

## Die Bestimmung der Sauerstoffbindungskurve von hochverdünnten Hämoglobinlösungen

JÜRGEN GROTE

Physiologisches Institut der Universität Mainz

Eingegangen am 5. Juni 1967

*Summary.* Oxygen dissociation curves of diluted haemoglobin solutions are plotted with the aid of a test procedure, outlined by THEWS (1960), for the examination of O<sub>2</sub> diffusion in biological media. The applicability of this process for the direct and exact determination of oxygen dissociation curves is verified both theoretically and in practice. Tests on greatly diluted human haemoglobin solutions, of concentration  $16.4 \times 10^{-3}$  g/100 ml and  $16.4 \times 10^{-4}$  g/100 ml, give the following results:

At temperatures of 20, 30, and 37°C, with a pH value of 8.0, the oxygen dissociation curves of the haemoglobin solutions tested, display typical slopes. The oxygen affinity of the test-solutions increases with diminishing concentration.

*Zusammenfassung.* Mit Hilfe einer von THEWS (1960) für Untersuchungen der O<sub>2</sub>-Diffusion in biologischen Medien angegebenen Versuchsanordnung werden Sauerstoffverbindungskurven von verdünnten Hämoglobinlösungen aufgenommen. Die Anwendbarkeit des Verfahrens für die direkte und genaue Bestimmung von Sauerstoffbindungskurven wird theoretisch und praktisch überprüft. Untersuchungen an hochverdünnten Lösungen menschlichen Hämoglobins einer Konzentration von  $16,4 \cdot 10^{-3}$  g/100 ml und  $16,4 \cdot 10^{-4}$  g/100 ml führen zu folgenden Ergebnissen:

Bei den Temperaturen 20, 30 und 37°C und dem pH-Wert 8,0 haben die Sauerstoffbindungskurven der untersuchten Hämoglobinlösungen typisch S-förmige Verlaufsformen. Die Sauerstoffaffinität der Untersuchungslösungen steigt mit abnehmender Konzentration.

Da der genaue Ablauf der Anlagerungsreaktion des Sauerstoffes an das Hämoglobin bisher unbekannt ist, wurden zahlreiche Theorien entwickelt, die eine Deutung für das Zustandekommen der typischen S-Form der Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobins in Lösungen und im Blut zu geben versuchten. Von ihnen werden heute die Zwischenbindungshypothese von ADAIR (1925), die Umlagerungshypothese von NIESEL (1961), eine Hypothese von RADFORD, die den statistischen Charakter des Reaktionsablaufes in den Vordergrund stellt (1962), und die Hypothese von SCHEJTER, ADLER u. GLAUSER (1963), GLAUSER u. FORSTER (1967), die voraussetzt, daß das Hämoglobin in dimerer wie tetramerer Form im Blut und in Hämoglobinlösungen vorliegt und in beiden Zustandsformen Sauerstoff zu binden vermag, diskutiert. Für die Erklärung der Form der Sauerstoffbindungskurve des Neunaugenhämoglobins (WALD u. RIGGS, 1951; BRIEHL, 1963) wurde außerdem in jüngster

Zeit eine von HALDANE entwickelte Theorie (DOUGLAS, HALDANE u. HALDANE, 1912) erneut herangezogen (ROUGHTON, 1965).

Den genannten Deutungsversuchen des Verlaufes der Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobins ist gemeinsam, daß sie auf Annahmen basieren, für die in wichtigen Teilen bisher keine experimentellen Beweise vorliegen. Die von ADAIR geforderten Zwischenreaktionen bei der  $O_2$ -Bindung durch das Hämoglobin konnten noch nicht nachgewiesen werden, wenngleich ROUGHTON, GIBSON u. Mitarb. (1951—1965) durch Untersuchungen der Reaktionskinetik Gleichgewichtskonstanten für die möglichen Stufen der Anlagerung des Sauerstoffes bestimmten. Für die von NIESEL geforderten zwei Zustandsformen des Hämoglobins liegen lediglich Hinweise vor. Gleichfalls steht der Beweis für die Richtigkeit der Vorstellung von SCHEJTER, ADLER u. GLAUSER, daß das Hämoglobin in dimerer und tetramerer Form während der  $O_2$ -Anlagerung vorliegt, bisher aus.

