

# 1η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Επ. Καθ. Αικατερίνη Χλίχλια

## ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Το αίμα αποτελείται από υγρό που περιέχει τα **λευκοκύτταρα**, τα **ερυθροκύτταρα** και τα **αιμοπετάλια**. Το υγρό είναι υδατικό διάλυμα αλάτων, υδατανθράκων και πρωτεϊνών. Η ολική ποσότητα του αίματος στο σώμα ενός οργανισμού αποτελεί συνήθως το 1/12 του βάρους του. Τα κύτταρα αποτελούν κάτι λιγότερο από το 50% του όγκου του αίματος.

Αν από το αίμα αφαιρεθούν τα κύτταρα παραμένει το **πλάσμα**. Αν από το αίμα αφαιρεθεί η ινική παραμένει ο **ορός**. Το αίμα μόλις το πάρουμε από κάποιον οργανισμό θα πήξει μέσα σε μερικά λεπτά. Ο σχηματισμός θρόμβου είναι σύνθετη διεργασία κατά την οποία μία πρωτεΐνη, το ινωδογόνο, μετατρέπεται με τη δράση πολλών ενζύμων και ιόντων ασβεστίου σε αδιάλυτη ινική. Τα περισσότερα κύτταρα του αίματος παγιδεύονται στο θρόμβο της ινικής, ο οποίος ζαρώνει μετά από μερικές ώρες και ελευθερώνει τον ορό που είναι ένα διαφανές κιτρινωπό υγρό. Ο σχηματισμός θρόμβου παρεμποδίζεται αν το αίμα αναμιχθεί με αντιπηκτικές ουσίες (όπως ηπαρίνη, EDTA, κλπ.). Όταν το αίμα που περιέχει αντιπηκτικό φυγοκεντρηθεί, τα κύτταρα κάθονται και αφήνουν ένα διαυγές υπερκείμενο, το πλάσμα, το οποίο περιέχει ακόμα το ινωδογόνο.

Τα **λευκοκύτταρα** αποτελούν μία ετερογενή ομάδα εμπύρηνων κυττάρων του αίματος. Ο ολικός αριθμός λευκοκυττάρων στον άνθρωπο κυμαίνεται από 3.5 έως  $10.5 \times 10^9/L$ . Τα λευκοκύτταρα είναι διαφόρων ειδών και ταξινομούνται σε υποπληθυσμούς ανάλογα με το μέγεθος τους, την παρουσία και τον τύπο των κοκκίων, το σχήμα του πυρήνα και το χαρακτήρα του κυτταροπλάσματος. Τα ποσοστά τους στο αίμα του ανθρώπου είναι αρκετά σταθερά:

πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα	50 — 70%
εωζινόφιλα	2 - 5 %
βασεόφιλα	± 0.2 %
λεμφοκύτταρα	20 - 30%
μονοκύτταρα	2 - 6%

Η μορφολογική εξέταση των κυττάρων του αίματος γίνεται μετά από ειδική χρώση του επιχρίσματος κυττάρων αίματος.

## Επίχρισμα αίματος (blood smear)

Υλικά:

αποστειρωμένες βελόνες, σταγόνες αίματος, αντικειμενοφόρες πλάκες, βαμβάκι με αλκοόλη

Μέθοδος:

1. Τρυπάμε το δάκτυλο με αποστειρωμένη βελόνα (λανσέτα), αφού πρώτα το απολυμάνουμε με βαμβάκι εμποτισμένο σε αλκοόλη.
2. Βγάζουμε μία σταγόνα αίμα και την τοποθετούμε στο άκρο μιας καθαρής αντικειμενοφόρου πλάκας.
3. Με μία δεύτερη πλάκα (με γυαλισμένο άκρο) αγγίζουμε τη σταγόνα. Κρατούμε τη δεύτερη πλάκα έτσι ώστε να σχηματίζει γωνία  $45^\circ$ .
4. Αφήνουμε το αίμα να προχωρήσει στα χείλη της δεύτερης πλάκας και μετά τη σπρώχνουμε (με γωνία  $45^\circ$ ) προς το άλλο άκρο της πρώτης πλάκας έτσι ώστε να σχηματιστεί φιλμ από τα κύτταρα του αίματος.
5. Κινούμε την πλάκα στον αέρα για λίγα λεπτά μέχρι να στεγνώσει.
6. Παρασκευάζουμε αρκετά επιχρίσματα έτσι ώστε να επιτύχουμε την καλύτερη δυνατή κατανομή και λεπτή στρώση των κυττάρων.

