مطالعه گلبولهای سفید خون انسان روی یک گسترش خونی

در زیرمیکروسکوپ نوری

هدف ازتهیه گسترش خونی:

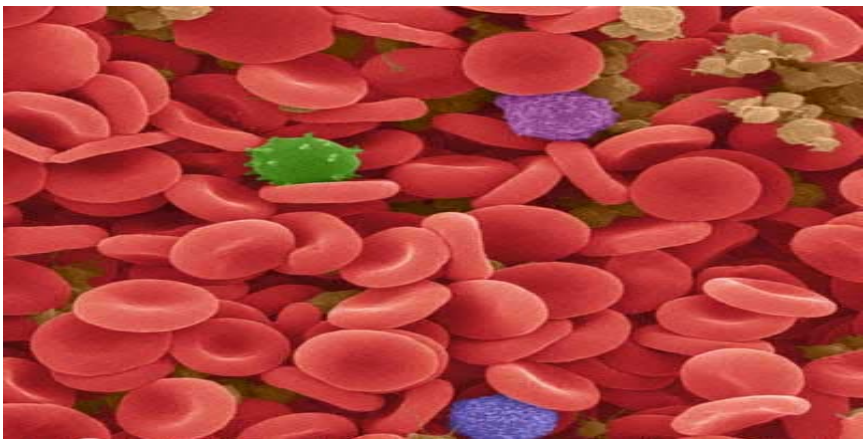
- ✓ شمارش افتراقی گلبولهای سفید(DIFF)
- ✓ بررسی مرفولوژی گلبولها

به طور معمول پنج نوع گلبول سفید مشاهده می شود. نوتروفیل، لنفوسیت، منوسیت، ائوزینوفیل و بازوفیل که تمام این پنج نوع از یک سلول مادر مشترک خونساز منشا می گیرند ولی مکانیسم های هدایت کننده تولید، پخش و فعالیت آنها متفاوت است. تعداد گلبول های سفید به طور طبیعی ۳/۵ تا ۱۰ هزار عدد در میکرولیتر متغیر است.

افزایش یا کاهش تعداد گلبول های سفید به ترتیب لکوسیتوز و لکوپنی نامیده می شوند.

شایعترین علت لکوپنی، مهار مغز استخوان به دنبال مصرف دارو یا تابیدن اشعه است. بعضی از بیماری های ویروسی هم این عارضه را ایجاد می کنند.

لکو سیتوز به طور شایع در عفونت های باکتریال، بیماری های التهابی و خونریزی های همراه با بدخیمی ها دیده می شود.



جهت مشاهده گلبولهای سفید خون در زیر میکروسکوپ باید مقدمات کار را آماده سازیم.

- **خونگیری از شخص**
- **تهیه گسترش خونی**
- **ثابت کردن خون رو ی لام(گسترش خونی)**
- **رنگ آمیز ی گسترش خونی**

خونگیری :

خون باید با یک ماده ضد انعقاد مخلوط شود .چون خون منعقد برای این آزمایش بی فایده است.

ماده ضد انعقاد مناسب این آزمایش یک نوع نمک بنام EDTA (اتیلن دی آمین تنرا استیک اسید) است .

تهیه گسترش خونی:

وسایل کار:

