

Intravitale, azelluläre Hämolyse extravasaler Erythrozyten*

Ein experimenteller Beitrag zur Wundaltersbestimmung

M. Oehmichen, H. Grüninger und Th. Norpoth

Institut für Rechtsmedizin der Universität zu Köln,
Melatengürtel 60–62, D-5000 Köln 30, Bundesrepublik Deutschland

Intravital, acellular hemolysis of extravascular erythrocytes

An experimental contribution to wound timing

Summary. The time-dependent acellular, destructive changes in erythrocytes was investigated in rabbits by subcutaneous, intraperitoneal, and subdural implantation of blood-filled diffusion chambers with 0.45 μm pores. The animals were killed at various intervals after implantation (7–24 h), and the erythrocytes in the capsules were examined by light and electron microscopy. The findings were quantified by counting 100 cells per preparation under the light microscope; changes in both matrix and membrane structure were recorded. Matrix changes and membrane variants were specified by electron microscopy. Time-dependent changes in erythrocyte matrix and membrane were established, which occurred at the various localizations in an identical sequence, but with different time intervals. The destructive changes were: an increase in loss of matrix, increase in membrane permeability, and decrease in membrane stability. The physiologic bases of and the conclusions for wound timing were discussed.

Key words: Time interval – Wound, destructive changes in erythrocytes

Zusammenfassung. Zur Frage der Zeitabhängigkeit azellulärer, destruktiver Veränderungen der Erythrozyten erfolgte die Implantation von mit Vollblut gefüllten Diffusionskammern mit Poren (\varnothing 0,45 μm) subcutan, intraperitoneal und subdural in Kaninchen. Die Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Implantation getötet (7–24 Std) und die Erythrozyten in den Kapseln licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Lichtmikroskopisch erfolgte eine Quantifizierung durch Auszählen von je 100 Zellen/Präparat, wobei sowohl Matrix- als auch Formveränderungen erfaßt wurden. Elektronenmikroskopisch wurden die Matrixveränderungen und

* Herrn Prof. Dr. med. Steffen Berg zum 65. Geburtstag in Verehrung gewidmet
Sonderdruckanfragen an: M. Oehmichen (Adresse siehe oben)

Formvarianten spezifiziert. Es wurden zeitabhängige Veränderungen der Erythrozytenmatrix und -membranen festgestellt, die bei verschiedener Lokalisation zwar in identischer Reihenfolge, zeitlich aber verschoben abliefern. Die destruktiven Veränderungen äußerten sich in Form eines zunehmenden Matrixverlustes, zunehmender Membrandurchlässigkeit und abnehmender Membranstabilität. Der pathophysiologische Hintergrund sowie die Schlußfolgerungen für die Wundaltersbestimmung werden erörtert.

Schlüsselwörter: Wundaltersbestimmung, Veränderung der Erythrozyten

Einleitung

Nach einer intravitalen Blutung kommt es in Abhängigkeit vom Intervall zwischen Extravasation und histologischer Fixation zu reaktiven und destruktiven Veränderungen im Blutungsbereich. Die reaktiven Veränderungen waren Anlaß zu zahlreichen Untersuchungen im Rahmen der Wundaltersbestimmungen, wobei neben zellulären (Berg 1972, 1975; Janssen 1977) vor allem die humoralen Veränderungen (Berg und Ebel 1969; Berg et al. 1968, 1974; Rackallio 1970) am Ort der Blutung erfaßt wurden und Aussagen zu Vitalität und/oder Überlebenszeit erlaubten. Im Rahmen der Reaktionen auf den Fremdkörper „Erythrozyt“ im extravasalen Kompartiment kommt es u. a. zur Extravasation von Monozyten durch Chemotaxis, die in Form von Makrophagen die Erythrozyten inkorporieren und intrazellulär in Fragmente zerkleinern bzw. lysieren (Morselt et al. 1973; Ghadially 1979; Oehmichen et al. 1980, 1983; vgl. Oehmichen 1984). Voraussetzung für diesen – im weiteren Sinne als Kannibalismus zu verstehenden – Vorgang ist eine Veränderung der Erythrozytenoberfläche durch biochemische und/oder strukturelle Alteration.

Erythrozyten zerfallen jedoch auch extrazellulär, offenbar durch Fehlen von Sauerstoff und durch Einfluß des umgebenden (Wund-)Milieus. Die vorliegende tierexperimentelle Untersuchung will speziell diese destruktiven Veränderungen in Abhängigkeit vom Wundalter – sowohl in der Subcutis als auch in der Bauchhöhle und im Subduralraum – erfassen, um sie u. a. den postmortalen intravasalen Erythrozyten-Veränderungen gegenüberstellen zu können (vgl. Oehmichen und Krause 1986). Es stellt sich die Frage, ob die destruktiven Veränderungen eine zeitliche Zuordnung erlauben und ob sie bei unterschiedlicher Lokalisation einen differenten Ablauf aufweisen.

Material und Methoden

Versuchstiere. Kaninchen der Rasse „Deutscher Riese“ wurden mit Altromin und Wasser ad libitum gefüttert. Im Experiment befanden sich Tiere beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht zwischen 3000 und 3500 g.

Kapsel. Verwendung fanden Millipore-Kapseln (Diffusionskammern, Katalog-Nr.: PR 00 014 01, 2 mm Höhe und 14 mm Außendurchmesser; Filtertyp HA, Porengröße: 0,45 µm, Durchmesser 13 mm, Lot-No: F8 MO 71.000, Katalog-Nr.: HAWP 01300; Firma Millipore

GmbH, D-6236 Eschborn, FRG), die für Zellen undurchlässig, für Flüssigkeit jedoch durchlässig sind. Durch Gregersen et al. (1967) wird darauf hingewiesen, daß Erythrozyten Poren mit mittleren Durchmessern von mindestens $2,8\mu\text{m}$ passieren können.

In diese Kapseln wurde autologes, nicht heparinisierendes, steriles Vollblut sofort nach der vorsichtigen Blutentnahme aus einer Ohrvene injiziert und die Kapsel anschließend in den durch vorhergehende Operation bereits vorbereiteten Körperabschnitt implantiert.

Operation. Die Operation erfolgte in kombinierter Barbiturat-Äther-Narkose, wobei einzelnen Tieren je eine Kapsel in unterschiedliche Körperabschnitte implantiert wurde. Die Operation erfolgte unter halbsterilen Bedingungen.

Subcutane Implantation. Parasagittalschnitt im Nacken und subcutane Implantation einer kompletten, blutgefüllten Kapsel; Einzelkopfnah.

