

57  
147  
063 556

И. ЛЕОНТЬЕВ

СЕР.

1938 г.

## Биологическая идентификация протеинов I

1. оттиск из «Трудов» Агрохимической лаборатории Политехнического  
Музея, выпуск I-й, ст. , 1927 г.

31504

53/сб.

4 СЕНТЯ

11453  
-----  
1928

15.37

Прозорова 1909 г.

5.55  
3.55

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ  
ПРОТЕИНОВ I

И. ЛЕОНТЬЕВ

# Биологическая идентификация протеинов. I.

## Содержание:

- I. Введение и постановка проблемы.
- II. Метод биологической идентификации протеинов.
- III. Экспериментальная часть:
  - 1) Изготовление рафинированных протеиновых препаратов:
    - a) казеиновой кислоты,
    - b) фасолевого кислоты.
  - 2) Изготовление естественного растворителя.
  - 3) Получение обыкновенных протеиновых препаратов:
    - a) казеина,
    - b) фасолевого вытяжки.
  - 4) Опыты на животных.
- IV. Заключение и выводы.
- V. Литература.

## 1. ВВЕДЕНИЕ И ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ.

Протеины — класс веществ, который не только составляет органический базис животных и растительных тканей, но представляет основной ингредиент того субстрата, где вообще возможна игра, так называемых, «жизненных явлений».

Между тем химия этих протеиновых веществ до настоящего времени лишена принципов, позволяющих построить рациональную систематику этих тел и выработать методы для их распознавания и обособления.

Если спросить, какими средствами располагает биохимия в указанном смысле, то ответ будет недостаточно удовлетворительный, особенно с точки зрения современной дисперсологии. В самом деле, спрашивается, что имеет биохимик в руках в качестве аппарата, позволяющего вскрыть структуру протеинов?

Ответят, что протеиновые вещества могут быть предметом качественного и количественного анализов.

Но ведь качественные реакции, позволяя различать протеины среди других углеродных соединений, крайне элементарны, и эта группа реакций является скорее индикатором на продукты распада протеинов, чем аналитическими реакциями по существу.

Так, реакция с сульфатом меди в щелочной среде, разрушающей протеин, идет с одним из крайних продуктов распада—биуретом и не идет с протеинами, подвергшимися диазотированию. Тот факт, что биурет дает эту реакцию, указывает, что реакция эта не специально протеиновая. В действительности и оказалось, что многие другие вещества дают эту реакцию, напр., малон-амид ( $\text{NH}-\text{CO}-\text{CO}-\text{NH}$ ). Эту же реакцию дает и уробилин—красящее вещество желчи. Биуретовая реакция, следовательно, не есть реакция на определенную аминокислоту, но скорее зависит от физического состояния нестелуемого протеина. Цвет этой реакции, вероятно, обусловлен атомом меди. Как известно, некоторые соединения меди имеют синий цвет, другие же, подобно самому металлу или окиси меди, — красный. Возможно, что в синих соединениях атом меди находится в ионном состоянии, чем в красных формах, где валентные электроны обладают, возможно, иным колебательным периодом, изменяющим поглощение света. И так как это состояние атома может быть вызвано большим числом соединений, то ясно, что биуретовая проба не может быть специфической пробой для протеинов или для какого-либо определенного класса веществ. Раз цветовое изменение при биуретовой пробе зависит от изменения состояния атома меди, то можно было предвидеть, что другие металлы при соединении с аминогруппами также дадут подобную реакцию. Эксперимент это подтвердил. Пикеринг установил, что соли кобальта могут быть также использованы для биуретовой пробы и что в этих условиях реакция более чувствительна, чем при работе с медью.

Так называемая ксантопротеиновая реакция, реакции Миллона и Либермана возможны лишь при нагревании в сильно кислой среде, когда несомненно наступило разложение испытуемого препарата. Кроме того, реакцию Миллона дают фенол, салициловая кислота и некоторые другие вещества.

Реакция Молиша должна быть рассматриваема как реакция, указывающая на загрязнение протеинов углеводами, а реакцию Адамкевича-Голкинса современная биохимия считает реакцией на глиоксильную кислоту, которая может быть получена из не протеиновых тел.

Количественный анализ элементов углеродных соединений, как известно, осуществляется при помощи метода сжигания, но этот способ, не подвергавшийся со времени его введения в обиход химии, изменениям ни в смысле химического процесса, ни в смысле устройства более совершенного механизма для улавливания продуктов сжигания, имеет ряд существеннейших недостатков (15).

Эти недостатки обуславливают законный скептицизм к результатам анализов, полученных методом сжигания. Каждый биохимик знает, что даже классически точные исследования

допускают ошибку, против теоретического расчета из формулы на 0,2—0,5%. Ясно, что при этом может легко быть скрыто различие в гомологических углеводородах на группу  $\text{CH}_2$ , при содержании углерода в 50 атомов.

В протеиновых веществах, где количество атомов углерода насчитывается сотнями, за ошибкой метода могут быть скрыты большие, чем  $\text{CH}_2$ , группы. Кроме этого, надо помнить, что условия анализа протеиновых веществ усложняются появлением кислородных соединений S и P.

Существующие методы дифференциации протеиновых веществ еще более грубы и совсем не обоснованы химически. Способ многократной перекристаллизации в неорганической химии дает возможность, при качественных реакциях на ионы, добиться выделения тела и удаления посторонних, загрязняющих веществ. Точки кипения в органической химии позволяют обособить тело температурными границами перегонки. Полученные в этих условиях вещества имеют ряд физических и химических свойств, принадлежащих им одним, что в конечном счете дает возможность провести проверку чистоты изолированного и изучаемого вещества.

Для некристаллизующихся и неперегоняющихся протеиновых веществ предложен способ выделения, состоящий, как известно, в их осаждении из естественных растворов или аналогичных естественным. При этом считается, что осаждение (другими словами — высаливание) при помощи нейтральных солей (напр., сульфатов магния или аммония) является операцией, не денатурирующей протеины, так как при этом методе сохраняется обратимость процесса.

Но несомненное присутствие в протеинах карбоксильных и амидных групп заставляет ждать большего количества производных соединений, как с катионами, так и анионами. При одном и том же ядре различные компонирующие группы могут менять границы высаливания и, наконец, разная степень дисперсности, зависящая от условий концентрации дисперсной фазы в дисперсионной среде и условий процесса растворения, могут передвинуть величину концентрации высаливающихся веществ. Эти соображения подкрепляют ту мысль, что высаливание, и особенно фракционное высаливание, есть просто разделение физических фаз по величине агрегированных частиц, а не способ химической индивидуализации.

Для выяснения структуры протеинов в химии принят еще также метод анализа и количественного выхода продуктов гидролиза этих веществ. Но надо ли приводить доказательства, что ход гидролиза протеинов зависит от целого ряда неучитываемых факторов, как: концентрация гидролизующих (водородных или гидроксильных) ионов, температурные колебания, продолжительность и направление гидролиза, побочные реакции при нем и т. д.

Эти факторы при одном и том же исходном веществе могут дать различные результаты, и идентифицировать или дифференцировать протеины, по выходам продуктов гидролиза представляется столь же затруднительным, как судить по продуктам сухой перегонки о классе углеводородного соединения. Также совершенно ясно, что не меньшую роль при количественном анализе полученных продуктов гидролиза играет выбранный способ их определения (табл. 1):

Таблица 1.

ПРОТЕИН.	Содержание триптофана в % по методам:			
	Tillmans и Alt (1).	Furth, Nobel и Lieben.	Folin и Looney.	May и Rose.
Альбумин яйца . . . . .	1,24	2—2,6	1,23	1,10
Казеин коровьего молока . . . . .	1,60	2,02	1,54	1,50
Глиадин . . . . .	0,84	2,0	1,14	1,05

Подобных примеров, данных в таблице 1-й, можно привести относительно всех (2) аминокислот (табл. 2):

Таблица 2.

ПРОТЕИН.	Колич. аминокисл. в гр. на 100 гр. беззольн. влажного протеина.		
	Аргинин.	Гистидин.	Лизин.
Куриное яйцо—желток . . . . .	7,0	1,4	6,0
» » —белок . . . . .	6,9	0,1	7,4
» » —оболочка . . . . .	8,6	2,2	6,9
Овомукоид . . . . .	5,7	0	7,6
Куриное яйцо—желток . . . . .	7,5	1,9	4,8
» » —белок . . . . .	4,9	1,7	3,8
» » —оболочка . . . . .	—	—	—
Овомукоид . . . . .	—	—	—

Авторы этих (таблица 2) анализов — английские биохимики Plimmer и Rosedale—считают, что разногласия в результатах обязаны методу исследования.

Отсюда следует, что метод гидролиза, сопровождающийся рядом потерь (из-за неполного гидролиза, при эстерификации, при дистилляции эфиров и некоторых распадах при этом и т. д.), может рассматриваться, как метод, дающий только приближенные значения количества аминокислот в различных протеинах (4). В этом методе, по мнению датского биохимика Tjoen-segaard'a (5), химия имеет средство крайне одностороннего исследования.

Аминокислоты, получаемые при гидролизе протеинов кислотой, исключая глицина, оптически активны. Большинство из них лево-вращающие. Аминокислоты же, получаемые при щелочном гидролизе протеинов, по большей части неактивны. Эти аминокислоты, как правило (но не исключительно), состоят из равных количеств право- и лево-вращающих форм. Так как в протеинах, вероятно, встречается только одна оптически активная форма аминокислоты, как это можно заключить из поведения этих кислот при гидролизе кислотой, то можно думать, что образование другой оптической формы обязано действию щелочи.

Этот процесс, при котором из одного оптически активного изомера образуется другой—оптически противоположный, активный изомер, называется «рацемизацией». Название произошло от виноградной кислоты (по-французски—*acide racémique*) представляющей соединение равных количеств двух оптических антиподов винной кислоты.

Dakin (7) допускает, что оптические свойства аминокислот зависят от их положения в пептидных связях. По его взгляду, аминокислоты, карбоксильная группа которых свободна, и которые поэтому занимают концевое положение, неспособны к «рацемизации». А аминокислоты, карбоксильные группы которых не свободны, а соединены в пептидных связях, могут претерпевать «рацемизацию».

Оптическая активность или неактивность аминокислот «рацемизованного» протеина может поэтому дать некоторое указание на исходное положение этих кислот в протеиновой молекуле.

Отсюда некоторые биохимики (6) начали применять «рацемизацию» в качестве метода идентификации (соотв. дифференциации) протеинов (табл. 3).

