

Archiv

für

pathologische Anatomie und Physiologie

und für

klinische Medicin.

Bd. LXXXVII. (Achte Folge Bd. VII.) Hft. 2.

VIII.

Die Zählung der weissen Zellen des Blutes.

Von Prof. R. Thoma,

erstem Assistenten am pathologischen Institute in Heidelberg.

Die Zählung der weissen Zellen des Blutes stösst auf eigenartige Schwierigkeiten aus dem Grunde, weil bei den gebräuchlichen Zählmethoden das Blut sehr stark verdünnt wird. Die Folge ist, dass alsdann in dem Zählraume sehr wenige weisse Zellen enthalten sind. Im normalen menschlichen Blute darf man im Cbmm. durchschnittlich etwa 5000 bis 10000 farblose Zellen erwarten. Wenn man daher das Blut im Verhältnisse von 1:100 mit 3 Proc. Kochsalzlösung verdünnt und in dem von Lyon und mir ¹⁾ angegebenen Apparate untersucht, wird man erst in 40 bis 80 Feldern ein weisses Blutkörperchen finden, und in dem ganzen, 400 Felder umfassenden Präparate durchschnittlich fünf bis zehn. Eine einigermaassen brauchbare Zählung sollte sich aber nie auf weniger als auf 300 bis 600 farblose Zellen erstrecken, da anderen Falles die in jenem Aufsatze besprochenen variablen Fehler der Methode so gross werden, dass dem Ergebnisse kaum irgend welche Bedeutung zuzumessen ist. Somit erscheint eine Verbesserung der Zählungsmethode dringend geboten. Diese kann aber nicht durch eine Aen-

¹⁾ Lyon und Thoma, Ueber die Methode der Blutkörperzählung. Dieses Archiv Bd. 84.

derung des Zählapparates angestrebt werden. Der letztere muss, wie früher genauer nachgewiesen wurde, in so ferne für vollkommen angesehen werden, als es unmöglich ist, die Fehler des Resultates in anderer Weise weiter zu vermindern, ausser durch Zählung einer sehr grossen Zahl von Zellen. Die Vervollkommnung der Methode ist demnach durch eine Aenderung des zu zählenden Objectes herbeizuführen, welche gestattet eine grössere Zahl von weissen Blutkörpern in dem gegebenen Zählraume zu vereinigen.

Der in Rede stehende Uebelstand kann beseitigt werden, indem man das Blut nur in viel schwächeren Verhältnissen verdünnt. Dann aber wird die grosse Zahl der vorhandenen rothen Blutkörper der Zählung im höchsten Grade hinderlich. Um letztere zu ermöglichen, ist man darauf angewiesen die rothen Blutkörper in Lösung zu bringen. Damit ist in allgemeinen Zügen die Methode gegeben, die ich zur Zählung der weissen Blutkörper vorschlagen möchte.

Auf meinen Wunsch verfertigt C. Zeiss in Jena gegenwärtig Mischgefässe nach dem Muster des Melangeur-Potain von Malassez, welche gestatten das Blut im Verhältnisse von 1:10 zu verdünnen. Verwendet man alsdann zur Verdünnung eine wässrige Flüssigkeit, welche $\frac{1}{3}$ Proc. Essigsäurehydrat enthält, so gehen bei der Mischung alle rothen Blutkörper in Lösung, während die weissen Zellen ungelöst bleiben und nur in so ferne verändert werden, dass die Kerne sehr deutlich hervortreten. Von dieser Blutmischung bringt man unter den bekannten Vorsichtsmaassregeln ein kleines Tröpfchen in die Zählkammer des oben erwähnten Zählapparates und zählt bei einer etwa 200fachen Vergrösserung. Die Zählung ist auch bei dieser Versuchseinrichtung wesentlich erleichtert durch den Umstand, dass die farblosen Zellen rasch sedimentiren und am Boden der Zählkammer sich in einer Ebene ausbreiten. In einem Gesichtsfelde des Mikroskops kann man nunmehr, normales Blut vorausgesetzt, 10 bis 20 farblose Blutkörper zählen. Diese Zahl ist immerhin noch so gering, dass es sich nicht empfiehlt, die quadratische Feldertheilung am Boden der Zählkammer zu benützen. Vielmehr erscheint es practisch, das ganze Gesichtsfeld des Mikroskops zur Flächeneinheit zu wählen und seinen Inhalt abzuzählen, wobei man durch Drehen der Stellschraube sich überzeugen muss, ob alle farblosen Zellen sedimentirt sind. Es ereignet sich nemlich zuweilen, dass einzelne farblose Zellen nicht sedimentiren. Sie