Um die Gültigkeit der einzelnen Hypothesen überprüfen zu können, ist man auf die Gegenüberstellung von direkt bestimmten Sauerstoffbindungskurven mit Kurven, die für gleiche Versuchsbedingungen nach den verschiedenen Theorien zu erwarten sind, angewiesen. Als besonders geeignet für die Untersuchung dieser Frage erwiesen sich Hämoglobinlösungen, in denen leichter als im Blut konstante und reproduzierbare Bedingungen eingestellt werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Sauerstoffbindungskurven hochverdünnter Lösungen menschlichen Hämoglobins und ihre Temperaturabhängigkeit zu bestimmen. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob die nach den Untersuchungsergebnissen von GILBERT (unveröffentlicht, zitiert nach ROUGHTON, 1965) und der Zwischenbindungshypothese von ADAIR zu fordernde Formänderung der Sauerstoffbindungskurve in stark verdünnten Lösungen menschlichen Hämoglobins nachzuweisen ist.

## Methodik

### *Prinzip der Meßanordnung*

In eine mit desoxygenierter Hämoglobinlösung gefüllte Reaktionskammer diffundiert Sauerstoff mit konstanter Geschwindigkeit. Die beim Übergang des Hämoglobins vom desoxygenierten in den oxygenierten Zustand auftretende Farbänderung wird photometrisch registriert und fortlaufend aufgezeichnet.

Durch Eichung des Systems mit Lösungen, die mit Gasgemischen bekannter Zusammensetzung äquilibriert wurden, ist es möglich, den zeitlichen Verlauf der bestimmten Extinktionsänderung in eine vom Sauerstoffdruck abhängige  $O_2$ -Sättigungsänderung des Hämoglobins umzurechnen.

### *Aufbau der Meßanordnung und Versuchsdurchführung*

Für die direkte und kurzzeitige Aufnahme der Sauerstoffbindungskurve von Hämoglobinlösungen wurde eine Versuchsanordnung benutzt, die von THEWS (1960) für Untersuchungen der Sauerstoffdiffusion in biologischen Medien beschrieben und später von THEWS u. RÖSKENBLECK (unveröffentlicht) weiterentwickelt wurde.

In Abb. 1 ist die Meßanordnung schematisch dargestellt. Abweichend von der ursprünglichen Anordnung wurden in der verwendeten Meßapparatur der Gasraum und die mit Hämoglobin gefüllte Reaktionskammer lediglich durch eine dünne Kunststoffmembran (Teflon, 12  $\mu$ ) getrennt.

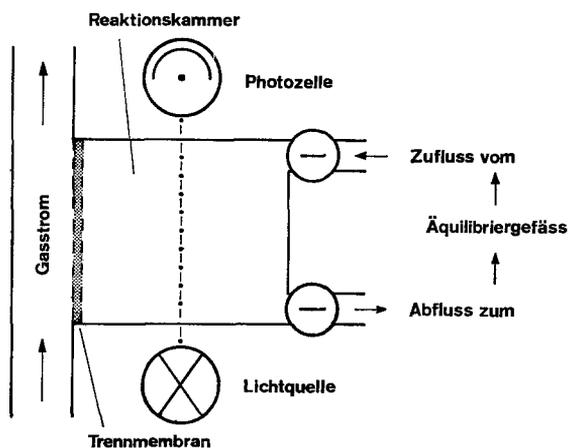


Abb. 1. Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur direkten Aufnahme von Sauerstoffbindungskurven in stark verdünnten Hämoglobinlösungen

Vor Versuchsbeginn ist die Meßkammer  $O_2$  frei. Die zu untersuchende Hämoglobinlösung wird nach vollständiger Desoxygenierung direkt aus einem Äquilibriumgefäß in die Reaktionskammer überführt. Die Zu- und Abflußwege der Reaktionskammer werden verschlossen, durch das Gasrohr wird  $N_2$  geleitet. Zum definierten Zeitpunkt  $t_0$  wird der  $N_2$ -Strom unterbrochen, und der Weg für den Durchfluß von Sauerstoff oder ein Sauerstoff-Stickstoffgemisch freigegeben. Sauerstoff diffundiert dann durch die Trennmembran in die Reaktionskammer, das Hämoglobin wird oxygeniert. Die dabei auftretende Extinktionsänderung der Hämoglobinlösung wird von einem Photometer (Photometer Eppendorf) fortlaufend bestimmt und auf einem angeschlossenen Registriergerät (Kompensations-Linien-Schreiber Servogor, Metrawatt) direkt aufgezeichnet.

Für eine gleichmäßige und vollständige Durchmischung des eindiffundierenden Sauerstoffes mit der Hämoglobinlösung in weniger als 0,5 sec sorgt ein magnetisches Rührsystem.

