Naturwissenschaften 61, 260—266 (1974) © by Springer-Verlag 1974

Die elektrische Volumenmessung von Blutzellen bei der Erythropoese, bei Rauchern, Herzinfarkt- und Leukämiepatienten sowie von Leberzellkernen

G. Ruhenstroth-Bauer, G. Valet, V. Kachel und N. Boss

Max-Planck-Institut für Biochemie,
Abteilung für experimentelle Medizin, Martinsried bei München

The use of an improved electrical particle-sizing apparatus has enabled different erythrocyte populations to be demonstrated in newborn rats, mice, and guinea pigs. An increased tendency toward aggregation of erythrocytes was found in patients with myocardial infarction and in smokers. The peripheral blood of patients with leukemia and Hodgkin's disease displayed characteristic changes in the proportion of small lymphocytes and granulocytes. Two further populations of cell nuclei, in addition to di-, tetra- and octoploid cell nuclei, were distinguished in rat liver.

Vor genau 300 Jahren [1] wurde das erste Mal eine Messung vorgenommen, aufgrund derer sich das Volumen einer biologischen Zelle bestimmen ließ: Im Jahre 1674 schätzte Antoinie van Leeuwenhoek das Volumen eines menschlichen roten Blutkörperchens aufgrund mikroskopischer Durchmesserbestimmungen auf etwa 1/25 000 des Volumens eines Vergleichssandkorns. Leeuwenhoek nahm dabei an, daß die Blutkörperchen Kugelform hätten. Es läßt sich rückrechnen, daß das Sandkorn einen Durchmesser von etwa 0,3 mm besaß. Damit tauchte schon damals das Problem der Eichung der Bestimmungsmethode auf, das heute noch so manche Schwierigkeiten bereitet.

Seit diesem Anfang ist die Zahl der Bestimmungen des Volumens von Zellen und Zellbestandteilen bzw. der Volumenverteilung solcher Populationen sehr angestiegen. Trotzdem war dies bis vor kurzem immer noch Sache von Spezialisten, da die Methoden oft mühsam und ungenau waren. Gewöhnlich wurde das Volumen mit Hilfe des Mikroskops bestimmt. Dies erfordert jedoch einen hohen Zeitaufwand; außerdem sind die Messungen häufig nur von beschränkter Genauigkeit. Dagegen kann man wesentlich genauer und verläßlicher Partikelvolumen messen, wenn man unter Beachtung bestimmter, später gefundener Voraussetzungen [2—4] ein von Coulter angegebenes [5] elektrisches Meßverfahren verwendet.

Methodische Voraussetzungen

Das Coulter'sche Meßsystem [5, 6] besteht im wesentlichen aus zwei Elektrolyt-gefüllten, mit Elektroden versehenen Behältern, die durch eine kleine, meist zylindrische Öffnung miteinander verbunden sind. Ein Druckgefälle treibt den Elektrolyten des einen Behälters, in dem die zu untersuchenden Teilchen suspendiert sind, durch die Öffnung in den anderen Behälter. Gleichzeitig fließt ein konstanter elektrischer Strom durch die Meßöffnung. Partikel, deren elektrischer Widerstand wesentlich anders als der des Elektrolyten ist, rufen bei ihrem Durchtritt durch die Meßöffnung eine elektrische Widerstandsänderung hervor, die als impulsförmige Änderung der Spannung an den Elektroden meßbar wird. Die Höhe dieser Impulse ist der grundlegende Parameter für das Partikelvolumen. Den Meßwerten kann aber nur unter bestimmten Voraussetzungen ein definiertes Absolutvolumen zugeordnet werden [3, 4, 7—9].

Aus einer von Maxwell [10] angegebenen mathematischen Beziehung läßt sich das Volumen von Körpern berechnen, die in einem Elektrolyten suspendiert sind. Durch Umformen der Maxwellschen Beziehung erhält man einen Faktor, der für nichtleitende Kugeln den Wert 1,5 annimmt und den man als Formfaktor bezeichnet. Diesem Formfaktor wurde bei der Volumenmessung mit dem Coulter-Verfahren früher kaum Beachtung geschenkt. Er besagt, daß Teilchen mit gleichem Volumen, aber unterschiedlicher Form verschiedene Meßwerte zeigen und Teilchen gleichen Volumens und gleicher, aber nicht kugeliger Form beim Durchlaufen der Meßkapillare mit unterschiedlicher Orientierung verschiedene Meßwerte ergeben. Für genaue Volumenmessungen ist es also notwendig, Form bzw. Verformung und Orientierung der Meßpartikel unter der hohen hydrodynamischen Beanspruchung in der Meßöffnung zu kennen. Durch Photographieren mit Belichtungszeiten im ns-Bereich gelang es, Zellen bei der Passage von Meßöffnungen scharf abzubilden [9, 11, 12]; eine Partikel-Triggerung erlaubte eine vom Teilchen selbst beim Durchtritt durch die Meßöffnung ausgelöste Belichtung.

