именно: те преципитины, которые вырабатываются в сывороткѣ кролика от введения промежуточных продуктов сывороточного бляска, образовавшихся под влиянием нагревания; тогда как в предыдущем опытѣ, надо предполагать, скорее дѣйствуют преципитины, образовавшиеся от введения щелочных блясков. Окончательно решить этот вопрос при современном состоянии наших знаний о преципитинной реакции не представляется возможным.

Можно было бы с другой стороны подойти к этому вопросу, а именно: Schmidt в своих опытах замѣтил, что при долгом хранении этих антисывороток исчезает у них способность реагировать со щелочным бляском, а остается только способность къ преципитации с нагрѣтыми блясками; на основании этого явления он заключает, что в таких иммунных сыворотках содержится два преципитина: один реагирует с нагрѣтым бляском, другой со щелочным. Вот интересно было бы такую антисыворотку, потерявшую способность реагировать со щелочным бляском, испытать на сыворотку, нагрѣтую при 70° в течение 30 минут, и на сыворотку, обработанную 1/2ным натром при комнатной температурѣ в течение 15 минут. Если бы реакция в первом случаѣ получилась, а со щелочным бляском нѣтъ, то это указывало бы,

что преципитины здесь действуют различные. Къ сожалѣнью, Schmidt'омъ такихъ опытовъ не было поставлено, а мнѣ не приходилось наблюдать исчезновения въ иммунной сывороткѣ способности къ реакціи со щелочнымъ бѣлкомъ.

Schmidt изслѣдовалъ свои антисыворотки на 70°-сывороточный бѣлокъ, но сравнить его результаты съ моими опять-таки нельзя, такъ какъ онъ эту реакцію опредѣляетъ только какъ „starke Reaktion“.

#### Д. Дѣйствіе на 100°-бѣлки.

Затѣмъ сыворотки были мною изслѣдованы на 100°-сывороточный бѣлокъ. Для этого бралась сыворотка въ разведеніи 1 : 100 съ физиологическимъ растворомъ поваренной соли, нагревалась въ кипящей банѣ въ теченіи 30 минутъ, въ результатѣ получалась опалесцирующая жидкость; послѣ фильтрованія черезъ двойной фильтр опалесценція становилась совсѣмъ слабая, и изъ этой жидкости дѣлались дальнѣйшія разведенія. Слабая опалесценція этихъ разведеній совершенно не мѣшаетъ реакціи; такъ Schmidt тоже замѣчаетъ въ своей работѣ о нагрѣтыхъ бѣлкахъ, что опалесценція растворовъ не мѣшаетъ опредѣленію реакціи, хотя ставить контрольные опыты необходимо, но рѣдко, по его мнѣнію, приходится прибѣгать къ сравненію съ контролемъ.

Проф. А. В. Григорьевъ въ своей послѣдней статьѣ (Русскій Врачъ 1913 г. № 34) тоже говоритъ, что при переслаиваніи жидкостей не мѣшаетъ реакціи, если испытуемая жидкость представляется немного опалесцирующей или даже слегка мутноватой, и большее значеніе имѣетъ „безусловная прозрачность реактивной сыворотки“. Фильтрація же черезъ кизельгуръ избѣгалась, такъ какъ существовать въполнѣ опредѣленныя указанія, что фильтрація съ кизельгуромъ ослабляетъ способность сыворотки преципитироваться. Помутнѣніе получалось быстро: черезъ 5—10

минутъ. Скоро вслѣдъ за этимъ образовывался значительный преципитатъ, особенно большой въ разведеніяхъ 1 : 100 и 1 : 500. Быстрота появленія помутнѣнія и величина преципитата рѣзко отличаются при изслѣдованіи Hitzte-Alkali-преципитина и нативнаго преципитина,

Таблица № 29.

№№ пробъ.	Антисыворотка	Сыворотка нагрѣтая при 100° въ течен. 30 мин.																		
		Лошадь						Коровы				Свинья								
		100	500	1000	5000	10000	20000	500	1000	10000	15000	20000	100	500	1000	5000	10000	15000	20000	
7	Лошад.	++	++	++	++	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	0
8	"	++	+	++	++	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	0
9	"	++	++	++	++	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	0
10	"	++	++	++	++	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	0
13	Коров.	+	+	+	0	0	0	++	++	++	++	0	+	+	+	+	0	0	0	0
14	"	+	+	+	0	0	0	++	++	++	++	0	+	+	+	+	0	0	0	0
15	Свиная	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	++	++	++	++	++	?	0	0	0
16	"	+	+	0	0	0	0	+	+	+	0	++	++	++	++	++	?	0	0	0

такъ какъ въ послѣднемъ случаѣ помутнѣніе при реакціи съ нагрѣтыми бѣлками получается медленно и преципитатъ бываетъ необильный. Это вполнѣ согласуется съ таковыми же наблюденіями Schmidt'a надъ нагрѣтыми бѣлками.

Нѣкоторыя сыворотки въ этихъ опытахъ съ 100°-бѣлкомъ давали реакцію въ большихъ разведеніяхъ, чѣмъ со своимъ антигеномъ (сывор. №№ 7, 13, 14). Чѣмъ объясняется это, сказать трудно, но возможно, что количествомъ бѣлка, котораго въ антигенѣ меньше, чѣмъ въ 100°-сывороткѣ, такъ какъ при нейтрализаціи щелочной жидкости выпадаетъ осадокъ, но болѣе опредѣленное объясненіе найти сейчасъ трудно.

Точно также трудно объяснить появленіе въ этихъ опытахъ еще меньшей специфичности, чѣмъ съ антигеномъ. Единственно возможное предположеніе, что и здѣсь бѣлкомъ больше и что при 100°-нагрѣваніи больше получается продуктовъ денатураціи бѣлковъ. Во всякомъ случаѣ всѣ

преципитирующія сыворотки дали съ чужими бѣлками преципитацию еще въ разведеніяхъ 1:1000, кромѣ сыворотки № 16, которая давала только въ разведеніи 1:500.

Эту реакцію Schmidt называетъ въ своей работѣ „starke Reaktion“, но относительно вопроса о специфичности, безусловно наиболѣе интересующаго насъ, у него кромѣ общаго заключенія о специфичности антисыворотокъ, указаній нѣтъ.

Въ этой реакціи рѣзко сказывается различіе между преципитиномъ Schmidt'a и нативнымъ: въ то время какъ первый реагируетъ съ 100%-бѣлкомъ сильно, легко и въ большихъ разведеніяхъ, нативный преципитинъ не даетъ никакой реакціи.

Параллельно эти антисыворотки были испытаны на мышечный экстрактъ, который при тѣхъ же условіяхъ подвергался нагреванію при 100°. Послѣ нагреванія получался обильный хлопчатый осадокъ, отфильтровавъ который, я получалъ совершенно прозрачный растворъ, при чемъ химически бѣлокъ въ этомъ растворѣ нельзя было опредѣлить. Реакція преципитации оказалась совершенно отрицательной.

Чтобы уменьшить разведеніе мышечнаго экстракта, мною такіе же опыты были поставлены съ экстрактомъ, который нагревался въ разведеніи 1:25 съ физиологическимъ растворомъ; однако и при этомъ разведеніи реакціи не получалось, при чемъ химически опредѣлить бѣлокъ не удалось.

Въ виду того, что здѣсь причина отрицательной реакціи можетъ заключаться въ томъ, что весь или большая часть бѣлка экстракта свертывается и профильтрованная жидкость не содержитъ химически опредѣлимаго бѣлка, мною эти антисыворотки были изслѣдованы на мышечный экстрактъ, который разводился 1:25 физиологическимъ растворомъ повареной соли содержащимъ 0,1% соды (соды 1,0; повареной соли 8,5 и воды 1000). Затѣмъ этотъ ра-

створъ подвергался нагреванію въ кипящей банѣ въ теченіи 30 минутъ; свертыванія бѣлка не получалось; щелочная реакція раствора доводилась посредствомъ соляной кислоты до слабо щелочной, при этомъ получалось едва замѣтное помутнѣніе раствора, который фильтровался черезъ простой фильтръ и, будучи совершенно прозрачнымъ, испытывался антисыворотками по Schmidt'у. При изслѣдованіи этихъ растворовъ на бѣлокъ съ помощью азотной кислоты получалась или опалесценція ясно замѣтная или же муть. Реакція же преципитации въ данномъ случаѣ получилась очень слабая.

6 антисыворотокъ реагировало только въ разведеніи 1:25, и то лишь совѣмъ слабо, и двѣ (№№ 9 и 14) дали въ разведеніи 1:50 незначительную реакцію.

Такимъ образомъ удержаніемъ почти всего бѣлка мышечнаго экстракта въ растворѣ при кипяченіи со слабымъ растворомъ соды удается получить очень слабую преципи-

Таблица № 30.

№№ кролика	Антисыворотка	Мышечный экстр. 1:25 съ 0,1% соды 100-30 м.								
		Лошади			Коровы			Свиньи		
		25	50	100	25	50	100	25	50	100
7	Лошад.	+	0	0	0	0	—	0	0	—
8	-	?	0	0	0	0	—	0	0	—
9	-	+	?	0	0	0	—	0	0	—
10	-	?	0	0	0	0	—	0	0	—
13	Коров.	0	0	—	+	0	0	0	0	—
14	-	0	0	—	+	?	0	0	0	—
15	Свинная	0	0	—	0	0	—	+	0	0
16	-	0	0	—	0	0	—	?	0	0

тацію съ помощью Hitze-Alkali-преципитина, полученнаго введеніемъ кроликамъ антигена изъ сыворотки. При этомъ, какъ мы увидимъ дальше, сила реакціи въ этомъ случаѣ почти одинакова съ реакціей съ экстрактами изъ органовъ, тоже подвергнутыхъ нагреванію при 100° съ содой. Изслѣ-

дованіе же этого преципитина на сывотку, тоже разведенную 0,1% соды и нагрѣтую до 100° в теченіи 30 минутъ, дало приблизительно такіе же результаты, какіе получались при изслѣдованіи на сывотку, кипяченую безъ прибавленія соды (табл. № 29).

#### Е. Дѣйствіе на высушенный при 100° бѣлокъ.

Наконецъ, антисывотки мною были изслѣдованы, какъ это дѣлалъ и Schmidt, на сывоточный бѣлокъ, который отъ нагрѣванія сдѣлался совершенно нерастворимымъ въ физиологическомъ растворѣ хлористаго натра и только ѣдкой щелочью могъ быть переведенъ въ растворъ. Для этого опыта нормальная кровяная сывотка, согласно указаніямъ Schmidt'a, подвергалась слѣдующей обработкѣ.

Бралось около 20—25 к. с. той или иной сывотки, вливалось въ Эрленмейеровскую колбу, куда прибавлялось около 5 к. с. физиологическаго раствора. Колба ставилась въ кипящую водяную баню и держалась тамъ до тѣхъ поръ, пока вся свернувшаяся сывотка совершенно не высохнетъ, на что требовалось обыкновенно около 3 часовъ. Свернувшаяся и высушенная сывотка тщательно промывалась физиологическимъ растворомъ, чтобы удалить такимъ образомъ всякіе слѣды еще растворимаго бѣлка. Затѣмъ высушивалась и въ ступочкѣ растиралась въ порошокъ, который получался желтаго или буровато-желтаго цвѣта. Нѣкоторое количество, приблизительно, какъ соотвѣтуетъ Schmidt, на кончикъ ножа, этой высушенной сывотки смѣшивалось въ пробиркѣ съ 10 к. с. децинормальнаго раствора ѣдкаго натра, содержащаго и повареную соль; эта пробирка помещалась въ водяную баню при 70° и подвергалась нагрѣванію в теченіи 10—20 минутъ при взбалтываніи по временамъ. Порошокъ сывотки при этомъ нагрѣваніи разбухаетъ и часть его, повидимому, переходитъ въ растворъ. Schmidt не соотвѣтуетъ ждать, пока растворится

весь порошокъ, такъ какъ отъ продолжительнаго дѣйствія щелочи, въ особенности при такой температурѣ, можетъ получиться полное уничтоженіе реакціонной способности сывотки. Поэтому когда достаточное количество сывотки перешло въ растворъ, щелочная жидкость фильтровалась черезъ смоченный физиологическимъ растворомъ фильтръ въ колбочку, въ которую наливалось 10 к. с. физиологическаго раствора. Затѣмъ этотъ щелочный растворъ (около 20 к. с.) нейтрализовался  $\frac{1}{20}$  нормальнымъ растворомъ соляной кислоты до получения слабокрасной окраски съ фенолфталеиномъ, при чемъ солянй кислоты шло около 18—20 к. с.; всего жидкости получалось около 40 к. с.

Такъ какъ Schmidt соотвѣтуетъ для опытовъ преципитации брать еще болѣе разведенные растворы, то я изъ этой жидкости приготавливалъ разведенія 1:5 и 1:10 и все подвергалъ изслѣдованію Hitze-Alkali — преципитиномъ. Надо еще замѣтить, что точное разведеніе бѣлка въ этихъ случаяхъ не извѣстно, такъ какъ не опредѣлимо количество сухого бѣлка, перешедшаго въ растворъ при нагрѣваніи со щелочью.

Вообще же химически бѣлокъ былъ опредѣлимъ.

По словамъ Schmidt'a Hitze-Alkali-преципитинъ хорошо реагируетъ съ этимъ бѣлкомъ, который только съ помощью щелочи переходитъ въ растворимое состояніе: „Es erfolgt auch in ziemlich verdünnter Lösung sofortige Trübung und schon nach wenigen Minuten Flockenbildung. Besondere Versuche ergaben, dass die Reaktionen des Hitze-Alkali-Präzipitins in gleicher Weise artspezifisch sind, wie die des Nativ-Präzipitins“.

Мои результаты не даютъ возможности подтвердить эти наблюденія Schmidt'a. Дѣйствительно, Hitze-Alkali-преципитинъ оказался въ состояніи реагировать съ такимъ денатурированнымъ бѣлкомъ, но весьма не сильно и въ незначительныхъ разведеніяхъ, а въ большинствѣ случаевъ даже



реагировать с бѣлками другихъ органовъ, находящимися въ различныхъ отъ физико-химическихъ воздѣйствій состоянiяхъ, т. е. въ нативномъ, денатурированномъ нагреванiемъ и щелочью и однимъ нагреванiемъ.

Для этого всѣ преципитирующiя сыворотки испытывались мной: 1) на натуральные экстракты изъ органовъ, 2) экстракты, подвергнутые денатурированiю по Schmidt'y, 3) на кипяченые въ теченiи 30 минутъ въ разведенiи 1:25 съ физиологическимъ растворомъ, 4) тоже кипяченые, но съ физиологическимъ растворомъ содержащимъ 0,1% соды. Обработка всего этого матерiала производилась описанными уже выше способами.

Преципитация антисыворотокъ по Schmidt'y съ нативными экстрактами изъ органовъ происходитъ только при самыхъ незначительныхъ разведенiяхъ ихъ, исключая селезеночный экстрактъ, который реагировалъ въ большихъ разведенiяхъ, особенно съ сыворотками №№ 9, 15 и 16. Преципитация не было только при дѣйстви антисыворотки № 13 на печеночный экстрактъ.

Передъ постановкой опыта многие экстракты приходилось подвергать фильтраци съ порошокомъ инфузорной земли, такъ какъ при фильтраци черезъ простой фильтр экстрактъ получался опалесцирующимъ. Химически бѣлокъ определялся: въ почечныхъ экстрактахъ ясно въ разведенiяхъ 1:500 и слѣды въ 1:1000; въ печеночныхъ — ясно въ 1:500, а 1:1000 только въ свиномъ печеночномъ; въ селезеночныхъ — 1:500 и слѣды въ 1:1000 (см. таблицу № 81).

Такимъ образомъ антисыворотки по Schmidt'y оказались въ состоянiи реагировать съ нативными экстрактами изъ органовъ.

Въ опытахъ съ экстрактами, обработанными по способу Schmidt'a, видно, что наиболѣе сильно реагируютъ антисыворотки съ селезеночнымъ экстрактомъ; но въ меньшихъ разведенiяхъ дѣйствуютъ и на другiе экстракты. Такъ

Таблица № 33.

№№ кролик.	Антисывор.	Экстракты обработанные по Schmidt'y:														
		Почки.			Печени.			Селезенки.								
		Лош.	Кор.	Свин.	Лош.	Кор.	Свин.	Лош.	Кор.	Свин.						
		50	100	250	50	100	250	50	100	250	50	100	250	50	100	250
7	Лош.	+	?	0	0	0	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+
8	"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	"	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	"	?	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	Кор.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	Свин.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

что при иммунизации денатурированнымъ сывороточнымъ бѣлкомъ по Schmidt'y получаются не только общiе преципитины къ натуральнымъ бѣлкамъ, но и къ денатурированнымъ, благодаря чему антисыворотки могутъ реагировать съ бѣлками изъ другихъ органовъ. Химически бѣлокъ былъ найденъ: въ почечныхъ экстрактахъ, обработанныхъ по Schmidt'y, въ разведенiи 1:100 ясно, 1:500-слѣды; въ печеночныхъ 1:100 воплоти ясно, и 1:500 слѣды и то не во всѣхъ экстрактахъ; въ селезеночныхъ 1:500 во всѣхъ.

Затѣмъ былъ поставленъ опытъ съ экстрактами, которые нагревались до 100° съ содой и безъ нея. Результаты этихъ опытовъ приведены въ двухъ таблицахъ рядомъ для лучшаго сравненiя.

Таблица № 34.

№№ кролик.	Антисывор.	Экстракты съ физiol. раствор. 100° — 30 минутъ													
		Почки			Печени			Селезенки							
		лош.	коров.	свин.	лош.	коров.	свин.	лош.	коров.	свин.					
		25	50	25	50	25	50	25	50	25	50	25	50	25	50
7	Лош.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	"	?	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
9	"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	"	?	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0
13	Кор.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
14	"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	Свин.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	"	0	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0

\*) 1:500 — 0 \*\*) 1:500 — ?

Таблица № 35.

№№ кролик.	Антисыворот.	Экстракты 1:25 съ 0,1% соды 100° — 30 мин.																		
		Почки			Печени			Селезенки												
		Лощ.	Кор.	Свин.	Лощ.	Кор.	Свин.	Лощ.	Кор.	Свин.										
7	Лощ.	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	"	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0
9	"	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0
10	"	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0
11	Кор.	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	"	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	Свин.	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	"	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	"	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	"	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

При кипячении экстрактовъ съ физиологическимъ растворомъ всегда получался свертокъ; этого не бывало, когда кипячение производилось съ добавлениемъ соды. Почечный экстрактъ какъ при образованіи свертка, такъ и безъ него давалъ опалесцирующій растворъ, почему его приходилось фильтровать черезъ кисельгуръ.

Химически бѣлка нельзя было опредѣлить въ разведеніи 1:25 послѣ кипяченія безъ соды; послѣ же кипяченія съ содой бѣлокъ опредѣлялся въ разведеніи 1:25.

Изъ сравненія этихъ двухъ таблицъ видна большая разница между преципитацией послѣ кипяченія безъ соды и съ прибавленіемъ ея. Въ то время какъ въ первомъ случаѣ, т. е. при кипяченіи безъ соды, многія преципитирующія сыворотки давали реакцію съ разведеніемъ 1:25 въ видѣ слѣдовъ ея, а въ второя и совсѣмъ не давали реакціи, при чемъ опять-таки съ селезеночнымъ экстрактомъ реакція чаще получалась ясная; во второмъ случаѣ замѣчалось значительное усиленіе реакціи: не было ни одной антисыворотки, которая не давала бы реакціи хотя въ разведеніи 1:25, но значительное большинство ихъ реагировало съ разведеніемъ 1:50; что же касается селезеночнаго экстракта, то съ нимъ всѣ сыворотки реагировали въ разведеніяхъ

1:25 и 1:50. Такое усиленіе преципитации надо объяснить увеличеніемъ содержанія бѣлка въ растворѣ при кипяченіи съ содой, на что указываетъ отсутствіе свертыванія бѣлка и химическое опредѣленіе его въ растворѣ.

Изъ этихъ опытовъ преципитации съ экстрактами изъ разныхъ органовъ животныхъ выходитъ, что при иммунизации кроликовъ бѣлкомъ, денатурированнымъ по способу Schmidt'a нагрѣваніемъ и щелочью, въ сывороткѣ ихъ, также какъ и при иммунизации нативными бѣлками, вырабатываются общіе къ различнымъ гомологическимъ бѣлкамъ преципитины. Однако эти общіе преципитины, подобно вообще реакціонной способности сыворотки, обладаютъ способностью реагировать не только съ нативными бѣлками другихъ органовъ, но и съ денатурированными. Въ этомъ отношеніи замѣчается полное соответствіе между способностью антисыворотки Schmidt'a реагировать со своей сывороткой и съ бѣлками изъ другихъ органовъ: такъ антисыворотка реагируетъ и съ нативной сывороткой и съ нативнымъ экстрактомъ, съ антигеномъ изъ сыворотки и съ экстрактами, обработанными какъ антигенъ, съ нагрѣтой до 100° сывороткой и съ 100°-экстрактомъ.

Конечно съ бѣлками другихъ органовъ преципитация получается медленнѣе, слабѣе и преципитатъ въ большинствѣ случаевъ незначительный.

Надо и здѣсь замѣтить, что одна и та же преципитирующая сыворотка съ различными экстрактами реагировала различно, также неодинаково преципитировала она одинъ и тотъ же экстрактъ, но различно денатурированный, и, наконецъ, не было соответствія между силой реакціи и содержаніемъ бѣлковъ, такъ какъ часто преципитация уже не получалась съ разведеніемъ, въ которомъ ясно былъ находитъ химически бѣлокъ. Все это можно объяснить только различной выработкой въ сывороткѣ того или другого кролика различныхъ общихъ преципитиновъ, благодаря чему

онѣ проявляють различную силу къ тому или другому экстракту, въ темъ или другомъ состояніи денатурированія. Такъ обладающими наибольшимъ количествомъ общихъ преципитиновъ надо признать антисыворотки №№ 15 и 16.

Для практики является важнымъ то обстоятельство, что иммунныя сыворотки, полученныя введеніемъ кровяныхъ сыворотокъ и содержащія общіе преципитины, могутъ реагировать, хотя и слабѣе, съ бѣлками другихъ органовъ. Что же касается изслѣдованія кипяченыхъ экстрактовъ, то, какъ это видно изъ опытовъ, имѣеть преуменьшеніе кипяченіе со слабымъ растворомъ соды.

#### И. Дѣйствіе элективного насыщенія на сыворотки.

Въ виду того, что антисыворотки, полученныя по способу Schmidt'a, при дѣйствіи ихъ на денатурированныя бѣлки сыворотки даютъ довольно сильную реакцію съ гетерологическими бѣлками, т. е. не достаточно специфичны, мною были произведены опыты насыщенія 4 антисыворотокъ къ гетерологическимъ денатурированнымъ бѣлкамъ. Такимъ образомъ я думалъ получить вполне специфичныя антисыворотки, а потому болѣе пригодныя для практики.

Для этого мною прибавлялось къ 5 к. с. антисыворотокъ №№ 7 и 8 по 0,5 к. с. коровьяго антигена, т. е. кровяной сыворотки, обработанной нагреваніемъ и щелочью по Schmidt'у; къ 5 к. с. антисыворотокъ №№ 13 и 16 по 0,5 к. с. лошадиного антигена. Затѣмъ черезъ сутки стоянія на холоду антисыворотки изслѣдовались; послѣ чего опять прибавлялось 0,4 к. с. того же антигена; черезъ слѣдующіе 24 часа опять изслѣдовались, и если насыщенія не произошло, то антигенъ снова прибавлялся. Для нѣкоторыхъ антисыворотокъ достаточно было насыщать 2 раза, для другихъ 3 раза. Кромѣ того эти антисыворотки изслѣдовались до и послѣ насы-

щенія на нативную кровяную сыворотку. Въ остальномъ методика насыщенія по Weichardt'y была такая же, какъ и при насыщеніи нативныхъ сыворотокъ. Результаты насыщенія представлены въ слѣдующихъ 2-хъ таблицахъ.