Η μορφολογική εξέταση των κυττάρων του αίματος γίνεται μετά από χρώση με May-Grünwald-Giemsa.

## Χρώση May-Grünwald-Giemsa (MGG stain)

Η χρώση αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για τα επιχρίσματα αίματος και μυελού των οστών. Περιλαμβάνει ένα μείγμα χρωστικών, όπως:

το μπλε του μεθυλενίου → βάφει μπλε τα όξινα συστατικά του κυττάρου, το κυανό (azure) → βάφει κόκκινα και μώβ τα βασικά κυτταρικά συστατικά και η εωζίνη (ηωσίνη) → βάφει πορτοκαλί-κόκκινα τα αλκαλικά συστατικά του κυττάρου.

Αυτή η χρώση χαρακτηρίζεται ως πανοπτική, επειδή βάφει όλα τα κυτταρικά συστατικά. Επειδή η τιμή του pH είναι πολύ σημαντική για τις ιδιότητες χρώσης, οποιαδήποτε αλλαγή του pH θα οδηγήσει σε λανθασμένη αντίδραση χρώσης. Τα όρια βέλτιστου pH είναι μεταξύ 6.5 και 6.8.

Στη χρώση αυτή βάφονται μπλε το RNA, το κυτταρόπλασμα και οι πυρηνίσκοι. Το DNA και τα πρωτογενή κοκκία βάφονται κόκκινα και μωβ, καθώς και πορτοκαλί-κόκκινα η αιμογλοβίνη και τα εωζινοφιλικά κοκκία.

**Υλικά:**

επίχρισμα κυττάρων αίματος, δοχεία και στατώ για χρώση, χρωστική May-Grünwald, χρωστική Giemsa, απεσταγμένο νερό

**Μέθοδος:**

1. Βυθίζουμε την αντικειμενοφόρο με το επίχρισμα αίματος στο δοχείο με τη χρωστική May-Grünwald.
2. Παραμονή 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προετοιμασία του διαλύματος Giemsa: Διαλύουμε 5 ml χρωστική Giemsa σε 50 ml απεσταγμένο νερό στο δοχείο χρώσης.
4. Ξεπλένουμε το επίχρισμα βυθίζοντας το και ανακινώντας το σε νερό, και το μεταφέρουμε στη συνέχεια στο δοχείο με τη διαλυμένη χρωστική Giemsa.
5. Παραμονή 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Ξεπλένουμε καλά με νερό (βυθίζοντας και ανακινώντας μέσα σε δοχείο νερού).
7. Στεγνώνουμε τις πλάκες στον αέρα.
8. Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο με καταδυτικό φακό (100 x) κάτω από σταγόνα ελαίου.
9. Εξέταση των επιχρισμάτων: Τα κόκκινα κύτταρα είναι ερυθροκύτταρα, τα κύτταρα με ιώδη πυρήνα είναι λευκοκύτταρα. Εξετάζουμε 100 λευκοκύτταρα και τα κατατάσσουμε ανάλογα με τον τύπο τους σε:
  - a. πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα (ταινιοειδή και τετμημένα)
  - b. εωζινόφιλα
  - c. βασεόφιλα
  - d. λεμφοκύτταρα
  - e. πλασματοκύτταρα
  - f. μονοκύτταρα

\* Στη μοντέρνα ανοσοβιολογία αυτή η χρώση δεν προσφέρει και πολλά γιατί δυστυχώς όλα τα μικρά λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν την ίδια όψη, ενώ διαφέρουν στη λειτουργία τους.