Im wesentlichen ergab sich: Es besteht ein großer Unterschied im Verhalten kernhaltiger und kernloser Zellen unter der hydromechanischen Beanspruchung in der Meßöffnung. Kernlose Säugererythrozyten werden zu torpedoförmigen Strömungskörpern verformt, die sich im Strömungskern der Meßöffnung mit ihrer Längsachse in Strömungsrichtung ausrichten (Fig. 1, unterer Strahl). Man kann ihnen also einen Formfaktor nahe 1 zuordnen. Auf Bahnen in der Wandzone der Meßöffnung können dagegen Umorientierungen auftreten, die als formfaktorbedingte Zwischengipfel der elektrischen Impulse sichtbar werden. Änderungen in der Umwelt der Erythrozyten können nicht nur die Ruheform dieser Zellen, sondern auch ihre Verformbarkeit ändern (Fig. 1, oberer Strahl, hypertone Lösung). Bei kernhaltigen Zellen konnte dagegen keine wesentliche Verformung festgestellt werden (Fig. 2b). Eine weitere bis vor wenigen Jahren unbekannte Quelle für Meßfehler sind Verzerrungen des elektrischen Feldes in der Meßöffnung. Fig. 3 zeigt die Abhängigkeit von Impulshöhe und -form von der

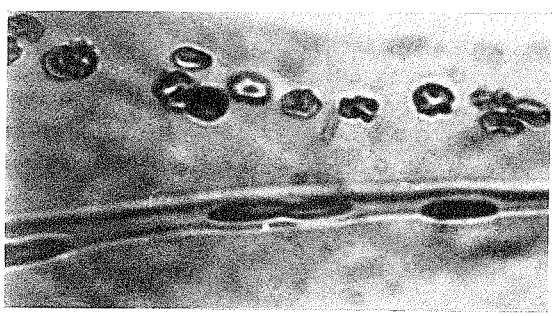

Fig. 1. Die Meßkapillare in Seitensicht. Untere Spur: torpedoförmig verformte native Humanerythrozyten im Eigenplasma, obere Spur: die gleichen Zellen in 1,9 proz. NaCl-Lösung

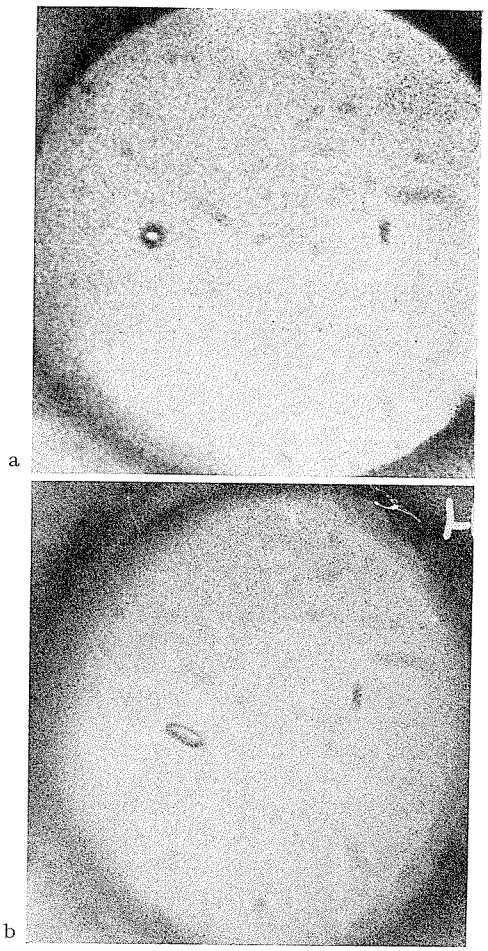

Fig. 2a u. b. Die Meßkapillare in Aufsicht. a Nativer kernloser Humanerythrozyt beim Durchtritt, b nativer kernhaltiger Hühnererythrozyt an gleicher Stelle

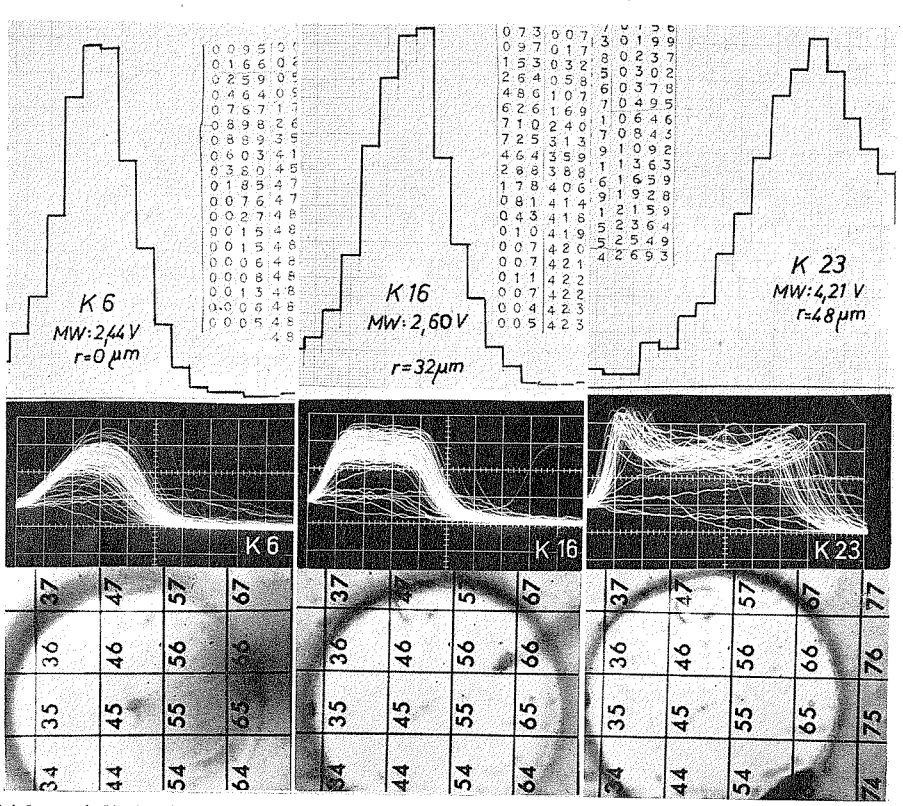

Fig. 3. Unten: Aufsicht auf die Meßkapillare mit Markierung der Zelldurchtrittskanäle, oben: Verteilungskurven von fixierten Humanerythrozyten bei entsprechenden Durchtrittskanälen, mitte: zugehörige Impulsformen

