

**DER FÄRBERISCHEN DARSTELLUNG DER
ERYTHROZYTEN-MEMBRAN***Mit 5 Abbildungen***Von DR. PAUL VONWILLER (Rheinau)
und DR. FRANZ BRUMAN (Zürich)**

Niemand zweifelt daran, daß die Frage, ob die roten Blutzellen eine eigene, ihre Oberfläche bekleidende, selbständig ausgebildete Membran besitzen, eine ganz außerordentlich praktisch und theoretisch wichtige sei. Zwar stand man ihr in neuerer Zeit wohl eher ablehnend gegenüber, ließ vielleicht noch am ehesten eine bloß „funktionelle“ solche Membran zu. Aber eine anatomisch selbständige Membran, die sich scharf und deutlich vom Zellkörper differenzieren lasse, wurde nicht angenommen (TZANCK und DREYFUSS, S. 88 ff.).

In neuester Zeit dagegen mehren sich die Stimmen, welche eine solche anatomisch selbständige Membran annehmen. Aber es besteht immer noch keine wirklich histologisch sichere Methode, um sie klar und deutlich darzustellen. Da die klassischen hämatologischen Methoden sie nicht zeigen, ist es begreiflich, daß die Stimmen, welche ihre Existenz behaupten, von seiten von Forschern ausgingen, welche mit anderen, neueren Methoden arbeiten. Wir weisen auf die Arbeiten von HOLLANDE hin, welcher eine solche Membran zu sehen glaubte. Zweitens wird von seiten der Elektronenmikroskopiker die Existenz der Membran behauptet und sogar ihre Dicke gemessen.

Aber währenddem HOLLANDE nur mit Wahrscheinlichkeit ihre Existenz nachweisen konnte und seine Bilder offenbar noch nicht scharf und hinreichend überzeugend sind, muß gegen die Feststellungen der Elektronenmikroskopie geltend gemacht werden, daß die Entstehung und Auswertung ihrer Bilder bei so großen und so verhältnismäßig dicken Objekten, wie es die Erythrozyten für die Elektronenmikroskopie darstellen, noch nicht hinreichend abgeklärt sind, um so weitgehende Schlüsse ganz sicher zuzulassen (INDUNI). Aber aus der Tatsache, daß man einerseits mit dem Lichtmikroskop doch diese Membran eben noch sehen kann und anderseits mittels der Elektronenmikroskopie sogar ihre Dicke gemessen werden könne, ergibt sich, daß es sich offenbar um ein Objekt handelt, das vorläufig noch in der Nähe der Grenze der Sichtbarkeit des optischen Verfahrens gelegen ist, aber ihm vielleicht doch auch durch Verbesserung der Methoden noch besser zugänglich gemacht werden könnte, und anderseits, daß vermutlich das Elektronenmikroskop weitere neue Momente zur Lösung dieser Frage wird beitragen können.

Wir erwähnen hier weiterhin die Arbeit von SALAZAR über gewisse merkwürdige Kunstprodukte und nicht immer leicht zu deutende Veränderungen der roten Blutzellen bei sogenanntem Schock, worauf wir weiter unten noch einmal zurückkommen werden.

1. Versuche mit Trypanblau und Nigrosin

Unser Ausgangspunkt waren Beobachtungen, die ich im Jahre 1945 als Chef des Laboratoriums der Militärsanitätsanstalt I in Flüelen unter Mitarbeit von Fräulein E. SENN machen konnte. Eine größere Anzahl von Blutaussstrichen wurden dabei mit dem von uns vorher bei Arbeiten über die Netzhaut verwendeten Farbstoffgemisch behandelt. Dieses Farbstoffgemisch setzt sich bei unseren jetzigen Versuchen folgendermaßen zusammen:

Trypanblau 2% in Wasser oder physiol. Kochsalzlösung	8,0 ccm,
Alkohol absolutus	0,4 ccm,
Essigsäure 30%	0,2 ccm.

