

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Berlin.  
Direktor: Geh.-R. Lubarsch.)

## Über den Bau der Erythrocyten.

III. Mitteilung.

### Untersuchungen über die Heinz-Ehrlichschen hämoglobinämischen Innenkörper.

Von

M. Gutstein und G. Wallbach.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. August 1927.)

Bekanntlich hat man in den Erythrocyten, die sowohl im frischen als auch fixiertem Präparat bei den üblichen Färbemethoden gewöhnlich homogen und strukturlos erscheinen, unter pathologischen Bedingungen runde, körperhafte Gebilde auftreten sehen. Zuerst hat wohl *Heinz* hauptsächlich bei Pyroдинvergiftung von Warmblütern einen solchen Körper innerhalb des Erythrocyten gesehen, der sich im Supravitalpräparat stark mit Methylviolett anfärbte. Später wurde von *Ehrlich* die Gleichheit dieser Blaukörperchen von *Heinz* mit seinen hämoglobinämischen Innenkörpern festgestellt. Diese Gebilde erhielt *Ehrlich* durch Methämoglobinfite und hielt sie durch ihre besondere Affinität zum Eosin im fixierten Präparat für genügend charakterisiert. Beide Forscher haben wohl angenommen, daß es sich um nekrotisiertes Protoplasma der roten Blutkörperchen handelt, d. h. also um Gebilde, die nicht vorgebildet im Erythrocyten vorhanden sind, sondern wahrscheinlich als Reaktionsprodukte auf die Vergiftung entstehen. Bemerkenswert ist noch, daß *Ehrlich* auf Grund der starken Eosinophilie der Ansicht zuneigte, daß sie Methämoglobin oder verändertes Hämoglobin enthalten.

Nach der Auffindung dieser methämoglobinämischen Innenkörper sind es hauptsächlich 2 Fragen gewesen, die in der Folge zahlreiche Untersucher beschäftigt haben, und zwar 1. sind die *Heinz-Ehrlichschen* Körper vorherbestehende Gebilde oder Reaktionsprodukte, die durch die Vergiftung entstanden sind? und 2. die chemische Zusammensetzung dieser Gebilde; enthalten die Heinz-Ehrlich-Körper Methämoglobin oder andere Abbaustufen des Hämoglobins? Von den Entdeckern *Heinz* und *Ehrlich* wurde, wie bereits erwähnt, angenommen, daß diese endoglobulären

Gebilde erst durch den Vergiftungsprozeß als solchen entstehen sollten. Es sollte sich um partielle Nekrosen des Erythrocytenkörpers handeln, die nun als körperhafte Gebilde deutlich hervortreten. Später wurde von *Schmauch* hervorgehoben, daß auch in den normalen Erythrocyten der Katze solche endoglobulären Körperchen sichtbar sind; doch sind diesem Forscher sicherlich teilweise Verwechslungen mit *Jolly*-körperchen unterlaufen. Ähnliche Gedankengänge scheinen auch *Schwalbe* und *Solley* zu vertreten, da sie auch solche Gebilde im normalen Blut nach der Gerinnung auftreten sahen. Die meisten Hämatologen dagegen vertreten im Gegensatz zu diesen Untersuchern die Ansicht, daß es sich in Übereinstimmung mit *Heinz* und *Ehrlich* um neu entstandene Gebilde handelt, darunter besonders die *Pappenheimsche* Schule. Einen anderen Standpunkt scheint *Schilling* einzunehmen, der die Präexistenz dieser Gebilde als vorliegend erachtet. „*Heinzkörper* sind nur substanzell pathologisch etwas veränderte Kapselkörper und in jedem Erythrocyten, wahrscheinlich mehr oder weniger gut erhalten, dauernd vorhanden“. *Schilling* macht auch darauf aufmerksam, daß es histologisch einleuchtender ist, wenn die partielle Nekrose des Erythrocytenkörpers, wie *Ehrlich* behauptet, einen histologisch differenzierten Abschnitt des Erythrocyten betrifft. Durch die Vergiftung erfahren jedoch die *Heinz-Ehrlichschen* Körperchen (H.E.K.), vielleicht durch Aufnahme von Methämoglobin oder ähnlichen Abbauprodukten des Hb. (Hämoglobin) eine Erhöhung ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber hämolytischen Einflüssen. Ähnliche Gedanken vertrat früher schon *Pappenheim*. . . .