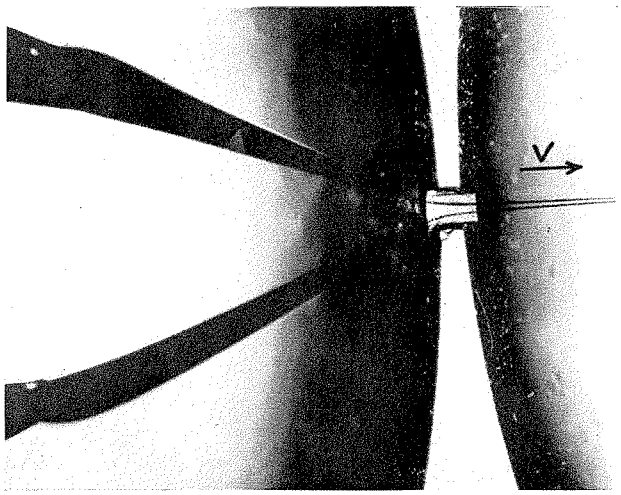

Fig. 4. Meßanordnung in Seitenansicht: gleichzeitige Ausbildung zweier Partikelbahnen in einer Meßkapillare

Partikelbahn. Will man eine gleichmäßige Bewertung aller Teilchen erzwingen, muß man sich auf eine definierte Partikelbahn in der Meßöffnung festlegen und alle Teilchen auf dieser Bahn messen. Diese Bahn kann die Achsenbahn [4] oder eine andere Bahn im Bereich zwischen $r=0$ und $r=R/2$ [11] sein. Eine einstellbare Partikelbahn läßt sich einfach dadurch erzeugen, daß man die Suspension über eine Zuführungsspitze in das partikelfreie Strömungsfeld vor der Meßöffnung einfließen läßt. Die zunehmende Konzentrierung der Stromlinien in der Senkenströmung vor der Meßöffnung zwingt die Teilchen auf die gewünschte eng begrenzte Bahn, deren Lage durch die Eingabestelle der Suspension bestimmt wird (Fig. 4).

Will man anhand der Maxwellschen Beziehung Absolutvolumina berechnen, so ist eine wichtige Voraussetzung, daß in der Meßöffnung ein homogenes elektrisches Feld herrscht. Diese Voraussetzung ist jedoch bei Meßöffnungen, die kürzer sind als ihr Durchmesser, auch in der Nähe der Lochachse nicht mehr erfüllt. Die Teilchen werden kleiner bewertet als in einer gleichen Meßöffnung mit homogenem elektrischem Feld zu erwarten wäre. Diese Unterbewertung konnte durch Modellversuche [9] und Vergleiche mit Absolutmethoden [8] bestimmt werden. Sie erhält ihren Ausdruck in Gleichung (1) durch den Kapillarfaktor.

$$v = V \cdot \frac{\Delta R \cdot k}{R \cdot f} = \frac{\Delta R \cdot r^4 \cdot \pi^2 \cdot k}{\varrho \cdot f} = \frac{u}{D} \cdot \frac{r^4 \cdot \pi^2 \cdot k}{\varrho \cdot f} \quad (1)$$

R = Kapillargrundwiderstand in Ω
r = Radius der Meßöffnung in μm
ΔR = Durch Partikel hervorgerufene Widerstandsänderung in Ω
ϱ = Spez. Widerstand des Suspensionsmediums in $\Omega \cdot \mu$m
k = Kapillarfaktor [8, 9]
f = Formfaktor der Partikel [3, 4, 8—10]
V = Volumen der Meßkapillare in μm^3
v = Partikelvolumen in μm^3
D = Eichfaktor in V/Ω
u = in Spannung umgesetzte Widerstandsänderung (Meßstrom mal ΔR) in V

Für eine Meßkugel mit dem Volumen 1 cm^3 ergab sich in der Modellmeßöffnung von 11 cm Durchmesser und 5,5 cm Länge bei zwangshomogenisiertem Feld ein berechnetes Volumen von 0,99 cm^3, bei natürlichem elektrischem Feld aber nur ein Wert von 0,78 cm^3, also eine Unterbewertung von 22%. Durch einen Kapillarfaktor von $k = 1/0{,}78 = 1{,}28$ wird für eine Meßöffnung von $l/d = 1/2$ in der Formel diese Unterbewertung korrigiert.

Bei den bisherigen Betrachtungen wurde vorausgesetzt, daß die Meßpartikel eine vernachlässigbare Leitfähigkeit besitzen. Die Leitfähigkeit der Teilchen läßt sich sehr einfach mit dem Coulter-Verfahren feststellen. Kriterium dafür ist die Polarität der von der Widerstandsänderung hervorgerufenen Impulse: So lange man auf einem angeschlossenen Oszillographen positive Impulse beobachten kann, hat bei jedem Partikeldurchtritt der Gesamtwiderstand der Meßöffnung zugenommen; die Leitfähigkeit des Teilchens war also geringer als die des Suspensionsmediums, dessen Leitfähigkeit sich einfach bestimmen läßt. Erst wenn durch Verändern der Leitfähigkeit des Suspensionsmediums die positiven Impulse zum Verschwinden gebracht werden, entspricht die Leitfähigkeit des Partikels der des Suspensionsmediums. Diese Methode arbeitet allerdings nur zuverlässig bei Partikeln, in deren Innerem wie im Suspensionsmedium Ionenleitung herrscht, sie versagt z.B. bei Metallpartikeln. Besitzen die Teilchen eine nicht mehr vernachlässigbare Leitfähigkeit, gilt Gl. (1) nicht mehr. Man muß dann zur Volumenberechnung auf die unverkürzte Maxwellsche Beziehung zurückgreifen [10].

