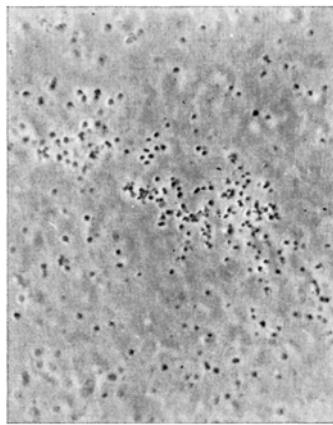


Isolierung der menschlichen Eosinophilen und ihrer Granula¹

Isolierung eosinophiler Granulozyten

Eine möglichst weitgehende Anreicherung menschlicher eosinophiler Leukozyten ist die Voraussetzung jeder einigermassen ergiebigen Isolierung menschlicher Granula. Menschliche Eosinophile lassen sich weder auf Grund ihrer Zellgrösse noch ihres spezifischen Gewichtes von den übrigen Leukozyten abtrennen, da die Werte für die einzelnen Zellarten zu nahe beieinanderliegen. Die Eosinophilen unterscheiden sich hingegen durch ihre grössere osmotische Resistenz wesentlich von allen übrigen Zellen des Blutes. Unter Auswertung dieser Eigenschaft lassen sich die eosinophilen Granulozyten des Menschen auf folgende Weise gewinnen:

Methodik. Als Ausgangsmaterial dient menschliches Blut, das nicht unter 15% Eosinophile enthalten soll.



Isolierte Granula aus menschlichen eosinophilen Granulozyten (Phasenkontrast-Mikroskop, Vergr. 1:1000).

40 cm³ 3,5%ige Na-Zitratlösung werden mit 160 cm³ frisch entnommenem Venenblut in einem Standzylinder gemischt und stehengelassen, bis sich die Erythrozyten um $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{3}$ der Flüssigkeitssäule gesenkt haben. Die dazu erforderliche Zeit ist von der Senkungsgeschwindigkeit abhängig und beträgt meist $\frac{1}{2}$ –2 h. Das überstehende leukozytenhaltige Plasma wird abgehebelt und 10 min bei einer Tourenzahl von 3000 U./min zentrifugiert (Zentrifuge Christ U J 2). Der zellhaltige Bodensatz wird in 20 cm³ 3,5%iger Na-Zitratlösung aufgeschwemmt, kräftig geschüttelt, bis sich alle Zellverklumpungen lösen, und 5 min bei 2000 U./min zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit enthält danach neben ausgewaschenen Plasmabestandteilen reichlich Thrombozyten; das Sediment besteht aus den Leukozyten und den restlichen Erythro- und Thrombozyten. Es wird so lange mit Na-Zitratlösung gewaschen, bis alle Thrombozyten entfernt sind; in der Regel genügen 5–7 Waschungen. Mit den Thrombozyten werden auch die noch vorhandenen Erythrozyten und die Lymphozyten teilweise eliminiert. Das schliesslich erhaltene Sediment mit neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, mässig zahlreichen Erythrozyten und wenig Lymphozyten wird jetzt in 20 cm³ *Aqua bidest.* kräftig aufgeschüttelt und sofort

während 5 min bei 2000 U./min zentrifugiert. Man gewinnt so eine aufrahmende oberflächliche Schicht aus lysiertem Zellmaterial, das ebenfalls noch eingeschlossene Eosinophile enthält, und einen Bodensatz, der zu 90 bis 95% aus Eosinophilen besteht, die allerdings teilweise miteinander verklebt sind.

Isolierung eosinophiler Granula

Die Granula der menschlichen Eosinophilen waren bisher für experimentelle Arbeiten praktisch unzugänglich. Ihre intrazelluläre Lage verunmöglicht eine direkte Untersuchung mit chemischen Methoden, und die Isolierung der Granula ist durch ihre Kleinheit erschwert. In der Literatur angegebene Isolierungsmethoden beschränken sich deshalb auf Granula tierischer Herkunft, wobei vor allem Granula aus Pferde-Eosinophilen verwendet werden (PETRY¹, NEUMANN², VERCAUTEREN³). Die eosinophilen Granulozyten des Pferdes lassen sich auf Grund ihres spezifischen Gewichtes von den übrigen Blutzellen abtrennen und enthalten bedeutend grössere Granula (BEHRENS und TAUBERT⁴, BEHRENS und MARTI⁵).

