(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Gießen.)

Über den Einfluß der Verdünnungsflüssigkeit auf das Zählresultat bei Erythrocytenzählungen.

Von

B. Behrens,

Medizinalpraktikant aus Gießen.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. März 1922.)

Inhalt:

1. Zur Einführung (S. 266)
2. Plan der Untersuchung (S. 267)
3. Durchführung der Untersuchung (S. 270)
4. Ergebnisse der Untersuchung (S. 273)
5. Zusammenfassung und Schluß (S. 285)

1. Zur Einführung.

Die im hiesigen Physiologischen Institut durchgeführten Untersuchungen *Marloffs*¹⁾ haben ergeben, daß die bisher am meisten verwandte *Thomasche* Zählmethode mit einem um so größeren Fehler behaftet ist, je größer die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten in der Verdünnungsflüssigkeit ist. Die Senkungsgeschwindigkeit hat sich aber als eine Funktion des Hämoglobingehaltes der Erythrocyten erwiesen, sie ist auch von der Größe der Erythrocyten abhängig insofern, als je größer beide Werte sind, um so größer sich auch die Senkungsgeschwindigkeit ergibt. Die *Marloffschen* Versuche wurden alle in derselben Verdünnungsflüssigkeit, in *Hayemscher* Lösung, durchgeführt.

Hat sich so die Beschaffenheit der Erythrocyten als maßgebend für das Zählresultat erwiesen, so ist andererseits klar, daß auch die Beschaffenheit der Verdünnungsflüssigkeit von Einfluß auf das Resultat sein muß. Bei Verwendung anderer Verdünnungsflüssigkeit als *Hayem-*scher Lösung wird daher auch das Zählresultat anders ausfallen können.

Weiterhin hat sich die für menschliches Blut und für manche Tierblutarten im allgemeinen so geeignete *Hayemsche* Lösung nun aber nicht als eine ideale, für alle Blutarten brauchbare Verdünnungsflüssigkeit erwiesen. Schon *Marloff* hat festgestellt, daß es bei Verdünnung von

¹⁾ *R. Marloff*, Die früheren Zählungen der Erythrocyten im Blute verschiedener Tiere sind teilweise mit großen Fehlern behaftet. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **175**, 355. 1919.

Rinder- und Ziegenblut mit *Hayem*scher Lösung zu Agglutination der Erythrocyten und zu Stechapfelformen derselben kommt. Dasselbe hat *G. Fritsch*¹⁾ bei Hühner- und Taubenblut beobachtet. In der hiesigen medizinischen Klinik hat ferner Fräulein Dr. med. *Thaer* festgestellt, daß auch die Erythrocyten des Menschenblutes in Fällen von Sepsis agglutinieren, wenn das Blut mit *Hayem*scher Lösung verdünnt wird, eine Beobachtung, die *Hayem*²⁾ selbst schon gemacht hat.

Dies alles legt es nahe, nach einer vielleicht noch geeigneteren Verdünnungsflüssigkeit zu suchen. Auf Veranlassung von Herrn Professor Dr. *Bürker* habe ich Untersuchungen nach dieser Richtung hin angestellt.

2. Plan der Untersuchung.

Die Eigenschaften, welche eine brauchbare Verdünnungsflüssigkeit aufweisen muß, sind die folgenden:

1. Muß die Flüssigkeit die Erythrocyten möglichst gut konservieren.
2. Muß die Verteilung der Erythrocyten in ihr und auf der Zählfläche eine möglichst gleichmäßige sein, Agglutination muß unter allen Umständen vermieden werden.

3. Muß die Dichte und auch die Viscosität der Verdünnungsflüssigkeit so beschaffen sein, daß auf der einen Seite ein zu schnelles Entmischen durch Sedimentieren nicht zustande kommt, auf der anderen Seite müssen aber die Körperchen dem Zählnetz doch möglichst fest aufliegen.

4. Darf der Brechungsexponent nicht zu groß sein, da sonst das Zählnetz schwer zu sehen ist.

5. Muß die Flüssigkeit haltbar sein, sie darf nicht zu rasch verdunsten, darf keine Niederschläge ausfallen lassen und muß einer Entwicklung von Algen und anderen Kleinlebewesen vorbeugen.

6. Darf die Flüssigkeit beim Schütteln nicht Schaum entwickeln.

7. Darf die Flüssigkeit nicht schmieren und muß leicht wieder aus den Pipetten und der Zählkammer entfernt werden können.

Von ausschlaggebender Bedeutung ist in der Praxis der Erythrocytenzählung, wie die Erfahrungen ergeben haben, der Punkt 3, ihm sollen daher hauptsächlich unsere Untersuchungen gewidmet sein.

Die Bedingungen, von welchen die Senkungsgeschwindigkeit kugelig gedachter Gebilde in einer Suspensionsflüssigkeit abhängig ist, sind durch die bekannte *Stokes*sche Formel

$$v = \frac{2}{9} g \frac{D - d}{\eta} r^2$$

¹⁾ *G. Fritsch*, Das Blut der Haustiere mit neueren Methoden untersucht. II. Untersuchung des Kaninchen-, Hühner- und Taubenblutes. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **181**, 88. 1920.

²⁾ *G. Hayem*, Recherches sur l'évolution des hématies dans le sang de l'homme et des vertébrés. Arch. de physiol. norm. et pathol. **5**, 700. 1878.

gegeben, worin v die Senkungsgeschwindigkeit, g die Beschleunigung der Schwere, D die Dichte der Körperchen, d die Dichte der Flüssigkeit, η den Koeffizienten der inneren Reibung und r den Radius der Kügelchen bedeutet. Auch die Temperatur spielt noch insofern eine Rolle, als die Werte D , d und η Temperaturkoeffizienten aufweisen. Sind streng genommen die Erythrocyten auch keine kugeligen Gebilde, so läßt sich doch ein Ersatzkügelchen ermitteln mit dem Äquivalentradius r .

Von besonderem Einfluß ist demnach, was die Körperchen angeht, ihr Radius, denn dieser kommt in der 2. Potenz vor. Hiermit stimmt überein, daß in der *Marloffs*chen Versuchsreihe die Senkungsgeschwindigkeit sich immer um so größer ergeben hat, je größer der Radius der betreffenden Erythrocyten war. Dazu kommt noch bei gleicher Größe ihr Hämoglobingehalt, mit dessen Zunahme die Senkungsgeschwindigkeit auch noch wächst.

Da bei einem gegebenen Blut an den Erythrocyten nichts geändert werden kann, so ist die passende Senkungsgeschwindigkeit nur durch geeignete Wahl der Dichte und der Viscosität der Verdünnungsflüssigkeit zu erzielen, wobei auch die Temperatur zu berücksichtigen ist.

Es handelt sich nunmehr darum, durch Versuche die geeignete Verdünnungsflüssigkeit zu ermitteln. Zu diesem Zweck sollte einerseits die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten ein und desselben Blutes in Verdünnungsflüssigkeiten verschiedener Beschaffenheit bestimmt und in Beziehung zum Zählfehler der *Thomas*chen und der *Bürkers*chen Zählmethode gesetzt werden, andererseits sollten die Senkungsgeschwindigkeiten möglichst verschiedener Erythrocyten in ein und derselben geeigneten Verdünnungsflüssigkeit geprüft und gleichfalls in Beziehung zum Zählfehler der beiden Methoden gebracht werden. Das mit der *Thomas*chen Methode gewonnene Zählresultat hat sich bisher als abhängig von der Senkungsgeschwindigkeit erwiesen, das mit der *Bürkers*chen Methode erzielte aber nicht.

Zunächst wurde Ausschau nach den *bisher zur Zählung von Erythrocyten verwendeten Verdünnungsflüssigkeiten* gehalten. Man kann diese Flüssigkeiten in 6 Hauptgruppen einteilen:

1. Körperflüssigkeiten, wie Serum, Ascitesflüssigkeit vom Mensch, Amnionflüssigkeit von der Kuh, Urin von Diabetikern, schwach phosphathaltiger Urin, die heute nur noch historisches Interesse haben.

2. Einfache und zusammengesetzte, dem Blute isotonische oder wenigstens annähernd isotonische Salzlösungen wie 0,9proz. Kochsalzlösung, *Ringers*che oder *Tyrodes*che Lösung, 5,1proz. Rohrzuckerlösung.