Peritoneale Implantation. Parasagittalschnitt parallel zur Abdomenmittellinie und Einlagerung einer kompletten, blutgefüllten Kapsel in die Bauchhöhle; Einzelkopfnah.

Subdurale Implantation. Parasagittalschnitt in der Kopfschwarte über der rechten Großhirnhälfte, Trepanation und Freilegung der Oberflächen der rechten Großhirnhälfte mit zunächst intakter Dura mater; Eröffnung der Dura mater und Einlagerung einer auf ein Viertel verkleinerten, mit Vollblut gefüllten Kapsel unter Verdrängung des Hirngewebes; Einzelkopfnah der Kopfschwarte.

Tötung: Die Tötung erfolgte durch intravenöse Gabe einer Überdosis von Barbituraten.

Präparation. Entfernung der Kapsel, die sofort in gepuffertem Paraformaldehyd durch Immersion fixiert wurde. Einbettung der Kapsel nach Eröffnung in Araldit. Erstellung von Semidünnschnitten und Färbung mit Toluidin-Blau; Erstellung von Ultradünnschnitten, die mit Uranylzitrat und Bleizitrat kontrastiert wurden.

Aus dem umgebenden Gewebe von Haut, Peritoneum/Netz/Darm bzw. Hirn/Dura wurde Gewebe in 4%igem Formalin durch Immersion fixiert und entsprechend Routinemethoden nach Paraffin-Einbettung geschnitten und gefärbt.

Lichtmikroskopische Untersuchung. Photomikroskop Typ III RS (Zeiss, D-7082 Oberkochen). Die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte mit einem Mikroskop, Typ EM 9 (Zeiss, D-7082 Oberkochen).

Experimentelles Vorgehen. Pro Tier wurde je eine Kapsel subcutan, intraperitoneal und subdural implantiert; je ein Tier wurde pro Intervall Überlebenszeit getötet, wobei die Überlebenszeit von mindestens 7 Stunden bis maximal 24 Tage währten.

Auswertung. Auf Semidünnschnitten erfolgte eine Differenzierung der Zellen durch Auszählen von je 100 Erythrozyten unter zwei Gesichtspunkten.

a) Matrixveränderungen: Die relative Anfärbarkeit des Erythrozytenzytoplasmas entsprach in submikroskopischen Bildern einer unterschiedlichen Matrixdichte und gab somit eine Information über das Ausmaß der vorausgegangenen Hämolyse. Es wurden pro Präparat vier Zellpopulationen differenziert: Hyperchrome, pyknotische Zellen; mittelstarke Anfärbung (normochrom) mit homogenem Zytoplasma; mittelstarke Anfärbung mit granulärem Zytoplasma; Zellhülle ohne gefärbtes Zytoplasma (sog. „ghosts“).

b) Membranveränderungen: Die Membranveränderungen ließen sich durch Differenzierung unterschiedlicher Zellformen erfassen, wobei folgende Varianten differenziert und quantifiziert wurden:

1. Discozyt: Typischer, tellerförmiger Erythrozyt mit bikonkaver Konfiguration;
2. Echinozyt I: Polymorphe Oberflächenstruktur;
3. Echinozyt II: Darstellung einzelner oder zahlreicher Spikes an der Oberfläche der Zellen;
4. Sphäro-Echinozyt: Runde Zellkonfiguration mit Spikes an der Oberfläche (sog. Stechapfelform);
5. Sphärozyt: Runde Gestalt mit glatter Oberfläche;
6. Sphärostomatozyt: Runde glatte Oberfläche mit einzelnen Oberflächeneinziehungen.

Ergebnisse

Lichtmikroskopische qualitative und quantitative Veränderungen

Wird ausschließlich die Matrixveränderung (vergl. u. a. Abb. 1) berücksichtigt, dann ergeben sich Verhältnisse, wie sie den Säulendiagrammen (Abb. 2–4) zu entnehmen sind. Auf der Schnittfläche, die jeweils parallel zur Kapseloberfläche durchgeführt wurde, konnte bis zu 60 Std Überlebenszeit eine gewisse Abhängigkeit des Matrixverlustes von der Lokalisation der Erythrozyten innerhalb der Kapsel