Die Volumenverteilungskurven von Partikelpopulationen, bei denen durch mikroskopische Messung bekannt war, daß sie normalverteilt sind, zeigten bei Messung mit dem ursprünglichen Coulterschen Verfahren eine deutliche Rechtsschiefe. Erst als durch systematische Versuche gezeigt werden konnte, daß die Volumenbewertung von Partikeln abhängig von ihrer Bahn durch die Meßkapillare ist [2—4, 11], war der Nachweis für den apparativen Ursprung der Rechtsschiefe geführt. Mit Partikelstrahl- [9, 11] und Zentralstrahlkapillaren [3, 4] wurde diese Erkenntnis für die praktische Messung zugänglich gemacht. Am Beispiel der Erythrozyten zeigte sich, daß nunmehr mit der mikroskopischen und elektrischen Volumenmessung grundsätzlich gleichwertige Ergebnisse zu erzielen sind. Der wesentliche Vorteil der elektrischen Messung besteht in der weitaus größeren Meßgeschwindigkeit, die in der Größenordnung von 1000 Partikel/sec liegen kann. Die elektrische Volumenmessung ist auch einfacher durchführbar und von hoher Genauigkeit. Die Erfordernisse an das Untersuchungsgut sind bescheiden. Die Partikel sollten einzeln vorliegen; eine einfache Volumenberechnung ist dann möglich, wenn ihr spezifischer elektrischer Widerstand 50—100mal größer ist als der des Suspensionsmediums. Diese Forderung ist nach unserer bisherigen Erfahrung bei verschiedenen Zellen und auch bei Zellkernen erfüllt. Durch die Fortschritte auf dem Gebiet der Einzelzellgewinnung aus Organen durch enzymatischen Aufschluß mit Collagenase, Hyaluronidase oder Trypsin ist das elektrische Volumenmeßverfahren im Gegensatz zu früher nicht mehr auf frei vorkommende Zellpopulationen beschränkt. Mit den meist verwendeten Meßkapillaren von 20—200 μm Durchmesser kann, angefangen von Bakterien bis zu großen Zellen, ein weiter Partikelgrößenbereich erfaßt werden.

Biologische und medizinische Ergebnisse

Das Volumen ist eine charakteristische Kenngröße von Zellen und Zellkernen, die im Laufe des Lebens nicht konstant bleiben muß; durch Wachstum, Differenzierung, Krankheit oder experimentelle Eingriffe können Veränderungen auftreten. Es ist von

 © by Springer-Verlag 1974

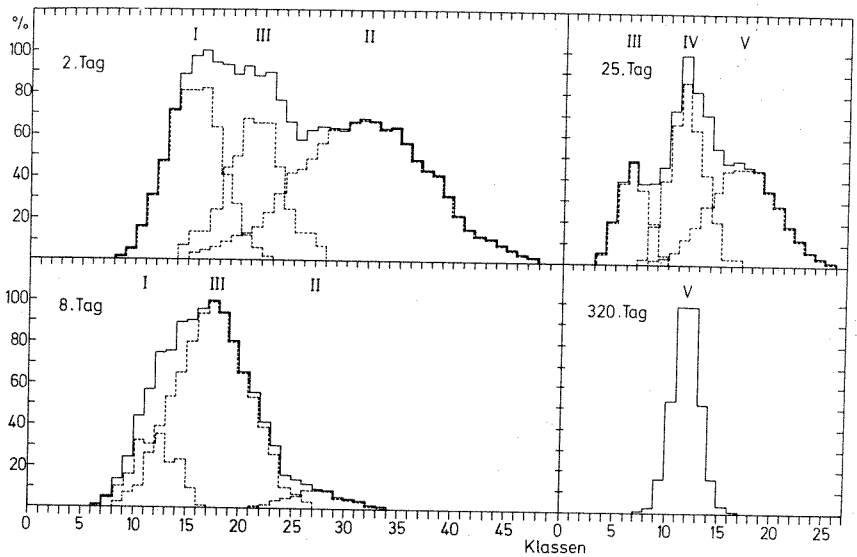

Fig. 5. Analysierte Volumenverteilungskurven von Ratten-Erythrozyten an verschiedenen Tagen nach Geburt (s. Text). Die Kurven sind für die Ordinate auf den häufigsten Wert (= 100 %) normiert. Die Klassenbreite auf der Abszisse wurde durch Eichung zu $5{,}49 \pm 0{,}14\ \mu m^3$ bestimmt

