

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.

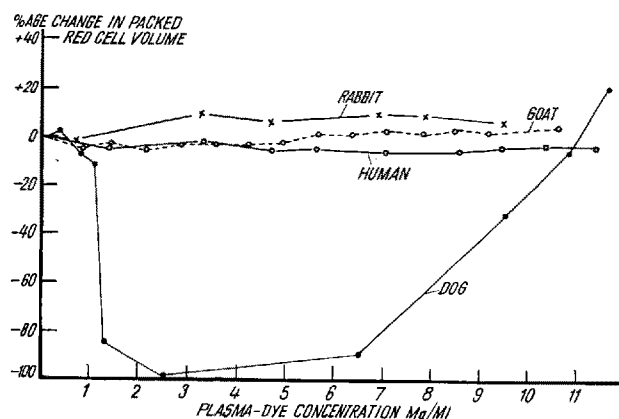


Fig. 1.—The effect of varying concentrations of T-1824 on the packed red cell volume of rabbit, goat, human and dog blood.

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 "Aglar" 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

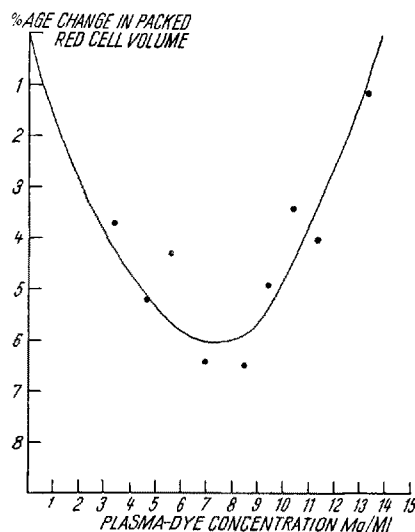


Fig. 2.—The effect of varying concentrations of T-1824 on the packed red cell volume of human blood.

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

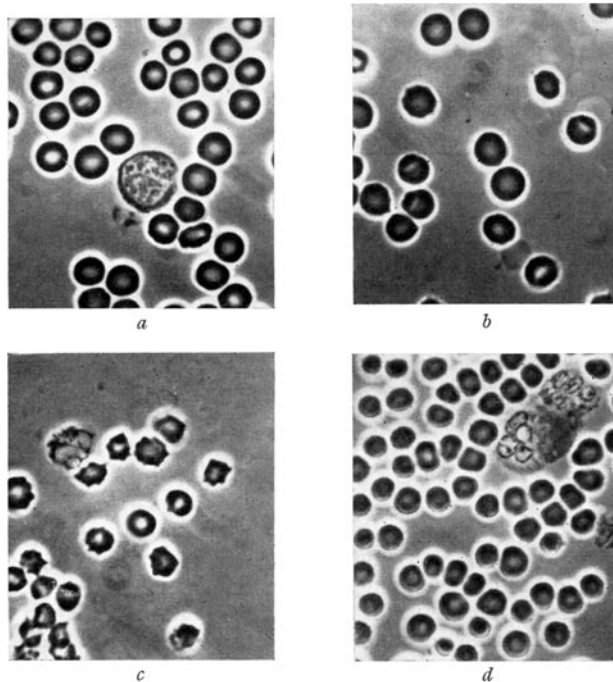


Fig. 3.—The effect of T-1824 on dog erythrocytes as shown by phase-contrast microscopy. *a* normal blood; *b*, *c*, and *d* blood mixed with 1.0, 4.3, and 9.1 mg of dye/ml of plasma respectively.

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).

¹ T. H. ALLEN and M. I. GREGERSEN, *Amer. J. Physiol.* 172, 377 (1953).

assumed that discrepancies between observed and expected haematocrit values were due to haemolysis. Dye concentrations were calculated on the assumption that no haemolysis or change in cell size had occurred at the moment when the dye was added to the blood.

It was found that Evan's Blue dye had little or no effect on the packed red cell volume in the case of human, rabbit and goat blood over the range of concentrations investigated. The comparative susceptibility of dog erythrocytes to the dye¹ was confirmed; but it was also observed that when concentrations were used above that at which marked haemolysis occurred, there was a progressive increase in stability of cells with increasing concentration of dye (Fig. 1). A similar pattern of changes but of slight degree was discerned on plotting the results found with human blood on an appropriate scale (Fig. 2).

Examination by means of phase-contrast microscopy² showed that dog red cells were reduced in size and crenated by T-1824, but that these effects were minimal at the extremes of the dye concentrations investigated (Fig. 3).

It seems reasonable to suppose that these effects were due to Evan's Blue dye itself rather than to other substances which could only have been present in very minute amounts.

G. R. WADSWORTH

*Department of Physiology, University of Liverpool,
June 15, 1955.*

Zusammenfassung

Bei Behandlung mit hohen Konzentrationen von Evan's Blue sind rote Blutkörperchen von Hunden weniger stabil als solche von Menschen, Kaninchen oder Ziegen. Die Hunderythrozyten wurden am stärksten angegriffen bei Konzentrationen von T 1824 zwischen 2–6 mg/cm³ und zeigen zunehmende Stabilität, wenn die Farbstoffkonzentrationen über oder unter diesem Wert liegen.

¹ T. H. ALLEN and M. I. GREGERSEN, *Amcr. J. Physiol.* 172, 377 (1953).

² I wish to thank Dr. J. KRUSZYNSKI for making these photographs.