finden sich alsdann entweder an der unteren Fläche des Deckglases, oder aber anhängend an einzelnen kleinen, nur bei starken Vergrößerungen sichtbaren Resten rother Blutkörper. Die Zählung dieser nicht sedimentirten Zellen bietet keinerlei Schwierigkeiten. Sie wird weiterhin bedeutend zuverlässiger, wenn man in das Ocular eine kleine, gleichfalls bei C. Zeiss angefertigte Glasplatte einlegt. Auf dieser findet sich eine Feldertheilung, die gestattet, mit Musse die verschiedenen Abschnitte des Gesichtsfeldes durchzuzählen.

Behufs Ausrechnung des Resultates wird es nunmehr nothwendig, die Oberfläche desjenigen Theiles des Bodens der Kammer zu messen, welcher in einem Gesichtsfelde enthalten ist. Als Maassstab dient dabei am zweckmässigsten die Feldertheilung am Boden der Kammer selbst, welche bei der Zählung nicht direct benützt wird. Man beschickt die Kammer mit der genannten Blutverdünnung und bringt dieselbe unter das Mikroskop. Vor der Zählung gelingt es leicht durch Ausziehen oder Verkürzen des Tubus die Vergrößerung des Mikroskops so zu ändern, dass der Durchmesser des Gesichtsfeldes genau ein Ganzes Vielfaches der Theilung am Boden der Kammer beträgt. Man kann sich diese Stellung des Tubusauszuges markiren, und sie ist für das benützte Ocular und Objectiv so lange gültig, als die Deckglasdicke gleich bleibt. Bei Benützung verschiedener Deckgläser dient aber diese Marke zur groben Einstellung des Tubusauszuges, wodurch dann die Auffindung der genauen Einstellung sehr erleichtert und beschleunigt wird. Die Rechnung selbst ist aber einfach. Gesetzt der Durchmesser des Gesichtsfeldes betrage gerade 11 Theilungen der Kammer, so ist diese Länge gleich $11 \times \frac{1}{20}$ Mm., da die Längeneinheit der Theilung genau gleich ist $\frac{1}{20}$ Mm. Der Radius des Gesichtsfeldes beträgt in diesem Falle $\frac{1}{2} \times 11 \times \frac{1}{20}$ Mm. gleich $\frac{11}{40}$ Mm. Die Oberfläche des Gesichtsfeldes ist alsdann gleich

$$\pi \left(\frac{11}{40} \right)^2 \square \text{Mm.}$$

Der Cubikinhalt des Zählraumes, der einem Gesichtsfelde entspricht, wird somit bei einer Kammertiefe von 0,100 Mm. gleich

$$0,1 \left(\frac{11}{40} \right)^2 \pi \text{ Cbmm.}$$

Setzt man diesen Cubikinhalt gleich Q, und nimmt man an, dass z. B. auf 50 Gesichtsfeldern, die man leicht in einem Präparate zählen kann, da man bei der Zählung nicht an die Feldertheilung am Kammerboden gebunden ist, enthalten gewesen wären im Ganzen

950 Zellen, so folgt der Gehalt des Cbmm. Blutmischung an weissen Zellen gleich

$$\frac{950}{50 Q} \text{ Zellen.}$$

Wenn nun die Verdünnung der Blutflüssigkeit 1:10 betrug (10 Vol. Mischung enthalten 1 Vol. Blut), wird der Gehalt des Cbmm. unverdünnten Blutes an farblosen Zellen gleich

$$\frac{950}{50 Q} \times 10 \text{ Zellen}$$

oder gleich 7998 Zellen.

In allgemeinerer Weise lässt sich diese Formel aufstellen, wenn man die Zahl der durchgezählten Gesichtsfelder gleich m und die Zahl der in diesen gefundenen Zellen zusammen gleich Z setzt, und eine Verdünnung des Blutes im Verhältnisse 1: a annimmt. Es ergeben sich alsdann im Cbmm. unverdünnten Blutes

$$\frac{aZ}{m Q} \text{ Zellen,}$$

wobei

$$Q = 0,1 \pi R^2$$

und R gleich dem Radius des Gesichtsfeldes in Millimetern. Diese Berechnung ist um soviel einfacher, da für jeden Apparat (inclusive Mikroskop) die Grösse Q ein für alle Male ausgerechnet werden kann.