Насыщеніе антисыворотокъ къ чужой сывороткѣ, обработанной по Schmidt'у, достигнуть можно, но довольно трудно; такъ для 3-хъ антисыворотокъ нужно было 3 раза прибавлять чужой антигенъ, чтобы достигнуть полной специфичности, что и понятно, такъ какъ специфичность этихъ антисыворотокъ выражена сравнительно не рѣзко. Особенно при насыщеніи антисыворотокъ Schmidt'a является во-первыхъ то, что при насыщеніи однимъ какимъ-либо чужимъ антигеномъ происходитъ насыщеніе и къ другому, иногда даже насыщеніе къ другому идетъ скорѣе; и въ результатѣ антисыворотка получается насыщенной къ обоимъ чужимъ антигенамъ, т. е. вполне специфичной; такъ напримѣръ: при насыщеніи антисыворотки № 7 коровьимъ антигеномъ черезъ 24 часа замѣчается уменьшеніе преципитации со свинымъ антигеномъ, а съ коровьимъ остается безъ измѣненія; черезъ 72 часа антисыворотка не реагируетъ ни съ коровьимъ, ни со свинымъ.

Вторая особенность этого насыщенія заключается въ елишкомъ сильномъ уменьшеніи титра со своимъ антигеномъ при насыщеніи чужимъ. И при насыщеніи нативныхъ сыворотокъ мы замѣчали ослабленіе реакціи со своимъ бѣлкомъ, но тамъ оно было незначительно; здѣсь же, въ антисывороткахъ Schmidt'a это уменьшеніе было рѣзкое, такъ что получалась преципитация только съ разведеніями 1:500, и то у антисыворотокъ №№ 7 и 13 слѣды ея. Такое сильное ослабленіе преципитирующей силы антисыворотокъ Schmidt'a при насыщеніи ихъ — явленіе неблагоприятное, а потому едва-ли насыщеніе этихъ антисыворотокъ для получения полной специфичности возможно примѣнить на практикѣ.



со своимъ антигеномъ, такъ какъ и здѣсь преципитины, реагирующіе съ бѣлками въ определенной фазѣ измѣненія, насыщены; остатокъ же преципитирующей силы антисыворотки надо отнести на счетъ существованія „видовой специфичности“, т. е. такихъ преципитиновъ, которые реагируютъ съ бѣлками только этого вида животныхъ.

Въ заключеніе представимъ всѣ произведенныя изслѣдованія съ преципитирующими сыворотками, полученными введеніемъ антигена по Schmidt'y, въ видѣ таблицы.

Таблица № 38.

Антисыворотка полученная отъ введенія сыворотки, денатурированной по Schmidt'y

Растворы	Результатъ	Растворы	Результатъ	Растворы	Результ.
Сыв-ка по Schm.	++++	Мыш. экстр. съ фиб. рас. 100°—30°	0	Сухая 100° сыв-ка + NaOH	+
Мыш. экстр. по Schm.	+	Сыв-ка + 0,1% соды 100°—30°	++++	Нат. экстр. орган.	+
Натив. сыв-ка	+++	Мыш. экстр. + 0,1% соды 100°—30°	+	Экстр. по Schm.	+
Нат. мыш. экстр.	++	Сыв-ка 70°—30°	+++	Экстр. + фиб. р. 100°—30°	+
Смв. съ фиб. р. 100°—30°	++++	Сыв-ка + NaOH. коми. 0°	+++	Экстр. + 0,1% соды 100°—30°	+

Въ этой таблицѣ обозначенія тѣ же, что и въ таблицѣ № 22.

1. Полученіе Nitze-Alkali-преципитина не представляеть затрудненія, но требуетъ болѣе продолжительной иммунизации.

2. Титръ ихъ достаточно высокъ, не уступаетъ титру

нативныхъ преципитиновъ; теченіе реакціи преципитации замедляется; преципитатъ получается въ общемъ менѣе обильный.

3. Специфичность антисыворотокъ Schmidt'a выражена менѣе рѣзко, чѣмъ специфичность нативныхъ антисыворотокъ. Наилучшее объясненіе даетъ этому ученіе о „видовой специфичности“ и „специфичности состоянія“.

4. Обладаютъ большою „шириной реакціи“, такъ какъ реагируютъ съ бѣлками: а) нативнымъ, б) обработаннымъ по Schmidt'y, в) 100°-нымъ бѣлкомъ и е) высушеннымъ при 100° и раствореннымъ въ водкомъ натрѣ (съ послѣднимъ слабо).

5. Реагируютъ съ такой же „шириной реакціи“, давая только болѣе слабую преципитацию, съ бѣлками изъ мяса и органовъ.

## Глава 8.

### Преципитины, полученные отъ введенія нативныхъ мышечныхъ экстрактовъ.

Въ 1901 году Uhlenhuth<sup>1)</sup>, предлагая полученныя имъ для дифференцированія крови преципитирующія сыворотки применять также и для опредѣленія мяса различныхъ видовъ животныхъ, такъ говоритъ о примѣненіи какъ преципитиногена мясныхъ экстрактовъ: „Будетъ ли реакція интенсивнѣе, если употреблять для иммунизации кроликовъ вмѣсто крови вытяжки изъ мяса соответствующихъ животныхъ — должны показать дальѣйшіе опыты.“

Въ 1908 году Uhlenhuth съ Weidanz'омъ и Weidemann'омъ уже болѣе категорически высказываются о

1) Uhlenhuth. „Die Unterscheidung des Fleisches verschiedener Tiere mit Hilfe spezieller Sera und die praktische Anwendung der Methode in der Fleischbeschau“. — Deutsch. med. Wochenschr. 1901. № 45.

получении преципитирующихся сывороток при введении мышечных вытяжек: „Da man Pferdefleischweiss nachweisen will, so ist von vornherein die Einspritzung von Fleischsaft am rationellsten.“ Также высказываются они в „Praktische Anleitung“ и т. д. в 1909 году: „Sollen die präzipitierenden Sera zum Nachweis von Pferdefleischweiss dienen, so ist es a priori am rationellsten, die Vorbehandlung der Kaninchen mit Pferdefleischsaft vorzunehmen“ (стр. 188).

Но сейчас же дальше они так говорят о получении ими сывороток для исследования мясных продуктов: „Wir benutzen für die Herstellung der für die Fleischuntersuchung in Betracht kommenden Antisera fast ausschliesslich Pferdeserum. Nach unseren Erfahrungen ist die Vorbehandlung der Tiere mit Pferdeserum am bequemsten und in allen Fällen ausreichend“ (стр. 189). Чтобы понять такое несоответствие, что авторы, признавая самым рациональным получение антисывороток для биологического исследования мясных продуктов путем введения животным мышечного сока, а не кровяной сыворотки, сами в то же время пользуются не выжатым соком, а сывороткой, — необходимо просмотреть существующую по этому вопросу литературу.

Давно же дѣлаются попытки получать преципитирующую сыворотку, вводя животным то выжатый мясной сок, то различно приготовленные экстракты изъ мяса, но до послѣдняго времени онѣ оставались безрезультатными.

Nôtel<sup>1)</sup> иммунизировалъ часть животныхъ выжатымъ лошадинымъ мышечнымъ сокомъ, а другую часть — вытяжкой изъ мяса содержащей 0,1% соды, при чемъ экстрагированіе продолжалось 3 часа при 37°, а затѣмъ экстрактъ сливался, мясо же подвергалось прессованію, и обѣ жидкости, наконецъ, смѣшивались. Выпрыскиванія дѣлались подъ кожу. Такимъ образомъ Nôtel получалъ антисыво-

1) Nôtel. „Ueber ein Verfahren zum Nachweis von Pferdefleisch.“ Zeitschr. für Hygiene u. Infektionskr. 1902. Bd. 39.

ротки, которая съ мышечнымъ сокомъ „eine nicht unbedeutlich stärkere Reaktion gaben“, чѣмъ антисыворотки, полученныя обработкой кроликовъ лошадиной сывороткой. Эти опыты Nôtel'a были подтверждены Vallée et Nicolas<sup>1)</sup>, а затѣмъ Riegler<sup>2)</sup>, который впрыскивалъ подъ кожу водный мясной экстрактъ.

Gröning<sup>3)</sup> иммунизировалъ мяснымъ сокомъ, полученнымъ не при помощи механической силы, а путемъ замораживания мяса и послѣдующаго выдѣленія сока при оттаиваніи; однако же и онъ получалъ у кроликовъ „мѣстныхъ и общія болѣзненные явленія.“

Ruppin<sup>4)</sup> также получалъ мышечныя антисыворотки, съ сожалѣніемъ, какъ и у Nôtel'a, — слабо дѣйствующія. При этомъ Ruppin старался получать инъекционный матеріалъ возможно стерильнымъ; для этого онъ мясо опускалъ на 10 минутъ въ алкоголь, затѣмъ на стерильной тарелкѣ наружныя части мяса срезалъ стерильнымъ ножомъ; измельчалъ въ стерильной машинкѣ и выжималъ стерильнымъ прессомъ,

Для другихъ кроликовъ онъ готовилъ вытяжки изъ мяса, извлекая бѣлки рубленаго мяса стерилизованной водой въ теченіи 6 часовъ при низкой температурѣ, а затѣмъ прессуя мясо.

Но другимъ авторамъ не удавалось получать и такія слабо дѣйствующія мышечныя антисыворотки. Такъ Piorkowski, Ascoli<sup>5)</sup>, Grund und Jess<sup>6)</sup> отказались

1) Vallée et Nicolas. „Les sérums précipitants“. Bull. de la soc. centr. de méd.-vet. T. 21.

2) Riegler. „Die Serodiagnose in der Untersuchung der Nahrungsmittel.“ — Oesterreich. Chemik. Ztg. 1902. № 5.

3) Gröning. „Nachweis des Pferdefleisches durch ein spezifisches Serum.“ — Zeitschr. f. Fleisch- und Milch-Hygiene. 1902. Bd. 13.

4) Ruppin. „Zum Nachweis von Pferdefleisch.“ — Zeitschr. f. Untersuchung der Nahrungsmittel. 1902. № 8.

5) Ascoli. Biochem. Zentralbl. 2, 227 (Autoreferat).

6) Jess. „Beiträge zu Immunisierungs-Versuchen“ — Berlin. Herärztl. Wochenschr. 1901. № 42.

получать по такому способу иммунная сыворотка вследствие огромной потери кроликов, объясняя такую токсичность вытяжек содержанием в них токсальбуминов. Подвергать же сок фильтрацию через фильтр Berkefeld'a они не рѣшались, опасаясь, что фильтромъ будутъ задержаны и дѣятельныя части бѣлковъ.

Schmidt<sup>1)</sup> также пробовалъ иммунизировать кроликовъ нестерильнымъ мышечнымъ сокомъ (человѣка и рогатаго скота), вводя подъ кожу спины черезъ 3—4 дня отъ 4 до 10 к. с. сока. Получить преципитирующія сыворотки Schmidt'y не удалось, такъ какъ изъ 15 кроликовъ всѣ кромѣ 2-хъ, погибли послѣ 3-го и 4-го впрыскиванія; а эти два больше 4 и 5 впрыскиваній перенести не могли вслѣдствіе паденія въ вѣсѣ и образования гнойниковъ, при чемъ сыворотки ихъ не содержали ни мясныхъ, ни сывороточныхъ преципитиновъ.

Uhlenhuth также на основаніи своихъ опытовъ пришелъ къ выводу, что кролики очень плохо переносятъ мышечный сокъ.

Въ виду всего вышеизложеннаго Schmidt поставилъ опыты съ иммунизированіемъ кроликовъ мышечнымъ сокомъ, профильтрованнымъ черезъ свѣчу Berkefeld'a. Для этого полученный при обычныхъ условіяхъ мышечный сокъ фильтровался черезъ свѣчу, длиной въ 4—6 см.; фильтрація идетъ сравнительно медленно, но если взять двѣ свѣчи, то черезъ нѣсколько часовъ при пользованіи разрѣзывающимъ насосомъ получается достаточное количество сока для впрыскиванія 6—8 кроликамъ по 10 к. с. Такой профильтрованный сокъ всѣ 8 кроликовъ перенесли хорошо и дали послѣ 4 впрыскиваній сильно преципитирующую сыворотку.

На основаніи этого Schmidt предполагаетъ, что токсичность

сока зависитъ не отъ содержанія токсальбуминовъ, а отъ бактерій, которыя всегда будутъ въ нестерильномъ сокѣ и которыя, попадая въ организмъ иммунизируемаго животнаго, вызываютъ заболѣванія, что и препятствуетъ выработкѣ иммунныхъ тѣлъ (преципитиновъ). Устраняя это, фильтрацію черезъ свѣчу Berkefeld'a сравнительно немного уменьшаетъ содержаніе въ сокѣ бѣлковъ; такъ по изслѣдованію Schmidt'a выходило, что нефилтрованный сокъ даетъ 10—12% сухого остатка, а профильтрованный — 6,5—7,5%. Поэтому Schmidt настойчиво рекомендуетъ для полученія мышечныхъ антисыворотокъ пользоваться профильтрованнымъ черезъ свѣчу Berkefeld'a сокомъ.

Однако и послѣ этихъ изслѣдованій Schmidt'a появлялись работы, въ которыхъ авторы рекомендуютъ примѣненіе экстрактовъ для иммунизациі безъ предварительнаго фильтрованія черезъ фильтр Berkefeld'a.

Сюда относится, между прочимъ, работа Fernet'a und Müller'a<sup>1)</sup>. Они примѣняютъ для инъекціи слѣдующій экстрактъ: берутъ въ  $\frac{1}{4}$  килогр. вѣсомъ кусокъ лошадинаго мяса, обжигаютъ его со всѣхъ сторонъ на бунзеновской горѣлкѣ или опускаютъ на одну минуту въ кипящую воду, затѣмъ на стерильной тарелкѣ стерильнымъ ложкомъ разрѣзываютъ кусокъ пополамъ и съ поверхности разрѣза соскабливаютъ около 50 гр. мяса, которое растираютъ въ стерильной ступкѣ и выжимаютъ. Затѣмъ прибавляютъ до двойнаго количества физиологическаго раствора поваренной соли и оставляютъ выщелачиваться 2—3 час. въ ледяномъ шкафу съ прибавленіемъ 10—20 кап. хлороформа въ темной бутылкѣ. Пропустивъ затѣмъ экстрактъ черезъ тонкое волосное ситечко, сохраняютъ въ стерильныхъ пробиркахъ съ прибавленіемъ хлороформа на холоду. Fernet und Müller

1) Fernet und Müller. „Zur Herstellung und Verwendung präzipitierender Sera insbesondere für den Nachweis von Pferdefleisch.“ Zeitschr. für biolog. Technik und Methodik 1908—1909. Bd. 1.

1) Schmidt. „Untersuchungen über die Erzeugung hochwertiger Muskelweiss-Antisera für die Fleischdifferenzierung“. — Biochem. Zeitschr. 1907. Bd. 5.

примѣняли этотъ мышечный экстрактъ вѣсто кровяной сыворотки для иммунизации, такъ какъ замѣтили, что его лучше переноситъ животныя, и что мышечный экстрактъ даетъ болѣе дѣятельную лошадиную антисыворотку.

Uhlenhuth, Weidanz и Wedemann предлагаютъ два способа: или фильтрование черезъ свѣчу, какъ совѣтуетъ Schmidt, или же по ихъ способу приготовленный экстрактъ. Для этого они берутъ равныя вѣсовыя количества скобленного мяса и физиологическаго раствора, смѣшиваютъ ихъ и оставляютъ на нѣсколько часовъ выщелачиваться; затѣмъ прессуютъ и сохраняютъ съ небольшимъ количествомъ хлороформа, который передъ впрыскиваніемъ удаляютъ нагреваніемъ. Но и тутъ авторы добавляют, что „покойнѣе и удобнѣе все же употреблять дефибринированную лошадиную кровь или лошадиную сыворотку“.

Изъ обзора этой литературы видно, почему Uhlenhuth все же старается избѣгнуть получения мышечныхъ антисыворотокъ. Дѣйствительно, цѣлый рядъ въ началѣ неудачныхъ попытокъ получить преципитирующую сыворотку путемъ введенія мышечнаго сока или экстракта, затѣмъ удачные опыты Schmidt'a, но которые требуютъ обязательной стерильности этого сока, достигаемой фильтрованіемъ черезъ свѣчу Berkefeld'a; наконецъ, указанія Uhlenhuth'a, Weidanz'a и Wedemann'a, что возможно получение такихъ антисыворотокъ безъ фильтрованія, и то предпочтеніе, которое оказываютъ Fognet и Mülleг именно мышечнымъ преципитирующимъ сывороткамъ, даже безъ фильтрованія, — все это показываетъ, насколько неопредѣленно стоитъ въ настоящій моментъ вопросъ о методѣ получения преципитирующихъ сыворотокъ при введеніи животнымъ выжатого мышечнаго сока или экстракта. Поэтому Uhlenhuth и предпочитаетъ пользоваться старымъ методомъ получения антисыворотокъ — введеніемъ животнымъ дефибринированной крови или кровяной сыво-

воротки, хотя и признаетъ полную цѣлесообразность получения мышечныхъ антисыворотокъ для изслѣдованія мясныхъ продуктовъ.

Что касается преимуществъ мышечныхъ преципитирующихъ сыворотокъ передъ сывороточными и преципитивами при изслѣдованіи мясныхъ продуктовъ, то авторы, работавшіе по этому вопросу, указываютъ, что такое преимущество существуетъ, но точныхъ изслѣдованій не было сдѣлано до работы Schmidt'a, который, выработавъ свой методъ получения мышечныхъ преципитивовъ, подвергнулъ ихъ параллельно съ сывороточными преципитивами болѣе точному изслѣдованію.

Правда, еще до изслѣдованій Schmidt'a можно было а priori предполагать, что такое преимущество мышечныхъ преципитирующихъ сыворотокъ при изслѣдованіи мясныхъ продуктовъ должно существовать. Это выходило изъ работъ всѣхъ авторовъ, занимавшихся полученіемъ органо-специфическихъ сыворотокъ (Grund, Forssner, Ascoli, Weichardt и др.), выводъ которыхъ былъ тотъ, что сильнѣе всего преципитируютъ сыворотки съ тѣмъ веществомъ или, вѣрнѣе, съ тѣмъ бѣлкомъ, который служилъ для иммунизации животнаго, а затѣмъ уже значительно слабѣе съ другими бѣлками того же вида животныхъ. Отсюда надо было думать, что и преципитирующая сыворотка, полученная введеніемъ мышечныхъ бѣлковъ, должна сильнѣе реагировать съ мясными вытяжками, чѣмъ антисыворотки, полученныя отъ иммунизации сывороточными бѣлками.

Это предположеніе болѣе или менѣе точно подтвердилъ Schmidt, который ставилъ слѣдующимъ образомъ опыты. Для испытанія антисыворотокъ онъ приготовлялъ 2%-ые растворы фильтрованнаго выжатого сока изъ человѣческаго, лошадинаго и коровьяго мяса и изъ человѣческой кровяной сыворотки. Для опыта преципитации смѣшивалъ 5 капель преципитирующей сыворотки и 2 к. с. испытуемаго раствора,

и послѣ 24 часового стоянія при комнатной температурѣ опредѣлять количество осадка. Свои результаты Schmidt представилъ въ видѣ таблицы, которую приводимъ здѣсь.

Таблица № 39.

1	$\frac{2}{10}$ раств. выж. сока изъ человѣч. мяса	+	Menschen-Pressaft-Antiserum	Момент. оч. сильн. реакц. Выс. осадка = 6 мм.
2	То же	+	Menschen-Blut-Antiserum	Очень слаб. помутн. Выс. осадка = 0,5 мм.
3	$\frac{2}{10}$ раств. человѣч. кров. сывор.	+	Menschen-Pressaft-Antiserum	Момент. оч. сильн. реакц. Выс. осадка = 3 мм.
4	То же	+	Menschen-Blut-Antiserum	Момент. оч. сильн. реакц. Выс. осадка = 6 мм.
5	$\frac{2}{10}$ раств. выжат. коров. сока	+	Menschen-Pressaft-Antiserum	Остается явнѣе прозрачнымъ.
6	$\frac{2}{10}$ раств. выжат. лошад. сока	+	То же	То же
7	То же	+	Безъ прибавленія	То же

Изъ опытовъ 1-го и 2-го авторъ выводитъ заключеніе, что фильтрованный выжатый сокъ вызываетъ въ животномъ организмѣ особый преципитинъ мышечнаго бѣлка (Muskel-eiweisspräcipitin), благодаря которому съ растворомъ выжатого сока получается сильный осадокъ, въ то время какъ кровяная антисыворотка даетъ очень слабую реакцію. Изъ опытовъ 1-го и 3-го выходитъ, что антисыворотка выжатого сока вызываетъ обильный преципитатъ не только съ растворомъ выжатого сока, но и съ растворомъ кровяной сыворотки; а сравненіе опытовъ 3-го и 4-го показываетъ, что антисыворотка выжатого сока также сильно реагируетъ съ сывороточнымъ бѣлкомъ, какъ и очень дѣятельная кровяная антисыворотка. Наконецъ, опыты 1, 5 и 6 указываютъ на специфичность преципитина мышечнаго бѣлка.

Изъ всего этого можно вывести заключеніе, что мышечный бѣлокъ отличается биологически отъ сывороточнаго бѣлка. Но если иммунизировать кролика выжатымъ мышечнымъ сокомъ, то получается преципитирующая сыворотка, которая обладаетъ

способностью реагировать какъ съ мышечнымъ бѣлкомъ, такъ и съ сывороточнымъ.

Въ этой двойной способности Schmidt и видить главное преимущество антисыворотокъ выжатого сока при изслѣдованіи мясныхъ продуктовъ; и такъ какъ полученіе такихъ антисыворотокъ, по его мнѣнію, не представляетъ особаго труда, то Schmidt рекомендуетъ приниматьъ всегда мышечный преципитинъ при изслѣдованіи мяса. Для этого онъ считаетъ необходимымъ, чтобы сыворотка была такой силы, что при смѣшиваніи въ вышеуказанномъ отношеніи, т. е. около 1 : 15, съ  $\frac{2}{10}$  растворомъ выжатого сока тотчасъ получалось помутнѣніе, а черезъ 5 минутъ и образованіе хлопьевъ. Такая сыворотка получить легко; у автора же желательная интенсивность реакціи получалась даже съ  $\frac{1}{2}$  растворомъ выжатого сока.

Считаю необходимымъ замѣтить здѣсь, что автору нужно было бы указать, каковыми титрами обладаютъ его антисыворотки, что могло бы разрѣшить одинъ вопросъ, который возникаетъ при разборѣ таблицы № 39. Дѣйствительно, антисыворотка выжатого сока, если она обладаетъ высокимъ титромъ, т. е. сильно реагирующая, легко можетъ дать большой преципитатъ съ  $\frac{2}{10}$  растворомъ кровяной сыворотки, какъ это подтвердитъ и мои опыты; но здѣсь надо принимать во вниманіе, что  $\frac{2}{10}$  растворъ кровяной сыворотки содержитъ гораздо больше бѣлковъ, чѣмъ  $\frac{2}{10}$  растворъ выжатого сока, а это не можетъ не вліять на усиленіе реакціи. Съ другой стороны, если предположить, что антисыворотка кровянаго бѣлка, наоборотъ, обладаетъ невысокимъ титромъ, то она съ  $\frac{2}{10}$  растворомъ кровяной сыворотки, конечно, еще даетъ обильный осадокъ, такъ какъ это очень крѣпкій растворъ бѣлка и даже слабо-преципитирующая сыворотка дастъ съ нимъ обильный осадокъ, зато съ  $\frac{2}{10}$  растворомъ выжатого сока реакція будетъ незначительная. Такимъ образомъ и можетъ получиться такая рѣзкая разница въ

дѣйствія преципитивовъ, мышечнаго и сывороточнаго, на 2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> растворъ выжатого сока

Но если даже принять во вниманіе эту возможность разницы въ титрахъ обѣихъ антисыворотокъ, то все же надо признать изъ этихъ опытовъ, что разница между мышечнымъ и сывороточнымъ бѣлками существуетъ, и что мышечный преципитивъ долженъ болѣе годиться для изслѣдованія мясныхъ продуктовъ.