Leukocytenemigrationsförderung durch Antigen-Antikörper-Reaktion *in vitro*

Untersuchungen der Antigen-Antikörper-Reaktion an Leukozyten mit zellständigem Antigen haben bisher nur schädigende Wirkungen ergeben, die von der Anwesenheit von Komplementen abhängig sind¹. Bei der Bedeutung der zellulären Reaktion bei allergischem Geschehen schien es richtig, zu untersuchen, ob es nicht gelingt, durch Modifikation der experimentellen Bedingungen andersartige Wirkungen zu erhalten.

Methodisch verwendeten wir für die Ermittlung der Wirkung die früher beschriebene Auswanderung von Hühnerleukozyten in einem Medium von Hühnerplasma und 10% Hühnerembryonalextrakt aa. in der modifizierten Petrischale². Als Antiseren überschichteten wir:

1. hämolysierendes Antihühnerkaninchenserum
2. hämolysierendes Antihühnermeerschweinchenserum
3. agglutinierendes inaktiviertes Antihühnerkaninchenserum
4. präzipitierendes Antihühnergansserum (BEHRING)
5. normale Kontrollseren in gleichen Verdünnungsreihen.

Hämolysierende und agglutinierende Antiseren hemmen in hohen Konzentrationen durch Zellschädigung und Agglutination die Auswanderung. Bei zunehmender Verdünnung des Antiserums wird das Auswanderungsareal zunächst dem der Kontrollen gleich, bei weiterer Verdünnung nimmt das Auswanderungsareal aber über das der Kontrollen zu und geht über ein Maximum wieder auf den Kontrollwert zurück. Komplementinaktivierte (56°C/h) und membranfiltrierte (Porendichte 500–1000 m μ) Antiseren zeigen denselben Kurvenverlauf, sind jedoch weniger wirksam.

Das präzipitierende Antiserum (Tier spez. 1:20000, unspez. 1:10000) führt nur zu einer Auswanderungsförderung bis zur Verdünnung von 2:3.

Bringt man Tropfen der Serumverdünnungen auf der Plasmaoberfläche im geeigneten Abstand von den Leukozyten an, so ergibt sich eine der allgemeinen Emigrationsförderung entsprechende chemotaktische Wirkung.

Unter gleichen Kautelen zubereitete und verwendete normale Seren von Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen und Menschen hatten keine nennenswerte Wirkung auf die Leukozytenauswanderung.

Unter Verwendung des präzipitierenden Gans-Antihühnerserums liess sich zeigen, welcher Anteil der Reaktionsprodukte die leukocytenemigrationsfördernde Wirkung enthält. Die Präzipitierung wurde in paraffinierten oder silikonisierten Röhrchen mit heparinisiertem (100 γ /cm³) Hühnerplasma desselben Tieres durchgeführt, dessen Leukozyten und Plasma zum Emigrationsversuch herangezogen wurden. Das eisgekühlte Plasma wurde mit der halben Menge präzipitierendem Serum vermischt, 3 h bei 0°C gehalten, eisgekühlt zentrifugiert. Durch Abhebern wurde die überstehende Flüssigkeit vom Präzipitat getrennt. Die Prüfung ergab Unwirksamkeit des überstehenden Plasma-Serum-Gemisches und Wirksamkeit des in Tyrode aufgenommenen Präzipitates. Heparinisierendes Hühnerplasma mit Tyrode an Stelle von präzipitierendem Serum verdünnt und sonst in obiger Weise behandelt ist unwirksam.

Von den bei der Antigen-Antikörper-Reaktion entstehenden Stoffen scheiden Histamin und Serotonin als mögliche Wirkstoffe aus, da sie auf Leukozyten *in vitro* unwirksam sind. Heparin und Bradykinin besitzen zwar eine geringe leukocytenemigrationsfördernde Wirkung (10⁻⁴), sie sollten sich aber in der Lösung vorfinden. Da nur das Präzipitat wirksam ist, sind folgende Möglichkeiten hinsichtlich der stofflichen Ursache der Wirkung in Betracht zu ziehen: 1. Adsorption eines Wirkstoffes an die Fällung, 2. Entstehung eines neuen chemischen Produktes durch die Fällung, 3. physikalische Wirkung des Präzipitates auf Bestandteile des Milieus. Besonders müssen wohl Lipopolysaccharide oder ihre Derivate als wirkende Stoffe in Betracht gezogen werden¹.

Ganz unabhängig von der endgültigen Abklärung dieser Frage ist mit den vorliegenden Befunden zum ersten Mal der Nachweis erbracht worden, dass im Immunserum bei der Antigen-Antikörper-Reaktion neben Stoffen, die Gefässreaktion, Permeabilität und

¹ B. SCHÄR und R. MEIER, *Schweiz. Z. Allg. Path. Bakt.* 14, 618 (1951).

² R. MEIER und B. SCHÄR, *Exper.* 7, 308 (1951).

¹ R. MEIER und B. SCHÄR, *Exper.* 10, 376 (1954). – M. R. SHETLAR, *Texas Rep. Biol. Med.* 10, 228 (1952). – F. B. SEIBERT *et al.*, *J. Clin. Invest.* 26, 90 (1947). – R. J. WINZLER und I. J. SMITH, *J. Clin. Invest.* 27, 617 (1948). – H. E. WEIMER, J. REDLICH-MOSHIN und E. T. NELSON, *J. Immunol.* 74, 213 (1955).