

ПОЛУЧЕНИЕ ИНСУЛИНА ИЗ ТРЕСКИ

Мл. научный сотрудник Л. Н. Егорова

Лаборатория химического консервирования ВНИРО

Основным источником получения инсулина до сих пор является поджелудочная железа крупного рогатого скота.

Потребность в инсулине, вследствие расширения сферы его применения (лечение сахарной болезни, шизофрении, истощения, пневмонии и др.), растет, что влечет за собой необходимость изыскания новых источников сырья. Одним из таких источников может быть рыбное сырье.

Поджелудочная железа рыб

Поджелудочная железа [2] у хрящевых рыб — акул и скатов — представляет компактный орган (рис. 1 и 2), по своему гистологическому

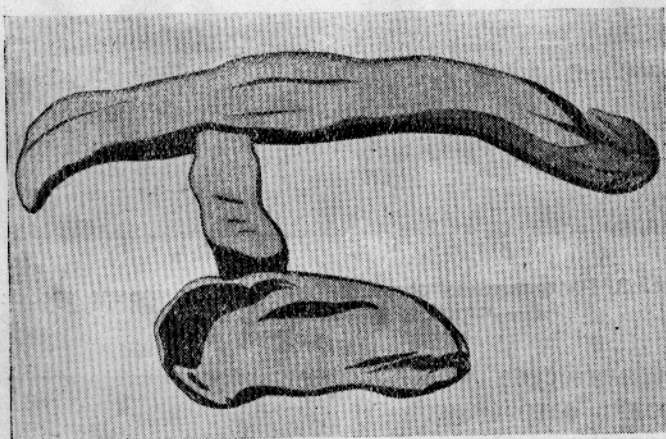


Рис. 1. Поджелудочная железа акулы (*Squalus acanthias*).

строению подобный железам млекопитающих. Эндокринная ткань, выделяющая инсулин, вкраплена в экзокринную ткань, выделяющую панкреатический сок, в виде отдельных островков, разбросанных в паренхиме железы.

У костистых рыб строение поджелудочной железы иное и отличается большим разнообразием. Например, у угрей поджелудочная железа разбросана в виде маленьких долек между петлями кишечника; у карпа она облегает кровеносные сосуды, входящие в печень, и срастается с нею,

образуя так называемый гепатопанкреас. Такое же строение железы у осетра (хрящекостные рыбы).

У многих рыб ткань, выделяющая инсулин, обособлена от всей поджелудочной железы в отдельные тельца сферической или овальной формы — так называемые островки, содержащие наряду с эндокринной тканью также некоторое количество экзокринной ткани.

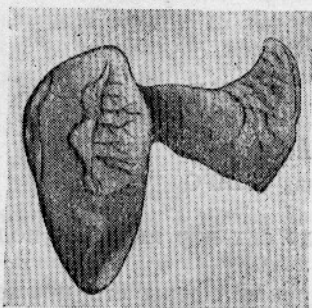


Рис. 2. Поджелудочная железа ската (*Raja clavata*).

Количество этих телец у разных видов рыб различно, но почти всегда имеется по одному тельцу сравнительно большего размера, которое называют главным островком [5].

У морского черта [2] главный островок расположен на передней стороне желудка, а многочисленные мелкие островки разбросаны в складках брюшечки. У скумбрии и пелагиды островки овальной формы расположены близ желчного протока; у бычков островки сферической формы находятся около селезенки; у камбалы и палтуса сравнительно крупные островки прикреплены к верхушке желчного пузыря [2].

У рыб семейства тресковых — трески, пикши, сайды — островки продолговатой формы прикреплены к верхушке или боковой части желчного пузыря (рис. 3 и 4).