## Λευκοκύτταρα (leukocytes)

Τα λευκοκύτταρα είναι μια ετερογενής ομάδα των εμπύρηνων κυττάρων του αίματος. Στη διαχωριστική φυγοκέντρηση του αίματος σχηματίζουν μία άσπρη ενδιάμεση ζώνη μεταξύ των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος, γνωστή ως **λευκοκρίτης (buffy coat, leukocrit)**. Ο λευκοκρίτης πολύ σπάνια λαμβάνεται υπόψη στην κανονική μέτρηση λευκοκυττάρων, αλλά είναι πολύ σημαντικός σε περιπτώσεις με αυξημένα επίπεδα λευκοκυττάρων, όπως για παράδειγμα στις λευχαιμίες.

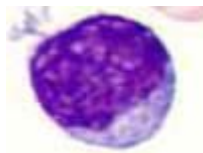
Τα ουδετερόφιλα, εωζινόφιλα, και βασεόφιλα κοκκιοκύτταρα υπάρχουν κανονικά στο αίμα, όπως και τα μονοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα και τα πλασματοκύτταρα. Όλα αυτά συμμετέχουν στις διεργασίες φλεγμονής και καταπολέμησης των λοιμώξεων. Οι μυελοβλάστες, τα προμυελοκύτταρα, τα μυελοκύτταρα, τα μεταμυελοκύτταρα και οι λευχαιμικοί βλάστες εμφανίζονται μόνο σε παθολογικές περιπτώσεις στο περιφερικό αίμα.

Τα επίπεδα αναφοράς των λευκοκυττάρων είναι μεταξύ  $3.5$  και  $10.5 \times 10^9/L$ . Η μείωση του αριθμού των λευκοκυττάρων κάτω από τα επίπεδα αναφοράς είναι γνωστή ως **λευκοπενία** (leucopenia), ενώ η αύξηση ως **λευκοκυττάρωση** (leukocytosis).

Η μέτρηση του ολικού αριθμού των λευκοκυττάρων είναι μία επιφανειακή παράμετρος λόγω της ετερογένειας κυτταρικών τύπων. Αντιθέτως, η μέτρηση των λευκοκυττάρων στους διάφορους υποπληθυσμούς θεωρείται πολύ σημαντική και είναι γνωστή ως **διαφορική μέτρηση** (differential count). Τα αποτελέσματα της διαφορικής μέτρησης δίδονται και σε απόλυτους αριθμούς και σε σχετικούς αριθμούς (ποσοστιαίους). Διαγνωστική αξία όμως έχουν μόνον οι απόλυτες τιμές!

## Λεμφοκύτταρα (lymphocytes)

Εμφάνιση:



Τα λεμφοκύτταρα έχουν ένα στρόγγυλο προς οβάλ πυρήνα και το μέγεθός τους μοιάζει περίπου το μέγεθος των ερυθροκυττάρων. Το κυτταρόπλασμα

χρωματίζεται γκρι-μπλε. Ο όγκος του κυτταροπλάσματος μπορεί να ποικίλει πολύ. Ως αποτέλεσμα αυτού, το μέγεθος του κυττάρου ποικίλλει από 9 έως 20  $\mu\text{m}$ . Η διαφορά στον όγκο του κυτταροπλάσματος είναι η αιτία διάκρισης των λεμφοκυττάρων σε μικρά και μεγάλα. Η διαφορά αυτή αντανακλά τις διάφορες φάσεις ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων.

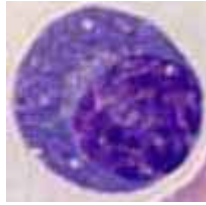
Τα λεμφοκύτταρα του αίματος μετά από χρώση κατατάσσονται σε δύο κυρίους μορφολογικούς τύπους. Τα κύτταρα του ενός τύπου είναι σχετικά μικρά, συνήθως δεν διαθέτουν κοκκία και εμφανίζουν μεγάλο λόγο πυρήνα προς κυτταρόπλασμα (N:C). Τα κύτταρα του άλλου τύπου, γνωστά ως **μεγάλα, κοκκιώδη λεμφοκύτταρα** (LGL, large granular lymphocytes), είναι μεγαλύτερα, έχουν μικρότερο λόγο N:C και περιέχουν κυτταροπλασματικά, αζουρόφιλα κοκκία. Αποτελούν το 5-10% όλων των λεμφοκυττάρων. Μορφολογικά χαρακτηριστικά LGL παρουσιάζει η γάμμα/δέλτα υποομάδα των T λεμφοκυττάρων (γδ T λεμφοκύτταρα) καθώς και τα φυσικά φονικά ή NK κύτταρα (natural killer cells).

