

Zur Biologie der roten Blutzellen.

Von

Otto Warburg.

(Aus der medizinischen Klinik zu Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 13. Februar 1909.)

Eine Beziehung des Zellkerns zu den Oxydationen ist besonders durch Versuche von Ralph Lillie¹⁾ wahrscheinlich geworden.²⁾ An sie anschließend habe ich vorigen Sommer in Neapel den Sauerstoffverbrauch einer Zelle bestimmt,³⁾ deren Protoplasmamasse (relativ) unverändert bleibt und deren Kernmasse rapid wächst. Es ergab sich, daß eine Vermehrung der Kernmasse keine entsprechende Vermehrung der Oxydationsgröße zur Folge hat; daß sich also, eine Beziehung vorausgesetzt, die Oxydationen auf die größere Kernmasse verteilen.

Ich habe diese Studien jetzt an einem andern Objekt fortgesetzt, an den roten Blutzellen der Wirbeltiere. Bekanntlich sind sie bei den Säugetieren in der Regel alle kernlos, bei den übrigen Wirbeltieren kernhaltig. Es fragte sich

1. Haben die kernlosen Erythrocyten einen oxydativen Stoffwechsel? Die ziemlich umfangreiche Literatur ist in den Handbüchern von Herrmann (Zuntz), Nagel (Bohr) und Oppenheimer (Loewy) zusammengestellt.

¹⁾ American Journ. of Physiol., Bd. VII, S. 412 (1902).

²⁾ Arbeiten, die als Beiträge zu dieser Frage gelten können, hat J. Loeb in seiner «Dynamik der Lebenserscheinungen», Seite 36 ff. (Leipzig 1906), zusammengestellt.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LVII, S. 1 (1908).

2. Haben die kernhaltigen Erythrocyten einen oxydativen Stoffwechsel und besteht ein Unterschied zwischen kernhaltigen und kernlosen?

Methode.

Die Gerinnung wurde in einigen Fällen durch Hirudin verhindert; meistens das Fibrin durch Schütteln abgeschieden. Das Blut wurde dann maximal mit Sauerstoff gesättigt, sofort mehrmals in 0,9%iger Kochsalzlösung (oder Ringerscher oder Friedenthalscher¹⁾ Lösung) zentrifugiert, das Sediment passend verdünnt und in ca. 3 ccm fassende Gläschen mit eingeschiffenem Glasstopfen luftdicht eingefüllt. In ihm befanden sich 2 Glasperlen, sodaß vor Öffnen des Gefäßes die Formelemente durch Schütteln gleichmäßig verteilt werden konnten. In einer Probe wurde der Sauerstoff sofort bestimmt, in den übrigen, nachdem sie einige Zeit im Thermostaten gestanden hatten. Sauerstoff und Kohlensäure wurden nach der Methode von Haldane²⁾ gemessen. In der Regel verwendete ich zur Analyse 0,9 ccm Blut, 0,3 Ferricyanid, 0,5 Weinsäure und 1,5 ccm Ammoniaklösung. Den Vogelerythrocyten war, einem Vorschlag von Krogh folgend, zum Lackieren etwas Saponin zugesetzt. Die Methode ist für Vogelblut nicht ausprobiert; sie ist wohl nicht so genau, wie für Säugetierblut, weil sich bei Zugabe des Ferricyanids eine gelatinierende Masse bildet. Doch genügte sie für meine Zwecke vollständig, besonders da es sich immer nur um Differenzbestimmungen in derselben Blutprobe handelte. Die Resultate sind fast alle Mittelwerte von Doppelbestimmungen, sodaß der Fehler 1—2 mm Wasser beträgt. Ich verstehe im folgenden unter v das Volumen des Gasentbindungsgefäßes, inkl. Capillare, unter p den Druck des entwickelten Gases in Millimeter Wasser und unter t die Temperatur. Wenn z. B. $v = 35$, $t = 15$ und $p = 50$, so ist 0,16 ccm Sauerstoff (0° ; 760 mm) entwickelt.

¹⁾ Friedenthal, Arbeiten aus dem Gebiet der experimentellen Physiologie (Jena 1908), S. 308. Sie wurde durch eine sterile Berkefeldkerze filtriert.

²⁾ Barcroft, Ergebnisse der Physiologie, 1908, S. 771.

Fehlerquellen.

1. Bakterien: Alles unter den Vorsichtsmaßregeln der Asepsis. Zur Kontrolle immer mikroskopische Präparate und meistens Abimpfungen in sterile Bouillon.

