

In addition, Katz et al.⁸ proposed that chlorophyll in hexadecane solutions represents one of the possible states of the pigment in a bilayer, namely the distribution of Chl-a oligomers between the hydrocarbon moieties of membrane lipids. If this arrangement simulates the state of chlorophylls in phospholipid vesicles, one expects to obtain identical values for the rate constants of Chl-a reactions with piperidine¹³ in hexadecane and in a bilayer. However, the table shows that the reaction rates in phosphatidylcholine (PC) vesicles in the form of pseudo-first-order rate constants k' exceed by a factor of about 2.7 the values obtained in hexadecane. In this connection, it can be shown¹⁴ that the rate constant of reaction of uncharged particles in condensed media is given by the expression $k = 8 RT / 3000 \eta M^{-1} \text{ sec}^{-1}$, which is one form of Smoluchowski's equation¹⁵ where R is the molar gas constant and η is the viscosity of the medium. The equation indicates that the rate constant decreases as the viscosity increases. One may conclude, therefore, that the porphyrin environment in the vesicle membrane is more fluid than

in hydrocarbon phases like a hexadecane solution, or the centre of a lipid bilayer. The results suggest further that in PC vesicles and in BLM the Chl-a porphyrin is exposed – to an extent yet undetermined – to the water embedded on the outer and the inner faces of the vesicle bilayer. These interpretations are in good agreement with viscosities of 17 to 32 centipoise (cP) which prevail at the annular region of lipid micelles and 2.98 cP for liquid n-hexadecane at 27°C¹⁶, compared with a viscosity value of 0.8513 cP for water at the same temperature.

- 13 F. C. Pennington, N. B. Böttcher and J. J. Katz, *Bioorg. Chem.* 3, 204 (1974).
- 14 E. A. Moelwyn-Hughes, in: *The Chemical Statics and Kinetics of Solutions*, chap. 5. Academic Press, London and New York 1971.
- 15 M. V. Smoluchowski, *Z. phys. Chem.* 92, 129 (1917).
- 16 M. Shinitzky, A.-C. Dianoux, C. Gitler and G. Weber, *Biochemistry* 10, 2106 (1971).

Methodische Untersuchungen zur Messung der Erythrozytenverformbarkeit (Filtrabilität, Flexibilität, Fluidität) in Abhängigkeit der Plasmaviskosität, der Plasma-Proteine, des Hämatokrits, des Filtrationsdruckes sowie der Osmolarität

Methodical investigations concerning the measurement of red cell deformability dependent on plasma viscosity, plasma proteins, hematocrit, filtration pressure as well as osmolarity

H. Leonhardt und I. Reinhardt

Medizinische Klinik und Poliklinik im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin, Hindenburgdamm 30, D-1000 Berlin (West) 45, 24. August 1976

Summary. The measurement of red cell deformability (flexibility or fluidity) according to the method of filtration strongly depends on the suspension medium, the hematocrit, filtration pressure as well as osmolarity and is hard to differentiate over the influence of red cell aggregation. Therefore, data concerning the flexibility of red cells have to be established under standardized conditions, e.g. suspension medium, such as albumin, stabilized hematocrit, constant osmolarity and pressure.

Neben der Bestimmung der Vollblut- und Plasma-Viskosität, dem Hämatokrit und der Erythrozytenaggregation ist die Messung der Erythrozyten-Verformbarkeit ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Fließeigenschaft des Blutes. Da bisher ein breites methodisches Spektrum von der Filtration ungerinnbar gemachten Vollblutes durch einfache Filter bis zu dem Versuch, möglichst den isolierten Erythrozyten durch eine grössenmässig definierte Pore oder Kapillare zu filtrieren und die Formveränderungsfähigkeit pro Zeiteinheit zu registrieren, besteht, sollten systematische messtechnische Untersuchun-

gen mit dem Filtrationsgerät nach Schmid-Schönbein durchgeführt werden¹⁻⁷. Ziel der Untersuchung sollte es sein, Möglichkeiten und Grenzen dieser Methodik aufzuzeigen, dargestellt an der Reproduzierbarkeit, der Abhängigkeit der Messung vom Hämatokrit, der Plasmaviskosität, den Plasma-Proteinen, dem Druck und der Osmolarität.