Eine andere Fragestellung, die im Anschluß an die Entstehung der H.E.K. interessiert, ist die, ob wirklich diese Gebilde den von *Ehrlich* eingeführten Namen „*hämoglobinämische Innenkörper*“ verdienen. *Ehrlich* sah an diesen Gebilden als wesentlichen Bestandteil Hb., in einer widerstandsfähigeren Form, vielleicht Methb., oder ein polymeres Hb., und er wurde besonders durch die gesteigerte Eosinophilie „dieses intraglobulären Hb.“ zu dieser Ansicht geführt. Ebenfalls sprach auch für diese Anschauung die Tatsache, daß die H.E.K. durch Methb.-Gifte hervorgerufen werden. Die H.E.K. werden also als Hb.-haltige Mikrocytenabsprengungen aufgefaßt, durch welche Ausgleichserscheinung das Blut seine respiratorische Oberfläche trotz der Giftwirkung zu erhalten trachtet (*Ehrlich*).

Gegen die Annahme des Hb.-Gehaltes der H.E.K. wurden von der *Pappenheimschen* Schule Einwände gemacht. Doch glaubte auch *Pappenheim*, daß ein dem Methb. nahestehender Körper in den *Heinz*-körperchen enthalten sei. Ein Vorhandensein von Methb. selbst wurde jedoch vollkommen abgelehnt; im allgemeinen wurde das Vorhandensein von vergifteten nekrobiotischen eiweißhaltigen, vielleicht auch eiweißfreien Blutfarbstoff mit Stromalipoid angenommen. Und auch in der

nächsten Arbeit aus der Pappenheimschen Schule von *Dora Friedstein* wird auch noch das Vorhandensein einer dem Hb. ähnlichen Substanz angenommen. Als hauptsächlichen Bestandteil der Heinzkörperchen wurde jedoch ein Lipoid vermutet, das, nach der Vitalfärbung mit Nilblau und anderen Farbstoffen zu urteilen, ferner nach seinen Löslichkeitsbedingungen in Form einer Lipoideiweißverbindung enthalten sein dürfte. Als dann später *Hartwich* und *Suzuki* eine neue Methode ausfindig machten, die H.E.K. zu isolieren, die eine makroschemische Analyse derselben ermöglichte, wurde von diesen Verfassern auch noch an dem Vorhandensein von Hb.-Produkten festgehalten, von *Methb.* jedoch abgelehnt. Besonders hebt *Suzuki* hervor: Wären die roten Blutkörperchen selbst *Methb.*-haltig, bzw. ihr Hb. vollständig in *Methb.* umgewandelt, so müßte das Tier ja ersticken.

Die nächste Arbeit aus der Pappenheimschen Schule, die sich mit der Chemie der Substanz der H.E.K. befaßt, stammt von *Kunkel*. Die E.H.K. enthalten nach diesem Autor als wesentlichen Bestandteil einen Eiweißkörper, den man als denaturiertes *Histon* ansprechen kann. Der beträchtlichste Teil der H.E.K. besteht jedoch aus *Lipoid*, das vielleicht als Diamidophosphatid aufgefaßt werden kann. Außerdem fand *Kunkel*, was wir besonders unterstreichen wollen, in den H.E.K. etwas Eisen in außerordentlich geringen Mengen, die spektroskopisch nicht mehr nachweisbar waren. Wegen dieser geringen Menge war eine nähere Charakterisierung nicht möglich; jedenfalls sei es sicher, daß es sich nicht um Hb. handelt.

Die Befunde von *Kunkel*, daß die H.E.K. kein verändertes Hb., dagegen erhebliche Mengen Phosphatide enthalten, muß daher die Annahme von *Heinz* und *Ehrlich*, daß es sich um neu gebildete Körper handelt, als sehr fraglich erscheinen lassen. Denn es ist nicht einzusehen, warum die *Methb.*-Gifte imstande sind, Gebilde zu erzeugen, die sich durch eine völlig andere chemische Zusammensetzung auszeichnen. Dagegen würde die Ansicht *Schillings*, daß es sich um präexistente Gebilde handelt, den Befunden *Kunkels* nicht widersprechen. Doch wird die Ansicht *Schillings* von den meisten Hämatologen bestritten, mit der Begründung, daß die normalen Erythrocyten keine Struktur erkennen ließen (*Weidenreich* u. a.). Diese Einwände erscheinen aber nicht mehr stichhaltig, nachdem wir in der vorhergehenden Mitteilung Methoden beschrieben haben, die an Erythrocyten zwei wohl charakterisierte Gebilde erkennen lassen, Innenkörper und Innenkörperchen. Unsere Befunde, die z. T. mit *Schillings* Angaben übereinstimmen dürften, sind um so beachtenswerter, als sie die Gebilde neben dem Hb. und in einer Kontrastfarbe zu demselben erkennen lassen. Es drängte sich daher uns die Frage auf, ob die H.E.K. dasselbe sind, wie die von uns in normalen Erythrocyten gefundenen Innenkörper oder Innenkörperchen.