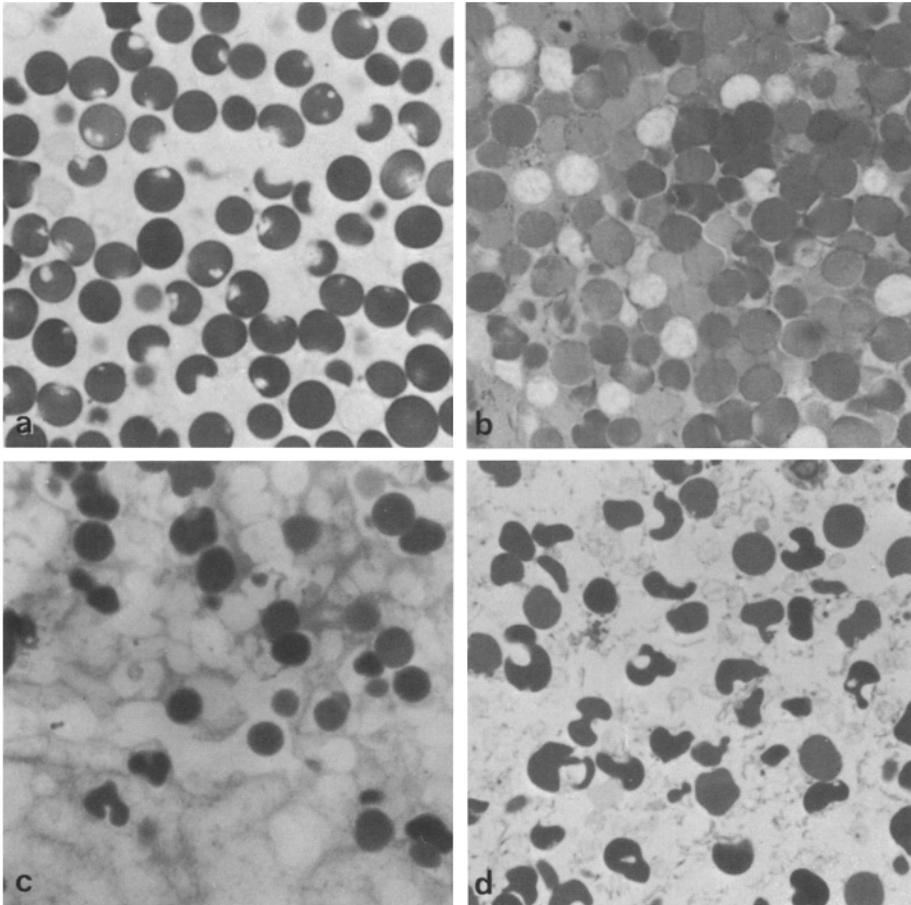


Abb. 1a–d. Lichtmikroskopisch erfaßte Erythrozytenveränderungen bei unterschiedlicher Überlebenszeit und Lokalisation. **a** 60 Std Überlebenszeit bei intraperitonealer Implantation: überwiegend finden sich Sphärozyten sowie Sphärostomatozyten. **b** 60 Std Überlebenszeit bei subduraler Implantation: Zunehmend werden sphärische Formen in Form von leeren Zellhüllen neben Zellen unterschiedlicher Matrixdichte erkennbar. **c** 18 Tage Überlebenszeit bei intraperitonealer Implantation: Nur noch wenige Erythrozyten enthalten eine Matrix, die z. T. hyperchrom anfärbbar ist; überwiegend finden sich stromaentleerte Zellhüllen der Erythrozyten. **d** 18 Tage Überlebenszeit bei subcutaner Implantation: Zwischen den überwiegend polymorph gestalteten Erythrozyten mit Matrixanfärbung erkennt man zahlreiche Zellhüllen sowie Membranreste. (a–d: Toluidin-Blau; Semidünnschnitt: $\times 900$)

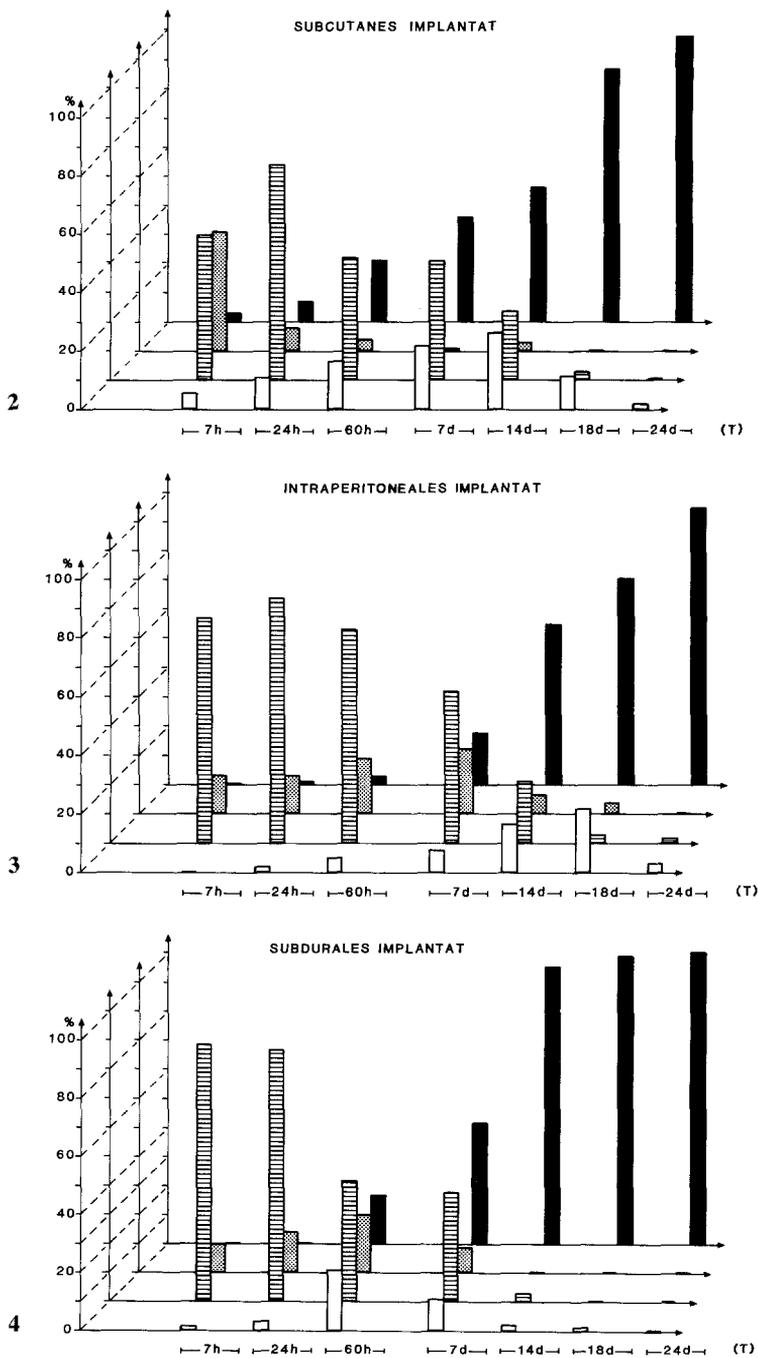


Abb. 2-4. Matrixveränderungen in Abhängigkeit von der Überlebenszeit der Tiere und der Lokalisation der implantierten Vollblut-enhaltenden Kapseln. Dargestellt wird nach Auszählen von 100 Zellen je Überlebenszeitintervall und Lokalisation der Prozentsatz der Zellen, die sich hyperchrom (weiße Säule), normochrom-homogen (quergestreifte Säule), normochrom-granulär (gepunktete Säule) und in Form von Stroma-entleerten Zellhüllen (schwarze Säule) darstellen

Tabelle 1. Formvarianten der Erythrozyten in ihrer Abhängigkeit von der Überlebenszeit und dem Ort der Implantation

	Überlebenszeit						
	7 h	24 h	60 h	7 d	14 d	18 d	24 d
<i>s.c.-Implantat</i>							
Echinozyt I	2		24	41	14	20	
Sphärozyt	98	59	62	17	31	9	1
Sphärostomatozyt		39	10	1			
Nicht identifizierbar		2	4	42	55	71	99
<i>i.p.-Implantat</i>							
Echinozyt I	5	3	7	17	23	32	17
Sphärozyt	94	95	87	59	41	32	21
Sphärostomatozyt	1	2	5	6	5	4	
Nicht identifizierbar			1	18	31	32	62
<i>s.d.-Implantat</i>							
Echinozyt I	5	9	2	4	6	2	
Sphärozyt	93	83	97	91	21	6	4
Sphärostomatozyt	2	8	1	5	1		
Nicht identifizierbar					72	92	96

beobachtet werden. Die Anzahl der Zellen mit Matrixverlust war oberflächen-nahe größer als im Zentrum des Blutkuchens. Dieser Unterschied war zu späteren Zeitpunkten nicht mehr nachweisbar.