Таблица 3

ИЗВАННЕ.	Рацемизированный «казеин» из молока.		Рацемизированные из молока коровы.	
	Коровы.	Овцы.	«Казеин».	«Казеоза».
Аланин . . . . .	Неактивный (и d?)	Неактивный (и d?)	Неактивный (и d?)	Неактивный (и d?).
Валин . . . . .	d и неактивный.	d и неактивный.	d и неактивный.	d и неактивный.
Лейцин . . . . .	l и неактивный.	l и неактивный.	l и неактивный.	l и неактивный.
Тирозин . . . . .	Неактивный.	l	Неактивный.	Неактивный.
Фенил-аланин . . . . .	»	Неактивный.	»	»
Пролин . . . . .	l	l	l	l
Аспарагин, к-та . . . . .	Неактивный.	Неактивный.	Неактивный.	Неактивный.
Глютамин, к-та . . . . .	»	Неактивный и d.	»	»
Аргинин . . . . .	»	Неактивный.	»	»
Гистидин . . . . .	»	»	»	»
Лизин . . . . .	»	d	»	»

Но так как «рацемизация» раскрывает только один вид структурной группировки (если она вообще его раскрывает), то ясно, что границы ее приложимости ограничены. Нужно помнить, что в протеиновой молекуле встречаются другие структурные особенности, которые «рацемизацией» не выявляются.

Еще большая контрoверсия в проблеме идентификации (соотв. дифференциации) протсннов существующими способами выявляется, стоит только сопоставить результаты анализов этими методами (табл. 4):

Таблица 4.

Название препарата.	Химическ. анализ	Биолог. анализ.	Фрагментация.	Л и т е р а т у р а.
Альбумин куриного яйца . . . . .	+	—	—	1. Dudley a. Woodmans Bioch. Jnl. 8, 541, 1914; <i>ibid.</i> 9, 97, 1915; <i>ibid.</i> 12, 339, 1918; —2. Dakin a. Dale, <i>ibid.</i> 13, 248, 1919; —3. Dale a. Hartley, <i>ibid.</i> 10, 408, 1916; 4. Dakin a. Dudley, Jnl. biol. Chem., 15, 263, 271, 1913; —5. Wells, Jnl. inf. Dis., 9, 147, 1911; —6. Dale a. Hartley, Bioch. Jnl. 10, 408, 1916; 7. Wells a. Osborne, Jnl inf. Dis., 29, 200, 1921. —8. Wells a. Osborne, <i>ibid.</i> , 19, 183, 1916; —9. Abderhalden u. Schittenhelm, Ztsch. f. phys. Chemic. 47, 458, 1906; —10. Hammarsten, <i>ibid.</i> , 7, 227, 1883, и 9, 273, 1885; —11. Tangl. Arch. ges. Physiol., 121, 534, 1908; 12. K. Goodner. Jnl. inf. dis., 37, 285, 1925
Альбумин утиногo яйца . . . . .	—	—	—	
Казеин из коровьегo молока . . . . .	—	—	—	
Казеин из овечьегo молока . . . . .	—	—	—	
Казеин из коровьегo молока . . . . .	—	—	+	
Казеоза из коровьегo молока . . . . .	—	—	—	
Эмглобулин из молока	—	—	—	
Псевдоглобул. ка	—	—	—	
Глобулин из молока	—	—	—	
Глобулин из сывoротки . . . . .	—	+	—	

Простое обозрение этой таблицы указывает, насколько неопределенны результаты усилий химиков в этом отношении.

Биохимия из вышеизложенных затруднений при идентификации соотв. дифференциации протеинов вышла путем наименьшего сопротивления. Возведя в догму существующие методы выделения и анализа протеинов, биохимия индивидуализировала протеины при первом намеке на несходство состава или несходство свойств. В силу этого создались длиннейшие списки, насчитывающие многие сотни наименований протеинов растительного и животного происхождения (9). Эта картина едва ли отвечает действительному положению вещей.

9) См. главу II, стр. 45.

+) Знак + отвечает совпадению анализов; знак — отвечает совпадению анализов у одних авторов и различию у других; знак — отвечает различию, и знак ? отвечает отсутствию анализов.

Что касается классификации протеинов, то, как известно, основным признаком этой классификации взята растворимость, чем вся проблема поставлена на ложный путь. Растворимость, показывающая лишь физическое соотношение дисперсной фазы с дисперсионной средой, ни в коем случае не может быть критерием для определения различия или сходства в химическом составе. Современные классификационные системы протеинов (9) формальны и поверхностны. Они говорят не больше, чем простое констатирование существования химических элементов вообще и их соединений. Концепция разделения протеинов на «растворимые», как показал теоретически и экспериментально Перов (11), в высшей степени условна.

Ревизия представлений биохимии в этом отделе более чем необходима, и действительно за последнее время определенно выявилась тенденция оставить, напр., понятия «глобулин» и «альбумин», а говорить о «полунасыщенной и вполне насыщенной сернокислым аммонием фракциях» одного белкового тела (12). Эта тенденция выявляется не только в специальных исследованиях (13), но уже проникла на страницы школьных руководств (14).

Так Arndt и Hafner считают, что Globulin und Albumin sind... konventionell... festgelegte Begriffe<sup>1)</sup>, и «Wir definieren und identifizieren Albumine und Globuline durch ihre Aussalzbarkeit. Diese Sackgasse hat immer wieder zu Unklarheiten und unzutreffenden Interpretationen (12) geführt»<sup>2)</sup>.

Американский биохимик Hawk (14) высказывает свои суждения еще категоричнее: «The precipitation limits with ammonium sulphate should not be made a basis for distinguishing the albumins from the globulins»<sup>3)</sup>. И далее: «The characterization of a globulin, as a protein which is precipitated by half saturation with ammonium sulphate can no longer hold. Certain vegetable globulins have been isolated which are not precipitated by this salt until a concentration is reached greater than that secured by half-saturation. As an example of an albumin which does not conform to the definition of an albumin as regards its precipitation by ammonium sulphate may be mentioned the leucosin of the wheat germ, which is precipitated from its solution upon half-saturation with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . The limits of precipitation by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , therefore, do not furnish a sufficiently accurate basis for the differentiation of-globulins from albumins» (14)<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> Глобулин и альбумин — условно установленные понятия.

<sup>2)</sup> Мы определяем и идентифицируем альбумины и глобулины по степени их высаливаемости. Этот тупик постоянно приводит к неясностям и неправильным толкованиям.

<sup>3)</sup> Границы осаждения сернокислым аммонием не могут быть взяты в качестве меры для различия альбуминов от глобулинов.

<sup>4)</sup> Характеристика глобулина, как протеина, осаждающегося при полунасыщении сернокислым аммонием, не может дольше поддерживаться. Некоторые глобулины, изолированные из растений, не осаждались

Эта тенденция получает свое теоретическое и экспериментальное обоснование в работах Перова, доказавшего не только тождество протеинов молока (14), но и явления тождества протеинов различного происхождения (15). Тождество протеинов молока (казеина и параказеина) подтверждает также Инихов, работавший формольным методом (17).

В дополнение к этому необходимо сказать, что Ракузин защищает идентичность легумина стручковых и амандина миндаля (18), и вместе с этим же установлено, что легумин стручковых является полным аналогом казеина (19).

Отсюда вытекала необходимость попытки биологически идентифицировать, получаемые Перовым (15), препараты протеинов, так как старая и новая литература полна указаний на то, что биологически можно, например, в курином яйце обнаружить пять различных протеинов, и что это соответствует пяти химически различным протеинам, выделенным из яиц (18).

## II. МЕТОД БИОЛОГИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРОТЕИНОВ.

Биологический метод, позволяющий идентифицировать и соответственно дифференцировать протеины, состоит в получении так наз. анафилактического шока (19) у какого-либо экспериментального животного. Обычно классическим объектом в этих работах является морская свинка определенного веса (не  $< 200$  и не  $> 350$  гр.).

Анафилаксия принадлежит, согласно школьной традиции, к так наз. иммунным реакциям и обладает, по мнению большинства иммунологов и многих биохимиков, строгой специфичностью. Так, например, животные, анафилактизированные «альбумином», делают «чувствительными» только к «альбумину», но вовсе не к «глобулину» и наоборот (20). Таких примеров в биохимической и иммунологической литературе можно найти бесконечно много. Технически (21, 22) этот метод сводится к тому, что у опытного животного путем однократного парэнтерального введения, т.е. не через пищеварительный тракт, инородного (гетерологического) протеина в минимальной дозе (0,10—0,25 ксм. раствора) вызывается так наз. «сверхчувствительность» к реинъекции — к повторному включению через определенный, инкубационный, преанафилактический, латентный период (10—12 день) интраперитонеально (соотв.

этой солью до тех пор, пока ее концентрация ясно не превышала полунасыщения. Как пример альбумина, не подтверждающего определения альбумина на основании его осаждения сульфатом аммония, можно указать на лейкозин пшеницы, который осаждается из своих растворов при полунасыщении  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; поэтому границы осаждения  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  не представляют достаточно точного способа для обособления глобулинов от альбуминов.

интравенно или интракардиально) значительно больших (5 ксм.) доз того же препарата. Совершенно ясно, что тот или иной взятый инородный протеин должен быть совершенно безвредным для данного животного, а должен делать его только лишь, как говорят, «сверхчувствительным», иными словами сенсibiliзировать, точнее анафилактизировать его против этого протеина.

В случае идентичности препарата, у животного возникает ряд определенных патологических процессов (сильное возбуждение, тяжелая одышка, периферические спазмы на брюшных мышцах, цианоз) и смерть в среднем через два часа после реинъекции.

Реинъекция больших доз протеина другого происхождения этих процессов и смерти не дает. Этот метод, по указаниям огромного ряда иммунологов и биохимиков, позволяет различать вещества, которые, всеми известными методами химического анализа, кажутся тождественными.

При этом надо отметить, что аминокислоты, чистые альбумозы и так наз. протамины не вызывают анафилаксии. В опытах Friedberger'a и Joachimoglu (25) гетеро- и протоальбумозы не вызывали сенсibiliзированного состояния у экспериментального животного при однократном введении 0,001 гр. на кило веса объекта.

Синтетические полипептиды (26) также оказались негодными для сенсibiliзации. Такой же отрицательный результат получен и для так наз. «пластеинов» (27). Не вызывают анафилактического шока и «рацемизированные» протеины (28).

Некоторые авторы указывали, что им удалось вызвать анафилаксию с непротеиновыми веществами, как липоиды, но ряд исследователей показал, что чистые липоиды анафилаксии не дают, а получаемый эффект их предшественниками необходимо отнести на счет загрязнения липоидов протеинами (29, 30, 31).

### III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

Экспериментальная часть работы выразилась:

- 1) в получении рафинированных (по Перову) препаратов протеинов и
- 2) в опытах над животными.

