

(Aus dem Pathologisch-anatomischen Institut der deutschen Karls-Universität
in Prag [Vorstand: Prof. Dr. H. Hamperl].)

Über die Hämolyse roter Blutkörperchen.

Von

Walter H. Günther.

Mit 6 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 7. September 1941.)

Einleitung.

Die morphologische Vorstellung, daß rote Blutkörperchen in hypertonuschen Lösungen wie eine Blase schrumpfen und in hypotonischen Lösungen einfach platzen und das Hämoglobin abgeben, wird heute nicht mehr aufrechterhalten. Lassen sich doch auf diese Art physikalische, chemische und serologische Hämolyse nicht erklären. *F. Ransom*¹ fand, daß eine Herauslösung des Cholesterins durch Saponin Austritt des Hämoglobins zur Folge hat, ohne daß eine besondere Quellung oder Schrumpfung stattgefunden hätte. *E. Albrecht*² sah bei leichtem Erhitzen, das nach längerer Zeit auch zu Hämolyse führte, Abschnürungsprodukte im Erythrocyten auftreten, die er als kleine, ungefärbte, matt glänzende Kügelchen beschreibt und glaubt, daß deren Hauptmasse aus Fettsubstanzen bestehé. Er faßt den Hämolysevorgang als Verseifung in der Hülle der Erythrocyten auf. *E. Albrecht* und *Hedinger*³ waren es auch, die erkannten, daß die Stechapfelformen der Hämolyse vorangehen. Sie zeigten ferner in ihren Versuchen, daß die fettartige Oberflächenschicht der roten Blutkörperchen des Kaninchenblutes bei 51° zum Schmelzen kam. Dieser Schmelzpunkt war mit dem des Hühnereilecithins gleich. Aus dieser Tatsache und den genannten Versuchen ergab sich, daß Lecithin einen wesentlichen Bestandteil am Aufbau der roten Blutkörperchen bildet und daß dieses Lipoïd bei der Hämolyse eine Rolle spielt. *E. Albrecht*⁴ schreibt ferner, daß keine Rede davon sein könne, „daß entsprechend der gewöhnlichen Annahme eine zunehmende Wasserimbibition und schließlich Platzen der roten Blutkörperchen ... eintrete“. *H. Bechhold*⁵ sah bei Sublimathämolyse im Erythrocyten wollknäuelartige Strukturen auftreten und faßt die Hämolyse als „Folge der Entmischung der drei in der Blutkörperchenhülle vereinigten Bestandteile, des Proteingerüstes, des Lecithins und des Cholesterins“ auf. *A. Dietrich*⁶ beobachtete, daß knapp vor der Hämolyse am Rande der Erythrocyten kleine, glänzende Pünktchen auftreten und meint, daß dies Lipoidkörnchen sein könnten. *W. W. Lepeschkin*⁷ hat kugelige Tropfen am Rande von Froscherythrocyten gesehen, die

sich in hypertonischen Salzlösungen befanden. Er deutet diese Tropfen als hämoglobinhaltige Protoplasmakörnchen.

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß der morphologische Vorgang bei der Hämolyse nicht ein einfaches Quellen oder Schrumpfen der Erythrocyten ist. Wir machten es uns deshalb zur Aufgabe, die *gestaltlichen Vorgänge bei der Hämolyse*, insbesondere *die Rolle, welche die einzelnen Bestandteile des roten Blutkörperchens dabei spielen*, mit Hilfe neuer Methoden zu analysieren.

Eigene Befunde.

Eine sehr eindrucksvolle Übersicht über den Hämolysevorgang erhält man, wenn man *hämolsierende Streptokokken auf rote Blutkörperchen einwirken* läßt.

Hämolsierende Streptokokken und rote Blutkörperchen wurden in einer gewöhnlichen Nährbouillon angesetzt und in den Brutschrank gestellt. Ein Kontrollversuch mit Bouillon und roten Blutkörperchen ohne hämolsierende Streptokokken wurde gleichzeitig angesetzt. Nach je 1 Stunde wurden beiden Röhrchen Proben entnommen, einige im hängenden Tropfen beobachtet, andere 15 Sek. in 96%igem Alkohol fixiert und nach *Manson-Schwarz* 5 Sek. mit Methylenblau, wieder andere nach der *Giemsa*-Methode gefärbt.

Bereits *nach 2 Stunden* waren im hängenden Tropfen in der Hülle vieler Erythrocyten, die unter Kokkeneinwirkung gestanden hatten, kleine, runde, glänzende *Körnchen* zu sehen. Mit Methylenblau nach *Manson-Schwarz* im Ausstrich gefärbt, wiesen die Erythrocyten eine bläuliche Farbe auf, ebenso wie die kleinen Körnchen. Zwischen den kleinen Körnchen konnten stets schmale Verbindungsbrücken festgestellt werden, so daß man den Eindruck einer *netzartigen Struktur* hatte, auf der die Körnchen aufgelagert waren. Die größeren dieser Körnchen färbten sich oft tiefblau. Bei der Färbung nach *Giemsa* färbten sich die netzartige Struktur und die kleineren Körnchen rosa bis rot, die größeren stets bläulich. *Nach 4 Stunden* waren fast sämtliche roten Blutkörperchen stark gekörnt, während jeweils die Kontrollproben ungekörnte rote Blutkörperchen zeigten. *Nach 6 Stunden* waren schon massenhaft Blutschatten vorhanden. Die dicht granulierten roten Blutkörperchen zeigten in dem flüssigen Medium ruckartige Bewegungen. Wurde längere Zeit ein und derselbe Erythrocyt beobachtet, so sah man, wie kurze *Ausläufer*, die mit kleinen, meist runden Körnchen besetzt waren, von der Oberfläche der Blutkörperchen gewissermaßen herauswuchsen. Diese Ausläufer vollführten ebenfalls ruckartige Bewegungen, die an Molekularbewegung erinnerten. Oft waren die Ausläufer nur kurz und mit einem Körnchen besetzt. Die Molekularbewegung eines solchen Körnchens wurde immer lebhafter, die Verbindung zum Erythrocyten immer dünner, bis diese schließlich entzweiriß und das Körnchen ruckartig ein Stückchen weggeschleudert wurde. Manchmal