Methodik. Die auf die oben beschriebene Art gewonnenen menschlichen eosinophilen Zellen werden in 10 cm³ *Aqua bidest.* wieder aufgeschwemmt, gut geschüttelt, mit einem linsengrossen Stück eines Benetzungsmittels (Aerosol MA = Dihexyl-Na-sulfosuccinat⁶) versetzt und 10 min stehengelassen. Durch die oberflächenaktive Substanz kommt es zur vollständigen Zytolyse der Eosinophilen; Zellkern und Zytoplasma werden aufgelöst. Die noch vorhandenen grösseren Zelltrümmer werden anschliessend durch 10 min langes Zentrifugieren bei 3000 U./min entfernt. Die überstehende Flüssigkeit enthält massenhaft Granula, die beim Zentrifugieren mit höherer Tourenzahl (15 min bei 6000 U./min) sedimentieren. Die so erhaltenen Granula werden wiederum in *Aqua bidest.* suspendiert. Durch erneutes Zentrifugieren mit 3000 U./min werden allfällig noch vorhandene Zellen oder Zelltrümmer eliminiert; mit 6000 U./min gewinnt man die nun bereits einmal gewaschenen Granula. Es empfiehlt sich, die Granula nicht mehr als 2–3 mal auf diese Art in *Aqua bidest.* zu waschen, da sie sonst verklumpen und teilweise an der Wand des Röhrchens kleben bleiben.

Die derart isolierten Granula sind durch die Behandlung mit *Aqua dest.* etwas gequollen, im übrigen aber morphologisch unverändert (s. Abb.). Sie lassen sich mit Eosin färben. Der morphologische Reinheitsgrad erreicht 90–95% und kann im Ausstrichpräparat mit der Giemsafärbung bestimmt werden. (Fixation: Methylalkohol 3 min; Färbung: 6 Tropfen Giemsa/10 cm³ *Aqua dest.* 5 min). 160 cm³ Blut ergeben etwa 5 mg Granulasubstanz.

A. F. ESELLIER und H. R. MARTI

Medizinische Universitätsklinik Zürich, den 2. Juli 1955.

¹ E. PETRY, Wien. klin. Wschr. 21, 1360 (1908); Biochem. Z. 38, 92 (1912).

² A. NEUMANN, Biochem. Z. 148, 524 (1924); 150, 256 (1928); Fol. haemat. (Lpz.) 36, 95 (1928); Hdb. allg. Haematol. 1, 354 (Urban & Schwarzenberg, 1932).

³ R. VERCAUTEREN, Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) 33, 522 (1951); Nature (London) 167, 819 (1951); Enzymologia (Amst.) 16, 1 (1953).

⁴ M. BEHRENS und M. TAUBERT, Hoppe-Seyl. Z. physiol. Chem. 290, 228 (1953).

⁵ M. BEHRENS und H. R. MARTI, Exper. 10, 315 (1954).

⁶ American Cyanamid Co.

¹ Die vorliegenden Untersuchungen wurden durch ein Stipendium des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung ermöglicht.

Summary

A method is described for isolation of the granula from human eosinophils. The eosinophile leucocytes are separated on the basis of their osmotic resistance and subsequently lysed with distilled water and a wetting agent.

The Stability of Erythrocytes in Solutions of Evan's Blue Dye

Most techniques of measuring blood volume by means of Evan's Blue dye (T-1824) involve concentrations in the plasma of about 5 mg/l. This amount is safe and can be accurately measured. Much higher concentrations of the dye are used, for example, in the estimation of plasma-trapping within the packed red cell column¹, and sometimes for the measurement of blood volume in animals². In these instances it is important to know whether the blood cells are affected by the dye both from the point of view of accuracy and of possible side-effects. ALLEN and GREGERSEN² found that dog erythrocytes were markedly haemolysed at a plasma-dye concentration of 1.0 to 2.0 mg/ml whilst human red cells were stable in similar concentrations.

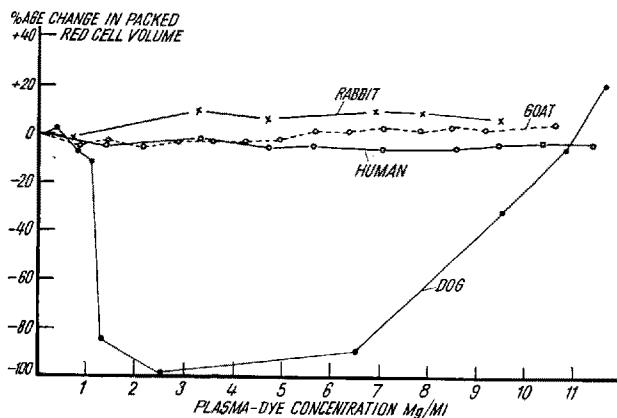


Fig. 1.—The effect of varying concentrations of T-1824 on the packed red cell volume of rabbit, goat, human and dog blood.