In den anfänglichen Versuchen war der Farbstoff in geringerer Proportion vertreten, 1% oder $\frac{1}{2}\%$. Das ändert, außer der Färbedauer, am Ergebnis nichts Wesentliches. Anfänglich färbten wir einige Stunden, später 12—24 Stunden, ja noch länger. Zuerst fiel nur das auf, daß die in der Nähe von Leukozyten liegenden roten Blutzellen eine deutliche, dunkelgefärbte, scharf abgegrenzte Membran an ihrer Oberfläche zeigten. Nach und nach gelang es sodann, eine solche an allen Erythrozyten eines Blutaussstriches nachzuweisen. Wir besitzen also von jetzt an eine sichere und einfache Methode zum Nachweis der Erythrozytenmembran.

Wir geben hier zunächst ein Bild zur Übersicht über einen derartig ge-

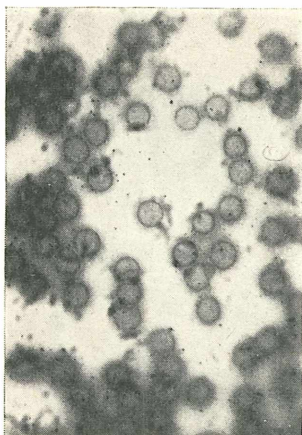


Abb. 1.

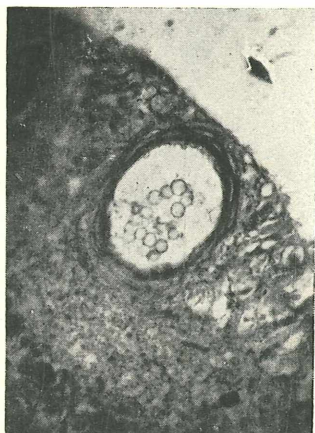


Abb. 2.

Abb. 1. Ausstrich von menschlichem Blut.

Färbung mittels Trypanblau-Alkohol-Essigsäure-Gemisch. Fixierung mit Formolalkohol. Ölimmersion $\frac{1}{12}$, Periplanat. Okular 4X, Micca Leitz.

Abb. 2. Netzhautschnitt vom Rind.

Gleiche Färbung und Fixierung. Micca Leitz. Mittlere Vergrößerung.

färbten Blutausstrich. Man sieht daran ganz deutlich, wie bei scharfer Einstellung jedes rote Blutkörperchen von einem scharf markierten, dunkeln Rand an seiner Oberfläche begrenzt wird (Abb. 1).

In der Folge hat es sich gezeigt, daß das Vorgehen mit unserem Farbstoffgemisch an gewöhnlichen Blutausstrichen nicht das einzig mögliche darstellt. Vielmehr stießen wir bei unseren Netzhautuntersuchungen zunächst an Flächenpräparaten der Netzhaut und in der Folge auch an Schnittpräparaten desselben Objektes auf Bilder, welche die scharfgefärbte Erythrozytenmembran bei ganz farblosem Zellplasma dieser Zellen und ebenso farblosem Blutplasma zeigten (Abb. 2).

Erst kürzlich stießen wir auf eine weitere Möglichkeit der Darstellung der uns interessierenden Oberflächenstruktur der roten Blutkörperchen, nämlich mittels des Farbstoffes Nigrosin (CIBA). Die Zusammensetzung des Farbstoffgemisches geschieht analog dem obenerwähnten Trypanblaugemisch, und zwar verwendeten wir 1%ige Nigrosinlösung in physiologischer Kochsalzlösung mit den oben angegebenen Zusätzen von Alkohol und Essigsäure. Wir bemerkten die Färbung zuerst an unseren Netzhautpräparaten, sowohl



Abb. 3. Netzhautschnitt vom Rind. Färbung mit Nigrosin-Alkohol-Essigsäure. Fixierung mit Formolalkohol. Mittlere Vergrößerung. Micca Leitz. Die kreisförmigen Konturen der einzelnen Erythrozyten sind beim Klüschieren etwas zu hell geworden und daher im folgenden Druck nur schwer sichtbar