waren die Ausläufer länger, astförmig verzweigt und mit zahlreichen kleinen und größeren Körnchen besetzt. Die Körnchen, die auf solchen astartigen Gebilden saßen, färbten sich mit Methylenblau tief dunkelblau und mit Giemsa ebenfalls dunkelblau. Von den verästelten Gebilden lösten sich entweder einzelne Körnchen ab, manchmal zwei, hie und da wurden ganze Äste bei der Ablösung beobachtet. Öfters konnten ganze Reihen von Körnchen gesehen werden, die dann lebhaft an die, zwischen den Blutkörperchen liegenden Streptokokken erinnerten, sich von diesen aber durch ihre Kleinheit unterschieden; auch lagen die Körnchen nicht so eng wie die Kokken. Die Loslösung der Körnchen von den Erythrocyten konnte so lange beobachtet werden, als irgendwo noch Granula der Oberfläche des Erythrocyten anhafteten. Übrig blieb ein durchsichtiges, rundes, feinmaschiges Gebilde, das die Form des ehemaligen Erythrocyten hatte und auf dessen Peripherie noch hie und da ein oder zwei Körnchen zu finden waren; das Innere des Erythrocyten war dann meist frei von ihnen.

Die auffälligste Veränderung in den roten Blutkörperchen während dieser, durch Streptokokken ausgelösten Hämolyse war also das Auftreten kleiner, glänzender Körnchen und ihre Ablösung vom Erythrocyten. Um Näheres über die Natur dieser „*Hämolysekörnchen*“ (HK) zu erfahren, wurden rote Blutkörperchen zuerst unfixiert, dann fixiert mit verschiedenen Lösungen hämolysiert und nach verschiedenen Methoden gefärbt. Zu unseren Versuchen erwies sich eine Benzpyren-Glycerin-Serumlösung (Bp-Gl-S-L), die nach *A. Graffi*⁸ hergestellt wurde, als besonders geeignet. Diese Lösung konnte durch das Glycerin einerseits hypertonisch gemacht werden, andererseits ist das in ihr enthaltene Benzpyren ein ausgezeichnetes Mittel zur Darstellung kleinsten Spuren von Fettsubstanzen unter dem Fluoreszenzmikroskop (*W. H. Günther*⁹). Mit dieser Lösung konnten wir also Hämolyse und gleichzeitig Färbung von Fettsubstanzen erzielen.

Bevor jedoch diese Lösung zur Hämolyse roter Blutkörperchen verwendet wurde, mußten wir das *Verhalten der roten Blutkörperchen gegenüber Glycerin* allein prüfen.

Aus diesem Grunde wurde Glycerin, gekochtes Glycerin (da bei der Bp-Gl-S-L das Glycerin zwecks Lösung des Bp ebenfalls gekocht werden muß) und Bp-Glycerin in drei verschiedenen Eprouvetten mit roten Blutkörperchen angesetzt. In bestimmten Zeitabschnitten bis zu 5 Stunden wurden den Röhrchen Proben entnommen, Deckgläschenaufstriche angefertigt und unfixiert und ungefärbt betrachtet.

Ein Teil der roten Blutkörperchen zeigte mehr oder minder ausgebildete Stechapfelformen. HK konnten selbst nach längerer Versuchsdauer nicht beobachtet werden. Da die drei Flüssigkeiten verhältnismäßig zähflüssig waren, wurden sie mit Rinderserum verdünnt im Verhältnis 30 Teile Glycerin zu 100 Teilen Serum. Zu verschiedenen Zeiten wurden wieder Proben entnommen und auf die gleiche Art wie

