

NAŠA ISKUSTVA U TEHNICI BOJADISANJA RETIKULOCITA

Autor opisuje bojadisanje retikulocita po nekim poznatim metodama. U laboratoriju Ambulante za profesionalne bolesti u Zagrebu učinjene su po stečenim iskustvima izmjene u tehničkom postupku modificirane Wolferove metode bojadisanja retikulocita:

Na dobro očišćeno objektno staklo razmažu se staklenim štapićem 2—3 kapi 1%-ne otopine briljant-krezilnog modrila u apsolutnom alkoholu i preparat se ostavlja, da se osuši na zraku. Neposredno pred upotrebom ovlaži se osušena površina boje hukanjem i na nju se stave s jagodice prsta 2—3 kapi krvi. Spomoću koso položenog pokrovnog stakla ta se krv razmazuje u oba smjera (jednu i pol do dvije minute) i miješa se s bojom. Kad je krv jednolično izmiješana s bojom, prenosi se čistim pokrovnim staklom na čisto objektno staklo i razmaže tanki razmaz, koji se na zraku brzo osuši. Retikulociti se u tako bojadisanom preparatu jasno ističu, jer je retikulofilamentozna supstancija bojadisana tamnoplavo, a eritrociti zeleno.

Retikulociti su eritrociti, u kojima se naročitim metodama bojadisanja bazičnim bojama (briljant-krezilno modrilo, toluidinsko modrilo, metilensko modrilo i t. d.) mogu prikazati končaste i zrnaste tvorbe (substantia reticulofilamentosa). U dobro bojadisanom preparatu vide se retikulociti s tamnomodro bojadisanom retikulo-filamentoznom supstancijom u obliku klupke, mrežice, nepotpune mrežice i u obliku zrnaca.

Normalno nalazimo u krvi zdravog čovjeka 3—15 promile retikulocita (1). Povećan broj retikulocita znak je pojačane regenerativne djelatnosti srži kosti (kod različitih anemija u remisiji, kod anemija nakon krvarenja, kod perniciozne i hemolitičke anemije, kod trovanja clovom, nakon zračenja rentgenskim i radium zrakama i t. d.).

Do danas je objavljeno više originalnih i modificiranih metoda bojadisanja retikulocita. Po nekima smo i mi radili u laboratoriju Ambulante za profesionalne bolesti u Zagrebu od 1945. godine. U praksi smo nailazili na poteškoće, koje su nam ometale rad. Često smo dobivali preparate loše bojadisane, i to je kod brojenja retikulocita utjecalo na konačni rezultat, a uz to smo za tehnički postupak utrošili mnogo vremena. Po nekim metodama bojadisanja dobili smo dobro bojadisane preparate, ali je tehnički postupak bio suviše dugotrajan za naš frekventan rad u laboratoriju. Najprije smo radili po jednostavnoj metodi bojadisanja retikulocita metilenskim modrilom (3).

Sa jagodice prsta uzme se objektnim staklom svježa kap krvi i učini tanki razmaz. Razmaz se osuši na zraku, odmah fiksira u metilnom alkoholu 3 minute, a zatim ispere destiliranom vodom i bojadiše 5—10 sekunda metilenskim modrilom (Löffler).

Nakon bojadisanja preparat se ispere vodom, koso položi i osuši na zraku. Bojadisani preparat je svijetlomodne boje i pod mikro-

skopom s imerzijom vide se svijetlodri eritrociti, dok je retikulo-filamentozna supstancija bojadisana nešto tamnije modro i slabo se ističe. Tako se bojadisani preparat na plameniku lagano zagrije, postane svijetlozelene boje i tu boju sadrži trajno. Retikulo-filamentozna supstancija je u takvom preparatu zadržala modru boju i jasnije se ističe prema svijetlozelenim eritrocitima.

Po našem je iskustvu u preparatima bojadisanim po opisanoj metodi retikulo-filamentozna supstancija bila slabo ili nikako bojadisana, a to je utjecalo na konačni rezultat kod brojenja retikulocita.

Za brzu orijentaciju o broju retikulocita služili smo se metodom bojadisanja po Nageliju (6).