#### а) Получение казеиновой кислоты.

Естественным субстратом для получения казеиновой кислоты является коровье молоко. В нем «казеин» присутствует в виде дисперсного раствора—отчасти кальциевых солей, отчасти казеиновой кислоты.

В виду физиологического и морфологического разнообразия отделяющих клеток молочных желез, раствор «казеина» в молоке полидисперсионен. На это указывает центрофугирование обраты (обезжиренное—сепарированное молоко), дающего зональное распределение «казеина».

Способ получения «казеиновой кислоты» сводится к сгусткообразованию «казеина» уксусной кислотой (5% к объему молока 10%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Предварительно молоко разводится дистиллированной водой вдвое или втрое. Полученные сгустки «казеина» отмываются на фильтрате от кислоты и растворяются 0,25% раствором карбоната натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ). Мутные растворы фильтруются через бумажные фильтры и вновь осаждаются уксусной кислотой той же концентрации. Растворение в карбонате натрия и кислотное осаждение повторяются. Препарат, отмытый водой от кислоты, протирается сквозь металлическое сито с ячейками в 0,25 мм. Протертый осадок дегидратируется этиловым алкоголем, при этом осадок в форме спиртовой кашицы вновь протирается сквозь сито, отмывается от алкоголя и обезжиривается эфиром и высушивается в термостате при температуре 45° С.

Растворение в карбонате натрия необходимо вести только в указанной концентрации во избежание частичного распада «казеина». Протирание кашицы сквозь сито необходимо для уменьшения внутренних казеиновых агрегатов.

Препарат, добытый указанным методом, быстро растворяется в так наз. «естественном растворителе». Для растворения же его в салицилово-кислом натре необходимо легкое нагревание.

Наиболее высоко измельченный «казеин» получается путем пересаживания из 5% раствора салицилово-кислого натра. Промытый до полной сухости спиртом и эфиром, такой казеин уже легко растворяется на холоду в  $\text{C}_6\text{H}_5\text{ONCOONa}$ .

Основная задача при таком получении препарата «казеина» состоит в получении его в наименьшей величине внутренних агрегатов, так как скорость растворения увеличивается по мере уменьшения последних. Перерастворители, в роде салицилово-кислого натра, играют роль молекулярных сит. «Казеин» в чистом, беззольном препарате является веществом с ясно кислотными функциями. Индикатором для его карбоксильных групп служит фенол-фталеин, как более слабая кислота. На этом основании для этого препарата Перовым предложен термин «казеиновая кислота» (32).

Казеиновая кислота не растворима в воде, этиловом алкоголе, в 10% хлориде натрия, но растворима в естественном растворителе (см. ниже глава III, разд. 2, стр. 50), 5—10% салицилово-кислом натрии и щелочах (33).

Растворимость «казеина» в щелочах, где «казеин» в известной мере насыщает щелочь, дал ряду биохимиков возможность вывести степень титруемости «казеина» щелочью на 1 грамм.

Число титрования препарата настоящего исследования, при многих повторных определениях, равнялось в среднем 8,2 ксм. на 1 грамм казеин. кислоты.

При титровании  $n/10$  NaOH удается открыть 0,003 гр. казеин. кислоты. Точность до 0,01% можно довести, прибегнув к

увеличению навесок или уменьшив титр щелочи (n/50 NaOH). Число титрования 8,2—в высшей степени важная величина. На основании ее Перов вывел эквивалентный вес казеина, равный 1220. Полученная цифра находится в хорошем согласии с цифрами 1124 Long'a (34), 1131,5 Matthaipoulos'a (35), 1135 Laqueur'a и Sackur'a (36) и, наконец, 1111 Van Slyke'a (37).

б) Изготовление фасоловой кислоты.

Сырье—в форме семян фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.)—подвергалось очистке от кожицы с предварительным (24 часа) настаиванием в дистиллированной воде. Таким образом обработанное сырье заливалось 2—3%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  в таком объеме, чтобы кислота могла разложить протеннаты кальция, рассчитанные на весь вес взятых семян, и, кроме того, имелся бы некоторый избыток кислоты.

Семена, залитые кислотой, стоят 48 часов при комнатной температуре, при чем производится перемешивание через каждые 3—4 часа (или еще лучше повторно меняют кислоту). Этого достаточно для реакции кислото-действия. После такой операции семена принимают рассычатое, мягкое строение. Кислая реакция семян даже после продолжительного промывания дистиллированной водой совершенно ясна на лакмус.

Перед тем, как перенести семена в мясорубку для дальнейшего раздробления, семена промываются дистиллированной водой до полного исчезновения их кислой реакции. Двойное или тройное пропускание материала через мясорубку дает удовлетворительное раздробление. Большее размельчение излишне, так как вызывает сильное набухание клетчатки и крахмала при последующей обработке, эмульгирует жиры и тем затрудняет получение «фасоловой кислоты» в дальнейшем. Понятно, что такое крупное раздробление не дает хорошего выхода.

На цело протени можно извлечь, само собой разумеется, лишь при сильном раздроблении. Цель в данном процессе представляет быстрый способ получения препарата, а не полный.

Раздробленные в мясорубке семена затем переносятся в толстостенные стеклянные банки и заливаются раствором щелочи. При этом приблизительно рассчитывается количество протенина во взятой массе семян, к которой доливается дистиллированная вода в таком количестве, чтобы объем воды над семенами был равен объему воды с семенами. Далее смесь взбалтывается, и в ней устанавливается щелочная реакция приливанием n/2 раствора щелочи.

Семена со щелочью оставляются при лабораторной температуре на 24 часа и перемешиваются через каждые 3—4 часа. Если в этот период времени реакция раствора над семенами становится слабо щелочной или кислой, то необходимо добавить к первоначальному объему раствора до 25% щелочи.

Через 48 часов предварительное извлечение препарата считается законченным. Общий объем семян после этого стояния

увеличивается, клетчатка разбухает, крахмал семян делается слизистым. Декантацией отстаившегося раствора удаляют верхний, более прозрачный, слой. Полученную жидкость фильтруют через кисею для удаления грубых частиц и осаждают избытком уксусной кислоты, приливая ее 10% раствор с таким расчетом, чтобы она вытеснила всю взятую щелочь и дала бы перевес к ней, но не больший, чем 10—20%.

В результате этой операции фасоловая кислота осаждается в виде объемистых хлопьев. Последним дают осесть, а жидкость над осадком декантируют. Сам осадок 2—3 раза промывается дистиллированной водой, удаляемой также декантированием. Вымытый осадок снова растворяют в щелочи и так, чтобы весь протенин перешел в протеинат. Полученный раствор фильтруют через обыкновенный бумажный фильтр. Фильтрация протеината идет крайне медленно, так как она должна вестись без применения давления. Применение сосалок настолько засоряет фильтр, что он перестает действовать, и большое количество протеината остается на фильтре. Свободная же фильтрация обуславливает полноту процесса, но и при ней иногда приходится сменять фильтрующую поверхность. Профильтрованный раствор протеината разбавляется соответственным образом щелочью и осаждается 10% раствором уксусной кислоты, учитывая усреднение и избыток кислоты в 20%. Фасоловая кислота в этом случае осаждается в форме объемистого коагулята, при чем она может иметь едва заметный желтый цвет.

Осажденная кислота переносится на фильтр, промывается дистиллированной водой до полного исчезновения кислой реакции на лакмус. Наконец, осадок промывают чистым этиловым алкоголем, сначала 50%-м, а потом 96%-м. Алкоголь приливается до тех пор, пока он не вытеснит всю воду из коагулята, заменив ее собой. Идеальным при такой операции является заливание абсолютным этиловым алкоголем. После спирта фасоловая кислота промывается эфиром для удаления жирон и этилового алкоголя. Затем многократной сменой (5—6) эфира и растиранием фасоловой кислоты с эфиром, свободным от спирта и воды, в ступке, получится препарат в виде сухого, мелкого порошка. Этот порошок после окончательной обработки настолько тонок, что в тщательно вымытой пробирке пристаёт к ее стенке, как бы «смачивает» ее.

Высушивание фасоловой кислоты ведется в ступке при постоянном растирании и размешивании. Окончательная просушка производится в сушильном шкафу при температуре не более 45° С.

Чистота полученного препарата контролируется основным признаком — растворимостью (лучше без нагревания) в естественном растворителе и, кроме того, титрованием n/10 раствором едкого натрия с фенолфталеином. Среднее число титрования должно быть обязательно равно 8,2.

В итоге описания способа получения фасоловой кислоты надо подчеркнуть, что только тщательное выполнение всех моментов изложенного способа гарантирует выход однозначных препаратов.

Полученный таким путем препарат фасоловой кислоты не растворим в дистиллированной воде, этиловом спирте, в 10% растворе хлористого натрия, но растворим в естественном растворителе, в 5—10% растворе салицилово-кислого натрия и щелочах.

## 2. Изготовление естественного растворителя.

Проблема создания условий, при которых так наз. «казеин» мог быть переведен в раствор, исходя из естественной солевой среды, поставлена Soldner'ом (38). Он дает такой состав:

- 1) Окиси кальция . . . . . CaO — 1,98 гр.
- 2) Окиси калия . . . . . KO — 1,72 гр.
- 3) Окиси магния . . . . . MgO — 0,20 гр.
- 4) Окиси натрия . . . . . NaO — 0,51 гр.
- 5) Хлора . . . . . Cl — 0,98 гр.
- 6) Фосфорной кислоты . . . . . P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> — 1,82 гр.
- 7) Воды . . . . . H<sub>2</sub>O — 1000 к. см.

Оставляя в стороне Mg и Ca, как элементы, для которых в присутствии P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> необходимо решать такую же задачу (39), как и для «казеина» (т.-е. условия их растворения), берутся в расчет только оставшиеся соли, при чем Na<sub>2</sub>O переводится в хлориды. Хлорида натрия тогда получается 0,96 граммов. К переводится на оставшийся Cl, тогда хлорида калия получается 0,84 грамма. Остаточный калий переводится в фосфорно-кислую соль. В виду того, что солевая среда должна быть нейтральна, так как только при этом условии исключается действие щелочности или кислотности на растворение «казеина», то при переводе K в фосфат калия получается около пяти граммов K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O.

Отсюда нейтральный растворитель для казеиновой кислоты (соотв. и для других подобных кислот) будет иметь такую пропись в круглых цифрах:

NaCl . . . . .	1 грамм.
KCl . . . . .	1 »
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O . . . . .	5 »
H <sub>2</sub> O . . . . .	1000 к. см.

В этой солевой среде, так называемом естественном растворителе, казеиновая и фасоловая кислоты с легкостью растворяются при комнатной температуре, давая коллоидальный раствор. Реакция самого растворителя (по фенолфталеину) нейтральна.

