

XIII.

Ueber den Einfluss von venöser Stauung und Kohlensäure auf die Phagocytose

von

H. J. Hamburger
in Utrecht.

Die vorhergehenden Untersuchungen¹⁾ haben gelehrt, dass CO₂ einen steigernden Einfluss auf das antibakterielle Vermögen von Blut-, Gewebs- und Exsudatflüssigkeit auszuüben im Stande ist, und dass dieser Einfluss u. A. bei venöser Stauung zu Tage treten kann. Andere Untersuchungen haben dieses Resultat bestätigt²⁾.

Wir haben uns jetzt, im Zusammenhang mit dem auf S. 370 u. 371 Besprochenen, die Frage vorgelegt, welchen Einfluss venöse Stauung und Kohlensäure auf die Phagocytose ausüben.

Man kann bei der Phagocytose drei Momente unterscheiden:

1. Die Phagocyten bewegen sich nach den Mikroben zu (Chemotaxis).

2. Sie nehmen Mikroben auf.

3. Die aufgenommenen Mikroben werden getödtet.

Ich habe nun versucht, den Einfluss venöser Stauung auf jedes der drei Momente zu untersuchen.

1. Einfluss venöser Stauung auf die Chemotaxis.

Um den Einfluss venöser Stauung auf die Chemotaxis kennen zu lernen, gebrauchte ich, nach dem Vorgang von Hess, anfänglich viereckige, etwa 0,2 mm hohe, an einer Seite offene Glaskämmerchen. Diese Kämmerchen wurden angefüllt mit Culturen und unter die Haut gebracht. Nach einigen Stunden sah man nun in der That die Capillarspalte theilweise gefüllt

¹⁾ Dieses Heft S. 329.

²⁾ Hamburger. Over den invloed van veneuse stuwung op de vernieling van miltvuur in het onderhuidsch bindweesel. Zittingsversl. d. Koninkl. Akad. v. Wetensch. 23. April 1898. Dasselbe im Centralbl. f. Bakteriöl. 1. Abth. 1898. S. 345. Es stellte sich heraus, dass durch venöse Stauung, die Zerstörung von Milzbrandvirus im Unterhautbindegewebe in hohem Maasse befördert wird.

mit Leukocyten; die Begrenzung der weissen Blutkörperchen war aber nicht scharf, und bildete nur selten eine ordentliche Linie, so dass es schwierig zu unterscheiden war, wo die meisten Leukocyten eingedrungen waren, in das Kämmerchen, welches in der Hauttasche des normalen, oder welches in der des Stauungsbeines gelegen hatte. Ausserdem stiess das Experimentiren mit jenen Kämmerchen auf grosse technische Schwierigkeiten. Schliesslich habe ich mich darum etwa 1 cm langer, an einer Seite geschlossener Capillarröhrchen bedient. Dieselben wurden in der ganzen Länge und ziemlich tief in eine an beiden Vorderbeinen symmetrisch angefertigte Hauttasche hineingeschoben.

Um die Capillarröhrchen in der gewünschten Richtung zu halten, und um dieselben später leicht zurückfinden zu können, wurden sie in ein parallelopipedonförmiges Stückchen Kork gestochen. In jedes Korkstückchen wurden drei Röhrchen parallel eingesteckt (natürlich durch Canälchen, welche vorher mit einer Nadel angefertigt waren). Die Korkstückchen waren so hoch, dass die Enden der Röhrchen etwa ein Millimeter oben und unten hervorragten.