oben Ausstriche angefertigt. Nach 5 Minuten waren in der ersten Lösung, die reines Glycerinserum enthielt, Stechapfelformen und vereinzelt HK in den roten Blutkörperchen zu sehen, in stark erhöhtem Maße fanden sich HK in der Lösung: gekochtes Glycerin-Serum und in der Lösung: Bp-Gl-S. Wir versuchten, die von diesen Lösungen hergestellten, unfixierten Ausstriche mit Giemsa und Methylenblau nach *Manson-Schwarz* zu färben, was aber nur nach vielen Versuchen und unter großen Schwierigkeiten wegen des leichten Abschwimmens der Blutkörperchen gelang. In ein und demselben, nach *Giemsa* gefärbten Präparate konnte man die verschiedensten Stadien des Hämolyseablaufes beobachten. Kreisrunde, etwas vergrößerte rote Blutkörperchen wiesen eine deutliche *Granulation* auf, teils aus kleineren, teils aus größeren Körnchen bestehend. Die kleineren Körnchen in den roten Blutkörperchen waren stets untereinander verbunden, so daß eine *Netzstruktur* sichtbar war, meist standen auch die größeren damit im Zusammenhang. Die Farbe des Netzes und der kleinsten Körnchen war im allgemeinen hell- bis dunkelrot, die der größeren meist dunkelblau, doch kamen immer Abweichungen vor, insofern, als sich manchmal einige kleine Körnchen blau und größere rot färbten. An vielen, nur noch zart gefärbten Erythrocyten waren *astartige*, verzweigte *Ausläufer* zu sehen, die mit blau gefärbten Körnchen besetzt waren. Nach *Manson-Schwarz* färbten sich die HK mit Methylenblau bläulich bis dunkelblau und zeigten in Form und Verhalten während der Hämolyse von der oben geschilderten Streptokokkenhämolyse keine Abweichungen. Die HK wiesen also stellenweise basophile Eigenschaften auf.

Wir fragten uns weiter, verhalten sich *rote Blutkörperchen in einem hypotonischen Medium* gestaltlich genau so wie in einem hypertonischen? Zur Lösung dieser Frage verwandten wir *destilliertes Wasser*. Auf frische, lufttrockene Blutausstriche wurde ganz kurz destilliertes Wasser einwirken gelassen. Bei der Färbung mit Giemsa und nach *Manson-Schwarz* treten dieselben Schwierigkeiten auf, gegen die wir bereits in den vorangegangenen Versuchen gekämpft hatten. Schließlich konnten wir aber auch in diesem Falle verwendbare Präparate erhalten, die uns vor Augen führten, daß rote Blutkörperchen im hypotonischen Medium dieselben Formveränderungen, also Auftreten einer Netzstruktur und basophile HK mit nachfolgender astartiger Ablösung vom Blutkörperchen zeigten, wie in der hypertonischen Lösung.

Bei den vorangegangenen Versuchen wurden stets unfixierte Blutausstriche gefärbt, was allerdings den Nachteil hatte, daß bei der Färbung oftmals fast alle Blutkörperchen abgeschwemmt wurden. Um dies zu vermeiden wurde geprüft, ob die Hämolyse an frisch angefertigten, lufttrockenen und dann mit *Fixierungsmitteln* behandelten Blutausstrichen ebenso verläuft, wie an nicht fixierten Ausstrichen. Dabei stellten wir fest, daß tatsächlich der Hämolysevorgang im vorher fixierten Blut-

ausstrich gestaltlich ganz gleich verläuft, wenn die Fixierungsflüssigkeit nur ganz kurze Zeit eingewirkt hat, die roten Blutkörperchen also nur „*anfixiert*“ wurden; bei längerer Einwirkung des Fixierungsmittels wird eine Hämolyse der roten Blutkörperchen unmöglich. Frische, lufttrockene Blutausstriche wurden dementsprechend 1 Sek. mit 96%igem Alkohol oder 1 Min. mit 4%igem Formalin fixiert, anschließend 5 Min. einer 30%igen Glycerin-Serumlösung ausgesetzt und nach *Giemsa* und

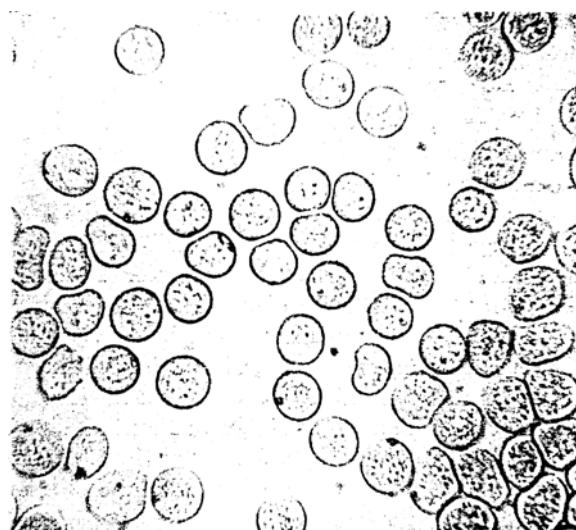


Abb. 1. Starke Körnung der Erythrocyten, hervorgerufen durch eine hypertonische Lösung. 1 Sek. in 96%igem Alkohol anfixiert. 5 Min. mit 30%iger Glycerin-Serumlösung behandelt. Giemsa. Aufnahme im Hellfeld.

Manson-Schwarz gefärbt. Dabei ist wichtig, daß die Blutausstriche vollkommen trocken sind, da die Blutkörperchen nasser Blutausstriche durch den Alkohol teils hämolytiert, teils agglutiniert werden. In auf solche Art gewonnenen Präparaten zeigten die roten Blutkörperchen dieselben gestaltlichen Veränderungen wie in unfixierten Präparaten. Auf die Abb. 1 (Erythrocyten mit HK) und Abb. 2 (HK in Ablösung von fixierten Erythrocyten) paßt vollkommen die oben gegebene Beschreibung der HK an unfixierten Erythrocyten, obwohl sie von anfixierten Präparaten stammen. Die gestaltlichen Veränderungen an anfixierten roten Blutkörperchen sind dabei nicht nur in der hypertonischen Lösung, sondern auch im hypotonischen Medium, denen bei Streptokokkenhämolyse gleich.

