

Получение стойких кристаллов гемоглобина из крови человека ¹⁾).

Заведующего кабинетом доцента А. Д. Гусева.

Более 80 лет прошло с того времени, как была открыта способность гемоглобина к кристаллизации, но следует сознаться, что и до сих пор мы встречаемся с большими затруднениями при попытках получить стойкие кристаллы этого вещества, а из крови некоторых животных и совсем не можем еще получить таких кристаллов. Между тем с того времени, как Hünefeld ²⁾ впервые описал полученные им между двумя стеклянными пластинками кристаллы высыхающей в эксикаторе крови, появилось немало трудов, посвященных методике получения кристаллов гемоглобина и описанию их кристаллографических форм.

Я не буду останавливаться на всей огромной литературе этого вопроса, а отмечу только, что все эти работы можно разделить на две группы: одни из них имели целью получение кристаллического гемоглобина для изучения его свойств, другие же главным образом были направлены на установку отличий крови различных животных по форме кристаллов гемоглобина. Вполне естественно, что эта вторая группа исследований появилась уже после того, как были изучены важнейшие морфологические свойства кристаллов.

К первой группе исследований надо отнести прежде всего наблюдения Reichert'a ³⁾ над кристаллами, найденными им на поверхности следа морской свинки, затем наблюдения Kölliker'a, Leydig'a и Budge, но первым, самостоятельно, а не случайно получившим такие кристаллы, следует считать Otto Funke ⁴⁾, которому удалось получить, между прочим, и кристаллы гемоглобина из крови человека, но в очень небольшом количестве, в подсыхающей по краям капле крови.

После того, как Al. Rollett, Lehmann, Horre-Seyler, Böttcher, Kühne дали свои методы получения кристаллического гемоглобина, вопрос о способности последнего к кристаллизации был окончательно разрешен, и разница в форме кристаллов была положена в основу попыток определения вида животного при судебно-медицинском исследовании пятен крови. Вопрос этот был крайне существенен, так как в то время биологическая проба Uhlenhuth'a еще не была

¹⁾ Сообщено в Физиологической секции Общества Врачей при Казанском Университете 22/II 1928.

²⁾ Der Chemismus in der tierischen Organisation. Leipzig. 1840.

³⁾ Beobachtungen über eine eiweissartige Substanz in Krystallform. Arch. f. Anat., Phys. und Wiss. Med., 1849.

⁴⁾ Zeit. f. rat. Medicin, N. F., 1, 1851.

известна, определение же вида крови являлось неотложным вопросом судебно-медицинской практики.

Первая работа в этом направлении принадлежала Misugasa¹⁾, а спустя несколько месяцев после нее появилась небольшая работа по тому же вопросу Moncton-Coréman²⁾. Сводка судебно-медицинских работ по вопросу о получении кристаллов гемоглобина дана Дворинченко³⁾, к труду которого мы и отсылаем всех, желающих ознакомиться с историческим развитием этого вопроса. Здесь же я отмечу только, что и после того, как проба Uhlenhuth'a вполне заслуженно вошла в судебно-медицинскую практику, вопрос о судебно-медицинском значении кристаллов гемоглобина не остался забытым, и в 1905 году появилась в печати работа Бокариуса⁴⁾, а в 1924 году—работа Амантеа⁵⁾, обе посвященные судебно-медицинскому значению кристаллов гемоглобина.

В настоящее время вопрос о получении кристаллического гемоглобина вновь приобретает особую важность для судебной медицины в связи с указаниями возможности получения гемоглобин-преципитинов. Первым получил их Higashi⁶⁾ в 1923 году, а в 1927 году гемоглобин-преципитины были получены и в нашей лаборатории⁷⁾. Получение гемоглобин-преципитинов должно повести к полной реформе судебно-медицинского исследования крови, но, к сожалению, до сих пор не было получено стойких кристаллов гемоглобина из крови человека в количестве, достаточном для перекристаллизации их и дальнейшего применения в качестве антигена. Вследствие этого вопрос о получении таковых кристаллов стал неотложным вопросом текущего времени. Настоящая работа именно и посвящается опытам, поставленным в нашей лаборатории с целью выработать такую методику, при помощи которой можно было бы получить достаточное количество стойкого кристаллического гемоглобина, способного к перекристаллизации.

