

Методи підрахування еозинофілів крові людини безпосередньо в лічильній камері

К. П. Зак

Одним з тестів для судження про функціональний стан надниркових залоз є проба Торна, основана на зміні абсолютної кількості еозинофілів після одноразового введення адренкортикотропного гормону гіпофіза (АКТГ). В зв'язку з широким застосуванням проби Торна у клініці збільшився інтерес до методів підрахунку еозинофілів безпосередньо в камері, які відзначаються швидкістю і точністю.

Першим, хто застосував безпосереднє підраховання еозинофілів, був Дунгер (1910), який запропонував для цього рідину такого складу: 1%-ний водний розчин еозину — 10 мл, ацетон — 10 мл, дистильована вода — до 100 мл.

В цій рідині еозинофіли забарвлюються у коричнево-червоний колір, і їх можна підрахувати в камері протягом дуже короткого часу.

Торн (1948) використав для своєї проби рідину Дунгера, але так модифікував її: 2%-ний водний розчин жовтого еозину — 5 мл, ацетон — 5 мл, дистильована вода — до 100 мл.

Цю рідину треба зберігати в холодильнику і перед використанням відфільтрувати в охолодженому стані.

Слід зазначити, що описана методика розрахована лише на стабілізовану оксалатами венозну кров. Застосування її для дослідження капілярної крові з пальця людини є помилковим. За Торном, кров, взяту з вени в кількості 5 мл, вміщують у скляночку з висушеним залишком 0,5 мл такого розчину: 1,2 г щавлевокислого амонію і 0,8 г щавлевокислого калію. Стабілізовану кров набирають у лейкоцитарний меланжер до мітки 0,5 і розбавляють описаною вище рідиною до мітки 11. Меланжер струшують відразу після здобуття крові лише протягом 30 сек. і негайно заповнюють камеру. Підрахування провадиться через 3 хв. Еозинофіли в камері визначаються як темночервоні клітини на яскраворожевому фоні, тоді як інші форми лейкоцитів залишаються безколірними.

Проте цьому методу властиві значні недоліки, які полягають у тому, що підрахування еозинофілів треба провадити дуже швидко після здобуття крові (до 5 хв.), бо при повторному струшуванні значна кількість еозинофілів руйнується. Саме струшування має бути не дуже сильним і, як уже зазначалось, тривати не більше 30 сек.; недодержання цього правила також приводить до заниження справжньої кількості еозинофілів.

Хеннеман, Векслер і Вестенхауер (1949) показали, що рідина, яку для розбавлення застосовував Торн, викликає руйнування клітинних мембран еозинофілів, після чого клітини розпадаються. Якщо залишити меланжер на 20 хв. після здобуття крові, кількість зруйнованих клітин становить понад 50%. Через 80 хв. залишаються незруйнованими лише поодинокі еозинофіли.

Нам також доводилося спостерігати, що при більш тривалому, ніж це потрібно, стоянні меланжерів або при сильному їх струшуванні все поле камери замість еозинофілів заповнюється еозинотильними зернами. Заважає підрахуванню також швидке випарювання розбавляючої рідини.

Отже, описаний метод досить капризний, що, звичайно, утруднює використання його безпосередньо в палаті, де перебуває хворий.

У 1956 р. один з співавторів Торна — Форшера у підручнику з ендокринології під редакцією Вільямса визнав, що метод Дунгера, яким вони користувалися, має недоліки, і рекомендував для прямого швидкого підрахування еозинофілів метод Гінклемана. У розбавляючій рідині Гінклемана, за даними авторів, еозинофіли можуть зберігатися протягом однієї-двох годин. За допомогою цього методу можна досліджувати як венозну оксалатну, так і капілярну кров.

Склад розчину Гінклемана такий: жовтий еозин — 0,05 г, концентрований формалін (40%) — 0,5 мл, концентрований фенол (88%) — 0,5 мл, дистильована вода —

до 100 мл. Рідину необхідно зберігати в спеціальних посудинах. Кров набирають у меланжер за допомогою шприца — до мітки 11. Кров і розчинять у воді протягом не менш як дві хвилини. Меланжер заповнюють камери. При цьому еритроцити осідають на дно, а цитоплазма — в жовтогарячий шар. Для визначення кількості лейкоцитів у камері можна провадити

В описаній розбавляючій рідині еозинофілів, зберігаються також у бують фарбу і мають вигляд тінь еозинофілів підраховувати також

За нашими даними, при взятті слід додавати гепарин з розрахунку найкраще негайно після здобуття повнени лічильні камери бажано і щоб еозинофіли краще зафарбували герметичності вологої камери, як і можуть бути підраховані на пр

Широке застосування для підстав метод Рандольфа (1944). Б. понованій ним розбавляючій рідині. Розбавляюча рідина Рандольфа складається з двох частин, одна з яких додається в частинах безпосередньо перед взяттям проб близько чотирьох годин, після чого

Перед здобуттям крові в скляну пробірочку з додаванням 0,5 мл 1% розчину етилового спирту і другого розчинів, які зберігаються в холодильнику.