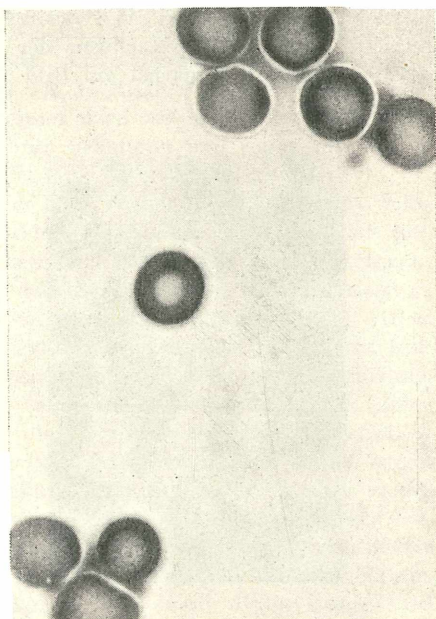


Abb. 4. Ausstrich von menschlichem Blut. Färbung mit alizarin-sulfosaurem Natrium. Fluorit-Ölimmersion $\frac{1}{12}$ Fl. Periplanat. Okular 10 \times , Leica-Aufsatz, nachträgliche Vergrößerung. — Deutliche Membranfärbung, besonders gut sichtbar im zentral gelegenen Erythrozyten. In weiterer Umgebung sieht man einen konzentrischen Riß des leicht tingierten Blutplasmas, hervorgerufen beim Eintrocknen des Ausstriches.

Flächenpräparaten als Schnitten (vgl. Abb. 3). In der Folge konnten wir sie auch an Blutausstrichen vom Menschen erzeugen; eventuell fixiert man vorher einige Stunden mit Formolalkohol.

2. Versuche mit alizarinsulfosaurem Natrium

Frische, aber gut luftgetrocknete und möglichst dünne Blutausstriche auf Objektträgern oder Deckgläschen werden nach den Prinzipien der hämatologischen Technik mit der Schicht nach abwärts für 12—48 Stunden in einer 1—2%igen Lösung von alizarinsulfosaurem Natrium gefärbt, nachher mit destilliertem Wasser abgespült, mit Filtrierpapier abgetupft und luftgetrocknet mit neutralem Kanadabalsam oder Zedernöl eingeschlossen.

Von OKAJIMA wurde vor Jahren eine Methode angegeben, welche durch Verwendung einer Lösung von alizarinsulfosaurem Natrium und Phosphormolybdänsäure eine intensive braunschwarze Färbung der Erythrozyten erzeugte.

Mit unserer Methode erfolgt eine hell- bis dunkelblauviolette Färbung der Zelloberfläche der Erythrozyten, während das Stroma hellbräunlich tingiert wird.

Die photographische Darstellung der erhaltenen Strukturen machte anfänglich wegen ihrer Feinheit Schwierigkeiten und war nur auf einem gewissen Umweg zu erreichen: Unter Verwendung eines angepaßten monochromatischen Grünfilters, des Mikraufsatzes für die Leica, sehr feinkörnigen Negativmaterials (z. B. Agfa Isopan 10/10 Din) und Vergrößerung auf

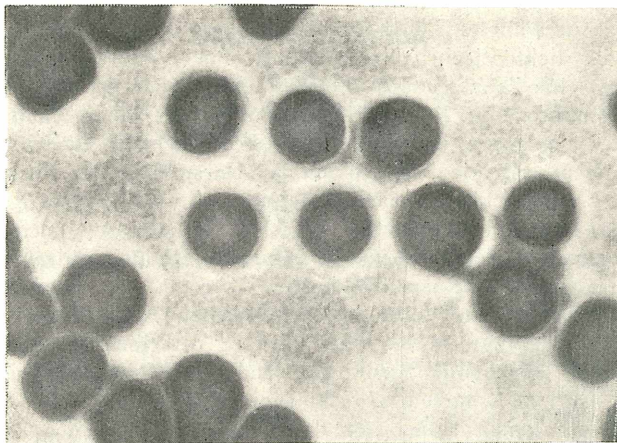


Abb. 5. Gleiche Technik.