Считая очень важнымъ вопросъ о преимуществѣ мышечнаго преципитива передъ сывороточнымъ при изслѣдованіи мясныхъ продуктовъ, мною тоже были поставлены опыты съ полученіемъ Nativ- und Hitze-Alkali — преципитивовъ введеніемъ животнымъ различныхъ мышечныхъ экстрактовъ и выжатого мясного сока. Для полученія нативныхъ мышечныхъ преципитивовъ я впрыскивалъ только обыкновенные мышечные экстракты, полученные, какъ было описано выше, выщелачиваніемъ съ помощью физиологическаго раствора. Эти экстракты заготовлялись мною заранѣе и хранились на холоду въ темныхъ стеклянкахъ съ прибавленіемъ хлороформа. Они не фильтровались черезъ фильтръ Berkefeld'a, и я пользовался ими только послѣ храненія въ теченіи нѣсколькихъ дней съ хлороформомъ. Такимъ образомъ я расчитывалъ достигнуть большей или меньшей стерильности этихъ экстрактовъ и избѣгнуть гибели животныхъ. Это я дѣлалъ на основаніи тѣхъ соображеній, что удачные опыты иммунизации кроликовъ мышечнымъ выжатымъ сокомъ Fogneta, Müller'a и Uhlenhuth'a безъ фильтрованія надо объяснять тѣмъ, что сокъ у нихъ держался нѣкоторое время съ хлороформомъ и терялъ отъ этого свою токсичность, какъ это было доказано, между прочимъ, и по отношенію къ кровяной сывороткѣ.

Опыты, повидимому, оправдали мои предположенія и изъ 5-ти кроликовъ, иммунизированныхъ нативными мышечными экстрактами, ни одинъ не погибъ и не далъ замѣт-

наго паденія въса во время иммунизации, что могло бы указывать на заболѣваніе его. Получали кролики первый разъ по 10 к. с., а затѣмъ по 25 к. с. внутривенно черезъ 2 дня въ третій, всего по 6 впрыскиваній; послѣ чего производилось вытѣ крови изъ уха и, по опредѣленіи титра, обезкровливаніе кролика. Такъ какъ при храненіи экстрактовъ въ нихъ образовывался осадокъ, то я для впрыскиванія употреблялъ экстрактъ вмѣстѣ съ осадкомъ, удаливъ предварительно нагреваніемъ въ термостатѣ слѣды хлороформа. Вреда для кроликовъ при введеніи въ брюшную полость такого осадка не наблюдалось.

Всѣ эти антисыворотки, полученныя иммунизацией кроликовъ нативными мышечными экстрактами, были подвергнуты изслѣдованіямъ съ тѣми же самыми растворами, съ которыми изслѣдовались нативные сывороточные преципитивы. Такимъ образомъ я расчитывалъ имѣть возможность провести полное сравненіе между мышечными и сывороточными нативными преципитивами.

#### А. Дѣйствіе на нативные бѣлки.

Таблица № 40 представляетъ опредѣленіе титра антисыворотокъ, т. е. преципитацию ихъ съ разведеніями нативныхъ мышечныхъ экстрактовъ.

Таблица № 40.

№ кроликовъ	Антисыворотка	Лошад. экстр.				Коровій экстр.				Свин. экстр.				
		50	100	500	1000	5000	10000	50	100	500	1000	5000	10000	
17	Лошадн.	++	++	++	++	+	0	0	0	—	—	—	—	—
18	"	++	++	++	++	+	0	0	0	—	—	—	—	—
19	Коровья	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
20	"	+	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
21	Свинья	0	0	0	—	—	0	0	0	0	+	+	0	0

Отсюда видно, что изъ 5-ти иммунныхъ сыворотокъ 3 дали преципитацию до разведенія 1:5000 включительно

(сыв. №№ 17, 18, 19), хотя двѣ изъ нихъ съ разведеніемъ 1:5000 дали только слѣды реакціи; 1 дала до разведенія 1:1000 (№ 20) и послѣдняя — № 21 преципитировала всего только до развенія 1:100. Поэтому послѣдняя антисыворотка, какъ обладающая слишкомъ слабой преципитирующей силой, другимъ изслѣдованіямъ не подвергалась.

Что касается специфичности, которая изслѣдовалась вмѣстѣ съ опредѣленіемъ титра, то съ гетерологическими экстрактами помутнѣніе получалось не больше, какъ въ разведеніяхъ 1:50, и то въ нѣкоторыхъ случаяхъ здѣсь получался только намекъ на преципитацию; антисыворотка же № 21 обладала полной специфичностью.

Преципитатъ съ гомологическими экстрактами получался обильный, въ особенности съ болѣе крѣпкими растворами (1:50 и 1:100), и появлялся черезъ 1—2 минуты послѣ наславанія на преципитинъ экстракта. Съ гетерологическими бѣлками преципитатъ, наоборотъ, былъ очень незначительный и появлялся несравненно медленнѣе (черезъ 10—15 минутъ). Въ общемъ теченіе реакціи въ этомъ случаѣ вполне похоже на реакцію при дѣйствіи нативныхъ сывороточныхъ преципитиновъ на неизмѣненную кровяную сыворотку. Химически бѣлокъ опредѣлялся только въ разведеніяхъ экстрактовъ 1:500, давая и въ этомъ разведеніи реакцію не со всеми химическими реактивами на бѣлокъ, какъ это видно изъ таблицы № 81.

Надо еще добавить, что всѣ антисыворотки были испытаны, не даютъ-ли самостоятельнаго помутнѣнія съ физиологическимъ растворомъ хлористаго натра, а экстракты въ разведеніи 1:50 съ нормальной кроличьей сывороткой. Всѣ эти повѣрочные опыты дали отрицательный результатъ. Реакція экстрактовъ уже въ разведеніи 1:50 была нейтральная на лакмусъ.

Наконецъ, эти антисыворотки были изслѣдованы мною 3 раза на экстракты, въ различное время приготовленные,

чтобы такимъ образомъ рѣшить вопросъ, не зависитъ-ли титръ въ значительной степени отъ содержанія бѣлка въ томъ или иномъ экстрактѣ; оказалось, что колебанія столь незначительныя, что не могутъ быть принимаемы во вниманіе.

Таблица № 41.

№№ кроликъ	Антисывор.	Лошадн. сыворотка					Коровья сыворотка					Свиная сыворотка					
		50	100	500	1000	5000	10000	15000	20000	50	100	500	1000	5000	10000	15000	20000
17	Лощ.	++	++	++	++	++	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
18	•	++	++	++	++	++	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
19	Кор.	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
20	*	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+

Въ этихъ опытахъ также теченіе реакціи имѣло много общаго съ реакціей нативныхъ сывороточныхъ преципитиновъ на нативную кровяную сыворотку: помутнѣніе появлялось почти непосредственно послѣ примитія кровяной сыворотки и преципитатъ получался очень обильный, въ особенности въ разведеніяхъ 1:50, 1:100 и 1:500. Если сравнить преципитатъ въ этомъ опытѣ съ преципитатомъ предыдущаго опыта, то первый несравненно больше второго. Такъ точно и развенія кровяной сыворотки, съ которыми происходитъ еще реакція, значительно большія, чѣмъ при дѣйствіи тѣхъ же мышечныхъ преципитиновъ на экстракты изъ мяса (таблица № 40). Дѣйствительно, съ мышечными экстрактами эти преципитины реагировали самое большее въ развеніяхъ 1:1000 и 1:5000, а здѣсь три антисыворотки давали еще реакцію въ развеніяхъ 1:15000 и одна — 1:10000.

Объясненіе этому, по моему мнѣнію, надо искать главнымъ образомъ въ значительно большемъ содержаніи бѣлковъ въ сывороткахъ по сравненію съ экстрактами; такъ и химическими способами, какъ было упомянуто, бѣлокъ опредѣлялся еще въ сывороткахъ, разведенныхъ 1:5000 физио-

логическим раствором, по Эсбаху сыворотки содержат 47,2—68,2<sup>0</sup>/<sub>100</sub> бѣлка, а мышечные экстракты — 7,9—9,9<sup>0</sup>/<sub>100</sub>. От этой разницы зависит и образование значительно большего преципитата съ разведениями кровяной сыворотки. Реакція съ гетерологическими бѣлками или сывороткамъ не получалась или получалась только съ разведениями 1:50.

Но возможно также, что при введеніи въ организмъ животному мышечныхъ бѣлковъ въ сывороткѣ вырабатывается больше общихъ для сывороточныхъ бѣлковъ преципитиновъ, чѣмъ, наоборотъ, при введеніи сывороточныхъ бѣлковъ вырабатывается общихъ для мышечныхъ бѣлковъ преципитиновъ. Такая выработка большого количества общихъ преципитиновъ, а также большое количество бѣлка въ сывороткѣ, вполне объяснило-бы такую реакцію мышечныхъ преципитиновъ съ сывороткой, какъ это наблюдается въ этомъ опытѣ.

Такимъ образомъ и здѣсь я считаю нужнымъ указать, какъ и послѣ опытовъ съ нативными сывороточными преципитинами, что, опредѣляя титръ той или иной преципитирующей сыворотки, необходимо указывать, съ какимъ растворомъ опредѣлялся этотъ титръ, или что то же самое: сравнивая титръ двухъ антисыворотокъ, надо всегда имѣть въ виду, на одинаковое-ли преципитируемое вещество опредѣлялся ихъ титръ; такъ напримѣръ: сыворотку, которая получена введеніемъ мышечныхъ экстрактовъ и реагируетъ со своимъ антигеномъ въ разведеніи 1:1000 и 1:5000, надо считать сывороткой сильно дѣйствующей; тогда какъ сыворотка, полученная послѣ иммунизации кролика кровяной сывороткой и также реагирующая со своимъ антигеномъ, т. е. сывороткой, въ разведеніи 1:1000 или 1:5000, должна считаться обладающей средней преципитирующей силой. Хотя титръ здѣсь одинаковъ въ обоихъ сывороткахъ, но играетъ большое значеніе то преципитируемое вещество, съ которымъ

опредѣлялся титръ. Поэтому то у Куррота на стр. 69 его диссертации получается 2 титра, значительно отличающіеся другъ отъ друга: для одной сыворотки (крол. № 16) одинъ относительно раствора сыворотки (1:20000), а другой — относительно раствора препарата Schütze (1:10000). Авторъ ничего не говоритъ объ этомъ, но, по моему мнѣнію, только разницей въ преципитируемомъ веществѣ и можно объяснить эту разницу въ титрахъ.

Сравнивая теперь дѣйствія нативныхъ мышечныхъ и сывороточныхъ преципитиновъ на неизмѣненныя кровяныя сыворотки и мышечные экстракты, мы видимъ, что мышечные преципитины, обладая почти одинаковой съ сывороточными преципитинами способностью реагировать на нативную кровяную сыворотку, на мышечный бѣлокъ дѣйствуютъ сильнѣе сывороточныхъ преципитиновъ. Такимъ образомъ здѣсь подтверждается сдѣланное ранѣе наблюденіе, что изъ двухъ антисыворотокъ реагируетъ сильнѣе на какое либо вещество та антисыворотка, которая иммунизировалась введеніемъ именно этого вещества.

На основаніи этихъ опытовъ я также долженъ согласиться съ мнѣніемъ Schmidt'a, что мышечный преципитинъ имѣетъ преимущество передъ сывороточнымъ преципитиномъ въ томъ отношеніи, что кромѣ реакціи съ мышечнымъ бѣлкомъ, онъ обладаетъ большой способностью къ реакціи съ сывороточнымъ бѣлкомъ; тогда какъ сывороточный преципитинъ проявляетъ очень слабую реакцію съ мышечнымъ бѣлкомъ. Schmidt не даетъ никакого объясненія этому явленію. Мнѣ же представляется весьма вѣроятнымъ, что причина зависитъ, во-первыхъ, отъ разницы въ содержаніи бѣлковъ въ сывороткѣ и мышечномъ экстрактѣ и, во-вторыхъ, можетъ быть, въ различной выработкѣ общихъ преципитиновъ въ тѣхъ и другихъ антисывороткахъ, такъ какъ самъ Schmidt отбрасываетъ еще

одно возможное предположение, что то небольшое количество (следы) крови, которое содержится в мясе, может вызвать такое сильное образование сыровоточных преципитинов в организм животного.

Нѣкоторое количество ихъ безусловно образуется, но главная роль принадлежит общимъ преципитинамъ. Для практики же, конечно, получение мышечныхъ преципитиновъ играетъ большое значеніе, такъ какъ, будучи болѣе пригодными для изслѣдованія мясныхъ продуктовъ, они могутъ быть примѣняемы и для судебно-медицинскихъ цѣлей: для дифференцированія крови того или другого вида животныхъ.

#### Б. Дѣйствіе на бѣлки денатурированные по Schmidt'y.

Далѣе мышечные преципитины изслѣдовались мной на сыровотку и мышечный экстрактъ, обработанные по способу Schmidt'a съ послѣдующей нейтрализаціей; разведенія дѣлались отъ 1 : 50 и выше. Однако ни съ сыровоткой, ни съ мышечнымъ экстрактомъ преципитации не получилось даже въ разведеніи 1 : 50.

#### В. Дѣйствіе на 100°-бѣлки.

Такіе же отрицательные результаты получились при дѣйствіи мышечныхъ преципитиновъ на сыровотку и мышечный экстрактъ, которые въ разведеніи 1 : 50 съ физиологическимъ растворомъ подвергались нагреванію въ теченіи 30 минутъ въ кипящей банѣ, а также съ мышечнымъ экстрактомъ и сыровоткой, подвергнутыми такому же нагреванію, но въ разведеніи 1 : 25 съ 0,1% растворомъ соды, благодаря чему устранялось свертываніе бѣлка, какъ это было въ разведеніяхъ съ физиологическимъ растворомъ.

Всѣ эти опыты показываютъ, что нативные мышечные преципитины относятся совершенно

индифферентно къ денатурированнымъ по Schmidt'y и кипяченіемъ съ содой и безъ нея бѣлками.

Здѣсь мы видимъ полную аналогию между нативными мышечными и сыровоточными преципитинами, такъ какъ и послѣдніе не реагировали съ бѣлками, ни мышечными, ни сыровоточными, подвергнутыми той или другой изъ вышеупомянутыхъ обработокъ.

#### Г. Дѣйствіе на бѣлокъ денатурированный щелочью при комнатной температурѣ и при 70°.

Подобно тому какъ нативные сыровоточные преципитины изслѣдовались на сыровотку, подвергнутую дѣйствію щелочи при комнатной температурѣ и при 70° въ теченіи 15 минутъ и послѣ того нейтрализованную, также и мышечные преципитины были изслѣдованы на такимъ же способомъ обработанные ѣдкой щелочью мышечные экстракты. При чемъ одна часть экстракта, разведеннаго физиологическимъ растворомъ и смѣшаннаго съ нормальнымъ растворомъ ѣдкаго натра въ пропорціи указанной Schmidt'омъ, подвергалась дѣйствію щелочи при комнатной температурѣ, другая часть — при 70°.

Таблица № 42.

№ № Крестьянъ	Аннотатор.	Мышечный экстрактъ обработ. щелочью 15 м. при ком. °											
		Лошадинамъ					Коровамъ					Свиной	
		50	100	500	1000	5000	50	100	500	1000	5000	50	100
17	Лошад.	++	+	+	+	0	+	0	0	—	—	+	0
18	"	+	+	+	+	0	+	0	0	—	—	+	0
19	Коров.	?	0	0	—	—	+	+	+	+	0	?	0
20	"	+	0	0	—	—	+	+	+	+	0	?	0

Изъ этой таблицы видно, что обработка щелочью мышечнаго экстракта при комнатной температурѣ производить настолько незначительныя измѣненія мышечныхъ бѣлковъ,

что precipitation с нативными precipitation почти не страдает. Замечается только незначительное уменьшение титра со своими экстрактами, специфичность же остается такой же, как и с неизменными мышечными экстрактами. Этот опыт подтверждает одинаковый опыт с сывороточными нативными precipitation и, наоборот, опять противоречит опытам Schmidt'a, у которого нативный precipitation не реагирует с сывороткой, подвергнутой действию Na OH при комнатной температурѣ.

Совершенно другое получается при действии щелочи и 70° температурѣ; здѣсь денатурація бѣлка идетъ такъ далеко, что не получается precipitation даже с разведеніемъ 1:50.

#### Д. Дѣйствіе на экстракты изъ органовъ.

Затѣмъ мною были поставлены опыты precipitation мышечными precipitationующими сыворотками экстрактовъ

Таблица № 43.

№ Крѣпкого	Антисыворот.	Натуральный экстрактъ изъ печени									
		Лошади				Коровы				Свиньи	
		50	100	500	1000	50	100	500	1000	50	100
17	Лошад.	+	+	0	0	0	0	—	—	0	0
18	"	+	+	0	0	0	0	—	—	0	0
19	Коров.	0	0	—	—	+	+	0	0	0	0
20	"	0	0	—	—	+	+	0	0	0	0

Таблица № 44.

№ Крѣпкого	Антисыворот.	Натуральный экстрактъ изъ почки									
		Лошади				Коровы				Свиньи	
		50	100	500	1000	50	100	500	1000	50	100
17	Лошад.	+	+	+	0	0	0	—	—	0	0
18	"	+	+	0	0	0	0	—	—	0	0
19	Коровья	0	0	—	—	+	+	+	?	0	0
20	"	0	0	—	—	+	+	+	?	0	0

Таблица № 45.

№ Крѣпкого	Антисыворот.	Натуральный экстрактъ изъ селезенки									
		Лошади				Коровы				Свиньи	
		50	100	500	1000	50	100	500	1000	50	100
17	Лошад.	+	+	?	0	0	0	—	—	0	0
18	"	+	+	+	0	0	0	—	—	0	0
19	Коровья	0	0	—	—	+	+	+	0	0	0
20	"	0	0	—	—	+	+	+	0	0	0

изъ почки, печени и селезенки для рѣшенія вопроса, содержится-ли въ этихъ антисывороткахъ общіе precipitation для этихъ экстрактовъ. Методика была такая же, какъ и въ другихъ опытахъ съ экстрактами изъ органовъ.

Изъ приведенныхъ опытовъ можно вывести заключеніе, что въ сывороткѣ кролика, иммунизируемаго мышечными бѣлками, также какъ и при иммунизации сывороточными бѣлками, образуются кромѣ специфичныхъ для мышечнаго бѣлка precipitation и общіе, которыми и обуславливается появленіе реакціи съ экстрактами изъ органовъ. Такъ какъ такихъ общихъ precipitation выработывается въ сывороткѣ кролика меньше, чѣмъ специфичныхъ, а количество бѣлка въ мышечныхъ экстрактахъ и экстрактахъ изъ органовъ приблизительно одинаково (см. табл. №№ 81 и 82), то этимъ и объясняется, что precipitation антисыворотокъ съ экстрактами изъ органовъ слабѣе, а потому надо ожидать, что реакція окончится при меньшихъ разведеніяхъ, чѣмъ это получается со своимъ антигеномъ. Опыты, действительно, и подтверждаютъ это предположеніе, такъ какъ наибольшее разведеніе, при которомъ получается еще precipitation, это 1:500; и только 2 антисыворотки (№№ 19 и 20) дали слѣды реакціи съ разведеніями коровьяго печеночнаго экстракта 1:1000; а другія двѣ (№№ 17 и 19) съ печеночнымъ экстрактомъ реагировали только 1:100.

Такимъ образомъ съ экстрактами изъ органовъ мышеч-

ние преципитины реагируют все, но в более крепких разведениях; с гетерологическими экстрактами реакции не получалось. Сильнее всего реакция здесь протекала с почечным экстрактом, затѣм с селезеночным и печеночным; что же касается отдѣльных антисыворотокъ, то надо предположить, что выработка общихъ преципитиновъ, какъ это было замѣчено и раньше, идетъ очень индивидуально, отчего одна антисыворотка, какъ содержащая больше общихъ преципитиновъ для печеночнаго экстракта, реагируетъ съ нимъ сильнее и, наоборотъ, бѣдная общими для печеночныхъ бѣлковъ преципитинами, даетъ съ этимъ экстрактомъ реакцію только въ небольшихъ разведенияхъ; другая же антисыворотка можетъ представлять совершенно другія отношенія къ экстрактамъ, благодаря тому, что выработка общихъ преципитиновъ въ этой сывороткѣ шла въ другомъ направленіи, если, напримѣръ, вырабатывалось больше общихъ преципитиновъ для печеночныхъ бѣлковъ и меньше для почечныхъ. Но въ общемъ, какъ было только что сказано, въ сывороткахъ имѣется наклонность вырабатывать большее количество общихъ для почечныхъ бѣлковъ преципитиновъ.

Испытаніе этихъ антисыворотокъ на экстракты изъ органовъ въ обработкѣ Schmid't'a или нагреваніемъ до 100° (съ содой и безъ нея) дало совершенно отрицательные результаты.

#### Е. Дѣйствіе элективного насыщенія на сыворотки.

Мышечныя преципитирующія сыворотки я не подвергалъ элективному насыщенію экстрактами изъ какого либо органа, такъ какъ на основаніи существующей литературы, а также моихъ опытовъ, можно быть увѣреннымъ, что ихъ удастся вполне насытить бѣлками того или другого органа и сдѣлать такимъ образомъ антисыворотку специфичной для опредѣленныхъ бѣлковъ. Вопросъ заключается только въ

томъ, что сыворотки, полученныя введеніемъ экстрактовъ изъ различныхъ органовъ, какъ показали Grund, Forssner и др., различаются только большей или меньшей легкостью къ насыщенію опредѣленнымъ бѣлкомъ. Поэтому нельзя и здѣсь ожидать какой-либо существенной разницы въ отношеніи къ насыщенію между сывороточными и мышечными преципитинами.

Методъ элективного насыщенія по Weichardt'у применялся мною къ мышечнымъ преципитинамъ съ цѣлью ближе подойти къ объясненію причинъ, отъ чего зависитъ получение такой сильной реакціи при дѣйствіи мышечныхъ преципитиновъ на кровяную сыворотку. Для этого мною однѣ и тѣ же двѣ мышечныя антисыворотки насыщались, съ одной стороны, неизмѣненной кровяной сывороткой, съ другой стороны, — своимъ же мышечнымъ экстрактомъ. Для опытовъ бралось по 5 к. с. преципитирующихъ сыворотокъ и прибавлялось послѣдовательно по 0,5; 0,4; 0,3 а иногда и 0,2 или мышечнаго экстракта или сыворотки, пока не получится полного насыщенія. При этомъ надо замѣтить, что какъ при прибавленіи мышечнаго экстракта, такъ и кровяной сыворотки въ антисывороткѣ всякій разъ, въ особенности же при первыхъ насыщеніяхъ (прибавленіяхъ), образовывался большой осадокъ. Антисыворотки по отношенію къ насыщаемому веществу испытывались послѣ каждого насыщенія, а по отношенію къ ненасыщаемому веществу только 2 раза: передъ началомъ насыщенія и въ концѣ его.

Результаты этихъ опытовъ сведены въ одну таблицу (со свиной сывороткой и экстрактомъ преципитации не ставилось).

Изъ этихъ опытовъ видно, что существуетъ большая разница между насыщеніемъ мышечныхъ антисыворотокъ кровяной сывороткой и мышечнымъ экстрактомъ. Въ первомъ случаѣ, т. е. при насыщеніи кровяной сывороткой, наблюдается полное уничтоженіе у этихъ антисыворотокъ



способны еще довольно значительно реагировать с мышечными экстрактами.

Этим специфичными для мышечных бѣлков преципитинами, повидному, и надо объяснить то преимущество, которое имѣют мышечныя преципитирующія сыворотки передъ сывороточными при изслѣдованіи мясныхъ продуктовъ.

Результаты всѣхъ опытовъ, поставленныхъ съ нативными мышечными преципитинами, собраны въ слѣдующую таблицу, гдѣ обозначенія будутъ тѣ же, какъ въ сводныхъ таблицахъ въ предыдущихъ отдѣлахъ.

Таблица № 47.