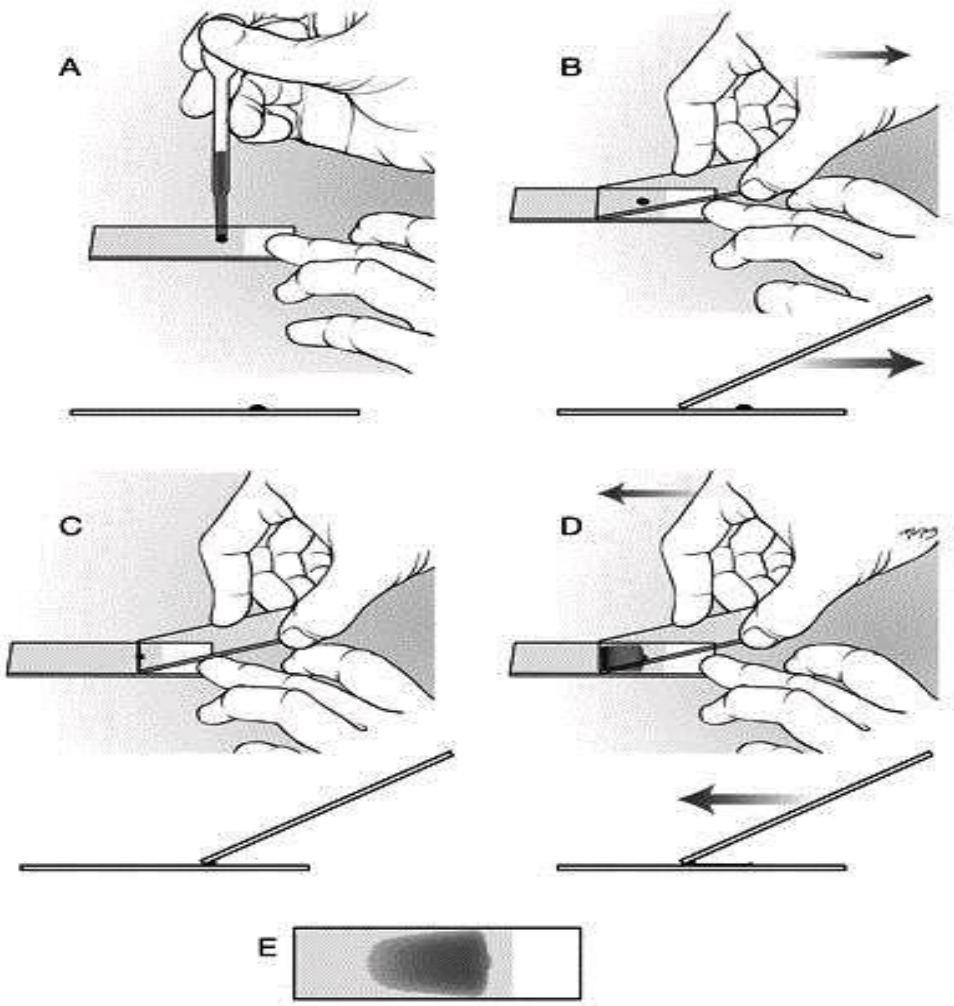
- **دو عدد لام یک بار مصرف تمیز**
- **لوله موئینه ساده**

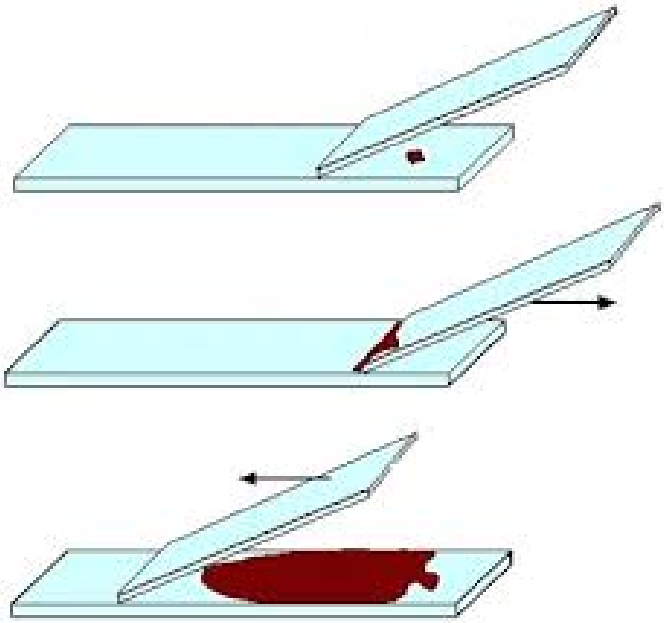
نمونه خون حاوی ماده ضد انعقاد EDTA را به آرامی خوب مخلوط می کنیم.

راه دیگر این ا ست که ابتدا نوک انگشت را تو سط پنبه آغشته به الکل ضد عفونی میکنیم . بعد تو سط یک ضربه لانست نوک انگشت را سوراخ کرده, خون جریان پیدا میکند یک قطره خون را(بو سیله لوله هماتوکریت ساده) در یک سانتیمتری انتهای لام قرار میدهیم . یک قطره خون را بوسیله لوله موئینه در یک سانتیمتری انتهای لام (A) قرار میدهیم . لبه لام (B) را با زاویه (۲۰) درجه بر روی قطره خون قرار می دهیم.

لحظـه ای بعـد خون درســراســر لبـه لام (C) یعنی فصـــل مشــترک دولام انتشـــار می یـابـد. اکنون لام رویی را با زاویه (۲۰) درجه با یک فشارملایم و با سرعت یکنواخت در سطح لام حاوی قطره خون به سـمت جلوحرکت میدهیم (D) . هنگام تهیه گسـترش باید دقت کرد که لبه لام در جلوی قطره خون حرکت کند و به اصطلاح خون را به دنبال خود بکشد و بر روی آن فشار نیاورد. تا بدین ترتیب از له شـدن و تغییر شـکل گویچه های خون در موقع گسـترش جلوگیری شـود چنان چه این کار درسـت انجام گیرد خون گسترش یافته به شکل شعله شمع در می آید.