Розчин I. 0,1%-на метиленовий розчин в воді — 50 мл. Розчин II — 0,1%-на

50%-ний розчин пропілен-глі-
видимими, тоді як усі форми лей-
пошкодженими.

Отже, користуючись цим методом, можна визначити загальну кількість лейкоцитів. еозинофільні гранули у блискачці мають аквамаринового кольору. С

ефект, що, за даними автора, при
форми лейкоцитів (нейтрофіли, лі

Цей метод можна застосовувати і до інших порід кози, бо у пропілен-гліколі добре розчиняються всі жирні кислоти, що дозволяє врахувати підрахуванню також по-

Для здобуття крові використані ланжер струшують під час набивання цього. В разі заповнення камери жера, необхідно виждати 3—5 хв. Цього часу досить для підрахування

Для диференційованого підтрібно 10—15 хв., бо за цей час жера для підрахування можна ко

Еозинофіли відрізняються в а також дещо більшими розмірами. Для диференціації всіх ле

Пропілен-гліколь відзначаєть можливість точніше наповнити м розчину також є його перевагою.

Слід зазначити, що флоксин (хлортетрабромфлуоресцеїн) мож і сам автор, але з дещо гіршим

На думку ряду дослідників Рандольфа поряд з позитивними і коліткий, ніж інші методи. Завд

ває процес змішування і осадже-
лишаються в різних місцях щодо
Швидке підрахування еозинофілії

Хенніман, Векслер і Вестемендують застосовувати лише о.традію флоксину, що спрощує ме.пропілен-гліколь — 50,0 мл, дист.

Проведена ними перевірка саної вище, показала значні пер

до 100 мл. Рідину необхідно зберігати в холодильнику і фільтрувати перед застосуванням. Кров набирають у меланжер для лейкоцитів до мітки 0,5 або 1, розбавляючи рідину — до мітки 11. Кров і розбавляюча рідина мають залишатися в контакті не менш як дві хвилини. Меланжер добре струшують протягом двох хвилин, після чого заповнюють камери. При цьому еозинофільні гранули забарвлюються у чорний колір, а цитоплазма — в жовтогарячий. Завдяки чіткому зафарбуванню підрахування еозинофілів у камері можна провадити при малому збільшенні.

В описаній розбавляючій рідині лізуються лише еритроцити, внаслідок чого, крім еозинофілів, зберігаються також усі інші форми лейкоцитів, але вони погано адсорбують фарбу і мають вигляд тіней. Це дає можливість одночасно з підрахуванням еозинофілів підраховувати також загальну кількість лейкоцитів.

За нашими даними, при взятті крові з пальця до описаної розбавляючої рідини слід додавати гепарин з розрахунку 1—2 од. на 1 мл розчину. Заповнювати камери найкраще негайно після здобуття крові і двохвилинного струшування меланжера. Заповнені лічильні камери бажано поставити хвилин на п'ятнадцять у вологу камеру, щоб еозинофіли краще зафарбувалися і осіли. При додаванні гепарину і достатній герметичності вологої камери, як показали наші дослідження, еозинофіли зберігаються і можуть бути підраховані на протязі 24—48 год. після взяття крові.

Широке застосування для безпосереднього підрахування еозинофілів у камері дістав метод Рандольфа (1944). Великою перевагою цього методу є те, що в запропонованій ним розбавляючій рідині еозинофіли можуть зберігатися протягом 24 год. Розбавляюча рідина Рандольфа складається з двох розчинів, які змішуються в рівних частинах безпосередньо перед взяттям крові. Приготовлена суміш може зберігатися близько чотирьох годин, після чого її фарбуючі властивості слабшають.