Антисыворотка, полученная отъ введенія нативныхъ мышечныхъ бѣлковъ.

Растворы	Результ.	Растворы	Результ.	Растворы	Результ.
Нат. мыш. экстр.	+++	Мыш. экстр. съ физ. р. 100° — 30°	0	Мыш. экстр. + NaOH 15° — комн. т°	+++
Нат. сыв-ка	++++	Сыв-ка съ физ. раств.	0	Печени. экстр.	++
Мыш. экстр. по Schm.	0	100° — 30° Мыш. экстр. + 0,1% соды	0	Печен. экстр.	+
Сыв-ка по Schm.	0	Сыв-ка + 0,1% соды 100° — 30°	0	Селезен. экстр.	++

1. Удастся безъ потери животныхъ получить нативную мышечную преципитирующую сыворотку съ достаточно высокимъ титромъ, если только мышечный экстрактъ до впрыскиванія животнымъ продержатъ нѣсколько дней съ хлороформомъ.
2. Нативные мышечные преципитины обладаютъ всеми

свойствами нативныхъ сывороточныхъ преципитиновъ, давая такую же ширину реакціонной способности, заключая въ себѣ какъ общіе, такъ и специфичные преципитины и т. д.

3. Преимущество мышечныхъ преципитиновъ передъ сывороточными заключается въ слѣдующемъ: во-первыхъ, мышечные преципитины сильнѣе реагируютъ съ мышечными бѣлками, и, во вторыхъ, обладаютъ почти одинаковой способностью съ сывороточными преципитинами реагировать съ сывороточными бѣлками. А потому необходимо рекомендовать примѣненіе нативныхъ мышечныхъ преципитиновъ при изслѣдованіи мясныхъ продуктовъ, такъ какъ эти же преципитины вполнѣ пригодны и для изслѣдованія крови въ судебно-медицинскихъ цѣляхъ.

## Глава 9.

### Преципитины, полученные отъ введенія мышечныхъ экстрактовъ денатурированныхъ по Schmidt'у.

Въ виду выяснившихся изъ опытовъ съ нативными мышечными преципитинами преимуществъ этихъ преципитиновъ передъ сывороточными мною были поставлены опыты иммунизации кроликовъ мышечными экстрактами, обработанными нагреваніемъ и цельюю по способу Schmidt'a. Но только Schmidt'омъ такое денатурированіе было предложено для полученія сывороточнаго Hitzte-Alkali-преципитина, а же ставилъ опыты, расчитывая получить мышечные Hitzte-Alkali-преципитины и такимъ образомъ соединить, въ случаѣ удачныхъ результатовъ, свойства мышечныхъ преципитиновъ съ преимуществами Hitzte-Alkali-преципитиновъ. При иммунизации мышечнымъ экстрактомъ, подвергну-

тять предварительной обработкой по способу Schmidt'a, не надо беспокоиться о возможной токсичности вводимой жидкости, так как, если правильно предположение Schmidt'a, что токсичность мясного сока зависит от содержания в нем бактерий, то в данном случае и нагревание и действие щелочи безусловно обезвреживают в этом отношении инъекционный материал. Действительно, гибели кроликов у меня не наблюдалось.

При приготовлении инъекционной жидкости замечается, в отличие от приготовления жидкости из кровяной сыворотки, что после нагревания при 70° в течение 30 минут жидкость получается не только густая, но и содержащая много хлопьев, повидимому, фибры; однако, при прибавлении указанного количества раствора фибриного натра жидкость становится легко подвижной и хлопья растворяются, так что в конце концов инъекционная жидкость представляется на вид такой же, как и жидкость из сыворотки. При стоянии ее уже после обработки щелочью также выпадает при полном охлаждении незначительный мелкий беловатый осадок. Нейтрализация этой щелочной жидкости я также не применяю.

Мышечными экстрактами, полученными выщелачиванием мяса физиологическим раствором поваренной соли и обработанными по способу Schmidt'a, я иммунизировал 6 кроликов (№№ 22—27): по 2 кролика лошадиным, коровьим и свиным мышечными экстрактами. Впрыскивания производились через два дня в третий по 20—25—30 к. с. в брюшную полость, при чем антиген приготовлялся предь каждым впрыскиванием новый и по охлаждении впрыскивался. Все кролики получили по 15 впрыскиваний, так как через 10—11 впрыскиваний взятая из уха кровь давала еще недостаточно высокой титр, что объясняется, может быть, малым содержанием белков в антигене. Переносили, как было уже упомянуто, эти впрыскивания

кролики довольно легко, некоторые даже дали повышение во всем к концу иммунизации.

#### А. Действие на белки денатурированные по Schmidt'y.

Полученная таким способом мышечная антисыворотка по Schmidt'y исследовалась мной с различными белками, в различных состояниях.

Таким образом при определении титра этих антисывороток, как показывает эта таблица, оказалось, что

Таблица № 48.

№ Кроликов	Антисыворот.	Мышечный экстракт обработанный по сп. Schm.											
		Лошадя				Коровы				Свиный			
		25	50	100	200	25	50	100	250	25	50	100	250
22	Лошад.	+	+	+	+	0	0	—	—	—	—	—	—
23	—	+	+	+	+	0	0	—	—	—	—	—	—
24	Коров.	+	0	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—
25	—	+	0	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
26	Свиная	+	0	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
27	—	0	0	—	—	0	0	—	—	+	+	+	0

4 антисыворотки преципитировали до разведения 1:250 включительно, одна (№ 25) до 1:500 и, наконец, 6-ая (№ 27) — 1:100. Таким образом титр выше 1:250 поднимался только у одной антисыворотки. Надо заметить, что преципитат появлялся медленно (15—20 мин.) и был незначительный; а весь ход реакции напоминал реакцию сывороточных Nitze-Alkali-преципитинов со своим антигеном, так что наблюдение за ходом реакции продолжалось в течение 1 часа.

Полной специфичности у этих сывороток не наблюдалось, так как они реагировали в большинстве случаев с чужим экстрактом в разведении 1:25, а сывор. № 25 с лошадиным экстрактом даже в разведении 1:50, что конечно при малом титре этих антисыво-

роток является довольно значительной реакцией. И только сывор. № 27 дала полную специфичность.

Такое отсутствие полной специфичности у большинства сывороток можно также объяснить существованием наряду с "видовой" специфичностью "специфичности состояния". Получение такого недостаточно высокого титра у мышечных преципитирующих сывороток Schmidt'a может зависеть от двух причин: с одной стороны, получение сильно-действующих сывороток при иммунизации денатурированными нагрыванием блясками, как это было замечено авторами, вообще затруднительно, а с другой стороны, содержание блясков в мышечных экстрактах, обработанных по Schmidt'y, очень незначительно, так что химически блясок можно определить только до разведения 1:100, и то не всеми химическими реактивами.

Обычная контрольная пробы с иммунными сыворотками и физиологическим раствором, а также с мышечными экстрактами и нормальной кроличьей сывороткой не дали помутнений.

Сравнивая реакции сывороточных и мышечных Hitze-Alkali-преципитинов, надо признать, что вторые сильнее действуют на мышечные экстракты, денатурированные по Schmidt'y. Этого и надо было ожидать, так как мышечный экстракт в обработке по Schmidt'y является антигеном для мышечного Hitze-Alkali-преципитина, а в таком случае реакция должна быть более сильная.

Таким образом явление, наблюдаемое при сравнении действий нативных мышечных и сывороточных преципитинов на мышечный экстракт, повторяется и с Hitze-Alkali-преципитинами и дает этим самым преимущество и здесь мышечному преципитину, в особенности, если сравнить еще, как мы увидим дальше, их действие на сыворотку, подвергнутую обработке по Schmidt'y.

Таким образом и здесь, как и в нативных мы-

шечных сыворотках, мы замечаем значительно более сильную реакцию с сывороткой, обработанной по Schmidt'y, по сравнению со своим мышечным антигеном. Здесь реакция с гомологической сывороткой получается еще в разведении 1:5000 у 4-х сывороток, 1:10000 и 1:1000 у двух остальных. Таким образом это значительно превосходит титр антисыворотки относительно мышечных экстрактов. Гетерологическая помутнения также получается в больших разведениях, а именно 1:50 и даже 1:100. Преципитат получается и больше и скорее (5—10 минут), чем с мышечным экстрактом, денатурированным по способу Schmidt'a.

Таблица № 49.

№ кролика.	Антисывор.	Сыворотка обработанная по спос. Schmidt'a															
		Лошади				Коровы				Свиньи							
		25	50	100	1000	25	50	100	1000	25	50	100	1000				
22	Лошад.	++	++	++	++	+	?	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23	"	++	++	++	++	+	+	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24	Коров.	++	++	++	++	+	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0
25	"	++	++	++	++	+	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0
26	Свиная	++	++	++	++	+	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0
27	"	++	++	++	++	+	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?

Объяснить такое усиление реакции мышечного Hitze-Alkali-преципитина при действии его на сывороточный антиген Schmidt'a можно только тем же, чем объяснялся такой же факт в действиях нативного мышечного преципитина, а именно: большим содержанием бляски в сыворотке по сравнению с экстрактом, а также предположением, что при иммунизации кролика мышечным экстрактом в сыворотке появляется много общих для других блясков этого же вида животных преципитинов, которые и реагируют с сывороточными блясками.

### Б. Дѣйствіе на нативные бѣлки.

Далѣе антисыворотки были испытаны на нативный мышечный экстракт и на нативную кровяную сыворотку.

Съ нативнымъ мышечнымъ экстрактомъ антисыворотки реагируютъ приблизительно съ такой же силой, съ какой онѣ преципитируютъ свой антигенъ; при этомъ нѣкоторыя реагируютъ сильнѣе съ нативнымъ мышечнымъ экстрактомъ, другія слабѣе; но въ общемъ колебанія эти незначительны. Гетерологическія помутнѣнія дала только антисыворотка № 24 въ разведеніи 1:25 съ лошадинымъ экстрактомъ.

Таблица № 50.

№№ пробы	Антисыворотка	Нативный мышечный экстрактъ											
		Лошади				Коровы				Свиньи			
		25	50	100	1000	25	50	100	1000	25	50	100	1000
22	Лошади.	++	++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	"	++	++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	Коровы	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	Свинья	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Но главное значеніе этихъ опытовъ заключается въ томъ, что антисыворотки, полученныя введеніемъ денатурированныхъ по спос. Schmid't'a мышечныхъ бѣлковъ, оказываются способными реагировать съ нативными мышечными бѣлками.

Точно также реагируетъ мышечный Nitze-Alkali-преципитинъ и съ сывороточными нативными бѣлками, давая реакцію болѣе сильную, чѣмъ съ нативными мышечными.

Причина этого заключается въ томъ, отъ чего вообще реакція съ сыворотками сильнѣе. Дѣйствительно, какъ показывать таблица № 51, эти мышечныя антисыворотки реагируютъ даже до разведенія 1:10000, т. е. мало уступая

обыкновеннымъ нативнымъ сывороточнымъ преципитинамъ, оставаясь въ то же время вполне специфичными. Такимъ образомъ видимъ, что мышечныя преципитирующія сыворотки, антигеномъ которыхъ служили мышечныя экстракты, обработанныя по способу Schmid't'a, имѣютъ то же самое свойство реагировать и съ мышечнымъ бѣлкомъ и значительно сильнѣе съ сывороточнымъ, какимъ обладаютъ нативныя мышечныя антисыворотки.

Специфичность антисыворотокъ при дѣйствіи на нативныя бѣлки какъ мышечныя, такъ и сывороточныя зависитъ, если объяснять согласно гипотезѣ Obermaier'a и Pick'a, отъ того, что здѣсь преципитирующая сыворотка проявляетъ

Таблица № 51.

№№ пробы	Антисыворотка	Нативная кровяная сыворотка											
		Лошади				Коровы				Свиньи			
		50	100	500	1000	50	100	500	1000	50	100	500	1000
22	Лошади.	++	++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	"	++	++	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	Коровы	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	Свинья	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

только свою „видовую специфичность“; если-бы бѣлки были денатурированы, то проявилась бы и „специфичность состоянія“, и тогда реакція не была бы специфична для одного вида животныхъ, какъ мы это и видимъ при дѣйствіи на подвергнутыя обработкѣ по Schmid'ty сывороточныя и мышечныя бѣлки.

### В. Дѣйствіе на 100°-бѣлки.

Дальнѣйшее изслѣдованіе антисыворотокъ было на мышечныя экстракты, подвергнутыя кипяченію при 100° въ теченіи 1/2—1 1/2 часовъ.

Такіе опыты ставились двойко: или бралось разведеніе

экстракта 1 : 25 съ физиологическимъ растворомъ или съ 0,1% соды въ физиологическомъ растворѣ. При первомъ кипяченіи, т. е. съ физиологическимъ растворомъ безъ прибавленія соды, бѣлокъ сразу свертывался; по прошествіи  $\frac{1}{2}$  часа нагреванія часть жидкости сливалась и изъ нея дѣлались разведенія 1 : 50 и 1 : 100, а остальная часть оставалась нагреваться въ кипящей банѣ до 1 часу, а затѣмъ часть опять сливалась, а съ остальной нагреваніе продолжалось до  $\frac{1}{2}$  часовъ. Всѣ иммунныя сыворотки испытывались на разведенія 1 : 25; 1 : 50 и 1 : 100 послѣ нагреванія въ теченіи  $\frac{1}{2}$ , 1 и  $\frac{1}{2}$  часовъ. Опыты ставились и съ чужими экстрактами; кромѣ того были поставлены обычные повѣрочные опыты.

Наблюденіе надъ ходомъ реакціи производилось въ теченіи тоже  $\frac{1}{2}$  часовъ, при чемъ отмѣчались результаты реакціи черезъ каждые полчаса.

Преципитатъ появлялся очень медленно, какъ это видно изъ таблицы, и былъ очень незначительный. Съ гетерологическими экстрактами помутнѣнія ни разу не было.

Изъ этой таблицы ясно видно, что тѣмъ болѣе продолжительному нагреванію подвергается преципитируемое вещество, т. е. мышечный экстрактъ въ разведеніи 1 : 25, тѣмъ медленнѣе появляется помутнѣніе. Этотъ фактъ мы отмѣчали и при предыдущихъ опытахъ; на это же замедленіе появленія преципитата съ нагрѣтыми бѣлками указываютъ и многіе авторы (Schmidt, Obermayer u. Pick и другіе).

Но здѣсь это рѣзко выступаетъ: отмѣчая состояніе преципитата черезъ каждые полчаса, я замѣтилъ, что почти всѣ сыворотки кромѣ сыворотки № 26, (но она совсѣмъ оказалась слабо-дѣйствующей на нагрѣтый мышечный экстрактъ), съ мышечнымъ экстрактомъ, подвергнутымъ нагреванію въ теченіи  $\frac{1}{2}$  часа давали помутнѣніе въ разведеніи 1 : 25 уже въ теченіи первого получаса, усиливаясь

по мѣрѣ стоянія и появляясь черезъ болѣе продолжительное время въ видѣ яснаго осадка и въ разведеніи 1 : 50.

Таблица № 52.

№№ сыворотки	Антисыворотокъ	Время наблюд.	Мышечный экстр. 1 : 25 съ физiol. раств. нагр. при 100° въ теч. :																	
			полъ часа ( $\frac{1}{2}$ ч.)			1 часа (1 ч.)			полтора ч. ( $1\frac{1}{2}$ ч.)											
			Лощ.	Корон.	Синн.	Лощ.	Корон.	Синн.	Лощ.	Корон.	Синн.									
22	Лошад.	$\frac{1}{2}$	+	0	—	0	0	—	0	—	0	0	0	—	0	—	0	—	0	—
		$\frac{1}{2}$	+	?	0	—	0	—	?	0	—	0	—	0	—	?	0	—	0	—
		$\frac{1}{2}$	+	0	—	0	—	0	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
		1	+	0	—	0	—	0	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
		$\frac{1}{2}$	+	?	0	—	0	—	?	0	—	0	—	0	—	?	0	—	0	—
		1	+	0	—	0	—	0	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
		$\frac{1}{2}$	+	0	—	0	—	0	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
23	"	1	+	0	—	0	—	0	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
		$\frac{1}{2}$	+	0	—	0	—	0	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
		1	+	0	—	0	—	0	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
		$\frac{1}{2}$	+	0	—	0	—	0	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
		1	+	0	—	0	—	0	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
24	Кор.	1	0	—	—	+	?	0	—	—	+	0	—	—	+	0	—	—	0	—
		$\frac{1}{2}$	0	—	—	+	?	0	—	—	+	?	0	—	+	?	0	—	—	0
		1	0	—	—	+	?	0	—	—	+	?	0	—	+	?	0	—	—	0
		$\frac{1}{2}$	0	—	—	+	?	0	—	—	+	?	0	—	+	?	0	—	—	0
		1	0	—	—	+	?	0	—	—	+	?	0	—	+	?	0	—	—	0
25	"	1	0	—	—	+	?	0	—	—	+	?	0	—	+	?	0	—	—	0
		$\frac{1}{2}$	0	—	—	+	?	0	—	—	+	?	0	—	+	?	0	—	—	0
		1	0	—	—	+	?	0	—	—	+	?	0	—	+	?	0	—	—	0
		$\frac{1}{2}$	0	—	—	+	?	0	—	—	+	?	0	—	+	?	0	—	—	0
		1	0	—	—	+	?	0	—	—	+	?	0	—	+	?	0	—	—	0
26	Свин.	1	0	—	—	0	—	0	—	—	0	—	0	—	0	—	0	—	—	0
		$\frac{1}{2}$	0	—	—	0	—	0	—	—	0	—	0	—	0	—	0	—	—	0
		1	0	—	—	0	—	0	—	—	0	—	0	—	0	—	0	—	—	0
		$\frac{1}{2}$	0	—	—	0	—	0	—	—	0	—	0	—	0	—	0	—	—	0
		1	0	—	—	0	—	0	—	—	0	—	0	—	0	—	0	—	—	0
27	"	1	0	—	—	0	—	?	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	—	0
		$\frac{1}{2}$	0	—	—	0	—	?	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	—	0
		1	0	—	—	0	—	?	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	—	0
		$\frac{1}{2}$	0	—	—	0	—	?	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	—	0
		1	0	—	—	0	—	?	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	—	0
		$\frac{1}{2}$	0	—	—	0	—	+	?	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0
		1	0	—	—	0	—	+	?	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0

Послѣ часового нагреванія экстракта помутнѣніе появляется, и то очень слабое, въ теченіи первого получаса только у двухъ антисыворотокъ (№№ 24, 25); черезъ одинъ часъ стоянія тоже у двухъ (сывор. № 22 и 23), затѣмъ у одной — черезъ  $\frac{1}{2}$  часа (сывор. № 27) и у сывор. № 26 совсѣмъ нѣтъ помутнѣнія. При дальнѣйшемъ стояніи усиленіе преципитации сказывалось только въ появленіи болѣе рѣзкой реакціи съ тѣмъ же разведеніемъ 1 : 25; и только сыворотка № 24 дала еще очень слабую реакцію и въ разведеніи экстракта 1 : 50. Наконецъ, послѣ  $\frac{1}{2}$  часового нагреванія у большинства антисыворотокъ реакціи болѣе не получалось, и только антисыворотки №№ 22 и 24 дали послѣ  $\frac{1}{2}$  часового стоянія слѣды реакціи съ разведеніемъ 1 : 25.

Из шести антисывороток очень слабым действием на нагретый блок обладает, как было упомянуто, антисыворотка № 26, и, наоборот, самое сильное действие проявляла коровья антисыворотка № 24, что конечно надо объяснить индивидуальными свойствами иммунных сывороток. Что же касается отсутствия гетерологических помутнений, то это объясняется тем, что вообще помутнения сыворотки чужого вида животных появляются в более крепких растворах; здесь же блок было так мало, что химически он не определялся и в разведении 1:25.

Из этих опытов можно сделать два заключения: во-первых, тем больше нагревается преципитруемое вещество, тем медленнее появляется преципитация, и, во-вторых, в то время как сывороточный Nitze-Alkali-преципитин отказывался преципитировать нагретый в течение  $\frac{1}{2}$  часа до  $100^\circ$  мышечный экстракт, — мышечный Nitze-Alkali-преципитин реагирует, правда, довольно слабо и медленно, с мышечным экстрактом даже после часового нагревания.

В этом опять так сказывается преимущество мышечного преципитина перед сывороточным.

Для того чтобы избежать свертывания блока при нагревании, я, как уже было упомянуто, разводил мышечный экстракт (1:25) физиологическим раствором поваренной соли, содержащим 0,1% соды. Эти разведения нагревались в кипящей бане и через  $\frac{1}{2}$  и 1 час часть жидкости сливалась, а остальное количество нагревалось в течение  $\frac{1}{2}$  часов. При этом свертывания блока не происходило даже после  $\frac{1}{2}$  часового нагревания. Щелочная жидкость доводилась соляной кислотой до слабо-щелочной реакции и подвергалась исследованию в разведениях 1:25; 1:50 и 1:100. Результаты преципитации отмечались через

каждые  $\frac{1}{2}$  часа, а всего наблюдение продолжалось, как и в предыдущем опыте,  $\frac{1}{2}$  часа.

Таблица № 53.

№№ пробы	Антисыворотка	Время наблюдения	Мышечный экстракт с 0,1% соды нагрет. $100^\circ$ в течение:																			
			полтора часа ( $\frac{1}{2}$ ч.)			1 часа (1 ч.)			полтора часа ( $\frac{1}{2}$ ч.)													
			Лощ.	Коров.	Свин.	Лощ.	Коров.	Свин.	Лощ.	Коров.	Свин.											
22	лош.	$\frac{1}{2}$	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		1	+	+	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		$\frac{1}{2}$	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	"	$\frac{1}{2}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		1	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{2}$	+	+	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	коров.	$\frac{1}{2}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{2}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	"	$\frac{1}{2}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{2}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	свин.	$\frac{1}{2}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{2}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	"	$\frac{1}{2}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{2}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Из этой таблицы также, как из предыдущей, можно сделать вывод, что тем дольше нагревается блок, тем слабее становится преципитация и тем медленнее образуется преципитат. С мышечным экстрактом, нагретым в продолжение  $\frac{1}{2}$  часа, преципитация получается в течение первых 30 минут наблюдения (кроме сыворотки № 26, где появляется только через 1 час стояния), это уже ясная реакция, но только в разведении 1:25; в более слабых разведениях преципитация через  $\frac{1}{2}$  часа еще нет; в конце наблюдения за ходом реакции, т. е. через  $\frac{1}{2}$  часа, реакция у антисывороток (№№ 22, 23 и 24) получается уже

\*) 1:250—0.

и в разведении 1:100, у двух (№№ 25 и 27) в разведении 1:50 и только у сыворотки № 26 получается также только в разведении 1:25.

Нагретый в течение 1 часа мышечный экстракт дает уже более слабую реакцию: через  $\frac{1}{2}$  часа заметно начало реакции только у двух антисывороток (№№ 24 и 27) и только после часового наблюдения она появляется в разведениях экстракта 1:25 у всех сывороток, кроме сыворотки № 26; а через полтора часа у 5-ти сывороток реакция получается и в разведениях 1:50 (сывор. № 26 в разведении 1:25 дает следы реакции); в больших разведениях реакция после часового нагревания не получается.

Наконец, после  $\frac{1}{2}$  часового нагревания преципитация получается совсем слабая, появляясь только при  $\frac{1}{2}$  часовом наблюдении: сыворотки №№ 22 и 24 дают преципитацию, правда, очень слабую, и в разведении 1:50, сыворотки № 23, 25 и 27 только в разведении 1:25, а сыворотка № 26 не преципитирует совсем. И в этих опытах сыворотка № 24 оказалось самой сильно-действующей, а сыворотка № 26 — самой слабой. Специфичность здесь такая же, как в предыдущем опыте; химически в разведении 1:25 блясок определяется очень слабо.