Material und Methodik. Alle Filtrationsmessungen wurden mit der Apparatur nach Schmid-Schönbein⁷ durchgeführt⁸. Filtriert wurde mit Sartorius-Filtern, Typ SM 11 301, mit einem Porendurchmesser von 8,0 µm bei einem

Darstellung der Messergebnisse zur Reproduzierbarkeit der Erythrozytenfiltration für Erythrozytensuspensionen in Plasma und Serum bei unterschiedlichen Hämatokritwerten

Probe	Hämatokrit (Vol.-%)	Mittelwert (sec)	Standard-abweichung (sec)	Variations-koeffizient (s_D in Prozent)
I Plasma	7,3	41	± 9,3	23
Serum	7,5	11	± 2,6	23
II Plasma	13,6	61	± 7,1	12
Serum	12,8	37	± 13,7	37
III Plasma	27,9	152	± 46,9	32
Serum	27,1	111	± 26,6	25

- 1 D. Braasch, *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 329, 167 (1971).
- 2 A. M. Ehrly und P. Rossbach, in: *Erythrozytes, Thrombozytes, Leukozytes*. Hrsg. E. Gerlach, K. Moser, E. Deutsch und W. Willmann. Thieme, Stuttgart 1973.
- 3 F. Gramlich, in: *Die angiologische Bedeutung der Mikrozirkulation, Herrenalber angiologisches Gespräch 1971*. Hrsg. S. Witte, G. Witzstrock, Baden-Baden-Brüssel 1973.
- 4 P. L. La Celle, *Blood Cells* 1, 269 (1975).
- 5 H. L. Reid, A. J. Barnes, P. J. Lock, J. A. Dormandy und T. L. Dormandy, *J. clin. Path.* (im Druck).
- 6 W. Schlick und H. Schmid-Schönbein, *Blood Cells* 1, 333 (1975).
- 7 H. Schmid-Schönbein, J. Weiss und H. Ludwig, *Blut* 6, 369 (1973).
- 8 Der Erwerb eines entsprechenden Gerätes wurde uns freundlicherweise durch die Universität München ermöglicht.

Druck von 10 cm Wassersäule und einer Probenmenge von 0,2 ml. Jede Probe wurde der Anordnung des Gerätes entsprechend 6mal bei Raumtemperatur filtriert. Als Mass der Erythrozytenverformbarkeit wurde die Durchlaufzeit der Probenmenge in Sekunden gemessen. Der Mittelwert dieser 6 Messungen wurde für die weiteren Berechnungen herangezogen.

Um eine Beeinflussung der Filtration durch weisse Blutkörperchen, Thrombozyten und Proteinpräzipitate weit-

gehend auszuschliessen, wurde das Suspensionsmedium bzw. das Plasma vor Verwendung durch Milliporefilter mit einem Porendurchmesser von 1,2 μm vorfiltriert. Zum endgültigen Ansatz der zu messenden Proben wurden dann die Erythrozyten 3mal mit diesem Suspensionsmedium gewaschen.