После растворения в нем казеиновой или фасоловой кислоты он делается кислым. Число кубических сантиметров n/10 едкого натрия, идущих на нейтрализацию 1 грамма казеиновой, соотв. фасоловой кислоты, как уже было сказано, должно равняться 8,2.

Основное условие растворения в этом естественном растворителе состоит в том, что препараты должны быть в виде сухого порошка с полным вытеснением желеобразующей воды или же должны быть свежеприготовленными (только что осажденными), из которых вода вытеснена этиловым алкоголем. Растворение совершается в зависимости от степени сухости препарата. Например, 3—5%-ные растворы казеиновой кислоты получаются при лабораторной температуре в течение 10 час.

Теоретические соображения при конструировании естественного растворителя были следующими (39): хлориды в естественном растворителе не являются главенствующими, но лишь сопутствующими веществами для растворения. Они необходимы для понижения гидролиза главной растворяющей соли, какой является фосфат калия, а в этой соли характерно присутствие  $\text{OH}^-$ , не влияющего на фенолфталеин.

### 3. Получение обыкновенных протеиновых препаратов.

#### а. Казеина.

В качестве обыкновенного протеинового препарата был взят продажный казеин (иногда фирмы Merck'a). Его раствор изготовлялся таким путем: навеска в 0,12 грамма смачивалась дистиллированной водой, затем к ней приливался 1 см. 1/10 раствора едкого натрия (из металлического натрия). После растворения казеина, чаще всего при нагревании на водяной бане при  $40\text{--}50^\circ\text{C}$ ., раствор казеина сливался в стерильную мерную колбу в 50 см. и доливался стерильной дистиллированной водой до черты. Полученный, почти прозрачный, раствор при нагревании на водяной бане в течение 40 мин. при  $80^\circ\text{C}$ . приобретал заметное помутнение, которое при охлаждении до  $20^\circ\text{C}$ . исчезало, оставляя едва заметную опалесценцию, наблюдаемую перед нагреванием. Так как растворение казеина в щелочи велось в асептических условиях, то раствор казеина инъецировался без стерилизации.

Сенсибилизирующая доза этого препарата всегда была 0,2 см., а доза реинъекции равнялась 5 см.

#### б. Фасолевой вытяжки.

Покупные семена фасоли смачивались стерилизованной дистиллированной водой в химическом стаканчике до момента свободного отделения намокшей кожицы. Семенодоли, освобожденные от зародыша, высушивались в сушильном шкафу при  $t\text{-ре } 60^\circ\text{C}$ . Высушенные семенодоли растирались стерильным пестиком в стерильной фарфоровой ступке до пылеобразного состояния.

10 граммов полученного порошка взбалтывались в 100 к. см. 0,95% стерильного раствора хлористого натрия в стерильной колбочке из иенского стекла на шаталке 30 мин., а затем настаивались в той же колбочке при  $t\text{-ре } 5\text{--}8^\circ\text{C}$ . 24 часа.

Полученный настой декантировался в стерильные центрифужные пробирки и центрифугировался 15 мин. при 3000 оборотах в одну минуту.

Вытяжка из этих пробирок непосредственно поступала в инъецирующий прибор. Дозы первой инъекции и реинъекции были те же, что и при продажном казеине. Так как весь процесс получения фасоловой вытяжки велся в асептических условиях, то она вводилась в морскую свинку без стерилизации. 5 ксм. фасоловой вытяжки перед инъекцией содержало в среднем 0,055 грамма растворенных веществ.

#### 4. Опыты на животных.

В данной работе опыты были проведены с морскими свинками различного происхождения, получающими корм (овес плюс свекла плюс сено или овес плюс морковь плюс сено) *ad libitum*.

Испытуемыми препаратами были:

1. Казеиновая кислота.
2. Фасолевая кислота.
3. Продажный «казеин».
4. Фасолевая вытяжка.

Опыты ставились по такой схеме:

	2 доза.	Казеин.	Фасол.
1 доза.		к-та.	к-та.
Казеиновая кислота	1	к + к	2 к + ф
Фасолевая кислота	3	ф + к	4 ф + ф

При чем в одну серию бралось 4 соотв. 8 соотв. 16 свинок. Эта же схема применялась при опытах с продажным казеином и фасоловой вытяжкой.

Сенсибилизирующая доза [субкутанно — брюшко свинки, закрепленной на операционном столике Roth'a (39)] представляла 0,1—0,2—0,4 ксм. 0,1—0,2 3% раствора соответственной кислоты в естественном растворителе. Раствор стерилизовался нагреванием в течение 40 мин. на водяной бане при 80° С. три дня подряд перед опытом. Растворение кислот и стерилизация их растворов велись в колбах или соответственных ампулах из иенского стекла.

Реинъекция в объеме 5 ксм. интраперитонеально выполнялась через 14 дней соответствующим препаратом той же

концентрации и стерилизованным в тех же условиях, что и исходные дозы. Инъекция растворов препаратов производилась 1 см. соотв. 10 см. шприцами Рекорда, стерилизованными кипячением в дистиллированной воде в течение 10 мин. Иногда препараты инъецировались стерильными градуированными пипетками из иенского стекла.

Число морских свинок, использованных в экспериментах, равняется 96 (соответствующие контрольные животные не подсчитывались), из них 72 относятся к опытам с рафинированными препаратами, а остальные 24—к продажному казеину и фасоловой вытяжке.

Общие результаты этих серий опытов сводятся к тому, что классических—резко выраженных явлений анафилаксии, а главное смерти у морских свинок в изложенных условиях опытов с растворами фасоловой и казеиновой кислоты получить не удается (см. протоколы).

### Протоколы по опытам с казеиновой кислотой.

#### Свинка М (самка).

Время.	Вес в гр.	Т-ра по С°.
12 июня 1926 г.	247	39,0
14 » »	253	38,6
15 » »	259	38,9
16 » »	269	39,0
17 » »	269	38,4
18 » »	273	39,2
18 » »	15 час. инъекция 0,2 см. 0,1% раствора казеин. к-ты. Перед инъекцией т-ра раствора к-ты 37° С.	
19 » »	275	39,2
22 » »	274	39,2
23 » »	279	39,1
25 » »	273	39,1
28 » »	287	39,1
29 » »	300	39,2
1 июля »	313	39,2
2 » »	307	39,2
2 » »	12 ч. 35 м. реинъекция 5 см. в брюшину шприцем свеже-изготовленного и простерилизованного раствора каз. к-ты той же концентрации.	
	12 ч. 45 м. морская свинка спокойно сидит в большом кристаллизаторе.	
	13 ч. — м. спокойно сидит.	
	13 » 30 » то же.	
	14 » 10 » »	
	14 » 30 » легла, встала, сидит.	
	15 » 05 » легла на бок, встала.	
	15 » 30 » сидит.	
	16 » — » сидит спокойно.	
	17 » — » »	
	17 » 30 » »	
	18 » - » »	
3 » »	перенесена в клетку.	
	10 » — » утра. Поведение свинки—неотличимое от вполне здоровых, не бывших в опыте.	
24 августа 1926 г.	Вес - 495 гр.	

**Свинка А (черная, самец).**

Время.		Вес в гр.	Т-ра.
6 июля	1926 г.	264	38,9
8 »	»	245	39,3
10 »	»	252	39,3
10 »	»	Инъекция под кожу брюшка 0,2 ксм. 0,1% раствора казеин. к-ты. Перед инъекцией раствор к-ты подогреет до 37° С.	
12 »	»	262	39,3
14 »	»	243	39,0
16 »	»	274	39,2
20 »	»	286	39,4
22 »	»	319	39,0
24 »	»	297	39,1
24 »	»	15 ч. 40 м. реинъекция 5 ксм. 0,1% раств. казеиновой к-ты в брюшину шприцем (натошак).	
		16 ч. 01 м. испражнение (твердыми массами).	
		16 » 07 » новое испражнение. сидит покойно.	
		16 » 10 » сидит покойно.	
		16 » 15 » переминается задними лапами.	
		16 » 20 » сидит покойно.	
		16 » 30 » то же.	
		16 » 48 » чуть вздрагивает.	
		17 » 08 » сидит покойно. обычный бодрый вид.	
		17 » 15 » т-ра 38,7° С.	
		17 » 28 » дана пища (свежий огурец), не ест.	
		17 » 30 » обнюхала огурец и начала его есть.	
		18 » 35 » поела огурец, сидит покойно.	
		19 » — » сидит покойно. перенесена в клетку.	
25 июля	»	14 » — » поведение — неотличимое от свинок, не бывших в опыте.	
24 августа	»	Вес—410 граммов.	

**Свинка Р (самка).**

Время.		Вес в гр.	Т-ра.
5 октября	1926 г.	265	38,9
»	»	287	38,8
9 »	»	292	39,2
10 »	»	291	38,9
10 »	»	10 час. инъекция под кожу брюшка 0,4 к. см. 0,2% раств. казеин. к-ты (натошак).	
12 »	»	308	39,1
14 »	»	306	39,3
16 »	»	310	39,3
18 »	»	313	39,2
20 »	»	325	39,3
22 »	»	320	39,2
24 »	»	310	39,2
24 »	»	12 час. реинъекция 5 ксм. шприцем 0,2% раств. казеин к-ты в брюшину.	
		12 час. 15 мин. сидит покойно.	
		12 » 30 » » »	
		13 » — » » »	
		13 » 15 » жидкие испражнения.	
		14 » 30 » сидит покойно.	
		15 » — » сидит покойно, перенесена в клетку.	
25 »	»	10 час. утра жина, поведение, как перед реинъекцией.	
3 ноября	»	Вес—319 гр.	

**Свинка И (рыжая)**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
30 ноября 1926 г.	177	38,6
2 декабря »	183	38,5
5 » »	185	38,4
7 » »	192	38,1
8 » »	инъекция под кожу брюшка 0,1 ксм. 0,2% раств. казеин. к-ты шприцем.	
11 » »	218	39,1
14 » »	221	39,0
18 » »	227	38,9
22 » »	224	38,8
24 » »	222	38,7
24 » »	12 час. 26 мин. реинъекция в брюшину шприцем 5 ксм. казеин. к-ты.	
	12 час. 37 мин. сидит покойно.	
	13 » 15 » тоже.	
	13 » 25 » тоже.	
	14 » 15 » тоже.	
	16 » — » поведение не изменилось.	
	19 » 15 » тоже, перенос в клетку, жива, состояние нормальное.	
26 » »		
14 января 1927 г.	Вес — 280 гр., т-ра — 39,0° С.	