Der Hämolysevorgang wird also durch Anfixierung nicht grundsätzlich abgeändert, diese bietet uns aber den Vorteil der guten Beobachtungs- und Abbildungsmöglichkeit.

Ein etwas abweichendes Verhalten von dem bisher geschilderten Ablauf des Hämolysevorganges wurde bei *besonders rascher Hämolyse mit Rugescher Lösung* (Ac. acet. glac. 1,0, Formalin 2,0, Aqua dest. ad 100,0) beobachtet. Diese Hämolyse zeichnet sich dadurch aus, daß es in Präparaten, die 1 Sek. lang mit 96%igem Alkohol anfixiert wurden, fast in derselben Zeit zur Hämolyse aller roten Blutkörperchen kommt. Auch das dabei zu beobachtende Bild ist ein anderes.

An mit Methylenblau nach *Manson-Schwarz* gefärbten Präparaten waren die roten Blutkörperchen durchwegs in ihrem Inneren optisch leer und ungefärbt, außen herum jedoch stets von einem *blauen Hof* umgeben, der meist $1\frac{1}{3}$ — $1\frac{1}{2}$ des Erythrocytendurchmessers breit war. Dieser tiefblaue Saum nahm vom Erythrocyten weg an Farbintensität ab und ging ganz allmählich in die Farbe des Unter-

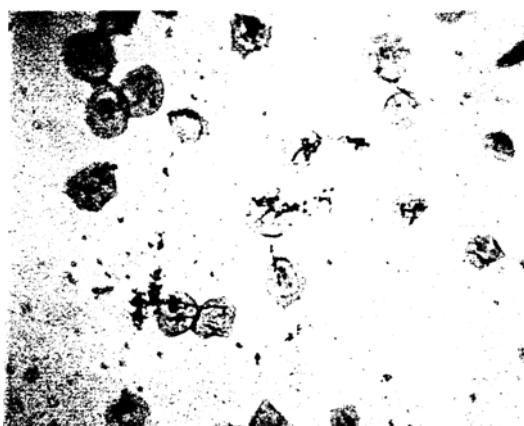


Abb. 2. Erythrocyten während der Hämolyse mit astartigen, verzweigten, körnchenbesetzten Ausläufern. 1 Sek. in 96%igem Alkohol anfixiert, 5 Min. mit 30%iger Glycerin-Serumlösung behandelt. Giemsa-Färbung.

grundes über. In diesen blauen Säumen lagen kleinere und größere, runde *Körnchen*, die stets heller waren als der blaue Hof, in welchem sie eingebettet lagen. Lagen mehrere Erythrocyten nebeneinander, so daß ihre Höfe sich berührten oder ineinander übergingen, so war deren blaue Farbe satter, als wenn Erythrocyten einzeln gelagert waren. Stellenweise waren in den blauen Säumen keine Körnchen, sondern größere mattblaue Tropfen zu sehen. Diese „Blasen“ saßen auf dem Rest der Hülle des Erythrocyten eng aneinander. Fehlten die blauen Säume oder waren sie nur zart um den Erythrocyten angedeutet, so fanden sich meist rundliche, *polychromatisch*, das heißt rotviolett gefärbte *Körnchen* oder längliche, gerade oder gebogene bzw. hantelförmige, *polychromatisch gefärbte Stäbchen*. Meist lagen Körnchen und Stäbchen nebeneinander und umgaben den Erythrocyten an Stelle der ehemaligen Hülle in einfacher Reihe (Abb. 3).

Die bei der schnellen Hämolyse auftretenden Gebilde im Erythrocyten (Höfe, Körnchen und Stäbchen) zeigen also ebenfalls Basophilie, genau so wie viele Hämolysekörnchen.

Außer den angeführten färberischen Reaktionen der HK mit Giemsa und *Manson-Schwarz* wurden noch folgende Färbungen ausgeführt: mit *Fuchsin*, *Neutralrot* und nach *Gram*, wobei bei dieser Methode die Färbezeiten etwas verkürzt wurden. Bei allen drei Färbemethoden wurden lufttrockene Blutausstriche 1 Sek. in 96%igen Alkohol anfixiert

und 5 Min. einer 30%igen Gl-S-L ausgesetzt. Die dabei aufgetretenen Netzstrukturen färbten sich mit Fuchsin und Neutralrot blaß rot, nach *Gram* schwach grampositiv. Die HK, vor allem solche in Ablösung, färbten sich mit Fuchsin und Neutralrot intensiv rot, nach *Gram* stark grampositiv. Auch in diesen Versuchen zeigt sich also die Neigung der HK, sich mit basischen Farbstoffen zu färben.

