

Из Факультетской Терапевтической клиники (директор проф. М. Н. Чебоксаров) и Фармакологической лаборатории Казанского Университета (заведующий пр.-доц. В. М. Соколов).

О билирубинемии.

Д-ра Е. С. Алексеева.

За последние годы среди клиницистов и патологов замечается усиленный интерес к выяснению сущности желтухи. Не касаясь здесь литературы этого вопроса, подробно приведенной в статье д-ра Лепской, напечатанной в 4-й книжке Каз. Мед. Журнала за 1923 г., останавлиюсь лишь вкратце на работах Aschoff'a и его школы.

Aschoff и его ученики подошли к разрешению вопроса о патогенезе желтухи, заинтересовавшись ролью в этом процессе звездчатых клеток Kupffer'a. Рядом опытов Mc Nee, Lerehne'a и др. была установлена несомненная связь означенных клеток с появлением желтухи, именно, их резкое увеличение в числе при отравлении птиц мышьяковистым водородом, наполнение обломками красных кровяных телец, железом и зеленовато-желтым пигментом (билирубином). На основании этого Aschoff'ом было высказано мнение, что при физиологических условиях элементами, образующими билирубин, именно и являются эти клетки ретикуло-эндотелиального аппарата печени, собственно же печеночные клетки несут функцию исключительно выделительную.

Вскоре появился ряд сообщений о том, что билирубинообразовательной способностью обладает также ретикуло-эндотелиальная ткань селезенки, костного мозга, а некоторые авторы утверждали, что означенной способностью обладает всякая эндотелиальная клетка любого органа. В селезенке при нормальных условиях были обнаружены эритрофаги—клетки, поглощающие обломки эритроцитов и содержащие железистый пигмент, причем часть эритроцитов, не поглощенных этими клетками, подвергается, возможно, в селезенке каким-то изменениям, вследствие чего они легче потом перерабатываются Kupffer'овскими клетками печени.

На основании этих данных, а также на основании опытов Lerehne'a с отравлением птиц мышьяковистым водородом после предварительного удаления у них селезенки и „блокирования“ Кур-

рfer'овских клеток печени колларголом Aschoff и построил свои воззрения на патогенез желтухи. Он делит все желтухи на три основные формы: 1) продуктивную желтуху, возникающую вследствие избыточного образования билирубина, в которой относится желтуха при пернициозной анемии, малярии, пневмонии и пр.; 2) ретенционную желтуху, являющуюся результатом расстройства выделения печеночными клетками нормально образованного билирубина, куда он относит некоторые токсические формы, и 3) механическую желтуху, возникающую при нормальном образовании и выделении желчных пигментов, как результат прямого поступления желчи в лимфу и кровь, вследствие механического препятствия в желчных ходах.

Появившиеся за последнее десятилетие работы H y m a n s v a n d e r B e r g h'a существенно подвинули вперед вопрос о патогенезе желтух, открыв широкие горизонты для клиницистов. Помимо того, что этот автор подтвердил взгляды Aschoff'a, он рядом опытов и наблюдений доказал возможность внепеченочного образования билирубина с помощью предложенной им диазореакции Ehrlich'a. Самое же важное открытие v. d. B e r g h'a заключается в том, что в организме, по его мнению, мы имеем дело с двумя разновидностями билирубина, дающими реакцию различно. Так, он подметил, что при желтухах застойного типа диазореакция с билирубином происходит непосредственно с сывороткой через 20"-30" („прямая реакция"), при желтухах же иного характера означенная реакция получается значительно позже, или не получается совсем, и чтобы получить ее, нужно предварительно обработать сыворотку двумя объемами алкоголя, т. е. перевести билирубин в алкогольный раствор (такая реакция названа автором непрямой).

Это различное выпадение реакции в зависимости от характера патогенеза желтухи дало повод v. d. B e r g h'y вывести заключение, что в обоих случаях имеется дело с двумя модификациями билирубина: печеночного и внепеченочного происхождения.

Почему в одних случаях билирубин дает прямую реакцию, в других—непрямую, автор пытался объяснить связью билирубина с белковой молекулой крови: по его мнению билирубин, прошедший через печень, дающий прямую реакцию, циркулирует в крови в свободном состоянии, билирубин же, образованный вне печени и не прошедший через ее клетки, находится в крови в связанном состоянии с белками, а потому дает диазореакцию после их осаждения и перевода его в раствор, т. е. непрямую реакцию.