Die Anfertigung und Füllung der Capillarröhrchen geschah in folgender Weise: Ein sterilisirtes Glasrohr wurde in einer breiten Flamme lang ausgezogen, an der weiten Seite zugeschmolzen und dann mit dem offenen capillären Ende in eine Cultur gesetzt. Dann wurde, wenn die Cultur zu einer genügenden Höhe aufgestiegen war, das lange ganz mit Cultur angefüllte Capillarrohr mittels einer sehr feinen Feile angeschnitten, abgebrochen und an einem Ende zugeschmolzen. 1 cm von dem geschlossenen Ende wurde ein feiner Feilstrich gemacht und das erste Röhrchen abgebrochen. Jetzt wurde das geöffnete Ende des langen Capillarrohres wieder zugeschmolzen, und auf 1 cm Distanz vom geschlossenen Ende wieder ein feiner Feilstrich gemacht u. s. w. Bei Hunden war es nothwendig mit dem Hineinbringen der Korkstückchen zu warten, bis die geringe Blutung, welche bei der Präparirung der Hauttasche entstand, gestillt war. Sonst drangen auch rothe Blutkörperchen in die Capillarröhrchen hinein. Bei Kaninchen dahingegen brauchte man nicht zu warten, weil die Haut da so wenig fest aufliegt, dass die Präparirung der Hauttasche ohne merkliche Blutung geschehen kann.

Nach Entfernung der beiden, mit den offenen Enden der Röhrchen nach unten liegenden Apparätchen aus den mittels Seidenfaden geschlossenen Wunden, wurden die Längen der Leukocytensäulchen gemessen und je drei zu einander addirt. Als Culturen wurden genommen: Milzbrand und B. coli in Bouillon und in NaCl 0,9 pCt.; theilweise auch Culturen in Serum.

In den fünf ersten Versuchen wurde an einem Bein Stauung herbeigeführt, nachdem die Röhrchen unter die Haut geschoben waren. In den sechs letzten Experimenten VI, VII, VIII, IX, X und XI hingegen rief man erst ein kräftiges Oedem hervor (durch einfache Ligatur), und es wurden nachher die beiden Apparätchen hineingeführt. Das Oedem war immer so bedeutend, dass dasselbe im weiteren Verlauf des Versuchs nicht mehr mittels einer Ligatur unterhalten zu werden brauchte.

Nach 24 Stunden war es noch sehr deutlich.

In der ersten Versuchsreihe war das Oedem etwa drei Stunden nach Anlegung der Ligatur schon sichtbar. Es braucht kaum gesagt zu werden, dass alle Manipulationen ausgeführt wurden unter sorgfältigen aseptischen Cautelen.

Die folgende Tabelle enthält eine Uebersicht der erzielten Resultate.

Versuchs-Nummer	Thierart	Zeit, w. die Capillarröhrchen unter der Haut gelegen haben	Inhalt der Capillarröhrchen	Länge der Leukocyten-Säulchen, ausgedrückt in halben Millimetern	
				Normales Bein	Stauungsbein
I	Hund	5½ Std.	Milzbrand in Hunde-Serum	$3 + 3 + 2\frac{1}{4} = 8\frac{1}{4}$	$3 + 3 + 2 = 8$
II	Hund	24 "	Milzbrand in Hunde-Serum	$8\frac{1}{4} + 7\frac{1}{4} + 5\frac{1}{4} = 20\frac{3}{4}$	$5\frac{1}{2} + 6\frac{3}{4} + 4\frac{1}{2} = 16\frac{3}{4}$
III	Hund	23 "	B. coli in Hunde-Serum	$4\frac{1}{2} + 3\frac{1}{2} + 4 = 12$	$6 + 5 + 4 = 15$
IV	Kaninchen	23 "	B. coli in Hunde-Serum	$6 + 7 + 5 = 18$	$11\frac{1}{2} + 8 + 9\frac{1}{2} = 29$
V	Hund	25 "	Milzbrand theilt in NaCl 0,9 %	$3 + 3\frac{1}{2} + 3 = 9\frac{1}{2}$	$4 + 4 + 4\frac{1}{2} = 12\frac{1}{2}$