Die Hämatokritmessungen erfolgten nach der Mikrohämatokritmethode (2400 Umdrehungen/min über 2 min). Bei allen Proben wurde versucht, die Hämatokriteinstellung auf exakt 5 Vol.-% durchzuführen. Kontrollmessungen nach der Einstellung ergaben Werte, die zwischen 4,9 und 5,1 Vol.-% lagen. Zu jeder Versuchsanordnung wurde das Blut von 5 gesunden Probanden (Nichtraucher, Normgewichtige mit laborchemisch ausgeschlossenen manifestem Diabetes mellitus, ausgeschlossener Hyperlipoproteinämie bzw. pathologischen Veränderungen in der Elektrophorese und normaler BSG) benutzt und nach entsprechender Vorbereitung vermessen. Zur Untersuchung der Abhängigkeit der die Plasmaviskosität bestimmenden Parameter wurden die Erythrozyten in Albumin-, Fibrinogen- und Gamma-Globulin-Suspensionen ansteigender Konzentrationen untersucht. Zur Überprüfung der Abhängigkeit von der Albuminkonzentration konnten die Erythrozyten direkt in einer Albuminlösung unterschiedlicher Konzentration suspendiert und vermessen werden. Zur Messung der Abhängigkeit von der Gamma-Globulin-Konzentration musste dem jeweiligen Serum der Probanden eine unterschiedliche Gamma-Globulin-Konzentration hinzugegeben werden, da es nicht gelang, eine reine Globulinsuspension herzustellen. Hierdurch konnte weitgehend auch eine wechselseitige Beeinflussung mit dem Fibrinogen ausgeschlossen werden. Zur Untersuchung des Einflusses des Fibrinogens wurden Erythrozyten in einer Fibrinogenlösung ansteigender Konzentration suspendiert. Um die hierbei gewonnenen Ergebnisse zu unterstützen, wurden in einem Zusatzversuch mit Plasma- und Serumsuspensionen physiologische Kochsalzlösungen in zunehmender Verdünnung zugesetzt und vermessen. Zur Messung der Hämatokritabhängigkeit wurden unterschiedliche Hämatokritkonzentrationen mit autologem Plasma eingestellt und vermessen. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde Plasma und Serum mit unterschiedlichem Hämatokrit je Probe 30mal hintereinander vermessen. Zur Darstellung der Abhängigkeit der Erythrozytenverformbarkeit von der Osmolarität wurden durch die Zugabe von Kochsalz Erythrozytensuspensionen unterschiedlicher Osmolarität hergestellt.

Ergebnisse. Die gefundenen Ergebnisse bezüglich der Reproduzierbarkeit, der Abhängigkeit der Filtrabilität von der Albumin-, Gamma-Globulin-, und Fibrinogen-Konzentration, vom Hämatokrit sowie vom Druck und der

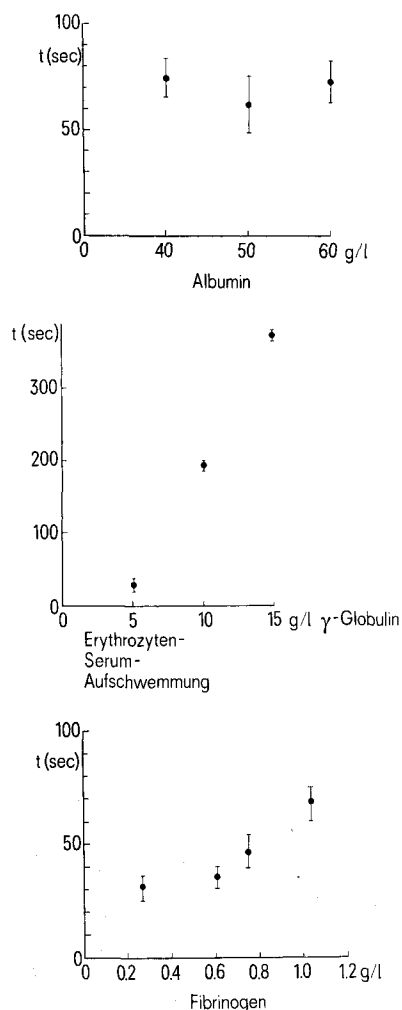


Fig. 1. *a* Veränderungen der Filtration einer Erythrozytenaufschwemmung im Suspensionsmedium Albumin, *b* Gamma-Globulin, *c* Fibrinogen in Abhängigkeit der Konzentration.