Сравнивая эти опыты с предыдущими опытами нагревания мышечных экстрактов в разведении с физиологическим раствором, видим, что, устрояя свертывание при нагревании прибавлением к физиологическому раствору 0,1% соды, мы достигаем усиления преципитации, что сказывается в двух направлениях: увеличивается способность реагировать с более разведенными растворами (с содой доходит до 1:100, а без неа только 1:50), а затем увеличивается способность реагировать и после более продолжительного нагревания экстракта. Так после на-

гревания с содой в течение  $1\frac{1}{2}$  часов реакция, хотя и слабая, получалась, а без соды — ее совсем не было.

Из сравнения этих опытов с опытами, где сывороточный Hitze-Alkali-преципитин действует на мышечный экстракт, нагретый в течение  $\frac{1}{2}$  часа с содой при 100° (таблица № 30), опять выступает превосходство мышечных Hitze-Alkali-преципитинов, так как сывороточный реагирует в этом опыте очень слабо.

Далее изследовался мышечный Hitze-Alkali-преципитин на сыворотку, которая в разведении 1:25 нагревалась в кипящей бане в течение 30 минут.

Мышечные Hitze-Alkali-преципитины также как сывороточные обладают сильной преципитирующей силой при действии на сывороточный блясок, нагретый при 100° в течение 30 минут: 3 антисыворотки преципитировали до разведения 1:10000 (№№ 22, 24 и 27); две (№№ 23 и 25) до разведения 1:5000 и 1 (№ 26) — до 1:1000. Преципитат появлялся через 5—10 минут и в крепких разведениях был очень обильный.

Таблица № 54.

№№ сыворотки	Антисыворотка	Сыворотка нагретая до 100° в течение 30 минут														
		Лошадь					Корова					Свинья				
		25	50	100	500	1000	25	50	100	500	1000	25	50	100	500	1000
22	Лов.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
23	"	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
24	Кор.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
25	Свин.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
26	"	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
27	"	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Также сравнительно сильно реагировали эти антисыворотки с чужими сыворотками, при чем большинство давало осадок еще и в разведении 1:100; преципитат появлялся здесь медленнее (15—20 минут) и был незначительный. Если сравнить действие этих антисывороток на

антигенъ изъ сыворотки по Schmidt'у съ дѣйствіемъ на 100°-сывороточный бѣлокъ, то въ послѣднемъ случаѣ дѣйствіе антисыворотокъ въ общемъ сильнѣе, а специфичность ихъ менѣе рѣзко выражена. Приблизительно такія же отношенія получаются и у антисыворотокъ, полученныхъ введеніемъ сывороточныхъ бѣлковъ, денатурированныхъ по способу Schmidt'a.

Значитъ, антисыворотки Schmidt'a, все равно — получены-ли онѣ отъ введенія сывороточныхъ или мышечныхъ бѣлковъ, приблизительно одинаково реагируютъ съ 100°-сывороточнымъ бѣлкомъ.

#### Г. Дѣйствіе на бѣлки, денатурированные щелочью при комнатной температурѣ.

Подобно тому какъ сывороточный Nitze-Alkali-преципитинъ изслѣдовался на кровяную сыворотку, обработанную ѣдкимъ натромъ при комнатной температурѣ, также и мышечный Nitze-Alkali-преципитинъ изслѣдовался на такимъ же способомъ обработанный мышечный экстрактъ.

Для этого, какъ было уже описано, экстрактъ смѣшивался съ физиологическимъ растворомъ и щелочью въ пропорціи Schmidt'a, но оставался стоять 15 минутъ при комнатной температурѣ, затѣмъ нейтрализовался и изслѣдовался.

Способность мышечныхъ Nitze-Alkali-преципитиновъ дѣйствовать на мышечный экстрактъ, подвергнутый обработкѣ только щелочью, приблизительно такая же, съ какой дѣйствуютъ эти преципитины на нативный мышечный бѣлокъ. Но это касается только реакціи со своимъ бѣлкомъ; относительно же реакціи съ чужими бѣлками, то здѣсь больше сходства съ реакціей на антигенъ; тогда какъ съ нативными бѣлками реакція специфична, здѣсь антисыворотки реагируютъ съ чужими бѣлками, хотя и слабѣе, чѣмъ при дѣйствіи на антигенъ.

Таблица № 55.

№№ пробы.	Антисывор.	Мышечный экстрактъ при комн. темпер. + NaOH — 15 мин.															
		Лошади					Свиньи										
		25	50	100	250	500	1000	25	50	100	250	500	1000				
22	Лоп.	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
23	Кор.	?	0	0	0	0	?	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0
24	Сви.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	Сви.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	Сви.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Объясненіе этому надо искать также въ появленіи продуктовъ денатурированія бѣлка, а вмѣстѣ съ тѣмъ и „специфичности состоянія“. Опыты съ сывороткой, также при комнатной температурѣ обработанной ѣдкимъ натромъ, дали совершенно согласные съ этими результаты, а потому здѣсь не приводятся.

#### Д. Дѣйствіе на высушенный при 100° бѣлокъ.

Наконецъ, были поставлены опыты преципитации этими антисыворотками высушеннаго при 100° сывороточнаго бѣлка, переведеннаго съ помощью ѣдкой щелочи въ растворъ, нейтрализованный затѣмъ соляной кислотой. Подробно методика описана выше, при изслѣдованіи сывороточныхъ антисыворотокъ; разведенія взяты тѣ же.

Таблица № 56.

№№ пробы.	Антисывор.	Сухая сыв-ка раст. NaOH															
		Лош.					Свин.										
		Нерав.	5	10	5	10	Нерав.	5	10	5	10						
22	Лоп.	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	Кор.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	Сви.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Только двѣ антисыворотки (№№ 22 и 24) дали въ этомъ опытѣ черезъ 1½ часовае наблюдение реакцію, при чемъ антисыворотка № 22 — очень слабую; остальные же 4 совсѣмъ не реагировали.

Сравнивая эти результаты съ результатами преципитации сывороточнымъ Nitze-Alkali-преципитиномъ также обработаннаго бѣлка (табл. № 31), оказывается, что мышечные преципитины обладаютъ меньшей способностью реагировать съ такъ сильно денатурированнымъ сывороточнымъ бѣлкомъ, чѣмъ сывороточные преципитины.

Кромѣ этихъ опытовъ я получалъ такой же сухой мышечный бѣлокъ, подвергая высушиванію въ кипящей банѣ мышечный экстрактъ. Но получить съ этимъ сухимъ бѣлкомъ преципитацию не удавалось.

Я пробовалъ его переводить въ растворъ кипяченіемъ съ 0,1% растворомъ соды, но и послѣ ½ часового кипяченія количество осадка не уменьшалось, химически бѣлокъ не опредѣлялся и преципитация не получалось.

Затѣмъ я дѣйствовалъ ѣдкимъ натромъ, какъ это предлагаетъ Schmidt для сывороточнаго сухого бѣлка, т. е. при температурѣ 70° и въ продолженіи 10—20 минутъ, однако же и здѣсь уменьшенія бѣлка не замѣчалось и преципитация не получалось. Увеличивъ продолжительность нагрѣванія до 30—40 минутъ, я опять не получилъ положительнаго результата, хотя здѣсь можно уже ожидать уничтоженія подъ влияніемъ щелочи способности преципитироваться, чѣмъ можетъ быть и нужно объяснить этотъ отрицательный результатъ, такъ какъ часть бѣлка здѣсь растворилась.

Такимъ образомъ мои старанія перевести высушенный при 100° мышечный бѣлокъ въ растворъ, съ которымъ могли бы реагировать мышечные Nitze-Alkali-преципитины, не привели къ желаемому результату.

### Е. Дѣйствіе на экстракты изъ органовъ.

Дальнѣйшіе опыты относились уже къ изслѣдованію мышечныхъ антисыворотокъ на экстракты изъ различныхъ органовъ.

Таблица № 57.

№№ пробова	Антисыворотка	Нативные экстракты изъ																						
		Почки			Печени			Селезенки																
		Лощ.	Коров.	Свин.	Лощ.	Коров.	Свин.	Лощ.	Коров.	Свин.														
25	35	50	100	25	50	100	25	50	100	25	50	100												
22	Лощ.	+	+	?	0	0	+	?	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0				
23	Кор.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
24	Свин.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
25	Лощ.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
26	Кор.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	Свин.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица № 58.

№№ пробова	Антисыворотка	Экстракты обработанные по Schmidt																						
		Почки			Печени			Селезенки																
		Лощ.	Кор.	Свин.	Лощ.	Кор.	Свин.	Лощ.	Кор.	Свин.														
25	35	50	100	25	50	100	25	50	100	25	50	100												
22	Лощ.	?	0	0	0	0	0	?	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23	Кор.	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	Свин.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	Лощ.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	Кор.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	Свин.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица № 59.

№№ пробова	Антисыворотка	Экстракты съ физиологическимъ растворомъ 1:25—100—30 мин.																						
		Почки			Печени			Селезенки																
		Лощ.	Кор.	Свин.	Лощ.	Кор.	Свин.	Лощ.	Кор.	Свин.														
25	35	50	100	25	50	100	25	50	100	25	50	100												
22	Лощ.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	Кор.	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	Свин.	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	Лощ.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	Кор.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	Свин.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*) 1:250 — +; 1:500 — 0.



Таблица № 61 представляет сводку всех опытов, произведенных с мышечными преципитирующими сыворотками, полученными иммунизацией животных экстрактами, денатурированными по способу Schmidt'a.

Таблица № 61.

Антисыворотка, полученная от введения мышечных экстрактов денатурированных по Schmidt'y

Растворы	Результ.	Растворы	Результ.	Растворы	Результ.
Мыш. экстр. по Schm.	+	Мыш. экстр. + 0,1% соды 100°-30'	+	Нативные экстр. органов	+
Сыворотка по Schm.	+++	Сыворотка с физ. р. 100°-30'	++++	Экстр. органов по Schmidt'y	+
Нативный мыш. экстр.	++	Мыш. экстр. + NaOH комн. т°-15'	++	Экстр. орг. + физ. раст. 100°-30'	0
Нативная сыворотка	+++	Сухой экстр. + NaOH	0	Экстр. орг. + 0,1% соды 100°-30'	+
Мыш. экстр. + физ. раст. 100°-30'	+	Сух. сыворотка + NaOH	почти 0		

1. Получение мышечных преципитирующих сывороток по способу Schmidt'a несколько не затруднительнее получения нативных мышечных антисывороток или сывороточных антисывороток Schmidt'a.
2. Мышечные антисыворотки, полученные по способу Schmidt'a, обладают теми же свойствами мышечных преципитинов, как и нативные мышечные антисыворотки, т. е. одинаковой с сывороточными преципитинами преципитирующей силой действия на сывороточный флок и более сильным действием на мышечные флок.
3. Мышечные Hitze-Alkali-преципитины, соединяя преимущество мышечных преципитинов со свойствами Hitze-Alkali-преципитинов вообще, обладают спо-

собностью реагировать не только с сывороточным желочным флокком и с нагретым до 100°, но и с 100°-мышечным, чьм почти не обладают сывороточные преципитины Schmidt'a.

## Глава 10.

### Преципитины, полученные от введения мясного сока и щелочных мясных экстрактов, денатурированных по Schmidt'y.

Многие авторы, работавшие с мышечными экстрактами, применяли для получения экстрактов из мяса не просто физиологический раствор, а с добавлением той или иной щелочи. Цель, которая преследовалась при этом, заключалась в желани достигнуть более полного растворения флокковых веществ мяса и получить таким образом экстракт содержащий большее количество флоквов.

Действительно, например, Гаммарстен<sup>1)</sup> так говорит о растворении мизина: „мизин имеет общия свойства глобулинов и соответственно этому он не растворим в воде и растворяется в разведенных солевых растворах, а также в сильно разведенных кислотах и щелочах, причем он легко переходит в альбуминат“.

При этом каждый автор применял ту щелочь, которая ему казалась наиболее подходящей; и какое в этом отношении было разнообразие, видно из следующих нескольких примеров: Nötel<sup>2)</sup> применял для извлечения флоквов из рубленого лошадиного мяса 0,1% раствор

1) Гаммарстенъ. Учебникъ физиологической химии. Изд. 1905 г. стр. 409.

2) Nötel. Ueber ein Verfahren s. Nachweis von Pferdefleisch. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektkr. 1902. Bd. 39.

сода; Grund<sup>1)</sup> извлекает не просто содовым раствором, а физиологическим раствором съ содой: о таком же растворе упоминает и Schmidt<sup>2)</sup>; въ болѣе позднее время онъ предлагаетъ уже другую щелочь — окись магнезія, какъ наиболѣе подходящую, при чемъ пропорцію для вытяжки изъ мяса рекомендуетъ слѣдующую: 50 гр. рубленого мяса смѣшиваются со 100 к. с. физиологическаго раствора поваренной соли, содержащаго на 1 литръ около 5 гр. окиси магнезія; масса размѣшивается и черезъ 2 часа или болѣе выжимается черезъ фланелевый или бумажный платокъ на смоченный физиологическимъ растворомъ фильтр. Наконецъ, Forssner<sup>3)</sup> применялъ для приготовления вытяжекъ изъ органовъ морскихъ свинокъ  $\frac{1}{2}\%$  растворъ амміака.

Въ виду того, что содержаніе бѣлковъ въ экстрактахъ, полученныхъ съ помощью физиологическаго раствора, дѣйствительно, не велико, чѣмъ, можетъ быть, надо объяснить такое продолжительное иммунизированіе кроликовъ, а также невысокіе титры по отношенію къ экстрактамъ; и въ виду существующихъ указаній, что щелочными жидкостями можно экстрагировать болше бѣлковъ, мною, по предложенію проф. Евгенія Алексѣевича Шенилевскаго, также были предприняты опыты иммунизированія кроликовъ вытяжками изъ мяса, полученными съ помощью щелочныхъ растворовъ, и чистымъ выжатымъ мяснымъ сокомъ.

Мясо во всѣхъ этихъ опытахъ было только коровье. Пропущенное черезъ котлетную машинку мясо я экстрагировать двумя различными щелочными растворами: одинъ

1) Grund. „Über organspezifische Präcipitate und ihre Bedeutung“. — Deutsche Arch. f. klin. Med. 1908. Bd. 87.

2) Schmidt. „Eiweiße Versuche über die Geschwindigkeit der Inaktivierung (Denaturierung) der präcipitablen Substanz durch Alkalien“. — Biochem. Zeitschr. 1910. Bd. 24.

3) Forssner. „Über die Möglichkeit isolierte Eiweisskörper bezw. eiweisshaltige Flüssigkeiten, welche aus einem und demselben Organismus stammen, durch die Präcipitation zu differenzieren.“ — Münch. med. Wochenschr. 1905, № 19.

— соды 1 гр., поваренной соли 8,5 гр. и дистиллированной воды 1000 к. с.; другой — ѣдкаго натра 1 гр., поваренной соли 8,5 гр. и дистиллированной воды 1000 к. с. Такимъ образомъ я прибавлялъ къ физиологическому раствору поваренной соли въ одномъ случаѣ 0,1% соды, въ другомъ — 0,1% ѣдкаго натра.

При этомъ имѣлось въ виду, что содовый растворъ, какъ слабая щелочь, не можетъ денатурировать бѣлки, а растворъ ѣдкаго натра, какъ содержащій болше OH-ионовъ въ растворѣ, могъ оказаться уже дѣйствующимъ денатурирующимъ образомъ на бѣлковыя вещества. По крайней мѣрѣ Cohnheim<sup>1)</sup>, говоря о быстротѣ превращенія нативныхъ бѣлковъ въ щелочные альбуминаты подъ влияніемъ щелочей, приводитъ мнѣніе Johanson'a, что достаточно 0,2% ѣдкаго натра, чтобы при комнатной температурѣ въ теченіи  $2\frac{1}{2}$  часовъ перевести большую часть сыровоточнаго альбумина въ щелочной альбуминатъ, и при этомъ происходитъ даже выдѣленіе амміака.

Моей цѣлью было узнать, какъ это вліяетъ, если такое же измѣненіе бѣлковъ существуетъ, на конечный результатъ иммунизации кроликовъ.

Эти щелочные растворы смѣшивались въ равныхъ по вѣсу количествахъ съ рубленнымъ мясомъ и ставились въ Schüttelapparat на 24 часа, затѣмъ выжимались черезъ бумажную ткань и фильтровались черезъ обыкновенный фильтр. Реакція такимъ способомъ полученныхъ экстрактовъ бывала или нейтральной или же слабо-кислой, что объясняется, по-видимому, дѣйствіемъ мясо-молочной кислоты. Такимъ образомъ a priori можно предполагать, что большого денатурированія бѣлковъ здѣсь нельзя ожидать.

Третій препаратъ изъ мышцъ былъ мясной сокъ, который я получалъ, подвергая рубленое мясо дѣйствию прессы.

1) Otto Cohnheim. „Chemie der Eiweisskörper“. Braunschweig 1900.

Оба экстракта и мясной сок хранились на холоду в темных стеклянках с прибавлением хлороформа; выпадающий при этом осадок мной тоже употреблялся для инъекций вместе с жидкой частью; тем более, что при обработке по Schmidt'y этот осадок растворяется при прибавлении щелочи. Самый антиген из этих препаратов я приготавливал по способу Schmidt'a также как из сыворотки и обыкновенного мышечного экстракта; и тотчас по охлаждению до комнатной температуры выпискивалось. Надо еще отметить, что хлопьевидный осадок после 1/2 часового нагревания при 70° был более обильный, чем в обыкновенных мышечных экстрактах, в особенности же в мясном соке, но он от щелочи при взбалтывании сравнительно легко растворялся.

Этими препаратами мною было иммунизировано 6 кроликов (№№ 28—33); по 2 кролика — содовым и йодкаго натра экстрактами и мясным выжатым соком. Инъекции делались через 2 дня в 3-й, всего 9—10 инъекций, по 30 к. с. зараз в брюшную полость. Переносили кролики иммунизацию легко.

#### А. Действие на белки денатурированные по Schmidt'y.

Полученные антисыворотки для определения титра испытывались каждая на свой мышечный препарат, т. е. на

Таблица № 62.

№№ кролика	Антисыворотка	Опред. титра сь обраб. по Schm. щел. экст. и выж. сок.													
		Лошадь			Коровы						Свиньи				
		25	50	100	25	50	100	250	500	1000	5000	25	50	100	
28	содовая	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	0
29	"	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
30	йод. натр.	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
31	"	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
32	выж. сока	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
33	"	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0

тот, который употреблялся для иммунизации кроликов, а именно: антисыворотки №№ 28 и 29 — на содовый экстракт, №№ 30 и 31 — на экстракт йодкаго натра и №№ 32 и 33 — на выжатый сок.

Мышечная антисыворотка содового экстракта дали титр со своим экстрактом: одна — 1:500, другая — 1:250, а с чужими содовыми экстрактами, т. е. лошади и свиньи, 1:50 и один раз (антисыворотка № 29) 1:25. Антисыворотки, полученные иммунизацией экстрактом йодкаго натра, оба дали титр 1:500, а с гетерологическими экстрактами йодкаго натра антисыворотка № 30 — 1:50, а антисыв. № 31 — 1:25. Наконец, антисыворотки от выжатого сока дали больший титр 1:1000 и неспецифичные помутнения 1:50, кроме антисыв. № 33, которая со свиным выжатым соком дала 1:25. Все обычные контрольные опыты дали отрицательный результат. Преципитат в этих опытах появлялся довольно быстро (5—10 минут) и в разведениях 1:25 и 1:50 был обильный; наоборот, гетерологические помутнения были незначительные и появлялись медленно (15—20 мин.).

Сравнивая полученные здесь титры с титрами антисывороток, полученных иммунизацией кроликов обыкновенными мышечными экстрактами вы обработать Schmidt'a (табл. № 48), мы видим, что в данном случае титры выше: в то время как там титры были почти у всех антисывороток 1:250, в этих опытах были для экстрактов 1:500, а для выжатого сока 1:1000. Это может зависеть от двух причин: или последние антисыворотки обладают большей преципитирующей силой, чем антисыворотки обыкновенных экстрактов, или же содержание белка в экстрактах содовом и йодкаго натра, а также и в выжатом соке, больше чем в экстрактах физиологического раствора, а тогда титры быть сравнимами не могут.

Для решения этого вопроса все 6 антисывороток были

исследованы на мышечный экстракт, полученный съ помощью физиологического раствора и денатурированный по Schmidt'y.

Таблица № 63.

№№ кролик.	Антисыворотка	Мышечный экстр. (физиол. раств.) обраб. по Schm.												
		Лошади			Коровы				Свиньи					
		25	50	100	25	50	100	250	500	1000	5000	25	50	100
28	Содовая	+	?	0	+	+	+	+	?	0	0	+	0	0
29	"	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	+	0	0
30	Ъдк. натр.	+	0	0	+	+	+	+	+	0	0	+	?	0
31	"	+	0	0	+	+	+	+	+	0	0	+	0	0
32	Выж. сок.	+	0	0	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0
33	"	+	?	0	+	+	+	+	+	0	0	+	0	0

Сравнивая таблицу определения титра антисывороток №№ 28—33 съ этой таблицей, мы замѣчаемъ, что при дѣйстви на обыкновенные мышечные экстракты, денатурированные по способу Schmidt'a, эти антисыворотки проявляютъ меньшую преципитирующую силу, что сказывается, съ одной стороны, въ неполученіи такого большого преципитата въ разведеніяхъ 1:25 и 1:50 и вообще въ болѣе слабой реакціи, а, съ другой стороны, въ неспособности реагировать въ такихъ же разведеніяхъ, какъ со своими препаратами (содовымъ, ѣдкаго натра и выжатаго сока). Такъ, въ антисыворотки, кромѣ № 30, дали преципитацию или въ меньшихъ разведеніяхъ или въ тѣхъ же, но болѣе слабую.

Такъ какъ въ этихъ обояхъ опытахъ антисыворотки исследовались на одни и тѣ же мышечные бѣлки при одинаковомъ денатурированіи ихъ, то такую разницу въ преципитирующей силѣ надо объяснить только разницей содержанія бѣлковъ въ этихъ экстрактахъ.

Съ другой стороны, сравнивая таблицу опредѣленія титра антисыворотокъ №№ 22—27 (табл. № 48) съ послѣдней таблицей, можно сдѣлать и другой выводъ: такъ какъ антисыворотки №№ 28—33 даютъ въ большинствѣ случаевъ, кромѣ двухъ (№№ 29 и 31), преципитацию еще въ разведеніи

1:500 обыкновеннаго мышечнаго экстракта, денатурированнаго по Schmidt'y, а антисыворотки №№ 22—27 даютъ только до разведенія его 1:250, то объяснять такой незначительный титръ антисыворотокъ №№ 22—27 однимъ незначительнымъ содержаніемъ бѣлковъ въ этихъ экстрактахъ нельзя, а надо считать, что по преципитирующей силѣ антисыворотки № 22—27 стоятъ ниже антисыворотокъ №№ 28—33.

Такимъ образомъ оказывается, что, вводя животнымъ выжатый мясной сокъ или въ вытяжки, сдѣланныя съ помощью соды или ѣдкаго натра, можно получить болѣе дѣятельныя антисыворотки къ мышечному бѣлку, чѣмъ при введеніи обыкновенныхъ мышечныхъ экстрактовъ, когда бѣлки извлекаются физиологическимъ растворомъ поваренной соли.

Далѣе антисыворотки №№ 28—33 были исследованы на сывороточный бѣлокъ, подвергнутый обработкѣ Schmidt'a.

И у этихъ антисыворотокъ реакція съ сывороточнымъ бѣлкомъ получалась въ значительно большихъ разведеніяхъ и давала болѣе обильный преципитатъ, чѣмъ со своими антигенами. 4 антисыворотки реагировали до разведенія 1:10000, а 2 (№№ 29 и 31) до 1:5000; по вмѣстѣ съ тѣмъ усилился и помутнѣніи съ чужими сыворотками (1:100).

Объяснить эту разницу между титромъ антисыворотокъ

Таблица № 64.