2. Methämoglobin: Durch Bildung von Methämoglobin könnte ein Sauerstoffverbrauch vorgetäuscht werden. Deshalb wurde häufig nach Beendigung des Versuchs eine zweite maximale Sauerstoffbestimmung vorgenommen. Diese mußte mit der ersten, zu Beginn des Versuchs ausgeführten übereinstimmen. Wurde gleichzeitig die gebildete Kohlensäure gemessen, so war die zweite maximale Sauerstoffanalyse überflüssig.

Meiner Erfahrung nach sieht man Methämoglobinbildung innerhalb der in Frage kommenden Versuchszeiten (10—20 Stunden) nur bei Benutzung unsauberer Gläser. Diese dürfen nicht mit Alkohol und Äther, sondern nur mit Wasser gereinigt werden; ferner sollen Watte und Papier beim Sterilisieren nicht braun werden.

3. Leukocyten: Die Entfernung geschieht am besten auf Grund der Beobachtung von Alex. Schmidt, daß das Fibrinnetz die Leukocyten festhält. Es gelingt so leicht, selbst beim leukocytenreichen Vogelblut, die weißen Blutzellen fast vollständig zu entfernen. Technik siehe unten beim Gänseblut.

Anfänglich versuchte ich die Leukocytenatmung so auszuschließen, daß ich in verschiedenen Schichten des Zentrifugats die Atmung bestimmte. Sie geht dann nicht der sehr wesentlich differierenden Zahl Leukocyten parallel, sondern ungefähr der Zahl der Erythrocyten; aber nicht genau, weil die stärker atmenden Erythrocyten spezifisch leichter sind, als die schwächer atmenden.

4. Blutplättchen: Gehen beim Defibrinieren zugrunde.

I.

Die kernlosen Erythrocyten.

Es gelingt mit voller Sicherheit, einen oxydativen Stoffwechsel kernloser Erythrocyten zu messen. Mit den Blutzellen normaler, erwachsener Menschen ist der Nachweis nicht sicher. Dagegen sind die Ausschläge groß mit dem Blut von jungen Kaninchen. Der Sauerstoffbedarf geht parallel mit der Polychromasie der Erythrocyten.

Menschenblut. Thermostat 37,5°.

(Gesunde Menschen; über 50 Jahre.)

Nr.	Natur der Lösung	Dauer des Versuches in Std.	Sauerstoff in 0,9 ccm		Abgelesene Differenz in mm Wasser	Differenz in mm Wasser, bezogen auf gleiche Volumina und Temperatur	Sauerstoffverbrauch in Prozenten ¹⁾
			vor dem Versuch	nach dem Versuch			
1	Friedenthal	3	v = 35,9 t = 17,5 p = 61	v = 37,3 t = 17,5 p = 57	4	2	3 % in 3 Std.
1 a	desgl.	17	v = 35,9 t = 17,5 p = 61	v = 37,3 t = 15 p = 54	7	5 ²⁾	9 % in 17 Std.
2	»	15	v = 35,9 t = 14 p = 45	v = 37,3 t = 14 p = 41	4	2	5 % in 15 Std.
3	»	20	v = 37,3 t = 14 p = 70	v = 35,9 t = 14 p = 66	4	7	10 % in 20 Std.

In Versuch 1 und 2 fallen die Differenzen fast noch in die Fehlergrenzen; in Versuch 1 a und 3 ist ein Ausschlag deutlich; dieser könnte aber auf die Atmung der Leukocyten zurückzuführen sein; obwohl es möglich ist (siehe unten), diese auszuschließen, habe ich die folgenden überzeugenden Experimente mit Kaninchenblut ausgeführt, weil ich bald fand, daß hier die Ausschläge sehr viel größer sind.

¹⁾ Der Sauerstoffverbrauch in Prozenten des maximalen Sauerstoffgehalts ist ein direktes Maß für die Atmung, weil bei normalen Individuen die aus einem Erythrocyten entwickelte Sauerstoffmenge hinreichend konstant ist.

²⁾ Methämoglobin hatte sich nicht gebildet; nach 17 Stunden war die maximale Sauerstoffkapazität unverändert.

Kaninchenblut. Thermostat 37,5—38°.

Blutentnahme bei Nr. 1—4 aus der Carotis, bei 5 aus dem Herzen.