**Протоколы по опытам с фасолево й кислотой.**

**Свинка Н (коричневая, самка).**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
12 июня 1926 г.	290	39,0
14 » »	285	38,6
15 » »	290	38,6
16 » »	315	39,1
17 » »	328	38,7
18 » »	336	38,7
18 » »	15 ч. 30 м. инъекция под кожу брюшка 0,2 к см. 0,1% раств. фасолево й к-ты. Перед инъекцией раствор нагрет до 37° С.	
19 » »	336	39,2
22 » »	358	39,1
23 » »	358	39,0
25 » »	368	38,7
28 » »	377	39,0
29 » »	403	38,9
1 июля »	425	39,0
2 » »	410	39,2
2 » »	13 ч. 10 м реинъекция 0,1% раств. фасолево й к-ты в брюшину 5 ксм.	
	13 » 30 » сидит покойно в большом кристаллизаторе.	
	14 ч. 10 м тоже.	
	14 » 30 » тоже.	
	15 » — » взъерошилась.	
	16 » — » сидит покойно.	
	17 » — » поведение без изменений.	
	18 » — » тоже, перенесена в клетку.	
3 » »	10 час. утра жива, поведение, как у нормальных свинок.	
24 августа »	Вес — 525 гр.	

**Свинка А<sub>1</sub> (коричневая, самец).**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
30 ноября 1926 г.	125	37,8
2 декабря »	127	38,2
5 » »	132	38,5
7 » »	141	38,3
8 » »	Инъекция под кожу брюшка 0,1 см. 0,1% раств. казеин. к-ты шприцем (патошак).	
11 » »	172	38,8
14 » »	180	39,0
18 » »	190	38,8
22 » »	200	38,7
24 » »	205	39,0
24 » »	12 ч. 40 м. реинъекция 5 к. см. в брюшину шприцем такого же раствора. При съемке с операционного стола—легкая дрожь.	
	12 ч. 55 м. испражнения (твердые), моча.	
	13 » 15 » сидит покойно.	
	13 » 30 » тоже.	
	14 » 15 » тоже.	
	14 » 30 » сидит покойно.	
	15 » 10 » тоже.	
	16 » — » тоже.	
	19 » 15 » состояние без перемен. перенесена в клетку.	
26 » »	жива, состояние нормальное.	
14 января 1927 г.	Вес—250 гр. т-ра—39,2° С.	

**Свинка С (серая, самец).**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
5 октября 1926 г.	270	39,2
7 » »	303	38,6
9 » »	302	39,1
10 » »	302	38,1
10 » »	Инъекция под кожу брюшка 0,4 см. 0,2% раств. фасолев. к-ты.	
12 » »	321	39,0
14 » »	331	39,3
16 » »	335	39,3
18 » »	340	39,3
20 » »	346	39,3
22 » »	340	39,3
24 » »	320	39,4
24 » »	12 ч. 15 м. реинъекция 5 см. в брюшину 0,2% раств. фасол. к-ты, тотчас после снятия со столика дефекация (жидкие экскременты).	
	12 ч. 55 м. усиленно грызет край стеклянного кристаллизатора.	
	13 ч. — м. успокоилась и сидит.	
	13 » 30 » сидит покойно.	
	14 » — » » »	
	14 » 30 » » »	
	15 » — » » »	
	16 » — » » »	
	17 » — » поведение не изменилось, перенесена в клетку.	
25 » »	жива, состояние нормальное.	
2 ноября »	Вес 335 граммов.	

**Свинка Ч (с белыми и коричневыми пятнами, самка).**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
30 ноября 1926 г.	154	38,3
2 декабря »	170	38,4
5 » »	187	38,6
7 » »	190	38,3
8 » »	Инъекция под кожу брюшка 0,1 ксм. 0,2% раств. фасолев. к-ты.	
11 » »	220	38,6
14 » »	221	38,8
18 » »	220	38,6
22 » »	224	38,8
24 » »	212	38,7
24 » »	16 ч. 20 м. инъекция 5 ксм. раствора фасолев. к-ты той же концентрации в брюшину.	
	16 ч. 30 м. сидит покойно.	
	16 » 40 »	» »
	17 » — »	» »
	17 » 20 »	» »
	18 » — »	» »
	19 » — »	» »
	20 » — »	» »
	21 » — »	поведение не изменилось, перенос в клетку
26 » »	жива, состояние нормальное.	
14 января 1927 г.	Вес—250 гр., т-ра— 38,8° С.	

**Свинка А<sub>2</sub> (рыжая, самец).**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
30 ноября 1926 г.	167	38,2
2 декабря »	163	38,0
5 » »	156	38,2
7 » »	151	38,2
8 » »	Инъекция 0,1 к. см. 0,2% раствора фасол. к-ты под кожу брюшка.	
11 » »	205	38,8
22 » »	240	35,5
24 » »	230	38,6
24 » »	16 ч. 30 м. реинъекция в брюшину 5 к. см. фасолевой кислоты прежней концентрации.	
	16 ч. 35 м. сидит покойно.	
	16 » 40 »	тоже.
	17 » — »	сидит покойно.
	17 » 30 »	тоже.
	18 » — »	сидит покойно.
	18 » 20 »	тоже.
	19 » — »	»
	20 » — »	»
	21 » — »	поведение не изменилось, перенос в клетку.
26 » »	жива, поведение ничем не отличается от нормального.	
14 января 1927 г.	Вес—285 гр., т-ра—38,6° С.	

Анафилактические симптомы, которые легко подмечаются в прямых опытах с казеиновой и фасолевой кислотой, еще легче наблюдать в опытах с разноименными препаратами, т.-е. при К плюс Ф, или Ф плюс К (см. схему, стр. 52, и следующие протоколы).

Протоколы по перекрестным опытам.

Свинка С<sub>1</sub> (самка).

Время	Вес в гр.	Т-ра.
12 июня 1926 г.	227	38,8
14 » »	233	38,4
15 » »	243	38,0
16 » »	248	38,3
17 » »	241	38,5
18 » »	245	38,5
	15 ч. — м. инъекция под кожу брюшка 0,2 к. см. 0,1% казеин. к-ты. Перед инъекцией раствор нагрет до 37° С.	
19 » »	255	39,2
22 » »	255	39,1
23 » »	258	39,1
25 » »	260	38,6
27 » »	277	39,2
29 » »	288	39,2
1 июля » »	297	39,1
2 » »	29	39,2
2 » »	13 ч. — м. реинъекция 5 ксм. 0,1% раств. фасол. к-ты в брюшину.	
	13 ч. 05 м. сидит покойно в кристаллизаторе.	
	13 » 10 » тоже.	
	13 » 30 » »	
	14 » 10 » »	
	14 » 30 » »	
	14 » 48 » дефекация.	
	15 » — » сидит покойно.	
	16 » — » все время сидела покойно.	
	16 » 45 » мочеотделение	
	17 » — » сидит покойно.	
	18 » — » состояние без перемен, перенесена в клетку.	
3 » »	Жива, состояние нормальное.	
24 августа »	Вес—445 граммов.	

Свинка С (трехцветная, белые уши, самка).

Время	Вес в гр.	Т-ра.
6 июля 1926 г.	315	38,5
8 » »	302	38,9
10 » »	310	39,2
10 » »	Инъекция под кожу 0,2 к. см 0,1% раств. казеин. к-ты; перед инъекцией раствор подогрет до 37° С.	
12 » »	318	39,2
14 » »	285	38,7
16 » »	311	39,1
20 » »	333	39,1
22 » »	346	39,2
24 » »	347	39,0
24 » »	16 ч. 15 м. реинъекция (натощак) фасолев. к-ты той же концентрации 5 ксм. в брюшину.	
	16 ч. 20 м. учащенное дыхание. сидит распластанно.	
	16 ч. 30 м. приняла обычную позу и сидит.	
	16 » 35 » сидит покойно.	
	16 » 47 » легкая дрожь.	
	17 » 08 » сидит покойно, бодрый вид.	

17 » 10 » участилось дыхание.  
 17 » 20 » т-ра 38,7° С.  
 17 » 28 » дана пища (свежий огурец), не ест.  
 17 » 30 » чешет лапами мордочку.  
 17 » 35 » попытка к ходьбе, неясно-выраженный парез задних конечностей.  
 17 ч. 55 м. дефекация.  
 18 » — » сидит покойно.  
 18 » 30 » тоже, бодрый вид  
 19 » — » состояние не изменилось, перенесена в клетку.  
 Жива, состояние—неотличимое от нормального.  
 Вес—390 граммов.

25 июля 1926 г.  
 24 августа »

### Свинка Т<sub>1</sub> (рыжая, правая щека с черным пятном, самец).

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
30 ноября 1926 г.	157	37,9
2 декабря »	165	38,3
5 » »	160	38,3
7 » »	167	38,5
8 » »	Инъекция 0,1 к. см. 0,1% раств. казеин. к-ты под кожу брюшка шприцем.	
11 » »	205	38,4
14 » »	210	38,4
18 » »	219	38,3
22 » »	217	38,8
24 » »	239	38,8
24 » »	14 ч. 40 м. реинъекция в брюшину 5 ксм. ф-а солевой к-ты той же концентрации.	
	14 ч. 45 м. сидит, нахохлившись, испражнения, изредка вздрагивает.	
	14 ч. 48 м. поджимает под себя задние ноги.	
	14 » 53 » испражнения.	
	14 » 55 » легкое учащение дыхания.	
	15 » — » сидит покойно.	
	15 » 30 » тоже.	
	16 » — » тоже.	
	16 » 10 » сидит покойно.	
	16 » 40 » сидит покойно.	
	17 » — » тоже.	
	19 » — » состояние без изменений, перенесена в клетку.	
26 » »	Жива, состояние—неотличимое от контрольных.	
14 января 1927 г.	Вес—280 граммов, т-ра—38,8° С.	

### Свинка Е<sub>2</sub> (самец).

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
30 ноября 1926 г.	140	37,8
2 декабря »	158	38,0
5 » »	147	38,5
7 » »	167	38,5
8 » »	Инъекция 0,1 ксм. под кожу брюшка шприцем 0,1% раств. казеин. к-ты.	
11 » »	202	38,9
14 » »	212	38,5
18 » »	220	38,7
22 » »	222	38,9
24 » »	240	39,0
24 » »	14 ч. 45 м. реинъекция в брюшину 5 ксм. раств.	

ф а с о л. к-ты той же концентрации. При снятии со столика затрудненное дыхание.

14 ч. 50 м. посажена в кристаллизатор, дрожит.

14 » 55 » прежняя легкая дрожь.

15 » — » приподнимается на задних лапах.

15 » 18 » попытка лечь, беспокойство.

15 » 30 » поднимается на задних лапах, вздрагивает.

15 ч. 40 м. тоже.

16 » - - » беспокойство.

16 » 10 » жевательные движения, попытка лечь.

16 » 20 » усиливающееся беспокойство, вертится на одном месте.

16 ч. 40 м. успокоилась и сидит.

17 » — » сидит покойно.