Es bedarf wohl keiner besonderen Betonung, dass die variablen Fehler solcher Beobachtungen nach den gleichen Methoden bestimmt werden können, welche in der erwähnten Abhandlung für die Zählung der rothen Blutkörper in Anregung gebracht wurden. Dies bestätigte sich auch bei Gelegenheit der weiterhin mitzutheilenden Zählungen. Nur die Frage nach etwa vorhandenen constanten Beobachtungsfehlern beansprucht eine eingehendere Erörterung.

Der Apparat hat gegenüber demjenigen, welcher zur Zählung der rothen Blutkörper benützt wurde, keine wesentliche Aenderung erfahren. Es wird daher gerechtfertigt sein, nach dem Inhalte jener früheren Mittheilung, diesen als soweit fehlerfrei zu betrachten, als sich dies mit aller Sorgfalt durch Zählungen prüfen lässt. Dagegen möchte vielleicht der Anwendung der Essigsäure zur Lösung der rothen Blutkörper der Vorwurf gemacht werden, dass dieses differente Mittel einen Theil der weissen Zellen auflösen oder unkenntlich machen könnte. Dieser Vorwurf findet zwar für die $\frac{1}{3}$ procen-

tige Essigsäure in den bisherigen Erfahrungen keine Anhaltspunkte, allein er wird dennoch zu berücksichtigen sein, da die früheren Untersuchungen diese Frage doch nicht ganz direct berühren. Genau genommen erhebt sich für jede Flüssigkeit, mit welcher man das Blut behufs Zählung seiner Zellen verdünnt, die gleiche Schwierigkeit. Bezüglich der Zählung der rothen Zellen kann sie aber als beseitigt angesehen werden, weil Zählungen mit sehr verschiedenartigen Verdünnungsflüssigkeiten übereinstimmende Resultate ergeben haben. An den weissen Zellen des mit $\frac{1}{3}$ procentiger Essigsäure verdünnten Blutes nimmt man keine Auflösungserscheinungen wahr, wenn man die Zählung an dem gleichen Präparate innerhalb eines Intervalles von 12 bis 18 Stunden wiederholt. Dieses Ergebniss spricht bereits gegen das Vorhandensein eines solchen constanten Fehlers, allein er bleibt immer noch zu untersuchen, ob nicht während der Vornahme der Blutmischung bereits ein Theil der weissen Zellen in Lösung geht.

Zur Hebung dieses Zweifels wird es somit nothwendig die farblosen Zellen des gleichen Blutes in verschiedenen Verdünnungsflüssigkeiten zu zählen. Indessen empfiehlt es sich nicht, in ähnlicher Weise wie bei der Prüfung der Zählungsmethode der rothen Blutkörper, dazu defibrinirtes Blut zu verwenden, weil man nicht sicher ist, dass die Fibringerinnung nicht nachträglich noch fortschreite, wobei einige farblose Zellen aufgelöst werden könnten. Auch ist die Zahl der weissen Zellen in defibrinirtem Blute voraussichtlich so gering, dass dadurch die Abzählung einer grösseren Zahl derselben in hohem Grade zeitraubend und schwierig wird. Diese Erwägung bestimmte mich, ausschliesslich frisches Menschenblut zu verwenden, um so mehr, da es gerade darauf ankommen musste, für das menschliche Blut die Fehler der Methode zu prüfen. Somit war die Aufgabe gegeben die weissen Zellen im menschlichen Blute zu zählen, erstens mit Hülfe der soeben beschriebenen Essigsäureverdünnung und zweitens mit Zuhülfenahme einer anderen mehr indifferenten Verdünnungsflüssigkeit.

Am meisten geeignet zu solchen Controlzählungen erschien eine 3procentige Kochsalzlösung. Wenn man mit Hülfe des oben erwähnten Mischgefässes ¹⁾ das menschliche Blut im Verhältnisse

¹⁾ Dieses besitzt Theilungen um in verschiedenen Verhältnissen zwischen 0,1 : 10 und 1 : 10 zu verdünnen.