3. Lösungen, die noch ein Fixationsmittel wie Sublimat, Formol oder Osmiumsäure enthalten. Solche Lösungen haben *Gowers*, *Malassez* und *Hayem* angegeben.

4. Lösungen, die man durch Zusätze von Glycerin, Gummilösung oder Zucker spezifisch schwerer und viscöser gemacht hat. Von *Potain*, *Pacini*, *Mayet*, *Toison*, *Bürker* und *Krotkow* wurden solche Lösungen benutzt.

5. Lösungen, welche Farbstoffe wie Eosin, Gentianaviolett, Methylviolett, Toluidinblau oder Kresylblau enthalten, entweder zum Anfärben der Erythrocyten (Eosin) oder zum Färben der Leukocyten (die anderen Farbstoffe), um die Leukocyten von den Erythrocyten besser unterscheiden zu können [siehe *A. Pappenheim*¹⁾].

6. Lösungen, welche besonders gerinnungshemmende Stoffe enthalten. Diese Stoffe verhindern den Zerfall und die Agglutination der Thrombocyten, was für eine gleichmäßige Verteilung der Erythrocyten auch von Bedeutung ist. Eine solche Lösung hat *A. Pappenheim* (a. a. O. S. 237) angegeben:

Natr. citric.	0,3
Ammon. oxal.	0,1
CaFl ₂	0,1
Aqua dest.	100,0

Für meine Zwecke kommen nur die unter 2., 3. und 4. genannten Lösungen in Frage. Eine Reihe von diesen Lösungen kann man auf Grund der neueren Erfahrungen von vornherein ausschließen. Mit den anderen habe ich die Frage zu beantworten gesucht, welchen Einfluß diese Verdünnungsflüssigkeiten auf das Zählresultat sowohl bei Verwendung der *Thomaschen* als auch bei Verwendung der *Bürkerschen* Methode haben.

Diese Lösungen sind: Aus Gruppe 2 *Kochsalzlösung 0,9 proz.*, *Tyrodelösung*; aus Gruppe 3 *Hayemsche Lösung*; aus Gruppe 4 *Krotkowsche Lösung*²⁾, bestehend aus:

Natr. sulfurici	8,0
Natr. chlorat.	1,0
Hydr. bichlor. c.	0,5
Glycerini	30,0
Aqua destill.	180,0

Es war ferner wichtig zu prüfen, wie diese Lösungen sich bei Zählung möglichst verschiedenartiger Erythrocyten verhalten. Zu dem Zwecke wurden neben Erythrocyten des Menschen, welche ein mittleres Sen-

¹⁾ *A. Pappenheim*, Grundriß der hämatologischen Diagnostik und praktischen Blutuntersuchung. Verlag von Dr. Werner Klinkhardt. Leipzig 1911. S. 236.

²⁾ Über die genaue Zusammensetzung aller bisher genannten Verdünnungsflüssigkeiten siehe *K. Bürker*, Zählung und Differenzierung der körperlichen Elemente des Blutes. Tigerstedts Handbuch der physiol. Methodik, Bd. II, Abt. 5, S. 10, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 21, 52. — Ferner *K. Bürker*, Über weitere Verbesserungen der Methode zur Zählung roter Blutkörperchen nebst einigen Zählresultaten. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **142**, 362. 1911. — Über die *Krotkowsche* Lösung siehe *S. F. Krotkow*, Zur Methodik der Blutkörperchenzählung. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **153**, 627. 1913.

kungsbestreben aufweisen, auch noch Froscherythrocyten, welche sich sehr rasch, und Ziegenerythrocyten, welche sich sehr langsam senken, in den Kreis der Untersuchung gezogen.

3. Durchführung der Untersuchung.

Zur Charakterisierung der verwendeten Verdünnungsflüssigkeiten war es mit Rücksicht auf die S. 267 erwähnten Punkte zunächst nötig, das *morphologische Verhalten* der Erythrocyten in diesen Flüssigkeiten zu prüfen, was ohne weiteres bei der Zählung mit Hilfe des Mikroskopes geschah. Dabei ergab sich dann auch, ob *Agglutination* vermieden war oder nicht. In dieser Beziehung waren auch besonders die neueren Untersuchungen *R. Höbers* und seiner Schule über Suspensionsstabilität und -instabilität der Erythrocyten zu berücksichtigen.

Die *Dichte* der Verdünnungsflüssigkeit wurde mit der *Mohrschen Wage*, die *Viscosität* mit dem *Ostwaldschen Viscosimeter*, der *Brechungs-exponent* mit dem *Pulfrichschen Eintauchrefraktometer* bestimmt.

Ganz besonders wichtig aber war die genaue *Ermittlung der Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten* in der betreffenden Verdünnungsflüssigkeit. *R. Marloff* hat in seiner oben zitierten Arbeit, S. 358, diese Geschwindigkeit auf folgende Weise bestimmt: „Unter einem *Leitzschen* „Binokularmikroskop, in dessen Gesichtsfeld die Erythrocyten plastisch „erscheinen, wurde auf das Zählnetz der *Bürkerschen* Zählkammer „ein Tröpfchen der Blutmischung gebracht, ein Blutkörperchen, das „in der Kuppe des Tröpfchens scharf im Gesichtsfelde erschien, ins „Auge gefaßt, mit Hilfe der Mikrometerschraube das Körperchen bei „der Senkung verfolgt und mit einer Stoppuhr die Zeit bestimmt, „innerhalb welcher das Körperchen die Zählfläche eben erreichte oder „auch nur sich um eine bestimmte Strecke senkte.“

Für die *Marloffschen* Zwecke — es handelte sich damals besonders um die Gewinnung relativer Werte in ein und derselben Verdünnungsflüssigkeit — genügte diese Methode, sie war die einzig mögliche, wenn die Verhältnisse auf der Zählfläche, wie sie sich bei der Füllung der Zählkammer ergeben, berücksichtigt werden sollten. Zur annähernden Ermittlung der absoluten Senkungsgeschwindigkeit hätte die Tubusverschiebung mit dem Brechungsexponenten der Verdünnungsflüssigkeit multipliziert werden müssen. Auch konnte *Marloff* bei seiner Versuchsanordnung die Temperatur, welche einen wesentlichen Einfluß auf die Senkungsgeschwindigkeit hat, nicht genügend genau in Betracht ziehen. Ich bin daher zu der Methode übergegangen, welche *Marloff* auch schon angewendet, aber aus den obengenannten Gründen wieder verlassen hatte, nämlich zur Beobachtung der Senkung des Blutkörperchenspiegels in der Verdünnungsflüssigkeit nach vorheriger guter Mischung des Blutes mit dieser Flüssigkeit.

Zur Erzielung eines möglichst ebenen und scharf begrenzten Blutkörperchenspiegels erwies es sich als nötig, die Senkung in einem relativ weiten Glasröhrchen vor sich gehen zu lassen, sonst machte sich die Adhäsion an der Wand und die dadurch bedingte Konkavität des Flüssigkeitsspiegels störend geltend. Das Röhrchen war ca. 140 mm lang, der innere Durchmesser betrug 7,3, der äußere 9,0 mm. In seiner unteren Hälfte war das Röhrchen mit einer Millimeterskala versehen. Um parallaxenfrei ablesen zu können, war die Millimeterteilung auf der Vorder- und Rückseite in gleicher Höhe angebracht, die gemeinsamen Zentimeterteilstriche waren ringsherum geführt. Die Temperatur wurde dadurch konstant erhalten, daß das Röhrchen in ein mit Wasser gefülltes, etwa 8 cm weites Becherglas möglichst tief eingetaucht wurde, das seinerseits in einem mit einem Thermoregulator versehenen Wasserbad (etwa doppelt so weites wasserhaltiges Becherglas) stand. Im inneren und äußeren Becherglas befand sich zur Kontrolle der Temperatur je ein Thermometer. In späteren Versuchen wurde das Röhrchen im inneren Becherglas mit einem Luft- statt einem Wassermantel umgeben.