گسترش خونی آماده شد . می گذاریم خون سطح لام خشک شود. سپس در حاشیه گسترس توسط مداد مشخصات شخص آزمایش شونده را می نویسیم.





ثابت کردن خون روی لام : **اول روی واقعی لام خونی را مشـــخص کرده و علامت زده - همان طرف لام که قبلا رویش خون کشیده ایم.**

ثـابـت کـردن یـا فـیـکـس کـردن خـون روی لام تـوســـط الـکـل مـتـانـول انـجـام مـی گـیـرد روی سطح لام خونی قطره قطره الکل متانول میریزیم . بطوریکه الکل تمام سطح لام خونی را فرا گیرد . صبر می کنیم تا الکل روی سطح لام خوب خشک شود.(این عمل را ثابت کردن لام خونی با الکل گویند.)

نکاتی در مورد لام ها :

۱ – باید لام ها را تمیزوعاری ازچربی انتخاب کرد.

۲ -لام (rode) باید لبه اش صاف باشد

۳ -درفاصله بین تهیه هر گسترش خونی باید لبه لام (rode) را بایک پارچه مرطوب ازخون پاک کنیم تا با نمونه بعدی تداخل صورت نگیرد.

ویژگیهای یک گسترش خونی:

تهیه یک گسترش خونی استاندار واصولی نخستین قدم درتشخیص سلول های خونی طبیعی از غیر طبیعی وحکم درخصوص آنهاست و یک گسترش خونی نادرست باعث اشکال در تشخیص سلول های خونی می شود.

ویژگی ها :

- **گسترش خونی باید دو سوم(۲/۳) سطح لام را ا شغال کند،گسترش خونی کوتاه ارزش پایینی دارد.**
- **گسترش خونی ازابتدا وانتهای لام فاصله داشته باشد.**
- **گسترش خونی مطلوب دارای مناطق ضخیم، متوسط ونازک می باشد.**
- **انتهای گسترش خونی شعله شمعی باشد . انتهای گسترش های خونی ناصاف، کج و نوک تیز بی ارزش تلقی می شود.**
- **یک گسترش خونی خوب دارای دو حاشیه دردو سمت لام دارد**

نکات :

- **تهیه گسترش خونی خوب نیازمند تمرین وممارست است .**
- **به هرحال برای تهیه گسترش خونی نازک با کم کردن زاویه وبرای آماده کردن لام ضخیم با زیاد کردن زاویه به این هدف نایل می شویم.**
- **خاطر نشان می کنم برای تهیه لام خوب درمورد کم خونی ها برداشتن قطره خون بزرگتر یا زیاد کردن زاویه می توان لام مطلوب را بدست آورد.**

یافتن علل ایجاد آرتیفکت درلام های رنگ آمیزی شده:

علتهای ایجاد آرتیفکت (ARTEACTCT) در لامهای رنگ آمیزی شده جهت شمارش افتراقی(DIFF)

الف) درموقع نمونه گیری:

1 - بستن طولانی مدت تورنیکت (HEMOCONCENTRATION) باعث افزایش پارامترهای خونی میشود.حداکثرمدت بسته بودن تورنیکت یک دقیقه است.

2 - کشیدن سریع خون در سرنگ باعث لیز گلبول های قرمز می شود.

***اگر اندازه نیدل سرنگ نامناسب باشد. باعث تغییر فرم گلبول ها می شود.**

***انتقال خون به لوله با فشار باعث تغییر فرم گلبولها می شود. نیدل باید از سرنگ جداشود و خون به آرامی به جدار داخل لوله وارد شود.وبه آرامی با ماده ضدانعقاد مخلوط گردد**

***اگر لوله به مقدار بسیار کمی دترژنت آلوده باشد. یا لوله خشک نباشد خون همولیز می شود.**

***خون گیری از برانول بیماری که سرم دریافت می کند. از علل ایجاد آرتیفکت در لام است .**

ب) ماده ضدانعقاد:

۱- انتخاب ماده ضدانعقاد مناسب برای آزمایش (CBC) ماده ضدانعقاد EDTA است.

۲ -مقدار کم ماده ضد انعقادسبب ایجاد ذرات لخته وخطا در تست می شود.

۳ -مقدار زیاد ماده ضد انعقاد باعث چروکید گی(SHRINKAGE) و تغییر درشکل گلبول های قرمز را درپی دارد.

***مقدار زیاد ماده ضد انعقاد باعث کاهش حجم متوسط گلبول های قرمز می شود. در اصل کاهش (MCV)را درپی دارد.**

***بر اثر ماندن خون بر روی ماده ضد انعقاد EDTAتغییراتی درشکل گلبول ها ایجاد می شود.**

پ) زمان:

۱- تاخیر درفیکس کردن فروتی باعث تغییر شکل وتغییر اندازه گلبول ها می شود.