In the course of measuring plasma-trapping within the packed red cell column of goat blood the effect of high concentrations of Evan's Blue on the red cells was investigated. Simultaneous observations on human, rabbit and dog erythrocytes were used as controls. Varying amounts of a solution of T-1824 containing 25 mg/ml dissolved in 1% saline were added to 1.0 ml aliquots of heparinised blood. The dye was delivered from an "Agla" micro-syringe, and the mixtures allowed to stand at room temperature for about 1 h. They were then placed in Wintrobe haematocrit tubes and centrifuged at 15 cm radius and 3000 r.p.m. for 55 min. A correction for trapped plasma was made according to the findings of CHAPLIN and MOLLISON¹, for human blood. The same correction was applied to the observed haematocrit values for dog and rabbit blood as for human blood because plasma-trapping seems to be of the same order for all these species³. In the case of goat blood a cor-

rection for plasma-trapping determined in another experiment on blood of that species was applied to the observed packed cell volume. The expected packed red

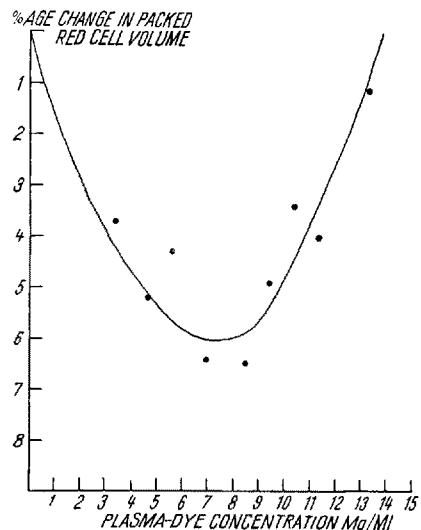


Fig. 2.—The effect of varying concentrations of T-1824 on the packed red cell volume of human blood.

cell volume for each mixture of blood and dye was estimated from control, dye-free, haematocrit determinations making allowance for trapped plasma and for the

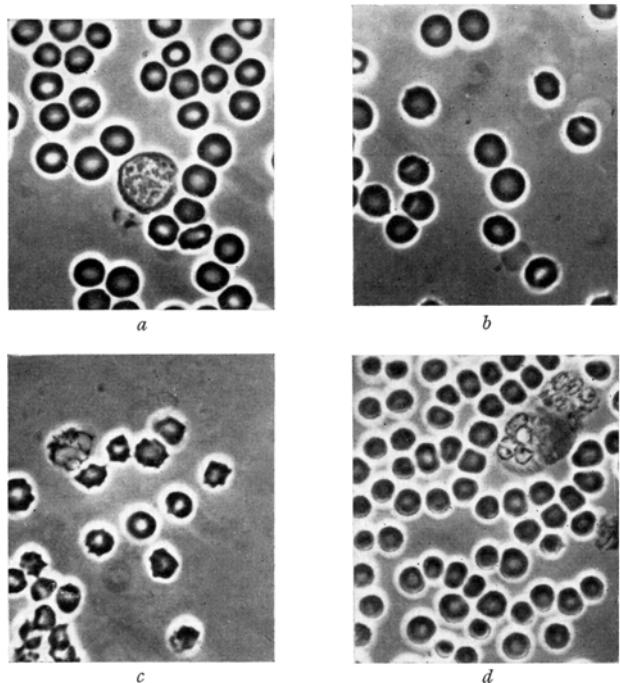


Fig. 3.—The effect of T-1824 on dog erythrocytes as shown by phase-contrast microscopy. *a* normal blood; *b*, *c*, and *d* blood mixed with 1.0, 4.3, and 9.1 mg of dye/ml of plasma respectively.

volume of dye solution added. The observed packed cell volume, also corrected for plasma-trapping, was then estimated as a percentage of the expected value. In view of the findings of ALLEN and GREGERSEN¹ it was

¹ H. CHAPLIN and P. L. MOLLISON, *Blood* 7, 1227 (1952).
² T. H. ALLEN and M. I. GREGERSEN, *Amer. J. Physiol.* 172, 377 (1953).
³ F. W. JENNINGS, I. M. LAUDER, W. MULLIGAN, and G. M. URQUHART, *Vet. Rec.* 66, 155 (1954).