Перед здобуттям крові в скляночці змішується однакова кількість краплин першого і другого розчинів, які зберігаються у крапельниці. Склад розчинів такий:

Розчин I. 0,1%-на метиленова синька у пропілен-гліколі — 50 мл, дистильована вода — 50 мл. Розчин II — 0,1%-ний флоксин у пропілен-гліколі — 50 мл.

50%-ний розчин пропілен-гліколю у воді має властивість робити еритроцити невидимими, тоді як усі форми лейкоцитів зберігаються і можуть довго залишатися непошкодженими.

Отже, користуючись цим методом, можна разом з еозинофілами підраховувати і загальну кількість лейкоцитів. Суміш флоксину і метиленової синьки забарвлює еозинофільні гранули у блискучий червоний колір, тоді як ядра всіх клітин набувають аквамаринового кольору. Суміш цих фарб у пропілен-гліколі дає такий чіткий ефект, що, за даними автора, при великому збільшенні можна віддиференціювати всі форми лейкоцитів (нейтрофіли, лімфоцити), отже підрахувати лейкоцитарну формулу.

Цей метод можна застосовувати також при хворобах крові, наприклад при лейкозії, бо у пропілен-гліколі добре зберігаються навіть дуже нестійкі лейкоцити. Не заважає підрахуванню також поява молодих мієлоїдних форм.

Для здобуття крові використовуються звичайні лейкоцитарні меланжери. Меланжер струшують під час набирання розбавляючої рідини і безпосередньо після цього. В разі заповнення камери зараз же після здобуття крові і струшування меланжера, необхідно виждати 3—5 хв., поки «зникнуть» еритроцити і осядуть лейкоцити. Цього часу досить для підрахування загальної кількості лейкоцитів.

Для диференційованого підрахування еозинофілів та інших форм лейкоцитів потрібно 10—15 хв., бо за цей час вони найкраще зафарбуються. Брати кров з меланжера для підрахування можна коли завгодно на протязі 24 год. після взяття крові.

Еозинофіли відрізняються від інших клітин блискучим червоним забарвленням, а також дещо більшими розмірами; тому їх можна підрахувати при малому збільшенні. Для диференціації всіх лейкоцитарних форм потрібне велике збільшення.

Пропілен-гліколь відзначається великою в'язкістю, що, на думку автора, дає можливість точніше наповнити меланжери і камери. Низький ступінь випарювання розчину також є його перевагою.

Слід зазначити, що флоксин (червоний кислотний ксантеновий барвник — тетра-хлортетрабромфлуоресцеїн) можна замінити еозином, який спочатку застосовував і сам автор, але з дещо гіршим результатом.

На думку ряду дослідників (Мака Фарлана і Сесил, Маннер, Пілот), метод Рандольфа поряд з позитивними якостями має той недолік, що він більш забарний і копіткий, ніж інші методи. Завдяки великій в'язкості пропілен-гліколю довше триває процес змішування і осадження в лічильній камері. Деякі клітини постійно залишаються в різних місцях щодо дна камери, тому необхідне постійне рефокусування. Швидке підрахування еозинофілів затримується наявністю інших форм лейкоцитів.

Хеннеман, Векслер і Вестенхауер (1949) для підрахування еозинофілів рекомендують застосовувати лише один з розчинів Рандольфа, трохи змінивши концентрацію флоксину, що спрощує метод. Склад цього розчину такий: флоксин — 0,05 г, пропілен-гліколь — 50,0 мл, дистильована вода — 50,0 мл.

Проведена ними перевірка розбавляючих рідин, запропонованої Торном, і описаної вище, показала значні переваги останньої.

Руд (1947) на підставі численних досліджень прийшов до висновку, що еозинофіли є найстійкішими клітинами крові. Тоді як невелика концентрація лугу швидко руйнує інші лейкоцити й еритроцити, еозинофіли протягом деякого часу залишаються непошкодженими. Для їх пофарбування він застосував фарбу магдаляред, яка в дуже невеликій концентрації забарвлює еозинофільні зерна, причому поле зору залишається майже безколірним. Однак слід зазначити, що цю фарбу дуже важко дістати. Запропонована ним розбавляюча рідина має такий склад: магдаляред (розчинна у воді) 10%-на—0,1 мл, ацетон—6 мл, розчин соди 10%-ний—14—20 краплин, вода—45 мл.

Ацетон додають для чіткішого виявлення еозинофільних гранул. Розчин зберігають у темному посуді; він придатний для використання протягом 14 днів.