18 » 40 » сидит покойно. перенос в клетку.

Жива, поведение—неотличимое от здоровых.

Вес—285 граммов, т-ра—38,7° С.

26 декабря 1926 г.

14 января 1927 г.

**Свинка М (бело-рыже-черная, самец).**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
30 ноября 1926 г.	148	37,7
2 декабря »	145	37,5
5 » »	135	38,3
7 » »	149	38,2
8 » »	Инъекция под кожу брюшка шприцем 0,1 ксм. 0,1% раств. к а з е и н. к-ты.	
11 » »	162	38,4
14 » »	165	38,5
18 » »	173	38,7
22 » »	185	38,8
24 » »	205	38,8
24 » »	15 ч. 30 м. реинъекция в брюшину 5 ксм. ф а с о л. к-ты той же концентрации. При снятии с операционного стола свинка дрожит.	
	15 ч. 35 м. жевательные движения, испражнение.	
	16 » — » все время сидела покойно.	
	16 » 10 » то же.	
	16 » 20 » поведение не изменилось.	
	17 » — » сидит покойно.	
	17 » 40 » » »	
	18 » 10 » » »	
	18 » 30 » состояние не изменилось.	
	19 » 10 » сидит покойно, перенесена в клетку.	
26 » »	Жива, поведение—неотличимое от здоровых.	
14 января 1927 г.	Вес—285, граммов, т-ра—38,7° С.	

**Свинка Б<sub>5</sub> (самец).**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
12 июня 1926 г.	248	38,9
14 » »	228	38,5
15 » »	216	38,6
16 » »	221	38,5
17 » »	211	38,4
18 » »	221	38,5
18 » »	15 ч. 30 м. инъекция под кожу брюшка шприцем 0,2 к. см. 0,1% раств. ф а с о л. к-ты. Перед инъекцией раствор нагрет до 37° С.	

19	июня	1926 г.	228	39,0
22	»	»	235	39,1
23	»	»	238	38,5
28	»	»	260	39,4
29	»	»	268	39,3
1	июля	»	270	39,0
2	»	»	281	39,1
2	»	»	12 ч. 30 м реинъекция 5 ксм. раствора казеин. к-ты той же концентр. в брюшину.	
			12 ч. 45 м. сидит покойно в кристаллизаторе.	
			13 » 40 » усиленная чистка лапками мордочки.	
			14 » 10 » сидит покойно.	
			14 » 30 » то же.	
			14 » 40 » беспокойство и судороги задних ног.	
			14 » 48 » легла на бок, конвульсии, мочеотделение.	
			14 ч. 50 м. встала и села.	
			15 » — » сидит покойно.	
			16 » — » все время сидела спокойно, изредка вздрагивая.	
			16 ч. 30 м. дефекация.	
			17 » — » сидит покойно.	
			18 » — » прерывное учащение дыхания.	
			19 » - » сидит покойно, бодрый вид, перенесена в клетку.	
3	»	»	Жива, состояние нормальное.	
24	августа	»	Вес—370 граммов.	

**Свинка Ш (темно-серая, самец).**

Время.		Вес в гр.	Т-ра.
6	июля 1926 г.	235	38,4
8	»	248	39,2
10	»	255	39,5
10	»	Инъекция под кожу 0,2 ксм. 0,1% раствора ф-а солевой к-ты. Раствор подогрет до 37° С.	
12	»	267	39,3
14	»	250	39,1
16	»	281	39,3
20	»	290	39,3
22	»	310	39,3
24	»	310	38,7
24	»	16 ч. 5 м. реинъекция (натощак) 5 ксм. раствора казеин. к-ты той же конц. в брюшину.	
		16 ч. 10 м. попытка чесать мордочку, жевательные движения.	
		16 ч. 10 м. приподнимается на задних лапах.	
		16 » 20 » сидит покойно.	
		16 » 30 » то же.	
		16 » 37 » жевательные движения.	
		16 » 47 » легкая дрожь.	
		17 » 08 » сидит покойно, бодрый вид.	
		17 » 13 » зевает.	
		17 » 18 » т-ра 38,5° С.	
		17 » 28 » дана пища (свежий огурец), ест его.	
		18 » 30 » сидит покойно, бодрый вид.	
		19 » — » состояние нормальное, перенесена в клетку.	
25	»	Жива, состояние—как до опытов.	
24	августа	Вес—390 граммов.	

Анализ экспериментальных результатов всех протоколов, относящихся к прямой и перекрестной анафилаксии с казенновой и фасолевыми кислотами, обусловил постановку таких опытов, где реинъекция препарата осуществлялась бы непосредственно в кровяные морские свинки.

Огромную услугу в этом отношении представляет новый метод интравенозных инъекций каких-либо веществ, разработанный, применительно к морским свинкам, Roth'ом (41).

Для этого свинка, брюшком вниз, закрепляется за лапки марлевыми, не слишком тонкими (во избежание гиперемии) тесемками на операционном столике до полной иммобилизации. Затем операционное поле (та или другая задняя лапа) освобождается от шерсти кривыми ножницами (выбравание кожи (по Roth'у) излишне), хорошо протирается ватой, смоченной спиртом, и обкладывается стерильными марлевыми салфеточками соответствующего размера. При помощи очень тонкого скальпеля (он может быть заменен лезвием Gillette) делается продольный разрез (в 1—1½ см. длиной) кожи задней верхней стороны ноги. Края разреза раздвигаются тупым концом скальпеля. Эта манипуляция тотчас выявляет топографию соответствующей вены, просвечивающей сквозь тонкую фасцию. Фасция в свою очередь с наибольшей осторожностью надрезается в нескольких местах вдоль вены, что заставляет последнюю непосредственно выступить перед оператором. Далее пальцами левой руки экспериментатора натягивается кожа оперируемой лапки морской свинки, и тончайшей платиновой иглой Resord'овского шприца, при крайне медленном движении его поршня, в вену инъецируется тот или иной из испытуемых препаратов.

Когда в вену введено нужное количество соответствующего препарата, игла быстро вынимается, края разреза быстро зашиваются шелком, швы смазываются 10% спиртовым раствором йода, и животное снимается с операционного столика.

Метод интравенозных инъекций Roth'a безусловно должен исключить способ сердечной пункции, практикуемой при работах по анафилаксии, так как сердечная пункция, сама без инъекции чего-либо, приводит к явлениям, симулирующим анафилактический шок.

Однако и эти опыты с реинъекцией слабых (0.2%) и крепких (3%) растворов казенновой и фасолевыми кислот при прямых и перекрестных опытах дали результат, вполне совпадающий с первыми сериями опытов, когда реинъекция производилась в брюшину (см. прот. стр. 53).

**Протоколы по опытам со слабыми и крепкими растворами фасолевого и казеннового кислот при введении в кровь.**

Свинка О (рыжая, самка).

Время	Вес в гр.	Т-ра.
26 января 1927 г.	138	38,4
1 февраля	150	39,0
4 »	164	38,8
6 »	187	38,7
8 »	192	38,7
8 »	Инъекция 0,4 ксм. под кожу брюшины шприцем с платиновой иглой 0,2% р-ств. фасол. к-ты.	
10 »	187	38,7
12 »	204	39,0
14 »	205	38,7

16 февраля	1927 г.	214	38,6
18 »	»	217	38,9
20 »	»	220	38,8
22 »	»	235	38,7

13 ч 30 м. Реинъекция в вену задней ноги шприцем с платиновой иглой 0,6 к. см. 0,2% раств. ф. а сол. к-ты. Раств. лабор. т-ры.  
 13 ч. 34 м. наложены швы и снята с операц. стола.  
 13 » 35 » сильные вздрагивающие движения.  
 13 » 37 » дрожь исчезла  
 13 » 39 » дрожь, поднимает опериров. ногу.  
 13 » 40 » ходит, мелкая дрожь, при ходьбе приподнимает опериров. лапу.  
 13 ч. 42 м. сидит, приподнимает опериров. лапу.  
 13 ч. 47 м. изредка вздрагивает.  
 13 » 57 » легкая, непрекращающаяся дрожь.  
 14 » — » то же.  
 14 » 10 » сидит покойно.  
 14 » 32 » то же.  
 15 » — » то же, перенесена в клетку.

11 апреля 1927 г. Вес 300 гр. Т-ра. 38,6° С.

**Свинка Н (коричневая, самец).**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
12 января 1927 г.	127	38,0
14 » »	134	37,6
16 » »	139	37,5
18 » »	150	37,7
20 » »	145	38,8
23 » »	157	39,0
23 » »	Инъекция 0,2 к.см. 0,2% р. казеин. к-ты шприцем с платин. иглой под кожу брюшка.	
25 » »	173	39,0
27 » »	190	38,9
1 февраля »	190	39,1
3 » »	198	38,8
5 » »	209	39,2
7 » »	229	38,8
8 » »	230	39,0

13 ч. 45 м. реинъекция 0,6 к.см. 0,2% р. казеин. к-ты в вену задней лапы. После снятия с операционного стола, легкая одышка.  
 13 ч. 55 м. легкая дрожь и дефекация, слабый писк.  
 13 ч. 57 м. попытка чесать зубами брюшко, новая дефекация, жевательные движения.  
 14 ч. — м. чешет лапой мордочку.  
 14 » 3 » (попеременно) задними и передними лапами чешет мордочку.  
 14 ч. 13 м. сидит покойно.  
 14 » 39 » т-ра 39,1°.  
 15 » 10 » сидит покойно.  
 15 » 40 » то же, перенесена в клетку.

11 апреля 1927 г. Вес 372 гр. Т-ра. 38,90° С.

**Свинка О<sub>1</sub> (рыжекоричневая, самец).**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
12 января 1927 г.	137	37,2
14 » »	145	37,5

16	января	1927 г.	155	37,7
18	»	»	160	37,6
20	»	»	160	37,8
23	»	»	168	39,0
23	»	»	Инъекция 0,2 ксм. 0,2% р. казеин. к-ты шприцем с платин. иглой под кожу брюшка.	
25	»	»	181	39,1
27	»	»	195	39,2
1	февраля	»	198	38,5
3	»	»	205	39,0
5	»	»	213	39,1
7	»	»	229	38,7
8	»	»	232	38,7
			13 ч. 20 м. реинъекция 0,6 ксм. в вену ноги 0,2% раств. фасоль в к-ты шприцем с плат. иглой.	
			13 ч. 25 м. дрожь.	
			13 » 26 » жевательн. движения, непрекращающаяся дрожь, дефекация.	
			13 ч. 28 м. обильная дефекация.	
			13 » 30 » дрожь, передвигается с места на место.	
			13 » 35 » новая дефекация, непрекращающаяся дрожь, попытка чесать зубами брюшко.	
			13 ч. 37 м. задней (оперирован.) лапой пытается чесать мордочку.	
			13 ч. 40 м. сидит покойно, изредка вздрагивает	
			13 » 45 » то же.	
			13 » 55 » то же и новая дефекация.	
			14 » 5 » сидит покойно.	
			14 » 8 » то же самое.	
			14 » 15 » сидит покойно.	
			14 » 28 » то же.	
			14 » 38 » т-ра 39,0.	
			15 » 10 » сидит покойно, перенесена в клетку.	
11	апреля	1927 г.	Вес—362 гр.	Т-ра 38,8° С.