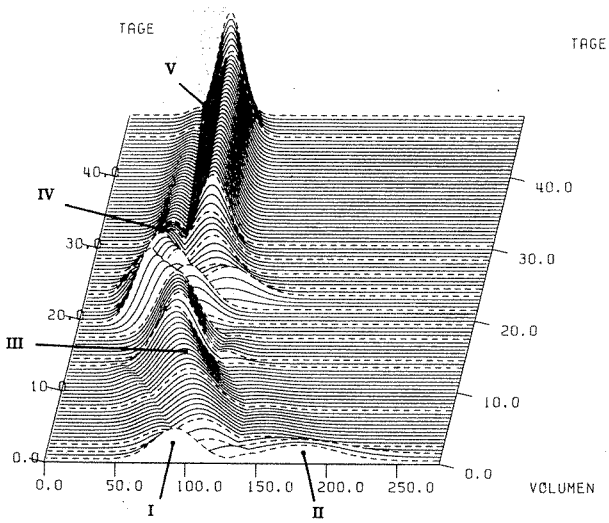

Fig. 6. Räumliche Darstellung der an verschiedenen Tagen nach Geburt gemessenen und analysierten Volumenverteilungskurven (gestrichelt) von Ratten-Erythrozyten. Zur Verbesserung des räumlichen Eindrucks sind zwischen den gemessenen linear interpolierte Kurven (durchgezogen) eingefügt (Volumen in μm^3)

biologischem Interesse, experimentell gefundene Volumenverteilungen von Partikelbevölkerungen auf einfache Verteilungsfunktionen wie etwa die lineare oder logarithmische Normalverteilung zurückzuführen. Ist eine Volumenverteilungskurve dadurch entstanden, daß eine Mischung verschiedener Partikelpopulationen mit unterschiedlichem Mittelwert, Anteil und Streuung gemessen wurde, so ist man bestrebt, aus der Gesamtverteilung die Einzelverteilungen durch Analyse zu ermitteln. Der Verteilungstyp und der Anteil von Teilverteilungen an der Gesamtverteilung können entweder graphisch mit Hilfe von Wahrscheinlichkeitspapieren [13] oder rechnerisch durch elektronische Datenverarbeitung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate [14] bestimmt werden. Im folgenden soll an einigen Beispielen das Ergebnis der Messung und Analyse von Volumenverteilungskurven von Zellen und Zellkernen beschrieben werden, die mit Hilfe des verbesserten elektrischen Volumenmeßverfahrens gewonnen wurden.

Bei Erythrozyten der *erwachsenen* Ratte [13] ergibt die Messung und Analyse der Volumenverteilungskurve ebenso wie bei Maus [15], Meerschweinchen [16], Kaninchen, Schaf und Mensch eine einzige einheitliche und linear normalverteilte Erythrozyten-Population. Erythrozyten *neugeborener* und *junger* Ratten verhalten sich dagegen anders [13], wie in Fig. 5 an einigen Kurvenbeispielen gezeigt ist. In der Gesamtverteilung lassen sich mehrere Volumengipfel unterscheiden. Die Analyse ergibt während des Heranwachsens der Ratte fünf volumenmäßig verschiedene normalverteilte Erythrozyten-Populationen (Fig. 6). Zwei (I und II)[1] sind bei der Geburt vorhanden. Eine weitere (III) bildet sich in den ersten Tagen danach aus. Um den 20. Tag verschwindet sie und macht zwei neuen Populationen (IV und V) Platz, von denen die Population V im späteren Leben der Ratte allein fortbesteht.

Eine Reihe von Einwänden gegen die Analyse lassen sich entkräften.

1. Vom mathematischen Gesichtspunkt läßt sich jede experimentell ermittelte Volumenverteilungskurve um so besser annähern, je mehr Populationen man annimmt. Dem steht jedoch bei einer Vielzahl von ausgewerteten Kurven deren biologischer Zusammenhang entgegen. Das mathematische Ergebnis hat nur dann eine Berechtigung, wenn es in der Zeitabfolge Kontinuität bezüglich Anzahl der Populationen, deren mittleren Absolutvolumen, ihres Anteils an der Gesamtverteilung und schließlich ihrer Variationskoeffizienten aufweist. Unterstützt wird eine derartige Analyse weiter durch die Messung anderer, von der Volumenmessung unabhängiger Parameter, im vorliegenden Fall z.B. Größen, die sich zu Zeiten der Neubildung und des Verschwindens von Erythrozyten-Populationen ebenfalls charakteristisch verändern [13].

2. Gegen die Entstehung der verschiedenen Erythrozyten-Populationen aufgrund von Wirkungen des Suspensionsme-

1 Die Numerierung der Erythrozyten-Populationen entspricht deren zeitlichem Auftreten. Aus diesem Grunde wurden die ursprünglichen Benennungen II und III [13] vertauscht.

diums auf die Erythrozyten spricht, daß die Kurvenform bei Messung in Eigenplasma, Mischplasma, Pufferlösung und auf- und absteigenden Pufferreihen erhalten bleibt.

3. Gegen einen methodischen Artefakt bei der Messung selbst spricht, daß der spezifische Widerstand aller Erythrozyten größer als 8 kΩcm ist. Dadurch ist eine Erklärung verschiedener Erythrozyten-Populationen aufgrund unterschiedlichen elektrischen Widerstands ausgeschlossen.

4. Die Erythrozyten werden weiterhin beim Durchtritt durch die Meßöffnung gleichartig verformt. Der Formfaktor beträgt etwa 1,05, so daß die Entstehung verschiedener Populationen aufgrund unterschiedlicher Formfaktoren unwahrscheinlich ist. Außerdem wurden keine Anzeichen für die Entstehung der Populationen infolge von transzellulären Ionenströmen [17] gefunden. Für die biologische Realität der verschiedenen Erythrozyten-Populationen sprechen auch Untersuchungen des Knochenmarks: Zur Zeit der Neuentstehung von Erythrozyten-Populationen zeigen sich dort charakteristische Veränderungen [18]. Messungen bei der Maus [15] und beim Meerschweinchen [16] ergeben, daß auch hier im peripheren Blut mehrere Erythrozyten-Populationen in der Neugeborenenphase auftreten. Beim Menschen schließlich fanden sich in der frühen Fetalperiode ebenfalls Anzeichen für die Existenz verschiedener, volumenmäßig unterscheidbarer Erythrozyten-Populationen [16].