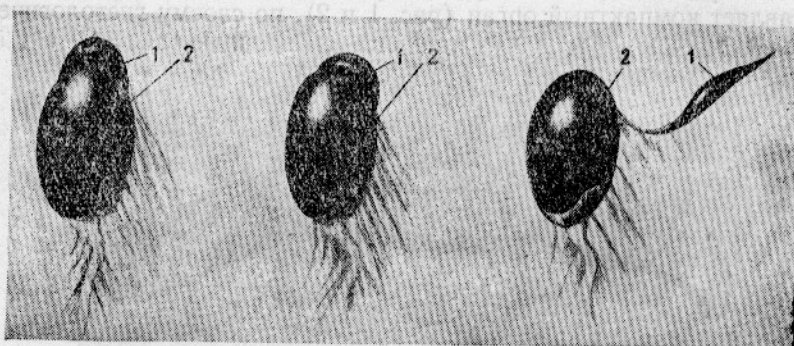


Рис. 3. Расположение островков на желчном пузыре трески: 1 — островок; 2 — желчный пузырь.

Гистологическое исследование островков трески

Материалом для исследования служили островки атлантической трески; островки отбирали из рыбы тотчас после ее вылова и немедленно фиксировали 4%-ным формалином.

Заготовка островков проводилась в январе 1950 г. сотрудниками ПИНРО Сорокиным В. П. и Киселевой Н. В. обработке материала принимала участие Лебедева Т. М.

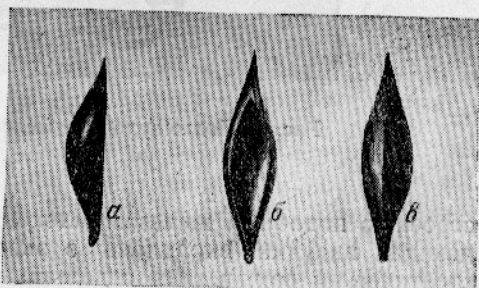


Рис. 4. Внешний вид островка трески: а — сбоку; б — снизу; в — сверху.

Фиксированный материал обрабатывали перед заливкой в парафин обычным методом [1]: промывание в воде, в спирте возрастающей крепости (от 50° до абсолютного), смесью спирта с хлороформом, хлороформом с парафином и парафином. Из полученных парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4—6 микрон, которые окрашивали железным гематоксилином [1] и заливали пихтовым бальзамом.

При просмотре под микроскопом большого количества приготовленных срезов были выбраны наиболее характерные по соотношению эндокринной и экзокринной ткани, и с них были сделаны микрофотографические снимки (увеличение в 100 раз).

На поперечном и продольном срезах островков трески видно, что главную массу их составляет эндокринная ткань (рис. 5 и 6), в которую вкраплены отдельные участки экзокринной ткани.



Рис. 5. Поперечный срез островка:
1 — эндокринная ткань; 2 — экзокринная
ткань.

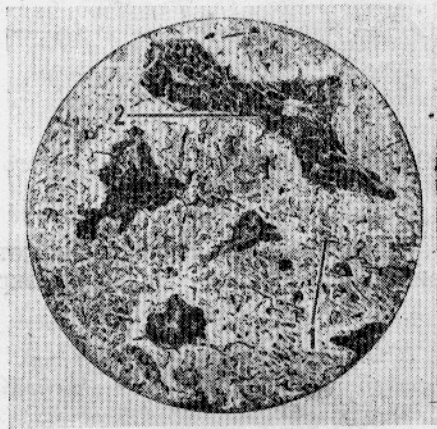


Рис. 6. Продольный срез островка:
1 — эндокринная ткань; 2 — экзокринная
ткань.

Слой экзокринной ткани расположен также по периферии островков (рис. 7 и 8) и образует как бы капсулу, в которой помещается эндокринная ткань.

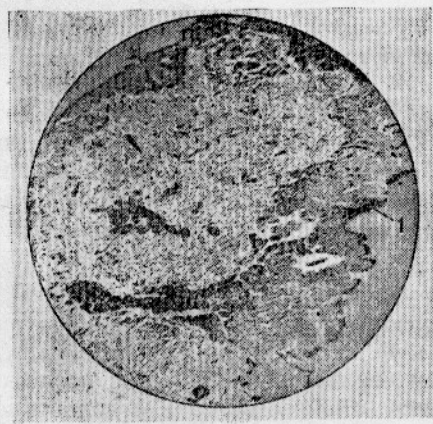


Рис. 7. Продольный срез островка.
1 — поверхностный слой.