Unabhängig von der Lokalisation der Implantate zeigen sich mit zunehmender Überlebenszeit folgende Veränderungen:

1. Die Anzahl der mittelstark, homogen angefärbten Zellen, die von Beginn der Untersuchung an dominieren, nimmt ab;
2. die Anzahl der Zellhüllen (ghosts), die zu Beginn praktisch nicht vorhanden sind, nimmt zu, so daß diese Formvariante ab 14 Tage Überlebenszeit dominiert und nach 24 Tagen praktisch isoliert auftritt;
3. die Anzahl der mittelstark angefärbten Erythrozyten mit granulierter Darstellung der Matrix hat nach 24 bis 60 Std ihren Gipfel erreicht, während ihre Zahl vorher und nachher deutlich niedriger ist und bereits nach 18 Tagen Überlebenszeit in keiner Lokalisation mehr nachweisbar wird;
4. der Prozentsatz dunkel angefärbter, pyknotischer Zellen nimmt bis zu 14/18 Tagen zu und danach wieder ab; insgesamt treten sie nur relativ vereinzelt auf und sind bei 7 Std Überlebenszeit praktisch noch nicht nachweisbar.

Berücksichtigt man die unterschiedliche Lokalisation, dann zeigt sich, daß die Hämolyse im subduralen Implantat am schnellsten, intraperitoneal am langsamsten eintritt.

Die Formveränderungen wurden tabellarisch zusammengestellt (Tabelle 1). Erkennbar wird, daß zu keinem Zeitpunkt typische Discozyten oder Stechapfelformen (Echinozyt II bzw. Sphäroechnozyt) zu beobachten waren. Über-



Abb. 5. Formveränderung von Erythrozyten im Sinne von Echinozyten I sowie diffus-granulärer Stromaverlust unterschiedlichen Ausmaßes in verschiedenen Zellen ($\times 16000$)

wiegend bestimmte – unabhängig von der Lokalisation – zu Beginn die Anzahl der Sphärozyten das Zellbild; diese Formvariante wird nach 14 Tagen Überlebenszeit abgelöst von den als „nicht mehr identifizierbar“ bezeichneten leeren Zellhüllen mit unregelmäßiger Gestalt. Sphärostomatozyten treten nur vereinzelt auf und sind nur in einem Präparat in großer Anzahl erkennbar (24stündige Überlebenszeit im subcutanen Implantat, – Abb. 1a).

Polymorph gestaltete Erythrozyten im Sinne des Echinozyt I nehmen bis zum 7. bzw. 18. Tag Überlebenszeit zu, um dann wieder abzunehmen.

Bezogen auf die unterschiedliche Lokalisation zeigt sich, daß bei subcutaner Implantation schon sehr früh „nicht identifizierbare“ Zellen auftreten und zunehmen, während sie bei intraperitonealem Implantat am spätesten und seltensten zu beobachten sind. Subdural sind zwar vor einer 14tägigen Überlebenszeit praktisch keine nicht-identifizierbaren Formvarianten zu beobachten; am 14. Tag treten diese Zelltypen jedoch in einem Prozentsatz auf, der auch subcutan zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisbar wird. Jeweils umgekehrt proportional verhalten sich die Sphärozyten.

Elektronenmikroskopische, qualitative Veränderungen

Es waren drei, z. T. voneinander unabhängige morphologische Veränderungen zu beobachten: Formveränderungen, Membranauflösung und Matrixverlust.

Die *Formveränderungen* waren durch ihre Vielfalt gekennzeichnet, wobei ihre Variabilität offenbar nicht immer mit Matrixverlust oder Membranauflösung korrelierte. Von der ursprünglich kreisförmigen Oberflächengestalt ver-

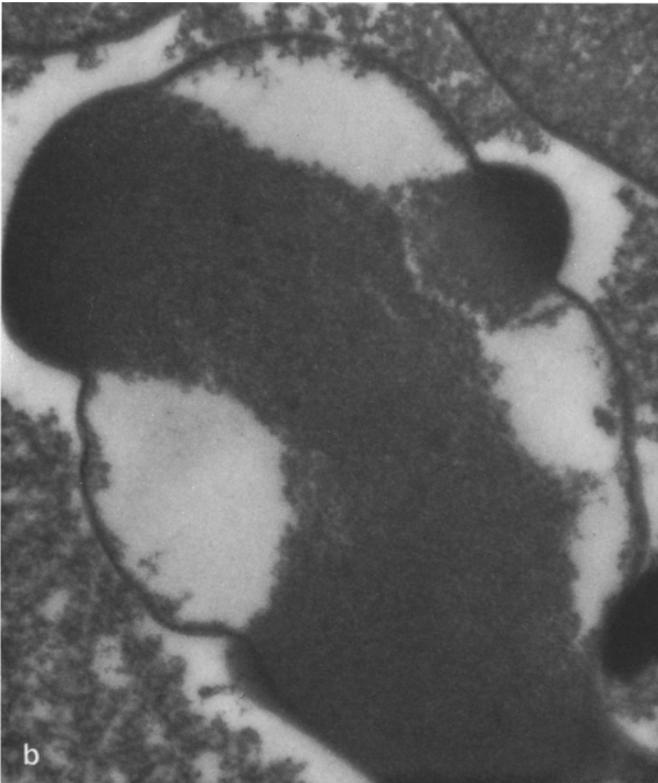
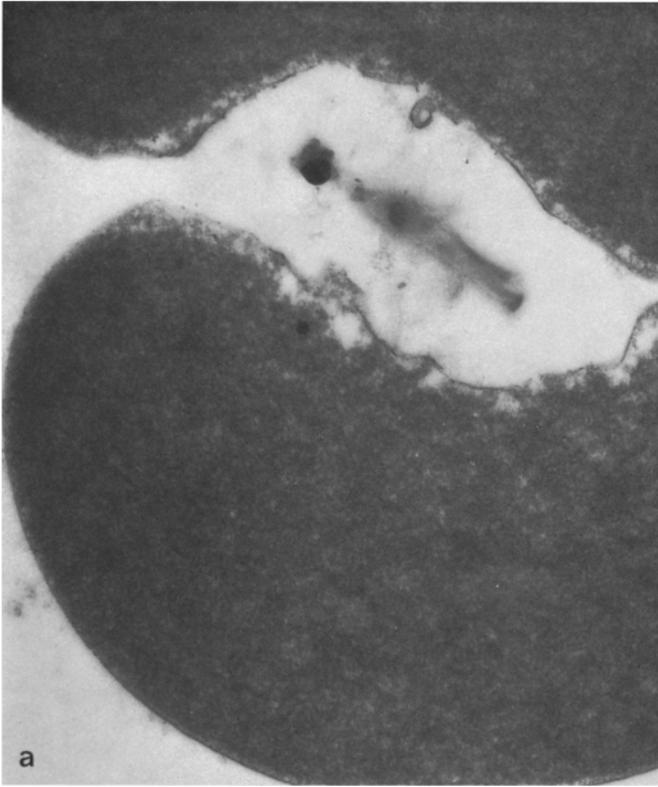


Abb. 6a, b

änderten sie sich in vieleckige Zellen, Elemente mit tiefen winkligen Einziehungen (Abb. 5) oder auch gestreckter ovaler Form.