Zur Erzeugung der H.E.K. spritzen wir in Anlehnung an die *Pappenheim'sche* Methodik ein Gemisch von 1 proz. Toluylendiamin (1 : 2 : 4) und 1 proz. Pyrodin zu gleichen Teilen in Dosen von 0,5 ccm Mäusen oder 5 ccm Kaninchen an 2 aufeinanderfolgenden Tagen ein. Bereits nach 2 Tagen traten die H.E.K. auch im ungefärbten Ausstrichpräparat deutlich hervor. Die Fixierung der Ausstrichpräparate erfolgte nach unseren früheren Methoden durch 24 Stunden Aufenthalt in Alkohol-Äther  $\ddot{\text{aa}}$ , dann wurden nach Abspülen der Präparate mit Wasser die folgenden Färbungen vorgenommen.

### I. Färbung mit basischen Farbstoffen.

Bei Färbung mit basischen Farbstoffen reißen die H.E.K. den Farbstoff stärker an sich als der übrige Leib des Erythrocyten. Es gelangen daher die H.E.K. elektiv zur Darstellung. Im folgenden wollen wir nur eine kleine Auswahl von Färbungen mit basischen Farbstoffen beschreiben, da die übrigen Farbstoffe in der Regel sich prinzipiell gleichartig verhalten.

#### 1. Carbolmethylenblaumethode.

*Technik.* Die Blutausstriche gelangen nach der Fixation für etwa  $\frac{1}{2}$  Minute in eine Carbolmethylenblaulösung (1 proz. wässerige Methylenblaulösung und 5% Carbolsäure zu gleichen Teilen). Abspülen mit Wasser, Trocknen.

*Färbungsergebnisse.* Die Erythrocyten werden teilweise von einer außerordentlich feinen Membran begrenzt oder sie sind unscharf begrenzt. Eine besonders starke Färbung zeigt die Membran der H.E.K. Um diese Membran zeigt sich oft eine schwächer gefärbte Zone. Im Ausstrich zeigen sich noch mehrere freiliegende H.E.K. mit deutlicher Membran und z. T. heller Außenzone (Abb. 1).

#### 2. Methylviolettmethode.

*Technik.* Die fixierten Blutausstriche gelangen etwa für  $\frac{1}{4} - \frac{1}{2}$  Minute in Methylviolett<sup>1</sup>. Abspülung und Trocknung.

*Färbungsergebnisse.* Undeutlich begrenzte Erythrocytenkörper, starke violette Färbung der Membran der H.E.K. mit heller Außenzone. In der Mitte der Abbildung befindet sich ein Erythrocyt mit deutlicher Membranfärbung, der im Begriff ist, sein H.E.K. auszustoßen (Abb. 2).



Abb. 1. Carbolmethylenblaumethode. Die Erythrocyten werden unscharf begrenzt. Eine besonders starke Färbung zeigt die Membran der H.E.K. Um diese Membran zeigt sich eine schwächer gefärbte Zone. Mehrere freiliegende H.E.K. mit deutlicher Membran und heller Außenzone. Sämtliche Abbildungen sind bei  $\frac{1}{12}$  Immersion und Okular 4 (Leitz) von Herrn M. Landsberg gezeichnet.

<sup>1</sup> Es wurden, soweit nicht eine andere Zusammensetzung ausdrücklich angegeben ist, 1 proz. wässerige Lösungen der Farbstoffe verwendet.

### 3. Carbofuchsinmethode.

Technik und Färbungsergebnis entsprechen vollkommen den soeben beschriebenen Methoden. Erythrocytenmembran deutlich sichtbar, scharf abgegrenzt. Innerhalb des Erythrocyten zentrisch oder exzentrisch die H.E.K. mit starker Rotfärbung ihrer Membran. Bemerkenswert ist hier, daß am Rande der H.E.K. oft ein kleines dunkles Pünktchen hervortritt, offenbar unser früher beschriebenes Mikrogranulum (Abb. 3). (Vgl. auch II. Mitteilung.)