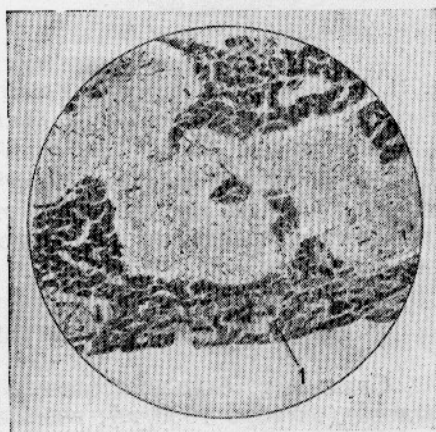


Рис. 8. Поперечный срез островка.
1 — поверхностный слой.

Довольно часто встречаются островки, содержащие большое количество (до 50%) экзокринной ткани (рис. 9).

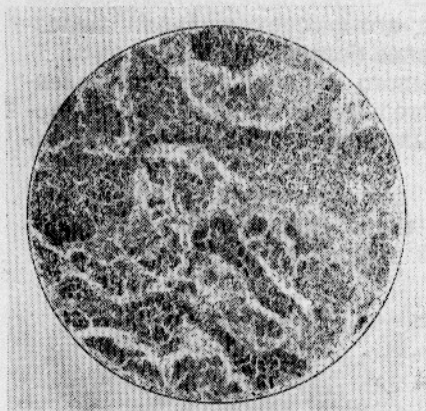


Рис. 9. Эндокринная и экзокринная ткань в островках.

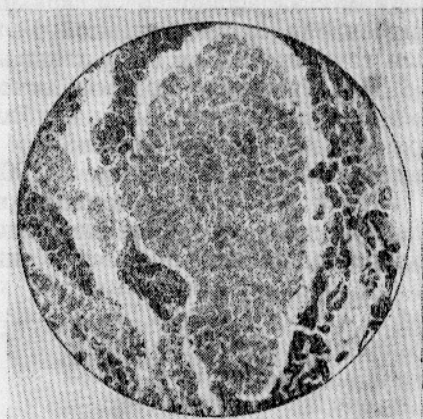


Рис. 10. Эндокринная и экзокринная ткань в островках.

Также бывают островки, в которых имеются большие участки эндокринной ткани, окруженные экзокринной тканью (рис. 10 и 11).

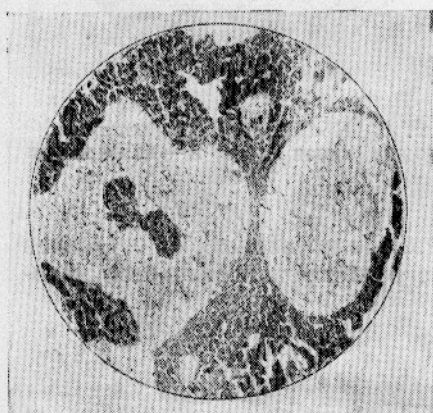


Рис. 11. Эндокринная и экзокринная ткань в островках.

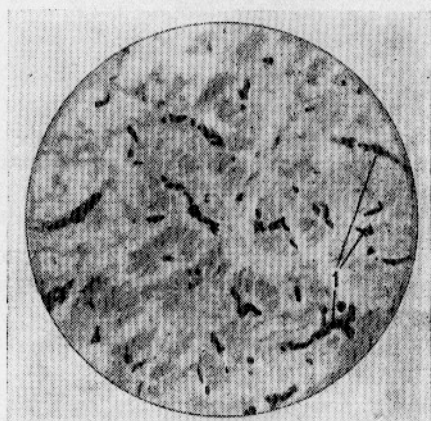


Рис. 12. Эндокринная ткань при увеличении в 300 раз. 1 — эритроциты.