Mit einer Pipette wurde nun die Blutmischung in das Glasröhrchen luftblasenfrei so eingefüllt, daß sie etwa 1 mm über dem Nullstrich der Skala stand. Von dem Augenblick an, wo der Blutkörperchenspiegel bei der Senkung den Nullstrich passierte, wurde mit der Ermittlung der Senkungsgeschwindigkeit begonnen. Die Beobachtungszeit erstreckte sich meist auf 60 Minuten. Aus der Senkungsstrecke und Senkungszeit ergab sich dann leicht die Senkungsgeschwindigkeit in Millimetern pro Minute.

Daß nun die auf diese Weise ermittelte Senkungsgeschwindigkeit in der Tat mit der von *Marloff* auf der Zählfläche ermittelten übereinstimmt, sofern man die Tubusverschiebung mit dem Brechungsexponenten der Verdünnungsflüssigkeit multipliziert, habe ich durch eine Reihe von Versuchen festgestellt. In 4 vom 8. bis 10. I. 1920 im Senkungsröhrchen durchgeführten Versuchen fand ich für mein 200fach mit *Hayemscher* Lösung verdünntes Blut die Senkungsgeschwindigkeit bei 15° zu 0,125, 0,125, 0,128 und 0,125 mm pro Minute, im Mittel 0,126. Als Gesamtmittel einer größeren Zahl von Versuchen (50 Beobachtungen) auf der Zählfläche ergab sich bei einer mittleren Temperatur von 14,4° 0,093 mm. Den Brechungsexponenten der *Hayemschen* Lösung bestimmte ich zu 1,3362 bei 15°, daraus ergibt sich die Senkungsgeschwindigkeit zu $0,093 \cdot 1,3362 = 0,124$ mm, ein Wert, der mit dem nach der anderen Methode gewonnenen von 0,126 recht gut übereinstimmt.

Die Ermittlung der Senkungsgeschwindigkeit in einem Glasröhrchen hat aber den weiteren Vorteil, daß sie die Zeit und Geduld des Beobachters viel weniger in Anspruch nimmt. Wie schon erwähnt, ist

es aber besser, das Glasröhrchen möglichst weit zu wählen. Von Vorteil ist ferner, das Blut möglichst stark zu verdünnen, man erzielt so besser einen ebenen Blutkörperchenspiegel. Es empfiehlt sich außerdem, die Beobachtungszeit möglichst lange zu wählen, doch ist hier mit 40—60 Minuten insofern eine Grenze gesetzt, als der Blutkörperchenspiegel nach dieser Zeit immer verschwommener wird.

Daß nun die *Senkungsgeschwindigkeit derselben Erythrocyten in derselben Verdünnungsflüssigkeit* unter Beachtung der genannten Momente eine konstante ist, wie auch nach der *Stokes'schen Formel* zu erwarten ist, hat *Marloff* bereits gezeigt. Die damit in Widerspruch stehenden, von *W. Roerdansz*¹⁾ erzielten Resultate sind unter so absonderlichen Verhältnissen gewonnen, daß man sich über die Abweichung nicht wundern kann. *Roerdansz* hat nämlich auffallenderweise die Senkung in dem unteren Capillarrohr der Mischpipette für weiße Blutkörperchen beobachtet, also unter Verhältnissen, wie sie für die Zählkammer gar nicht in Betracht kommen. Es ist ja leicht mit Hilfe des Mikroskops zu beobachten, sei es, daß man die Blutmischung in ein Capillarrohr oder in ein Trögchen mit planparallelen Wänden bringt, daß in der Nähe der Wand ein Strom entsteht, der die Erythrocyten nicht nach abwärts, sondern nach aufwärts führt, obwohl sich der Blutkörperchenspiegel als Ganzes beständig senkt. Schon im Jahre 1868 hat *A. Schklarewsky*²⁾ interessante, im *Helmholtz'schen* Laboratorium gewonnene Beobachtungen über den in einem Capillarrohr entstehenden, nach abwärts gerichteten axialen und den nach aufwärts gerichteten Randstrom mitgeteilt, ja an einer Stelle, der Stillstandzone, kann es zu einem relativen Stillstand der Bewegung kommen. Die von *Roerdansz* angewandte Methode ist also nicht geeignet für die Bestimmung der mittleren Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten.

Die Konstanz der Senkungsgeschwindigkeit ergab sich innerhalb der genannten Zeit auch für meine Versuchsanordnung, wie später (S. 275) noch gezeigt werden soll.

In der *Stokes'schen Formel* für die Senkungsgeschwindigkeit kommt die Temperatur nicht vor, sie ist aber insofern implicite in der Formel enthalten als die Dichte der Körperchen und der Verdünnungsflüssigkeit und besonders die Viscosität abhängig von der Temperatur ist. Es muß daher in genaueren Versuchen für Temperaturkonstanz gesorgt oder die Versuchstemperatur genau ermittelt werden.

Um den *Einfluß der Temperatur auf die Senkungsgeschwindigkeit* zu prüfen, habe ich noch einige Versuche angestellt, von denen einer,

¹⁾ *W. Roerdansz*, Die Vorbereitung des Blutes zur Zählung seiner Formelemente und die den einzelnen hierbei gebräuchlichen Methoden innewohnenden Unsicherheiten. *Fol. haematol.*, **18**, 38. 1914.

²⁾ *A. Schklarewsky*, Über das Blut und die Suspensionsflüssigkeiten. *Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol.* **1**, 616. 1868.

in Abb. 1 graphisch wiedergegeben, mitgeteilt sei; es handelt sich um mein eigenes, 200fach mit *Hayemscher* Lösung verdünntes Blut. Bei einer Senkung der Temperatur von 20 auf 10° nimmt demnach die Senkungsgeschwindigkeit um 10% ab, bei einer Erhöhung von 20 auf 30° um 22% zu.

Man könnte nun unserer Methode, die Senkungsgeschwindigkeit zu bestimmen, den Einwand machen, daß mit ihr ja nur die Geschwindigkeit der sich am langsamsten senkenden Erythrocyten ermittelt werde. *Marloff* hat diesen Einwand schon diskutiert (a. a. O. S. 358) und sich bemüht, die Senkungsgeschwindigkeit der am raschesten fallenden Erythrocyten festzustellen, es gelang das aber nicht einwandfrei. Die mitgeteilten Beobachtungen von *Schklarewsky* weisen aber darauf hin, daß durch den nach unten gerichteten axialen und den nach oben gerichteten Randstrom eine gewisse Mischung der sich senkenden Erythrocyten zustande kommt, wodurch der Einwand einigermaßen entkräftet, wenn auch noch nicht ganz behoben wird.

Abb. 1.

4. Ergebnisse der Untersuchung.

Was zunächst das *morphologische Verhalten der Erythrocyten in den 4 von mir besonders untersuchten Verdünnungsflüssigkeiten* betrifft, so konservieren die Kochsalz- und Tyrodelösung die Erythrocyten des Menschen und der genannten Tiere ungenügend, in der ersteren kommt es leicht zu Stechapfelformen und Geldrollenbildung, in beiden tritt schon nach 24 Stunden Hämolyse ein.

Sehr viel geeigneter ist die *Hayemsche* Lösung, die tagelang die Erythrocyten gut konserviert, freilich in Glockenform. Der Glycerinzusatz in der *Krotkowschen* Lösung bedeutet in morphologischer Hinsicht eine Verschlechterung, wie auch die glycerinhaltige *Pacinische* Lösung die Form der Erythrocyten schlechter bewahrt als die *Hayemsche*.

Agglutination wird noch am besten von der Tyrodelösung vermieden. *Hayemsche* Lösung agglutiniert Ziegenerythrocyten, *Krotkowsche* Lösung agglutiniert Menschen- und besonders Ziegenerythrocyten.

Über die *Dichte*, die *Viskosität*, den *Brechungsexponenten* und die *Senkungsgeschwindigkeit* bei 15° gibt die folgende Tabelle Auskunft, die Werte sind Mittelwerte aus einer größeren Zahl von Bestimmungen in mehrfach frisch bereiteten Lösungen.

Verdünnungsflüssigkeit	Dichte	Viscosität	Brechungs- exponent	Senkungsgeschwindigkeit in mm pro Minute		
				Frosch ²⁾	Mensch	Ziege
1. Kochsalz 0,9%	1,006	1,023	1,3349	0,33	0,07	0,02
2. Tyrodelösung	1,007	1,024	1,3350	0,30	0,06	0,02
3. Hayemsche Lösung	1,015	1,049	1,3362	0,58	0,10	0,04
4. Krotkowsche Lösung ¹⁾	1,050	1,535	1,3512	0,10	0,03	0,02

Aus der Tabelle geht die relativ große Dichte und Viscosität der Krotkowschen Lösung, welche an sich durch Verzögerung der Entmischung die Zählung der Erythrocyten günstig beeinflussen müssen, hervor, ein Nachteil bei dieser Lösung ist aber schon das schmierende Glycerin und der hohe Brechungsexponent, der das Sehen des Zählnetzes sehr erschwert.