Zur Eichung der Versuchsanordnung wird die untersuchte Hämoglobinlösung aus der Reaktionskammer erneut in ein angeschlossenes Tonometer überführt und mit Gasen bekannter Zusammensetzung äquilibriert. Die Eichgaszusammensetzung wird im Mikro-Gasanalysegerät nach SCHOLANDER (1947) bestimmt. Nach vollständiger Äquilibrierung der Lösung mit dem Eichgas wird eine mehrmalige Messung der Extinktion in der Reaktionskammer bei gleichzeitiger Durchströmung des Gasrohres mit dem Eichgas durchgeführt.

Konstante Temperaturbedingungen während der Messung sind durch die Thermostatisierung der gesamten Versuchsanordnung gewährleistet, die Genauigkeit der Temperatureinstellung beträgt  $\pm 0,1^\circ C$ .

*Auswertung der registrierten Kurven*

Die gemessenen zeitlichen Extinktionsänderungen während der Oxygenierung des Hämoglobins lassen sich direkt in HbO<sub>2</sub>-Sättigungsprozente umrechnen, da die Untersuchungen an homogenen Medien durchgeführt wurden, und weil eine lineare Beziehung zwischen der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins und seiner Extinktion nachgewiesen werden konnte (ENOKI u. TYUMA, 1964). Unter diesen Voraussetzungen entspricht die O<sub>2</sub>-Sättigung dem Verhältnis der Extinktionsdifferenz zwischen dem Ausgangspunkt 0 und dem Meßpunkt zur Extinktionsdifferenz zwischen 0 und 100% HbO<sub>2</sub>-Sättigung.

Aus der bestimmten zeitlichen Sättigungsänderung des Hämoglobins während eines Versuches kann die Sauerstoffbindungskurve nach Eichung des Systems direkt ermittelt werden, wenn die Bedingung erfüllt ist, daß der Sauerstoffdruck in der Reaktionskammer im Verlaufe des Meßvorganges linear ansteigt.

Diese Voraussetzung ist während einer kurzen Zeitspanne bei Versuchsbeginn und nach Überschreiten von 11% des Ausgleichsdruckes in der Hämoglobinlösung (NIESEL u. THEWS, 1961) nicht erfüllt.

Benutzt man für die Oxygenierung der Hämoglobinlösungen Gasgemische mit sehr hohem O<sub>2</sub>-Gehalt oder reinen Sauerstoff, so ist bereits am Ende des linearen Druckanstieges in der Reaktionskammer eine vollständige Sauerstoffsättigung des Hämoglobins eingetreten und der Meßvorgang beendet. Es bleibt zu prüfen, wie groß unter diesen Bedingungen der Zeitraum nichtstationärer O<sub>2</sub>-Diffusion am Versuchsbeginn ist und in welchem Verhältnis er zur Gesamtzeit, die für die Aufnahme der Bindungskurve benötigt wird, steht.

Die Zeitdauer nichtlinearen O<sub>2</sub>-Druckanstieges in der Reaktionskammer nach Beginn des Versuches kann nach der folgenden von THEWS (1960) angegebenen Gleichung bestimmt werden.

$$\left. \frac{dp}{dx} \right|_{x=d} = - \frac{p_1}{d} \left[ 1 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n e^{-\frac{n^2 \pi^2 D t}{d^2}} \right] \quad (1)$$

$p$  = O<sub>2</sub>-Partialdruck als Funktion von Ort und Zeit,  $p_1$  = konstanter O<sub>2</sub>-Partialdruck an der Grenze zur Reaktionskammer,  $x$  = Diffusionsweg,  $d$  = Dicke der Grenzmembran,  $t$  = Zeit,  $D$  = Diffusionskoeffizient,  $n$  = laufender Summenindex.

Aus Gl. (1) ergibt sich für den nichtlinearen O<sub>2</sub>-Druckanstieg in der Reaktionskammer nach Versuchsbeginn eine Zeitspanne von 0,6 sec. Bei der Berechnung wurde berücksichtigt, daß der O<sub>2</sub>-Diffusionswiderstand des Teflons ca. neunmal kleiner ist als der des Wassers. Dieser Wert konnte aus den Ergebnissen früherer Diffusionsuntersuchungen (GROTE, 1967) abgeschätzt werden.