Auch hier ist die Membranfärbung deutlich zu erkennen; die Erythrozyten und das Plasma erscheinen dunkler wegen längerer Färbedauer als bei Abb. 4.

extrahartem Hochglanzpapier konnte eine befriedigende Darstellung der Zellmembranfärbung erreicht werden, die auch die Reproduktion gestattete. Aufnahmen auf Farbfilm (z. B. Agfa-Tageslichtfilm unter der Verwendung der Monla-Lampe mit Tageslichtfilter) waren relativ leicht herzustellen und zeigten im Diapositiv aufs deutlichste die Farbe und Ausbildung der Erythrozytenmembran (Abb. 4 und 5).

Diskussion

Es erhebt sich jetzt die Frage, ob die mit unsern Methoden dargestellten Strukturen mit eventuellen Erythrozytenmembranen identisch sind. Das Vorhandensein einer Membran bei den roten Blutkörperchen wurde seit vielen Jahren auf Grund von Diffusionsversuchen von den Physiologen postuliert (HÖBER usw.). Aber auch die Tatsache, daß das Ionenmilieu in den Erythrozyten ein ganz anderes ist als dasjenige im umgebenden Plasma, müßte notwendig das Bestehen einer sich mindestens funktionell auswirkenden Grenzmembran wahrscheinlich machen; über deren Dicke waren die Ansichten allerdings sehr verschieden. Die Einführung des Elektronenmikroskops in die Biologie hat mit einem Schlag die ganze Frage weitgehend geklärt; WOLPERS konnte mit seinen Mitarbeitern das Vorhandensein einer definierten und scharf abgrenzbaren Membran nachweisen. Sie ist sowohl unfixiert wie fixiert nachweisbar und scharf gegen das darunterliegende Stroma abgegrenzt; ihre Dicke variiert je nach den Untersuchungsbedingungen zwischen 15—25 $m\mu$. JUNG hat diese Ergebnisse auf die Pathologie der Erythrozyten übertragen und gezeigt, daß die Hämolyse durch Ultraschall, Hitze- und Kälteeinwirkung und Ultraviolettbestrahlung verschiedene Mechanismen hat und nur die Kälte- und Ultraviolett-hämolyse durch elektronenoptisch feststellbare Membranveränderungen bedingt ist.

Bei der obenerwähnten Dicke der Membranen ist nun nicht zu erwarten, daß diese der lichtoptischen Beobachtung ohne weiteres zugänglich sind, denn sie liegt eine Zehnerpotenz unterhalb der Grenze der Auflösungsfähigkeit des Lichtmikroskops. BECHHOLD und VILLA haben schon vor Jahren eine Methode angegeben, um subvisible Gebilde sichtbar zu machen, so daß auch in unserem Fall die Möglichkeit der Darstellung der Membran nicht ohne weiteres ausgeschlossen werden konnte. Wir haben eben bei den Erythrozyten ganz besonders günstige optische Verhältnisse, indem die Membran als einzig stark definierte und strukturierte Bildung zwischen zwei fast oder ganz homogenen Nachbarbildungen (Stroma der Erythrozyten und umgebendes Plasma; im Falle der gewaschenen Erythrozyten fällt auch letzteres weg) eingefügt ist; bei einer Färbung derselben ist mit einer Überdeckung durch umgebende Strukturen und einer Verwischung nicht zu rechnen, so daß eine scharfe Darstellung erwartet werden kann. Es ist klar, daß uns die erhaltenen Bilder nur das Vorhandensein einer Randstruktur zeigen: über ihre Breite und über den feineren Aufbau läßt uns die lichtoptische Untersuchung völlig im Stich.