Nach den gestaltlichen Veränderungen der roten Blutkörperchen bei der Hämolyse und den färberischen Eigenschaften der dabei auftretenden HK beschäftigte uns die Rolle, welche die *Fettsubstanzen* der

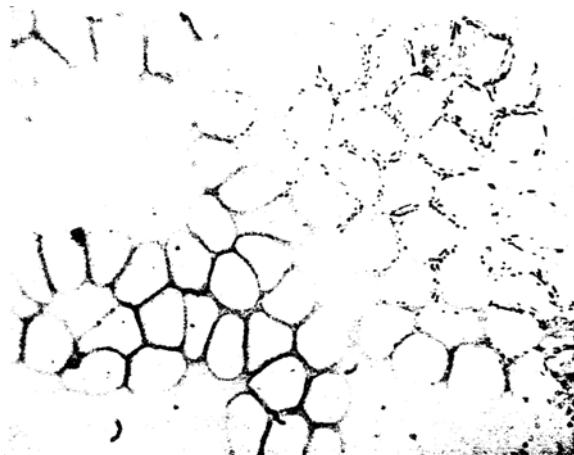


Abb. 3. Rasch hämolyzierte Erythrocyten, links mit den blauen, im Bild dunklen Höfen, rechts die körnchen- und stäbchenförmigen Ausfällungen der blauen Plasmahöfe. 1 Sek. in 96%igem Alkohol anfixiert. 2 Sek. mit *Rugescher* Lösung hämolytiert. Färbung nach *Manson-Schwarz* mit Methylenblau. Aufnahme im Hellfeld.

roten Blutkörperchen dabei spielen. Dazu war es notwendig, rote Blutkörperchen zu hämolsieren und gleichzeitig Fettfarbstoffe einwirken zu lassen. Da es sich aber nur um Spuren von Fettsubstanzen handelt, mußten wir ein besonders empfindliches Fettdarstellungsmittel verwenden. Benzpyren bietet uns diese Eigenschaften und hat noch dazu den Vorteil, im Hämolytikum gelöst zu sein (s. oben).

Die systematischen Versuche wurden nun mit der Bp-Gl-S-L begonnen. 1 ccm Serum enthielt 0,01 mg Bp und 0,5% Glycerin.

Frisch angefertigte, lufttrockene Blutausstriche von gesunden Menschen wurden 1 Min. in 4%igem Formol anfixiert, dann mit Leitungswasser abgespült, anschließend wurde die Bp-Gl-S-L aufgetropft. Wir ließen sie 5 Min., $\frac{1}{4}$ Stunde, $\frac{1}{2}$ Stunde, dann in Abständen von 1 Stunde bis 12 Stunden einwirken. Danach wurden die Präparate mit Leitungswasser abgespült, an der Luft getrocknet und mit Ölimmersion unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Niemals konnte dabei in den intakten roten Blutkörperchen irgend eine blaue, für das Benzpyren in Lösung kennzeichnende Fluorescenz

beobachtet werden, obwohl ja die roten Blutkörperchen sicherlich Fettstoffe enthalten. In der geringen Bp-Konzentration konnte die Ursache des Mißerfolges nicht liegen, da Paramecien, die mit der gleichen Lösung behandelt wurden, eine lebhafte Blaufluorescenz zeigten (W. H. Günther⁹). Anders wird das Bild erst, wenn man die Glycerin- und hiemit auch die Bp-Konzentration so steigert, daß Hämolyse auftritt (in 1 ccm Serum 1—30% Glycerin). Der Ablauf des Hämolysevorganges war bei den höheren Konzentrationen des Glycerins rascher als bei den niedriger

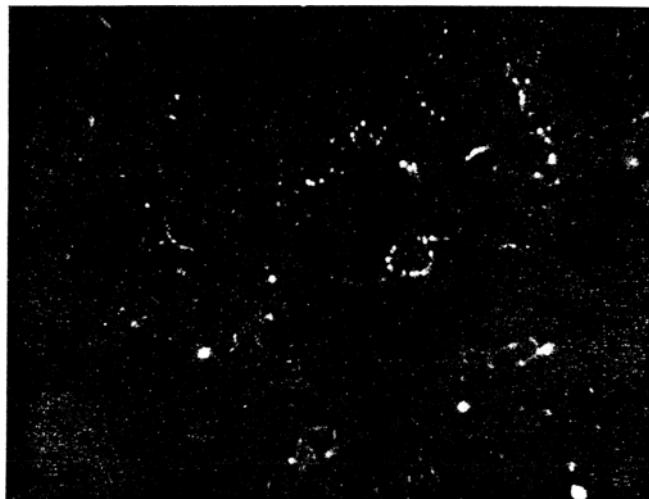


Abb. 4. Beginnende Hämolyse der Erythrocyten. Mit Benzpyren beladene Hämolysekörnchen auf der schwächer fluoreszierenden Hülle der roten Blutkörperchen. 1 Min. mit einer hypertонischen Benzpyren-Glycerin-Serumlösung behandelt. Aufnahme im u.v. Licht.

konzentrierten Lösungen, grundsätzlich aber der gleiche. Wir wollen deshalb das Ergebnis der Versuche bei einer Lösung beschreiben, die in 1 ccm Serum 0,2 mg Bp und 30% Glycerin enthielt.

Nach 1 Minute waren sämtliche Erythrocyten an ihrer Peripherie mit kleinen, intensiv *hellblau fluoreszierenden Körnchen* besetzt, die meist den Rand des Erythrocyten überragten und das Bild eines gezähnten Randes ergaben. Zwischen den Körnchen war stets eine mattblau fluoreszierende Verbindungsbrücke zu sehen (Abb. 4). Das Innere der Erythrocyten fluorescierte nur ganz gering diffus blau und enthielt nur vereinzelt kleinste, blau fluoreszierende Körnchen. All diese Körnchen entsprechen durchaus den obenerwähnten Hämolysekörnchen und sind im Hellfeld betrachtet, als runde, stark glänzende Kugelchen zu sehen, die losgelöst vom Erythrocyten Molekularbewegung zeigten.