Die *Membranauflösung* äußerte sich im frühesten Stadium in Form einer Membranablösung. Es kommt zu einer Auflockerung der Matrix direkt unter den Zellmembran, offenbar bedingt durch Flüssigkeitseinlagerung (Abb. 6). Die Membran wirkt auf der Schnittebene noch überwiegend intakt, wölbt sich jedoch ballonförmig nach außen, wobei sie lokal begrenzt an der Matrix haftet (Abb. 6b). Diese Membranablösung tritt z. T. lokal begrenzt auf (Abb. 6c) und kann hier offenbar auch platzen, so daß ein Leck in der Zellmembran entsteht, aus dem heraus sich die Matrix verliert (Abb. 6d). Dieser Membrandefekt findet sich nicht nur – wie auf den demonstrierten Abbildun-

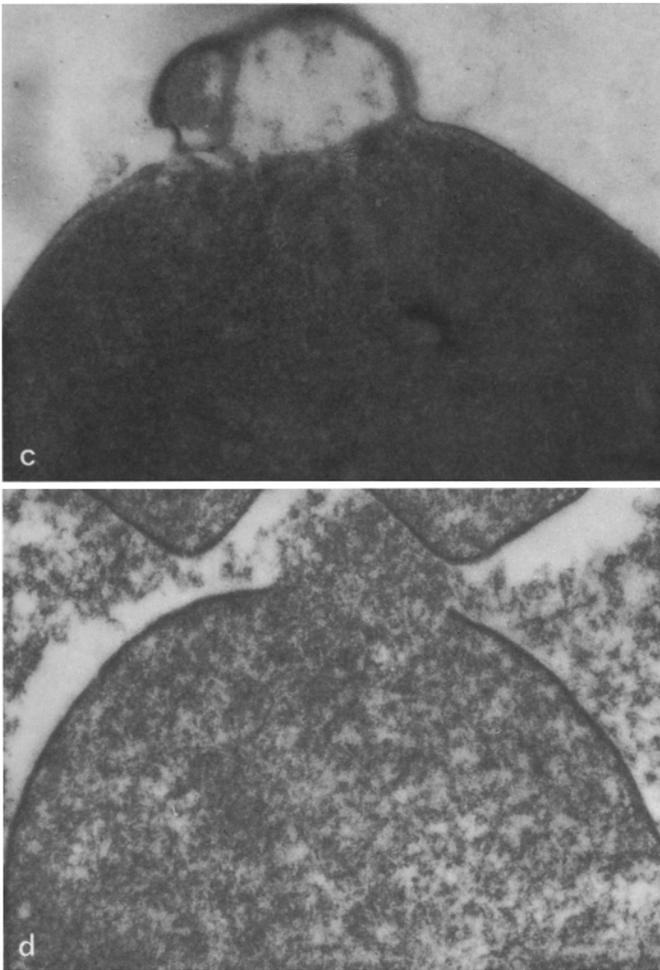


Abb. 6a–d. Membranveränderungen in Form einer Membranablösung vom Stroma, die z. T. vakuolär (a), z. T. blasenförmig-segmental auftritt (b und c), wobei die Vorwölbungen offenbar platzen können und damit ein Ausströmen von Matrix in den Extrazellularraum ermöglichen (d) (a und b $\times 22000$; c und d $\times 33000$)