ج) رنگ آمیزی :

۱- باز ماندن درب ظرف رنگ باعث تغییر PH رنگ میشود.

۲- اگر رنگ را صاف نکنیم رسوبات رنگ باعث مشکل می شود.

۳- خشک شدن رنگ بر روی لام در طی رنگ آمیزی

۴- شتستن نا کافی لام بعدازپایان مرحله رنگ آمیزی.

د) فوت کردن:

قبل از فیکس کردن فوت کردن به گسترش برای خشک کردن یا استفاده از پنکه با دور بالا باعث تجمع هموگلوبین در وسط گلبولهای قرمز وایجاد تارگت سل در روی لام می شود.

رنگ آمیزی(staining):

به افتخار آقای رومانوسکیromanowsky رنگ رایت (wrigth-stian) و رنگ گیمسا-GIMSA) Stian) و.... بنام رنگهای رومانوسکی نامگذاری شدند.

رنگ رایت:(wrigth-stian)

این رنگ دارای رنگینه های اسیدی مثل ائوزین و رنگینه های بازی یا قلیایی مثل متیلن بلو (آبی متیلن) می باشد.

رنگ گیمسا :(Gimsa – stain)

رنگ گیمسا را به نسبت یک به ده با آب رقیق می کنیم.(یک سی سی رنگ گیمسا و نه سی سی آب)

روی سطح لام خونی (که ثابت شده است) رنگ رقیق شده می ریزیم. بعد ازگذشت ۲۰تا ۳۰ دقیقه رنگ روی لام را دورمی ریزیم.لام را زیر شیر آب با جریان ملایم گرفته تا رنگ های اضافی خوب شسته شود. حالا سلول های خونی روی لام رنگ گرفته اند. می گذاریم لام خشک شود.

اساس رنگ آمیزی:

اجزا و ساختمان های اسیدی سلول ها ، رنگ های قلیائی را می پذیرند لذا این ساختمان ها را بازوفیلیک(قلیا دوست) دوستدار مواد بازی گویند,مثل هسته سلول که در این رنگ آمیزی آبی رنگ می شود.

اجزا و ساختمانهایی که فقط رنگینه های ا سیدی را به خود راه می دهند ا سیدوفیلیک (ا سید دو ست)یا ائوزینوفیلیک(ائوزین دو ست) می نامند.این اجزا که در سیتو پلا سم بع ضی سلول ها قرار دارند با این رنگ آمیزی قرمز رنگ می شوند.

اجزاوساختمانهائی که ترکیبی ازدو رنگینه هم رنگینه اسیدی هم رنگینه بازی را به خود راه می دهند نوتروفیلیک(خنثی دوست) می نامند.

بهترین رنگ برای رنگ آمیزی گسترش خونی رنگ رایت+ گیمسا است **رنگ آمیزی گیمسا با توجه مشکلات وعیوبی که برای آن ذکر می شود هنوز هم به عنوان رنگ آمیزی روتین ومعمول آزمایشگاه ها از آن استفاده می شود.