Es ist von großer Bedeutung, ob die verschiedenen Erythrozyten-Populationen von verschiedenen Organen erzeugt werden oder ob es sich um einen zeitgesteuerten Vorgang handelt, der dazu führt, daß ein Organ nacheinander verschiedene Erythrozyten-Populationen produziert. Untersuchungen sprechen dafür, daß zu bestimmten Zeiten der Entwicklung beides möglich ist [18]. Zusammenfassend scheint es sich nach den bisherigen Befunden beim Auftreten verschiedener Erythrozyten-Populationen im Laufe der Säugerentwicklung um ein allgemeineres Phänomen zu handeln.

Es wurde auch untersucht, ob sich die Abfolge der verschiedenen Erythrozyten-Populationen durch experimentelle Eingriffe im späteren Leben wiederholen läßt. Dazu wurden Ratten mit 600 R bestrahlt. Dadurch kommt es im Knochenmark zu einem etwa zweiwöchigen Produktions- und Ausschüttungsstopp von Erythrozyten [19]. Danach setzt eine überstürzte Produktion von Erythrozyten ein. Zur selben Zeit wie die Retikulozytose im Blut, die ein Maß für die Ausschüttung junger Erythrozyten ins periphere Blut ist, entsteht eine neue Erythrozyten-Population *M*, deren mittleres Volumen größer ist als das der bereits vorhandenen Erythrozyten (Fig. 7). Das mittlere Volumen der Population *M* sinkt so wie die mittleren Volumina der Erythrozyten jugendlicher Ratten [13] mit der Zeit ab [20], erreicht jedoch nicht das Volumen der übrigen Erythrozyten. Für eine Umwandlung in die normale Erythrozyten-Population ergeben sich demnach keine Anhaltspunkte, etwa aufgrund einer Linksschiefe der großen oder einer Rechtsschiefe der kleinen Erythrozyten-Population. Ob es sich bei der Population *M* um das vorübergehende Auftreten einer früheren Population handelt, ist unsicher.

Die Messung der Volumenverteilung der Erythrozyten hat medizinisch wichtige Ergebnisse geliefert. Aufgrund rheologischer Untersuchungen war vermutet worden [21], daß bei konventionell behandelten Herzinfarktpatienten und Rauchern eine erhöhte Aggregationsneigung der Erythrozyten besteht. Dies konnte durch die Messung der Volumenverteilungskurven der Erythrozyten experimentell bestätigt werden [22]. Hierfür wurden die Zellen im Eigenplasma des Patienten in geringer Konzentration unter genormten Bedingungen inkubiert. Die zeitabhängige Erythrozyten-Aggregation wurde im Volumenmeßgerät nach 5 min gemessen (Tabelle 1, Fig. 8). Die Untersuchungen weisen weiter darauf hin, daß eine Kortikoid- oder Colfarit®-Behandlung die erhöhte Aggregationsneigung der Erythrozyten von Herzinfarktpatienten vermindert. Auch zeigen sonst gesunde starke Raucher gegenüber Normalprobanden eine erhöhte Aggregationsneigung der Erythrozyten. Die Ergebnisse geben vielleicht eine Möglichkeit, mit einer schnellen und relativ einfachen Methode frühzeitig eine Herzinfarktgefährdung zu erkennen, sowie eine Erklärung für die erhöhte Infarktgefährdung von starken Rauchern.

Auch Leukozytenaufschwemmungen sind der elektrischen Volumenmessung zugänglich [23]. Gutartige

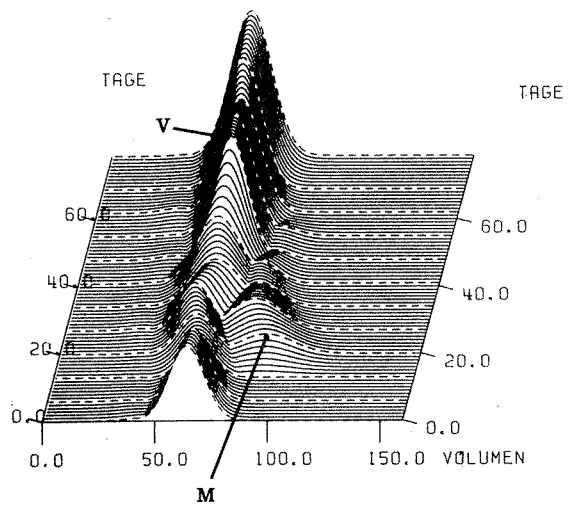

Fig. 7. Die Volumenverteilungskurven von Ratten-Erythrozyten nach 600 R Röntgenganzkörperbestrahlung. Die räumliche Darstellung entspricht Fig. 6

Tabelle 1. Aggregationsneigung von Humanerythrozyten

Untersuchte Gruppen	Erythrozyten-Aggregations-Index (EAI) [% ± 1 s]	*n*
Nichtraucher	3,1 ± 1,5	35
Raucher (20—40 Zigaretten/d)	4,7 — 3,6	29
Frische, nicht Kortikoid- oder Colfarit®-behandelte Herzinfarktpatienten (1.—3. Tag)	8,7 ± 4,5	21
Mit Heparin und Cumarinpräparaten behandelte Herzinfarktpatienten (4.—11. Tag)	18,1 ± 13,5	6
Herzinfarktpatienten (4.—11. Tag) nach oraler Behandlung mit Acetylsalicylsäure (Colfarit®)	3,1 ± 1,6	6