#### Свинка К (трехцветная, самец).

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
9 января 1927 г.	152	38,8
11 » »	164	38,7
13 » »	160	38,7
17 » »	180	39,1
19 » »	188	38,9
21 » »	195	38,8
22 » »	0,2 ксм. 0,2% раств. фасоль к-ты в естествен. раств. шприцем под кожу брюшка. Раствор лабор. т-ры.	
24 » »	209	38,5
26 » »	215	38,9
28 » »	—	—
30 » »	215	38,2
1 февраль »		
3 » »	252	38,3
5 » »	254	38,4
5 » »	Реинъекция 0,6 ксм. 0,2% раств. казеин к-ты шприцем (платиновая игла) в вену ноги. Реакция: дрожь (в течение полчаса).	

#### Свинка Н (рыжебелая, самец).

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
9 января 1927 г.	170	38,8

11	января	1927 г.	174	38,8
13	»	»	184	38,6
15	»	»	—	—
17	»	»	180	38,8
20	»	»	197	39,0
22	»	»	210	38,8
22	»	»	Инъекция 0,2 см. 3% раств. казеин. к-ты в естеств. раств. под кожу брюшка шприцем (латин. игла). Раств. лабор. т-ры.	
24	»	»	220	38,8
26	»	»	235	38,5
28	»	»	—	—
30	»	»	252	38,9
1	февраля	»	—	—
3	»	»	237	38,6
5	»	»	243	38,8
5	»	»	Рейнъекция 0,3 см. 3% раств. казеин. к-ты в вену ноги. Реакция: после снятия с операционного стола вздрагивает.	

**Свинка К, (черная, самец).**

Время.			Вес в гр.	Т-ра.
9	января	1927 г.	174	39,0
11	»	»	180	38,7
13	»	»	180	38,8
15	»	»	—	—
17	»	»	189	39,0
20	»	»	195	38,7
22	»	»	220	38,8
22	»	»	Инъекция 0,2 см. 3% р. фасол. к-ты в естеств. раств. шприцем (латин. игла) под кожу брюшка. Раств. лабор. т-ры.	
24	»	»	235	38,7
26	»	»	232	38,3
28	»	»	—	—
30	»	»	238	38,8
1	февраля	»	—	—
3	»	»	242	38,5
5	»	»	243	38,3
5	»	»	Рейнъекция 0,5 см. 3% р. фасол. к-ты в вену ноги. Реакция: после снятия с операцион. стола трясет опериров. ногой. Попытка чесать зубами брюшко. Дефекация.	

**Свинка А, (самец).**

Время.			Вес в гр.	Т-ра.
9	февраля	1927 г.	172	38,7
11	»	»	177	38,8
13	»	»	185	39,0
15	»	»	—	—
17	»	»	180	39,0
20	»	»	198	38,7
22	»	»	210	38,8
22	»	»	Инъекция 0,2 см. 3% раств. фасол. к-ты в естеств. раствор. шприцем (латиновая игла) под кожу брюшка (раств. лабор. т-ры).	
24	»	»	200	38,7
26	»	»	210	38,4
28	»	»	—	—
30	»	»	215	38,7

1 апреля	»	—	—
3 »	»	217	38,7
5 »	»	240	38,8
5 »	»	Реинъекция 0,5 ксм. 3% р. казеин. к-ты в вену ноги шприц, с платин. иглой. Реакция: закрывает глаза, чешет мордочку, нахохлилась, чешет зубами брюшко, жевательный рефлекс. чешет лапами мордочку, встряхивается, мочеотделение, поджимает под себя задние лапы.	
6 апреля	1927 г.	Вес—250 гр.	Т-ра—39,0.
		Инъекция 0,6 ксм. фасол. вытяжки в вену другой ноги; никакой реакции (NR).	

**Свинка 3 (рыжебелая, самец).**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
9 января 1927 г.	187	38,9
11 »	194	38,8
13 »	198	38,7
15 »	—	—
17 »	215	39,1
20 »	222	38,9
22 »	242	38,8
22 »	Инъекция 0,2 ксм. 3% фасол. к-ты в естеств. раств. шприцем под кожу брюшка (платиновая игла). Раств. лабор. т-ры.	
24 »	257	38,8
26 »	257	38,6
28 »	—	—
30 »	252	38,6
1 февраля	—	—
3 »	280	38,6
5 »	290	38,8
5 »	Реинъекция 0,5 ксм. 3% казеин. к-ты в вену ноги. После снятия с операционного стола никаких явлений. Затем изредка вздрагивает, дефекация, жевательные движения.	
4 »	302	39,0
	Инъекция 0,6 ксм. фасол. вытяжки в вену другой ноги. Реакция: жевательные движения, чесание зубами брюшка, передними лапами—мордочки, вздрагивание.	

Изложенные опыты поднимали вопрос о получении анафилактиксии при применении рафинированных и продажных препаратов. Эксперимент показал, что одноименные рафинированные и продажные препараты анафилактического шока не дают (см. проток.).

**Протоколы по опытам с рафиниров. и продажными протеинами.**

**Свинка О. (темнорыжий самец).**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
9 января 1927 г.	159	38,9
11 »	150	38,9

13	января 1927 г.	160	38,9
15	»	—	—
17	»	160	38,8
20	»	164	38,8
22	»	185	38,9
22	»	Инъекция 0,2 к. см. 3% р. казеин. к-ты под кожу брюшка шприцем (платинов. игла). Раств. лабор. т-ры.	
24	»	190	39,0
26	»	187	38,5
28	»	—	—
30	»	185	38,4
1	февраля	—	—
3	»	187	38,2
5	»	190	38,6
6	»	207	38,7
6	»	Рейнъекция 0,6 к. см. 3% казеина (отсеянного через мельничей газ). Мерка в п. 100 NaOH в вену ноги шприц с платин. игл. Никакой реакции. Изменения в поведении, очень слабая дрожь и др., должны быть отнесены за счет введения препарата прямо в кровяток. Так же ведут себя контрольные морские свинки, когда им в вену вводят 1 ксм. 3% раствора казеина в п. 100 NaOH.	

Опыты же с продажным казеином и вытяжками из семян фасоли в обычных условиях таких опытов (23) без всякого труда позволили дифференцировать протени молока от протеина фасоли. При работе с продажным казеином всегда имеет место обычная картина шока, сопровождающегося смертью (через 2—3 часа после реинъекции). Редко, но иногда после реинъекции раствора продажного казеина у морской свинки смерти не наступает, но при этом симптомы шока настолько ясны, что наличие самого шока не вызывает сомнений даже у лиц, никогда не видящих анафилаксии у морских свинок. То же самое касается фаселевой вытяжки (см. протоколы).

#### Протоколы с обыкновенными протени. препаратами.

##### Свинка Л<sub>3</sub> (черная с белыми пятнами, самец).

Время	Вес в гр.	Т-ра.	
1 декабря 1926 г.	187	38,3	
3	»	196	38,3
6	»	186	38,3
11	»	223	38,3
13	»	233	38,5
13	»	Инъекция под кожу брюшка 0,1 ксм. раствора 0,24% раств. продажного казеина.	
15	»	225	38,6
17	»	220	38,3
22	»	215	38,5
24	»	230	—
27	»	250	38,8
27	»	14 ч. 25 к. Рейнъекция в брюшину 5 ксм. фасол. вытяжки.	
		14 ч. 35 м. сидит покойно.	
		15 » — » — » — »	

15 » 10 » сидит покойно.  
 15 » 30 »       »       »  
 16 » 20 »       »       »  
 17 » — »       »       »  
 17 » 15 »       »       »  
 18 » — » состоянии без изменений, перенесена  
 в клетку.

31 декабря 1926 г. Жива, бодрый и здоровый вид.

**Свинка О. (белая, одна щека рыжая, самец).**

Время	Вес в гр.	Темп.
1 декабря 1926 г.	170	38,1
3 » »	177	38,1
6 » »	167	38,6
8 » »	180	38,3
11 » »	205	38,4
14 » »	200	38,3
16 » »	208	38,6
16 » »	Инъекция под кожу 0,1 см. фасол. вытяжки	
19 » »	210	38,6
22 » »	219	38,6
24 » »	221	38,6
30 » »	215	38,6
30 » »	13 ч 40 м. Реинъекция 5 см. фасол. вытяжки шприцем в брюшину. Тотчас после снятия с операционного столика дрожь и подергивание задних лап.	
	13 ч. 45 м. жевательные движения, дрожь.	
	13 » 50 » усиленная чистка лапами мордочки.	
	13 » 55 » дефекация.	
	14 » 25 » мочеотделение.	
	15 » 30 » беспокойно вертится на одном месте.	
	15 » 40 » запрокидывание головы назад, глаза закрыты.	
	16 ч. — м. вздрагивает, т-ра 35,5° С, движения всем телом, точно свинка подавилась	
	16 ч. 30 м. вздрагивает, те же движения, пицтит.	
	17 » — » откидывает задние лапы назад.	
	17 » 20 » жевательные движения челюсти.	
	17 » 40 » дрожит.	
	18 » — » то же.	
	18 » 30 » дрожит и пицтит.	
	19 » — » переминается с ноги на ногу, видна их слабость.	
	19 ч. 30 м. дрожь, жевател. движения челюстей.	
	19 » 40 » легла, конвульсивно дрожит.	
	20 » — » немного успокоилась и села.	
	20 » 10 » сидит.	
	20 » 20 » сидит покойно.	
	20 » 40 »       »       »	
	21 » — » состояние не изменилось, перенесена в клетку.	
31 » »	Жива, но имеет депрессивный вид.	

Опыты с этими же препаратами, реинъецируемыми прямо в кровь, давали резко выраженную картину анафилактического шока, в 100%<sub>0</sub> сопровождающегося смертью (см. проток.).