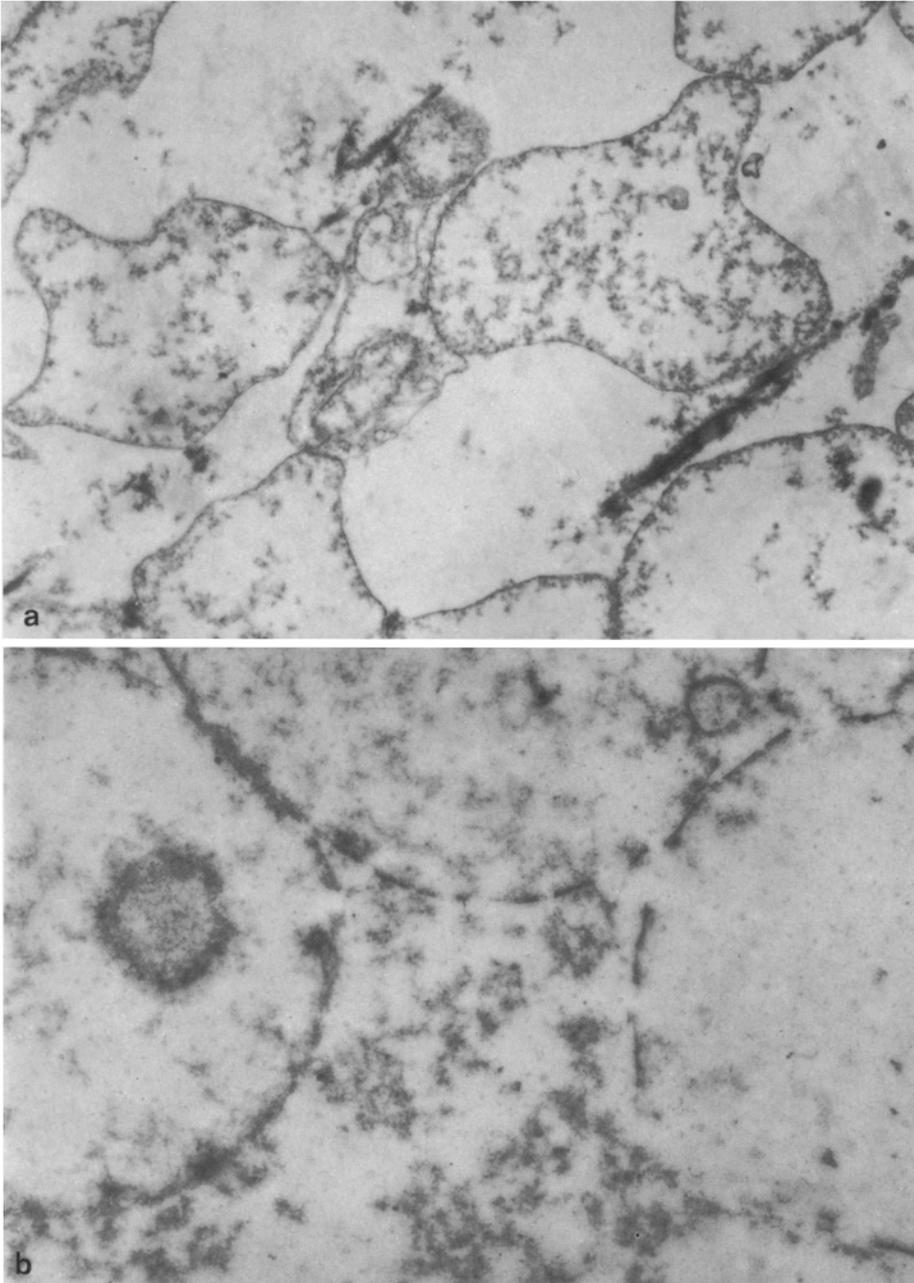


Abb. 7. a Stromaverlust und Darstellung von Stroma-entleerten Zellen, die überwiegend verformt auftreten ($\times 10\,000$). **b** Bei weitgehend erhaltener Zellgrundstruktur werden die lokalen Membranunterbrechungen erkennbar ($\times 24\,500$)

gen – segmentär, sondern läßt sich in fortgeschrittenen Stadien an jeder Zelle mehr oder weniger stark ausgeprägt nachweisen.

Mit zunehmender Überlebenszeit nimmt der Prozentsatz der Zellen mit Matrixverlust zu (Abb. 7). Relativ gut erhalten bleibt über einen langen Zeitraum das Membrangerüst, so daß auf der Schnittfläche am Ende wegen der segmentalen Membranauflösung nur noch angedeutete Zellstrukturen erkennbar bleiben (Abb. 7b). Die Membranen brechen schließlich auseinander und liegen als Fragmente im extrazellulären Raum. Innerhalb des Zytoplasmas treten wiederholt Membran-umschlossene Vakuolen auf, wobei es sich offenbar um Zelleinstülpungen handelt.

Diskussion

Werden die eigenen Beobachtungen zusammengefaßt, dann sind folgende Schlüsse möglich:

1. Der Vorgang der Hämolyse geht mit Membranveränderungen einher, wobei einerseits eine vermehrte Durchlässigkeit in Richtung Zellinneres (Ablösung und ballonförmige Blähung der Membran) und andererseits ein Verlust an Zellstroma in Richtung Extrazellularraum erkennbar wird.
2. Neben vereinzelt auftretenden hyperchromen, pyknotischen Erythrozyten treten – vor allem in der Anfangszeit – zahlreiche normochrom wirkende Erythrozyten auf, deren Zytoplasma granuliert ist und die als erste Abbaustufe im Rahmen der Hämolyse zu verstehen sind.
3. Die Reihenfolge des Zellabbaus ist subcutan, intraperitoneal und subdural identisch. Offenbar aber läuft die Erythrolyse in einem unterschiedlichen Tempo ab, subdural schneller als subcutan und am langsamsten intraperitoneal.
4. Im Untersuchungszeitraum von 7 Std und mehr (nach der Implantation) konnten ausschließlich Sphärozyten, Sphorästomatozyten und stromaleere Zellhüllen beobachtet werden. Zu keinem Zeitpunkt wurden typische bikonkave Erythrozyten (Discozyten), Echinozyten I (Zellen mit Spikes) bzw. Sphäro-Echinozyten (sog. Stechapfelformen) festgestellt. Ebenso wenig stellten sich in den Präparaten Varianten der Fragmentation dar.

Die Frage ist, welche Faktoren bei vorliegendem Versuchsablauf die verschiedenen Formvarianten und die eingetretene Hämolyse induzierten. Im Schrifttum wird überwiegend die Hämolyse innerhalb der Makrophagen beschrieben, bei der extravasale Erythrozyten inkorporiert werden. Es ist jedoch auch bekannt, daß bei Hämolyse zuerst (in wenigen Minuten) eine Hämoglobinämie auftritt und erst in der Folgezeit (nach Stunden) eine wesentliche Erythrophagozytose (Rifkind 1966). Dieses Phänomen muß als Hinweis darauf gewertet werden, daß tatsächlich – und zu einem vergleichsweise frühen Zeitpunkt – eine extrazelluläre Hämolyse möglich ist.

Diese Hämolyse mag auch in den eigenen Experimenten z. T. durch Makrophagen bedingt sein, die sich um die Kapsel herum im umgebenden Gewebe jeweils konzentrieren. Die Makrophagen enthalten und sezernieren ein Enzym,

die Hämi-Oxygenase (Pimstone et al. 1971). Dieses Enzym konnte in der Nähe von Blutungen ab dem zweiten Tag in etwa zehnfacher Aktivität nachgewiesen werden (Laiho und Tenhunen 1984).

Da sich nicht alle Erythrozyten in jeweils gleichem Zustand der Hämolyse und Membranauflösung befanden, stellte sich ferner die Frage, ob das unterschiedliche Verhalten nicht durch das unterschiedliche Alter der Erythrozyten selbst bedingt war. Aufgrund der sich innerhalb der ersten 60 Stunden ergebenden Abhängigkeit der Destruktion von der Zuordnung zur Kapseloberfläche ergaben sich jedoch eher Anhaltspunkte dafür, daß die Kontaktmöglichkeiten mit dem umgebenden Milieu den wesentlichen Einfluß nehmen.

Unabhängig von den reaktiven, Makrophagen-abhängigen Abbauvorgängen dürften zusätzlich passive, milieubedingte destruktive Vorgänge zu erwarten sein. Die extravasalen Zellen unterliegen einer anaeroben Glykolyse, die schlußendlich zu einer ATP-Reduktion bzw. einem ATP-Mangel führt. Die Folge ist eine Schädigung der Kalium-Natrium-Pumpe, so daß Kalium aus der Zelle freigesetzt und Natrium und Chlor sowie Flüssigkeit in der Zelle angereichert werden (Tosteson und Hoffman 1960; Weed und Reed 1966). Die beschriebene Elektrolytverschiebung als Folge des ATP-Mangels (Rous und Turner 1916; Drew et al. 1939; Maizels und Whittaker 1940; Maizels und Paterson 1940) ist ebenso bekannt wie die Abhängigkeit der Erythrozyten-Viabilität von dem ATP-Gehalt (Rapoport 1962; Yoshikawa und Nakao 1962; Dern et al. 1971; Dawson et al. 1971).