От этой причины, по мнению v. d. B e r g h'a, зависит и тот факт, что при желтухах механического характера билирубин, находясь в крови в свободном состоянии, легче покидает организм,

выделяясь почками, с мочей, билирубин же продуктивного происхождения, будучи связан с белковой молекулой крови, почками так легко выделяться не может.

Физиологическую билирубинэмию v. d. Bergh объясняет способностью печеночных клеток выделять не весь билирубин в желчные капилляры, а часть его оставлять в крови, и способностью почечных клеток выделять его с мочей только при накоплении его в крови до известного уровня (1:60.000).

Классификация желтух у v. d. Bergh'a—та же, что и у Aschoff'a, только он дает иные названия разным формам желтухи. Так, первую форму,—продуктивную по Aschoff'y,—он называет *динамической*, за второй группой оставляет те же причинные моменты, что и Aschoff, третью же, механическую форму он называет *резорбиционной*.

Вскоре за опубликованием v. d. Bergh'ом первых работ по вопросу о желтухах появилось его сообщение о методе количественного определения билирубина в кровяной сыворотке при помощи колориметра,—методе, позволяющем с достаточной точностью судить о колебаниях количества красящих веществ желчи в крови при различного рода желтухах и др. заболеваниях.

Чтобы проверить данные означенных работ и метод v. d. Bergh'a, я, по предложению проф. М. Н. Чебоксарова, занялся этим вопросом на стационарном и амбулаторном материале Факультетской Терапевтической клиники Казанского Университета, а также путем эксперимента на животных. Для своих исследований я пользовался кровяной сывороткой, экссудатами, транссудатами, желудочным и поджелудочным соками, добытыми зондом Einhorn'a, а также чистой желчью из желчного пузыря и из d. choledochus и hepaticus у больных, оперированных в Хирургической клинике проф. А. В. Вишневского. Всего мною было сделано 170 исследований, считая в том числе и 12 исследований крови здоровых лиц.

Примененная при этом методика исследования крови была следующая: добытая сухим шприцем из вены локтевого сгиба кровь в количестве 3 куб. сант. выливалась в сухую пробирку с 2—3 каплями 20% раствора Na. citrici, оставлялась на 2—3 часа для оседания форменных элементов и центрифугировалась. Полученная сыворотка и служила материалом для производства с ней реакций.

Диазореактив (диазосмесь) мною приготавливался тотчас перед исследованием, ex tempore, путем смешивания 49 ч. диазореактива Ehrlich'a № 1 и 1 ч. диазореактива Ehrlich'a № 2. Для производства прямой реакции бралось 0,5 к. с. исследуемой кровяной сыворотки, или другой жидкости, и в тонкой пробирке смешивалось

с 0,25 к. с. диазосмеси. Для контроля я смешивал в другой пробирке 0,5 к. с. сыворотки с 0,25 к. с. физиологического раствора. В случае положительного выпадения реакции вся смесь окрашивалась в серо-фиолетово-красный цвет или через несколько секунд—моментальная реакция, или через 3-10 минут и более—замедленная реакция. В некоторых случаях появившаяся слабо-положительная реакция усиливалась через некоторое время, т. е. получалась т. наз. двухфазная реакция. При малом количестве сыворотки я обычно обходился без контрольной пробирки, для чего диазосмесь (1,25 к. с.) смешивал не со всей сывороткой (0,5 к. с.), а только с верхней половиной ее. Изменение цвета смеси верхней половины было заметно вполне отчетливо сравнительно с неизменной сывороткой в нижней части пробирки. Гемолиз сыворотки сильно мешал реакции, скрадывая ее ясность.

Для получения алкогольной вытяжки 0,5 к. с. сыворотки смешивалось в центрифугальной пробирке с 1 к. с. 96% алкоголя и центрифугировалось. Осадок, нормально почти бесцветный, при гемолитических сыворотках имел красноватый цвет от увлечения в него гемоглобина, осадок желтушных сывороток окрашивался в желто-бурый цвет от увлечения в него красящих веществ желчи; при промывании такого осадка спиртом с повторным центрифугированием получавшаяся жидкость давала положительную диазореакцию на билирубин; поэтому при содержании в сыворотке большого количества красящих веществ желчи я обычно разводил ее физиологическим раствором и из разведенной уже делал алкогольную вытяжку; осадок тогда почти не окрашивался, и весь билирубин переходил в раствор, что существенно важно при количественном определении его колориметрическим путем.