### II. Färbung mit sauren Farbstoffen.

Die sauren Farbstoffe haben den Vorteil, daß sie schon bei schwächerer Fixierung der Ausstriche, die Erythrocyten zu färben gestatten ohne Gefahr der Schädigung und daß sie mit Leichtigkeit eine Kontrastfärbung der H.E.K. zu dem übrigen Erythrocytenleib ermöglichen.



Abb. 2.

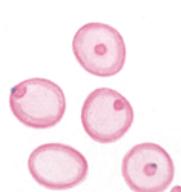


Abb. 3.

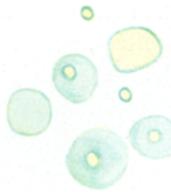


Abb. 4.

Abb. 2. Methylvioletmethode. Undeutlich begrenzte Erythrocytenkörper, stark violette Färbung der Membran der H.E.K. mit heller Außenzone. Rechts findet sich ein Erythrocyt mit deutlicher Membranfärbung, der im Begriff ist, sein H.E.K. auszustoßen.

Abb. 3. Carbofuchsinmethode. Erythrocytenmembran deutlich sichtbar, scharf abgegrenzt. Innerhalb des Erythrocyten, in der Mitte oder außerhalb von ihr die H.E.K. mit starker Fuchsinfärbung ihrer Membran. Am Rande der H.E.K. ein kleines dunkles Pünktchen, das Mikrogranulum.

Abb. 4. Pikrinsäure-Guineagrünmethode. Erythrocyten unscharf begrenzt, Erythrocytenkörper grün, die H.E.K.-Membran ebenfalls grün gefärbt, während diese Gebilde selbst einen gelben Farbenton angenommen haben. An einem hinreichend unversehrten Erythrocyten Gelbfärbung des Erythrocytenkörpers wegen des Hb-Gehaltes, grüne Erythrocytenmembran deutlich erkennbar.

### 4. Pikrinsäure-Guineagrünmethode.

*Technik.* Die fixierten Blutausstriche gelangen etwa für  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$  Minute in eine gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung, bis gerade eine deutliche Anfärbung des Ausstriches zutage tritt. Nach Abspülen gelangen die Ausstriche für etwa  $\frac{1}{2}$  Minute in Guineagrün. Abspülen und Trocknen.

*Färbungsergebnisse.* Die Erythrocyten sind unscharf begrenzt, der Erythrocytenleib nimmt einen grünen Farbton an. Die H.E.K.-Membran ist grün gefärbt, während der H.E.K. selbst einen gelben Farbenton angenommen hat. Ist der Erythrocyt noch hinreichend unversehrt so daß der Erythrocytenkörper infolge seines Hb-Gehaltes sich gelb färbt, so ist die grüne Erythrocytenmembran deutlich erkennbar (Abb. 4).

### 5. Erythrosin-Guineagrünmethode.

*Technik.* Die fixierten Blutausschüttungen gelangen zunächst in Erythrosin (ca.  $\frac{1}{2}$  Minute), nach Abspülen Färbung ( $\frac{1}{2}$  Minute) mit Guineagrün. Abspülen und Trocknen.

Die Färbungsergebnisse entsprechen vollkommen der vorigen Methode, nur sind alle vorher mit Pikrinsäure gelb gefärbten Teile jetzt rot gefärbt.

Doppelfärbungen lassen sich auch in der Weise erzielen, daß man die Ausschüttungen mit einem sauren Farbstoff vorfärbt und gewisse basische Farbstoffe folgen läßt.

### 6. Erythrosin-Victoriamethode.

*Technik.* Die Ausschüttungen gelangen zuerst in eine Erythrosin- oder Eosinlösung für  $\frac{1}{2}$  Minute. Nach Abspülung 10—15 Sekunden Färbung mit Victoriamethode (Kahlbaum). Sobald der Ausschüttung eine leichte bläuliche Farbe annimmt, wird die Färbung unterbrochen, da sonst zu leicht eine Zersetzung des Blutausschüttungen erfolgt. Abspülen und Trocknen.

*Färbungsergebnisse.* Der Erythrocytenkörper zeigt einen hellblauen Farbton, die H.E.K., in der Mitte oder außerhalb davon im Erythrocyten gelagert, ebenfalls extraglobulär, zeigen eine dunkelviolette Membran. Der H.E.K. selbst ist eosinrot (Abb. 5).