Noch viel stärker als die genannten Werte variiert die so maßgebende Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten in den verschiedenen Verdünnungsflüssigkeiten, und das gilt besonders für Froscherythrocyten; diese senken sich in Hayemscher Lösung etwa doppelt so rasch als in Kochsalz- und Tyrodelösung. Ihre Senkungsgeschwindigkeit ist ferner in den gleichen Verdünnungsflüssigkeiten 5—6 mal größer als die der Menschen- und 15 mal größer als die der Ziegenerythrocyten. In der Krotkowschen Lösung sind diese Unterschiede nicht so groß. Dieses verschiedene Verhalten hängt besonders mit der Größe bzw. dem Durchmesser und dem Hämoglobingehalt dieser Erythrocyten zusammen, welche Werte bei denen des Frosches $23,0$ und $16,3 \mu$ bzw. in einem besonderen Falle $213 \cdot 10^{-12}$ g Hb, bei denen des Menschen $7,5 \mu$ bzw. $30,0 \cdot 10^{-12}$ g und bei denen der Ziege $4,3 \mu$ bzw. $8 \cdot 10^{-12}$ g betragen.

Vom Standpunkte der Senkungsgeschwindigkeit aus allein betrachtet wäre die Hayemsche Lösung bei Verwendung der Thomaschen Zählmethode als nicht so besonders geeignet zu bezeichnen, wenn sie nicht andere wesentliche Vorteile darböte.

Von Bedeutung ist noch eine andere Beobachtung, welche mit der Hayemschen Lösung gemacht werden konnte. An sich ist die *Senkungsgeschwindigkeit* in dieser Lösung auffallend groß, sie ist aber auch noch *eine Funktion der Zeit, welche von der Herstellung der Blutmischung bis zur Anstellung des Versuches verstreicht*, insofern als mit zunehmender Zeit die Senkungsgeschwindigkeit in Hayemscher Lösung wächst, wie aus der folgenden Tabelle und aus der graphischen Darstellung mehrerer

¹⁾ Das für die Krotkowsche Lösung verwendete Glycerin konnte im Jahre 1919, in welchem diese Versuche angestellt wurden, in nicht ganz reinem Zustande erhalten werden, es war schwach gelblich gefärbt und hatte eine geringere Dichte als das ganz reine.

²⁾ Es handelt sich hier um Frühjahrsfrösche, die Herbstfrösche weisen höhere Werte auf, so wurde in einem Falle, der auf S. 280 dieser Arbeit verwertet wurde, $0,33$ mm pro Minute in der Krotkowschen Lösung gefunden.

Versuchsergebnisse in Abb. 2 deutlich hervorgeht. Nach 24 Stunden hat aber die Senkungsgeschwindigkeit einen konstanten Wert erreicht.

Laufende Nummer	Senkungsgeschwindigkeit meiner Erythrocyten bei 15° C in mm pro Minute	
	sofort nach dem Mischen	24 Stunden später
1	0,11	0,14
2	0,10	0,13
3	0,09	0,13
4	0,08	0,15
5	0,09	0,13
Mittel 0,09		0,14

Diese mit meinen Erythrocyten erhaltenen Ergebnisse gelten mutatis mutandis auch für die anderen Erythrocytenarten. Die Kurven zeigen auch, wie innerhalb einer Stunde die Senkungsgeschwindigkeit in derselben Blutmischung ziemlich konstant ist.

Diese Zunahme der Senkungsgeschwindigkeit, welche nach der Tabelle im Mittel 40% beträgt, also bei Anwendung der Thomaschen Zählmethode sich störend geltend machen muß, könnte auf einer Zunahme der Dichte und besonders des Radius der Körperchen beruhen, auch könnte Agglutination in Betracht kommen. Von letzterer ist nach 24 Stunden mikroskopisch noch nichts zu sehen, nach etwa 1 Woche ist sie in der Hayemschen Lösung zweifellos vorhanden. Auch von

einem Größerwerden der Erythrocyten ist ohne weiteres nichts zu beobachten. Dagegen scheint eine Bindung des Sublimates bzw. des Quecksilbers an die Erythrocyten stattzufinden, denn bei Verwendung von Hayemscher Lösung ohne Sublimat ist 1. die Senkungsgeschwindigkeit kleiner, 2. tritt eine nennenswerte Änderung der Senkungsgeschwindigkeit mit der Zeit nicht ein und 3. bleibt die Farbe der Blutmischung rot, während sie unter dem Einfluß des Sublimats mit der Zeit brauner wird. Es ist nun in der Tat bekannt, daß die semipermeable Membran der Erythrocyten für Sublimat durchgängig ist.

Abb. 2. A in Hayemlösung 24 Stunden nach dem Mischen. B in Hayemlösung sofort nach dem Mischen. C in Hayemlösung ohne Sublimat 16 Stunden nach dem Mischen. D in Hayemlösung ohne Sublimat sofort nach dem Mischen.

Noch sei darauf hingewiesen, daß die *Ermittlung der Senkungsgeschwindigkeit auch von praktischer Bedeutung ist*, indem man aus ihr auf den mittleren Gehalt eines Erythrocyten an Hämoglobin bzw. den *Färbeindex* schließen kann, bestehen doch fast 40% der feuchten Erythrocyten aus Hämoglobin. Ich verdanke Fräulein Dr. med. *Thaer*, welche im hiesigen Institut mit solchen Versuchen begonnen hat, folgende Angaben:

Färbeindex	1,28	Senkungsgeschwindigkeit	0,13
„	0,61	„	0,07

in *Hayemscher* Lösung. Durch einen relativ einfachen Versuch kann so unter Umständen die Differentialdiagnose zwischen Chlorose und perniziöser Anämie gestellt werden.

Nachdem nun durch die mitgeteilten Versuche die Art und Größe des Einflusses der Verdünnungsflüssigkeiten auf die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten ermittelt war, sollte nunmehr *geprüft* werden, *inwieweit das Zählresultat bei vergleichenden Zählungen mit der Thomaschen und Bürkerschen Methode von der Senkungsgeschwindigkeit und damit auch von der Natur der Verdünnungsflüssigkeit abhängig ist*. *Bürker* und *Marloff* haben gezeigt, daß das mit der *Thomaschen* Methode gewonnene Zählresultat weitgehend von dem Senkungsbestreben der Erythrocyten abhängig ist. Bei vergleichenden Zählungen im Blute der Haustiere ergaben sich *P. Kuhl*¹⁾ und *G. Fritsch*²⁾ durchschnittlich kleinere Erythrocytenwerte, als sie bisher, meist mit der *Thomaschen* Methode, ermittelt wurden. Bei all diesen Versuchen wurde aber mehr Rücksicht auf die Erythrocyten als auf die Verdünnungsflüssigkeit genommen. Es war zu erwarten, daß die *Thomasche* Methode auch in allen den Fällen zu hohe Werte geben würde, in welchen die Verdünnungsflüssigkeit eine rasche Senkung der Erythrocyten zuließ.

Von vornherein war beabsichtigt, den Einfluß aller der auf S. 273 genannten und untersuchten Verdünnungsflüssigkeiten, nämlich der 0,9proz. Kochsalz-, Tyrode-, *Hayem*- und *Krotkowschen* Lösung, auf das Zählresultat zu prüfen, und zwar bei den schweren Frosch-, den mittelschweren Menschen- und den leichten Ziegenerythrocyten, es ergaben sich aber Schwierigkeiten, die nur einen Teil der beabsichtigten Versuche zuließen. So stellte sich heraus, daß die Kochsalz- und Tyrodelösung hämolytisch und zwar auf alle Erythrocytenarten wirkte, wodurch die Zählungen illusorisch wurden, es zeigte sich ferner, daß die *Hayem*-sche Lösung die Ziegen-, die *Krotkowsche* Lösung die Menschen- und besonders die Ziegenerythrocyten agglutinierte, was auch das Zähl-

¹⁾ *P. Kuhl*, Das Blut der Haustiere mit neueren Methoden untersucht. I. Untersuchung des Pferde-, Rinder- und Hundebutes. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **176**, 263. 1919.