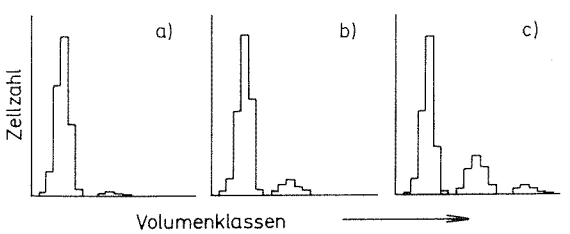

Fig. 8. Erythrozyten-Volumenverteilungskurven von einem a) Nichtraucher, b) starken Raucher, c) Herzinfarktpatienten. Der erste, hohe Gipfel stammt von den einzelnen Erythrozyten, die kleineren geben die Aggregate von 2 bzw. 3 Zellen wieder

 © by Springer-Verlag 1974

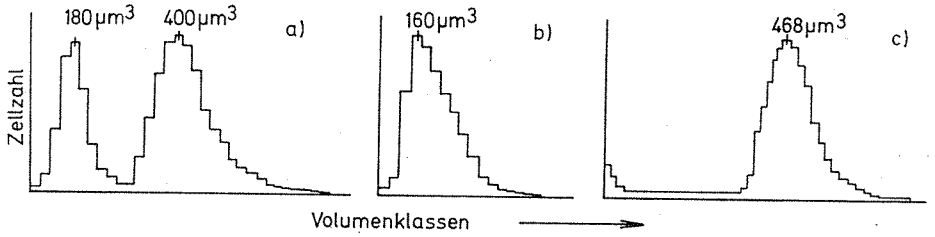

Fig. 9a—c. Leukozyten-Volumenverteilungskurven von a) gesunder Normalperson. Die Verteilung mit dem Maximum bei 180 μm^3 entspricht den kleinen Lymphozyten, die größere Verteilung mit dem Maximum bei 400 μm^3 den Granulozyten und umfaßt auch die großen Lymphozyten, die mit anderen Separationsmethoden auch gesondert dargestellt werden können. b) Akute Lymphadenose, c) Morbus Hodgkin

und bösartige Bluterkrankungen, z.B. Leukämien, führen meist zu erheblichen Verschiebungen der Volumenverteilungskurven (Fig. 9). Die Volumenmessung könnte hier als zusätzliche Methode der Diagnostik und zur Therapieüberwachung eingeführt werden. Desgleichen sind Thrombozyten-Messungen möglich, sogar ohne vorherige Isolierung der Thrombozyten [24].

Bei *Leberzellkernen* der Ratte, welche nach der Citrat-Sucrose-Methode [25] präpariert wurden, ergab sich die aus der Histologie bekannte Tendenz [26], daß mit zunehmendem Alter mehr tetraploide Zellkerne auftreten. Neben di-, tetra- und oktoploiden Zellkernen wurde eine zusätzliche Zellkernpopulation gefunden, die kleiner als diploide, und eine weitere, die größer als tetraploide Zellkerne ist (Fig. 10); es konnte noch nicht geklärt werden, welcher Art von Zellen sie zuzuordnen sind [27]. Ihr Anteil liegt zusammen zwischen 5—25% der Leberzellkerne. Die Verteilung der verschiedenen Leberzellkernpopulationen wird am besten durch eine logarithmische Normalverteilung beschrieben. Ähnliches war bei der Auswertung histologischer Messungen schon von Schröder [28] angenommen worden. Durch Photographie wurde ermittelt, daß die Leberzellkerne unter den Bedingungen der Volumenmessung im Gegensatz zu Erythrozyten beim Durchtritt durch die Meßöffnung keine systematische Verformung erleiden. Die isolierten Leberzellkerne sind vorwiegend elliptisch. Durch mikroskopische Ausmessung der großen und kleinen Halbachse der Leberzellkerne wurde ein mittlerer Formfaktor von 1,35 bestimmt. Zwischen Formfaktor und Zellkernvolumen besteht keine deutliche Korrelation. Die Entstehung von Zellkern-Populationen nur aufgrund besonders häufig vorkommender Formfaktoren ist deshalb wie bei den Erythrozyten-Populationen unwahrscheinlich. Der Zellkernwiderstand wurde zu >8 kΩcm bestimmt. Die Leberzellkerne erfüllen damit entgegen früheren Annahmen [25] die Bedingung eines hohen elektrischen Widerstandes gegenüber dem Suspensionsmedium, das einen spezifischen Widerstand von etwa 40 Ωcm aufweist.

Zur Kontrolle der elektrischen Volumenmessung wurden verschiedene Zellkernpräparationen mikroskopisch vermessen und aus den Längenmeßwerten unter Annahme einer Kugel- oder Rotationsellipsoid-Gestalt die Volumina berechnet und klassiert. Dabei ergaben sich zwischen beiden Meßverfahren für die Volumenmittelwerte Übereinstimmung innerhalb 10—20%, wobei das elektrisch gemessene Volumen meist niedriger war als das optisch ermittelte [27]. Die