Die zuletzt beschriebene Methode ist technisch nicht ganz leicht, da das Victoriamethode nur sehr kurze Zeit einwirken darf. Viel einfacher und zuverlässiger ist es, wenn man die mit sauren Farbstoffen vorbehandelten Ausschüttungen mit Tannin beizt und dann mit einem basischen Farbstoff nachfärbt. Bezgl. des Wesens der Tanninmethode verweisen wir auf die I. Mitteilung. (Fol. haemat. Arch. 33.)

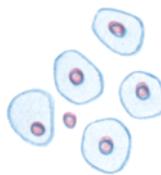


Abb. 5. Erythrosin-Victoriamethode. Es handelt sich hier um Erythrocyten, die nicht wie bei den vorigen Abbildungen mit Pyrozin, sondern mit Nilblau vergiftet wurden. Erythrocytenkörper zeigt hellblauen Farbenton, mit scharf begrenzter Membran. Die H.E.K. haben eine dunkelviolette Membran, während diese Gebilde selbst eosinrot gefärbt sind.

### 7. Carbolgentianaviolett-Tannin-Pyroninmethode.

*Technik.* Die fixierten Blutausschüttungen gelangen für  $\frac{1}{2}$  Minute in Carbolgentianaviolett. Nach dem Abspülen Beizung mit 5 proz. Tanninlösung (2—3 Minuten), Abspülen mit Wasser, ganz kurze Färbung mit Pyronin (ca.  $\frac{1}{2}$ —1 Minute).

*Färbungsergebnisse.* Die H.E.K. sind hellviolett gefärbt und von einer dunkelvioletten Membran begrenzt, an die sich nach außen ein heller roter Hof anschließt. Die Erythrocyten sind meistens ungefärbt, lassen aber oft eine rote Membran erkennen (Abb. 6).

### III. Supravitalfärbungsmethoden.

*Technik.* In Abänderung von Pappenheims Methode der Supravitalfärbung der H.E.K. durch mit Farbstofflösung vorbehandelte Objekträger, wobei die ausgestrichenen Erythrocyten vor ihrer Eintrocknung in einer feuchten Kammer gehalten werden, damit der Farbstoff längere Zeit auf die unfixierten Erythrocyten einwirken kann, haben wir nach dem Vorgange von *Gutstein* (I. Mitteilung) zu einem Tropfen Blut etwa 1—2 Ösen Farbstoff zugesetzt und dieses Gemisch mit einem Deckglas zugedeckt. Diese Methode hat den Vorteil, daß man die Anfärbung der überlebenden Erythrocyten unter dem Mikroskop deutlich verfolgen kann, und daß sie eine schnelle Anfärbung der H.E.K. der im Serum schwimmenden unveränderten Erythrocyten gestattet. Als Farbstoffe benutzen wir für diese Methode hauptsächlich Nilblau, Victoriablau oder Methylviolett ( $\frac{1}{2}$  proz. Lösungen).

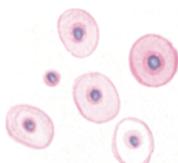


Abb. 6. Carbol-Gentianaviolett, Tannin - Pyronin - Methode. Die H.E.K. (ebenfalls durch Nilblau hervorgerufen), sind violettblau gefärbt und von einer violetten Membran begrenzt, an die sich nach außen ein heller Hof anschließt. Erythrocyten ungefärbt, lassen eine rote Membran erkennen.

*Färbungsergebnisse.* Nach wenigen Sekunden kann man deutlich beobachten, wie der H.E.K. den Farbstoff aufnimmt: er führt innerhalb des Erythrocytenkörpers tanzende Bewegungen aus. Außerdem finden sich frei liegende H.E.K., die sich ebenfalls mit den von uns benutzten Farbstoffen anfärbten. Deutlich ist oft der Austritt der endoglobulären Gebilde aus dem Erythrocyten zu verfolgen.