Da die Gesamtdauer für die Aufnahme einer Sauerstoffbindungskurve ca. 2 min beträgt, hat der kurze Zeitraum nichtstationärer Sauerstoffdiffusion praktisch keinen entscheidenden Einfluß auf das Versuchsergebnis und kann vernachlässigt werden. Die Voraussetzungen für die direkte Umrechnung der bestimmten zeitlichen O<sub>2</sub>-Sättigungsänderungen der Hämoglobinlösung in eine Sauerstoffbindungskurve sind damit gegeben.

*Untersuchungsmaterial*

Die untersuchten Hämoglobinlösungen wurden aus frischem defibriniertem menschlichem Blut hergestellt. Hämoglobinbestimmung im Blut photometrisch nach der Cyanhämoglobinmethode unter Beachtung der Standardisierung der Hämoglobinbestimmung mit Korrektur des Extinktionsfaktors für Cyanhämoglobin (BOBOVICENY, 1964). Hämolyse des Blutes durch Zugabe von Aqua dest., Verdünnung im Verhältnis 1:1000 mit H<sub>2</sub>O und 5 ml ( $\frac{1}{15}$  mol) Phosphatpuffer nach SÖRENSEN. Die Hämoglobinkonzentration betrug unter diesen Bedingungen  $16,4 \cdot 10^{-3}$

g/100 ml. Herstellung von Hämoglobinlösungen einer Konzentration von  $16,4 \cdot 10^{-4}$  g/100 ml durch weitere Zugabe von Aqua dest. Der pH-Wert in beiden Lösungen war konstant 8,0, Kontrolle mit der Mikro-pH-Elektrode nach ASTRUP.

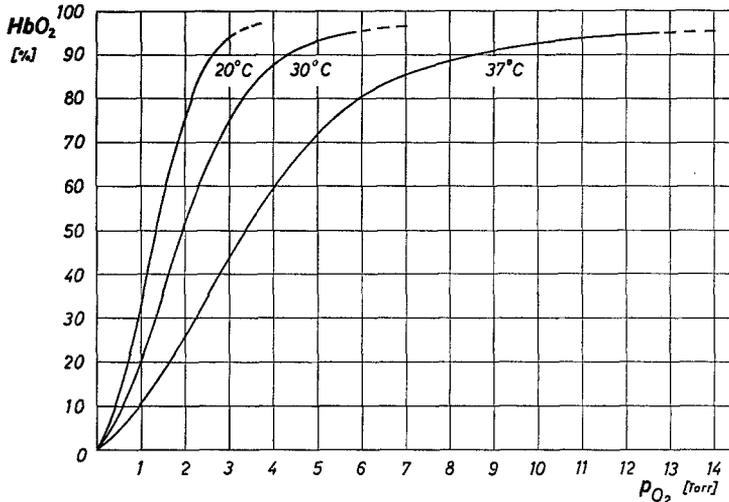


Abb. 2. Mittelwert-Sauerstoffbindungskurven einer Hämoglobinlösung der Konzentration  $16,4 \cdot 10^{-3}$  g/100 ml bei den Temperaturen 20, 30 und 37°C, pH 8,0 und  $p\text{CO}_2 = 0$  Torr. Ordinate: Prozentuale O<sub>2</sub>-Sättigung der Hämoglobinlösung. Abszisse: O<sub>2</sub>-Partialdruck

### Versuchsergebnisse

Nach dem beschriebenen Verfahren wurden die Sauerstoffbindungskurven von Hämoglobinlösungen einer Konzentration von  $16,4 \cdot 10^{-3}$  g/100 ml und  $16,4 \cdot 10^{-4}$  g/100 ml bei einem pH-Wert von 8,0, einem CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 0 Torr und den Temperaturen 20, 30 und 37°C direkt bestimmt.

Die Abb. 2 und 3 geben die ermittelten Mittelwert-O<sub>2</sub>-Bindungskurven von insgesamt 126 Versuchen wieder. In der Tabelle sind die bestimmten Sauerstoffdrucke  $\bar{p}_{50}$  bei Halbsättigung des Hämoglobins und ihre Standardabweichungen zusammengestellt.

Die Ergebnisse zeigen eine starke Zunahme der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins in Lösungen geringer Hb-Konzentration gegenüber den Bedingungen im Blut. Der Abfall des O<sub>2</sub>-Halbsättigungsdruckes von 13,5 Torr bei 37°C und pH 8,0 im Blut auf 3,4 Torr unter gleichen Temperatur- und pH-Bedingungen in einer 1:1000 verdünnten Hämoglobinlösung entspricht einer O<sub>2</sub>-Affinitätszunahme um ca. 400%. Bei weiterer Verdünnung der untersuchten Lösung um das Zehnfache auf eine Hb-Konzentration von  $16,4 \cdot 10^{-4}$  g/100 ml sinkt der O<sub>2</sub>-Halbsättigungs-

druck um ca. 20% von 3,4 auf 2,8 Torr ab. Vergleichbare Resultate ergaben die Untersuchungen bei 20 und 30°C.