²⁾ *G. Fritsch*, a. a. O.

resultat sehr ungünstig beeinflussen mußte. Es blieb daher nichts anderes übrig, als sich auf die extremen Fälle zu beschränken und die Zählung der Frosch- und Menschenerythrocyten in *Hayemscher* und *Krotkowscher* Lösung vergleichend nach der *Thomaschen* und der *Bürkerschen* Methode vorzunehmen.

Dabei wurde, um unter sonst identischen Verhältnissen zählen zu können, folgendermaßen verfahren: Die eine Abteilung einer *Bürker*-schen Zählkammer wurde nach Art der *Thomaschen* Methode gefüllt, d. h. es wurde ein Tröpfchen der Blutmischung auf die Zählfläche gebracht und dann erst das Deckglas aufgelegt und mit Hilfe der Klammern dauernd unter Erzeugung schönster *Newtonscher* Streifen aufgedrückt. Die andere Abteilung wurde unmittelbar darauf, während das Deckglas liegen blieb, nach *Bürker*, also durch Capillarität, gefüllt. Nach Auszählung der beiden Abteilungen — es wurden in jeder 160 Quadrate berücksichtigt — wurde eine zweite analoge Füllung vorgenommen, nur wurde jetzt insofern gewechselt, als die Abteilung, welche vorher nach *Bürker* gefüllt worden war, jetzt nach *Thoma* gefüllt wurde und umgekehrt. Das Resultat wurde aus dem Erythrocyteninhalt von je 320 Quadraten berechnet.

Bei dieser Art der Füllung zeigte sich wieder, wie schwer es war, einwandfrei nach *Thoma* zu füllen, es mußte die Füllung oft mehrere Male vorgenommen werden, bis sie allen Anforderungen entsprach. Mit Rücksicht auf die relativ großen Froscherythrocyten wurde bei Zählung derselben durch Auflegen des mit einem Einschliff von 0,100 mm Tiefe versehenen Deckglases die doppelte Kammerhöhe von 0,200 mm hergestellt. Gezählt wurde in diesem Falle in den großen Quadraten von $\frac{1}{25}$ qmm, 125 solcher Quadrate wurden in jeder Abteilung berücksichtigt, also gerade 1 cmm Blutmischung. Da im allgemeinen alle Blutarten 200fach verdünnt waren, so brauchte im letztgenannten Falle die ermittelte Erythrocytenzahl nur noch mit 200 multipliziert zu werden. In Wahrheit liegen die Verhältnisse bei Zählungen in der *Thomaschen* Kammer selbst wegen des 9mal kleineren Zählnetzes und der Unsicherheit, das Deckglas richtig aufzulegen und in gleicher Lage zu erhalten, noch ungünstiger.

In der Tabelle (S. 278) sind die *Resultate der Zählungen* mitgeteilt.

Aus den am Blute von 7 verschiedenen Tieren gewonnenen *Zählresultaten* ergibt sich, daß unter 17 nach *Thoma* angestellten Versuchen 16 ein höheres Resultat lieferten als die nach *Bürker* durchgeführten, nur Versuch 11 lieferte einen niedrigeren Wert. Im Durchschnitt von allen Zählungen beträgt die Differenz 10,3% bei einer mittleren Senkungsgeschwindigkeit der Froscherythrocyten von 0,60 mm pro Minute.

Die Versuche Nr. 8—17 sind an derselben Blutmischung durchgeführt, sie sind daher zur Berechnung des mittleren Fehlers jeder

einzelnen Zählung (fm) und des Mittelwertes (Fm) nach der *Gauss*schen Fehlerquadratmethode geeignet¹⁾. Nach dieser beträgt der erstere Fehler für die *Thomas*sche Methode bei einem Mittelwert von 348,5 Erythrocyten $\pm 25,6$ Erythrocyten oder $\pm 7,3\%$, der letztere $\pm 8,1$ Erythrocyten oder $\pm 2,3\%$. Zu diesen zufälligen Fehlern kommt aber noch ein der *Thomas*schen Methode zur Last fallender systematischer Fehler von $+ 10,3\%$.

**Vergleichende Zählungen von Froseherythrocyten
in Hayem'scher Lösung.**

Nr. des Versuches	Datum der Blutentnahme	Erythrocytenzahl in Millionen		Unterschied in Prozenten	Senkungs- geschwindigkeit in mm pro Minute
		nach Thoma	nach Bürker		
1	5. XII. 1919	0,473	0,422	+ 12,1	—
2	9. XII. 1919	0,489	0,446	+ 9,6	—
3	11. XII. 1919	0,624	0,526	+ 18,6	—
4	13. I. 1920	0,341	0,315	+ 8,3 ²⁾	0,64
5	19. IV. 1920	0,312	0,283	+ 10,3	0,55
6	20. IV. 1920	0,391	0,371	+ 5,4	0,60
7	26. IV. 1920	0,371	0,332	+ 11,8	0,60
8	26. IV. 1920	0,324	0,320	+ 1,3	—
9	26. IV. 1920	0,362	0,322	+ 12,4	—
10	26. IV. 1920	0,375	0,308	+ 21,8	—
11	26. IV. 1920	0,320	0,325	— 1,5	—
12	26. IV. 1920	0,333	0,329	+ 1,2	—
13	26. IV. 1920	0,321	0,318	+ 0,9	—
14	26. IV. 1920	0,332	0,315	+ 5,4	—
15	26. IV. 1920	0,358	0,316	+ 13,3	—
16	26. IV. 1920	0,369	0,315	+ 17,1	—
17	26. IV. 1920	0,391	0,313	+ 24,9	—
im Mittel				+ 10,3	0,60

Für die nach der *Bürker*schen Methode gewonnenen Zählresultate ergibt sich $fm = \pm 6,1$ Erythrocyten bzw. $1,9\%$, $Fm = \pm 1,9$ Erythrocyten bzw. $0,6\%$, ein systematischer Fehler kommt hier nicht hinzu. Die zufälligen Fehler sind hier also wesentlich kleiner als bei der *Thomas*schen Methode.

Die größte von mir beobachtete Differenz zwischen den nach *Thoma* und nach *Bürker* gewonnenen Zählresultaten betrug $24,9\%$. Wie *Marloff* (a. a. O. S. 362) zu der außerordentlich hohen Differenz von 136% kam, ist schwer zu entscheiden, soviel ist aber gewiß, daß die *Thomas*sche Methode viel unsicherer ist und an die Geschicklichkeit des

¹⁾ Die Fehler seien im folgenden unterschieden als persönliche und sachliche Fehler, die letzteren als systematische und zufällige Fehler. Siehe *F. Auerbach*, Maß und Messen, Handwörterbuch d. Naturwiss., 6, 744. Verlag von G. Fischer. Jena 1912.

²⁾ Einfache Kammerhöhe statt doppelte.

Untersuchers viel größere Anforderungen stellt, eine geringe Verzögerung im Auflegen des Deckglases führt schon große Fehler herbei. Es haftet eben dieser Methode nicht nur ein systematischer, sondern auch ein der Natur der Sache nach sehr variabler persönlicher Fehler an. Jedenfalls müssen die am Froschblut meist mit der *Thomaschen* Methode erzielten Zählresultate einer Revision unterzogen werden, um zu Standardwerten zu kommen.

Die folgenden Versuche beziehen sich auf die Zählung menschlicher Erythrocyten aus meinem Blute in *Hayemscher* Lösung.