Эндокринная ткань содержит обычно густую сеть кровеносных сосудов; на рис. 12, где показана эта ткань при увеличении в 300 раз, кровеносные сосуды не видны, но эритроциты крови видны в виде черных зернышек.

Вес и химический состав инсулиновых желез трески

Свежую треску, доставленную во льду через несколько часов после вылова (октябрь 1950 г.), взвешивали (каждый экземпляр в отдельности) и сейчас же разделявали для извлечения островков. Из каждой рыбы извлекали только наиболее крупный, так называемый главный островок, который мы в дальнейшем называем инсулиновой железой.

Железы тотчас взвешивали. Всего было исследовано около 350 экземпляров трески разных размеров. Средний вес желез у отношению к весу рыбы показан в табл. 1. Максимальный вес желез у крупной трески весом 9,9 кг составил 0,52 г. Хотя вес желез в среднем пропорционален весу трески, но во многих случаях наблюдаются отклонения: у мелкой трески встречаются более крупные желез, чем у крупной. Исходя из данных табл. 1, средний выход желез от 1 т трески составляет около 40 г.

Таблица 1

Вес трески (в кг) от—до	Число экзем- пляров	Вес рыбы (в кг)		Вес желез (в г)		Выход желез в г на 1 т рыбы
		общий	средний	общий	средний	
1—2	89	133,6	1,50	4,48	0,50	33,5
2—3	74	177,4	2,40	5,45	0,07	30,7
3—4	32	108,5	3,40	4,06	0,13	37,4
4—5	27	122,9	4,50	5,19	0,19	42,2
5—6	12	66,0	5,5	2,38	0,20	36,0
6—7	3	18,9	6,3	1,00	0,33	52,9
8—9	3	27,8	9,25	1,25	0,42	45,0

В табл. 2 приведены результаты анализа двух проб инсулиновых желез: первая проба из 76 экземпляров желез; вторая проба из 73 экземпляров желез.

Таблица 2

Номера проб	С о д е р ж а н и е (в %)				
	влага	жир	общий азот (N)	белок (N × 6,25)	зола
1	79,15	1,66	2,39	14,94	1,37
2	78,06	1,63	2,47	15,44	1,40

Содержание инсулина в инсулиновых железах

Впервые сведения о получении инсулина из рыб появились в литературе в 1924 г. [2], когда в лабораторных условиях был получен инсулин из желез некоторых рыб в следующем количестве (в клинических единицах¹ на 1 кг желез):

Морская щука	15000
Палтус	18000
Вахня	28300
Треска тихоокеанская	22700
Сайда	35000

¹ За 1 клиническую единицу в то время принимали $\frac{1}{3}$ количества инсулина, потребного для снижения сахара в крови у нормального голодающего кролика до состояния конвульсий в течение 4 часов. Клиническая единица по своему действию примерно равняется установленной в настоящее время международной единице. За 1 международную единицу принимают активность 0,045 мг стандартного препарата кристаллического инсулина.

По литературным данным, в Японии уже около 10 лет существует производство инсулина из рыб, которое дает от 60 до 70% общей продукции инсулина. Средний вес желез рыб, употребляемых в производстве, равен 0,03 г и от одной рыбы получают около одной международной единицы инсулина. При заготовке железы консервируют насыщенным раствором пикриновой кислоты, а в дальнейшем извлекают пикрат инсулина ацетоном и после соответствующей обработки ацетонового раствора получают осадок солянокислого инсулина, который растворяют в дистиллированной воде при pH около 5 [4].

При наших работах заготовка желез для получения инсулина производилась на экспедиционном судне «Персей II» в октябре 1950 г. и в мае 1951 г.

Для консервирования желез применялись следующие способы:

1. **Замораживание ледосоляной смесью.** Железы собирали в выставленную пергаментом жестяную консервную банку (емкость 400 г), помещенную в ледосоляную смесь; при этом железы сразу замораживали. Банки с замороженными железами закатывали и в дальнейшем хранили в ледосоляной смеси (льда 75% и соли 25%) при температуре около минус 17°.