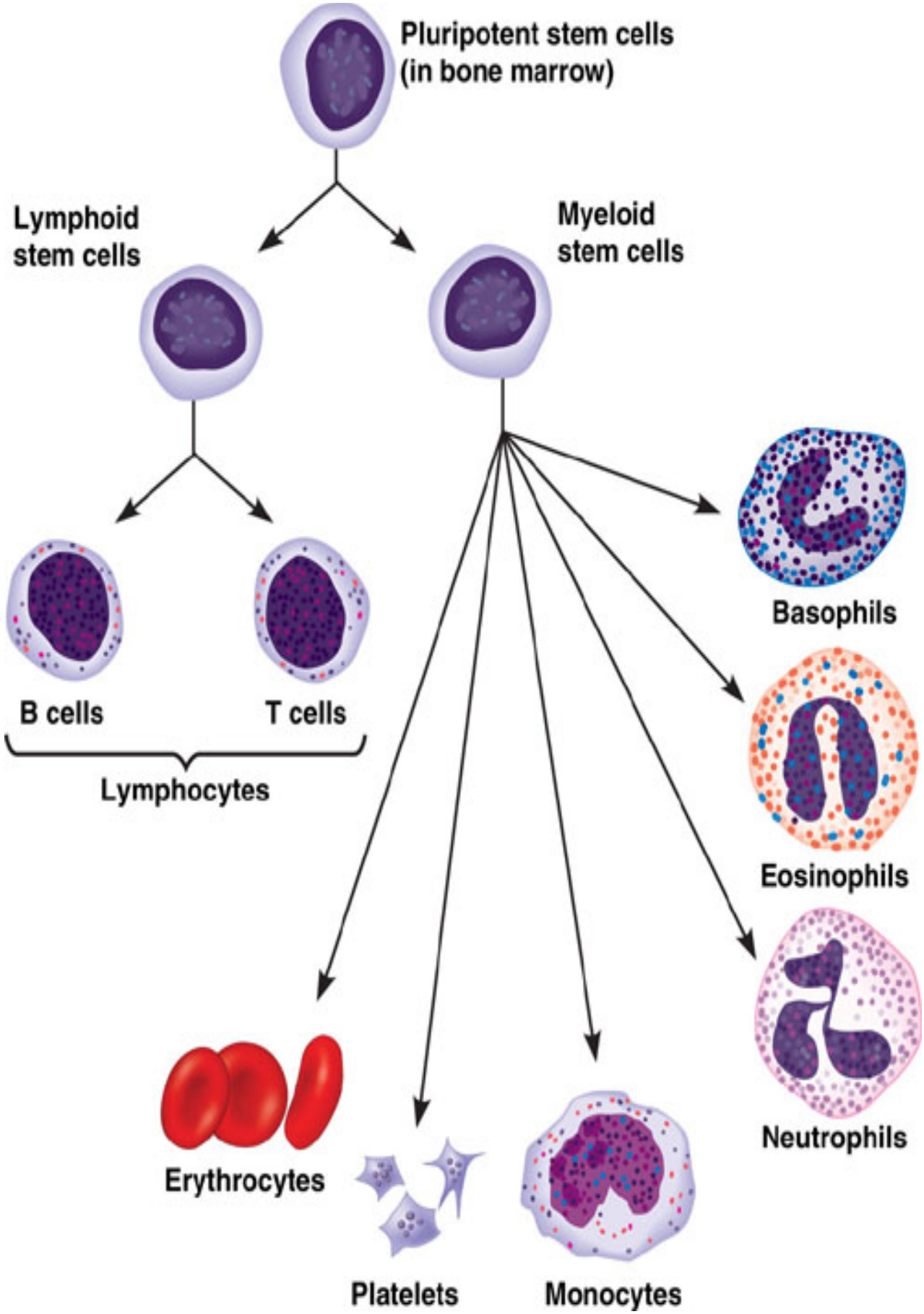
مشاهده در زیر میکروسکوپ نوری:

روی قســمت نازک خون گســترش یافته، یک قطره روغن ســدر می گذاریم و در زیر میکروســکوپ با ابژکتیو ۱۰۰ قرار داده ،پس از تنظیم دیافراگم و کندانســور آن را مورد مطالعه قرار می دهیم . برای انجام این منظور به کمک پیچ های حرکت دهنده صفحه میکروسکوپ با انجام حرکت مارپیچ ۱۰۰ عدد گلبول سفید خون را می شماریم درصد هر یک از انواع گلبول های سفید را محاسبه می کنیم.

انواع لکوسیت ها:

لکو سیت ها برا ساس شکل ه سته و نوع گرانول های موجود در سیتوپلا سم (برا ساس خا صیت رنگ آمیزی) به دو دسته تقسیم می شوند:

- **مونونوکلوئرها شامل لنفوسیت و منوسیت**
- **پلی مورفونوکلوئرها یا گرانولوسیت ها شامل نوتروفیل ها و ائوزینوفیل ها و بازوفیل ها**


Pluripotent stem cells
(in bone marrow)
Lymphoid
stem cells
Myeloid
stem cells
B cells
T cells
Lymphocytes
Basophils
Eosinophils
Neutrophils
Erythrocytes
Platelets
Monocytes

نوتروفیل :

سلول های گرد با قطر ۱۴-۱۰ میکرون و هسته ۵-۲ لوبی و سیتوپلا سم رو شن با گرانول های کوچک صورتی منتشر در سلول می با شند. در رنگ آمیزی هسته بنفش رنگ و گرانول ها معمولا با رنگ های خنثی رنگ می گیرند که به همین دیلی نوتروفیل خوانده می شود .

قسمت اعظم گلبول های سفید نوتروفیل ها هستند. در بالغین ۷۰-۴۰ درصد و در کودکان ۶۰-۲۰ درصد لکوسیت ها را تشکیل می دهند.

نوتروفیل های جوان را باند می گویند که هسته به صورت nonsegmented می باشد و نوتروفیل های پیر به شکل hypersegmented یعنی با بیش از پنج لوب در هسته دیده می شوند.