В этом направлении нами неоднократно были испытаны наиболее известные способы получения кристаллического гемоглобина. Классических способов, приводимых Preyer'ом⁸⁾ в его капитальном труде о кристаллах крови, давно уже известно пять, а именно: 1) метод Lehmann'a с растворением эритроцитов водой и последующим насыщением полученного раствора кислородом и углекислотой и добавлением спирта и эфира, 2) метод Rollett'a с замораживанием крови, 3) метод Böttcher'a—инъекция животному в вену во время хлороформного наркоза холодной воды, 4) метод Kühne и Thiry с растворением эритроцитов при помощи бычачьей желчи и 5) метод Horpe-Seyley'a—растворение эритроцитов водой и добавление 25% алкоголя.

¹⁾ Sulla importanza della ricerca dei cristalli di emoglobini. Riv. Sperim. 1889.

²⁾ The medico-legal detection of human blood. Brit. Med. Journ., 1889, juli.

³⁾ К вопросу об отличии крови человека от крови млекопитающих животных. Дисс., Харьков, 1893.

⁴⁾ К вопросу о кристаллах гемоглобина с судебно-медицинской точки зрения. Рус. Мед. Вестник, 1905.

⁵⁾ La cristallizzazione dell'emoglobina del sangue disseccato. Zacchia, 1924, № 3—4.

⁶⁾ Ref. b. Zentr. f. gerichtl. Medicin, 1925, Bd. V, H. 2.

⁷⁾ Гусев. К вопросу об эритропреципитинах и гемоглобин-преципитинах. Каз. Мед. Журнал, 1927, № 8.

⁸⁾ Die Blutkrystalle. Jena. 1871.

Один из этих способов, именно, способ Böttcher'a, был для нас, по вполне понятным соображениям, совершенно непригоден, другой—способ Kühne и Thiry—мы не применяли из-за боязни внести вещество, способное изменить природу гемоглобина и загрязнить его, остальные же три способа были испробованы, как вполне пригодные для наших целей.

Первым нами был испробован метод Hoppe-Seyler'a, как наиболее распространенный. Вначале мы его применяли в том существенном видоизменении, которое было выработано Лабораторией биологической химии Казанского Университета¹⁾, кровь же человека мы или брали на судебно-медицинских вскрытиях, или же нами использовались сгустки послеродовой крови, после взятия сыворотки для иммунизации. Сейчас же после взятия сыворотки эритроциты промывались 1% раствором NaCl, смесь отстаивалась и центрифугировалась, затем эритроциты вновь промывались тем же способом еще раз 2—3 и процеживались через полотно для отделения фибрина. К промытым эритроцитам добавлялась для получения лакового раствора дистиллированная вода с примесью эфира, затем строма эритроцитов отделялась продолжительным центрифугированием, лаковый раствор сливался в стеклянный сосуд, охлаждался при температуре от -3° до -20° , и к нему осторожно добавлялся охлажденный до той же температуры 95% алкоголь. Количество добавляемого алкоголя колебалось в отдельных опытах в пределах от 25 до 50%. Ни при одном из опытов,—а их было 15,—кристаллов гемоглобина получить не удалось.

Классический метод Hoppe-Seyler'a с применением одного спирта, без эфира, привел к таким же, совершенно отрицательным результатам. Тогда мы перешли к методу, предложенному Rollett'ом²⁾. Rollett, указывая, что добавление различных, растворяющих эритроциты, веществ задерживает кристаллизацию, рекомендует разрушать эритроциты действием холода. Для этого он ставит платиновый тигель, наполненный дефибрированной кровью, в замораживающую смесь, в которой кровь превращается в кусок льда. Через полчаса замерзшая кровь медленно оттаивается, разливается в стеклянки таким образом, что дно последних покрывается слоем крови высотой около 15 миллиметров, и стеклянки эти ставятся в прохладное место с равномерной температурой для кристаллизации, каковая наступает очень скоро („через несколько четвертей часа“). При испытании способа Rollett'a мы применяли кровь, полученную на вскрытиях трупов. Подлинный способ Rollett'a дал нам кристаллы гемоглобина только через трое суток.

