Über den isoelektrischen Punkt der tierischen Gewebe.

II. Mitteilung. Der isoelektrische Punkt der Erythrozyten verschiedener Tierarten.

Von

G. Yasuzumi.

Aus dem Anatomischen Institut der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen
Universität zu Osaka (Leitung: Prof. T. Tomita).

Mit 18 Textabbildungen.

Schon in meiner früheren Mitteilung wurde der isoelektrische Punkt des Oxyhämoglobins und der mit absolutem Alkohol fixierten Erythrozyten von Kaninchen als Ganzes beobachtet. Der isoelektrische Punkt des Oxyhämoglobins betrug $\text{pH} = 6,75$ bei den Kataphoreseversuchen. Der isoelektrische Punkt der mit absolutem Alkohol fixierten Erythrozyten betrug $\text{pH} = 6,50$. Die geringe Verschiedenheit zwischen dem isoelektrischen Punkte des Oxyhämoglobins, das als Hauptbestandteil der Zellen vorhanden ist, und der fixierten Erythrozyten als Ganzes ist wahrscheinlich auf den Einfluss der Stromasubstanz und anderer anorganischer Salze oder vielleicht auch auf die Denaturierung des Eiweisses, die von Fixation begleitet ist, zurückzuführen.

Die Erythrozyten verschiedener Tierarten sind dabei wahrscheinlich physikalisch, chemisch und strukturell verschieden gebaut. Daher kann man vermuten, dass der isoelektrische Punkt der Erythrozyten verschiedener Tierarten als Ganzes verschieden ist. Daher möchte ich durch das schon früher beschriebene Färbungsverfahren die Frage prüfen, ob der isoelektrische Punkt der Erythrozyten als Ganzes von Tierart zu Tierart differiert.

Untersuchungsmaterial.

Die Untersuchungsmethode habe ich schon früher beschrieben. Als Untersuchungsmaterial dienen die Erythrozyten von verschiedenen erwachsenen Tieren und zwar als Säugetiere: Mensch, Pferd, Rind, Hund, Katze, Kaninchen, Schwein, Ziege, Meerschweinchen, Maulwurf, Ratte und Maus; als Vögel: Taube, Huhn und *Uroloncha domestica*; als Reptilia: Schildkröte; als Amphibia: Frosch (*R. viridis*) und Triton; als Fische: Karausche und Goldfisch. Es wurden also hier Versuche mit dem Blute von achtzehn verschiedenen Tierarten angestellt, wozu noch die früher von mir ermittelten Werte für Kaninchenblut hinzukommen.

Untersuchungsergebnisse.

Durch die Kurven können die Färbungsintensitäten mit Toluidinblau und Ponceau der mit absolutem Alkohol fixierten Erythrozyten verschiedener Tiere dargestellt werden.

Kurven über die Färbung der mit absolutem Alkohol fixierten Erythrozyten:

A: Rind. B: Pferd. C: Schwein. D: Mensch. E: Meerschweinchen.
F: Maus. G: Maulwurf. H: Hund. I: Ziege. J: Ratte. K: Taube.
L: Huhn. M: *Uroloncha domestica*. N: Schildkröte. O: Triton.
P: Frosch. Q: Karausche. R: Goldfisch.

Auf der Abszisse wurden die pH-Werte abgetragen, auf der Ordinate die Färbungsintensität.

————— Toluidinblau. - - - - - Ponceau.

H

I

K

J

L

M

Wenn man sie zusammenfasst, so erhält man die folgende Tabelle.

Tabelle. Der isoelektrische Punkt der Erythrozyten verschiedener Tiere.

Tierarten	Isoelektrischer Punkt
Rind	6,78
Pferd	6,78
Schwein	6,73
Mensch	6,70
Meerschweinchen	6,68
Maus	6,60
Maulwurf	6,56
Kaninchen	6,50
Hund	6,48
Ziege	6,40
Ratte	6,39
Taube	6,68
Huhn	6,68
Uroloncha domestica	6,66
Schildkröte	6,53
Triton	6,46
Frosch	6,39
Karausche	6,30
Goldfisch	6,27

Diskussion.

Ordnet man die Tierarten hinsichtlich des isoelektrischen Punktes der mit Alkohol fixierten Erythrozyten, so erhält man die zwei folgenden Reihen. Natürlich müssen wir die kernlosen und kernhaltigen Erythrozyten unabhängig voneinander berücksichtigen.

Für die kernlosen Tierarten (Säugetiere) gilt :

Ratte > Ziege > Hund > Kaninchen > Maulwurf > Maus > Meerschweinchen > Mensch > Schwein > Rind, Pferd.