Ο κανονικός αριθμός λεμφοκυττάρων του αίματος είναι μεταξύ  $1.0$  και  $3.5 \times 10^9/\text{L}$ . Ο αριθμός αυτός υποδηλώνει ότι τα λεμφοκύτταρα είναι αμέσως μετά ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα τα πιο συχνά λευκοκύτταρα που απαντώνται σε επιχρίσματα αίματος. Ο μέσος ενήλικος άνθρωπος έχει περίπου  $10^{12}$  λεμφοκύτταρα. Δεν υπάρχει μορφολογική διάκριση μεταξύ B και T λεμφοκυττάρων. Τα λεμφοκύτταρα είναι οι μεσολαβητές της κυτταρικής και χυμικής ανοσίας.

**Λεμφοπενία** (lymphopenia) παρατηρείται σε περιπτώσεις που ο αριθμός λεμφοκυττάρων είναι χαμηλός, ενώ **λεμφοκυττάρωση** (lymphocytosis) σε περιπτώσεις αυξημένου αριθμού λεμφοκυττάρων. Λεμφοκυττάρωση παρατηρείται στα λεμφοπολλαπλασιαστικά σύνδρομα, ενώ λεμφοπενία σε περιπτώσεις λοιμώξεων (όπως π.χ. HIV, φυματίωση), μετά από ραδιοθεραπεία και κατά τη διάρκεια θεραπείας με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα.

## Πλασματοκύτταρα (plasma cells)

Εμφάνιση:

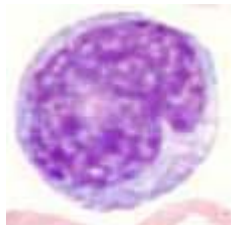


Τα πλασματοκύτταρα πολύ σπάνια συναντώνται στο περιφερικό αίμα. Είναι μεγαλύτερα από τα λεμφοκύτταρα με διάμετρο 15-20 μm. Εκκεντρικοί πυρήνες με διαυγή περιπυρηνική περιοχή και βασεόφιλο κυτταρόπλασμα είναι τα τυπικά χαρακτηριστικά των πλασματοκυττάρων. Η λειτουργία τους είναι η παραγωγή αντισωμάτων.

Τα κανονικά επίπεδα πλασματοκυττάρων είναι  $0 - 0.1 \times 10^9/L$ . Η ύπαρξή τους στο περιφερικό αίμα μπορεί να είναι αποτέλεσμα εμβολιασμού. Η αύξηση του αριθμού των πλασματοκυττάρων χαρακτηρίζεται ως **πλασματοκυττάρωση** (plasmacytosis). Καλοήθης πλασματοκυττάρωση παρατηρείται σε περιπτώσεις ιικών μολύνσεων όπως η ιλαρά. Απελευθέρωση πλασματοκυττάρων στο περιφερικό αίμα συμβαίνει μερικές φορές σε ασθενείς με προχωρημένο **πλασματοκύττωμα** (πλασματοκυτταρικό κακοήθες λέμφωμα, plasmacytoma).

## Μονοκύτταρα (monocytes)

Εμφάνιση:



Με διάμετρο 15-20 μm τα μονοκύτταρα είναι τα μεγαλύτερα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Η μορφή τους είναι ετερογενής. Μπορούν να σχηματίζουν ψευδοπόδια στην εξωτερική μεμβράνη. Το κυτταρόπλασμα είναι μπλε-γκρι και πολύ συχνά παρουσιάζουν λεπτά αζουρόφιλα κοκκία και οργάνια. Ο πυρήνας μπορεί να είναι πεταλοειδής ή να παρουσιάζει λοβούς.