Nr.	Natur der Lösung	Dauer des Versuches in Std.	Sauerstoff in 0,9 ccm		Abgelesene Differenz in mm Wasser	Differenz in mm Wasser, bezogen auf gleiche Volumina und Temperatur	Sauerstoffverbrauch in Prozenten	Im ccm Zahl der	
			vor dem Versuch	nach dem Versuch				roten	weißen
1	0,9 % NaCl	2½	v = 37,3 t = 15 p = 63	v = 37,3 t = 15 p = 58	5 ¹⁾	5	8 % in 2½ Std.	8,8 Millio- nen	200
2	desgl.	3	v = 37,3 t = 14 p = 63	v = 37,3 t = 14 p = 57	6	6	8 % in 2½ Std.	9 Millio- nen	3800 ²⁾
2 a	»	8½	v = 37,3 t = 14 p = 63	v = 37,3 t = 14 p = 49	14 ³⁾	14	22 % in 8 Std.	—	—
3	»	7	v = 37,3 t = 14 v = 62	v = 37,3 t = 14 p = 50	12	12	19 % in 7 Std.	8,6 Millio- nen	700
4	»	8½	v = 37,3 t = 13 p = 45	v = 35,9 t = 13 p = 32	13 ⁴⁾	14	31 % in 8½ Std.	—	1000
5	»	2½	v = 37,3 t = 12 p = 24	v = 35,9 t = 12 p = 18	6 ⁵⁾	7	29 % in 2½ Std.	3,8 Millio- nen	700

¹⁾ Methämoglobin hatte sich nicht gebildet; maximale Sauerstoffkapazität nach 2½ Stunden: v = 37,3; t = 15; p = 63; also unverändert.

²⁾ Besonders durch Vergleich von Versuch 1 und 2 folgt, daß die Leukocyten nicht die Ursache des Sauerstoffverbrauchs sein können.

³⁾ Kein Methämoglobin. Maximale Sauerstoffkapazität nach 8½ Stunden: v = 37,3; t = 14; p = 63; also unverändert.

⁴⁾ Sehr viele basophile Zellen (Methylenblau). Gleichzeitig mit dem Sauerstoffverbrauch wurde die Kohlensäurebildung bestimmt.

In 0,9 ccm: CO₂ Vor dem Versuch: v = 37,3; t = 13; p = 24.

Nach » » v̇ = 35,9; t = 13; p = 36.

Es sind also 0,036 ccm (0°, 760 mm) CO₂ gebildet, gleichzeitig 0,046 ccm Sauerstoff (0°, 760 mm) verschwunden.

⁵⁾ Das Tier war ca. 10 Tage alt. Das Blut enthielt sehr viele basophile Zellen. Keine kernhaltigen Erythrocyten!

Das Resultat ist eindeutig. Von besonderem Interesse scheinen mir die großen Unterschiede in der Oxydationsgröße der Erythrocyten zu sein, die in der Färbbarkeit durch das basische Methylenblau einen chemischen Ausdruck finden. Herr Morawitz und ich sind mit der chemischen Analyse derartig differenter Erythrocyten beschäftigt. Vielleicht ist dies ein Weg zur Erkenntnis der mit den Oxydationsprozessen verknüpften Substanzen.

II. Die kernhaltigen Erythrocyten.

Als Versuchstier wurde ausschließlich die Gans benutzt. Blutentnahme aus der vena jugularis oder der Flügelvene.

Läßt man die mit Sauerstoff gesättigten Vogelblutzellen, suspendiert in Serum oder einer passenden Salzlösung, im verschlossenen Gläschen bei 39—40° stehen, so färben sie sich bald tiefdunkel. Der Farbumschlag ist die Folge einer Atmung der Zellen.

Thermostat zwischen 39 und 40°.

Nr.	Natur der Lösung	Dauer des Versuches	Sauerstoff in 0,9 ccm		Abgelesene Differenz in mm Wasser	Differenz in mm Wasser, bezogen auf gleiche Volumina und Temperatur	Sauerstoffverbrauch in Prozenten pro Std.
			vor dem Versuch	nach dem Versuch			
1	Plasma	2½ Std.	v = 37,3 t = 18 p = 45	v = 35,9 t = 18 p = 9	36	36	33 ¹⁾
2	Ringer, ohne NaHCO ₃	102 Min.	v = 37,3 t = 17 p = 28	v = 36,6 t = 17 p = 13	15	15	32 ¹⁾
3	Friedenthal	120 Min.	v = 35,9 t = 19 p = 47	v = 37,3 t = 19 p = 17	30	29	33 ¹⁾

¹⁾ Nr. 1—4: durch maximale Sauerstoffbestimmungen nach dem Versuch wurde Methämoglobinbildung ausgeschlossen.

Thermostat zwischen 39 und 40°.

Fortsetzung.