Na svježi i još vlažni razmaz krvi stavi se jedna kap 2% vodene otopine metilenskog modrila (po našem iskustvu može se upotrebiti i 0,5% otopina briljant-krezilnog modrila u 9% rastvoru NaCl) i pokrije pokrovnim staklom. Nakon 10—15 min. bojadisanje je završeno. Retikulo-filamentozna supstancija bojadisana je izrazito tamnomodro, a eritrociti su svijetlozeleni. Retikulociti se broje u malom vidnom polju s imerzijom, a rezultat se izražava u odnosu na 1000 eritrocita.

Ti se preparati ne mogu sačuvati, jer se eritrociti i retikulociti raspadnu, kad se otopina boje pod pokrovnim staklom osuši.

Nadalje smo radili po poznatoj metodi bojadisanja retikulocita u vlažnoj komori (4).

Na predmetno staklo se namaže tanak sloj koncentrirane alkoholne otopine briljant-krezilnog modrila i preparat se ostavi da se dobro osuši. Suvišak boje obriše se svilenom krpicom, tako da na staklu ostane jedva vidljiva modra boja. Na to se napravi razmaz krvi, i dok je još vlažan, prenosi se u »vlažnu komoru«. (U tu svrhu može se upotrebiti Petrijeva šalica, a na dno se stavi vlažan papir za filtriranje. Razmaz stoji u »vlažnoj komori« 10 min., zatim se izvadi, osuši na zraku, fiksira 3—5 min. metilnim alkoholom i ispere destiliranom vodom. Nakon toga se razmaz bojadiše razrijeđenom otopinom Giemse (1:1) 30 min., ispere vodom i suši na zraku.

U preparatu su eritrociti bojadisanj crvenomodro, a retikulo-filamentozna supstancija tamnomodro.

Često smo dobivali nepouzdan rezultate, jer je retikulo-filamentozna supstancija bila slabo ili skoro nikako bojadisana, a artefakti od ostataka boje ometali su jasnoću preparata. Tehnički postupak je dugotrajan (45—50 min.), i zbog toga smo tražili što jednostavniju i kraću metodu bojadisanja, kojom bismo dobili točne rezultate pretrage retikulocita u krvi.

U 1946. god. organizirala je Ambulanta za profesionalne bolesti pregled radnika u jednom većem poduzeću industrije olova izvan Zagreba. Liječnički pregled radnika vršio se na samom radilištu, a uporedo se uzimao i biološki materijal, koji se zbog pomanjkanja laboratorijskih pomagala na terenu prenosio u Zagreb, gdje se tek

u našem laboratoriju pregledavao. Pored ostalih pretraga krvi trebalo je istražiti broj retikulocita u krvi, a to još tada nismo mogli izvršiti na terenu kako zbog nedostataka laboratorijskih pomagala tako i zbog opisanih nedostataka pojedinih metoda bojadisanja. To nas je ponukalo da i nadalje istražujemo razne metode bojadisanja retikulocita, a među ostalima i modificiranu Wolferovu metodu.

Staklenim štapićem prenese se na dva objektna stakla zasićena 5%-tna otopina briljant-krezilnog modrila u apsolutnom alkoholu i pusti da se osuši na zraku. Zatim se navlaži hukanjem i svilenom krpicom lagano natare tako, da ostane jednoličan dosta debeo sloj boje. Na sloj boje jednog objektnog stakla uzme se s jagodice prsta 4—6 kapi svježe krvi, i to se pokrije drugim premazanim objektnim staklom, da budu obojene strane stakla jedna na drugoj. Objektna stakla povlače se jedno preko drugoga i time se postizava miješanje krvi i boje. Nakon 1—2 min. takvog postupka bojadisanje je dovršeno, i od obojene krvi pravi se razmaz na čistom objektnom staklu. U suhom preparatu mogu se odmah pod imerzijom brojiti retikulociti, kojima je retikulo-filamentozna supstancija tamnomodro bojadisana, a eritrociti su svijetlozeleni.

U preparatu smo uvijek nalazili mnogobrojne artefakte od ostataka boje, koja se nije dobro izmiješala s krvi, a većina eritrocita i retikulocita bila je zdrobljena ili samo oštećena zbog povlačenja objektnih stakala jedno preko drugoga.

Da izbjegnemo mnogobrojnim artefaktima u preparatu, stavljali smo na objektna stakla tanji sloj boje. Zbog smanjene količine boje, bilo je vrlo malo artefakata, ali su retikulociti sa slabo bojadisanom retikulo-filamentoznom supstancijom bili jedva vidljivi.