Als Folge des ATP-Mangels wird u. a. die Transformation von bikonkaven Zellen zu runden Zellen angesehen (Ponder 1948; Nakao et al. 1960; Yoshikawa und Nakao 1962), wobei es sich offenbar um einen reversiblen Vorgang handelt (Weed und Lacelle 1969). Als Ursache für diese Transformation wird eine vorübergehende Organisationsveränderung des Membranmaterials mit der Folge einer Abnahme der effektiven Oberfläche angesehen.

Die Folge der anaeroben Glykolyse im Blutungsbereich ist u. a. eine pH-Erniedrigung. Besonders Stomatozyten sollen bei niedrigem pH entstehen (Jolly 1923; Bessis und Bricka 1950; Halpern und Bessis 1950; Weed und Bessis 1973). Sphärostomatozyten konnten *in vitro* dann induziert werden, wenn ATP-armen Erythrozyten ATP zugegeben wurde (Yoshikawa und Nakao 1962).

Ein morphologisches Äquivalent der Hämolyse muß – wie bereits gesagt – die Membranunterbrechung sein, wie sie für die osmotische, chemische und immunologische Hämolyse von Dourmashkin und Rosse (1966) beschrieben wurde. In den eigenen Befunden wiesen die bereits lichtmikroskopisch erkennbaren blasenförmigen Membranabhebungen indirekt auf eine derartige Permeabilitätsstörung, die bereits Trump und Ericson (1965) bzw. Bessis (1970) – jedoch bei anderen Zelltypen – beschrieben haben. Bessis (1977) beobachtete ferner bei osmotischer Lyse in hypotoner Lösung eine Ausstülpung von Membrananteilen, woraus ein Membrandefekt unterschiedlicher Größe resultierte. Prinzipiell muß ferner davon ausgegangen werden, daß zum Verlust von Hämoglobin die Zellmembran für mindestens 32 Å durchgängig sein muß, da das Hämoglobin-Molekül diesen Durchmesser aufweist (Dourmashkin und Rosse 1966). Neuere Untersuchungen weisen ferner eine Membrandurchlässigkeit infolge eines abnehmenden pH's bzw. einer abnehmenden Ionenkonzentration

hin, wobei u. a. davon ausgegangen wird, daß die sterische Oberflächenstruktur während der Erythrozytenlagerung abnimmt (Hessel und Lerche 1985). Im einzelnen wird ferner darauf hingewiesen, daß Phospholipide (Olthoff et al. 1979; Shiga et al. 1979) ebenso wie Membranproteine bei negativer Beladung (Choy et al. 1979; Walter et al. 1980) abnehmen. Die Folge ist eine vergrößerte Membrandurchlässigkeit, eine Vesiculation der Erythrozyten (Stibenz et al. 1981), eine Abnahme des ATP, eine veränderte mechanische Empfindlichkeit (Leuenberger et al. 1982) sowie eine Formveränderung (Bessis 1977).

Die zitierten Befunde und Schlußfolgerungen fußen überwiegend auf Untersuchungen an menschlichen Erythrozyten. Damit stellt sich die Frage, ob Befunde an tierischen Erythrozyten, insbesondere an Erythrozyten von Kaninchen, mit menschlichen Erythrozyten vergleichbar sind. Es gibt keinen Zweifel, daß morphologische und physiologische Unterschiede zwischen Menschen- und Kaninchen-Erythrozyten bestehen. Die Kaninchen-Erythrozyten haben einen geringeren Durchmesser (7,5 µm gegenüber 8,5 µm beim Menschen – Ponder 1948), eine geringere Glykolyserate (Hinterberger et al. 1962) und eine geringere Überlebenszeit von nur 40 bis 60 Tagen (Sprandel et al. 1980). Andererseits wird von frühen Beobachtern geschildert, daß Hämolyse und Nekrose der Erythrozyten bei Kaninchen und Menschen sich sehr ähnlich verhalten (Rous und Turner 1916).

Die am Kaninchen gemachten Beobachtungen sind somit überwiegend nicht direkt übertragbar auf Veränderungen beim Menschen. Sie geben ausschließlich Hinweise auf zu erwartende morphologische Veränderungen, die möglicherweise beim Menschen ähnlich ablaufen. Die vorliegende Untersuchung beabsichtigte nicht, Äquivalente für Veränderungen am Menschen zu finden, sondern ausschließlich festzustellen, ob destruktive Veränderungen an Erythrozyten überhaupt im Rahmen der Wundaltersbestimmung von Bedeutung sein können. Gleichzeitig sollte festgestellt werden, ob die Veränderungen in unterschiedlichen Kompartimenten unterschiedlich schnell ablaufen.

Die zuletzt genannte Frage konnte bejaht werden, wenn sich auch die Unterschiede ausschließlich durch Auszählen erfassen ließen. Die erste Frage kann insofern bejaht werden, als eindeutig zeitabhängige Veränderungen der Hämolyse sowie der Membran auftreten. Es bleibt zu klären, wieweit diese Veränderungen sich von der Destruktion bei postmortaler Lagerung unterscheiden. Diese Frage soll durch eine in Vorbereitung begriffene Untersuchung zu postmortalen Veränderungen menschlicher Erythrozyten geklärt werden.

Danksagung. Zu großem Dank verpflichtet sind die Autoren den Mitarbeiterinnen, FrI. B. Gräve und FrI. K. Stuka, für die technische Unterstützung bei Erstellung der elektronenmikroskopischen Präparate.

Literatur

- Berg S (1972) Die Altersbestimmung von Hautverletzungen. *Z Rechtsmed* 70:121–135
Berg S (1975) Vitale Reaktionen und Zeiteinschätzungen. In: Mueller B (Hrsg) *Gerichtliche Medizin*, Bd 1. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 327–340
Berg S, Bode G, Sekardi L (1974) Radiochemische Untersuchungen über den Verwendungsstoffwechsel von Leichenhaut in der Spravitalphase. *Beitr Gerichtl Med* 32:280–285