Eine Abweichung des Verlaufes der O<sub>2</sub>-Bindungskurven von der typischen S-Form trat trotz der starken Verdünnung der untersuchten Hämoglobinlösungen nicht auf.

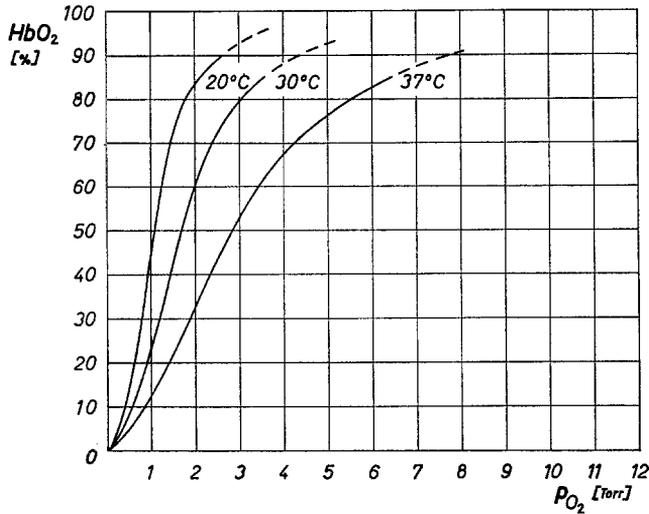


Abb. 3. Mittelwert-Sauerstoffbindungskurven einer Hämoglobinlösung der Konzentration  $16,4 \cdot 10^{-4}$  g/100 ml bei den Temperaturen 20, 30 und 37°C, pH 8,0 und  $p\text{CO}_2 = 0$  Torr. Ordinate: Prozentuale O<sub>2</sub>-Sättigung der Hämoglobinlösung. Abszisse: O<sub>2</sub>-Partialdruck

## Diskussion

### 1. Diskussion der Methode

a) *Die Genauigkeit des Verfahrens.* Die Genauigkeit des Verfahrens zur Aufnahme der O<sub>2</sub>-Bindungskurven von Hämoglobinlösungen wird in erster Linie von den Fehlergrenzen der benutzten Meß- und Registriergeräte sowie durch die Fehlerbreite der Analyse der verwendeten Eichgase bestimmt. Der relative Fehler für die Messung der Extinktionswerte und deren Registrierung beträgt in beiden Fällen  $\pm 0,5$  bis  $1,0\%$ . Da der O<sub>2</sub>-Gehalt der Eichgase sehr gering ist, bleibt die Gasanalyse mit Hilfe des Mikroverfahrens nach SCHOLANDER mit einem Fehler von ca.  $\pm 3$  bis  $4\%$  behaftet. Berücksichtigt man weitere Fehlerquellen, wie die unvollständige Durchmischung des Sauerstoffes und der Hämoglobinlösung während der Messung, auftretende Veränderungen des untersuchten Chromoproteids (RIGGS, 1965) oder Ungenauigkeiten bei der Eichung, so wird insgesamt der relative Fehler der Methode zur Aufnahme von O<sub>2</sub>-Bindungskurven in der Größenordnung von ca.  $\pm 5\%$  liegen. Da die Regi-

strierung einer Sauerstoffbindungskurve in wenigen Minuten abgeschlossen ist, und irreversible Veränderungen der Untersuchungslösung während des Meßvorganges bestimmt werden können, bleibt der Fehler, der durch mögliche Strukturänderungen der Eiweißkomponente des Hämoglobins oder durch Methämoglobinbildung (RIGGS, 1965) auftritt, klein und kann außerdem genau erfaßt werden.

b) *Anwendungsmöglichkeiten des Verfahrens.* Die angegebene Untersuchungsmethode erlaubt es, die Sauerstoffbindungskurven von Hämoglobininlösungen unterschiedlicher Zusammensetzung bis zu einer Hämoglobinkonzentration von ca.  $10^{-3}$  g/100 ml unter konstanten Temperaturbedingungen in wenigen Minuten zu bestimmen. Die Anwendung der Methode für die Untersuchung weiterer Chromoproteide ist möglich.

c) *Die Reproduzierbarkeit der ermittelten  $O_2$ -Bindungskurven.* Die Prüfung der Reproduzierbarkeit der ermittelten Sauerstoffbindungskurven ist an Hand der Standardabweichungen der für unterschiedliche  $O_2$ -Sättigungsgrade einer Hämoglobininlösung bestimmten mittleren Sauerstoffdruckwerte möglich.