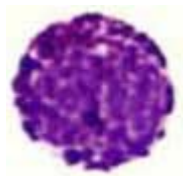
Τα κανονικά επίπεδα μονοκυττάρων κυμαίνονται από  $0.2 - 1.0 \times 10^9/L$ . Η αύξηση του αριθμού των μονοκυττάρων είναι γνωστή ως **μονοκυττάρωση** (monocytosis), ενώ η μείωση ως **μονοκυτταροπενία** (monocytopenia).

Τα μονοκύτταρα έχουν ιδιαίτερη ικανότητα μετανάστευσης. Όταν μεταναστεύουν στους ιστούς αποκαλούνται **μακροφάγα**. Τα μονοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στις οξείες και χρόνιες λοιμώξεις. Φαγοκυτταρώνουν ενεργά και είναι σημαντικά στοιχεία της κυτταρο-μεσολαβητικής ανοσίας.

Η μονοκυττάρωση συσχετίζεται με διάφορες χρόνιες λοιμώξεις (όπως η φυματίωση, ο τυφοειδής πυρετός) και με κακοήθεις ασθένειες (όπως π.χ. Hodgkins). Μονοκυττάρωση παρατηρείται και στην οξεία αλλά και στη χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία. Μονοκυτταροπενία παρουσιάζεται στην απλασία του μυελού των οστών, στη λευχαιμία από τριχωτά κύτταρα και μετά από θεραπεία αγωγής με στεροειδή.

## Βασεόφιλα (basophils)

Εμφάνιση:

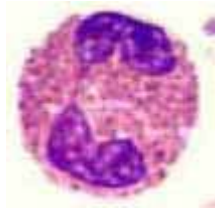


Το βασεόφιλο κοκκιοκύτταρο με διάμετρο 10-14  $\mu\text{m}$  είναι μικρότερο από τα άλλα κοκκιοκύτταρα. Τα σκούρα μωβ κοκκία είναι πολύ πυκνά πακεταρισμένα και επικαλύπτουν τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα.

Τα κανονικά επίπεδα των βασεόφιλων κυμαίνονται από 0 έως  $0.15 \times 10^9/L$ . Πολύ σπάνια συναντώνται σε επιχρίσματα αίματος. Τα βασεόφιλα παίζουν σημαντικό ρόλο σε αντιδράσεις υπερευαισθησίας. Μπορούν να φύγουν από την κυκλοφορία του αίματος και να μεταναστεύσουν στους περιβάλλοντες ιστούς. Η αύξηση του αριθμού των βασεόφιλων χαρακτηρίζεται ως **βασεοφιλία** (basophilia). Βασεοφιλία παρατηρείται στις περιπτώσεις χρόνιας μυελοκυτταρικής λευχαιμίας και στα άλλα μυελοπολλαπλασιαστικά σύνδρομα.

## Εωζινόφιλα/Ηωσινόφιλα (eosinophils)

Εμφάνιση:



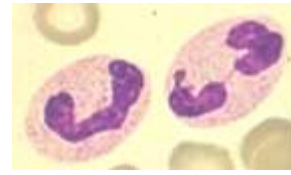
Τα εωζινοφιλα κοκκιοκύτταρα με διάμετρο 16 μm είναι στρόγγυλα και πολύ λίγο μεγαλύτερα από τα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα. Τα κοκκία είναι ανοιχτά κόκκινα προς πορτοκαλί-κίτρινα και πολύ πυκνά πακεταρισμένα. Ο πυρήνας είναι συνήθως δίλοβος.

Τα εωζινοφιλα σπάνια συναντώνται στο επίχρισμα αίματος και παρουσιάζουν κανονικές τιμές από  $0.02 - 0.4 \times 10^9/L$ . Τα εωζινοφιλα παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλλεργίες καθώς και στις παρασιτικές λοιμώξεις. Όπως και τα ουδετερόφιλα, είναι ικανά να φαγοκυτταρώνουν και να μεταναστεύουν.