Für die kernhaltigen Tierarten (Vögel, Reptilia, Amphibia und Fische) :

Goldfisch > Karausche > Triton > Frosch > Schildkröte > Uroloncha domestica > Huhn, Taube.

Von den verschiedenen Versuchen, die Artspezifität der Tierarten aufzuklären, bezogen sich besonders die Arbeiten von Michaelis und

Takahashi (1910), Landsteiner (1913), Kozawa (1914), Straub und Meier (1922) u. a. auf den isoelektrischen Punkt der Erythrozyten. Mit den Ergebnissen der oben aufgeführten Autoren stimmen aber meine Ergebnisse nicht überein.

Durch L. Michaelis und D. Takahashi wurden die isoelektrischen Konstanten der Blutkörperchenbestandteile von Hammel, Schwein, Taube, Maus, Rind und Kaninchen beobachtet, und zugleich wurde auf die Möglichkeit eines Zusammenhanges zwischen Hämolyse und elektrischer Ladung der Blutkörperchensubstanz hingewiesen. Nach ihnen sind diese Konstanten der Stromasubstanz und des Oxyhämoglobins der Blutkörperchen aller untersuchten Tiere $CH = 1 \cdot 10^{-5}$ und $CH = 1,8 \cdot 10^{-7}$. Diese Resultate geben keine artspezifischen Differenzen. Landsteiner bestimmte den isoelektrischen Punkt der Blutkörperchen durch Fällungsmethode. Es ergab sich, dass die Stromata der einzelnen Tierarten in ihrer Fällbarkeit recht erheblich differieren; ordnet man sie nach dem Beginn der Ausflockung, so erhält man, mit der an leichtesten ausflockenden Art beginnend, folgende Reihe: Taube > Ratte, Kaninchen > Meerschweinchen, Katze > Pferd, Gans > Mensch > Huhn, Hammel, Ziege > Rind.

Bei den Versuchen von Michaelis und Takahashi und Landsteiner handelt es sich um ein Bestandteil der Blutkörperchen, wie die Erythrozyten als Ganzes von Tierart zu Tierart differieren.

Sh. Kozawa bestimmte die isoelektrischen Punkte der Blutkörperchenbestandteile der intakten Blutkörperchen durch Kataphorese-Versuche. Durch diese Methode wurde die folgende Reihe der artspezifischen Differenzen in der Grösse der Gesamtladung der Blutkörperchen gezeigt:

Kaninchen > Meerschweinchen > Pferd, Katze, Mensch > Hund > Ziege > Hammel > Rind, Schwein.

Der Kataphoresevorgang gründet sich offenbar auf der Potentialdifferenz zwischen den Begrenzungsflächen der Zellen und dem Dispersionsmittel. Die Färbung der fixierten Erythrozyten vollzieht sich nicht nur an der Oberfläche, sondern besonders im Inneren der Zellen. So kann man vermuten, dass die Resultate von Kozawa und die des Autors nicht immer gleich sind.

Nach Beobachtungen von Straub und Meier tritt die Unstetigkeit der Kohlensäure-Verbindungskurve der Erythrozyten bei verschiedenen Tierarten bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration auf. Dieser pH-Wert entspricht, nach seiner Meinung, dem isoelektrischen Punkt der Erythrozyten der betreffenden Tiere. Daraus ergibt sich die folgende Reihe:

Meerschweinchen > Pferd, Mensch > Hund, Ziege, Hammel > Schwein > Kaninchen > Rind.

Von meinen Beobachtungen stimmen nur die Resultate von Rind und Schwein mit den von Straub und Meier bestimmten Unstetigkeitsresultaten der Kohlensäure-Verbindungskurve der Blutkörperchen überein. Die anderen zeigen eine mehr oder weniger grosse Differenz. Bei den Versuchen von Straub und Meier handelt es sich auch hauptsächlich um das Hämoglobin.

Nach den Versuchen von M. Seki (1933) ist die Potentialdifferenz zwischen der negativ geladenen Erythrozytenoberfläche und der umgebenden Salzlösung je nach der Tierart verschieden, sei es bei frischen, sei es bei fixierten Erythrozyten. Er hat nach der Stärke der negativen Ladung der Erythrozytenarten die folgende Reihe geordnet:

Hund, Katze > Mensch > Meerschweinchen > Kaninchen.

Er nimmt an, dass die Ladung bei Pflanzenfressern kleiner als bei Fleischfressern ist.