Der mittlere relative Fehler der einzelnen  $O_2$ -Druckwerte betrug bei Aufnahme der  $O_2$ -Bindungskurven von Hämoglobininlösungen einer Konzentration von  $16,4 \cdot 10^{-3}$  g/100 ml und  $16,4 \cdot 10^{-4}$  g/100 ml im Mittel weniger als  $\pm 5\%$ . Einen genauen Überblick über die Reproduzierbarkeit der bestimmten Sauerstoffbindungskurven gibt die Tabelle.

Tabelle.  $O_2$ -Halbsättigungsdrücke  $\bar{p}_{50}$  von Hämoglobininlösungen der Konzentrationen  $16,4 \cdot 10^{-3}$  g/100 ml und  $16,4 \cdot 10^{-4}$  g/100 ml bei dem pH-Wert 8,0 und den Temperaturen 20, 30 und 37°C und ihre Standardabweichung.  $n$  = Anzahl der untersuchten  $O_2$ -Bindungskurven

Hb-Konzentration [g/100 ml]	$n$	$t$ [°C]	$\bar{p}_{50}$ [Torr]	$s_x$ [Torr]	$\frac{s_x}{\bar{p}_{50}} \cdot 100$ [%]
$16,4 \cdot 10^{-3}$	26	20	1,3	$\pm 0,05$	$\pm 3,80$
$16,4 \cdot 10^{-3}$	29	30	1,9	$\pm 0,13$	$\pm 6,80$
$16,4 \cdot 10^{-3}$	32	37	3,4	$\pm 0,12$	$\pm 3,50$
$16,4 \cdot 10^{-4}$	16	20	1,1	$\pm 0,08$	$\pm 7,00$
$16,4 \cdot 10^{-4}$	14	30	1,7	$\pm 0,07$	$\pm 4,00$
$16,4 \cdot 10^{-4}$	12	37	2,8	$\pm 0,01$	$\pm 0,35$

## 2. Diskussion der Ergebnisse

Ein direkter Vergleich der erzielten Ergebnisse mit Meßwerten anderer Autoren ist nicht möglich. Die in der Literatur beschriebenen Sauerstoffbindungskurven von Hämoglobininlösungen wurden in der Mehrzahl der Fälle unter abweichenden Temperaturbedingungen, bei anderen pH-Werten und nur in Lösungen mit relativ hoher Hämoglobinkonzentration (Verdünnung des Blutes bis  $1/200$ ) und unterschiedlicher Ionenzusammen-

setzung gemessenen (BARCROFT u. ROBERTS, 1909/1910; ADAIR, 1925; HILL u. WOLVEKAMP, 1936; ALLEN et al., 1950 und 1953; NECHTMAN u. HUISMAN, 1964; zusammenfassende Darstellungen siehe ANTONINI, 1965 und RIGGS, 1965). Lediglich THEWS (1960) gab eine bei 20°C bestimmte Sauerstoffbindungskurve einer Hämoglobinlösung sehr geringer Konzentration an.

Die vorliegenden Befunde stehen in Einklang mit den Aussagen der Untersuchungsergebnisse von HILL u. WOLVEKAMP (1936), ALLEN et al. (1953) und NECHTMAN u. HUISMAN (1964). Während in Hämoglobinlösungen einer Konzentration von ca. 16 g/100 ml der O<sub>2</sub>-Halbsättigungsdruck etwa dem des Blutes unter gleichen pH- und Temperaturbedingungen entspricht (BOCK et al., 1924; ADAIR, 1925), registrierten HILL u. WOLVEKAMP nach Hämolyse von Menschenblut und Verdünnung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:5 bei pH 7,4 eine Zunahme der O<sub>2</sub>-Affinität des Hämoglobins um 200%. Bei weiterer Herabsetzung der Hb-Konzentration änderte sich die Sauerstoffaffinität nur unwesentlich. In Lösungen von Schafshämoglobin stellten die Autoren eine direkte Beziehung zwischen dem Verdünnungsgrad der Lösungen und ihrer O<sub>2</sub>-Affinität fest. Die vorliegenden Befunde nehmen eine Zwischenstellung ein. Bei Herabsetzung der Hämoglobinkonzentration von ca. 40 g/100 ml, wie sie im Erythrocyten angenommen werden darf, auf  $16,4 \cdot 10^{-3}$  g/100 ml änderte sich die O<sub>2</sub>-Affinität um ca. 400%, bei Konzentrationsabnahme bis  $16,4 \cdot 10^{-4}$  g/100 ml um weitere 20%.