نیمه عمر این سلول ها در خون ۷-۶ ساعت و در بافت ۴-۱ روز می باشد.

نوتروفیل ها سلول بالغی هستند که حتی در خون در گردش به باکتری ها و ویروس ها حمله کرده و آنها را از بین می برند همچنین توسط حرکت آمیبی در بافت ها حرکت کرده تا به ناحیه ملتهب بر سند. پس مهمترین عمل نوتروفیل ها فاگوسیتوز می باشد.

افزایش یا کاهش نوتروفیل ها را به ترتیب نوتروفیلی و نوتروپنی می گویند.

نوتروپنی ناشی از اثرات دارویی ،عفونت ویروسی، بیماری های خودایمنی و کمبود ویتامین B12 و اسید فولیک است.

نوتروفیلی در جریان عفونت های باکتریال بیماری های التهابی و یا بدخیمی ها دیده می شود.

ائوزینوفیل :

سلول های گرد کمی بزرگتر از نوتروفیل ها هستند. هسته ها معمولا دو لوب دارند. مشخصه این سلول ها حضور گرانول های بزرگ به رنگ قرمز نارنجی است که در تمام سلول و حتی روی هسته ها توزیع شده اند. این گرانول ها بزرگتر از گرانول های نوتروفیل ها می با شند. رنگ هسته بنفش رنگ است و

قطر متوسط آن 16pm می باشد. ائوزینوفیل ها به طور طبیعی ۳-۲ در صد تمام لکوسیت ها را تشکیل می دهند. عمل آنها فاگوسیتوز می باشد.

ائوزینوفیلی یا افزایش تعداد ائوزینوفیل ها در عفونت های انگلی و بیماری های آلرژیک بیشتر مشاهده می شود. ائوزینوپنی یا کم شدن ائوزینوفیل ها همراه با استرس و عفونت و بعد از تجویز استروئیدها حادث می شود.

بازوفیل :

شبیه بقیه پلی مورفونوکلوئرها و کمی کوچکتر از نوتروفیل ها می باشند. دارای هسته بنفش رنگ چند لوبی و سیتوپلاسمی با رنگدانه های درشت هستند که با رنگ های قلیایی بلودومتیلن به رنگ آبی در می آید. این گرانول ها روی هسته را نیز می پوشانند. اندازه قطر آنها 12-15 pm و مقدار آنها در خون ۲-۰ درصد می باشد.

این سلول ها هپارین به داخل خون آزاد می کنند که از انعقاد خون جلوگیری می کند. هیستامین نیز آزاد می کنند. بازوفیل ها نقش مهمی در بعضی از انواع واکنش های آلرژیک به عهده دارند.

لنفوسیت :

سلول های معمولا کوچک با قطر 7-10 pm می باشند و به شکل های بزرگتر تا قطر 20 pm هم دیده می شود. نوع کوچک در خون طبیعی، غالب تر می باشند. سلول های گرد با هسته های بزرگ به رنگ بنفش هستند و سیتوپلاسم به صورت هلالی نازک به دور هسته به رنگ آبی روشن یا تیره در یک طرف سلول قرار دارد تعداد لنفوسیت ها در بزرگسالان ۲۵-۲۰ درصد و در بچه ها ۷۰-۳۰ درصد می باشد.

لنفو سیتوز (افزایش لنفو سیت ها) در بیماری های ویرو سی مثل ایدز، هپاتیت و منونوکلئوز عفونی دیده می شود.

لنفوپنی (کمبود لنفو سیت ها) در کمبود مادرزادی، ا سترس، آ سیب نا شی از ا شعه و م صرف داروهای کورتیکواستروئیدها مشاهده می گردد.

دو نوع لنفو سیت وجود دارد : لنفو سیت نوع T م سئول ایمنی سلولی و لنفو سیت نوع B م سئول ت شکیل آنتی بادی هایی هستند که ایمنی هومورال را تولید می کنند.

منوسیت:

بزرگترین سلول های طبیعی خون با قطری برابر 15-22 pm هستند. هسته آنها به شکل های مختلف گرد، بیضی، لوبیایی یا لوبوله می باشد. اطراف هسته سیتوپلاسم به رنگ آبی مایل به خاکستری می باشد. ۱۰-۸ درصد لکوسیت ها را تشکیل می دهند. مهمترین وظیفه منوسیت ها شرکت در عمل بیگانه خواری می با شد. نیمه عمر این سلول ها در خون ۱۰۰-۱۲ ساعت می با شد، وقتی وارد بافت می شوند تبدیل به ماکروفاژ شده و عمل خود را انجام می دهد.