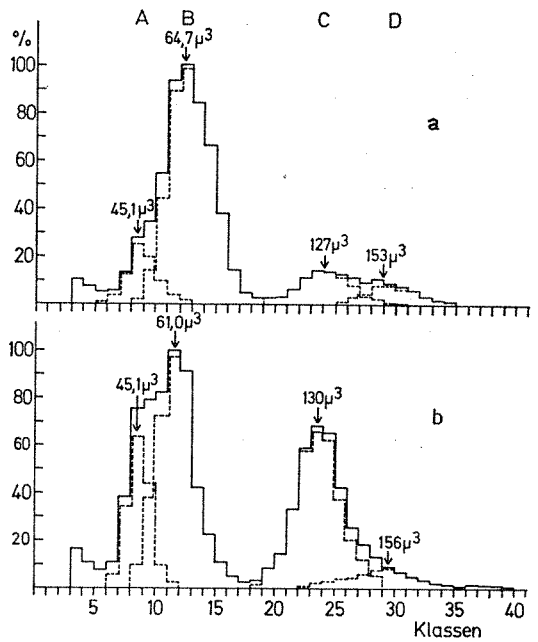

Fig. 10a u. b. Volumenverteilungskurven von Rattenleberzellkernen. a 199 g schweres weibliches Tier, b 301 g schweres weibliches Tier. Neben den diploiden und tetraploiden Hauptgipfeln B und C befindet sich eine zusätzliche Zellkernpopulation A, die kleiner als diploide Zellkerne ist, und eine (D), die größer als tetraploide, aber kleiner als oktoploide Zellkerne ist

elektrische Volumenmessung liefert also bezüglich Anteil der Zellkernarten, Volumenverteilung und mittlerem Absolutvolumen der Zellkern-Populationen Ergebnisse, die gut mit den mikroskopisch ermittelten übereinstimmen. Ein wesentlicher Vorteil der elektrischen Messung liegt jedoch in der weitaus größeren Schnelligkeit und der besseren Auflösung der Volumenverteilungskurven, die den Nachweis zusätzlicher Zellkern-Populationen in der Leber erlauben. Von Interesse ist hier der hohe elektrische Widerstand der *isolierten* Leberzellkerne, der wohl als Membranwiderstand aufzufassen ist. Er spricht dafür, daß die Zellkernmembran trotz ihrer elektronenoptisch darstellbaren Kernporen keinen ungehinderten Durchgang für Ionen erlaubt. Dies wurde auch durch Mikropunktion von Zellkernen der Speicheldrüsen von *Drosophila* gefunden [29].

Die Beispiele sollten zeigen, daß die Messung der Volumenverteilung von Zellen und Zellorganellen in Biologie und Medizin wichtige neuartige Informationen

liefern können. Darüber hinaus werden weitere technisch-methodische Fortschritte ihr Anwendungsgebiet, insbesondere auch in der klinischen Diagnostik, ausweiten.

1. Leeuwenhoek, A. van: Microscopical observation concerning blood, milk, bones, the brain, spitle and cuticula. Philosophical transaction, S. 121; 21. Sept. 1674
2. Spielman, L., Goren, S. L.: J. Coll. Interf. Sci. **26**, 175 (1968)
3. Thom, R., Kachel, V.: Blut **21**, 48 (1970)
4. Thom, R., Hampe, A., Sauerbrey, G.: Z. ges. exp. Med. **151**, 331 (1969)
5. Coulter, W. H.: U.S. Patent Nr. 2656508 (1953)
6. Helleman, P. W.: The Coulter electronic particle counter. De Bilt Holland 1972
7. Grover, N. B., *et al.*: Biophys. J. **9**, 1398 (1969)
8. Metzger, H., *et al.*: Blut **25**, 179 (1972)
9. Kachel, V.: Dissertation TU Berlin 1972
10. Maxwell, J. C.: Lehrbuch der Elektrizität und des Magnetismus. Berlin: Springer 1883
11. Kachel, V., Metzger, H., Ruhenstroth-Bauer, G.: Z. ges. exp. Med. **153**, 331 (1970)
12. Thom, R.: Telefunken Veröffentlichung N1/EP/V 1698 (1972)
13. Valet, G., *et al.*: Blut **24**, 42 (1972)
14. Das Programm wurde von Herrn H. Hofmann (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) dankenswerterweise zusammengestellt
15. Metzger, H.: Dissertation Univ. München 1972
16. Valet, G., *et al.*: Abstr. XV. Internat. Congr. Hematol., Jerusalem 1974 (im Druck)
17. Zimmermann, U., Schulz, J., Pilwat, G.: Biophys. J. **13**, 1005 (1973)
18. Hanser, G., *et al.*: Abstr. XV. Internat. Congr. Hematol, Jerusalem 1974 (im Druck)
19. Cottier, H., in: Handbuch der medizinischen Radiologie, Band II/2, S. 35 (Hrsg. A. Zuppinger). Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966
20. Valet, G., *et al.*: Blut **24**, 274 (1972)
21. Chmiel, H., Störmer, B.: Biomed. Technik **5**, 174 (1972)
22. Boss, N., *et al.*: Blut **27**, 191 (1973)
23. Zucker, R. M., Cassen, R.: Blood **34**, 591 (1969)
24. Schulz, J., Thom, R.: Med. Biol. Eng. **11**, 447 (1973)
25. Schulte-Hermann, R., *et al.*: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **261**, 42 (1968)
26. Nadel, C., Zajdela, F.: Exp. Cell. Res. **42**, 99 (1966)
27. Valet, G., *et al.*: (in Vorbereitung)
28. Schröder, R.: Acta Histochem. **30**, 297 (1968)
29. Loewenstein, W. R., in: Protoplasmologia, Bd. V/2, S. 27. Wien: Springer 1964

Eingegangen am 4. Februar 1974

 © by Springer-Verlag 1974