Die Temperaturabhängigkeit der registrierten O<sub>2</sub>-Bindungskurven entspricht der erwarteten Sauerstoffaffinitätszunahme des Hämoglobins bei sinkenden Temperaturen (zusammenfassende Darstellung siehe SEVERINGHAUS, 1966).

Die in den untersuchten Hämoglobinlösungen nachgewiesene deutliche S-Form der O<sub>2</sub>-Bindungskurven, die im Hinblick auf den relativen Verlauf der Sauerstoffbindungskurve des Blutes bei pH 8,0 entspricht, steht im Gegensatz zu den Erwartungen, die sich an Ergebnisse experimenteller Untersuchungen von GILBERT (unveröffentlicht, zitiert nach ROUGHTON, 1965) und die Aussagen der Zwischenbindungshypothese von ADAIR (1925) bzw. die Hypothese von SCHEJTER, ADLER u. GLAUSER (1963) knüpfen.

Folgt man den Ergebnissen von GILBERT, der in Lösungen von menschlichem Hämoglobin bei pH 7,1 mit zunehmender Verdünnung eine Verminderung der Zahl von Hämoglobinmolekülen tetramerer Form nachweisen konnte, so wäre zu erwarten, daß in den untersuchten Hämoglobinlösungen ein erheblicher Teil der Hämoglobinmoleküle dissoziiert ist. Dieses bedeutete gleichzeitig, daß die Voraussetzungen für das Zustandekommen einer S-förmigen O<sub>2</sub>-Bindungskurve entsprechend der Zwischenbindungshypothese von ADAIR wie nach der Hypothese von

SCHJEJTER, ADLER u. GLAUSER mit zunehmender Verdünnung der Lösung weniger erfüllt wären, und daß das Hämoglobin nach ROUGHTON (1965) vom Adair-Typ (S-förmige  $O_2$ -Bindungskurve) in den Haldane-Typ, für den eine hyperbolische Sauerstoffbindungskurve charakteristisch ist, überginge.

Trotz sehr hoher Verdünnungsgrade der untersuchten Hämoglobinlösungen zeigten die von uns bestimmten  $O_2$ -Bindungskurven keine Abweichung von der S-Form. Es muß vorläufig offenbleiben, welche der Annahmen unzutreffend sind, die Übertragung der Versuchsergebnisse von GILBERT auf die vorliegenden Versuchsbedingungen oder die Gültigkeit der Zwischenbindungshypothese nach ADAIR bzw. der Hypothese von SCHJEJTER, ADLER u. GLAUSER für die untersuchten Hämoglobinlösungen.

Fräulein AINO HURT danke ich vielmals für die technische Assistenz.

### Literatur

- ADAIR, G. S.: The hemoglobin system. VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. *J. biol. Chem.* **63**, 529 (1925).
- ALLEN, D. W., K. F. GUTHE, and J. WYMAN jr.: Further studies on the equilibrium of hemoglobin. *J. biol. Chem.* **187**, 393 (1950).
- J. WYMAN jr., and C. A. SMITH: The oxygen equilibrium of fetal and adult human hemoglobin. *J. biol. Chem.* **203**, 81 (1953).
- ANTONINI, E.: Interrelation between structure and function in hemoglobin and myoglobin. *Physiol. Rev.* **45**, 123 (1965).
- BARCROFT, J., and F. ROBERTS: The dissociation curve of haemoglobin. *J. Physiol. (Lond.)* **39**, 143 (1909/1910).
- BOCK, A. V., H. FIELD, and G. S. ADAIR: The oxygen and carbon dioxide dissociation curves of human blood. *J. biol. Chem.* **59**, 353 (1924).
- BOROVICZENY, K. G. v.: Erythrocytometric methods and their standardization. Basel u. New York: Karger 1964.
- BRIEHL, R. W.: The relation between the oxygen equilibrium and aggregation of subunits in lamprey hemoglobin. *J. biol. Chem.* **238**, 2361 (1963).
- DOUGLAS, C. G., J. S. HALDANE, and J. B. S. HALDANE: The law of combination of haemoglobin with carbon monoxide and oxygen. *J. Physiol. (Lond.)* **44**, 275 (1912).
- ENOKI, Y., and I. TYUMA: Further studies on hemoglobin-oxygen equilibrium. *Jap. J. Physiol.* **14**, 280 (1964).
- GIBSON, Q. H.: The kinetics of reactions between haemoglobin and gases. *Progr. Biophys.* **9**, 1 (1959).
- F. KREUZER, E. MEDA, and F. J. W. ROUGHTON: The kinetics of human hemoglobin in solution and in red cell at 37° C. *J. Physiol. (Lond.)* **129**, 65 (1955).
- , and F. J. W. ROUGHTON: The kinetics of dissociation of the first oxygen molecule from fully saturated oxyhaemoglobin in sheep blood solutions. *Proc. roy. Soc. B* **143**, 310 (1955).
- — The velocity of combination of the first oxygen molecule with sheep hemoglobin. *J. Physiol. (Lond.)* **140**, 37 P (1958).
- — The velocity constant,  $k_4$ , of the reaction  $Hb_4O_8 - Hb_4O_6 + O_2$  in dilute sheep hemoglobin solutions. *J. Physiol. (Lond.)* **145**, 32 P (1959).