Необходимо еще отметить факт, встречавшийся мне весьма часто,—что при желтухах застойного типа белковый осадок всегда был больше: при этих формах, по моим данным, его количество колеблется в пределах от 0,35 до 0,5, при динамических же формах—в пределах от 0,2 до 0,3. Цвет алкогольной вытяжки у здоровых лиц—светло-соломенно-желтый, у желтушных больных—от лимонно-желтого до цвета пива.

Непрямая реакция, производимая с алкогольной вытяжкой, технически проста: к 0,5—1 к. с. вытяжки прибавляется 0,25 к. с. диазосмеси; появляющееся фиолетово-розовое, фиолетово-красное или вишнево-фиолетовое окрашивание говорит за положительный результат реакции. Реакция, получающаяся тотчас после прибавления диазосмеси, будет моментальной, через 2-5 минут—замедленной, появивляющаяся в начале в виде следов и усиливающаяся с течением времени—двухфазной.

Для количественного определения билирубина я пользовался колориметром Autenrith'a, полый стеклянный клин которого наполнялся 70% спиртовым раствором чистого билирубина концентрации 1:200.000 с добавлением 2,5 к. с. диазосмеси. Для приготовления такого раствора 0,005 чистого билирубина Merck'a растворялось в 100 к. с. хлороформа, 1 к. с. этого раствора выпаривался в фарфоровой чашечке на водяной бане, и к сухому остатку при-

бавлялось 10 к. с. 70% спирта. По растворении сухого остатка к спирту прибавлялось 2,5 к. с. диазосмеси, причем получалось красивое фиолетово-красное окрашивание всей смеси. При пользовании колориметром в стеклянный стаканчик наливалась исследуемая кровяная сыворотка, и путем поднятия или опускания клина (при помощи винта) была находима соответствующая высота, при которой цвета жидкостей в стаканчике и клине были одинаковы. Отметив по шкале цифру, легко по ней было вычислить количество билирубина либо по таблице, либо по основным формулам колориметрии. Если исследуемая сыворотка по цвету была окрашена сильнее штандарта, то соответствующим разведением я делал ее сравнимой, что, конечно, должно было учитываться при вычислении количества билирубина. При долгом стоянии на свету штандарт менялся в цвете из преимущественно фиолетово-красного в фиолетово-розовый и розово-фиолетовый, что, понятно, отражалось на точности вычисления. Так, с одной и той же сывороткой старый штандарт дал у меня концентрацию билирубина 3,5: 200.000, а свежее-приготовленный—1,5: 200.000. Поэтому я по возможности пользовался каждый раз свежим штандартом, или штандартом 2—3-дневной давности при хранении его в темном месте. Сыворотку для исследования я брал также свежую, так как при стоянии она теряет часть красящих веществ желчи,—факт, отмеченный Lerehne'ом, который я могу подтвердить на основании собственных наблюдений.

Прямая реакция у меня оказывалась всегда положительной при желтухах застойного характера—от сдавления крупных желчных путей опухолями, от закупорки их камнями при приступах желчнокаменной болезни и при резко выраженных явлениях воспалительного ангиохолита. Чистая желчь из желчного пузыря, ducti choledochi et hepatici, а также свежие, только что добытые желудочный и поджелудочный соки также давали прямую реакцию. Во всех упомянутых случаях реакция выпадала моментально по прибавлении диазосмеси, и таким образом перечисленные роды желтух должны быть отнесены, по Aschoffу-v. d. Berghу, к механическим и резорбционным, т. е. здесь идет вопрос не о перепроизводстве билирубина, а об его задержке.