№№ кролик.	Антисыворотка	Сыворотка обработ. по способу Schmidt'a																
		Лошади			Коровы				Свиньи									
		25	50	100	50	100	500	1000	5000	10000	13000	25	50	100	500			
28	содовая	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	?	0	0
29	"	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	?	0	0
30	ѣдк. натр.	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	?	0	0
31	"	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	0
32	выж. сок.	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	?	0	0
33	"	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	?	0	0

и дѣйствіемъ на сывороточный бѣлокъ можно опять-таки двумя причинами; существованіемъ въ антисывороткахъ наряду со специфичными мышечными преципитинами значительнаго количества общихъ преципитиновъ, которые реагируютъ съ сывороточнымъ бѣлкомъ, какъ это признаетъ и Schmidt; и значительно большимъ содержаніемъ бѣлковъ въ сывороткахъ по сравненію съ экстрактами, что подтверждается и данными химическаго анализа (см. добавленіе). Антисыворотки №№ 28—33 въ дѣйствиіи своемъ на сывороточный антигенъ Schmidt'a также сильнѣе реагируютъ, чѣмъ антисыворотки №№ 22—27.

### Б. Дѣйствіе на нативные бѣлки.

Исслѣдованіе антисыворотокъ на нативные бѣлки также производилось тройнымъ образомъ: 1) на нативный выжатый сокъ, содовый и ѣдкаго натра экстракты, т. е. на свои мышечные препараты, но только неизмѣненные, 2) на обыкновенный мышечный экстрактъ (мясо извлекалось физиологическимъ растворомъ) и 3) на нативную кровяную сыворотку.

Со своими денатурированными мышечными препаратами, какъ показываетъ таблица № 65, антисыворотки реагируютъ приблизительно также, какъ съ денатурированными; зато гетерологическія помутнѣнія, какъ это замѣчалося при изслѣдованіи всѣхъ Hitz-e-Alkali-преципитиновъ на нативные бѣлки, почти отсутствовали; такъ какъ 2 только

Таблица № 65.

№№ групп.	Антисыворотка	Нативный выжатый сокъ и щелочные экстракты.														
		Лошад.		Коровы						Свин.						
		25	50	25	50	100	250	500	1000	5000	10000	25	50			
28	Содовая	0	0	++	++	++	++	++	++	++	?	0	0	0	0	0
29	"	0	0	+++	++	++	++	++	++	++	?	0	0	0	0	0
30	ѣдк. натр.	0	0	++	++	++	++	++	++	++	?	0	0	0	0	0
31	"	?	0	++	++	++	++	++	++	++	?	0	0	0	0	0
32	Выж. сок.	+	0	++	++	++	++	++	++	++	?	0	?	0	0	0
33	"	0	0	++	++	++	++	++	++	++	?	0	0	0	0	0

антисыворотки (№№ 31 и 32) дали незначительныя помутнѣнія съ разведеніями 1: 25.

Этимъ опытомъ, какъ и слѣдующими двумя, лишній разъ подтверждается, что Hitz-e-Alkali-преципитины обладаютъ способностью реагировать съ нативными бѣлками.

Таблица № 66.

№№ групп.	Антисыворотка	Натив. мышеч. экстр. (физиол. раст.)											
		Лош.		Коровы				Свин.					
		25	50	25	50	100	250	500	1000	25	50		
28	содовая	0	0	++	++	++	++	++	+	0	0	0	0
29	"	0	0	+++	++	++	++	++	0	0	0	0	0
30	ѣдк. натр.	0	0	++	++	++	++	++	+	0	0	0	0
31	"	+	0	++	++	++	++	++	+	0	0	0	0
32	выж. сок.	+	0	++	++	++	++	++	+	0	?	0	0
33	"	0	0	++	++	++	++	++	+	0	0	0	0

Изъ этой таблицы видно, что антисыворотки №№ 28—33 и съ нативными мышечными экстрактами (физиологическій растворъ) реагируютъ слабѣе, чѣмъ съ нативнымъ выжатымъ сокомъ и своими экстрактами, что можетъ быть объяснено только большимъ содержаніемъ бѣлка въ выжатомъ сокѣ и экстрактахъ съ содой и ѣдкимъ натромъ, какъ это было замѣчено и при параллельномъ изслѣдованіи на денатурированные мышечные бѣлки. Точно также оказалось

Таблица № 67.

№№ групп.	Антисыворотка	Нативная кровяная сыворотка												
		Лош.		Коровы						Свин.				
		25	50	100	500	1000	5000	15000	20000	25	50			
28	содовая	0	0	++	++	++	++	++	++	?	0	0	0	0
29	"	+	0	+++	++	++	++	++	++	?	0	0	0	0
30	ѣдк. натр.	0	0	+++	++	++	++	++	++	?	0	0	0	0
31	"	?	0	+++	++	++	++	++	++	?	0	0	0	0
32	выж. сок.	+	0	+++	++	++	++	++	++	+	0	0	0	0
33	"	0	0	+++	++	++	++	++	++	+	0	0	0	0

изъ опытовъ съ нативными мышечными экстрактами, что антисыворотки №№ 28—33 дѣйствуютъ сильнѣе, чѣмъ антисыворотки №№ 22—27 (таблица №№ 50 и 66).

Съ нативной кровяной сывороткой опять получидось какъ бы значительное увеличеніе преципитирующей силы антисыворотокъ, при чемъ у всѣхъ была преципитация не ниже 1:10000, а у двухъ антисыворотокъ (№№ 28 и 32) и въ разведеніи 1:15000; въ это же время съ чужими кровяными сыворотками у трехъ (№№ 28, 30 и 32) реакціи не было и въ разведеніяхъ 1:25, а остальные три (№№ 29, 31 и 33) дали помутніе только въ этихъ разведеніяхъ.

#### В. Дѣйствіе на 100°-бѣлки.

Исслѣдованія мышечныхъ антисыворотокъ на подвергнутые нагрѣванію съ физиологическимъ растворомъ мышечные экстракты и сыворотки въ разведеніи 1:25 въ кипящей банѣ въ теченіи 30 минутъ дали слѣдующіе результаты. При такой обработкѣ экстрактовъ и мясного сока выпадаетъ обильный хлопьевидный осадокъ, но въ разведеніяхъ 1:25 химически опредѣлимы еще слѣды бѣлка. Изъ сравненія дѣйствія антисыворотокъ №№ 28—33 на свои экстракты и сокъ, нагрѣтые при 100° 30 минутъ, съ таковыми же опытомъ антисыворотокъ №№ 22—27 (табл. № 52) выходитъ, что антисыворотки №№ 28—33 обладаютъ способностью въ большихъ разведеніяхъ преципитировать свои экстракты и сокъ, давая реакцію въ разведеніи 1:100, а одна (№ 32) и 1:250; только двѣ антисыворотки (№№ 29 и 31) не дали больше 1:50; тогда какъ антисыворотки №№ 22—27 не преципитировали выше разведенія 1:50 своего экстракта. Вторая разниа заключается въ появленіи въ послѣднемъ случаѣ незначительныхъ помутнѣній съ чужими бѣлками, чего не наблюдалось въ опытахъ съ мышечными антисыворотками №№ 22—27.

Таблица № 68.

№№ Кровин.	Антисывор.	Щелоч. экстр. и выж. сокъ нагрѣв. 100 — 30 м.											
		Лошади					Коровы					Свиньи	
		25	50	25	50	100	250	500	25	50			
28	Содовая	?	0	+	+	+	0	0	?	0	0	0	
29	"	0	0	+	+	0	0	0	?	0	0	0	
30	Ѣдк. натр.	0	0	+	+	+	0	0	?	0	0	0	
31	"	0	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	
32	Выж. сок.	0	0	+	+	+	0	0	?	0	?	0	
33	"	0	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	

И то и другое надо объяснять какъ большей преципитирующей силой антисыворотокъ №№ 28—33, такъ и большимъ содержаніемъ бѣлковъ въ мясномъ сокѣ, содовомъ и Ѣдкаго натра экстрактахъ, благодаря чему можетъ проявиться явленіе „специфичности состоянія“.

Таблица № 69.

№№ Кровин.	Антисыворотка	Кровяная сыворотка нагрѣв. 100° — 30 мин.														
		Лошади					Коровы					Свиньи				
		25	50	100	250	500	50	100	500	1000	15000	20000	25	50		
28	Содовая	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0
29	"	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0
30	Ѣдк. натр.	+	+	+	?	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0
31	"	+	+	+	?	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0
32	Выж. сок.	+	+	+	?	0	0	+	+	+	+	+	+	+	?	0
33	"	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0

Въ опытахъ съ кровяными сыворотками наблюдается полученіе реакціи въ значительно большихъ разведеніяхъ, по сравненію съ мышечными экстрактами, а также появленіе гетерологическихъ помутнѣній. Со своей коровьей сывороткой реакція получалась въ разведеніяхъ 1:10000 и 1:15000 (два раза), а съ чужими — 1:100, и даже у двухъ антисыворотокъ (№№ 30 и 32) — 1:250.

На мышечный экстрактъ, полученный съ помощью физиологическаго раствора и обработанный при 100°, антисыво-

ротки исследовались, как и антисыворотки №№ 22—27, послѣ нагреванія въ теченіи  $1/2$ — $1 1/2$  часовъ; при чемъ срокъ наблюденія за реакціей продолжался  $1 1/2$  часа, а результаты реакцій отмѣчались черезъ каждыя  $1/2$  часа.

Таблица № 70.

№№ групповыя	Антисыворотки	Время наблюденія	Мышечный экстракт 1:25 физiol. раств. 100° въ теченіи																		
			полъ часа ( $1/2$ ч.)			одного часа (1 ч.)			полтора ч. ( $1 1/2$ ч.)												
			Лощ.	Кор.	Свиц.	Лощ.	Кор.	Свиц.	Лощ.	Кор.	Свиц.										
28	содовая	$1/2$	0	+	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		$1 1/2$	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		1	0	+	+	?	0	0	+	?	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	
29	"	$1/2$	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		$1 1/2$	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	ѣдк. натр.	$1/2$	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		$1 1/2$	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	"	$1/2$	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		$1 1/2$	0	+	?	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	выж. сок.	$1/2$	0	+	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		$1 1/2$	0	+	?	0	0	0	+	?	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0
		1	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	"	$1/2$	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		$1 1/2$	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Также какъ въ аналогичномъ опытѣ съ антисыворотками №№ 22—27 (табл. № 52) и здѣсь мы видимъ ясную зависимость появленія преципитации отъ продолжительности нагреванія мышечнаго экстракта: такъ послѣ  $1/2$  часового нагреванія помутнѣніе появляется большей частью только въ разведеніи 1:25, уже черезъ  $1/2$  часа наблюденія; послѣ же часового нагреванія преципитация замѣтна только черезъ часъ; наконецъ, послѣ  $1 1/2$  часового нагреванія экстрактъ теряетъ способность преципитироваться 4-мя антисыворотками, и только антисыворотки №№ 28 и 31 даютъ послѣ  $1 1/2$  часового стоянія небольшое помутнѣніе въ разведеніи 1:25.

При болѣе долгомъ стояніи преципитаты увеличиваются въ объемѣ и появляются въ болѣе слабыхъ разведеніяхъ, однако и послѣ  $1 1/2$  часового стоянія преципитация получается: съ мышечнымъ экстрактомъ, нагрѣтымъ полъ часа, въ разведеніи 1:50 и только антисыворотки №№ 18 и 32 дали слѣды въ разведеніи 1:100; съ мышечнымъ экстрактомъ, нагрѣтымъ 1 часъ, въ разведеніи 1:25 ясная и 1:50 слѣды (и то не со всѣми антисыворотками); послѣ же  $1 1/2$  часового нагреванія при преципитации, можно считать, почти не получается.

Сравнивая эти опыты съ такими же опытами антисыворотокъ №№ 22—27, можно замѣтить лишь небольшое усиленіе реакціи антисыворотокъ №№ 28—33 съ экстрактами, нагрѣтыми  $1/2$  и 1 часъ, сказывающееся въ появленіи болѣе обильнаго преципитата. Но рѣзкой разницы здѣсь нѣтъ, если не считать, что антисыворотки №№ 28 и 32 дали слѣды реакціи и въ разведеніи 1:100. Какъ тѣ, такъ другія антисыворотки одинаково не преципитируютъ мышечнаго экстракта, подвергнутаго  $1 1/2$  часовому нагреванію.

Совершенно такіе же опыты были поставлены съ нагреваніемъ въ кипящей банѣ разведеній бѣлковъ съ физиологическимъ растворомъ, содержащимъ 0,1% соды, при этомъ мясной сокъ и экстракты содовой и ѣдкаго натра, а

Таблица № 71.

№№ групповыя	Антисыворотка	Щелочи. экстр. и выж. сокъ + 0,1% соды — 100° — 30 мин.									
		Лощ.				Коровы					
		25	50	25	50	100	250	500	Свины		
28	Содовая	?	0	+	+	+	+	0	?	0	0
29	"	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0
30	"	0	0	+	+	+	+	0	0	?	0
31	ѣдк. натр.	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0
32	"	?	0	+	+	+	+	0	0	0	0
33	Выж. сок.	?	0	+	+	+	+	?	0	?	0
	"	?	0	+	+	+	+	?	0	0	0

также кровяная сыворотка, исследовались послѣ нагревания въ теченіи 30 минутъ, а обыкновенный мышечный экстрактъ подвергался опять-таки исследованію послѣ  $1/2$ , 1 и  $1\frac{1}{2}$  часового нагреванія.

При кипяченіи съ содой 3 антисыворотки (№№ 28, 32 и 33) преципитируютъ въ разведеніи 1 : 250, 2 (№№ 29 и 30) — 1 : 100 и 1 (№ 31) — 1 : 50. Первые 5 перечисленныхъ здѣсь антисыворотокъ дали усиленіе преципитации по сравненію съ дѣйствіемъ на эти же экстракты и сокъ, нагреваемые безъ соды; одна антисыворотка (№ 31) показала ту же реакцію. Также нѣкоторыя антисыворотки (№№ 32 и 33) дали неспецифическіе осадки, чего не бывало при кипяченіи безъ соды. Такимъ образомъ, прибавляя 0,1% соды и не допуская тѣмъ самымъ свертыванія бѣлка, мы достигаемъ небольшого усиленія преципитации.

Что же касается дѣйствія этихъ антисыворотокъ на кровяную сыворотку, нагреваемую съ содой, то, какъ показывается слѣдующая таблица, здѣсь замѣтной разницы съ сывороткой, нагрѣтой безъ соды, не имѣется.

Таблица № 72.

№№ проб.	Анти-сыворотка	Кровяная сыворотка + 0,1% соды, нагрѣт. 100° — 30 мин.																
		Лошадь				Корова				Свинья								
		25	50	100	250	500	1000	15000	30000	35	50	100	250	500				
28	Содовая	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
29	"	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
30	"	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
31	Бѣл. патра	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
32	"	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
33	Выж. сок.	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0

Сравнивая эту таблицу съ таблицей дѣйствія этихъ же самыхъ антисыворотокъ на кровяную сыворотку, нагреваемую 30 минутъ при 100° безъ прибавленія соды (табл. № 69), замѣчаемъ, что однѣ сыворотки (№№ 29, 30 и 31) дали

небольшое увеличеніе преципитации съ сывороткой кипяченой съ содой; другія (№ 32 и 33) оказались одинаково дѣйствующими и въ томъ и другомъ случаѣ; наконецъ, антисыворотка № 28 дала въ этомъ опытѣ небольшое уменьшеніе; но эти колебанія въ ту или другую сторону были настолько незначительны, какъ и колебанія реакціи съ чужими сыворотками, что въ общемъ надо считать, что замѣтнаго значенія на реакцію преципитации кровяной сыворотки нагреваніе ея съ прибавленіемъ соды не имѣетъ. Объясняется, по моему, это тѣмъ, что въ то время какъ мышечный экстрактъ при нагреваніи безъ соды даетъ сильное свертываніе бѣлковъ въ видѣ обильнаго осадка, и прибавленіе соды устраняетъ это, — такой разницы съ кровяной сывороткой нѣтъ, такъ какъ безъ соды получается только опалесцирующій растворъ, а при прибавленіи соды растворъ послѣ кипяченія остается прозрачнымъ. Значитъ, нѣтъ и большой разницы въ содержаніи бѣлковъ въ растворахъ съ содой и безъ нея, а потому нѣтъ замѣтной разницы и въ преципитации.

Изъ таблицы № 73 видно, какъ продолжительность нагреванія влияетъ на время появленія преципитации. Если будемъ брать результаты преципитации послѣ  $1\frac{1}{2}$  часового наблюденія за ходомъ реакціи, то увидимъ, что послѣ  $1/2$  часового нагреванія 4 антисыворотки реагируютъ до разведенія 1 : 100 и 2 (№№ 29 и 31) до 1 : 50; послѣ 1 часового нагреванія преципитация выше разведенія 1 : 50 не получалась, при чемъ однѣ антисыворотки давали въ разведеніи экстракта 1 : 50 ясную реакцію (№№ 28, 30, 32 и 33), другія (№№ 29 и 30) слѣды ея; наконецъ, послѣ  $1\frac{1}{2}$  часового нагреванія антисыв. №№ 30 и 32 только въ разведеніи 1 : 25, антисыв. №№ 28 и 32 — ясную реакцію въ разведеніи 1 : 50, а антисыв. №№ 29 и 31 не дали совсѣмъ реакціи.

Съ чужими бѣлками реакціи не получалось.

Сравнивая дѣйствіе этихъ антисыворотокъ на мышечный

Таблица № 73.

ММ кроликов	Антисыворотка	Пробы набор.	Мышечный экстракт 1:25 съ 0,1% соды 100° в течении														
			полт часа (1/2 ч.)			одного часа (1 ч.)			полтора часа (1 1/2 ч.)								
			Лощ.	Кор.	Свиц.	Лощ.	Кор.	Свиц.	Лощ.	Кор.	Свиц.						
			25	35	50	100	250	25	25	25	50	100	25	25	50	25	
28	содовая	1/2	0	+	?	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0
		1 1/2	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0
29	"	1/2	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1 1/2	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0
30	б.к. натр.	1/2	0	+	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1 1/2	0	+	+	?	0	0	+	?	0	0	0	0	0	0	0
31	"	1/2	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0
		1 1/2	0	+	+	0	0	0	+	?	0	0	0	0	0	0	0
32	Выж. сок.	1/2	0	+	?	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0
		1 1/2	0	+	+	0	0	0	+	?	0	0	0	+	?	0	0
33	"	1/2	0	+	?	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0
		1 1/2	0	+	+	?	0	0	+	?	0	0	0	?	?	0	0

экстракт, нагреваемый съ содой или безъ соды (табл. №№ 70 и 73), замѣчаемъ, что въ послѣднихъ опытахъ, т. е. съ экстрактомъ нагрѣтымъ съ содой, преципитация подучается сильнѣе; это замѣтно, какъ послѣ 1/2 часового нагрѣванія, такъ и 1 и 1 1/2 часового; но особенно это замѣтно именно съ экстрактомъ нагрѣтымъ 1/2 часа и слабѣе всего съ 1 1/2 часовымъ экстрактомъ, такъ какъ здѣсь реакція тоже или не получалась совсѣмъ или получалась очень слабо. Это указываетъ на то, что при 1 1/2 часовомъ нагрѣваніи денатурированіе бѣлковъ идетъ настолько далеко (надо еще имѣть въ виду незначительное вообще содержаніе бѣлковъ въ экстрактахъ), что только наиболѣе сильно-дѣйствующія антисыворотки могутъ еще проявлять реакцію, и то совсѣмъ незначительную.

Если теперь сравнить дѣйствіе антисыворотокъ №№

28—33 и антисыворотокъ №№ 22—27 на одинаковій мышечный экстрактъ, полученный съ помощью физиологическаго раствора и одинаково обработанный 100° — температурой при разведеніи въ содовомъ растворѣ (табл. №№ 53 и 73), то и тутъ надо признать болѣе сильное дѣйствіе за антисыворотками №№ 28—33, что рѣзче выстутаетъ съ 1/2 и 1 часовыми экстрактами, тогда какъ съ экстрактомъ, нагрѣтымъ въ теченіи 1 1/2 часовъ, эта разниа исчезаетъ, такъ какъ дѣйствіе тѣхъ и другихъ антисыворотокъ съ этимъ экстрактомъ слабое.

#### Г. Дѣйствіе на бѣлки, денатурированные щелочью при комнатной температурѣ.

Далѣе преципитирующія сыворотки №№ 28—33 изслѣдовались на бѣлки, обработанные ѣдкимъ натромъ въ пропорціи Schmid'a при комнатной температурѣ въ теченіи 15 минутъ, причемъ этому изслѣдованію подвергались только тѣ мышечные препараты, которые служили для иммунизации кроликовъ №№ 28—33, т. е. выжатый мясной сокъ и экстракты, полученные дѣйствіемъ растворовъ соды и ѣдкаго натра.

Результаты дѣйствія антисыворотокъ №№ 28—33 на гомологическіе бѣлки, обработанные щелочью при комнатной температурѣ, не представляютъ изъ себя ничего особеннаго, занимая среднее мѣсто между результатами дѣйствія этихъ антисыворотокъ на нативные щелочные экстракты и выжатый сокъ и на свои антигены (табл. №№ 62, 65 и 74); зато преципитация съ гетерологическими экстрактами имѣетъ болѣе сходства съ неспецифическими осадками при дѣйствіи антисыворотокъ на свои антигены; неспецифические осадки въ послѣднихъ опытахъ только уступаютъ по величинѣ осадкамъ, получающимся при наслѣдованіи на антигены.

Сходство специфическихъ осадковъ въ этомъ опытѣ съ

Таблица № 74.

№№ кровяной Антисыворотка	Выж. сыв. и щелоч. экстр. + NaOH — 15 мин. — ком. 1°									
	Лошади			Коровы				Свиньи		
	25	50	100	25	50	100	25	50	100	
28 содовая	+	?	0	+	+	+	+	+	0	0
29 " "	0	0	0	+	+	+	+	+	0	0
30 Бл. натр.	0	0	0	+	+	+	+	+	0	0
31 " "	0	0	0	+	+	+	+	+	0	0
32 выж. сок.	+	?	0	+	+	+	+	+	0	0
33 " "	+	0	0	+	+	+	+	+	0	0

осадками в нативных экстрактах и антигенах объясняется тем, что щелоч при комнатной температур денатурирует блячок незначительно, а потому преципитация получается одинаковая и как бы занимающая среднее место между преципитациями с нативными блячками и с денатурированными по Schmidt'y.

Но что изменение блячка все-же происходит, на это указывает появление гетерологических помутнений, которая нужно объяснить присутствием денатурированных блячков, обуславливающих появление „специфичности состояния“.

#### Д. Действие на высушенные при 100° блячки.

Чтобы иметь возможность провести полное сравнение антисывороток №№ 28—33 с антисыворотками №№ 22—27, я исследовал первая на высушенную при 100° кровяную

Таблица № 75.

№№ кровяной Антисыворотка	Сух. сыв. раств. NaOH						№№ кровяной Антисыворотка	Сух. сыв. раств. NaOH					
	Лош.		Коров.		Свин.			Лош.		Коров.		Свин.	
	Нерав.	5	Нерав.	10	Нерав.	5		Нерав.	5	Нерав.	10	Нерав.	5
28 Содовая	0	0	?	0	0	0	31 Бл. нат.	0	0	0	0	0	0
29 " "	0	0	0	0	0	0	32 Выж. сок.	0	0	0	0	0	0
30 Бл. нат.	0	0	?	0	0	0	33 " "	0	0	+	0	0	0

сыворотку и высушенный мышечный экстракт, которые разводились в раствор, как было описано выше, с помощью блячки натрия, а затем раствор нейтрализовался соляной кислотой. Разведения брались те же самые.

Отсюда видно, что действие антисывороток №№ 28—33 на сильно денатурированный сывороточный блячок весьма незначительное, причем три антисыворотки (№№ 29, 31 и 33) совсем не дают преципитации, а другая 3 — очень слабую. В этом отношении он похожи на антисыворотки №№ 22—27, которая также очень слабо и далеко не все реагировали с высушенным сывороточным блячком.