- GLAUSER, S. C., and R. E. FORSTER II: pH dependence of the oxyhemoglobin dissociation curve at high oxygen tension. *J. appl. Physiol.* **22**, 113 (1967).
- GROTE, J.: Die Sauerstoffdiffusionskonstanten im Lungengewebe und Wasser und ihre Temperaturabhängigkeit. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **295**, 245 (1967).
- HILL, R., and H. P. WOLVEKAMP: The oxygen dissociation curve of haemoglobin in dilute solution. *Proc. roy. Soc. B* **120**, 484 (1936).
- NECHTMAN, C. M., and T. H. J. HUISMAN: Comparative studies of oxygen equilibria of human adult and cord blood red cell hemolysates and suspensions. *Clin. chim. Acta* **10**, 165 (1964).
- NIESEL, W.: Die Umlagerungshypothese. Ein Beitrag zur Klärung der Sauerstoff-Hämoglobin-Reaktion. Diss., Kiel 1961.
- Ein Beitrag zur Deutung des S-förmigen Verlaufes der Sauerstoffbindungskurve. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **274**, 16 (1961).
- , u. G. THEWS: Ein neues Verfahren zur schnellen und genauen Aufnahme der Sauerstoffbindungskurve des Blutes und konzentrierter Hämoproteidlösungen. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **273**, 380 (1961).
- OTIS, A. B., F. J. W. ROUGHTON, and R. L. J. LYSTER: The determination of the individual equilibrium constants of the four intermediate reactions between oxygen and sheep haemoglobin. *Proc. roy. Soc. B* **144**, 29 (1955).
- PAUL, W., and F. J. W. ROUGHTON: The equilibrium between oxygen and sheep haemoglobin at very low percentage saturation. *J. Physiol. (Lond.)* **113**, 23 (1951).
- RADFORD, E. P., jr.: Statistical-mechanical analysis of the oxygen-hemoglobin equilibrium. *Proc. int. Union of physiol. Sci. XXII. Int. Congr. Leiden* **2**, 3 (1962).
- RIGGS, A.: Functional properties of hemoglobin. *Physiol. Rev.* **45**, 619 (1965).
- ROUGHTON, F. J. W.: The oxygen equilibrium of mammalian hemoglobin. Some old and new physicochemical studies. In: *Oxygen*. Boston: Little, Brown and Comp. 1965.
- SCHJEJTER, Z., A. D. ADLER, and S. C. GLAUSER: Stoichiometry of hemoglobin reactions. *Science* **141**, 784 (1963).
- SCHOLANDER, P. F.: Analyzer for accurate estimation of respiratory gases in one-half cubic centimeter samples. *J. biol. Chem.* **167**, 235 (1947).
- SEVERINGHAUS, J. W.: Blood gas calculator. *J. appl. Physiol.* **21**, 1108 (1966).
- THEWS, G.: Ein Verfahren zur Bestimmung des O<sub>2</sub>-Diffusionskoeffizienten, der O<sub>2</sub>-Leitfähigkeit und des O<sub>2</sub>-Löslichkeitskoeffizienten im Gehirngewebe. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **271**, 227 (1960).
- WALD, G., and A. RIGGS: The hemoglobin of the sea lamprey, *Petromycon marinus*. *J. gen. Physiol.* **35**, 45 (1952).

Dr. Dr. JÜRGEN GROTE  
 Physiologisches Institut der Universität  
 6500 Mainz, Saarstraße 21