Nach 2 Minuten Einwirkungsdauer hatte sich das Bild nicht wesentlich geändert, nur war die Größe und Zahl der fluoreszierenden HK

vermehrt. *Nach 3 Minuten* waren sie noch zahlreicher. Die Mehrzahl der roten Blutkörperchen war kreisrund. An einzelnen Stellen gingen von der Peripherie der Erythrocyten kleine, fädige und mattblau fluorescierende Fortsätze aus, die mit hellblau fluorescierenden Körnchen besetzt waren. Solche Erythrocyten erwiesen sich im Helffeld als Stech-
apfelformen. War es bereits zum Austritt des Erythrocyteninhaltes gekommen (4.—5. Min.), so konnte man rote Blutkörperchen oder auch

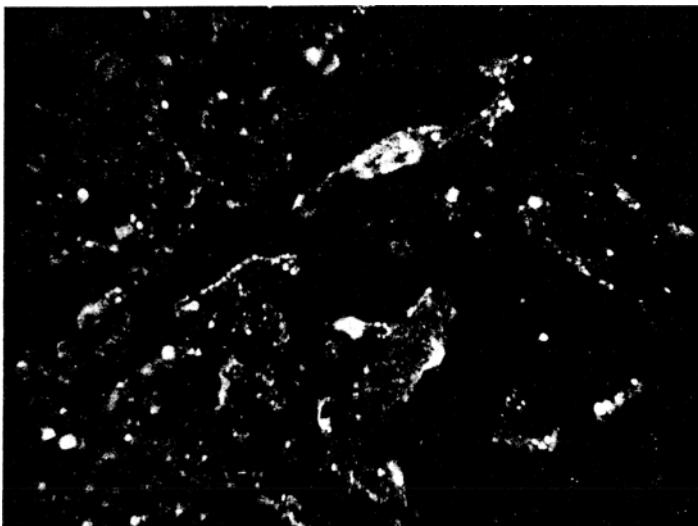


Abb. 5. Links Erythrocyten knapp vor der Hämolyse, in der Mitte während der Hämolyse. Die Netzstrukturen mit den Hämolysekörnchen sind in manchen Erythrocyten ausgetreten. 3 Min. mit einer hypertonischen Benzopyren-Glycerin-Serumlösung behandelt. Aufnahme im u.v. Licht.

nur Reste der Hülle der Erythrocyten beobachteten, die im Zusammenhang mit unregelmäßig begrenzten, mattblau fluorescierenden Massen standen. Diese wiesen eine *feinst-netzige Struktur* auf und waren mit zahlreichen, hellblau fluorescierenden, runden Körnchen besetzt (Abb. 5). Bei Dunkelfeldbeleuchtung bot sich ein ähnliches Bild (Abb. 6) wie im Fluoreszenzmikroskop.

Zum Nachweis der Fettsubstanzen wurden weiters noch *Nilblausulfat* und *Sudan* verwendet.

Frische, lufttrockene Blutausstriche wurden 1 Sek. in 96%igem Alkohol anfixiert, abgespült, getrocknet, 5 Min. in eine 30%ige Gl-S-L gebracht, wieder abgespült und getrocknet, $\frac{1}{4}$ Stunde mit *Nilblausulfatlösung* gefärbt, mit Leitungswasser abgespült und mit Ölimmersion betrachtet.

Die HK färbten sich blau, wobei die noch an den Erythrocyten haftenden sich schwächer färbten als solche, die sich bereits von ihnen abgelöst haben oder noch auf verzweigten Ausläufern saßen.

Um die *Sudan*-Färbung anwenden zu können wurden HK durch $1\frac{1}{2}$ Min. langes, trockenes Erhitzen über der Flamme erzeugt. Die dabei in verhältnismäßig wenig Erythrocyten auftretenden HK färbten sich rot.

Da manche der HK deutlich basophil (s. oben) sind, lag es nahe, diejenigen Färbemethoden an ihnen anzuwenden, die in der Hämatologie an lufttrockenen Blutausschichten zur Darstellung basophiler Granulation

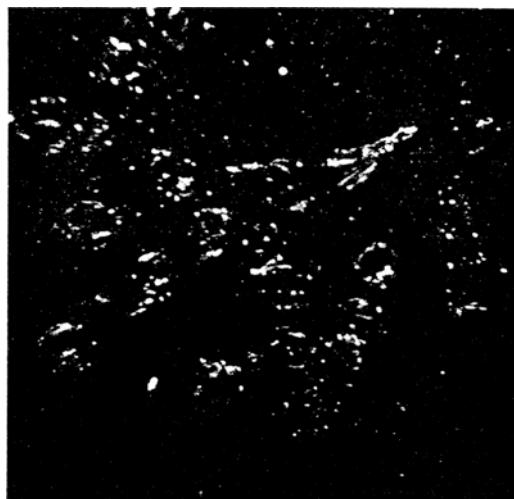


Abb. 6. Erythrocyten während der Hämolyse durch hypertonische Benzylpyren-Glycerin-Serum-Lösung mit deutlich runden, glänzenden Hämolysekörnchen. Aufnahme im Dunkelfeld (vgl. Abb. 5).

in Erythrocyten verschiedentlich angewendet wurden. Tatsächlich gelang es uns bei Anwendung der *hämolytischen Pyroninlösung* (E. Schröder¹⁰) sowie der *Forestschen Methode* in normalen roten Blutkörperchen das Auftreten von mehr oder minder reichlichen HK, die einer Netzstruktur aufgelagert waren, zu beobachten. Besonders die größeren färbten sich gut mit den basischen Farbstoffen.