Versuchs-No.	Thierart	Zeit, dass die Capillarröhrchen unter der Haut gelegen haben.	Inhalt der Capillarröhrchen.	Länge der Leucocytsensäulchen, in halben Millimetern	
				Normales Bein	Stauungsbein
VI	Hund	7 "	B. coli in NaCl 0,9 %	$4 + 4 + 4\frac{1}{2} = 13$	$5 + 3\frac{1}{2} + 4 = 12\frac{1}{2}$
VII	Kaninchen	18 "	B. coli in NaCl 0,9 %	$5 + 5\frac{1}{2} + 5\frac{1}{4} = 15\frac{3}{4}$	$4\frac{1}{2} + 4 + 4\frac{1}{2} = 13$
VIII	Kaninchen	8 "	B. coli in Bouillon	$3\frac{3}{4} + 4 + 4\frac{1}{2} = 12\frac{1}{4}$	$3\frac{1}{4} + 3\frac{3}{4} + 3\frac{1}{2} = 10\frac{1}{2}$
IX	Hund	18 "	Milzbrand in Bouillon	$6 + 4 + 4\frac{1}{2} = 14\frac{1}{2}$	$6\frac{1}{4} + 6 + 6 = 18\frac{1}{4}$
X	Kaninchen	10 "	B. Coli in Bouillon	$5\frac{3}{4} + 5 + 5\frac{1}{2} = 16\frac{1}{4}$	$5\frac{3}{4} + 4\frac{1}{2} + 4\frac{1}{4} = 14\frac{3}{4}$
XI	Hund	12 "	Milzbrand in NaCl 0,9 pCt.	$7 + 7 + 6\frac{1}{4} = 20\frac{1}{4}$	$6\frac{1}{2} + 6 + 7 = 19\frac{1}{2}$

Aus dieser Tabelle geht hervor, dass in zwei Versuchen (I und VI) die gesammten Leukocytsensäulchen dieselbe Länge besitzen; in zwei Versuchen (III und V) sind die Säulchen unter dem Einfluss venöser Stauung ein wenig grösser als unter normalen Umständen; in einem Versuch (IV) sogar unerwartet viel grösser. In den sechs übrigen Experimenten (II, VII, VIII, IX, X und XI) hingegen hat die venöse Stauung einen ungünstigen Einfluss auf die Chemotaxis ausgeübt.

Der Einfluss venöser Stauung auf die Chemotaxis ist also im Allgemeinen geringfügig. Wo er sich in den Versuchen geltend machte, war er aber in den meisten Fällen von beeinträchtigender Natur.

2. Einfluss von venöser Stauung und Kohlensäure auf die Aufnahmefähigkeit der Phagocyten.

Um den Einfluss venöser Stauung auf die Aufnahmefähigkeit der Phagocyten kennen zu lernen, war es angezeigt, wie bei den vorigen Experimenten, Capillarröhrchen mit einer Cultur zu versehen und dieselben in entsprechende Hauttaschen der beiden Vorderpfoten zu legen. Dann wurden etwa 24 Stunden nachher die hineingetretenen weissen Blut-

körperchen entfernt und man konnte für die beiden Pfoten untersuchen, wie viel Procent der weissen Blutkörperchen Bakterien aufgenommen hatten.

Ich wählte für diese Experimente keine Bouilloncultur, weil Bouillon für das Leben von Leukocyten nicht sehr günstig ist, sondern eine Cultur in Serum, und zwar von *B. anthrax*.

Als Versuchsthier wurde der Hund genommen, und auch hier wurde wieder darauf geachtet, dass die Röhrchen erst in die Hauttaschen gebracht wurden, nachdem die Blutung völlig aufgehört hatte. Die Präparate wurden gefärbt mit Methylenblau.

Anzahl der untersucht. weissen Blutkörperchen.	Anzahl der weissen Blutkörperchen, welche Bakterien aufgenommen hatten.	
	In den Röhrchen der nor- malen Pfote.	In den Röhrchen der Stauungspfote.
200	58	55
200	45	41
200	68	59
200	37	35

Nimmt man das Mittel, so stellt sich heraus, dass von den 200 weissen Blutkörperchen in der normalen Pfote 200, und der im Stauungspfote 190 Leukocyten Milzbrandbacillen aufgenommen haben, ein Unterschied, welcher nahezu innerhalb der Grenzen der Beobachtungsfehler fällt.

Hieraus geht hervor, dass venöse Stauung keine nennenswerthe Beeinträchtigung in der Fähigkeit der Phagocyten des Hundes, Milzbrandbacillen in sich aufzunehmen, verursacht hat.