**Vergleichende Zählungen von Menschenerythrocyten
in Hayemscher Lösung.**

Nummer des Versuchs	Datum der Blutentnahme	Erythrocytenzahl in Millionen		Unterschied in Prozenten	Senkungsgeschwindigkeit in mm pro Min.
		nach Thoma	nach Bürker		
1	7. XI. 1919	4,72	4,36	+ 8,3	0,09
2	11. XI. 1919	4,30	4,17	+ 3,1	0,08
3	16. X. 1919	4,82	4,58	+ 5,2	0,11
4	4. XI. 1919	4,51	4,12	+ 9,5	0,10
5	13. XI. 1919	4,48	4,21	+ 6,4	0,09
6	19. XI. 1919	4,53	4,31	+ 5,1	—
7	26. XI. 1919	4,63	4,46	+ 3,8	—
8	13. III. 1920	4,50	4,24	+ 6,1	0,10
9	21. IV. 1920	4,74	4,71	+ 0,6	0,10
10	22. V. 1920	4,15	4,01	+ 3,5	0,12
11	„	4,26	3,95	+ 7,8	—
12	„	4,19	4,05	+ 3,5	—
13	„	4,26	4,08	+ 4,4	—
14	„	4,12	4,11	+ 0,2	—
15	„	4,32	3,93	+ 10,0	—
16	„	4,29	4,00	+ 7,3	—
17	„	4,17	4,14	+ 0,7	—
18	„	4,36	4,08	+ 6,9	—
19	„	4,23	4,06	+ 4,2	—
im Mittel + 5,1					0,10

Die 19 an meinem Blute durchgeführten Doppelzählungen führten ohne jede Ausnahme zu einem höheren Resultat nach der Methode von Thoma, die Differenz beträgt im Mittel 5,1% bei einer Senkungsgeschwindigkeit der Menschenerythrocyten in der *Hayemschen* Lösung von durchschnittlich 0,10 mm in der Minute.

Auch hier seien die an derselben Blutmischung durchgeführten Versuche Nr. 10—19 zur Fehlerberechnung herangezogen. Bei der *Thomaschen* Methode beträgt $f_m = \pm 7,7$ Erythrocyten für einen Durchschnittswert von 4,235, also $\pm 1,8\%$, F_m aber $\pm 2,4$ Erythrocyten

oder $\pm 0,6\%$. Dazu kommt der der *Thomaschen* Methode anhaftende systematische Fehler von $+ 4,8\%$.

Nach der *Bürkerschen* Methode ergab sich bei 4,129 Durchschnittswert $fm = \pm 6,8$ Erythrocyten oder $\pm 1,7\%$, $Fm = \pm 2,2$ Erythrocyten oder $\pm 0,5\%$.

Der geringeren Senkungsgeschwindigkeit der menschlichen Erythrocyten entspricht auch ein geringerer systematischer und zufälliger Zählfehler nach *Thoma*, aber immerhin ein für genaue Zählungen sehr in Betracht kommender.

Die von *Marloff* gefundenen Differenzen sind auch für Menschenblut größer, nämlich $15-18\%$. *Bürker*¹⁾ hat seinerzeit etwas größere Differenzen als ich, nämlich durchschnittlich 7% , gefunden, was wohl damit zusammenhängt, daß der Hämoglobingehalt seiner Erythrocyten mit $32 \cdot 10^{-12}$ g und damit das Senkungsbestreben etwas größer ist als das der meinigen, deren mittlerer Hb.-Gehalt $29 \cdot 10^{-12}$ g beträgt. Neuere Zählungen im Blute von *Bürker* ergaben für dieselbe Blutmischung nach der *Bürkerschen* Methode $fm = \pm 1,4$ und $Fm = \pm 0,4\%^{2)}$.

Um den Einfluß der spezifisch schwereren *Krotkowschen* Lösung auf das Zählresultat zu prüfen, wurden die folgenden Versuche angestellt:

Vergleichende Zählungen von Froscherythrocyten in Krotkowscher Lösung.

Nr. des Versuches	Datum der Blutentnahme	Erythrocytenzahl in Millionen		Unterschied in Prozenten	Senkungsgeschwindigkeit in mm pro Min.
		nach Thoma	nach Bürker		
1	10. IV. 1921	0,323	0,325	— 0,6	0,10
2	dgl.	0,329	0,313	+ 5,1	—
3	„	0,320	0,319	— 0,3	—
4	4. I. 1922	0,605	0,536	+ 12,9	0,33
5	dgl.	0,581	0,504	+ 15,3	—
6	„	0,502	0,544	— 7,7	—
7	„	0,565	0,541	+ 4,4	—
8	„	0,529	0,505	+ 4,8	—
9	„	0,562	0,518	+ 8,5	—
10	„	0,541	0,480	+ 12,7	—
11	„	0,564	0,501	+ 12,6	—
12	„	0,550	0,510	+ 7,8	—
13	„	0,566	0,526	+ 7,6	—
14	„	0,548	0,467	+ 17,3	—

¹⁾ K. Bürker, Das Grundübel der älteren Zählmethoden für Erythrocyten und seine Beseitigung mit besonderer Rücksicht auf Versuche im Hochgebirge. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **152**, 273. 1913.

²⁾ K. Bürker, Über die Notwendigkeit exakter absoluter Hämoglobinbestimmungen und Erythrocytenzählungen. Münch. med. Wochenschr. **68**, 571. 1921.

Betrachtet man zunächst die Resultate der 3 ersten Zählungen, die am Blute eines Frühjahrsfrosches vorgenommen wurden, so ergibt sich bei einer Senkungsgeschwindigkeit von 0,10 mm eine relativ gute Übereinstimmung nach beiden Methoden. Die Erythrocytenzahl ist im Mittel 0,319 Millionen nach Bürker, 0,324 nach Thoma. Die wenigen Versuche lassen weitere Schlüsse nicht zu.

Die am Blute des Winterfrosches angestellten Versuche ergaben nach beiden Methoden wesentlich größere Differenzen, auch war die Senkungsgeschwindigkeit mehr als 3 mal so groß, die Erythrocytenzahl 1,6 mal so groß als bei dem Frühjahrsfrosch. Die Winterfrösche weisen offenbar höhere Werte auf als die Frühjahrsfrösche, die letzteren sind auch für thermodynamische und viele andere Versuche sehr wenig geeignet. In 10 von den im ganzen 11 Versuchen lieferte die Thomasche Methode ein höheres Resultat, und zwar ergab sich als Mittel bei dieser Methode 0,5508 Millionen, bei der Bürkerschen Methode 0,5096 Millionen, damit also für erstere Methode ein systematischer Fehler von 8,1%. Nach Gauss berechnet sich für die Thomasche Methode $f_m = \pm 22,6$ Erythrocyten oder $\pm 4,1\%$, $F_m = \pm 7,2$ Erythrocyten oder $\pm 1,3\%$, für die Bürkersche Methode $f_m = \pm 24,3$ Erythrocyten oder $\pm 4,8\%$, $F_m = \pm 7,7$ Erythrocyten oder $\pm 1,5\%$. Hier sind also die zufälligen Fehler nach der Thomaschen Methode eher etwas kleiner als nach der Bürkerschen Methode, es kommt als sehr erschwerend für die Zählung in Betracht, daß infolge des hohen Brechungsexponenten das Zählnetz kaum zu sehen ist. Auch der Umstand, ob bei Tages- oder künstlichem Licht untersucht wurde, spielt hier schon eine Rolle.

Als letzte Versuchsreihe sei die an Menschenblut unter Verwendung von Krotkowscher Lösung mitgeteilt:

Vergleichende Zählungen von Menschenerythrocyten in Krotkowscher Lösung.

Nr. des Versuchs	Datum der Blutentnahme	Erythrocytenzahl in Millionen		Unterschied in Prozenten	Senkungsgeschwindigkeit in mm pro Min.
		nach Thoma	nach Bürker		
1	7. V. 1921	359	377	— 4,8	0,03
2	dgl.	377	371	+ 1,6	—
3	„	381	367	+ 3,8	—
4	„	368	356	+ 3,4	—
5	„	367	354	+ 3,7	—
6	„	373	367	+ 1,6	—
7	„	357	361	— 1,1	—
8	„	365	370	— 1,4	—
9	„	368	375	— 1,9	—
10	„	367	370	— 0,8	—
11	12. III. 1920	424	412	+ 2,9	0,03
12	22. IV. 1920	427	402	+ 6,2	—

Wie zu erwarten sind hier bei der geringen Senkungsgeschwindigkeit von 0,03 mm pro Minute die Differenzen zwischen den nach beiden Methoden gewonnenen Zählresultaten recht gering, ergab doch in den 10 ersten Zählungen die Thomasche Methode einen Mittelwert von 3,682 Millionen, die Bürkersche 3,668, die Differenz beträgt nur noch 0,4%, der systematische Fehler ist also nahezu verschwunden. Auch die zufälligen Fehler stehen einander mit $f_m \pm 7,4$ Erythrocyten oder 2,0% und $F_m = \pm 2,3$ Erythrocyten oder 0,6% für die Thomasche und $f_m = \pm 7,6$ Erythrocyten oder 2,1% und $F_m = \pm 2,4$ Erythrocyten oder 0,7% für die Bürkersche Methode sehr nahe. Soviel ist jedenfalls sicher, daß durch Verwendung einer Verdünnungsflüssigkeit, in welcher sich die Erythrocyten langsam senken, die Thomasche Methode von dem systematischen Fehler, der ihr sonst anhaftet, fast befreit werden kann. Freilich muß die Verdünnungsflüssigkeit dann so beschaffen sein, daß das Zählnetz gut sichtbar bleibt.