Die Erzeugung der H.E.K. erfolgte bei uns, wie oben hervorgehoben, durch ein Gemisch von 2 Methb.-Giften, entsprechend den Vorschriften der Pappenheimschen Schule. Immerhin ist es bemerkenswert, daß nicht

alle Methb.-Gifte, die H.E.K. zu bilden fähig sind. So vermögen z. B. Toluylendiamin oder Pyrogallol, trotzdem sie starke Mthb.-Bildner sind, nicht, die H.E.K. hervorzurufen. Auch ist hervorzuheben, daß die Methämoglobinämie nicht parallel geht mit der Bildung der H.E.K. Wir müssen auch darauf aufmerksam machen, daß die in der Literatur immer wiederkehrende Angabe, die H.E.K. entstehen nur durch Hb.-Gifte, auch nicht ganz zutreffend ist. Denn es ist uns gelungen im Nilblau einen Stoff ausfindig zu machen, der zu einer ganz anderen Gruppe von organischen Körpern gehört, nämlich einem basischen Farbstoff aus der Oxazingruppe, der regelmäßig bei der weißen Maus, H.E.K. hervorzurufen imstande ist, ohne gleichzeitige Methämoglobinämie zu erzeugen.

Die Technik der Nilblaueinführung gestaltet sich derartig, daß einer weißen Maus 0,25 ccm einer 0,5 proz. filtrierten Nilblausulfatlösung unter die Haut, am besten unter die Rückenhaut, eingespritzt wurde. Die Einspritzungsstelle zeigt bereits am nächsten Tage eine Nekrose. Am 2. Tage

nach der 1. Einspritzung finden sich schon massenhaft oft H.E.K., extra- und intraglobulär vor. Makroskopisch zeigt das Blut einer solchen Maus eine ganz schwach bläuliche Farbe. Doch muß der Sitz des Nilblaus im Blute sicherlich im Plasma sein, da die Innenkörper selbst und die sonstigen geformten Bestandteile des Blutes bei mikroskopischer Betrachtung vollkommen farblos erscheinen.

Es muß natürlich die Frage aufgeworfen werden, ob die endoglobulären Gebilde, die wir mit dem Nilblau erzeugt haben, überhaupt mit dem H.E.K. gleich sind. Dafür spricht jedoch nicht nur ihr Verhalten im ungefärbten Präparat, insbesondere ihre äußere Form und ihre Lage im Erythrocyten, sondern ganz besonders ihr färberisches Verhalten gegenüber den von uns angewandten Färbemethoden. Ohne die einzelnen Färbungsversuche zu wiederholen, wollen wir besonders hervorheben, daß das färberische Verhalten der Nilblaukörper und der H.E.K. dasselbe ist, und zwar im Ausstrichpräparat ebenso wie im Supravitalpräparat (vgl. Abb. 7). Dabei möchten wir betonen, daß *uns zum erstenmal gelungen ist, durch einen Stoff die H.E.K. hervorzurufen, die in keiner Beziehung zur Methb.-Bildung steht*. Wir haben wiederholt das Blut unserer Nilblau-mäuse spektroskopisch auf Methb. untersucht, ohne auch nur eine Andeutung eines Absorptionsstreifens im Rot gefunden zu haben.

Was die Frage nach dem Ursprung der H.E.K. betrifft, so glauben wir, daß unsere Untersuchungen es ziemlich wahrscheinlich machen, daß die bei den beschriebenen Vergiftungen auftretenden Gebilde als bereits in normalen Erythrocyten vorhanden angesehen werden müssen. Dafür spricht vor allem das färberische Verhalten der H.E.K. gegenüber den oben beschriebenen Färbemethoden, mit denen wir in normalen Säugetiererythrocyten das Vorhandensein des Innenkörpers und Innenkörperchens nachweisen konnten. Noch nicht sicher zu entscheiden ist aber die Frage, mit welchem dieser beiden Gebilde des normalen Erythrocyten die H.E.K. zu vergleichen sind. Doch scheinen uns einige Eigenschaften der H.E.K. für die Annahme zu sprechen, daß sie sich vom Innenkörperchen ableiten. Die Gründe, die dafür sprechen, sind:

1. Die H.E.K. sind erheblich kleiner als die Innenkörper, wie wir sie mit den beschriebenen Färbemethoden dargestellt haben;
2. befinden sie sich oft am Rande der Erythrocyten, was wir oft an den Innenkörperchen, nicht aber am Innenkörper beobachtet haben;
3. ihr Verhalten bei der Supravitalfärbung: sie lassen sich supravital mit Nilblau, Victoriamblau und Methylviolett darstellen, ebenso wie die

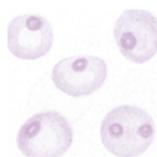


Abb. 7. Methylviolettmethode. Mit Nilblau vergiftete Erythrocyten. Die Abbildung entspricht vollkommen der Abb. 2. Besonders deutliche Membranfärbung der H.E.K.