Mit diesem Resultat in Einklang stehen die zahlreichen Experimente, welche ich angestellt habe, um den Einfluss reiner Kohlensäure auf die Aufnahmefähigkeit der Phagocyten zu studiren.

Es schien mir wichtig, hierzu keine Stoffe anzuwenden, welche auf die Phagocyten einen chemischen Einfluss ausüben

konnten. Ich nahm darum feine Knochenkohle. Diese wurde den gebräuchlichen Carminkörnchen vorgezogen, weil schwarze Kohlenstücke viel leichter in den weissen Blutkörperchen erkannt werden können.

Als leukocytenhaltige Flüssigkeit wurde anfänglich Kaninchenblut angewandt, doch bald mussten wir uns nach einer andern Flüssigkeit umsehen, weil es sich so selten ereignete, dass ein kohlehaltiges weisses Blutkörperchen unter dem Mikroskop sichtbar war. Bei näherer Betrachtung konnte das auch nicht wundern. Kommt ja auf 350 Blutkörperchen im Mittel ein Leukocyt vor, und von der totalen Leukocytenzahl sind nur ungefähr 10 pCt. phagocytisch. Man hat also nur die Chance, ein Kohle enthaltendes weisses Blutkörperchen auf 3500 Erythrocyten zu sehen.

Darum wurde defibrinirtes Jugularisblut eines Pferdes genommen. Ueberlässt man dieses $\frac{1}{2}$ Stunde sich selbst, so haben sich fast alle rothen Blutkörperchen zu Boden gesenkt. Entfernt man nun das Serum mit den weissen Blutkörperchen und einem kleinen Theil der rothen, centrifugirt, hebt den grössten Theil des klaren Serums ab, und vermischt den Bodensatz mit dem Rest des Serums, so bekommt man eine sehr trübe Flüssigkeit, welche reich an Leukocyten ist. Um nun den Einfluss von CO_2 zu studiren, wurden von dieser leukocytenreichen Flüssigkeit zwei gleiche Theile genommen, ein Theil wurde geschüttelt mit einem bekannten Volum CO_2 , der andere nicht. Weiter wurden die beiden Röhrchen geschlossen und während einer Stunde auf Körpertemperatur gehalten; endlich wurde zu beiden Knochenkohle hinzugefügt und jede Viertelstunde die Flüssigkeit ein wenig geschüttelt. Nach einer bestimmten Zeit entfernte man die Röhrchen aus dem Brutofen und fertigte von dem Inhalt Präparate an, behufs mikroskopischer Untersuchung, indem ein Tropfen der schwarzen Flüssigkeit zwischen Objectträger und Deckgläschen gebracht und in ein Paraffinleistchen eingeschlossen wurde. Um Präparate zu bekommen, in welchen die Leukocyten längere Zeit mit Kohle in Berührung gewesen waren, hätte man, nach Anfertigung der beiden soeben erwähnten Präparate, die Röhrchen wieder in den Ofen setzen können. Es wurde dies aber nicht gethan, weil sonst

durch das Oeffnen der Röhrchen der CO_2 -Gehalt stets mehr abnehmen würde. Besser war es darum für jeden Versuch ein neues Paar Röhrchen zu nehmen. Um zu vermeiden, dass in einem Präparat zweimal dieselben Leukocyten untersucht wurden, gebrauchten wir eine verschiebbare Objecttafel.

In der folgenden Tabelle findet man einige der erzielten Resultate zusammengefasst.

Wie man bemerken wird, haben wir die Blutkörperchen nicht länger als $1\frac{1}{2}$ Stunde mit Kohle in Berührung gelassen. Aus zahlreichen Experimenten hatte sich nemlich ergeben, dass bei längerer Berührung die Zahl der kohlehaltigen Phagocyten nicht zunahm.