2. **Обработка подкисленным спиртом.** Железы собирали и замораживали в банках в ледосоляной смеси. После этого железы погружали в этиловый спирт, налитый в стеклянные банки, подкисленный серной кислотой (0,5% кислоты к весу спирта). Банки с пробками хранили во льду.

3. **Обработка пикриновой кислотой.** Железы собирали в стеклянную банку, помещенную в ледосоляную смесь, и по окончании сбора заливали двойным (по весу) количеством насыщенного раствора пикриновой кислоты. Затем банки с материалом выдерживали при 10—15° в течение 6—8 часов, чтобы ткани пропитались пикриновой кислотой и далее сохранялись во льду.

По доставке на берег все заготовленные пробы до обработки сохранялись в холодильнике.

В табл. 3 дана характеристика собранного материала, из которого в дальнейшем получали инсулин.

Дальнейшая обработка собранных проб проводилась в зависимости от способа их консервирования.

а) Замороженные железы дважды экстрагировали спиртом, подкисленным серной кислотой. Полученный спиртовой экстракт очищали от балластных белков, после чего инсулин осаждался десятикратным количеством абсолютного спирта. Для полного осаждения смесь оставляли на сутки на холоде, затем выпавший осадок инсулина-сырца отделяли, высушивали серным эфиром и взвешивали.

б) Железы, консервированные подкисленным спиртом, отделяли от спиртового экстракта, измельчали и еще раз экстрагировали подкисленным спиртом. Спиртовые экстракты соединяли и обрабатывали для выделения инсулина-сырца, как указано выше.

в) Железы, консервированные насыщенным раствором пикриновой кислоты, обрабатывали по способу, описанному Мияучи [4]. К консервированным пикриновой кислотой железам прибавляют кварцевый песок и небольшое количество ацетона, тщательно растирают массу в ступке и фильтруют. Операцию повторяют несколько раз с новыми порциями ацетона до тех пор, пока не будет израсходовано, примерно, восьмикратное его количество. Ацетоновые экстракты смешивают, выдерживают 2—3 часа при комнатной температуре и затем фильтруют.

Прозрачный ацетоновый экстракт выпаривают под вакуумом при температуре 40—42° для удаления ацетона. От оставшегося водного раствора отделяют жир путем растворения его в серном эфире, после

чего из раствора выпадает коричневый осадок пикрата инсулина. Последний отделяют и растворяют в смеси этилового спирта (3 части) и нормального раствора соляной кислоты (1 часть). Раствор фильтруют и медленно выливают при помешивании в чистый ацетон, для осаждения солянокислого инсулина. Выпавший осадок отделяют, промывают чистым ацетоном и затем серным эфиром.

Таблица 3

Номера проб	Время заготовки железы	Количество рыбы, от которой взята проба		Продолжительность сбора (в часах)	Вес пробы желез (в г)
		штук	вес (в кг)		

Замороженные пробы

1	Октябрь 1950 г.	264	1200	—	40,8
2		114	500	30 минут	23,2
3		335	1500	1 час 30 "	66
1	Май 1951 г.	—	550	1 " 40 "	17
2		—	150	1 " 10 "	19

Пробы, консервированные подкисленным спиртом

4	Октябрь 1950 г.	92	500	25 минут	20
9	Май 1951 г.	—	220	2 часа 30 "	30
11 (б)		—	500	2 "	23
11 (с)		—	500	1 час 20 минут	38
12 (св)		—	500	1 " 20 "	35
III+IV		—	1700	2 часа 30 "	90
V		—	1000	1 час	140
VI		—	1000	1 "	76

Пробы, консервированные пикриновой кислотой

1	Май 1951 г.	—	1200	2 часа 30 минут	125
2		—	1500	4 " 30 "	85
3		—	1300	2 " 50 "	132

Полученные описанными выше способами инсулин-сырец и солянокислый инсулин для установления их активности подвергались биологическому испытанию на кроликах.