В других случаях желтух реакция имела явно замедленный тип. Так, при инфекционных желтухах она становилась заметной через 4—5 и более минут, достигая своего maximum'a через 12—24 и более часов. В одном случае очень резкой желтухи инфекционного характера прямая реакция, однако, выпала положительной моментально, ясно усилившись через 12 часов и став, таким образом, двухфазного характера. Вторичное исследование кровяной сыворотки, добытой через несколько дней при явлениях улучшения болезненного состояния больной, дало в этом случае прямую реакцию только лишь замедленного типа. Здесь желтуха была, очевидно,

двойного происхождения: механического—вследствие закупоривания воспалительными продуктами желчных ходов и ретенционного—вследствие нарушения функций печеночных клеток под влиянием интоксикации. Ретикуло-эндотелиальный аппарат в этих формах желтух, повидимому, никакого участия не принимает.

Замедленная прямая реакция получалась у меня также в случаях очень сильной декомпенсации сердечной деятельности при пороках сердца, в тяжелых случаях возвратного тифа и крупозной пневмонии, сопровождавшихся желтушной окраской кожи; с улучшением состояния больных и исчезанием явлений декомпенсации—прямая реакция исчезала.

Весьма характерно было выпадение прямой реакции замедленного типа при инфекционных желтухах: появляясь с первых дней заболевания, она стойко держалась в течении всей болезни; даже с исчезновением желтушной окраски кожи и желчных пигментов и уробилина в моче, при явлениях полного внешнего выздоровления больного, она в течении 2—3 дней все же выпадала положительной, уменьшаясь в своей резкости постепенно до едва заметных следов и затем пропадая совершенно.

Непрямая реакция *v. d. Bergh'a* с алкогольной вытяжкой кровяной сыворотки выпадала физиологически у совершенно-здоровых лиц. При этом концентрация билирубина колориметрически, по моим данным, колебалась у здоровых лиц в пределах от 0,16 до 0,2: 200.000. Выпадала непрямая реакция у здоровых лиц моментально. В патологических состояниях, при билирубинемии, эти цифры значительно повышались в зависимости от резкости ее. Навысшую цифру дала у меня сыворотка больного с раком печени—5: 200.000.

Что касается связи выпадения прямой и непрямой реакции с кровяной сывороткой при желтухах, то в этом отношении можно разделить все формы желтухи на 2 группы: в одной выпадает прямая реакция, в другой прямая реакция отсутствует, а выпадает одна лишь непрямая с различной концентрацией билирубина. По времени наступления реакции, как и при прямой реакции, можно в некоторых случаях и здесь отметить разницу: она может наступить тотчас после добавления диазосмеси и через 3—5 минут, а равно может, появившись сразу, усилиться через несколько часов.

К заболеваниям, сопровождающимся желтухой и дающим одну лишь непрямую реакцию, по моим наблюдениям, следует отнести малярию, гемолитическую желтуху, пернициозную анемию и крупозную пневмонию. Опираясь на данные *Aschoffa*, выпадение одной лишь непрямой реакции при указанных заболеваниях можно объяснить действием ретикуло-эндотелиального аппарата в смысле

усиленной продукции билирубина или одной из стадий превращения красящих веществ крови в билирубин. Билирубин этот должен быть отнесен, по схеме Aschoff'a, к продуктивному, а по схеме v. d. Bergh'a—к динамическому.

Колебания количества билирубина мне удалось подметить при крупозной пневмонии и декомпенсированных пороках сердца—в том отношении, что при улучшении болезненного состояния, напр., в конце пневмонии, при кризисах, титр билирубина падал, при псевдокризисах давал небольшие колебания, при ухудшении состояния и при появлении нового фокуса всегда повышался; равным образом понижался титр билирубина с уменьшением явлений декомпенсации и улучшением сердечной деятельности.

Весьма характерно влияние селезенки на титр билирубина при пернициозной анемии: в одном случае этой болезни со своеобразной желтушной окраской склер и кожи, который нам удалось проследить в клинике в течение нескольких недель, оказалась постоянно выпадающею одна непрямая реакция замедленного типа, причем титр билирубина по колориметру с течением времени все возрастал—с 0,25: 200.000 до 0,38: 200.000, параллельно с ухудшением картины крови и состояния больного. В заключение этому больному была сделана проф. А. В. Вишневским операция удаления селезенки. В периферической крови больного, добытой непосредственно перед операцией, титр билирубина был 0,4: 200.000; в крови селезеночной вены, добытой во время операции, он оказался равным 0,95: 200.000, т. е. в $2\frac{1}{2}$ раза больше, а через 20 дней после операции исследование крови дало нам опять одну лишь непрямую реакцию, но моментального типа, с титром билирубина 0,18: 200.000. Таким образом указанный случай, подтверждая мнение Aschoff'a-v. d. Bergh'a о возможности образования билирубина вне печени, ретикуло-эндотелиальным аппаратом селезенки, должен нами рассматриваться, по схеме Aschoff'a-v. d. Bergh'a, как продуктивно-динамический.