Die folgende Tabelle gewährt einen Überblick über die bei den vergleichenden Zählungen gewonnenen Resultate.

Erythrocytenart	Hayemsche Lösung				Krotkowsche Lösung			
	Senkungsgeschwindigkeit in mm pro Min.	Systemat. Fehler nach Thoma %	Zufälliger Fehler		Senkungsgeschwindigkeit in mm pro Min.	Systemat. Fehler nach Thoma %	Zufälliger Fehler	
			nach Thoma	nach Bürker			nach Thoma	nach Bürker
			%	%			%	%
Frosch	0,60	+ 10,3	$\pm 7,3$	$\pm 1,9$	0,33	+ 8,1	$\pm 4,1$	$\pm 4,8$
Mensch	0,10	+ 5,1	$\pm 1,8$	$\pm 1,7$	0,03	+ 0,4	$\pm 2,0$	$\pm 2,1$

Aus der Tabelle geht mit Bestimmtheit hervor, welch großen Einfluß die Verdünnungsflüssigkeit auf das Zählresultat bei Anwendung der Thomaschen Methode ausübt, die Bürkersche Methode dagegen ist von der Verdünnungsflüssigkeit unabhängig, es müßte denn sein, daß diese Flüssigkeit einen zu großen Brechungsexponenten aufweist und dann das Zählnetz schwer erkennen läßt. Der systematische Fehler, der der Thomaschen Methode anhaftet, ist um so größer, eine je größere Senkungsgeschwindigkeit die Verdünnungsflüssigkeit zuläßt. Es ist aber möglich, durch passende Wahl der Verdünnungsflüssigkeit die Thomasche Methode von diesem Fehler zu befreien, wobei freilich die anderen Fehler, die durch Verwendung der Mischpipette, des zu kleinen Zählnetzes und durch die Schwierigkeit der Zusammensetzung der Kammer in die Methode hineingetragen werden, bestehen bleiben.

Auf Grund der mitgeteilten Versuche muß die bei der Bürkerschen Methode zur Anwendung kommende Hayemsche Lösung als eine sehr

brauchbare Verdünnungsflüssigkeit bezeichnet werden, sofern es sich um menschliches Blut handelt, denn sie besitzt so ziemlich alle Eigenschaften, welche auf S. 267 von einer geeigneten Verdünnungsflüssigkeit verlangt werden. Bisher ist mir nur ein Fall bekannt geworden, bei dem in *Hayem'scher* Lösung Agglutination menschlicher Erythrocyten eintrat, nämlich bei Sepsis¹⁾. Von großer Bedeutung ist ferner, daß diese Lösung die Erythrocyten so gut konserviert, wenn auch in Glockenform, was auf das die Lipoidmembran der Erythrocyten passierende und sich wohl auch zum Teil mit ihr, hauptsächlich aber mit dem Hämoglobin verbindende Sublimat zurückzuführen ist.

Leider veranlaßt nun diese Lösung, wie schon S. 266 erwähnt wurde, in manchen Tierblutarten Agglutination, die Stabilität der Suspension ist darin eine ungenügende, und es erhebt sich die Frage, wodurch diese Instabilität bedingt ist und wie sie verbessert werden könnte.

A priori liegen 2 Möglichkeiten vor: 1. Die Instabilität hat ihre Ursache in der Beschaffenheit der Verdünnungsflüssigkeit und der in ihr suspendierten Erythrocyten; 2. die Beschaffenheit der Zählkammer ist für die Ungleichmäßigkeit in der Verteilung der Erythrocyten verantwortlich zu machen.

Was den ersteren Fall betrifft, so ist besonders durch die Untersuchungen Höbers²⁾ und seiner Schule mit Hilfe von Kataphoreseversuchen sichergestellt, daß die Erythrocyten eine negative Ladung aufweisen, sie wandern nach der Anode hin. Aber was nun für uns von besonderer Wichtigkeit ist, es bestehen artspezifische Differenzen in der Größe der Gesamtladung der Blutkörperchen, die Art und Konzentration der Binnenelektrolyte erteilt eben den Zellkolloiden eine ganz bestimmte Ladung. Daß diese Binnenelektrolyte in den Erythrocyten der verschiedenen Tiere in quantitativ verschiedener Menge vorhanden sind, geht schon aus den Analysen *E. Abderhaldens*³⁾ hervor, der bei Rind, Hammel und Ziege in 1000 Gewichtsteilen Blutkörperchen 0,3—0,4 Gewichtsteile anorganische Phosphorsäure und 0,7 Kali, bei Hund und Katze 1,2—1,3 Phosphorsäure und 0,3 Kali, bei Pferd, Schwein und Kaninchen sogar 1,7 Phosphorsäure und 4,1—5,2 Kali fand. Mit Hilfe von ein- und mehrwertigen Kationen, H^+ und La^{+++} , war es nun möglich, eine Umladung herbeizuführen, so daß jetzt die Erythrocyten zur Kathode wanderten. Wurde diejenige Wasser-

¹⁾ Siehe auch S. 267.

²⁾ R. Höber und O. Nast, Beiträge zum arteigenen Verhalten der roten Blutkörperchen. I. Hämolysen bei gleichzeitiger Einwirkung von Neutralsalzen und anderen cytolysierenden Stoffen. Biochem. Zeitschr. **60**, 131. 1914. — S. Kozawa, II. Kataphorese und Hämolyse. Ebenda S. 146. — R. Fahraeus, The suspension-stability of the blood. Acta med. scandinav. **55**. 1921.

³⁾ E. Abderhalden, Lehrbuch der physiologischen Chemie. 2. Aufl., S. 733. 1909.

stoffionenkonzentration bestimmt, bei welcher weder eine Bewegung zur Anode noch zur Kathode erfolgte, so zeigte sich diese Konzentration von Tier- zu Tierart verschieden; wie das Ausflocken der Zellkolloide, so erfolgt auch die Agglutination beim isoelektrischen Punkt am stärksten, man wird sich von diesem also möglichst fern zu halten suchen.

Es lag nun nahe zu prüfen, wie die Erythrocyten sich in *Hayem*scher Lösung verhalten. Mit der von *L. Michaelis*¹⁾ beschriebenen Methode habe ich nun festgestellt, daß auch in *Hayem*scher Lösung Menschen- und Froscherythrocyten, die ich bisher nur untersucht habe, zur Anode wandern, also negativ geladen sind. Man muß nun annehmen, daß in denjenigen mit *Hayem*scher Lösung hergestellten Blutmischungen, in welchen Agglutination zustande kommt, der isoelektrische Punkt erreicht oder nahezu erreicht ist. Nach den im hiesigen Institut durchgeführten Untersuchungen müßte dies für Rinder-, Hühner- und Tauben-, besonders aber für Ziegenblut zutreffen.

Es war nun zu erwarten, daß Zusatz von H- oder OH-Ionen eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes und damit Beseitigung oder wenigstens Minderung der Agglutination herbeiführen würde. Versuche, welche ich mit Ziegenblut angestellt habe, ergaben nun, daß Zusatz von einigen Kubikzentimetern $\frac{n}{10}$ -NaOH zu 100 ccm der mit *Hayem*scher Lösung hergestellten Blutmischung die Agglutination verstärkte, dagegen Zusatz von $\frac{n}{10}$ -HCl sie so verminderte, daß gut gezählt werden konnte. Auch Herrn *Welsch*, der im hiesigen Institut das Ziegen-, Schaf- und Schweineblut näher untersucht und in der Ziegen- und Schafblutmischung mit Agglutination zu kämpfen hatte, ergab sich durch Zusatz von $\frac{n}{10}$ -HCl eine Besserung der Verhältnisse. Nach alledem muß angenommen werden, daß die Kationen der Verdünnungsflüssigkeit es sind, welche auf die elektrische Ladung und damit auf die Stabilität der Erythrocytensuspension Einfluß haben.