**Протоколы по опытам с нерафинированными препаратами, вводимыми в кровь.**

**Свинка Т<sub>1</sub> (черная с белыми пятнами, самка).**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
9 февраля 1927 г.	215	38,8
11 » »	229	39,2
13 » »	240	38,7
14 » »	Инъекция 0,4 ксм. 3% раств. казеина Мерка под кожу брюшка (п 100 NaOH). Растворение казеина при нагревании.	
18 » »	252	38,9
20 » »	255	38,9
22 » »	269	38,8
24 » »	275	38,9
26 » »	290	38,7
28 » »	303	38,8
28 » »	18 ч. 45 м. реинъекция 0,6 ксм. 3% р. казеина Мерка (п 100 NaOH) (препар. просеян через мельничный сит; растворение в течение 6 час. в в терм. при 35° С. затем подогрето до 60° С на вод. бане). Реакции: при введении последних капель раствора в вену началась одышка, голова упала на бок, испражнение, моча. 18 ч. 49 м. сильная асфиксия, смерть, т-ра тела 37,0° С.	

**Свинка А. (рыжая с черными пятнами, самка).**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
9 февраля 1927 г.	189	39,0
11 » »	195	39,3
13 » »	205	39,0
14 » »	Инъекция 0,4 ксм. фасол. вытяжки под кожу брюшка шприцем.	
18 » »	210	38,8
20 » »	218	39,1
22 » »	232	38,7
24 » »	245	38,8
26 » »	252	38,8
28 » »	275	39,0
28 » »	19 ч. 20 м. реинъекция 0,4 ксм. фасол. вытяжки в вену ноги шприцем (платин. игла). 19 ч. 21 м. моментальная смерть на операционном столе, т-ра тела 37,7° С.	

**Свинка Я (рыжечерная, самец)**

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
9 января 1927 г.	195	38,8
11 » »	200	38,8
13 » »	200	39,1
14 » »	Инъекция 0,4 ксм. фасол. вытяжки под кожу брюшка шприцем.	
18 » »	200	38,6
20 » »	205	38,8
22 » »	215	38,7
24 » »	224	38,7
26 » »	233	38,7
28 » »	240	38,8

28	»	»	14 ч. 10 м. Инъекция 0,6 ксм. в вену 3% раствора казеина Мерка (п 100 NaOH при нагревании 50° С. на вод. бане). Никакой реакции.
30	»	»	245 38,5 16 ч. 35 м. Инъекция в вену другой ноги 0,5 ксм. фасолево-вытяжки. 16 ч. 36 м. судороги. 16 ч. 37 м. смерть, т-ра 36,0° С.

### Контроль.

Свинка К (рыжечерная, самец).

Время.	Вес в гр.	Т-ра.
30 января 1927 г.	232	38,8
30 » »	16 ч. — м. введено в вену правой и левой задних лап по 0,5 к. см. фасол. вытяжки шприцем с платиновой иглой.	
	Реакция: дрожь в опериров. лапках и только.	

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.

Современная биохимия располагает достаточным количеством фактов, колеблющих представление Fischer'a о строении протеиновой молекулы (43). Молекулу протеина теперь нельзя уже интерпретировать, как сложный полипептид, так как в ней имеются другие связи (44). Abderhalden склоняется к тому взгляду, что в собирательное понятие «протеин» надо вкладывать не определенную, индивидуальную молекулу, а считать протеин соединением ассоциированных друг с другом комплексов, соединенных посредством побочных валентностей. Этими элементарными комплексами являются ангидриды аминокислот, комбинированные как с полипептидами, так и аминокислотами (42). Как осуществляется связь этих комплексов — пока неясно.

Отсюда можно думать с максимальной вероятностью, что состав протеинов «в действительности гораздо проще, чем до сих пор это принимается на основании гидролиза и элементарного анализа», как писал Emil Fischer (46) в своей статье «Химия протеинов и ее отношение к биологии», вышедшей в 1907 г., и возможно, что в рафинированных по Перову протеиновых препаратах (казеиновая, фасолево-гороховая и др. к-ты) дается в руки биохимикам тот «материнский комплекс» (Mutterkomplex) из различных протеинов, о котором говорил Umberg (47) еще в 1898 году. Опыты биологической идентификации казеиновой и фасолево-гороховой кислот как-будто это доказывают.

Поэтому, исходя из общих теоретических представлений современной биохимии о строении протеинов, соображений, развиваемых по этому поводу Перовым, а также из изложенных в данной работе опытов, можно предварительно сделать выводы:

1. Казеиновая и фасолева́я кислоты (в слабых и крепких растворах), при прямых и перекрестных опытах по биологической идентификации протеинов, дают один и тот же физиологический эффект, не сопровождающийся анафилактическим шоком (даже при реинъекции в кровь).
  2. Опыты с продажным казеином и фасолево́й вытяжкой нацело совпадают с данными предыдущих исследователей, дифференцирующих, или соотв. идентифицирующих подобные препараты биологически (ачафилактический шок).
  3. Казеиновая кислота может быть дифференцирована биологическим методом от продажного казеина, а фасолева́я кислота — от фасолево́й вытяжки.
  4. Тождественность физиологического действия (0,2—3%) растворов (в естеств. растворителе) казеиновой и фасолево́й кислот на морских свинок, при прямых и перекрестных опытах по биологической идентификации протеинов, указывает на большую близость этих препаратов в их химическом строении и свойствах.
- Работа продолжается.

#### Литература.

1. J. Tillmans und A. Alt. *Bioch. Ztsch.*, **164**, 135, 1926.
2. R. Plimmer and J. Rosedall, *Bioch. Jnl.* **19**, 1015, 1925.
3. R. Plimmer and J. Rosedall, *ibid.* **19**, 1004 и 1015, 1925.
4. A. Mathews. *Physiol. Chemistry*, N.-Y. 1924, p. 127.
5. N. Troensegaard. *Ztsch. f. physiol. Chemie*, **133**, 116, 1924.
6. H. Dudley and H. Woodman. *Bioch. Jnl.* **8**, 541, 1914.
7. H. Dakin. *Jnl. biol. Chemistry*, **13**, 357, 1912.
8. H. Dakin, A. H. Dudley. *Jnl. biol. Chem.* **15**, 203, 1913.
9. Oppenheimer und Piskunson. *Tabulae biol.*, 1925
10. A. Mathews, *loc. cit.* 3 ed., 1924. 112—14.
11. С. Перов. Труды Гос. Тимирязевск. Научно-Иссл. Ин-та, сер. I, вып. 1, 8, 1925.
12. W. Starlinger u. K. Hartl. *Bioch. Ztsch.* **160**, 113, 1925.
13. O. Arndt u. E. Hafner. *Bioch. Ztsch.* **167**, 460 и 462, 1926.
14. P. Hawk, *Practical physiol. Chemistry*, London, 8 ed. 93 и 101—2.
15. С. Перов. Труды Вологод. Молочно-Хозяйств. Ин-та, 2, 1, 1921.
16. С. Перов. Труды Гос. Тимир. Научно-Иссл. Ин-та, 1925.
17. D. Litchow, *Bioch. Ztsch.*, **131**, 97, 1922
18. М. Ракузин. Протеины растительного царства, стр. 17 и 31. 1919 г., Петроград, изд. НТО ВСНХ; см. также его же: Химия протеинов и родственных им веществ. ч. I, стр. 63, 1923 г. Петроград, изд. НТО ВСНХ.
19. М. Ракузин и Пекарская. Журн. Русского Физико-Хим. О-ва, хим. часть, 200, 1916 г.
20. A. Wells. *Jnl. inf. dis.*, **9**, 147, 1911; см. также Wells a. Osborne, *Jnl. inf. dis.* **29**, 200, 1921.
21. Ch. Richet, *L'anaphylaxie*, Paris, 1923, также A. Lumière. *Le problème de Panaphylaxie*, Paris, 1924.
22. Dale a. Hartley, *Bioch. Jnl.* **10**, 408, 1906.

23. M. Klimmer. Technik u. Methodik d. Bakteriologie u. Serologi, 1925, 485.
24. H. Pfeiffer. Die Arbeitsmeth. bei Versuchen über Anaphylaxi. Hdb. d. biol. Arbeitsmeth., herausg. v. Abderhalden. Abt. XIII, 2, 1-95, 1925.
25. E. Friedberger u. Joachimoglu, Ztsch. f. Immunitätsforsch. 22, 522, 1914.
26. E. Abderhalden. Ztsch. f. physiol. Chemie, 81, 1912.
27. F. Knaffel—Lenz u. E. Pick. Arch. f. exp. Path., 71, 407, 1913.
28. Ten-Broeck. Jnl. biol. Chem., 17, 369, 1914.
29. Ritchie. James a. Miller. Jnl. path. a. bact., 17, 429, 1913.
30. B. White, Jnl. med. Res., 30, 393, 1914.
31. K. Meyer. Ztsch. f. Imm., 21, 654, 1914.
32. С. Перов. Труды Волг. Молочно-Хоз. Ин-та, 2, 95, 1921/22.
33. С. Перов. *ibid.*, 1, 62, 1918/19.
34. Long. Jnl. Amer. Chem. Soc., 28, 372, 1906.
35. Matthaiopoulos, Ztsch. f. anal. Chemie, 57, 492, 1908.
36. Laqueur u. Sackur. Hofmeister's Beiträge.
37. L. Van-Slyke Jnl. biol. Chemistry, 14, 227, 1913.
38. Söldner. Land. unters. 35, 1899.
39. С. Перов. Труды Волг. Мол.-Хоз. Ин-та, 1, 66, 1918/19.
40. С. Перов, *ibid.*
41. D. Roth. Jnl. of bacteriology, 6, 249, 1921.
42. M. Klimmer, loc. cit.
43. W. Sadikow u. N. Zelinskij. Bioch. Ztsch. 136, 241, 1923, и 147, 30, 1924.
44. E. Abderhalden. Ztsch. f. physiol. Chemie. 128, 119, 1923.
45. E. Abderhalden. Die Naturwissenschaften, 12, 716, 1924.
46. E. Fischer. Sitzb. d. Akad. d. Wiss., I, 35, 1907.
47. F. Ueber. Ztsch. f. physiol. Chemie, 25, 258, 1898.
48. С. Перов. Труды Волг. Мол.-Хоз. Ин-та, 2, 95, 1921/22.
49. С. Перов. Loc. cit.

---

S U M M A R Y

## Biological Identification of proteins

by J. Leontiew (Moscow).

1. Directly and cross tested for the biological identification of the proteins, the caseinic and bean acids—both weak and strong solutions—produce one and the same effect, which is not accompanied by an anaphylactic shock even while reinjected into the blood stream.

2. The tests on commercial casein and bean-extract thoroughly coincide with the results of the former investigators which prepares either differentiated or considered as identical biologically (anaphylactic shock).

3. By the biological method the caseinic acid can be differentiated from commercial casein (Merck) and bean acid from bean-extract.

4. The identity of the physiological effect of the (0,2-3%) solutions—in a «natural» solvent—of the caseinic and bean acids upon guinea pigs, when directly and cross tested for biological identification of the proteins, show the a great likeness of chemical structure and properties of these preparates.

---