Огнositельно связи появления желтушной окраски покровов и билирубинурии с билирубинемией я, на основании своих случаев, могу отметить, что самым ранним и верным признаком повышенного содержания билирубина в организме является билирубинемия; вскоре затем появляется желтушная окраска склер и покровов, а при достижении билирубинемией известного уровня появляется билирубинурия в зависимости от характера и происхождения желтухи. При резорбционных желтухах билирубинемия в моих случаях выступала при титре билирубина в крови около 0,4: 200.000, при желтухах, бывших результатом страдания печеночных клеток,—0,18:200.000 и ниже в зависимости от степени катарального набухания желчных

ходов, а в динамических формах она не наступала даже при титре билирубина в крови 3,2: 200.000.

Подводя итог результатам наших клинических наблюдений над реакциями v. d. Bergh'a, мы вправе сделать следующие заключения:

1) Реакции эти специфичны для билирубина и несомненно представляют большую ценность, давая возможность лучше анализировать каждый случай желтухи.

2) По выпадению прямой или непрямой реакции необходимо признать двоякое происхождение билирубина—печеночное и внепеченочное.

3) Прямая реакция получается при желтухах механического происхождения, а также в случаях, когда нарушается функция печеночной клетки.

4) Прямая реакция моментального типа специфична для желтух механического происхождения, замедленный тип реакции характерен для случаев с нарушением функции печеночной клетки, а двухфазность реакции присуща смешанным формам желтух.

5) Непрямая реакция получается при пернициозной анемии, гемолитической желтухе, малярии, крупозной пневмонии и др.

6) Владея методом v. d. Bergh'a, мы можем судить о колебаниях количества билирубина в крови больного в течение болезненного процесса и делать из этого те или иные прогностические выводы, а появление прямой или непрямой реакции, смена одной реакции другой, двухфазный тип реакции и скорость наступления их помогают нам лучше разобраться в патогенезе желтухи в клинике.

7) По своей простоте и удобству метод v. d. Bergh'a вполне применим для клинической работы и должен занять подобающее место среди других методов клинического исследования.

После того, как клинические наблюдения побудили нас согласиться с мнением v. d. Bergh'a о возможности присутствия в крови больных двух модификаций билирубина—печеночного и внепеченочного происхождения, а также о возможности определения их по выпадению прямой или непрямой реакции и по скорости их наступления, я решил обратиться к проверке этих данных экспериментальным путем на животных. При выборе последних я остановился на собаках потому, что у них нормально билирубина в сыворотке не содержится, а потому легче могут быть замечены первые признаки появления его. Работа моя производится в Фармакологической лаборатории Казанского Университета при непосредственном участии и помощи заведующего лабораторией пр.-доц. В. М. Соколова.

Задачей работы было тем или иным путем вызвать у животных появление желтухи, которую можно было-бы отнести к одной

из групп схемы Aschoff'a-v. d. Bergh'a, и затем проследить за выпадением той или иной реакции,—другими словами — вызывать у животных желтуху застойного характера (механическо-резорбционная форма), желтуху от избыточного образования билирубина ретикуло-эндотелиальным аппаратом (продуктивно-динамическая форма) и желтуху вследствие нарушения выделительной функции печеночных клеток (ретенционная форма Aschoff'a). Кроме того, в мою задачу входило выяснение роли ретикуло-эндотелиальной ткани в процессе образования билирубина в организме животного. Для этой цели я пока остановился на селезенке, стремясь установить ее билирубинообразовательную функцию.