- Berg S, Ditt J, Friedrich D, Bonte W (1968) Möglichkeiten der biochemischen Wundalterbestimmung. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med* 63: 183–198
- Berg S, Ebel R (1969) Altersbestimmung subkutaner Blutungen. *Münch Med Wochenschr* 111: 1185–1190
- Bessis M (1970) Das Absterben der Zellen. *Triangel (Sandoz)* 9: 191–199
- Bessis M, Bricka M (1950) Etude au microscope électronique sur l'hémolyse, l'agglutination, la forme et la structure des globules rouges. *Rev Hematol* 5: 396–427
- Bessis M (1977) Erythrocyte form and deformability for normal blood and some hereditary hemolytic anemias. *Nouv Rev Fr Hemat* 18: 75–94
- Choy YM, Wong SL, Lee CY (1979) Changes in surface carbohydrates of erythrocytes during in vivo aging. *Biochem Biophys Res Commun* 91: 410–415
- Dawson RB, Edinger MC, Eilig TJ (1971) Hemoglobin function in stored blood. IV. Red cell adenosine triphosphate and 2,3-diphosphoglycerate in acid-citrate-dextrose and citrate-phosphate-dextrose with adenine and inosine. *J Lab Clin Med* 77: 46–53
- Dern RJ, Brewer GJ, Wiorkowski JJ (1971) Studies on the preservation of human blood. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other in vitro measures to red cell storageability. *J Lab Clin Med* 69: 968–978
- Dourmashkin RR, Rosse WF (1966) Morphologic changes in the membranes of red blood cells undergoing hemolysis. *Am J Med* 41: 699–710
- Drew CR, Edsall K, Scudder J (1939) Studies in blood preservation. Fate of cellular elements in relation to potassium diffusion. *J Lab Clin Med* 25: 240–245
- Ghadially FN (1979) Haemorrhage and haemosiderin. *J Submicrosc Cytol* 11: 271–291
- Gregersen MI, Bryant CA, Mannerle WE, Usani S, Chien S (1967) Flow characteristics of human erythrocytes through polycarbonate sieves. *Science* 157: 825–827
- Halpern BN, Bessis M (1950) Action antisphérocytaire de certains corps synthétiques: dérivés de la phénothiazine. *C R Soc Biol (Paris)* 144: 759–760
- Hinterberger U, Rapoport S, Gerischer-Mothes W, Sukrow D (1962) Die Glykolyseraten der Erythrocyten verschiedener Tierarten bei konstantem pH. *Folia Haematol* 78: 471–473
- Hessel E, Lerche D (1985) Cell surface alterations during blood-storage characterized by artificial aggregation of washed red blood cells. *Vox Sang* 49: 86–91
- Janssen W (1977) *Forensische Histologie*. Schmidt-Römhild, Lübeck
- Jolly J (1923) *Traité technique d'hématologie*. Maloine et fils, Paris (Vol 1, p 64)
- Laiho K, Tenhunen R (1984) Hemoglobin-degrading enzymes in experimental subcutaneous hematomas. *Z Rechtsmed* 93: 193–198
- Leuenberg S, Barras J-P, Koerner K (1982) Rheological properties of erythrocytes stored as whole blood and as red blood cell concentration: a comparative study. *Vasa* 11: 15–20
- Maizels M, Paterson JH (1940) Survival of stored blood after transfusion. *Lancet* 2: 417–420
- Maizels M, Whittaker N (1940) Diluents for stored blood. *Lancet* 1: 590–593
- Morselt AFW, Cambier PH, James J (1973) Electron-microscopical and microphotometric studies on the breakdown of erythrocytes by macrophages. *Histochemie* 37: 161–168
- Nakao M, Nakao T, Yamazoe S (1960) Adenosine triphosphate and maintenance of shape of human red cells. *Nature (London)* 187: 945
- Oehmichen M (1984) Blutabbau in den Lungenalveolen: Zeichen der Vitalität und Bestimmung der Überlebenszeit. *Z Rechtsmed* 92: 47–57
- Oehmichen M, Krause M (1986) In Vorbereitung
- Oehmichen M, Wiethölter H, Gencic M, Grüninger H (1980) Erythrozyten-Abbau im Lymphknoten des Kaninchens – in Abhängigkeit von der Zeit. *Beitr Gerichtl Med* 38: 203–212
- Oehmichen M, Wiethölter H, Grüninger H, Gencic M (1983) Destruction of intracerebrally applied red blood cells in cervical lymph nodes. *Experimental investigations*. *Forensic Sci Int* 21: 43–57
- Olthoff D, Kunze D, Olthoff G (1979) Untersuchungen über die Wirkung des Procain auf den Phospholipidverlust der Erythrozyten bei der Blutkonservierung in ACD-AG-Stabilisator. *Folia Haematol* 106: 117–127
- Pimstone NR, Tenhunen R, Seitz P, Marver HS, Schmid R (1971) The enzymatic degradation of hemoglobin to bile pigments by macrophages. *J Exp Med* 133: 1264–1281

- Ponder E (1948) Hemolysis and related phenomena. Grune & Stratton, New York
- Raekallio J (1970) Enzyme histochemistry of wound healing. G Fischer, Stuttgart
- Rapoport S (1962) Reifung und Alterungsvorgänge in Erythrozyten. *Folia Haematol* 78:364–381
- Rifkind RA (1966) Destruction of injured red cells in vivo. *Am J Med* 41:711–723
- Rous P, Turner JR (1916) The preservation of living red blood cells in vitro. *J Exp Med* 23:219–237
- Shiga T, Maeda N, Suda T, Kon K, Sekiya M (1979) The decreased membrane fluidity of in vivo aged human erythrocytes. A spin label study. *Biochim Biophys Acta* 553:84–95
- Sprandel U, Hubbard AR, Chalmers RA (1980) In vivo life span of resealed rabbit erythrocyte "Ghosts". *Res Exp Med (Berl)* 177:13–17
- Stibenz D, Linns W, Meyer HW, Halbhuber K-J, Geyer G (1981) Erythrocyte vesiculation. 2. Membrane molecular transformation. *Folia Haematol* 108:580–587
- Tosteson DC, Hoffman JF (1960) Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red blood cells. *J Gen Physiol* 44:169–194
- Trump BF, Ericson JLE (1965) Some ultrastructural and biochemical consequences of cell injury. In: Zweifach BW, Grant L, McCluskey RT (eds) *The inflammatory process*. Academic Press, New York London, pp 35–120
- Walter H, Krob EJ, Tamblyn CH, Seaman GVF (1980) Surface alterations of erythrocytes with cell age: Rat red cell is not a model for human red cell. *Biochem Biophys Res Commun* 97:107–113
- Weed RI, Bessis M (1973) The discocyte-stomatocyte equilibrium of normal and pathologic red cells. *Blood* 41:471–475
- Weed RI, Lacelle PL (1969) ATP dependence of erythrocyte membrane deformability. Relation to "in vivo" survival and blood storage. In: Jamieson GA, Greenwalt TJ (eds) *Red cell membrane. Structure and function*. Lippincott & Co, Philadelphia Toronto, pp 318–338
- Weed RI, Reed CG (1966) Membrane alterations leading to red cell destruction. *Am J Med* 41:681–698
- Yoshikawa H, Nakao M (1962) Nucleotide metabolism and its relation to functions of preserved human erythrocyte. *Folia Haematol* 78:516–524

Eingegangen am 26. Mai 1986