Тогда мы стали применять двухкратное замораживание и оттаивание крови с последующим центрифугированием лакового раствора для отделения стромы. При этом вполне подтвердилось указание Rollett'a, что кристаллизация значительно облегчается некоторым загниванием крови, и мы обычно после центрифугирования оставляли полученный раствор (который все-таки еще содержал много стромы) при комнатной (или несколько выше) температуре до тех пор, пока не начиналось

¹⁾ Дмитриев. К методике получения стойких кристаллов гемоглобина. Каз. Мед. Журнал, 1927, № 4.

²⁾ Versuche und Beobachtungen am Blute. Moleschott, Untersuchungen, IX.

некоторое разжижение и загнивание крови: после того раствор разлился тонким слоем в чашки Petri и ставился в прохладное место. Через 1—2 суток получались кристаллы гемоглобина во всем разнообразии их форм, но в известной последовательности. Вначале, при микроскопическом исследовании, можно было заметить только одиночные, бледно окрашенные кристаллы, имевшие форму или четырехгранных, или же шестигранных призм, иногда со скошенными концами, образованными двумя наклонными плоскостями. Кроме этих кристаллов вначале еще получались кристаллы, несколько напоминавшие гробовые крышки, но отличные от кристаллов трипельфосфатов; кристаллы эти местами имели более темную окраску и отчасти напоминали кристаллы, описанные проф. Григорьевым ¹⁾ под названием „жировых кристаллов“.

При дальнейшем стоянии крови, обработанной по Rolletty, постепенно получались более типичные кристаллы гемоглобина—сначала в виде неправильных, расходящихся как бы лучами и перекрещивающихся между собой, очень тонких и длинных пластинок, затем к ним прибавлялись прямоугольные плоские пластинки, длина которых в 2—3 раза превышала ширину, и, наконец, образовывались кристаллы в виде довольно толстых прямоугольников. Сравнительно реже получались кристаллы гемоглобина, формой своей напоминавшие раскрытую книгу и, очевидно, представлявшие не одиночные кристаллы, а дружки кристаллов. Количество кристаллов гемоглобина при дальнейшем стоянии крови постепенно увеличивалось, форма их все более и более становилась правильно-прямоугольной, а вместе с тем нарастала и величина отдельных кристаллов, так что дней через 5—6 некоторые из них становились видимыми невооруженным глазом.

Таким образом при применении метода Rolletty нам удалось получить стойкие кристаллы гемоглобина в значительном количестве. Но крупным недостатком метода оказалось то, что кристаллы эти находились среди большого количества стромы эритроцитов, которую не удавалось отделить центрифугированием. Необходимо было как-нибудь видоизменить этот способ, чтобы получить возможность полного отделения стромы и выделения чистых кристаллов. Для этого прежде всего казалось необходимым добавить к крови какой-нибудь жидкости, так как лаковая кровь, полученная по способу Rolletty, была настолько вязка, что даже продолжительное центрифугирование оказывалось недостаточным для отделения стромы.

С этой целью мы изменили методику таким образом: после обычной обработки трупной крови отделением сыворотки, промыванием 1% раствором NaCl, процеживанием через полотно и замораживанием, к полученному лаковому раствору добавлялся малыми порциями охлажденный алкоголь (95%) в количестве, соответствующем 30 частям спирта на 100 частей крови. Затем смесь охлаждалась в снегу с солью. Через 2 часа кристаллов не было. Через 12 часов вся смесь получила вид кашицы, почти сплошь состоявшей из кристаллов гемоглобина трех видов: 1) веретенообразной формы (наибольшее количество), 2) пластинчатых, с расщепленными концами, и 3) правильных прямоугольников. Все эти кристаллы

¹⁾ Об отличительном распознавании крови человека от крови животных по форме кристаллов метгемоглобина и жировых кристаллов. Русский Врач, 1906, № 33.

были нестойки и, при комнатной температуре, при микроскопическом исследовании сначала становились как бы зернистыми, а минут через 5 распыливались и совершенно исчезали.