Eine besondere Stellung nimmt noch das *Sublimat* in der *Hayem*-schen Lösung ein, wie schon früher (S. 275) gezeigt wurde. Als Schwermetallsalz kommt ihm entsprechend der *Hofmeisterschen* Fällungsreihe²⁾ eine stark ausflockende Wirkung zu. In der Tat ist in einer *Hayem*schen Lösung mit weniger oder gar ohne *Sublimat* die Agglutination geringer. Fräulein Dr. *Thaer* hat auch beobachtet, daß in Fällen von Sepsis die Agglutination menschlicher Erythrocyten ausbleibt, wenn diese in *Hayem*sche Lösung ohne *Sublimat* aufgenommen werden. In einer

¹⁾ *L. Michaelis*, Praktikum der physikalischen Chemie, insbesondere der Kolloidchemie. S. 100. Verlag von J. Springer. Berlin 1921.

²⁾ Siehe auch die aus dem *Hamburger*schen Institut stammende Arbeit von *W. Radzma*, Über die Agglutination roter Blutkörperchen und die *Hofmeister*-schen Reihen. *Biochem. Zeitschr.* 89, 211. 1918.

solchen Lösung ist aber die Konservierung der körperlichen Elemente eine schlechte. Versuche, das Sublimat durch ein anderes für vorliegende Zwecke geeignetes Fixationsmittel zu ersetzen, haben bisher kein brauchbares Resultat gezeitigt.

Noch könnte man daran denken, in Fällen von Agglutination ein Schutzkolloid zu verwenden, ich habe aber bisher nur einige orientierende Versuche ohne gute Resultate in dieser Richtung anstellen können.

Schließlich war auch noch in Betracht zu ziehen, wie schon erwähnt, ob nicht etwa die *Beschaffenheit der Zählkammer* für die ungleichmäßige Verteilung der Erythrocyten in den genannten Fällen verantwortlich zu machen war, um so mehr als nach den Untersuchungen von *F. Schwyzer*¹⁾ im lebenden Gefäße die Erythrocyten durch kontaktelektrische Ladung auseinandergehalten und von der Gefäßwand abgestoßen werden, in Berührung mit Glas aber durch Abgabe von OH-Ionen entladen und dadurch der Agglutination zugänglich gemacht werden. Auch ist mit der Abgabe von Alkali von seiten des Glases zu rechnen, und es ist ja durch die Untersuchungen *Deetjens* bekannt, daß auch die Thrombocyten gegen dieses Alkali sehr empfindlich sind. Inwieweit alle diese Verhältnisse in der Zählkammer eine Rolle spielen, bedarf noch der genaueren Untersuchung, es wurde aber jedenfalls öfters beobachtet, daß unmittelbar nach der Füllung der Kammer Agglutination nicht bestand, nach einiger Zeit aber eintrat; ich behalte mir in dieser und in den anderen genannten Beziehungen weitere Untersuchungen vor.

5. Zusammenfassung und Schluß.

Es wird die Herstellung einer möglichst rationell zusammengesetzten und allgemein anwendbaren Verdünnungsflüssigkeit für Erythrocytenzählungen angestrebt, da die in vielen Fällen sehr brauchbare *Hayem*-sche Lösung bei manchen Blutarten dadurch versagt, daß sie Agglutination veranlaßt. Zu dem Zwecke wurde zunächst in der vorliegenden Arbeit der Einfluß möglichst verschiedener Verdünnungsflüssigkeiten auf möglichst verschiedene Erythrocyten bei der Zählung derselben geprüft.

Die Bedingungen, die vor allem an eine solche Flüssigkeit gestellt werden müssen, sind gute Konservierung unter Vermeidung von Agglutination, möglichst kleiner Brechungsindex, um das Zählnetz gut sehen zu können und eine gewisse mittlere Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten. Die Diskussion der *Stokes*-schen Formel über die Senkungsgeschwindigkeit körperlicher Gebilde in einer Suspensionsflüssig-

¹⁾ *F. Schwyzer*, Die Geldrollenbildung im Blute vom kolloidchemischen Standpunkte aus. *Biochem. Zeitschr.* **60**, 297. 1914.

keit ergibt, daß auf die Dichte und Viscosität derselben der größte Wert zu legen ist.

Aus der großen Zahl der bisher zur Anwendung gelangten Verdünnungsflüssigkeiten wurde isotonische Kochsalz- und Tyrodelösung, durch Sublimat im allgemeinen gut konservierende *Hayem*- und durch Glycerin dichter und viscöser gemachte *Krotkowsche* Lösung ausgewählt und genauer untersucht. Als möglichst verschiedene Erythrocyten kamen Frosch-, Menschen- und Ziegenerythrocyten zur Verwendung.

Um zu exakten Werten für die Senkungsgeschwindigkeit zu gelangen, erwies sich die Beobachtung der Senkung des Blutkörperchenspiegels in einem relativ weiten Glasrohr bei möglichst langer Beobachtungszeit als am günstigsten. Bei Temperaturkonstanz ist unter diesen Bedingungen die Senkungsgeschwindigkeit derselben Erythrocyten in derselben Verdünnungsflüssigkeit eine recht konstante. Bei steigender Temperatur nimmt die Senkungsgeschwindigkeit rascher zu als bei sinkender ab.

Besondere Verhältnisse liegen in der *Hayemschen* Lösung vor, da diese durch das die semipermeable Membran passierende Sublimat die Erythrocyten beschwert und sie rascher sinken läßt, als man nach den sonstigen Eigenschaften dieser Lösung erwarten sollte. Da das Durchtreten des Sublimats offenbar Zeit erfordert, so ist die Senkungsgeschwindigkeit 24 Stunden nach Herstellung der Blutmischung größer als unmittelbar nachher, von 24 Stunden an ist sie aber ziemlich konstant. Die Senkungsgeschwindigkeit in *Hayemscher* Lösung steht auch in naher Beziehung zum Hämoglobingehalt eines Erythrocyten, so senkten sich die Erythrocyten in einem Fall von Anämie etwa doppelt so rasch als in einem Fall von Chlorose, woraus sich eine Methode zur Ermittlung des Färbeindex ergeben kann.

Beachtenswert ist, daß in isotonischer Kochsalz- und Tyrodelösung schon nach 24 Stunden Hämolyse eintritt. Die dichtere und viscösere *Krotkowsche* Lösung beseitigt unter Umständen den systematischen Fehler der *Thomaschen* Methode, sie veranlaßt aber Agglutination der Menschen- und besonders der Ziegenerythrocyten und macht die Zählmethode dadurch wieder ungenauer, daß sie das Zählnetz nur schwer erkennen läßt.

Daß in der Tat die Beschaffenheit der Verdünnungsflüssigkeit von großem Einfluß auf das Zählresultat bei Verwendung der *Thomaschen* Methode ist, das haben die vergleichenden Zählungen nach dieser und der *Bürkerschen* Methode ergeben; die letztere Methode ist aber von der Verdünnungsflüssigkeit viel unabhängiger.

Als beste Verdünnungsflüssigkeit hat sich immer noch die *Hayem*-sche Lösung erwiesen. Um sie von dem Fehler der Agglutination, die

in naher Beziehung zum isoelektrischen Punkt steht, zu befreien, wurde versucht, die Ladung der Erythrocyten durch Zusatz von H-Ionen zu ändern, was sich in der Tat als günstig erwies, während Zusatz von OH-Ionen das Gegenteil bewirkte. Auch durch Herabsetzung des Sublimatgehaltes ließ sich die Lösung verbessern. Schließlich mußte auch noch damit gerechnet werden, daß das Glas der Zählkammer die Ladung der Erythrocyten beeinflußt und auch durch Abgabe von Alkali in den Zählraum ausflockend wirkt. Es bedarf aber noch weiterer Versuche, um dem Ziel, eine rationell zusammengesetzte und zugleich allgemein anwendbare Verdünnungsflüssigkeit herzustellen, näherzukommen.