In Bezug auf die elektrische Ladung der Erythrozyten stellen diese Resultate interessante Versuche dar. Hinsichtlich des isoelektrischen Punktes konnte ich aber diese Reihe nicht bestätigen. Dabei muss man berücksichtigen, dass ja natürlich auch die Methode sehr verschieden ist.

Von den Erythrozyten der von mir untersuchten Tierarten liegen die isoelektrischen Punkte derjenigen von Ungulata wie Rind, Pferd und Schwein auf der alkalischen Seite des Aciditätsgebiets. Jedoch liegt der Punkt bei der Ziege auf der relativ sauren Seite. Der isoelektrische Punkt der Erythrozyten aller Tiere von Ungulata ist also nicht immer gleich. Diese Tatsache besteht auch für Rodentia, und wahrscheinlich auch Carnivora, Insectivora u. a.. In Bezug auf den isoelektrischen Punkt der Erythrozyten können wir also keinen Zusammenhang zwischen Rodentia, Insectivora, Carnivora, Ungulata und Primates erkennen.

Die Reihe für die kernhaltigen Tierarten scheint phylogenetisch eine Bedeutung zu haben. Diese kolloidchemisch-artspezifische Verschiedenheit der Erythrozyten wurde strukturell mit der Gelatine-Silberimprägnationsmethode durch Fujita, Kawabe und Juba leicht bestätigt. In den Erythrozyten von Pisces und Amphibia kommt das Silberimprägnationsbild in der Form eines Netzes zum Vorschein. In denjenigen von Aves tritt dieses Bild in der Form eines Streifens an beiden Polen des Zelleibes auf, die Erythrozyten von Reptilia besitzen jedoch eine Zwischenform beider Strukturbilder. Wir können daher entschieden betonen, dass der isoelektrische Punkt der kernhaltigen Erythrozyten verschiedener

Tierarten je höher die Tierklasse ist, desto weiter auf der alkalischen Seite liegt.

Zusammenfassung.

Durch Färbungsverfahren wurde der isoelektrische Punkt der mit absolutem Alkohol fixierten Erythrozyten verschiedener Tierarten bestimmt.

1) Die Lage des isoelektrischen Punktes der Erythrozyten schwankt nach den einzelnen Tierarten nur innerhalb verhältnismässig enger Grenzen.

2) Von den Erythrozyten der untersuchten Säugetiere liegt der isoelektrische Punkt von Rind und Pferd auf der alkalischen Seite des Aciditätsgebietes, der Punkt von Ziege und Ratte auf der sauren Seite desselben und der Punkt von Schwein, Mensch, Meerschweinchen, Maus, Maulwurf, Kaninchen und Hund nehmen eine Mittelstellung ein.

3) In Bezug auf den isoelektrischen Punkt der Erythrozyten von kernhaltigen Tierarten zeigt sich die folgende phylogenetisch interessante Reihe mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration :

Pisces > Amphibia > Reptilia > Aves.

Zum Schlusse möchte ich hiermit noch Herrn Prof. T. Tomita für seine freundliche Anleitung und Anregung meinen herzlichsten Dank aussprechen.
(11. November 1933).

Literatur.

- 1) Kozawa, Sh., Beiträge zum arteigenden Verhalten der roten Blutkörperchen. II. Kataphorese und Hämolysse. Bioch. Zeitschr., Bd. 60, 1914.
- 2) Landsteiner, Zur Frage der Spezifität der Immunreaktionen und ihrer kolloidchemischen Erklärbarkeit. Bioch. Zeitschr., Bd. 50, 1913.
- 3) Michaelis, L. und Takahashi, D., Die isoelektrischen Konstante der Blutkörperchenbestandteile und ihre Beziehung zur Säurehämolysse. Bioch. Zeitschr., Bd. 29, 1910.
- 4) Seki, M., Studien der elektrischen Ladung und Färbbarkeit der Erythrozyten in Rücksicht auf die Beziehung zwischen Stroma und Hämoglobin. Zeitschr. f. Zellforsch. u. mikroskop. Anat., Bd. 17, 1933.
- 5) Straub, H. und Meier, K., Blutanalysen XI. Der isoelektrische Punkt roter Blutkörperchen verschiedener Säugetiere. Bioch. Zeitschr., Bd. 15, 1923.

- 6) Yasuzumi, G., Über den isoelektrischen Punkt der tierischen Gewebe. 1. Mitteilung. Bestimmungsmethode des isoelektrischen Punktes von Protoplasten und Verschiebung dieses Punktes der Erythrozyten von Kaninchen durch Formaldehyd. Fol. Anat. Jap., Bd. 11, 1933.