Da izbjegnemo mrvljenju eritrocita i retikulocita nismo povlačili objektna stakla jedno preko drugoga, nego smo miješali krv i boju 2—3 min. podizanjem i spuštanjem objektnih stakala jedno na drugo. Tim smo postupkom dobili preparate bez smrvljenih i oštećenih eritrocita i retikulocita, ali se krv nije dobro promiješala s bojom, te smo u preparatu dobivali ugruške neobojene krvi, koji su ometali brojenje retikulocita.

Prema tim iskustvima trebalo je učiniti neke izmjene u tehničkom postupku, da bi se izbjeglo mrvljenje eritrocita i retikulocita i onečišćenju preparata ostacima neiskorištene boje. To smo potpuno postigli našim izmjenama u modificiranoj Wolferovoj metodi (5):

Na dobro očišćeno objektno staklo razmažu se staklenim štapićem 2—3 kapi 1%-ne otopine briljant-krezilnog modrila u apsolutnom alkoholu, i preparat se ostavlja da se osuši na zraku. Neposredno pred porabom navlaži se osušena površina boje hukanjem, i na nju se uhvate s jagodice prsta 2—3 kapi svježe krvi. S pomoću koso položenog pokrovnog stakla ta se krv razmazuje u oba smjera kroz jednu i pol do dvije minute. Time se postizava miješanje krvi i boje. Jednolično izmiješana i tamnozeleno bojadisana krv prenosi se

čistim pokrovnim staklom na čisto objektno staklo, i razmaže se tanki razmaz, koji se na zraku brzo suši i postane jasnozeleno boje. U suhom preparatu mogu se odmah brojiti retikulociti. Retikulo-filamentozna supstancija je jasno tamnomodro bojadisana, a eritrociti su zeleni.

Tako bojadisan preparat može se prebojadisati razrijeđenom otopinom Giemse (30 min.), ali ga prije treba fiksirati metilnim alkoholom (3—5 min.).

Našim izmjenama u tehničkom postupku bojadisanja retikulocita postigli smo potpun uspjeh ne samo u čistoći preparata i jasnoći bojadisanih retikulocita, nego je to s obzirom na utrošeno vrijeme za bojadisanje retikulocita vrlo kratak postupak (3 min.), kojim se dobivaju preparati trajne vrijednosti. Osim toga pogodan je za rad u laboratorijima i na terenu, gdje treba prirediti više od deset preparata za pretragu retikulocita u krvi u jednom danu. Da pojednostavnimo rad u laboratoriju ili na terenu, možemo najednput prirediti i premazati bojom 100 ili 200 objektnih stakala. Osušimo boju na zraku i složimo stakla u kutije, da se ne zapraše. te ih po potrebi trošimo.

LITERATURA:

1. I. Botteri: Unutarnje bolesti, 1948.
2. H. Horster: Grundriss der klinischen Diagnostik, 1944.
3. E. Merck: Medizinisch-chemische Untersuchungsmethoden, 1939.
4. Müller-Seiffert: Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik, 1944.
5. L. Schudel: Leitfaden der Blutmorphologie, 1938.
6. Tillmann-Ohnesorge: Praktikum der klinischen, chemischen, mikroskopischen und bakteriologischen Untersuchungsmethoden, 1943.

RESUMÉ

NOS EXPERIENCES AVEC LA COLORATION DES RETICULOCYTES

L'auteur décrit d'abord la coloration des réticulocytes selon certaines méthodes connues. Il note ensuite qu'au laboratoire de la Policlinique pour les maladies professionnelles à Zagreb les changements suivants ont été introduits — à la base des expériences acquises — au procédé technique de la méthode Wolfer modifiée pour la coloration des réticulocytes.

Sur une lame bien nettoyée on fait avec une baguette un frottis de 2—3 gouttes d'une solution 1 : 100 du bleu de crésyl-brillant dans l'alcool absolu, et on laisse la préparation sécher à l'air. Immédiatement avant l'usage la surface séchée de la couleur est humectée à l'haleine et 2—3 gouttes de sang y sont ajoutées. Le sang est étendu dans les deux sens pendant 1½—2 minutes avec une lamelle couvreobjet inclinée, il est mélangé à la couleur et il est ensuite transporté avec une lamelle sur une lame propre en frottis mince qui sèche rapidement à l'air.

Les réticulocytes se distinguent bien sur une préparation colorée ainsi étant donné que la substance réticulofilamenteuse se présente en une couleur bleue-foncée tandis que les érythrocytes sont verts.