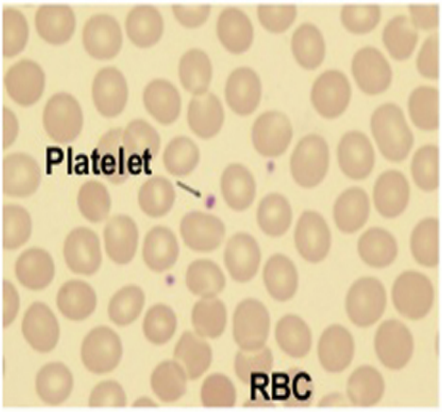
منو سیتوز (افزایش منو سیت ها) در آلودگی های مزمن مثل التهاب مفا صل، سل، اندوکاردیت باکتریال، بروسلوز و مالاریا دیده می شود.

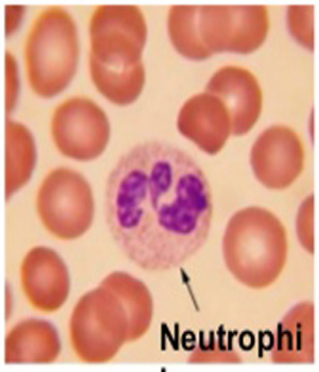
منوسیتوپنی (کاهش منوسیت ها) در آنمی آپلاستیک، در لوسمی و درمان با گلوکوکورتیکوئید دیده می شود.

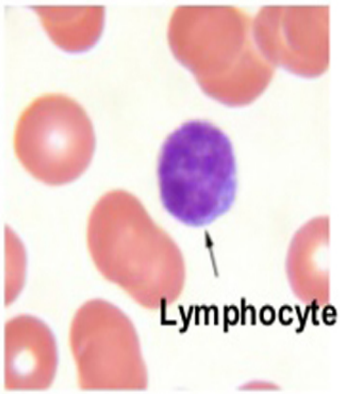
منبع :

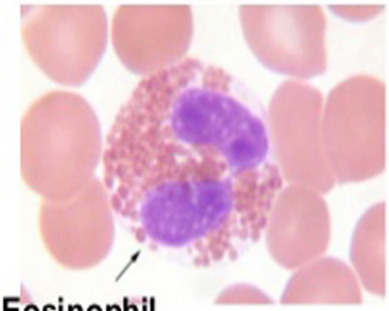
- **سایت علمی دانشجو**
- **فسیل نامه**
- **پارسیان لب**
- **گزارش کار آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران – فرهاد فتحی**

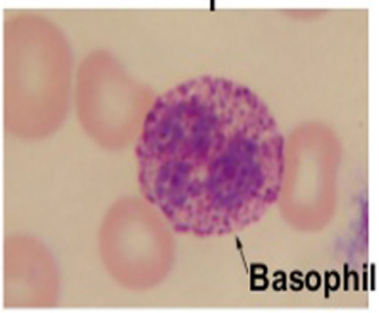
Normal Blood Cell Morphology











BLOOD SMEAR PREPARATION AND STAINING

LAB OBJECTIVE

1. The student will prepare at least five slide smears which are even, smooth and have an acceptable feathered edge.
2. The student will stain two of the above smears with Wright's stain so that all formed elements are readily identifiable according to criteria outlined in the textbook.

PRINCIPLE OF SMEAR PREPARATION

Smear Preparation

A small drop of blood is placed near the frosted end of a clean glass slide. A second slide is used as a spreader. The blood is streaked in a thin film over the slide. The slide is allowed to air-dry and is then stained.

SPECIMEN

EDTA anticoagulated blood is preferred. Blood smears can also be made from fingerstick blood directly onto a slide.

REAGENTS, EQUIPMENT. AND SUPPLIES

1. Glass slides, 3 x 1 inch with frosted edge
2. Stopper piercer

PROCEDURE

Three methods may be used to make blood smears: 1) the cover glass smear, 2) the wedge smear and 3) the spun smear. The spun smear requires an automatic slide spinner. For the purpose of this lab exercise, we will use the wedge smear.

1. Using the stopper piercer, place a drop of blood, about 2 mm in diameter approximately inch from the frosted area of the slide.
2. Place the slide on a flat surface, and hold the narrow side of the nonfrosted edge between your left thumb and forefinger.
3. With your right hand, place the smooth clean edge of a second (spreader) slide on the specimen slide, just in front of the blood drop.
4. Hold the spreader slide at a 30 angle, and draw it back against the drop of blood.
5. Allow the blood to spread almost to the edges of the slide.
6. Push the spread forward with one light, smooth, and fluid motion. A thin film of blood in the shape of a bullet with a feathered edge will remain on the slide.
7. Label the frosted edge with patient name, ID# and date.
8. Allow the blood film to air-dry completely before staining. (Do not blow to dry. The moisture from your breath will cause RBC artifact.)