Ως **εωζινοφιλία** (eosinophilia) χαρακτηρίζεται ο αυξημένος αριθμός εωζινοφίλων, ενώ ο μειωμένος ως **εωζινοπενία** (eosinopenia). Η εωζινοφιλία προκαλείται κυρίως από αλλεργίες και παρασιτικές ασθένειες. Πολλές φαρμακολογικές αγωγές μπορεί να προκαλέσουν επίσης εωζινοφιλία. Μερικές νεοπλαστικές ασθένειες (όπως π.χ. Hodgkins) έχουν ως επακόλουθο, περιστασιακά, την εωζινοφιλία. Οι περιπτώσεις όπου οι τιμές εωζινοφίλων ξεπερνούν το  $1.5 \times 10^9/L$  στο αίμα και όπου η αιτία πρόκλησης δεν είναι γνωστή, αναφέρονται ως ιδιοπαθή σύνδρομο εωζινοφιλίας. Η εωζινοπενία συναντάται συχνά σε περιπτώσεις στρες και σε οξείες λοιμώξεις.



## Ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα (neutrophils)



Εμφάνιση:



**ταινιοειδή ουδετερόφιλα**  
(band neutrophils)

**τετμημένα ουδετερόφιλα**  
(segmented neutrophils)

Τα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα είναι συνήθως κυκλικά και έχουν ένα ανοιχτό γκρι προς ροζ κυτταρόπλασμα. Η διάμετρος τους είναι γύρω στα 14 μm. Τα κοκκία είναι πολύ λεπτά και χρωματίζονται από κοκκινο-μωβ έως καφέ.

Τα ουδετερόφιλα υποδιαιρούνται με βάση τη δομή του πυρήνα τους σε ταινιοειδή ουδετερόφιλα (band neutrophils) και σε τετμημένα (segmented neutrophils) ουδετερόφιλα. Τα ταινιοειδή κύτταρα, όπου ο πυρήνας μοιάζει με λυγισμένη ταινία, είναι πιο νέα και ανώριμα από τα τετμημένα κύτταρα. Τα ουδετερόφιλα με πολύλοβους πυρήνες, χωρισμένους σε περισσότερα από 4 τμήματα, αναφέρονται ως **υπερτετμημένα** (hypersegmented).

Ο αριθμός των ουδετερόφιλων κυμαίνεται από 1.6 έως  $7.4 \times 10^9/L$ . Η απόκλιση από τα κανονικά επίπεδα προς τα κάτω είναι γνωστή ως **ουδετεροπενία** (neutropenia), ενώ προς τα πάνω ως **ουδετεροφιλία** (neutrophilia).

Μία από τις κύριες λειτουργίες των ουδετερόφιλων είναι η προστασία έναντι βακτηριακών λοιμώξεων, φαγοκυτταρώνοντας και καταστρέφοντας τα παθογόνα. Τα ουδετερόφιλα μπορούν να αφήσουν την αιματική κυκλοφορία και να μεταναστεύσουν στους γύρω ιστούς, έτσι ώστε να καταπολεμήσουν τη μόλυνση. Κανονικά, παραμένουν στην αιματική κυκλοφορία για περίπου 6 ώρες και στους γύρω ιστούς για 1-2 μέρες. Περίπου τα μισά από τα ουδετερόφιλα δεν κυκλοφορούν στο αίμα, αλλά προσκολλώνται στα τείχη των μικρών αγγείων (marginal pool).

Η ουδετεροφιλία μπορεί να έχει πολλές αιτίες πρόκλησης. Η κινητοποίηση των προσκολλημένων ουδετερόφιλων είναι τυπικό χαρακτηριστικό που συμβαίνει κάτω από συνθήκες στρες (λευκοκυττάρωση επαγόμενη από

στρες). Οξείες λοιμώξεις και φλεγμονές μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα και την κινητοποίηση των ουδετερόφιλων από το μυελό των οστών. Η ουδετεροπενία συσχετίζεται με φαρμακολογική αγωγή, με λοιμώξεις (π.χ. παρβοϊοί, ελονοσία) και με αυτοάνοσες ασθένειες (π.χ. συστηματικός ερυθηματώδης λύκος).

Η παρουσία υπερτετμημένων ουδετερόφιλων είναι συνήθως ένδειξη της έλλειψης βιταμίνης B<sub>12</sub> ή φολικού οξέος (μεγαλοβλαστική αναιμία).