Попытка центрифугирования этих кристаллов в охлажденной центрифуге оказалась безрезультатной,—кристаллы распоягались по прежнему во всех слоях, и осадить их не удавалось. Тогда к 12 куб. сант. кристаллической кашицы было добавлено 9 к. с. дистиллированной воды, и раствор центрифугировался для отделения стромы. Попытки нового получения кристаллов, тем же способом, из этого раствора, однако, опять не удались. Ряд дальнейших подобных же опытов не дал лучших результатов,—перекристаллизация не удалась ни разу.

Невольно возникала мысль, не оказала ли здесь какого-нибудь влияния продолжительная обработка крови, напр., в смысле изменения содержания кислорода в красящем веществе крови. Еще Moncton-Soreman отметил тот факт, что кристаллы, полученные из крови человека и обезьяны, состоят из восстановленного гемоглобина. Дворниченко указывает, что в то время, как из крови животных можно получить и кристаллы восстановленного гемоглобина, и кристаллы оксигемоглобина, из крови человека всегда получаются кристаллы только первого. То же подтверждает и Bonnel¹⁾.

В виду этого мы произвели спектральное исследование раствора полученной нами кристаллической кашицы после ее центрифугирования. Оказалось, что раствор дает спектр метгемоглобина, а Григорьев давно уже указал, что получить кристаллы последнего можно только из крови животных, и они никогда не получаются из крови человека. Этим, очевидно, и объясняются неудачи наших попыток перекристаллизации гемоглобина. Тогда нами были произведены попытки восстановления образующегося метгемоглобина вначале небольшим количеством сернистого аммония. Получение кристаллов из восстановленного таким образом раствора не удалось. Пришлось думать о добавлении к крови какого-либо другого вещества, которое действовало бы в качестве восстановителя и препятствовало бы переходу гемоглобина в метгемоглобин во время обработки крови.

Вначале, по аналогии с получением гемохромогена, нами был испробован пиридин. После обычного отделения эритроцитов плацентарной крови, кашица их была поставлена в закрытом сосуде на 12 часов при температуре около 17° R, а затем произведено разрушение эритроцитов замораживанием и центрифугированием, причем стромы отделить не удалось. Вся кашица была разделена на две части—первая около 20 куб. сант., вторая—10 куб. сант. К первой порции был добавлен спирт в количестве 6 куб. сант. и 1 куб. сант. эфира, а ко второй порции—3 куб. сант. спирта с 1% пиридина. Через 2½ часа (в смеси с пиридином несколько раньше) получились кристаллы гемоглобина, причем в пробирке с пиридином все они были одной и той же формы—в виде вытянутых шестиугольников, а в смеси с эфиром—кроме таких же кристаллов были и игольчатые кристаллы гемоглобина. Кристаллы эти оказались довольно стойкими и только через трое суток (при хранении их

¹⁾ A propos de la differenciation du sang humain et du sang animal par les cristaux d'hémoglobine. Paris. 1903.

при комнатной температуре) расплывались. В смеси с пиридином стромы оказались значительно меньше, чем в смеси с эфиром. Попытка перекристаллизации по тому же способу с применением спирта в смеси с пиридином опять оказалась неудачной.

Следующий опыт был поставлен таким образом, что эритроциты, выделенные из трупной крови обычным способом, были разрушены двукратным замораживанием, и вся масса их разделена на две части, причем к одной было прибавлено небольшое количество (на кончике ножа) сапонины, как это рекомендует *Amantea*. Под микроскопом было видно, что после добавления сапонины уцелевшие эритроциты быстро растворяются. Эта порция с сапонином была поставлена на холод. Через 10 часов в ней найдена смесь шестиугольных кристаллов гемоглобина с игольчатыми и прямоугольными формами. После центрифугирования в охлажденной центрифуге смесь удалось разделить на 2 части, — в верхней половине находилась смесь игольчатых и прямоугольных кристаллов со стромой, в нижней же — исключительно шестиугольные кристаллы без примеси стромы.

Другая порция той же крови была обработана, как это рекомендует *Кочкин*¹⁾, углекислотой в течение 15 минут, после чего верхние слои раствора (все-таки еще содержавшие строму) были слиты, и к ним добавлено соответствующее количество спирта с пиридином. Нижний слой центрифугировался для более полного осаждения стромы, и к слитому с осадка стромы раствору тоже добавлен спирт с пиридином. В этих растворах только через 3 дня были получены одиночные кристаллы гемоглобина различной формы. Новый опыт с сапонином дал те же результаты. Перекристаллизация при всех этих опытах совершенно не удалась.