Автор радить брати кров з медіальної сторони мочки вуха. Кров треба набрати у меланжер і розвести розбавляючою рідиною 1:20. Далі меланжер струшують і зараз же заповнюють лічильну камеру. Щоб запобігти випарюванню рідини, лічильну камеру необхідно поставити у звичайну чашку Петрі із змоченим фільтрувальним папером). Пофарбування відбувається у камері протягом 10—15 хв., після чого необхідно починати підрахування еозинофілів. Еозинофільні гранули забарвлені у яскраворожевий колір, їх дуже добре видно, ядра клітин не забарвлені. Інші лейкоцити, як правило, не забарвлюються, або їх ледве видно (тіні). Еритроцити гемолізуються.

Ця методика мало поширена. Недоліком її є застосування ацетону з наслідками, які з цього випливають.

Пілот (1950) вирішив поєднати позитивні якості розбавляючих рідин Рандольфа і Руда і звести їх в одному розчині. З методики Рандольфа він взяв 50%-ний розчин пропілен-гліколю, який мало випаровується, має більшу в'язкість і робить еритроцити невидимими. З методики Руда він запозичив невелику кількість соди, яка в певній концентрації руйнує всі лейкоцити крові людини, крім еозинофілів. Еозинофіли залишаються з непошкодженими клітинними мембранами і добре забарвлюються будь-якою фарбою. Автор пропонує флоксин, але забарвлення добре відбувається і при застосуванні еозину. Склад рідини, запропонованої Пілотом, такий: пропілен-гліколь—50 мл, дистильована вода—40 мл, 1%-ний водний розчин флоксину—10 мл, 10%-ний розчин соди—1 мл.

Після фільтрації суміш залишається стабільною і може зберігатися при кімнатній температурі протягом місяця.

Капілярну чи венозну кров набирають звичайним меланжером для лейкоцитів до мітки I, а потім розводять розбавляючою рідиною до мітки II. Меланжер струшують протягом 30 сек., камера заповнюється. Пофарбування еозинофілів і лізис інших клітин триває 15 хв. Пофарбування може відбуватися як безпосередньо в камері, так і в меланжері. При пофарбуванні в меланжері його треба повторно перед заповненням камери струшувати протягом 30 сек.

Еозинофіли забарвлюються у червоний колір і можуть бути підраховані в камері при малому збільшенні, бо всі інші клітини крові не виявляються. Якщо залишити меланжер на три години, помітного зменшення числа еозинофілів, за даними автора, не відбувається. Після 24 годин кількість еозинофілів зменшується на 35%.

Автор підрахував еозинофіли у 1000 чол. методами Дунгера, Рандольфа, Руда і своїм і прийшов до висновку, що запропонована ним рідина дає більш точні результати, ніж інші.

Мак Фарлан і Сесил (1951) перевірили метод Пілота і знайшли, що через чотири години стояння меланжера початкова кількість еозинофілів значно зменшується. На їх думку, це настає через склеювання еозинофілів внаслідок утворення в меланжері фібрину. Щоб усунути цей недолік, вони рекомендують примішувати до розбавляючої рідини Пілота гепарин (1 одиницю на 1 мл розчину).

У 1951 р. Маннер запропонував для безпосереднього підрахування еозинофілів розбавляючу рідину, основним інгредієнтом якої є сечовина. В насиченому розчині сечовини, за даними автора, відбувається швидкий лізис еритроцитів і всіх форм лейкоцитів, крім еозинофілів. Ця розбавляюча рідина повільно випаровується і має в'язкість трохи більшу, ніж вода. Тому на відміну від рідини Рандольфа її змішування в меланжері з кров'ю і осадження клітин у камері відбуваються швидко.

Рідина має такий склад: сечовина—50 г, лимоннокислий натрій—0,6 г, дистильована вода—100 мл, 2%-ний водний флоксин—5 мл.

Автор надає великого значення очищенню розчину від будь-яких сторонніх часточок, тому що було встановлено, що еозинофіли групуються навколо плаваючих часточок, нерівномірно розміщуються в лічильній камері, що приводить до завідомої помилки при підрахуванні. Щоб цього уникнути, треба розчин ретельно відцентрифугувати. 100 мл надосадової рідини обережно відсмоктують, а решту 5 мл, які містять осад, виливають.

Кров з пальця набирають у меланжер до мітки I і розводять вказаною рідиною до мітки II. Меланжер негайно струшують протягом 2—3 хв. і заповнюють камеру. Лічильні камери ставлять у вологу камеру, що являє собою велику чашку Петрі, на дні якої знаходиться кілька аркушів змоченого фільтрувального паперу.