Nr.	Natur der Lösung	Dauer des Versuches	Sauerstoff in 0,9 ccm		Abgelesene Differenz in mm Wasser	Differenz in mm Wasser, bezogen auf gleiche Volumina und Temperatur	Sauerstoffverbrauch in Prozenten pro Std.
			vor dem Versuch	nach dem Versuch			
4	Friedenthal	110 Min.	v = 37,3 t = 18 p = 35	v = 35,9 t = 18 p = 16	19	20	27 ¹⁾
5	Serum	65 Min.	v = 37,3 t = 10 p = 30	v = 35,9 t = 10 p = 11	19	19	60 ²⁾
6	0,6 % NaCl	55 Min.	v = 37,3 t = 16 p = 27	v = 35,9 t = 15 p = 13	14	15	50 ²⁾
6 a	1,2 % NaCl	55 Min.	v = 35,9 t = 16 p = 30	v = 37,3 t = 15 p = 15	15	14	50 ²⁾

Folgende Punkte haben vielleicht einiges Interesse:

1. Leukocyten: In den Versuchen der Tabelle ist die Hauptmenge so entfernt, daß die oberste Schicht, die man beim Zentrifugieren in Kochsalzlösung erhält, abgegossen war. Derartige Suspensionen enthalten dann auf 3 Millionen Erythrocyten etwa 10 000 Leukocyten.

Im folgenden Versuch wurden die Leukocyten fast vollständig abgetrennt:

Blutentnahme mittels Kanüle aus der Flügelvene. Die Hauptmenge wurde, nach Hinzufügung von etwas Gewebssaft, bei 40° gehalten, bis die Gerinnung so weit vorgeschritten war, daß man das Gefäß umkehren konnte, ohne daß Blut auslief. Dann wurden Glasstücke hinzugefügt und die Masse wieder

¹⁾ Nr. 1—4: durch maximale Sauerstoffbestimmungen nach dem Versuch wurde Methämoglobinbildung ausgeschlossen.

²⁾ Von demselben Tier; Nr. 6 und 6 a von derselben Blutentnahme; erst direkt vor dem Versuch auf die Lösungen verschiedener osmotischer Drucke verteilt und einmal in ihnen zentrifugiert.

flüssig geschüttelt. Vom Fibrin wurde koliert und zu der Flüssigkeit noch ungeronnenes Blut zugegeben, das in Eis gestanden hatte, um die Gerinnung zu verhindern. Nachdem bei 40° wieder Gerinnung eingetreten war, wurde wieder wie oben verfahren. In dem so erhaltenen Blut fand ich auf 3000 Erythrocyten nur einen Leukocyten. In einer Stunde verbrauchte diese Suspension, nachdem das Serum durch Kochsalzlösung ersetzt war, 57 % ihres Sauerstoffs.

Natur der Lösung	Dauer des Versuchs	Sauerstoff in 0,9 ccm		Abgelesene Differenz in mm Wasser	Sauerstoffverbrauch in Prozenten pro Stunde
		vor dem Versuch	nach dem Versuch		
0,6% NaCl	80 Minuten	v = 37,3 t = 12 p = 56	v = 37,3 t = 12 p = 14	42	57

2. Kohlensäure: In mehreren Versuchen wurde die Kohlensäure bestimmt. Die gefundenen Volumina entsprachen den verbrauchten Sauerstoffvolumina genau. Es gibt aber einige methodische Bedenken und ich begnüge mich deshalb mit der Feststellung der Tatsache, daß die gebildete Kohlensäure von derselben Größenordnung ist wie die verschwundene Sauerstoffmenge.

3. Individuelle Schwankungen sind sehr groß. Die Ursache wird experimentell weiter verfolgt werden.

4. Oxydationsgröße:

a) bezogen auf die einzelne Zelle:

2000 Millionen verbrauchen pro Stunde etwa 0,2 bis 0,4 ccm Sauerstoff. Die Größenordnung ist z. B. dieselbe für die sich lebhaft bewegenden Spermatozoen des Seeigels;¹⁾

b) bezogen auf den ganzen Organismus (nach Tigerstedts Zahlen für das Säugetier):

1 kg verbraucht pro Stunde 0,5 g Sauerstoff.

1 kg enthält ca. 70 ccm Blut.

70 ccm Blut verbrauchen ca. 6 mg Sauerstoff pro Stunde.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LVII, S. 1 (1908).

Also machen die Oxydationen der Blutzellen nur etwa 1 % der Gesamtoxydationen aus.

5. Kohlensäurebildung ohne Sauerstoff (intramolekulare Atmung) habe ich nicht beobachtet. Diese Versuche wären aussichtsreicher mit Amphibienblut.