Также неудачны были опыты преципитировать этими антисыворотками высушенный при 100° мышечный блячок (из обыкновенного экстракта), так как перевести его в раствор получасовым кипячением с 0,1% раствором соды или децинормальным раствором блячки натрия при нагревании до 70° в течении 15—20 минут не удавалось, и преципитация не получалась; 1/2 часовое нагревание с этим раствором блячки щелочи, хотя и растворяло блячок, но преципитация также не получалась, что зависло, видимо, от сильного денатурирования блячковых веществ. От этого предостерегаю, между прочим, и Schmidt в своих опытах с высушенным сывороточным блячком, рекомендуя не нагревать щелочной раствор больше 10—20 минут.

#### Е. Действие на экстракты из органов.

Наконец антисыворотки №№ 28—33 исследовались, как и все предыдущая, на экстракты из органов.

Таблица № 76.

№№ крольчихъ	Антисыворотка	Нативные экстракты изъ:																					
		Почки			Печени			Селезенки															
		Лощ.	Коровы	Свин.	Лощ.	Коровы	Свин.	Лощ.	Коровы	Свин.													
		25	25	50	100	250	25	25	50	100	250												
28	содовая	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
29	"	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
30	Ъдк. натр.	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
31	"	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
32	Выж. сок.	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
33	"	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица № 77.

№№ крольчихъ	Антисыворотка	Экстракты обработ. по Schmidtъ																				
		Почки			Печени			Селезенки														
		Лощ.	Коровы	Свин.	Лощ.	Коровы	Свин.	Лощ.	Коровы	Свин.												
		25	25	50	100	250	25	25	50	100	250											
28	содовая	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
29	"	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
30	Ъдк. натр.	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
31	"	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
32	Выж. сок.	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	"	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица № 78.

№№ крольчихъ	Антисыворотка	Экстракты 1:25 съ физiol. раств. 100°—30 мин.																			
		Почки			Печени			Селезенки													
		Лощ.	Коров.	Свин.	Лощ.	Коров.	Свин.	Лощ.	Коров.	Свин.											
		25	25	50	100	25	25	50	100	25	25	50	100	25							
28	содовая	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
29	"	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30	Ъдк. натр.	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
31	"	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
32	Выж. сок.	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	"	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*) 1:500—0.

Изъ этихъ опытовъ съ экстрактами изъ органовъ, которые преципитировались антисыворотками №№ 28—33 въ нативномъ состояннн и обработанными 3-мя различными способами (по Schmidtъ, нагреваемъ съ содой и безъ нея), видно, что сильнѣе всего антисыворотки дѣйствуютъ

Таблица № 79.

№№ кроль.	Антисыворотка	Экстракты 1:25 съ 0,1% соды 100°—30 мин.																		
		Почки			Печени			Селезенки												
		Лощ.	Коров.	Свин.	Лощ.	Коров.	Свин.	Лощ.	Коров.	Свин.										
		25	25	50	100	25	25	50	100	25	25	50	100	25						
28	Содовая	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	"	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	Ъдк. натр.	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	"	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	Выж. сок.	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	"	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

на нативные экстракты, слабѣе всего съ нагрѣтыми при 100° безъ соды; среднее же положеннн занимаютъ экстракты въ обработкѣ по Schmidtъ и послѣ нагрѣваннн съ содой.

Изъ экстрактовъ сильнѣе всего реагируютъ антисыворотки съ селезеночнымъ, затѣмъ почечнымъ и, наконецъ, съ печеночнымъ; хотя и въ данномъ случаѣ отдѣльныя антисыворотки представляли обратныя отношеннн, реагируя сильнѣе съ почечными и т. д. Но такнн антисыворотки представляютъ исключеннн.

Съ нативнымъ почечнымъ и селезеночнымъ экстрактами болнншинство антисыворотокъ реагируютъ до разведеннн 1:100, а съ нативнымъ печеночнымъ 1:25 и 1:50. Съ селезеночнымъ, обработаннымъ по Schmidtъ, реагируютъ до разведеннн 1:100, съ такимъ же почечнымъ — 1:50, а съ печеночнымъ 1:25 и 1:50. Съ кипяченными безъ соды: съ селезеночнымъ — 1:25 и 1:50, съ почечнымъ 1:25 и съ печеночнымъ давали или слѣды реакцнн или полное отсутствнн ея. Наконецъ, съ кипяченными съ содой: съ селезеночнымъ — 1:50, съ почечнымъ 1:25 и 1:50 и съ пече-

ночнымъ — 1:25, а двѣ антисыворотки (№№ 30 и 33) дали отсутствіе реакціи.

Такимъ образомъ антисыворотки, полученныя иммунизацией кроликовъ обработанными по способу Schmidt'a выжатымъ мяснымъ коровинымъ сокомъ и коровыми мышечными экстрактами, при чемъ мышечные бѣлки извлекались или растворомъ соды или ѣдкаго натра, содержатъ также, какъ и остальные антисыворотки, общіе преципитины, благодаря которымъ и удается, главнымъ образомъ, преципитация съ бѣлками, добытыми изъ селезенки, почки и печени.

Въ этихъ же опытахъ мы находимъ подтвержденіе разнѣ полученныхъ наблюденій, что при нагреваніи бѣлковыхъ растворовъ съ содой бѣлки болѣе сохраняютъ способность преципитироваться, чѣмъ нагрѣтые безъ соды и потому свернувшіеся.

Нижеслѣдующая таблица представляетъ сводку всѣхъ опытовъ съ антисыворотками № 28—33.

Таблица № 80.

Антисыворотка, полученная отъ введенія мясного сока и щелочныхъ мясныхъ экстрактовъ, денатурированныхъ по Schmidt'у.

Растворы	Результ.	Растворы	Результ.	Растворы	Результ.
Выж. сокъ и щел. экстр. по Schm.	+++	Выж. сокъ и щел. экстр. + физ. р. 100°—30°	+	Сухая сыв-ка и мыш. бѣл. + NaOH.	0
Обык. мыш. экстр. по Schm.	+	Сыв-ка + физ. р. 100°—30°	++++	Выж. сокъ и щел. экстр. + NaOH — комб. р.	+++
Сыв-ка по Schm.	++++	Обыкн. мыш. экстр. съ физ. р. 100°—30°	+	Нат. экстр. орган.	+
Нат. выж. сокъ и щел. экстр.	+++	Выж. сокъ и щел. экстр. + 0,1% соды 100°—30°	+	Экстр. орг. по Schm.	+
Нат. обык. мыш. экстр.	++	Сыв-ка + 0,1% соды 100°—30°	++++	Экстр. орг. + физ. р. 100°—30°	+
Нат. сыв-ка.	++++	Обыкн. мыш. экстр. + 0,1% соды 100°—30°	+	Экстр. орг. + 0,1% соды — 100°—30°	+

1. Экстрагированіе мяса 0,1% растворами соды или ѣдкаго натра не только является вполне безопаснымъ въ смыслѣ денатурированія бѣлковыхъ веществъ, но, повидимому, даетъ вытяжки съ большимъ содержаніемъ бѣлковъ, чѣмъ вытяжки, полученныя съ помощью физиологическаго раствора.

2. Иммунизированіе кроликовъ этими экстрактами и выжатымъ мяснымъ сокомъ въ обработкѣ Schmidt'a даетъ вполне пригодную для изслѣдованія преципитирующую сыворотку, сильнѣе дѣйствующую, чѣмъ сыворотки отъ иммунизированія обычными мышечными экстрактами; въ особенности это относится къ сывороткамъ полученнымъ отъ введенія мясного сока; что же касается антисыворотокъ послѣ иммунизации щелочными экстрактами, то замѣтить разницы между антисывороткой содоваго экстракта и антисывороткой экстракта съ ѣдкимъ натромъ — не удалось.

3. Эти антисыворотки, какъ и всѣ мышечные преципитины, обладаютъ свойствомъ предпочтительнѣе реагировать съ мышечными бѣлками, но въ то же время почти одинаково, какъ и сывороточные преципитины, реагировать съ сывороточными бѣлками.

4. Обладаютъ всѣми свойствами Hitze-Alkali-преципитиновъ, но передъ сывороточными преципитинами Schmidt'a имѣютъ то преимущество, что реагируютъ и съ мышечнымъ 100° — бѣлкомъ.

## Добавленіе.

**Определеніе содержанія бѣлковъ въ преципитируемыхъ растворахъ химическимъ путемъ.**

Изслѣдуя полученныя мною антисыворотки на бѣлки сыворотки, мяса и различныхъ органовъ, какъ въ нативномъ, такъ и въ денатурированномъ состояніи, мнѣ не

разъ приходилось убѣждаться въ почти очевидной зависимости силы преципитации, между прочимъ, и отъ содержанія бѣлковъ въ различныхъ преципитируемыхъ растворахъ. Такъ напримѣръ: получая мышечные преципитины, все равно — съ нативнымъ или съ денатурированнымъ по Schmidt'y бѣлкомъ, и послѣдую ихъ, я наблюдаю большую количественную разницу между преципитацией со своими мышечными экстрактами и преципитацией съ сывороточными бѣлками. Разница эта объясняется съ одной стороны тѣмъ, что мышечныя антисыворотки содержатъ, повидимому, много общихъ преципитиновъ, которые вызываютъ преципитацию и съ сывороточными бѣлками, а съ другой стороны, играетъ огромное значеніе въ этомъ явленіи и содержаніе значительнаго количества бѣлковъ въ сывороткѣ.

Но въ нашихъ опытахъ встрѣчались и обратные случаи, а именно такіе, когда преципитация не получалась въ тѣхъ разведеніяхъ, въ которыхъ предварительная химическая проба указывала на бѣлокъ. Здѣсь имѣются въ виду нѣтъ случаи, когда бѣлокъ въ преципитируемомъ растворѣ завѣдомо есть, но онъ денатурированъ или по способу Schmidt'a или сильнымъ нагреваніемъ, такъ что нативные преципитины не реагируютъ вслѣдствіе этого денатурированія бѣлковъ. Наоборотъ, здѣсь имѣются въ виду случаи неполученія реакціи нативныхъ преципитиновъ съ растворами нативныхъ же бѣлковъ, хотя бѣлокъ въ этихъ растворахъ химически опредѣлялся. Напримѣръ, какъ сывороточные, такъ и мышечные преципитины отказывались уже реагировать съ такими разведеніями экстрактовъ почки, печени и селезенки, въ которыхъ бѣлокъ еще былъ находимъ даже химическимъ путемъ, т. е. методомъ значительно менѣе чувствительнымъ, чѣмъ биологическій. Причину такой слабой реакціи надо уже искать въ маломъ содержаніи въ этихъ антисывороткахъ общихъ преципитиновъ, благодаря чему реакція получается только въ крѣпкихъ растворахъ

другихъ бѣлковъ того же вида животныхъ. Это явленіе вполне аналогично появленію неспецифическихъ помутнѣній, которыя тоже получаются только въ крѣпкихъ растворахъ гетерологическихъ бѣлковъ.

Наконецъ, продолжительность иммунизации животнаго для полученія достаточно высокой специфической сыворотки зависитъ, надо думать, отъ содержанія бѣлковъ въ томъ или въ другомъ антигенѣ. Достаточно уже накопились наблюденія, что, вводя животному большія количества бѣлковъ, можно скорѣе получить сильно-дѣйствующую антисыворотку, чѣмъ при введеніи антигена съ небольшимъ количествомъ бѣлка, хотя и здѣсь въ концѣ концовъ получится специфическая сыворотка. Такъ Obermayer und Pick говорятъ, что имъ удавалось, вприскивая въ теченіи мѣсяца по 0,02 гр. бѣлка, получать иммунную сыворотку. Въ нашихъ опытахъ также можно предполагать, что болѣе быстрое полученіе антисыворотокъ съ достаточно высокимъ титромъ при иммунизации кроликовъ выжатымъ мяснымъ сокомъ и щелочными экстрактами по сравнению съ иммунизацией обыкновенными мышечными экстрактами — зависитъ отъ сравнительно большаго содержанія бѣлковыхъ веществъ въ первыхъ антигенахъ, что, дѣйствительно, можно было заключить изъ сравненія опытовъ преципитации съ тѣми и другими экстрактами.

Во всѣхъ этихъ случаяхъ интересно было знать не столько абсолютное содержаніе бѣлковыхъ веществъ въ различныхъ бѣлковыхъ растворахъ, сколько сравнительное количество въ томъ или другомъ растворѣ. Въ виду того значенія, которое имѣетъ для насъ знаніе сравнительнаго содержанія бѣлковъ въ различныхъ растворахъ и въ разведеніяхъ этихъ растворовъ, я не ограничился только предварительными химическими опытами, обычно примѣняемыми и рекомендуемыми всеми авторами, какъ-то: пробой съ азотной кислотой и полученіемъ при взыбалываніи болѣе или

менше стойкой гѣны. Но такъ какъ для меня играли значеніе сравнительныя цифры содержанія бѣлка, то я не примѣнял и сложныхъ методовъ опредѣленія абсолютнаго количества бѣлковыхъ веществъ, а пользовался только методомъ Эсбаха, какъ наиболѣе простымъ и въ то же время удовлетворяющимъ моимъ цѣлямъ, и осадочными и цвѣтовыми реакціями качественнаго опредѣленія бѣлка въ послѣдовательныхъ разведеніяхъ бѣлковыхъ растворовъ. Въ первомъ случаѣ я судилъ по количеству получающагося осадка, повторяя каждый опытъ нѣсколько разъ; во второмъ случаѣ по тому разведенію бѣлковаго раствора, въ которомъ бѣлокъ еще опредѣлимъ. Каждое разведеніе бѣлковаго раствора изслѣдовалось мною нѣсколькими реактивами; это дѣлалось изъ тѣхъ соображеній, что существуютъ указанія на неодинаковую чувствительность того или другого бѣлка къ одному реактиву; напримѣръ, Гаммарстенъ такъ говоритъ объ этомъ: „По отношенію къ одному и тому же реактиву на бѣлки различнаго бѣлковаго тѣла обнаруживаются различную чувствительности и повтому невозможно для каждой отдѣльной реакціи установить предѣлы чувствительности для всѣхъ бѣлковъ“.

Изъ всего существующаго количества осадочныхъ, алкалоидныхъ и цвѣтовыхъ реакцій на бѣлокъ были выбраны по возможности тѣ реакціи, на которыя существуютъ указанія, какъ на наиболѣе чувствительныя. Такимъ образомъ я примѣнял биуретовую реакцію, кипяченіе съ добавленіемъ уксусной кислоты, пробу Heller'a съ азотной кислотой, реакцію съ желѣзисто-синеродистымъ кадмемъ и уксусной кислотой, съ фосфорновольфрамовой кислотой, инприновой и дубильной кислотой.

Результаты изслѣдованій приведены въ таблицѣ № 81, гдѣ числа обозначаютъ, до какого разведенія того или другого бѣлковаго раствора получается еще реакція съ даннымъ реактивомъ. Приготовленіе и примѣненіе всѣхъ этихъ реак-

тивовъ было обычное; надо только еще упомянуть, что для осажденія бѣлковъ танниномъ я пользовался изъ двухъ предложенныхъ для этого растворовъ Hedin'a и Almena' первымъ, который приготовлялся слѣдующимъ образомъ: брались таннину 7 гр., поваренной соли 10 гр., ледяной уксусной кислоты 5 к. с. и все это смѣшивалось съ 100 к. с. воды.

Различныя разведенія почти всѣхъ бѣлковыхъ растворовъ, которые примѣнялись въ моихъ опытахъ или въ качествѣ антигеновъ при иммунизаций животныхъ или только въ качествѣ преципитируемыхъ растворовъ, изслѣдовались всѣми семью реактивами. При этомъ всякій бѣлковый растворъ, все равно - денатурированный или неденатурированный, разводился постепенно физиологическимъ растворомъ, какъ это дѣлалось для постановки опыта преципитации, и всѣ разведенія изслѣдовались на бѣлокъ до полнаго исчезновенія реакціи со всѣми реактивами.

Всѣ бѣлковые растворы сыворотки и экстрактовъ, денатурированные или неденатурированные, изслѣдовались мною также по способу Эсбаха въ его альбуминометрахъ. Обыкновенно приходилось дѣлать разведенія этихъ бѣлковыхъ растворовъ для полученія болѣе точныхъ результатовъ, а затѣмъ производилось вычисленіе. При этомъ оказалось, что сывороточные растворы разбавлялись значительно больше, чѣмъ экстракты. Каждый опытъ повторялся 2—3 раза.

Изслѣдую бѣлковые растворы, обработанные по способу Schmidt'a, я нейтрализовала ихъ передъ опредѣленіемъ бѣлка, какъ это дѣлалось передъ постановкой опыта преципитации, а затѣмъ разводила физиологическимъ растворомъ въ 3—4—10 разъ и наливала въ альбуминометр. Вѣроятно такой нейтрализацией объясняется то, что у меня осадокъ ни разу не всплывалъ на верхъ пробирки, что по мнѣнію В. И. Словцова<sup>1)</sup> иногда получается при содержаніи боль-

1) В. И. Словцовъ. Руководство для клиническаго изслѣдованія мочи. 1908 СПб.

Таблица № 81.

Исследуемые растворы	1	2	3	4	5	6	7
	Взвешиват реакция	Кипячение + уксусн. к.	Азотная кисл.	Железисто- синер. калий + уксусн. к.	Фосфорно- вольфр. к.	Щавелевая + лимонная кислоты	Таналь
1. Натив. лошад. сыв.	1000	1000	5000	5000	5000	1000	5000
2. " коров.	1000	500	5000	1000	5000	1000	5000
3. " свин.	500	1000	5000	1000	5000	1000	5000
4. Лошад. сыв. по Schm.	100	100	1000	500	1000	100	1000
5. Коров. " "	500	100	1000	500	1000	500	1000
6. Свин. " а "	500	100	1000	1000	1000	100	1000
7. Натив. лош. мыш. экст.	50	100	500	100	500	100	500
8. " кор. " "	100	100	500	500	100	100	500
9. " свин. " "	100	500	500	500	500	500	500
10. Лош. мыш. экст. по Schm.	50	50	100	50	100	0	100
11. Коров. " " "	50	50	100	100	50	50	100
12. Свин. " " "	50	100	100	100	100	50	100
13. Натив. кор. содов. экст.	500	1000	1000	500	1000	100	1000
14. " " фдк. натра	100	1000	1000	500	1000	100	1000
15. " " выж. соки	1000	1000	5000	5000	5000	500	5000
16. Содов. экстр. по Schm.	50	100	500	100	500	50	100
17. Фдк. натр. " "	100	100	500	100	100	50	500
18. Выж. сок " "	100	100	500	100	500	100	500
19. Нат. лош. почечн. экст.	50	100	500	1000	500	100	500
20. " кор. " "	100	100	1000	100	500	100	1000
21. " свин. " "	100	500	1000	500	500	500	1000
22. " лош. печен. " "	100	100	500	100	500	100	500
23. " кор. " "	50	100	500	100	500	50	500
24. " свин. " "	100	500	1000	100	1000	50	1000
25. " лош. селез. " "	50	100	500	100	1000	100	500
26. " кор. " "	50	500	1000	500	500	100	500
27. " свин. " "	100	100	1000	500	1000	100	500
28. Лош. почечн. по Schm.	50	100	100	100	100	50	100
29. Коров. " " "	100	50	100	50	100	50	100
30. Свин. " " "	50	100	100	100	100	50	50
31. Лош. печен. по Schm.	50	50	500	100	500	50	100
32. Коров. " " "	50	100	100	100	100	50	100
33. Свин. " " "	50	50	500	500	100	50	100
34. Лош. селез. по Schm.	100	100	500	100	500	100	500
35. Коров. " " "	100	100	500	100	500	50	500
36. Свин. " " "	50	100	500	100	100	100	500

ших количеств нуклеопротеина в мочь, а чаще при щелочной реакции ея. Результаты приведены в ‰, как это получается по способу Эсбаха.

Таблица № 82.

Исследуемые растворы	Результаты ‰	Исследуемые растворы	Результаты ‰	Исследуемые растворы	Результаты ‰
1. Натив. лош. сыв.	52,5	13. Нат. содов. кор. экстр.	15,0	25. Нат. лош. селез.	7,9
2. " кор. "	47,2	14. Нат. фдк. натр. экстр.	14,5	26. " кор. "	6,8
3. " свин. "	68,2	15. Нат. выж. соки	20,0	27. " свин. "	7,5
4. Лош. сыв. Schm.	10,0	16. Содов. эк. Schm.	1,8	28. Лош. поч. Schm.	0,6
5. Коров. " "	15,0	17. Фдк. натр. "	1,3	29. Коров. " "	0,9
6. Свин. " "	25,0	18. Выж. сок " "	3,4	30. Свин. " "	1,0
7. Нат. лош. мыш. экстр.	7,9	19. Нат. лош. почечн. экстр.	5,2	31. Лош. печ. Schm.	0,75
8. Нат. кор. мыш. экстр.	9,6	20. Нат. коров. почечн. экстр.	10,0	32. Коров. " "	0,4
9. Нат. свин. мыш. экстр.	9,9	21. Нат. свин. почечн. экстр.	10,5	33. Свин. " "	0,8
10. Лош. мыш. эк. Schm.	0,75	22. Нат. лош. печен. "	6,9	34. Лошад. селез. Schm.	0,6
11. Коров. мыш. эк. Schm.	0,99	23. " кор. "	3,4	35. Коров. селезен. Schm.	0,7
12. Свин. мыш. эк. Schm.	1,0	24. " свин. "	10,5	36. Свин. селезен. Schm.	0,7

Получив таким образом определѣние бѣлковъ въ употребляемых мною растворахъ по двумъ способамъ, мы можемъ болѣе или менѣе увѣренно говорить о сравнительномъ содержаніи бѣлковъ въ этихъ растворахъ и такимъ образомъ разрѣшать вопросы, возникающіе въ этомъ отношеніи при изслѣдованіи предипитиновъ. Тѣмъ болѣе можетъ быть обоснована такая увѣренность, что при сравненіи результатовъ изслѣдованія бѣлка по тому или другому способу, наблюдается почти полный параллелизмъ въ обоихъ изслѣдованіяхъ, такъ напримѣръ: въ обоихъ таблицахъ мы видимъ рѣзкую разницу въ содержаніи бѣлка въ сывроточныхъ растворахъ и въ мышечныхъ, и въ то же время почти одинаковое содержаніе въ экстрактахъ мышечныхъ и почечныхъ, печеночныхъ и селезеночныхъ; какъ та, такъ и другая таблицы указываютъ на большее содержаніе

бѣлковъ въ выжатомъ сокъ, содовомъ и ѣдкаго натра экстрактахъ по сравненію съ экстрактами физиологическаго раствора, особенно эта разница велика въ мясномъ сокъ; также замѣчается въ обѣихъ таблицахъ уменьшеніе бѣлка при денатурированіи экстрактовъ по способу Schmidt'a. Что касается денатурированныхъ сыворотокъ, то уменьшеніе бѣлка болѣе замѣтно при изслѣдованіи его по Осбаху.

Такимъ образомъ эти изслѣдованія даютъ право болѣе категорически говорить о возможности влияния большаго или меньшаго содержанія бѣлковъ на реакцію преципитации ихъ. Напримѣръ: значительно большее содержаніе бѣлковъ въ сывороткахъ не можетъ не имѣть значенія (кромѣ другихъ причинъ) въ усиленіи преципитации мышечными преципитинами сывороточныхъ растворовъ по сравненію съ мышечными; также точно большее содержаніе бѣлка въ выжатомъ сокъ, содовомъ и ѣдкаго натра мышечныхъ экстрактахъ, повидимому, и даетъ увеличеніе титра антисыворотокъ при изслѣдованіи ихъ на сокъ и эти экстракты и, наоборотъ, уменьшеніе — при изслѣдованіи на экстракты, полученные съ помощью физиологическаго раствора. Это же большее содержаніе бѣлка въ сокъ и щелочныхъ экстрактахъ, возможно, служитъ причиной болѣе скорой иммунизации животныхъ, какъ это наблюдалось у насъ.

Въ то же время, опираясь на эти изслѣдованія, надо притти къ выводу, что слабое дѣйствіе Hitze-Alkali-преципитиновъ, все равно — сывороточныхъ или мышечныхъ, на экстракты почки, печени и селезенки, денатурированные по Schmidt'y, не можетъ зависеть только отъ незначительнаго содержанія бѣлковъ въ этихъ экстрактахъ, такъ какъ преципитация съ ними не получается больше разведенія 1 : 50, тогда какъ химически бѣлокъ еще ясно различимъ въ разведеніи 1 : 100. Повидимому, объясненіе здѣсь надо искать въ незначительномъ содержаніи въ антисывороткахъ общихъ къ этимъ бѣлкамъ преципитиновъ.