*Wedl*²⁾ еще в 1880 году предложил применять для получения кристаллов гемоглобина пирогалловую кислоту в растворе для получения микроскопических препаратов из капли крови и кристаллическую — для получения больших количеств кристаллов из крови животных. В последнем случае *Wedl* брал свежую кровь какого-либо позвоночного животного, оставлял ее стоять в закрытом сосуде от 24 до 48 часов, а затем добавлял пирогалловую кислоту; через 24 часа получались многочисленные кристаллы гемоглобина. Способ *Wedl*'я большого распространения не получил, и большинство авторов предпочли методику *Horre-Seyle*r'a. Между тем применение пирогалловой кислоты, обладающей сильными восстанавливающими свойствами, могло бы оказаться полезным в тех случаях, когда необходимо получение кристаллов восстановленного гемоглобина, так как можно предполагать, что добавление пирогалловой кислоты будет препятствовать окислению гемоглобина.

Исходя из такого предположения, мы попытались применить пирогалловую кислоту для получения кристаллического гемоглобина из крови человека. Для испытания было взято 20 куб. сант. крови из трупа человека. Промывание эритроцитов 1% раствором NaCl, процеживание через полотно и загнивание крови — как и раньше. Затем к эритроцитам добавлено 3½ куб. сант. дистиллированной воды, 1% сапонины и 1% пирогалловой кислоты, и смесь поставлена при температуре ниже 0°. Через

¹⁾ К вопросам о природе гемолитических антигенов. Дисс. Казань, 1911.

²⁾ Ueber ein Verfahren zur Darstellung der Hämoglobinkrystalle. *Virchow's Arch.*, Bd. 80, 1880.

2 дня — кристаллов нет. Тогда к смеси добавлен алкоголь из расчета 30 на 100. Через несколько часов после того в смеси были обнаружены мелкие кристаллы гемоглобина неправильной формы в небольшом количестве.

Следующий опыт был более удачен: взято 30 куб. сант. трупной крови человека, произведены обычное отстаивание и снятие сыворотки, промывание раствором NaCl , процеживание и загнивание; затем добавлено спирту с 1% ас. pyrogallici из расчета 30:100. Уже через 12 часов после этого были получены крупные, видимые невооруженным глазом кристаллы в виде палочек длиной около 3 миллиметров. Кристаллы эти были промыты холодной водой с 1% ас. pyrogallici и спиртом (30 частей на 100 частей воды) и высушены на холоду при $t^0 - 10^0 \text{ C}$. Высушенные кристаллы, оказалось, хорошо сохраняются при комнатной температуре. Быстрое высушивание их при температуре около $+25^0 \text{ C}$ тоже дает возможность сохранить полученные кристаллы, невысушенные же кристаллы при комнатной t^0 быстро расплывались. Попытки высушить кристаллы при комнатной t в эксикаторе над H_2SO_4 оказались неудачными, — кристаллы при такой обработке быстро расплывались.

Еще удачнее оказались попытки сочетания действия низкой t^0 и спиртового раствора пирогалловой кислоты. Методика была такова: взято 200 куб. сант. трупной крови человека; сыворотка, после отстаивания, тщательно снята, фибрин отделен процеживанием через полотно, эритроциты промыты 1% раствором NaCl и поставлены на 18 часов для загнивания при t^0 несколько выше комнатной; затем применено двукратное замораживание для разрушения эритроцитов, по 15 часов каждое, и добавлен охлажденный спирт (в отношении 30 на 100) с 1% пирогалловой кислоты. Тотчас же после добавления спирта образовалось много кристаллов в обычном разнообразии форм, но преимущественно в виде 4 и 6-угольников. Смесь составлена на холоду для дальнейшей кристаллизации. Через 12 часов получилась густая кашица, сплошь состоящая из кристаллов (игловатые, прямоугольные и шестиугольные). Полученная кашица кристаллов была разделена на 2 части, одна из которых, меньшая, была промыта на центрифуге холодной водой со спиртом и пирогалловой кислотой и высушена на фильтровальной бумаге. Другая, большая часть кристаллов была растворена в минимальном количестве дистиллированной воды (под контролем микроскопа) при сильном встряхивании. Тотчас же после растворения кристаллов к раствору их был добавлен обычный спиртовый раствор пирогалловой кислоты. Через 5 часов получилась кристаллическая кашица.