Innenkörperchen des normalen Erythrocyten, im Gegensatz zu dem Innenkörper, der supravital überhaupt nicht sichtbar gemacht werden kann.

Bei dieser Gelegenheit möchten wir darauf hinweisen, daß die H.E.K. bei unseren Färbemethoden dasselbe Aussehen erkennen lassen, wie der von *Schilling* abgebildete hämoglobinämische Innenkörper im Blut von mit Phenylhydrazin vergifteten Katzen. Besonders möchten wir darauf aufmerksam machen, daß das Granulum am Rande der Innenkörperchen, wie wir es bei der Carbofuchsinmethode darstellen konnten, auch in den Schillingschen Abbildungen deutlich hervortritt.

Gegen die Annahme einer Gleichheit von H.E.K. mit den Innenkörperchen spricht nicht die Tatsache, daß die Pikrinsäure-Guineagrünmethode die H.E.K. gelb, die Innenkörperchen des normalen Erythrocyten dagegen grün erscheinen läßt; denn der normale Erythrocyt mit

seinem reichlichen Hb.-Gehalt, das sich besonders an der Peripherie befindet, könnte u. E. wohl eine andere Verteilung zweier saurer Farbstoffe auf die im Innern gelegenen Körperchen bewirken, insbesondere da bei den Vergiftungen mit Pyrodin oder Nilblau nach Verschwinden des meisten Hb das H.E.K. der Wirkung der Farbstoffe (Färbung und Entfärbung) leichter zugänglich ist.

Eine besondere Stütze für unsere Annahme, daß der H.E.K. ein verändertes Innenkörperchen darstellt, glauben wir in einem Ausstrichpräparat zu haben, das etwa 4 Wochen nach dem ersten Auftreten der H.E.K. nach Pyrodinvergiftung beim Kaninchen angefertigt wurde. Abb. 8 stimmt vollkommen mit Abb. 7 unserer vorigen Mitteilung über-

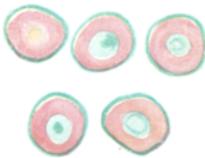


Abb. 8. Erythrosin-Guineagrün-Methode. Es handelt sich hier um Erythrocyten, wie sie sich etwa 4 Wochen nach Pyrodinvergiftung beim Kaninchen vordanden. Deutlich ist die grüne Erythrocytenmembran, das Hämaglobin ist rot gefärbt. Innerhalb des Erythrocyten der helle grüne Innenkörper, innerhalb dessen sich meist in der Mitte das dunkelgrüne Innenkörperchen befindet. Die Abbildung entspricht Abbildung 7 der zweiten Mitteilung.

ein. Bei dieser Erythrosin-Guineagrünmethode ist in sehr zahlreichen Erythrocyten innerhalb des hellgrünen Innenkörpers deutlich ein scharf begrenztes dunkelgrünes Innenkörperchen sichtbar, während beim normalen Erythrocyten nur vereinzelt solche Bilder auftreten.

Das Fehlen des Hb in den vergifteten Erythrocyten ist u. M. nach der hauptsächlichste Grund, weshalb die H.E.K. so leicht nachgewiesen werden können, im Gegensatz zu den Innenkörperchen der normalen Erythrocyten, die meistenteils durch das Hb. verdeckt und nur durch besondere Färbemethoden neben dem Hb. sichtbar gemacht werden konnten. Eine völlige Gleichheit der H.E.K. und der Innenkörperchen kann jedoch nicht vorliegen, da sie wesentliche Unterschiede bei der Hämolyse zeigen. Während nämlich normale Erythrocyten in hypotonischen Salzlösungen völlig zerstört, und deshalb in dem Bodensatz

nichts mehr von Innenkörpern und Innenkörperchen aufzufinden ist, konnte die Pappenheimsche Schule die H.E.K. durch eine solche Hämolysen isolieren und genau chemisch untersuchen. Diese chemischen Untersuchungen haben auch einwandfrei gezeigt, daß die H.E.K. reichlich Phosphatid, etwas Cholesterin und ein basisches Eiweiß (Histon) enthalten. Damit stimmen auch unsere färberischen Analysen überein.