Besprechung.

Die Angaben in der Literatur, daß durch verschiedene andere Einwirkung in gesunden roten Blutkörperchen kleine Körnchen entstehen und in krankhaft veränderten Erythrocyten eine bereits vorhandene Granulierung verstärkt wird, sind mannigfaltige. E. Albrecht² beobachtete solche Körnchen nach leichtem Erhitzen, A. Dietrich⁶ bei Serum-hämolyse, W. W. Lepeschkin⁷ bei Erythrocyten in hypertonischen Salzlösungen, J. Steffenson¹¹ nach Behandlung mit Gallocyaninchromalaun, Kiyoshi Sakai¹², der zwecks Nachweis einer Erythrocytenmembran

zu verschiedenen basischen Farbstoffen 1 oder 2% Carbolsäure, also ein Hämolytikum zusetzte, erhielt in den meisten Fällen eine Granulierung der Ratten- und Kaninchenerthrocyten. Auch wir konnten in allen unseren Versuchen diese Körnchen wiederfinden und haben diese „Hämolysekörnchen“ (HK) zum Gegenstand eingehender Untersuchung gemacht. Ihr Auftreten ließ sich unter fast natürlichen Bedingungen im hängenden Tropfen bei Einwirkung von hämolysierenden Streptokokken beobachten. Dabei tritt zunächst im Erythrocyten eine feine Netzstruktur auf, der die HK aufgelagert sind. Dann beginnt ihre Ablösung vom roten Blutkörperchen. Dabei vollführen die HK Molekularbewegungen, bis sie sich schließlich — wie besonders bei langsamer Hämolyse festzustellen — mit einem kleinen Ruck gänzlich vom Erythrocyten lösen. Durch diesen Vorgang werden im Erythrocyten Energien frei, wie *W. W. Lepeschkin*⁷ annimmt. Er gibt als Maß der frei werdenen Energie bei der Hämolyse für 1 g Trockensubstanz von Rindererythrocyten 2 g/Kal an und meint, daß eine derartige Molekularenergie nur noch bei Explosivstoffen erzeugt wird.

Augenblicksbilder aus diesem, in seinem Ablauf beobachteten Vorgang wurden an Ausstrichpräparaten festgehalten und gefärbt. Dabei war es ganz gleichgültig, welche Art der Hämolyse angewendet wurde (Gl-S-L, dest. Wasser, Rugesche Lösung usw.). *Es scheint also jede Hämolyse mit dem Auftreten solcher Hämolysekörnchen einherzugehen*, jedenfalls fehlen sie in so gut wie keiner Beschreibung der zahlreichen mit diesem Gegenstand befaßten Beobachter.

Manche Untersucher haben allerdings wollknäuelartige Strukturen gesehen, so *H. Bechhold*⁵ bei Saponin- und Sublimathämolyse, *A. Dietrich*⁶ bei Serumhämolyse. Auch bei unseren Versuchen fanden sich besonders bei Dunkelfeldbeleuchtung solche wollknäuelartige Strukturen in den roten Blutkörperchen zu Beginn der Hämolyse, doch lösten sie sich stets bei fortschreitender Hämolyse in kleine Körnchen auf, sind also nur als ein Vorstadium der HK zu betrachten.

Bei besonders schneller Hämolyse, wie sie durch Rugesche Lösung hervorgerufen wird, treten keine typischen HK auf, sondern eigentümliche blasige Gebilde oder Stäbchen. Diese Abweichung von dem gewöhnlichen Hämolysevorgang ist wohl durch die Besonderheiten der hämolysierenden und zugleich fixierenden Lösung zu erklären.

Um, soweit durch Färbung möglich, zu ergründen, *aus welchen Stoffen die HK bestehen*, wurden verschiedene Färbemethoden angewendet. Sie färbten sich gut mit basischen Farbstoffen, was für einen Gehalt an *Eiweiß* spricht. Wir stellen uns dementsprechend vor, daß durch den Hämolysevorgang aus dem Plasma der roten Blutkörperchen basisches Eiweiß entsteht bzw. nachweisbar wird, unter der Annahme, die auch *T. Casperson*¹³ vertritt, daß die Basophilie vor allem auf Eiweißsubstanzen zurückzuführen ist. Daß Eiweißsubstanzen in den HK vorhanden sind, beweist auch der positive Ausfall der *Gram-Färbung*.

Außer Eiweiß enthalten die HK noch *Fettsubstanzen*. Bei fortschreitender Hämolyse werden sie in den HK immer besser darstellbar. Anscheinend geht im *Erythrocytenplasma* eine teilweise *Entmischung von Fetten und Eiweiß* vor sich. Nach Behandlung mit dem besonders empfindlichen Fettfärbemittel Benzpyren fluorescieren die HK unter dem Lumineszenzmikroskop intensiv blau, die netzartige Grundstruktur dagegen nur mattblau. Auch durch den positiven Ausfall der Färbung mit Sudan, Nilblausulfat und Neutralrot wurde die Anwesenheit von Fetten gesichert, die schon von anderen vermutet wurde (E. Albrecht, A. Dietrich usw.); schon E. Albrecht² nahm an, daß die bei Kochsalzeinwirkung auf die roten Blutkörperchen entstandenen Sprossen vor allem aus Lecithin bestehen.