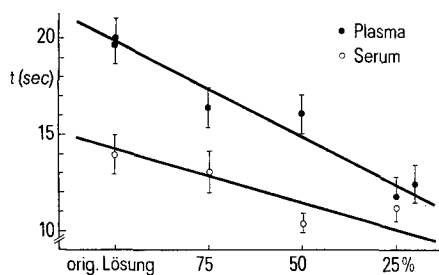


Fig. 2. Veränderungen der Erythrozytenfiltration (HK 5%) mit zunehmender Verdünnung des Suspensionsmediums (Plasma und Serum) mit physiologischer Kochsalzlösung.

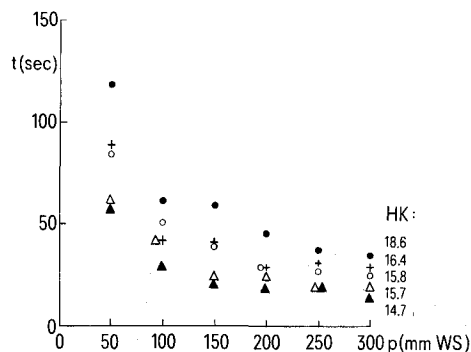


Fig. 3. Veränderungen der Erythrozytenfiltration (Erythrozyten-Plasma-Suspension bei unterschiedlichen Hämatokritwerten) in Abhängigkeit des Filtrationsdruckes (p) in mm-Wassersäule.

Osmolarität sind in der Tabelle und in den Figuren 1–5 dargestellt.

Diskussion. Plasmaviskosität. Ziel der Flexibilitätsmessungen sollte es sein, objektiv reproduzierbare Methoden, die allein die Verformbarkeit der Einzelerthrozyten messen, zu suchen. Die Ergebnisse über die Abhängigkeit der Plasmaviskosität zeigen insbesondere beim Fibrinogen und Gamma-Globulin, dass die Plasmaviskosität bzw. das Suspensionsmedium die Messung der Erythrozytenverformbarkeit bzw. die -filtrabilität mit beein-

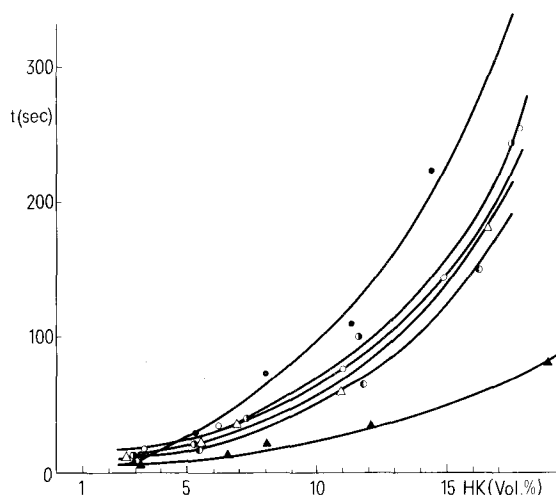


Fig. 4. Veränderung der Erythrozytenfiltration in Abhängigkeit der Erythrozytenanzahl, dargestellt am Hämatokrit.

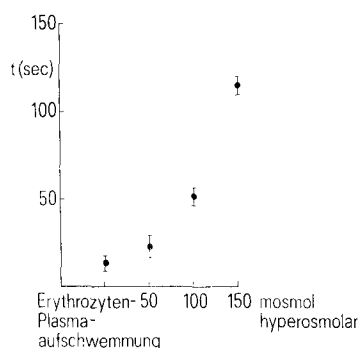


Fig. 5. Veränderung der Erythrozytenfiltration in Abhängigkeit der Osmolarität.

flusst. Überlegungen hierzu könnten auf einen Schmier-effekt der Plasmaproteine hindeuten, die es den Erythrozyten z.B. bei einer bestimmten Konzentration eines Plasmaanteils unabhängig von ihrer Verformbarkeit ermöglichen, schneller und besser durch die Poren zu treten.