Ряд следующих подобных же опытов с трупной кровью человека дал те же результаты. Перекристаллизация при всех этих опытах была так же удачна, как и в предыдущем опыте. Методика была совершенно та же, почему я и считаю лишним приводить протоколы этих опытов.

Кроме опытов с получением кристаллического гемоглобина из трупной крови человека, нами был поставлен ряд подобных же опытов с плацентарной кровью человека и со сгустками крови, полученными из Кожно-венерической клиники КГУ. Методика получения кристаллов была при этом та же самая, что и раньше, и во всех случаях тоже были получены кристаллы, но эти кристаллы в большинстве случаев отличались тем, что здесь преобладающей формой были вытянутые шестиугольники, прямоугольники же встречались только в некоторых опытах и в небольшом количестве.

Из сравнения результатов этих последних опытов с серией исследований трупной крови получается такое впечатление, что, чем более свежа кровь человека, тем более получается из нее шестугольных кристаллов гемоглобина и тем меньше—обычных прямоугольных и недоразвитых форм. Возможно, что именно этим и объясняется то обстоятельство, что ни одним из прежних авторов не было получено таких форм, и типичной для крови человека до сих пор считалась исключительно прямоугольная форма кристаллов гемоглобина. Дело в том, что форма эта была изучена почти исключительно на микроскопических препаратах, полученных загниванием и испарением или трупной крови, или же водных вытяжек из пятен крови. В настоящее время мы должны отвергнуть этот взгляд и сказать, что из крови человека получают и прямоугольные, и шестугольные кристаллы гемоглобина, причем как те, так и другие должны считаться одинаково часто встречающимися. Даже и в препаратах из трупной крови нам удалось получить шестугольные кристаллы, хотя и в значительно меньшем количестве.

Резюмируя все вышесказанное, мы приходим к следующим выводам:

1. Из крови человека можно получить стойкие кристаллы гемоглобина не только на микроскопических препаратах, но и в больших количествах.

2. Кристаллы эти путем перекристаллизации можно довести до надлежащей чистоты.

3. Наилучшим методом получения кристаллического гемоглобина из крови человека является следующий: кровь отстаивается, с нее снимается сыворотка, затем эритроциты тщательно отмываются 1% раствором NaCl, промываются через полотно и разрушаются двукратным, приблизительно 15-часовым замораживанием и оттаиванием; полученный лаковый раствор оставляется при комнатной t° на 18—24 часа для загнивания, затем к нему добавляется охлажденный 95% винный спирт с 1% пирогалловой кислоты с таким расчетом, чтобы на 100 частей лакового раствора приходилось 30 частей спирта, и смесь ставится на холод для полной кристаллизации; когда получится кристаллическая кашица, последняя фильтруется через бумажный фильтр, осевшие на фильтре кристаллы тщательно промываются дистиллированной водой в смеси со спиртом (30%) и пирогалловой кислотой (1%), затем растворяются в минимальном количестве теплой дистиллированной воды, к раствору вновь добавляется спирт с пирогалловой кислотой, смесь вновь помещается на холод для получения кристаллов, и затем, в случае надобности, вся операция повторяется еще несколько раз до тех пор, пока не будут получены вполне чистые кристаллы гемоглобина.

На описании этой методики я считаю свою задачу законченной, так как дальнейшая работа по определению чистоты полученных таким методом кристаллов гемоглобина должна, по моему мнению, быть проделана специалистами биолого-химиками.

В заключение считаю необходимым сказать, что выработанная нами методика позволила нам получить такое количество кристаллов гемоглобина человека, которого оказалось вполне достаточно для опытов иммунизации кроликов этим гемоглобином. О результате этих опытов будет доложено особо, после окончания иммунизации.