Man könnte ferner noch einwenden, daß die dargestellte Struktur uns nur

durch eine Niederschlagsbildung des Farbstoffes vorgetäuscht wird, die sich außen an der Zelle findet und gar nichts mit der Membran zu tun hätte. Soweit uns die bisherigen mikroskopischen Untersuchungen zeigen, handelt es sich um einen sehr feinen, ganz homogenen Saum, der auch unter den verschiedensten Versuchsbedingungen und, soweit er sich darstellt, immer von gleicher Dicke erscheint. Würde es sich um eine Niederschlagsbildung im Sinne Liesegangscher Ringe handeln, dann müßten z. B. bei Verwendung verschiedenster Farbstoffkonzentrationen und Färbedauer Unterschiede in der Ausbildung auftreten, was wir aber stets vermißt haben. Auch folgt die Färbung genau den Konturen des Erythrozyten, z. B. bei seiner Deformierung in die Stechapfelform. Ferner wird das Plasma des Blutes vom Farbstoff nur leicht hellgelb bis hellbräunlich gefärbt und nie bläulich oder blauviolett; das spricht gegen die Annahme, daß es sich um eine Plasmafärbung in den Randgebieten des Erythrozyten handelt.

Ergänzend soll noch bemerkt werden, daß auch das moderne Phasenkontrastverfahren membranähnliche Bildungen bei Erythrozyten sehr klar nachweisen läßt (KÖHLER und LOOS).

Im Zusammenhang mit diesen Fragen haben wir versucht, die Breite der dargestellten Membran zu messen; auch bei Verwendung von langwelligem UV-Licht und maximal schiefer Beleuchtung blieb das Bild dasselbe, so daß wir nur sagen können, daß ihre Dicke sich unter 100μ bewegt, was mit den elektronenoptisch erhaltenen Ergebnissen, wenigstens bezüglich der Grenze nach oben, gut übereinstimmt.

Die weitere Analyse des Färbevorganges hat uns gezeigt, daß derselbe von bestimmten physikalisch-chemischen Eigenschaften der Farblösung abhängt; Einzelheiten über diese Fragen sind einer späteren Mitteilung vorbehalten.

Zusammenfassung

Es gelingt nach einer neuen Methode mit Trypanblau, Nigrosin und alizarinsulfosaurem Natrium die Membran der Erythrozyten darzustellen; die bis jetzt erhaltenen Resultate werden diskutiert.

Literatur

- Bechhold H.* und *Villa L.*, *Biochem. Z.* **165** (1925): 250.
Höber R., *Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe* (1947).
Hollande A. Ch. und *G.*, *Bull. d'Histol.* **20** (1943): 189.
Induni, *Viertel-Jsch. Zürcher Naturforsch. Ges.* **90** (1945): 150, 181.
Köhler A. und *Loos W.*, *Naturwiss.* **29** (1941): 49.
Jung F., *Klin. Wsch.* **21** (1942): 917.
Okajima, *Anatom. Record* **12** (1917); *Fol. anat. japon.* **4** (1926): 411.
Salazar A., *Bull. d'Histol.* **22** (1945): 168.
Tzanck A. und *Dreyfuß A.*, *Hématologie du Practicien* **1**. Baillièrè, Paris, 1938.
Vonwiller P., *Acta Anatom.* **1** (1945): 191; *Corona Amicorum* **33**. Tschudy-Verlag, St. Gallen, 1948.
Wolpers C., *Klin. Wsch.* **18** (1939): 1077, 1111; **19** (1940): 695; *Naturwiss.* **29** (1941): 416.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik](#)

Jahr/Year: 1949

Band/Volume: [4](#)

Autor(en)/Author(s): Vonwiller Paul, Bruman Franz

Artikel/Article: [Zur Frage der färberischen Darstellung der Erythrozyten-Membran. 22-27](#)