von 0,3:10 gleich 1:33,33 verdünnt und in die Kammer einführt, bilden die rothen Zellen immer noch eine einfache Schicht am Boden der Kammer, und zwischen den einzelnen Zellen bleibt immer noch ein reichlicher Zwischenraum um alle einzelnen Elemente genau unterscheiden zu können. Damit wird es möglich in einem Gesichtsfelde, normales Blut vorausgesetzt, durchschnittlich 3 bis 6 weisse Zellen zu vereinigen und mit den obigen Hilfsmitteln im Laufe einiger Stunden 300 bis 400 weisse Zellen zu zählen. Ich verfuhr nun in der Weise, dass ich bei dem gleichen Individuum täglich zur gleichen Tagesstunde einen Tropfen Blut entnahm und die weissen Zellen desselben abwechselnd in Essigsäure und in Kochsalz zählte. Es stellte sich dabei zunächst auch der grosse Vortheil der Essigsäuremethode heraus, indem diese durchschnittlich 3 bis 5 Mal rascher zum Ziele führte und dabei unverhältnissmässig weniger ermüdete.

Erste Versuchsreihe.

Blut eines gesunden, regelmässig lebenden Mannes von 52 Jahren. Derselbe hat die Gewohnheit in den ersten Tagesstunden zu frühstücken und alsdann nichts Weiteres zu geniessen bis zu der 4 Uhr Nachmittags beginnenden Hauptmahlzeit. Blutabnahme zwischen 12 und 2 Uhr Nachmittags. In den mit Essigsäure verdünnten Blutportionen wurden in jedem Versuche zwischen 1000 und 1600 Zellen gezählt. In den mit Kochsalzlösung versetzten Blutproben dagegen 300 bis 500 Zellen. Die Zählungsergebnisse sind folgende:

Versuchstag.	Gehalt des Chmm. Blut an weissen Zellen.	
	Kochsalzmethode.	Essigsäuremethode.
1.	—	9067
2.	—	6784
3.	—	7626
4.	7377	—
6.	—	8620
7.	6901	—
8.	9441	—
9.	—	10590
9.	8962	—
10.	8521	—

Die Schwankungen des Zellgehaltes in den verschiedenen Versuchen sind ziemlich bedeutend und entschieden grösser, als es sich durch die einfachen Bestimmungsfehler der Zählmethode erklären liesse. Dennoch erscheint es zu lässig aus den beiden Zahlenreihen die arithmetischen Mittel zu nehmen, da die Blutentziehungen unter möglichst übereinstimmenden Verhältnissen an ein und demselben Individuum vorgenommen wurden. Dabei ergibt sich folgendes Resultat:

Kochsalzmethode.

Im Cbmm. Blut finden sich 8240 farblose Zellen. Wahrscheinlicher Fehler dieser Bestimmung gleich 323 Zellen = 3,9 Proc.

Essigsäuremethode.

Im Cbmm. Blut finden sich 8537 farblose Zellen. Wahrscheinlicher Fehler dieser Bestimmung gleich 437 Zellen = 5,1 Proc.

Zweite Versuchsreihe.

Blut eines gesunden Mannes von 24 Jahren. Blutentziehung täglich Morgens 10 Uhr, 1½ Stunde nach dem Frühstück. Die Zählungen erstreckten sich unter Einhaltung der früher erörterten Versuchsanordnungen, täglich auf 100 Gesichtsfelder. In diesen fanden sich bei Anwendung der Essigsäuremethode durchschnittlich 1115 Zellen und bei Anwendung der Kochsalzmethode durchschnittlich 309 Zellen. Nach der Ausrechnung gestaltete sich das Resultat wie folgt:

Versuchstag.	Weisse Zellen im Cbmm. Blut.		Wahrscheinlicher Fehler.
	Kochsalzmethode.	Essigsäuremethode.	
1.	4430	—	195
2.	—	4777	92
3.	5856	—	182
4.	—	5578	108
5.	5720	—	254
6.	—	5852	122
7.	5737	—	201
8.	—	5276	101
9.	4753	—	154
10.	—	5522	125
11.	5007	—	193
12.	—	7066	120

Aus diesen Zahlen ergibt sich sodann als Gesamtergebnis dieser zweiten Versuchsreihe:

Kochsalzmethode.

Im Cbmm. Blut 5251 farblose Zellen. Wahrscheinlicher Fehler dieser Bestimmung 165 Zellen = 3,1 Proc.

Essigsäuremethode.

Im Cbmm. Blut 5678 weisse Zellen. Wahrscheinlicher Fehler dieser Bestimmung 212 Zellen = 3,7 Proc.