6. Die Natur der Lösung beeinflusst die Oxydationen in den ersten Stunden auffallend wenig. Besonders instruktiv in dieser Hinsicht sind die Versuche 5, 6 und 6a. Der osmotische Druck in 6a ist gegenüber 5 und 6 um 100 % gesteigert, trotzdem sind die Oxydationen so gut wie unverändert.

Wenn es aber darauf ankommt, die Zellen möglichst lange am Leben zu erhalten, so spielt die Natur der Lösung eine große Rolle, und zwar besonders ihre Reaktion. Die besten Erfahrungen habe ich bis jetzt nicht mit Serum gemacht, sondern mit der von Friedenthal angegebenen Lösung,¹⁾ durch die ich sehr langsam Sauerstoff leitete:

Entnahme aus der Flügelvene 4 Uhr nachmittags. Dreimal zentrifugiert in Friedenthalscher Lösung, jedesmal auf das 10fache verdünnt. Anfang des Versuchs 5 Uhr 15 Min. Thermostat 39,5°. Der Sauerstoff passierte eine Waschflasche mit Friedenthalscher Lösung und ein steriles Wattefilter. Die Atmung einer Probe wurde sofort untersucht, die einer zweiten nach 16 Stunden.

Sauerstoffverbrauch sofort	64 % in 2 Stunden.
» nach 16 Stunden	43 % » 2 »

Während eines andern Versuchs ging der Sauerstoffstrom zu schnell. Die vorgeschaltete Friedenthalsche Lösung reagierte gegen Phenolphthalein alkalisch und die Zellen waren nach 15 Stunden tot.

Aus den mitgeteilten Beobachtungen geht hervor, daß die Vogelblutzellen ein sehr günstiges Material zum chemischen Studium der Lebenserscheinungen darstellen. Der experimentelle Vorteil gegenüber den von Gefäß- und Nervensystem beherrschten Organen ist ohne weiteres einleuchtend; gegenüber den Spermatozoen der Fische besteht er in der großen Resistenz gegen Veränderungen der normalen Lebensbedingungen.

Ich untersuche zunächst, inwieweit die Zersetzung stickstoffhaltigen Materials dem oxydativen Stoffwechsel parallel geht.

¹⁾ Osmot. Druck für Gänseblut entsprechend niedriger.

Zusammenfassung.

I. Es gibt kernlose Zellen, die eine meßbare Sauerstoffatmung haben, nämlich die roten Blutzellen der Säugetiere.

Der Nachweis gelingt nicht mit Sicherheit an den roten Blutzellen normaler erwachsener Menschen; dagegen wurde in den Erythrocyten der Kaninchen ein Material gefunden, mit dem einwandfreie Resultate zu erhalten sind.

Die Größe der Sauerstoffatmung war sehr verschieden; es stellte sich heraus, daß sie sich vorhersagen läßt auf Grund des histologischen Bildes: sie geht parallel der Basophilie, d. h. in den untersuchten Fällen der Jugend der Zellen. Hierbei bleibt unentschieden, ob nur die basophilen oder alle Erythrocyten atmen. Eine große Zahl basophiler Zellen ohne kernhaltige Erythrocyten findet man in der Regel bei jungen (5—20 Tage alten) Kaninchen.

II. Die (kernhaltigen) Erythrocyten normaler ausgewachsener Vögel haben eine sehr erhebliche Sauerstoffatmung; jedenfalls ist sie von einer ganz andern Größenordnung als die der Erythrocyten normaler erwachsener Säugetiere.

Nachtrag zu «Die Schwefelbestimmung im Urin».

Von

Emil Abderhalden und Casimir Funk.

(Der Redaktion zugegangen am 19. Februar 1909.)

Wir haben in Anlehnung an das Verfahren von Pringsheim eine Methode zur Bestimmung von Schwefel im Urin mitgeteilt, die sehr zuverlässige Resultate gibt und wenig Zeit in Anspruch nimmt. Nachträglich finden wir, daß G. Modrakowski¹⁾ ebenfalls Natriumsuperoxyd angewandt und die Ausführung der Schwefelbestimmung im Urin abgekürzt hat. Die von uns angegebene Methode dürfte jedoch vorzuziehen sein. Der Vollständigkeit wegen sei auch noch angeführt, daß die Schwefelbestimmung im Urin nach Schulz von Artur Kanschegg²⁾ modifiziert worden ist.

¹⁾ G. Modrakowski, Über die Schwefelbestimmung im Harn mittels Natriumsuperoxyd. Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 562, 1903.

²⁾ Artur Kanschegg, Zur Bestimmung des Gesamtschwefels im Harne. Pflügers Archiv, Bd. CXXIII, S. 274, 1908.