Тѣ же самыя явленія имѣются и при дѣйствіи нативныхъ преципитиновъ на нативные экстракты изъ органовъ, но выражены они здѣсь менѣе рѣзко.

Въ заключеніе считаю необходимымъ сказать нѣсколько словъ о чувствительности примѣнявшихся мною реакцій.

Наиболѣе чувствительными въ моихъ опытахъ какъ для сывороточныхъ, такъ и для мышечныхъ бѣлковъ, въ неизмѣненномъ и въ денатурированномъ состояніяхъ, оказались: реакція Heller'a съ азотной кислотой и реакція съ таниномъ; что сходится съ данными другихъ авторовъ. Наименѣе чувствительными оказались реакціи: буретовая, кипяченіе съ уксусной кислотой и пириновая кислота, такъ какъ онѣ получаются только въ болѣе рѣдкихъ разведеніяхъ. Наконецъ, среднее мѣсто занимаютъ реакціи съ желѣзосинеродистымъ калѣемъ и уксусной кислотой и реакція съ фосфорновольфрамовой кислотой, при чемъ вторая все же чувствительнѣе первой.

### Обзоръ результатовъ и оцѣнка ихъ.

Поставивъ себѣ задачей въ началѣ работы изучить свойства различныхъ преципитиновъ, полученныхъ по способу профессора Schmidt'a, и вмѣстѣ съ тѣмъ выяснитъ, насколько такіе преципитины могли бы быть примѣнны для опредѣленія денатурированныхъ бѣлковъ на практикѣ, — я одну часть кроликовъ иммунизировала денатурированными по Schmidt'y бѣлками, а другую часть нативными бѣлками съ цѣлю имѣть для сравненія нативные преципитины. Какъ нативные, такъ и полученные по способу Schmidt'a преципитины были двойкаго рода: сывороточные и мышечные.

Имунизация кроликовъ нативными сывороточными и мышечными бѣлками даетъ преципитины, которые имѣ-

ють, съ одной стороны, свойства общія для тѣхъ и другихъ, съ другой стороны, — принадлежащія определенному преципитину. Первые представляютъ свойства общія для нативныхъ преципитиновъ вообще, т. е. безразлично, какой бѣлокъ служилъ антигеномъ при полученіи этихъ преципитиновъ. Вторыя же представляютъ свойства, присутствія только данному преципитину, т. е. или мышечному или сывороточному.

Что касается общихъ свойствъ нативныхъ преципитиновъ, то тутъ надо указать на теченіе реакціи ихъ съ нативными бѣлками, которое въ общемъ придерживается схемы Uhlenhuth'a. Этого нельзя сказать про реакцію съ нагрѣтыми бѣлками, гдѣ отупленіе отъ этой схемы замѣчается явнѣе.

Специфичность нативныхъ преципитиновъ не была абсолютная, а только количественная, однако выражена была рѣзко, т. е. гетерологическія помутнѣнія получались въ разведеніяхъ далеко отстоящихъ отъ титра.

Наряду со специфическими для данного бѣлка преципитинами въ нативныхъ антисывороткахъ надо признавать существованіе преципитиновъ общихъ для различныхъ бѣлковъ того же вида животныхъ, благодаря которымъ получается реакція этихъ антисыворотокъ съ экстрактами изъ органовъ; но эта реакція слабѣе, чѣмъ со своимъ антигеномъ, что зависитъ, вѣрнѣе всего, отъ разницы въ содержаніи тѣхъ и другихъ преципитиновъ, а не отъ разницы въ содержаніи бѣлковъ.

Элективное насыщеніе по Weichardt'y даетъ возможность получить антисыворотки, не реагирующія съ тѣмъ или другимъ экстрактомъ. Однако въ настоящее время не встрѣчается необходимости въ примѣненіи такихъ органо-специфическихъ сыворотокъ на практикѣ.

Ислѣдованіе нативныхъ преципитирующихъ сыворотокъ на денатурированные бѣлки показало от-

сутствіе какой либо реакціи съ бѣлками, обработанными по Schmidt'y, а также подвергнутыми нагрѣванію при 100° въ теченіи  $\frac{1}{2}$  часа какъ съ содой, такъ и безъ нея.

Болѣе точное опредѣленіе „ширины реакціи“ нативныхъ преципитиновъ было произведено только по отношенію къ сывороточному преципитину и показало, что нативный преципитинъ обладаетъ „шириной реакціи“ отъ 0° до 85°, т. е. при условіяхъ опыта онъ даетъ еще преципитацию и съ 85°-бѣлкомъ; тогда какъ съ 86°-бѣлкомъ реакціи уже не получается.

Наконецъ, опыты съ дѣйствіемъ нативныхъ преципитиновъ на бѣлки, денатурированные ѣдкимъ натромъ въ условіяхъ Schmidt'a при комнатной температурѣ и при 70°, показали, что въ первомъ случаѣ реакція становится немного слабѣе, во второмъ же ея совсѣмъ нѣтъ.

Наиболѣе существенной разницей между сывороточными и мышечными нативными преципитинами, которую мнѣ удалось установить, является неодинаковая способность этихъ преципитиновъ реагировать съ мышечными бѣлками. А именно, оказалось, что мышечные преципитины сильнѣе реагируютъ съ мышечными экстрактами, чѣмъ сывороточные преципитины, хотя въ общемъ эта разница не такъ уже велика. На сывороточные бѣлки и тѣ и другіе преципитины дѣйствуютъ приблизительно одинаково.

Болѣе сильное дѣйствіе мышечныхъ преципитиновъ на мышечные экстракты надо объяснять тѣмъ, что мышечный же бѣлокъ служилъ для нихъ антигеномъ; причину же ихъ почти одинаковой съ сывороточными преципитинами реакціи съ сывороточнымъ бѣлкомъ надо искать въ двухъ обстоятельствахъ: въ содержаніи въ мышечныхъ антисывороткахъ большаго количества общихъ для сывороточныхъ бѣлковъ преципитиновъ, а также въ 5—6 разъ большемъ содержаніи бѣлковыхъ веществъ въ сывороткахъ по сравненію съ экстрактами.

Препятствие для получения нативных мышечных преципитинов, которое выставляется многими авторами, а именно: токсичность мясных экстрактов для кроликов, — на основании моих исследований легко может быть обойдено, если до выпрыскивания экстракты несколько дней продержать с хлороформом.

При исследовании сывороточных и мышечных Hitze-Alkali-преципитинов также были обнаружены: 1) общия для тѣх и других преципитинов свойства и 2) специально присущия каждому из них.

Останавливаясь сначала на общих свойствах, надо указать, что для получения годных антисывороток, содержащих Hitze-Alkali-преципитин, необходимо больше продолжительное иммунизирование, как это замечено вообще для получения антисывороток к денатурированным бѣлкам. Однако и послѣ продолжительной иммунизации мнѣ не удавалось получать антисывороток с таким же высоким титромъ по отношенію къ своему антигену, какимъ обладали нативная антисыворотки; но въ общемъ антисыворотки, полученные по способу Schmid'ta, были въ достаточной степени чувствительны и годны для исследований.

Главная разница въ теченіи реакціи Hitze-Alkali-преципитиновъ по сравненію съ требованіями Uhlenhuth'a заключается въ слишкомъ замедленномъ появленіи помутнѣній; остальное же теченіе реакціи обычное. Получающіяся преципитаты значительно меньше такового въ реакціяхъ нативныхъ преципитиновъ.

Еще большая разница между нативными и полученными по способу Schmid'ta антисыворотками заключается въ томъ, что Hitze-Alkali-преципитины обладаютъ слабею выраженной специфичностью по отношенію къ своему антигену, т. е. гетерологическія помутнѣнія получаются въ растворахъ денатурированного бѣлка, сравнительно недалеко отстоящихъ отъ титра сыворотокъ. Наилучшее объясненіе

этому явленію даетъ ученіе Obermauer'a und Pick'a о специфичности „видовой“ и „специфичности состоянія“, подтверждающееся и моими опытами.

Примѣненіе элективнаго насыненія съ цѣлью получить болѣе специфичную сыворотку дало настолько значительное ослабленіе преципитирующей силы ея, что пользование такой сывороткой на практикѣ представляется едва-ли возможнымъ.

„Ширина реакціи“ антисыворотокъ, полученныхъ по способу Schmid'ta, значительно больше „ширины“ нативныхъ антисыворотокъ, такъ какъ Hitze-Alkali-преципитины реагируютъ: 1) съ нативными бѣлками, 2) съ бѣлками денатурированными по Schmid'ty, 3) нагрѣтыми до 100° съ содой и безъ нея (при чемъ послѣ нагрѣванія съ содой реакція выступаетъ въ общемъ рѣзче), 4) съ высушеннымъ при 100° сывороточнымъ бѣлкомъ, переведеннымъ въ растворъ при помощи ѣдкой щелочи (въ послѣднемъ случаѣ реакція получается сравнительно слабая).

Чѣмъ болѣе рѣзко денатурація подвергается преципитируемый бѣлковый растворъ, тѣмъ болѣе появляется гетерологическихъ помутнѣній, и, наоборотъ, реакція съ нативными бѣлками специфична.

Присутствіемъ общихъ для различныхъ гомологическихъ бѣлковъ преципитиновъ надо объяснить полученіе реакціи Hitze-Alkali-преципитиновъ съ экстрактами изъ различныхъ органовъ; причемъ и по отношенію къ этимъ бѣлкамъ антисыворотки Schmid'ta проявляютъ такую же „ширину реакціи“, но только преципитация, какъ и у нативныхъ антисыворотокъ, получается болѣе слабая.

Изъ свойствъ, присущихъ только сывороточнымъ Hitze-Alkali-преципитинамъ, надо указать на ихъ малую способность реагировать съ мышечными бѣлками, въ особенности съ денатурированными.

Наоборот, мышечные Hitz-Alkali-преципитины обладают способностью, действуя сильнее на денатурированные мышечные бѣлки, приблизительно также, как сывороточные преципитины Schmidt'a, реагировать съ денатурированными сывороточными бѣлками; и только въ случаѣ сильной денатураціи бѣлковъ (каковой является высушивание при 100°) мышечные преципитины дѣйствуютъ слабѣ сывороточныхъ.

При иммунизациі кроликовъ мышечными бѣлками, денатурированными по Schmidt'y, я пользовался слѣдующими 4-мя мышечными препаратами: 1) экстрактами изъ мяса, полученными съ помощью обыкновеннаго физиологическаго раствора повареной соли, 2) съ добавленіемъ 0,1% соды; 3) съ добавленіемъ 0,1% ѣдкаго натра и, наконецъ, 4) выжатымъ мяснымъ сокомъ.

Изъ сравненія результатовъ иммунизациі и изслѣдованія полученныхъ иммунныхъ сыворотокъ оказалось, во-первыхъ, что экстрагированіе мышечныхъ бѣлковъ щелочными растворами способствуетъ получению болѣе крѣпкихъ концентрацій ихъ; во-вторыхъ, что для иммунизациі выжатымъ мяснымъ сокомъ и щелочными экстрактами нуженъ менѣе продолжительный срокъ, чѣмъ при пользованіи обыкновенными экстрактами (съ физиологическимъ растворомъ); и въ-третьихъ, что въ результатъ иммунизациі выжатымъ мяснымъ сокомъ и щелочными экстрактами получаютъ болѣе дѣятельныя сыворотки. Въ особенности все это относится къ примѣненію выжатого мясного сока, тогда какъ по отношенію къ щелочнымъ экстрактамъ это менѣе рѣзко выражено. Причиной этого служить, повидимому, большее содержаніе бѣлковъ, такъ какъ, дѣйствительно, выжатый мясной сокъ содержитъ въ 2 раза, а щелочные экстракты въ 1½ раза больше бѣлковъ, чѣмъ обыкновенные экстракты.

Всѣ полученные мною результаты по изслѣдованію

Hitze-Alkali-преципитивовъ интересны съ теоретической точки зрѣнія въ томъ отношеніи, что доказываютъ способность не только нативныхъ, но и денатурированныхъ бѣлковъ вызывать, при введеніи ихъ въ организмъ животныхъ, образованіе иммунныхъ тѣлъ — преципитивовъ.

Такъ введеніе животнымъ бѣлковъ, денатурированныхъ нагрѣваніемъ и щелочью по Schmidt'y, вызвало въ данномъ случаѣ образованіе особыхъ, характерныхъ для этихъ бѣлковъ, преципитивовъ, главное свойство которыхъ реагировать не рѣзко специфично съ бѣлкомъ, обработаннымъ какъ антигенъ. Затѣмъ оказалось, что подобно тому, какъ нативные преципитины обладаютъ способностью реагировать съ нагрѣтыми до известной степени бѣлками, такъ и Hitz-Alkali-преципитины реагируютъ съ бѣлками болѣе нагрѣтыми, чѣмъ антигенъ, но только ширина реакціонной способности ихъ значительно больше, чѣмъ нативныхъ преципитивовъ.

Выясъ съ тѣмъ былъ установленъ фактъ, что чѣмъ болѣе денатурированы бѣлковые растворы, на которые дѣйствуютъ Hitz-Alkali-преципитины, тѣмъ слабѣ выражена специфичность этой реакціи.

Наконецъ, обратило вниманіе при изученіи Hitz-Alkali-преципитивовъ еще одно явленіе, проливающее отчасти свѣтъ на понятіе о „преципитиногенѣ“. Оказалось, что антигенъ, полученный по Schmidt'y, не реагируя больше съ нативнымъ преципитивомъ, вызывалъ въ организмѣ животнаго образованіе преципитивовъ, реагирующихъ и съ нативнымъ бѣлкомъ. Значитъ, здѣсь бѣлокъ теряетъ способность преципитивоваться, но сохраняетъ способность быть преципитиногеномъ. Приходится на основаніи этого факта согласиться съ Pick'омъ, который нашелъ, что антигенное (активное) свойство преципитиногена и осаждаемость преципитивомъ (пассивное) не одинаковы; при чемъ по моимъ опытамъ выходитъ, что антигенное свойство болѣе стойко къ денатурированію.

Ранѣе работавшіе съ полученіемъ преципитиновъ къ денатурированнымъ бѣлкамъ (Schütze, Loeffler, Obermauer und Pick, Kraus u. Joachim) получали антисыворотки, реагирующія и съ нативными бѣлками, отъ введенія бѣлковъ, денатурированныхъ до потери способности преципитироваться нативными преципитинами; и только Fornet und Müller находили, что менѣе стойко антигенное свойство бѣлка.

Подобныя же явленія встрѣчаются и въ другихъ областяхъ биологии. Такъ Eisenberg und Volk, Штаммъ и др. отдѣляютъ способность агглютинироваться и быть агглютиногеномъ. Въ анафилактикѣ работами сначала Rosenau und Andersson'a, а затѣмъ Безъядки, Doerr'a und Raubitschek'a, Kraus'a und Volk'a, Thomsen'a и др., было найдено, что нагреваніемъ можно разединить двѣ функціи: сенсибилизирующую и токсическую, при чемъ послѣдняя при нагреваніи исчезаетъ.

На основаніи этого я тоже прихожу къ выводу, что въ бѣлкѣ надо отличать два различныхъ свойства: преципитироваться (пассивное) и быть преципитиногеномъ (активное), при чемъ первое менѣе стойко чѣмъ второе.

Изъ разсмотрѣнныхъ свойствъ Hitzte-Alkali-преципитиновъ можно сдѣлать нѣкоторыя заключенія и относительно примѣненія ихъ на практикѣ. Въ виду способности Hitzte-Alkali-преципитиновъ дѣйствовать на нагрѣтый и обработанный щелочью бѣлокъ, примѣненіе ихъ на практикѣ можетъ имѣть значеніе при изслѣдованіи нагрѣтыхъ мясныхъ продуктовъ, въ особенности когда невозможно перевести бѣлковыя вещества въ растворъ съ помощью индифферентныхъ растворителей и приходится прибѣгать къ щелочнымъ растворамъ. Хорошимъ растворителемъ былъ-бы содовый растворъ вслѣдствіе его слабого денатурирующаго свойства, однако сода въ то же время является и слабымъ растворителемъ; поэтому часто бываетъ необходи-

мымъ прибѣгать къ раствору ѣдкого натра, а въ этомъ какъ разъ заключается одно изъ преимуществъ къ широкому примѣненію преципитина Schmidt'a. Оказывается, что слишкомъ продолжительная обработка ѣдкой щелочью лишаетъ бѣлокъ способности преципитироваться и преципитиномъ Schmidt'a. Вторымъ неблагоприятнымъ для практики явленіемъ оказывается менѣе рѣзко выраженная специфичность Hitzte-Alkali-преципитиновъ, что, можетъ быть, удалось бы обойти постановкой достаточнаго числа контрольных опытовъ.

Изъ Hitzte-Alkali-преципитиновъ для изслѣдованія денатурированныхъ мясныхъ продуктовъ мышечные преципитины, изученные нами, имѣютъ преимущество передъ сывороточными, предложенными Schmidt'омъ. Что же касается изслѣдованія неизмѣненныхъ мясныхъ продуктовъ, то здѣсь большой разницѣ между дѣйствіемъ нативныхъ мышечнаго и сывороточнаго преципитиновъ не замѣчается.

Таблица № 83.

Преципитируемое вещество	Hitzte-Alkali-преципитинъ, получ. иммунизацией:			
	1 Кров. сыв.-ки	2 Обык. мыш. экстр.	3 Содов. и ѣдк. натр. экстр.	4 Выж. сока.
Обык. мыш. экстр. по Schmidt'y . . . . .	1:60	1:250	1:250	1:500
Обык. мыш. экстр. + физ. раст. 100°—30'.	0	1:25	1:50	1:50

Таблица № 83 представляетъ дѣйствіе различныхъ Hitzte-Alkali-преципитиновъ на обработанный по Schmidt'y и на 100°-мышечный экстрактъ. Такъ какъ изъ этой таблицы видно, что сильнѣе всего реагируетъ съ мышечнымъ бѣлкомъ преципитинъ выжатаго мясного сока, затѣмъ щелочныхъ экстрактовъ, потомъ обыкновеннаго экстракта и слабѣе всего сывороточный преципитинъ, то выжатый мясной сокъ надо

рекомендовать для получения Hitz-Alkali-преципитина, так как, содержа больше бѣлковъ, онъ сокращаетъ срокъ иммунизации и даетъ болѣе дѣятельную сыворотку.

## Выводы.

1. Введение бѣлковъ, денатурированныхъ нагреваніемъ и щелочью по способу Schmidt'a, вызываетъ, подобно нативнымъ бѣлкамъ, образование въ организмахъ животнаго иммунныхъ тѣлъ — преципитиновъ.
2. Особымъ свойствомъ Hitz-Alkali-преципитиновъ является способность ихъ реагировать съ бѣлкомъ, денатурированнымъ какъ антигенъ.
3. Специфичность Hitz-Alkali-преципитиновъ при дѣйствіи ихъ на денатурированные бѣлковые растворы выражена сравнительно не рѣзко, что зависитъ отъ существованія у этихъ антисыворотокъ «специфичности состоянія» (по Obermayer'u u. Pick'у).
4. Ширина реакціонной способности преципитиновъ Schmidt'a больше ширины нативныхъ преципитиновъ.
5. Hitz-Alkali-преципитинъ сильно реагируетъ съ бѣлкомъ нагрѣтымъ до 100° и растворимымъ въ физиологическомъ растворѣ.
6. Съ бѣлкомъ нагрѣтымъ до 100°, но растворимымъ только въ щелочныхъ растворахъ реагируетъ до известной степени, такъ какъ слишкомъ продолжительное дѣйствіе щелочи дѣлаетъ бѣлокъ неспособнымъ реагировать и съ преципитиномъ Schmidt'a.
7. Ширина реакціонной способности Hitz-Alkali-преципитина дѣлаетъ его болѣе применимымъ при изслѣдованіи нагрѣтыхъ бѣлковъ, поэтому этотъ преципитинъ можетъ быть рекомендованъ для изслѣдованія нагрѣтыхъ мясныхъ продуктовъ, если только достаточнымъ количествомъ кон-

трольныхъ опытовъ на специфичность исключить возможность ошибочныхъ выводовъ.

8. Hitz-Alkali-преципитинъ въ особенности долженъ быть пригоденъ тамъ, гдѣ необходимо примѣнить щелочной растворъ для экстрагирования бѣлковъ изъ мясныхъ продуктовъ.

9. Для извлечения бѣлковъ лучше всего пользоваться содовымъ растворомъ, какъ слабо денатурирующимъ бѣлокъ; при необходимости же воспользоваться болѣе сильнымъ растворителемъ-растворомъ ѣдкаго натра, надо помнить его рѣзкое денатурирующее свойство.

10. Свойство сыворотокъ преципитировать бѣлки изъ различныхъ органовъ можетъ оказаться пригоднымъ на практикѣ, если представится случай изслѣдовать продукты изъ органовъ.

11. При изслѣдованіи неизмѣненныхъ мясныхъ продуктовъ, повидимому, безразлично, пользоваться-ли сывороточнымъ или мышечнымъ преципитиномъ, такъ какъ различіе въ дѣйствіи ихъ на нативный мышечный бѣлокъ незначительная.

12. При изслѣдованіи же денатурированныхъ мышечныхъ бѣлковъ преимущество мышечныхъ преципитиновъ передъ сывороточными рѣзко выступаетъ, почему надо рекомендовать пользоваться ими при изслѣдованіи неизмѣненныхъ мясныхъ продуктовъ; тѣмъ болѣе, что мышечные преципитины пригодны и для дифференцированія крови.

13. Токсичность нативныхъ мышечныхъ экстрактовъ можетъ быть устранена предварительнымъ храненіемъ съ хлороформомъ.

14. При полученіи мышечныхъ преципитиновъ лучше примѣнять выжатый мясной сокъ, который, содержа больше бѣлковъ, оказывается болѣе пригоднымъ для этого.

15. При примѣненіи экстрактовъ лучше пользоваться щелочными, какъ содержащими больше бѣлковъ.

## Положения.

1. Вопросъ объ изслѣдованіи съ помощью преципитинной реакціи бѣлковъ, подвергнутыхъ очень сильному нагреванію, и до настоящаго времени окончательно не разрѣшенъ.
2. Необходимо, чтобы въ Россіи лабораторіи, въ вѣдѣніи которыхъ находится санитарный надзоръ надъ пищевыми продуктами, ввели и возможно широко пользовались биологическимъ методомъ преципитации при контролѣ надъ фальсификаціями мясныхъ продуктовъ.
3. Торгово-санитарный надзоръ долженъ быть переданъ въ общественныя руки, а отвѣтственность торгово-промышленниковъ увеличена.
4. Реакція Löwi, какъ имѣющая, повидимому, связь съ заболѣваніями органовъ съ внутренней секреціей, безусловно заслуживаетъ дальнѣйшаго экспериментальнаго и клиническаго изслѣдованія.
5. Поставить прижизненный діагнозъ заболѣванія поджелудочной железы въ настоящее время въ большинствѣ случаевъ удается, если только примѣнять каждый разъ не одну, а нѣсколько предложенныхъ для этой цѣли реакцій.
6. Аутосеротерапія экссудативныхъ плевритовъ даетъ неопредѣленные результаты.
7. Примѣненіе реакцій иммунитета при ранней діагностикѣ туберкулеза весьма желательно.
8. Формула Rignet не во всѣхъ случаяхъ даетъ правильную оцѣнку физической крѣпости человека.
9. Условия производства и широкое примѣненіе труда малолѣтнихъ являются главными причинами сильнаго развитія туберкулеза легкихъ среди рабочихъ фарфорово-фарфоровыхъ фабрикъ.
10. Желательно введеніе на медицинскихъ факультетахъ отдѣльнаго курса мясовѣдѣнія, такъ какъ знанія въ этой области необходимы для врачей вообще, и для военныхъ врачей въ особенности.