Die von uns hier angewandten Färbemethoden lassen darauf schließen, daß sich innerhalb der H.E.K. *kein Hb befindet*. Gegen das Vorhandensein von Hb. spricht besonders der Umstand, daß die H.E.K. *eine besonders starke Affinität zu basischen Farbstoffen zeigen*. Diese besteht nicht nur, wie *Pappenheim* behauptete, bei Supravitalfärbungen; wir konnten nämlich in unseren Ausstrichpräparaten die H.E.K. mit vielen basischen Farbstoffen darstellen. Die besondere Affinität der Gebilde zu basischen Farbstoffen dürfte ohne Zweifel auf ihrem Phosphatidgehalt beruhen. Daß Phosphatide, z. B. Lecithin, besonders stark mit basischen Farbstoffen sich anfärbten, hat einer von uns früher nachgewiesen (*Gutstein*).

Die Gegenwart von Hb wurde von *Ehrlich* daraus geschlossen, daß die H.E.K. sich besonders stark mit Eosin und anderen „Hb-Farbstoffen“ anfärbten. U. E. spricht diese Färbbarkeit mit Eosin nicht gegen die Lipoidnatur der H.E.K., denn das Verhalten läßt sich so erklären, daß diese Gebilde infolge ihres hohen Lipidgehaltes aus dem Eosin und ähnlichen sauren Farbstoffen die freie Farbsäure, die stark lipoidlöslich ist, aufnehmen. Bei dieser Färbung wäre die Aufnahme des sauren Farbstoffes nicht auf dem Wege einer chemischen Verbindung, sondern als Lösung aufzufassen. Übrigens verhalten sich die H.E.K. färberisch nicht ganz wie Hämoglobin, denn *Ehrlich* ist es bereits aufgefallen, daß die Färbung mit Eosin bei den H.E.K. viel stärker hervortritt, als bei dem Hb. Auch konnte *Pappenheim* und seine Schule feststellen, daß für die Färbung der H.E.K. besonders die lipoidlöslichen Chloresine (Rose bengale) geeignet sind, und mit solchen Farbstoffen sich auch Supravitalfärbungen hervorrufen lassen. Die gewöhnlichen Eosine färben dagegen nicht so gut; auch ist es noch nicht gelungen, das Hb der Erythrocyten supravital anzufärben.

Es ist bemerkenswert, daß *Friedstein* mit besonderem Nachdruck auf einen Vergleich zwischen H.E.K. und eosinophilen Granulationen hinweist. Beide Gebilde zeigen im Ausstrichpräparat eine starke Eosinophilie, beide färben sich dagegen supravital *nur* oder hauptsächlich mit basischen Farbstoffen. Gerade für die eosinophilen Granula ist in letzter Zeit von *A. Neumann* die Lipoidnatur dieser Gebilde nachgewiesen worden. Zu demselben Ergebnis kamen auch noch nicht veröffentlichte Versuche von *Gutstein* und *Blumensaatz*; nach *Gutstein* nehmen die eosinophilen Granula infolge ihres hohen Lipidgehaltes ebenfalls auf physikalischem Wege die Eosinsäure auf.

Ganz einwandfrei hat *Kunkel* durch chemische Analysen der isolierten H.E.K. zeigen können, daß diese Gebilde kein Hb enthalten. Er fand in den H.E.K. zwar etwas Eisen, doch in so äußerst geringen Mengen, daß es sich spektroskopisch nicht mehr nachweisen ließ. Auf Grund dieser Befunde dürfte nicht mehr daran zu zweifeln sein, daß die H.E.K. weder Hb noch abgebaute Hb-Abkömmlinge enthalten.

---

#### Literaturverzeichnis.

- Ehrlich*, Kongr. f. inn. Med. Leipzig 1892. — *Friedstein*, Folia haematol. **12**. — *Gutstein*, Folia haematol. **33**. — *Gutstein* und *Wallbach*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **263**. — *Gutstein*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. **95**, H. 7/8. 1925. — *Gutstein*, Zur Theorie der Vitalfärbung. Klin. Wochenschr. 1927, Nr. 19. — *Hartwich*, Folia haematol. **13**. — *Heinz*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **122**; Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **29**. — *Pappenheim*, Folia haematol. **12**. — *Pappenheim* und *Nakano*, Folia haematol. **14**. — *Pappenheim* und *Suzuki*, Folia haematol. **13**. — *Schilling-Torgau*, Folia haematol. **14**. — *Schilling*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **234**. — *Schmauch*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **156**. — *Schwalbe* und *Solley*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **168**. — *Suzuki*, Folia haematol. **13**.
-