CO ₂ -Menge, mit welcher geschüttelt wurde.	Zeit, währ. welcher die Blutkör- perchen mit Knochen- kohle in Berührung waren.	Anzahl der untersuchten weissen Blut- körperchen.	Procentgehalt d. kohlenhltg. Leukocyten.	
			Ohne Behandlung mit CO ₂	Nach Behandlung mit CO ₂
50 Vol. pCt.	$\frac{3}{4}$ Stunde	300	10.6 pCt.	9 pCt.
	$1\frac{1}{2}$ -	600	10.7 -	8 -
50 -	20 Minuten	400	8.4 -	5 -
	$\frac{3}{4}$ Stunde	400	8.9 -	$5\frac{1}{2}$ -
	$1\frac{1}{2}$ -	400	12 -	7 -
25 -	20 Minuten	450	8 -	7.5 -
	$\frac{3}{4}$ Stunde	400	8 -	8 -
	$1\frac{1}{2}$ -	500	11.5 -	9 -
25 -	$\frac{3}{4}$ -	400	8 -	5.5 -
	$1\frac{1}{2}$ -	450	8 -	6 -
10 -	$\frac{3}{4}$ -	500	10 -	9.4 -
	$1\frac{1}{2}$ -	500	10.6 -	11 -
10 -	$\frac{3}{4}$ -	400	7 -	7.5 -
	$1\frac{1}{2}$ -	400	9.5 -	8.5 -
5 -	$\frac{3}{4}$ -	500	9.9 -	9.6 -
	$1\frac{1}{2}$ -	500	10 -	10.4 -
5 -	$\frac{3}{4}$ -	500	8.6 -	9 -
	$1\frac{1}{2}$ -	500	9.4 -	9 -

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass unter dem Einfluss von 50—25 Vol. pCt. CO_2 , — ein CO_2 -Gehalt, welcher indessen bei einer nicht bedeutenden Stauung wahrscheinlich nicht vorkommt, — die Aufnahmefähigkeit der Phagocyten verringert ist.

Nach Einwirkung von 10 Vol. pCt. CO_2 und weniger, kann man von einer Verringerung der Aufnahmefähigkeit nichts bemerken.

3. Einfluss venöser Stauung auf die in die Phagocyten aufgenommenen Bakterien.

Ich habe mich sehr bemüht, den Einfluss von CO_2 auf die einmal in Phagocyten aufgenommenen Mikroben festzustellen; bis jetzt ist es mir aber nicht gelungen, weder in vitro, noch in vivo. Nicht in vitro, weil es mir nicht gelang, eine Combination von Bakterien und weissen Blutkörperchen zu finden, wobei ein Zugrundegehen oder eine Degeneration von Mikroben so schnell vor sich ginge, dass derselbe unter dem Mikroskope verfolgt werden konnte, was ja unentbehrlich ist, um festzustellen, in welchen Phagocyten dies schneller stattfindet, in den normalen, oder in den mit CO_2 behandelten.

Noch lieber hätte ich die Frage in vivo beantwortet, aber bis jetzt verfügte ich nicht über ein Mittel, um Bakterien dem Einfluss von weissen Blutkörperchen auszusetzen, mit Ausschluss von Gewebsflüssigkeit.

Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Phagocyten auch nicht auf andere Weise den Einfluss von CO_2 erfahren, ob namentlich die CO_2 -Phagocyten beim Auseinanderfallen vielleicht kräftiger baktericide Stoffe liefern, als die normalen.

Zusammenfassung.

1. Der Einfluss venöser Stauung auf die Chemotaxis ist im Allgemeinen geringfügig. Wo derselbe sich in den Versuchen geltend machte, war er aber in den meisten Fällen von beeinträchtigender Natur (Milzbrand und *B. coli* gegenüber Hund und Kaninchen).

2. In gleichem Sinne äussert sich der Einfluss venöser Stauung auf das Vermögen der Phagocyten, Bakterien (Milzbrand) in sich aufzunehmen.
3. Nur bedeutende CO_2 -Mengen sind im Stande, die Beweglichkeit der Phagocyten dermaassen zu verzögern, dass die Fähigkeit, Kohlepartikelchen in sich aufzunehmen, deutlich beeinträchtigt wird. Dieses Resultat ist in Einklang mit dem sub 2 erwähnten.