Als *dritten Hauptbestandteil* enthalten die HK offenbar auch noch *Hämoglobin*. Daß das Hämoglobin über die HK die roten Blutkörperchen verläßt, glauben wir daraus entnehmen zu können, daß in ungefärbten Präparaten im hängenden Tropfen die Erythrocyten mit zunehmender HK-Bildung und deren Ablösung vom Erythrocyten mehr und mehr den normalen grünlichen Farbton verlieren. Allerdings können wir W. W. Lepeschkin nicht ganz folgen, wenn er die bei der Hämolyse entstehenden Tröpfchen (HK) einfach als hämoglobinhaltige Protoplasmatröpfchen ansieht. Würde es sich um unverändertes Plasma handeln, dann müßte das Plasma in nicht hämolyzierten Erythrocyten Farbstoffe genau so aufnehmen wie die Tröpfchen bzw. HK; das ist aber nicht der Fall. Viel eher trifft die Meinung A. Dietrichs⁶ zu, daß es sich um Lipoidtröpfchen handle, die auch Hämoglobinreste einschließen.

Überblicken wir also die Ergebnisse unserer Färbeversuche, so kommen wir zu dem Schluß, daß in den HK zwar grundsätzlich die Bestandteile des Erythrocyten vorhanden sind, daß sie sich aber anders verhalten als im normalen roten Blutkörperchen. Da nicht anzunehmen ist, daß die ganz verschiedenen Einflüsse gleichartige chemische Veränderungen auslösen, hat die Annahme Bechholds die größte Wahrscheinlichkeit für sich, daß es sich bei der Hämolyse um eine Art *Entmischungsvorgang der Bestandteile des Erythrocytenplasmas* handelt, der ihre Reaktionsfähigkeit gegenüber unseren Färbemitteln ändert und seinen Niederschlag in der Ausbildung der Hämolysekörnchen findet.

Bei unseren Versuchen ist uns eine gewisse Ähnlichkeit der bei der Hämolyse auftretenden körperlichen Gebilde mit manchen Strukturen aufgefallen, die unter krankhaften Verhältnissen in roten Blutkörperchen gefunden werden. Wenn man hämolytische Färbemethoden zur besseren Darstellung von basophiler Punktierung anwendet, dann sollte man sich darüber im klaren sein, daß solche Methoden unter Umständen geeignet sind, schon in gesunden roten Blutkörperchen basophile Hämolysekörnchen hervorzubringen. Mit den von Schilling¹⁴ beschriebenen Erythrokonten haben wiederum die bei Anwendung der Rugeschen

Lösung im ausgetretenen Erythrocytenplasma nachweisbaren Stäbchen eine gewisse Ähnlichkeit. Vielleicht ergibt sich auf Grund dieses Vergleiches eine Möglichkeit, diese bisher rätselhaften Gebilde einer Deutung zuzuführen.

Zusammenfassung.

Mittels Streptokokkenhämolysin und anderer Hämolytika wurde während des Ablaufes des Hämolysevorganges an den ersten Blutkörperchen das Auftreten einer Netzstruktur beobachtet, auf der zahlreiche Körnchen, die als Hämolysekörnchen bezeichnet werden, zum Vorschein kamen. Die Hämolysekörnchen weisen größtenteils eine Basophilie auf und bestehen aus Eiweiß, Fettsubstanzen und wahrscheinlich auch Hämoglobin. Der Hämolysevorgang wird als teilweise Entmischung der drei Komponenten des roten Blutkörperchens, des Proteingerüstes, der Fettsubstanzen und des Hämoglobins gedeutet.

Schrifttum.

- ¹ *Ransom, F.*: Dtsch. med. Wschr. 1901 I, 194. — ² *Albrecht, E.*: Verh. dtsch. path. Ges. 5, 7 (1902). — ³ *Albrecht, E.* u. *Hedinger*: Zbl. path. Anat. 15, 982 (1904). — *Albrecht, E.*: Verh. dtsch. path. Ges. 8, 10 (1905). — ⁵ *Bechhold, H.*: Münch. med. Wschr. 1921 I, 127. — ⁶ *Dietrich, A.*: Münch. med. Wschr. 1921 I, 457. — ⁷ *Lepeschkin, W. W.*: Fol. haemat. (Lpz.) 54, 53 (1936). — ⁸ *Graffi, A.*: Z. Krebsforsch. 49, 477 (1939). — ⁹ *Günther, W. H.*: Z. Krebsforsch. (1941, im Druck). — ¹⁰ *Schröder, E.*: Fol. haemat. (Lpz.) 48, 1 (1932). — ¹¹ *Steffensen, J.*: Fol. haemat. (Lpz.) 54, 321 (1936). — ¹² *Sakai, Kiyoshi*: Fol. haemat. (Lpz.) 46, 401 (1932). — ¹³ *Casperon, T.*: Naturwiss. 29/3, 34 (1941). — ¹⁴ *Schilling, V.*: Klin. Wschr. 1928 I, 785.