Испытания проводились биостанцией ЦНИЛ органо-терапевтических препаратов под руководством А. В. Чуваева.

Таблица 4

Номера проб	Способ консервирования пробы	Количество желез (в г)	Продолжительность хранения желез (в сутках)	Получено инсулина-сырца (в мг)	Активность (в международных единицах)	
					препарата инсулина на мг	железы на кг
1	Замораживание	40,8	11	850	0,12	2600
2		23,2	8	130	0,40	2200
3		66,0	6	290	0,90	4000
1		17,0	8	100	0	0
2		19,0	7	90	0	0
4	Обработка подкисленным спиртом	20	4	340	0,3	6500
9		30	4	103	3,50	11500
11(б)		23	3	72	1,00	3130
10(с)		38	3	71	3,0	5600
12(св)		35	3	—	—	—
III+IV		90	3	112	0	0
V		140	3	260	1,50	3000
VI		76	3	117	1,50	2300
1п	Обработка пикриновой кислотой	125	7	100	4,00	3330
2п		85	5	35	—	0
3п		132	2	Осадок не выпал	—	—

Результаты биологических испытаний приведены в табл. 4.

Как показали опыты, хранение желез в ледосоляной смеси на рыболовных судах не обеспечивает достаточной сохранности инсулина ввиду трудности поддержания низкой и устойчивой температуры смеси на протяжении длительного срока.

Активность препарата, выделенного из замороженной желез, оказалась не выше 4000 международных единиц.

Значительно лучше сохранялись желез в подкисленном спирте. В этом случае получено инсулина до 11 500, а в среднем 5300 международных единиц (из 1 кг желез).

Хранение в пикриновой кислоте не дало ожидаемых результатов. Активность проб в одном случае была равна 0, в другом — только несколько более 3000 международных единиц.

В ы в о ы

1. Инсулиновые желез (островки) трески содержат очень большое количество эндокринной ткани (не менее 50%). В некоторых случаях желез состоят почти сплошь из эндокринной ткани.

2. Из испытанных способов консервирования желез (замораживание в ледосоляной смеси, обработка подкисленным спиртом, насыщенным раствором пикриновой кислоты) лучшие результаты при кратковременном хранении (до 5 суток) получены при консервировании подкисленным спиртом.

3. Так как хранение в ледосоляной смеси не обеспечивает хорошего качества инсулинового сырья, то для консервирования желез холодом на судах необходимо иметь небольшие холодильные шкафы, обеспечивающие температуру около минус 15—20°.

4. Содержание инсулина в железах трески во много раз выше, чем в поджелудочной железе крупного рогатого скота и, по данным нашей работы, в указанных выше условиях заготовки может достигать 11 500 международных единиц на 1 кг железы.

5. Некоторые трудности организации заготовки желез в условиях морского промысла на судах и, в частности, трудоемкость сбора желез (по нашим наблюдениям, один сборщик может собрать в день около 250 г железы) позволяют предполагать, что стоимость инсулина из трескового сырья будет выше, чем из желез крупного рогатого скота.

6. Учитывая обнаруженное высокое содержание инсулина в железах трески, а также большую потребность в инсулиновом сырье, представляется целесообразным исследовать другие виды рыб и главным образом морских животных с целью получения инсулина.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Роскин Г. И., Микроскопическая техника, изд. «Советская наука», 1950.
 2. McCormick N. A., Die Distribution and structure of the Islands of Langerhaus in certain fresh water and marine fishes, Transactions of the Royal Canad. Inst., 1924, v. 15.
 3. McCormick N. A., Insulin from fish, Bull. of the Biol. Board of Canada, 1924, VII—XII.
 4. Miyauchi D. T., Some processing and technol. methods in the Japanese Fisheries, Comm. fisher. Review, v. 12, № 10, 1950.
 5. Rennie J., Quart. Journ. of microscopie Anat. 1904—1905.
 6. Zeile K., Über Fischinsulin, Pharmazie, 1950, H. 7.
-