Auch aus messtechnischen Gründen muss auf die Bedeutung der Viskosität des Suspensionsmediums hingewiesen werden, da bei zu niedriger Viskosität dieses schneller durch die Filter gepresst wird und es zu einer relativen Erythrozytenvermehrung im Restfiltrat und damit zu einer relativen Erythrozytenvermehrung im Restfiltrat und damit zu einer Hämatokriterhöhung kommt, während umgekehrt bei zu hoher Viskosität die Verformungsgeschwindigkeit der Erythrozyten grösser als die Filtrationsgeschwindigkeit des Suspensionsmediums sein kann und der Erythrozyt hierdurch gebremst wird. Angaben über die Erythrozytenflexibilität, bei denen die Grösse der Plasmaviskosität fehlt oder variiert, sind daher nur eingeschränkt zu verwenden.

Hämatokrit. Unter dem Gesichtspunkt des Hämatokritwertes sollte es das Ziel einer Flexibilitätsmessmethode sein, einen Hämatokritwert zu finden, bei dem die Erythrozyten möglichst als Einzelerthrozyten vorliegen und desaggregiert sind. Die Ergebnisse der exponentiell verlaufenden Kurve in Abhängigkeit ansteigender Hämatokritwerte deuteten darauf hin, dass mit zunehmendem Hämatokrit der Filtrationsdruck (s. Methodik) nicht allein für die Verformbarkeit des Einzelerthrozyten, sondern zusätzlich für die vorher notwendige Desaggregation aggregierter Erythrozyten erforderlich ist.

Druck. Der Druck, mit dem Erythrozytensuspensionen filtriert werden, sollte möglichst im physiologischen Bereich liegen. Darüber hinaus sollten die Druckwerte aus messtechnischen Gründen auch in einem Bereich liegen, in dem weder der Filter noch die Erythrozyten unphysiologisch verformt werden, d.h. gepresst oder gar zerstört. Zusätzliche Messung von Parametern, die eine Hämolyse (α -HBDH, freies Hämoglobin, Hämatokrit) der Suspensionen vor und nach der Filtration anzeigen, zeigten bei den von uns untersuchten und angewendeten Druckwerten beim Hämatokrit zwischen 5 und 15 Vol.-% keinen Hinweis auf eine Erythrozytenzerstörung.

Aus dem Dargelegten muss man insgesamt den Schluss ziehen, dass bei Messmethoden, bei denen z.B. Originalblut mit der Fragestellung nach der Erythrozytenflexibilität vermessen wird, die Grösse der Erythrozytenaggregationstendenz sowie der unterschiedliche Effekt der Plasmaproteine bzw. der Plasmaviskosität die Aussage über die Verformbarkeit des Einzelerthrozyten erheblich einschränken.

Histoautoradiographic demonstration of cytoplasmic DNA synthesis in the cells from human ascitic fluid cultivated in vitro

V. Gotzos and Bona Cappelli-Gotzos

Department of Histology and General Embryology, University of Fribourg, CH-1700 Fribourg (Switzerland), 22 July 1976

Summary. Cells of human ascitic fluid, cultivated in vitro, showed an activity of cytoplasmic DNA synthesis apparently non-concomitant with a nuclear DNA synthesis.

Cells from ascitic fluid of patients suffering from a cirrhosis of the liver are cultivated in our laboratory. These cells can live in vitro, under our working conditions, 4–5 months¹. The incubation was regularly done with tritiated thymidine (Amersham, spec. act.: 5000 mCi/mmol) after 2 months of culture (0.5 μ Ci/ml of medium: 90% 199 Difco, 10% calf serum, 50 IU/ml penicillin, 50 μ g/ml

streptomycin). After 30 min incubation at 38°C with the radioactive medium (2 ml each Leighton), the cells were washed 3 times with a serum-free medium at 38°C, the cells remained in the third washing medium 40 min at

1 V. Gotzos, R. Bovet, B. Cappelli-Gotzos and G. Conti, 38^e réunion des Anatomistes Suisses, Fribourg 1975.