Auch in dieser zweiten Versuchsreihe zeigen die Zahlen, welche an den verschiedenen Tagen für den Gehalt des Blutes an weissen Zellen gefunden wurden, sehr beträchtliche Schwankungen. Diese liegen offenbar ausserhalb der Grenzen der einfachen Bestimmungsfehler, so dass man genöthigt ist, sie zum Theil auf wirkliche Verschiedenheiten in dem Zellgehalte der entleerten Blutstropfen zu beziehen. Ob auch im circulirenden Blute solche Verschiedenheiten vorkommen ist hiermit nicht zu bestimmen. Allein es möchte dies immerhin wahrscheinlich sein, da die Einstiche, die ich behufs der Blutgewinnung in die Haut machte, ziemlich tief waren, und weil in allen übrigen Beziehungen das Verfahren an den verschiedenen Tagen genau übereinstimmte. Diese täglichen Schwankungen des Leukocytengehaltes des entleerten Blutes bestimmen nahezu ausschliesslich die wahrscheinlichen Fehler der Mittelzahlen, die aus den Bestimmungen mehrerer Tage gewonnen wurden. Sie sind so beträchtlich, dass die genannten wahrscheinlichen Fehler keine merkliche Beeinflussung erfahren, sei es dass man täglich nur 300 Zellen zähle, sei es dass man die Zählung auf 1000 Zellen täglich erstrecke. Demgemäss erscheint es ausreichend, wenn man bei der Bestimmung des Gehaltes des Blutes an farblosen Blutkörpern die Zählung auf 300 bis 600 Zellen beschränkt.

Bezüglich der Frage nach constanten Fehlern der Essigsäuremethode dürften diese Versuche ein einfacheres und zuverlässigeres Resultat ergeben, indem sie zeigen, dass die Bestimmungen des Leukocytengehaltes nach beiden Methoden, innerhalb der Grenzen der variablen Fehler, übereinstimmende Resultate ergeben. Wenn die Essigsäuremethode im Durchschnitt einen etwas stärkeren Zellgehalt erkennen liess, so ist dies den variablen Fehlern zuzuschreiben. Möglicher Weise käme dabei auch noch der Umstand in Betracht, dass bei der Zählung der weissen Zellen in Kochsalzlösung, also

in einer Flüssigkeit, in der ausserdem sehr viele rothe Blutkörper liegen, die Gefahr vorhanden ist, einzelne weisse Zellen zu übersehen. Ich war aber gleich von Anfang an auf diese Fehlerquelle aufmerksam geworden und habe demgemäss bei den Zählungen die grösste Sorgfalt walten lassen, so dass die Bedeutung dieser Fehlerquelle für obige Resultate kaum in Betracht kommt. Im Allgemeinen aber zeigt sich, dass die hier in Anregung gebrachte Zählung der farblosen Zellen nach Auflösung der rothen durch Essigsäure nicht nur rascher und bequemer zum Ziele führt, sondern dass sie auch zuverlässiger ist, indem sie die genannte Fehlerquelle beseitigt.

Die Einzelheiten der Methode erfahren kaum irgend welche Aenderungen, wenn die Zahl der weissen Blutkörper mehr oder weniger erheblich vermehrt ist. Nur kann man sich zuweilen veranlasst sehen, das Blut in anderen Verhältnissen z. B. 0,5 auf 10 gleich 1 auf 20 zu verdünnen. Hierzu sind an der Calibrirung der Capillarröhre des Mischgefässes noch weitere Theilungen angebracht. Speciell zur Diagnose der Leukämie bedarf es aber in der Regel gar keiner Zählungen wenngleich solche auch bei dieser Erkrankung gewiss sehr erwünscht sind. Hier finden sich nicht selten 500000 weisse Zellen im Cbmm. Blut. Verfertigt man also nach obigen Regeln ein Essigsäurepräparat, so erscheint bereits auf den ersten Blick in das Mikroskop die Diagnose sicher, indem nunmehr statt 10 etwa 1000 farblose Zellen in dem Gesichtsfelde von der angegebenen Grösse sichtbar sind.

Zum Schlusse dieser Mittheilung möge es gestattet sein, darauf hinzuweisen, dass man auf diesem Wege im Stande ist, ohne bedeutende Schwierigkeiten die verschiedenen Formen der weissen Elemente des Blutes an einer grossen Anzahl von Zellen zu prüfen und auch die relative und absolute Zahl dieser verschiedenen Formen festzustellen. Durch eine solche Detaillirung der Untersuchung dürften voraussichtlich die Erfahrungen über die Zusammensetzung des Blutes sowohl im gesunden als namentlich im erkrankten Zustande eine nicht unwesentliche Bereicherung erfahren.