PROCEDURE NOTES

1. A good blood film preparation will be thick at the drop end and thin at the opposite end.
2. As soon as the drop of blood is placed on the glass slide, the smear should be made without delay. Any delay results in an abnormal distribution of the white blood cells, with many of the large white cells accumulating at the thin edge of the smear.
3. The blood smear should occupy the central portion of the slide and should not touch the edges.
4. The thickness of the spread when pulling the smear is determined by the 1) angle of the spreader slide (the greater the angle, the thicker and shorter the smear), 2) size of the blood drop and 3) speed of spreading.
    a. If the hematocrit is increased, the angle of the spreader slide should be decreased.
    b. If the hematocrit is decreased, the angle of the spreader slide should be increased.

5. Common causes of a poor blood smear:
   a. Drop of blood too large or too small.
   b. Spreader slide pushed across the slide in a jerky manner.
   c. Failure to keep the entire edge of the spreader slide against the slide while making the smear.
   d. Failure to keep the spreader slide at a 30 angle with the slide.
   e. Failure to push the spreader slide completely across the slide.
6. Although this is the easiest and most popular methods for producing a blood smear, it does not produce a quality smear. The WBCs are unevenly distributed and RBC distortion is seen at the edges. Smaller WBCs such as lymphocytes tend to reside in the middle of the feathered edge. Large cells such as monocytes, immature cells and abnormal cells can be found in the outer limits of this area. Spun smears produce the most uniform distribution of blood cells.

Biologic causes of a poor smear

1. Cold agglutinin - RBCs will clump together. Warm the blood at 37 C for 5 minutes, then remake the smear.
2. Lipemia - holes will appear in the smear. There is nothing you can do to correct this.
3. Rouleaux - RBC's will form into stacks resembling coins. There is nothing you can do to correct this.

PRINCIPLE OF WRIGHT'S STAIN

Wright's Stain

The Wright's stain is a Romanowsky stain. A Romanowsky stain is any stain combination consisting of eosin Y or eosin B with methylene blue and/or any of its oxidations products. Such stains produce the typical purple coloration of leukocyte nuclei and neutrophilic granules as well as the numerous blues and pinks found in other cell types. Methyl alcohol is used as both a solvent and fixative in this procedure.

REAGENTS AND EQUIPMENT

Slides can be stained manually or on automatic slide stainers. For this lab, we will use the manual method.

1. Commercial Wright's stain
2. Commercial buffer
3. Deionized water
4. 3 Coplin jars
5. Clothes pin or forceps for holding the slide
6. Paper towels

PROCEDURE

1. Attach a clothes pin (or use forceps) to the thick edge of the blood smear.
2. Place the slide in the Coplin jar with Wright's stain. Allow to stand 5-10 seconds.
3. Raise the slide out of the stain and allow the majority of the stain to run off the slide.
4. Place the slide in the first jar containing deionized water. Allow to stand 10-20 seconds.
5. Remove the slide carefully and dip several times in the second jar containing deionized water to rinse off the excess stain.
   NOTE:It may be necessary to change the DI water frequently if many slides are being stained.
6. Wipe off excess fluid from the back of the slide. Place the slide upright on a paper towel with the feathered edge up and allow to air dry.
7. When completely dry, examine the smear with the microscope as follows:

Low power (10x) scan

8. Determine the overall staining quality of the blood smear.
   a. Stain should not be too dark or too pale.
   b. There should be no stain precipitate present on smear.
   c. RBCs should be appropriate color of reddish pink.
   d. Lymphocytes have dark purple nuclei with varying shades of blue cytoplasm

e. Neutrophils have dark purple nuclei with reddish, granular cytoplasm.
f. Monocytes have a lighter purple nucleus with a gray-blue cytoplasm.
g. Eosinophils have bright red/orange granules
h. Basophils have dark purple nuclei and granules.

9. Determine if there is a good distribution of the cells on the smear.

a. Scan the edges and center of the slide to be sure there are no clumps of RBCs, WBCs or platelets.
b. Scan the edges for abnormal cells.

High power (40x) scan

10. Find an optimal area for the detailed examination and enumerations of cells.

a. The RBCs should not quite touch each other.
b. There should be no area containing large amounts of broken cells or precipitated stain.
c. The RBCs should have a graduated central pallor.
d. Nuclei and cytoplasm of WBCs should be the proper color.
e. Platelets should be clearly visible.

REFERENCES

Harmening., Denise, Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis, 3rd edition, pp.606-608.

Brown, Barbara, Hematology: Principles and Procedures, 5th edition, p 96-97.