Через 15 хв. майже всі лейкоцити трапляються окремі нейтрофіли і лі...

Проведені нами для перевірки підрахування еозинофілів краще проводили в крові. За цей час відбувається по...

Еозинофіли забарвлюються у двочасточкове ядро. Клітини мож...

При використанні кожного з слід провадити у кількох лічильних меру Фукс-Розенталя (глибина 0,1 мм, товщина 0,1 мм, діаметр 10 мм). Для підрахування форменних елементів слід підрахувати еозинофілів у кількох лічильних камерах. На 3,2, при підрахуванні двох камер на розведення, тобто при набиранні до мітки I—на 10.

- Dunger, München. med. v. 37, No. 7, 1941, 1017.
Fischer a. Fischer, Hennenman, Wexler v. 37, No. 7, 1941, 1017.
MacFarlane a. Cessmanners, Brit. Med. J., Pilot, Amer. J. Clin. Pathol., Randolph, J. Allergy, Randolph, J. Labor. Recant, Hume, F v. 10, No. 2, 1950, 187.
Rud, The eosinophil count Thorn, Forsham, P No. 12, 1948, 1005.
Williams, Textbook of

Інститут фізіології ім. О. Академії наук УРСР, лабораторія ендокринних

Через 15 хв. майже всі лейкоцити, крім еозинофілів, лізуються; правда, можуть ще траплятися окремі нейтрофіли і лімфоцити, але вони не заважають підрахуванню.

Проведені нами для перевірки цієї методики дослідження показали, що підрахування еозинофілів краще провадити не через 15, а через 45—60 хв. після взяття крові. За цей час відбувається повний лізис усіх формених елементів крові, за винятком еозинофілів, причому відзначається найбільш чітке їх пофарбування. За даними Маннера, лічильні камери можуть залишатися у вологій камері протягом двох годин.

Еозинофіли забарвлюються у яскраворожевий колір, причому часто виділяється двочасточкове ядро. Клітини можна легко підрахувати при малому збільшенні. Методика приваблює своєю простотою, але потребує детальної перевірки.

При використанні кожного з описаних вище методів підрахування еозинофілів слід провадити у кількох лічильних камерах великого об'єму. Ми маємо на увазі камеру Фукс-Розенталя (глибина 0,2 мм, об'єм 3,2 мм³), яку виробляє наша промисловість для підрахування формених елементів спинномозкової рідини. Для більшої точності слід підрахувати еозинофіли не менше як в двох таких камерах. Для перерахування кількості еозинофілів в 1 мм³ необхідно одержану кількість еозинофілів поділити на об'єм камери, тобто при використанні однієї камери Фукс-Розенталя — на 3,2, при підрахуванні двох камер — на 6,4, чотирьох камер — на 12,8 і помножити на розведення, тобто при набиранні крові до мітки 0,5 — на 20, а при набиранні крові до мітки 1 — на 10.

ЛІТЕРАТУРА

- D u n g e r, München. med. Wchsch., 1910, 57, 1942.
 F i s c h e r a. F i s c h e r, Am. J. Med. Sc., v. 221, No. 2, 1951, 121.
 H e n n e m a n, W e x l e r a. W e s t e n h a v e r, J. Labor. a. Clin. Med., v. 37, No. 7, 1941, 1017.
 M a c F a r l a n e a. C e c i l, Brit. Med. J., No. 4741, 1951, 1187.
 M a n n e r s, Brit. Med. J., № 4720, 1951, 1429.
 P i l o t, Amer. J. Clin. Path., v. 20, No. 9, 1950, 870.
 R a n d o l p h, J. Allergy, v. 15, No. 2, 1944, 89.
 R a n d o l p h, J. Labor. a. Clin. Med., v. 34, No. 12, 1949, 1696.
 R e c a n t, H u m e, F o r s h a m a. T h o r n, J. Clin. Endocrinology, v. 10, No. 2, 1950, 187.
 R u d, The eosinophil count in health and in mental disease, Copenhagen, 1947.
 T h o r n, F o r s h a m, P r u n t y a. H i l l s, J. Am. Med. Assoc., v. 137, No. 12, 1948, 1005.
 W i l l a m s, Textbook of Endocrinology, Philadelphia — London, 1956.

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
 Академії наук УРСР,
 лабораторія ендокринних функцій

Надійшла до редакції
 1. VI 1958 р.