Так как в клинических случаях при желтухах механического происхождения у меня всегда выпадала положительной прямая реакция v. d. Bergh'a, то для того, чтобы установить указанную связь, мною была произведена на собаке операция перевязки общего желчного протока с частичной его резекцией, с последующими исследованиями крови и мочи на желчные пигменты. До операции в периферической крови собаки билирубин мною не был обнаружен ни разу, через двое же суток после операции в крови собаки была обнаружена, в виде следов, положительная прямая реакция; на третьи сутки появилось слабое желтушное окрашивание склер и слизистой рта, и развилась заметная билирубинурия, прямая реакция в крови сделалась заметно - положительною, моментального типа, и появилась непрямая реакция, титр билирубина был 0,4:200 000. На 5-е сутки прямая реакция сделалась очень резкой, появлялась моментально; непрямая реакция тоже получилась резко - положительная; колориметрически титр билирубина оказался равным 0,55:200 000. В дальнейших исследованиях повышение титра билирубина в кровяной сыворотке происходило медленно, а выделение желчных пигментов с мочей резко усилилось. На 10-й день собака была убита, причем на вскрытии были обнаружены резкое пропитывание желчью всех органов и тканей, увеличение печени и желчного пузыря, и желчные ходы оказались растянутыми желчью в виде толстых извилистых шнуров. Из желчного пузыря было добыто 30 к. с. густой, темной, слизистой желчи, тянувшейся в нити. Прямая реакция с желчью получилась такого же характера, как и с кровяной сывороткой.

Этот опыт подтверждает заключение v. d. Bergh'a, что при механических препятствиях для оттока желчи в кишечник последняя, попадая в кровь, дает положительную прямую реакцию. Кроме того данный опыт дает некоторое основание подтвердить мнение L e r e h n e'a о значении двухфазной реакции на билирубин при смешанных формах желтух: в данном случае была застойная желтуха и, как результат длительного застоя, возможно, имело место нарушение функции печеночных клеток, в результате чего у нас прямая реакция стала выпадать двухфазного характера.

Для получения желтухи гемолитического внепеченочного происхождения мною было проделан следующий опыт:

Собаке под кожу сделана ин'екция 5 к. с. 10% раствора фенилгидрацина. Через 3 дня ин'екция повторена. В результате у животного появился сильный распад красных кровяных тельц (количество их с 7 милл. упало до 1 милл.) и резкое желтушное окрашивание склер и слизистой рта. Через сутки после первой ин'екции в крови появилась непрямая реакция v. d. Bergh'a. Через сутки после второй ин'екции появились слабо-положительная прямая реакция замедленного типа и очень резкая непрямая. Через 5 суток после второй ин'екции прямая реакция в кровяной сыворотке исчезла; непрямая оставалась резко-положительной; титр билирубина был 0,8:200.000. Через 7 дней, с восстановлением формулы крови, исчезла и непрямая реакция.

Таким образом наши теоретические предположения о возможности появления в подобных случаях в крови билирубина внепеченочного происхождения, дающего непрямую реакцию, вполне оправдались. На появление прямой реакции после вторичной ин'екции фенилгидрацина, повидимому, следует смотреть, как на результат нарушения функций печеночных клеток под влиянием яда.

Для выяснения роли селезенки в образовании билирубина мною проделаны опыты с переживающей селезенкой собаки и пропусканьем через нее дефибринированной крови. Через 6 часов пропускания крови через орган, при соблюдении всех требуемых условий—температуры и пр., в пропускаемой крови появилась положительной только одна непрямая реакция.

Этот опыт подтверждает участие селезенки в билирубинообразовательной функции и то, что образованный ею билирубин дает непрямую реакцию, клинически получающуюся у больных с желтухой внепеченочного типа.

Далее мне удалось проделать опыт с пропусканьем дефибринированной крови собаки через селезенку человека, удаленную по поводу пернициозной анемии. В периферической крови больного, добытой во время операции, прямая реакция отсутствовала, непрямая была резко-положительной, титр билирубина—0,4:200.000. В крови селезеночной вены прямая реакция также отсутствовала, а непрямая была резко-положительная с титром билирубина 0,95:200.000. При пропусканьи через удаленную селезенку дефибринированной крови собаки втечении 4 $\frac{1}{2}$ часов мне удалось получить в пропускаемой крови положительную непрямую реакцию, тогда как в дефибринированной крови перед пропусканьем ее через орган и в промывных водах Ringer'овского раствора эта реакция оказалась отрицательною.

Таким образом и здесь, несмотря на значительное несоответствие в химико-биологических свойствах органа человека и крови собаки, мне удалось подтвердить возможность образования билирубина в изолированной селезенке.