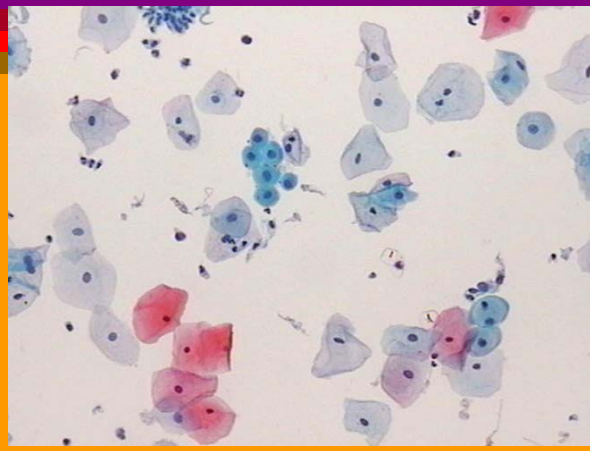
Βασικές αρχές κυτταροχημείας

Π. Καρακίτσος

Καθηγητής Κυτταρολογίας

Διευθυντής Εργαστηρίου Διαγνωστικής Κυτταρολογίας Π.Γ.Ν. «ΑΤΤΙΚΟΝ»

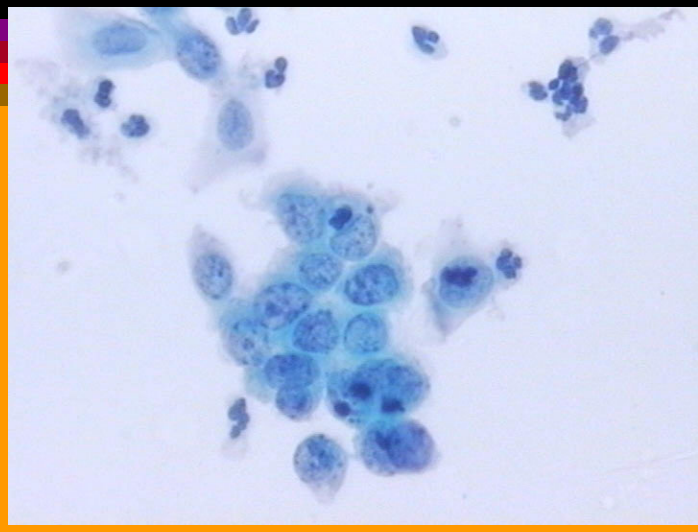
Η Χρώση Παπανικολάου

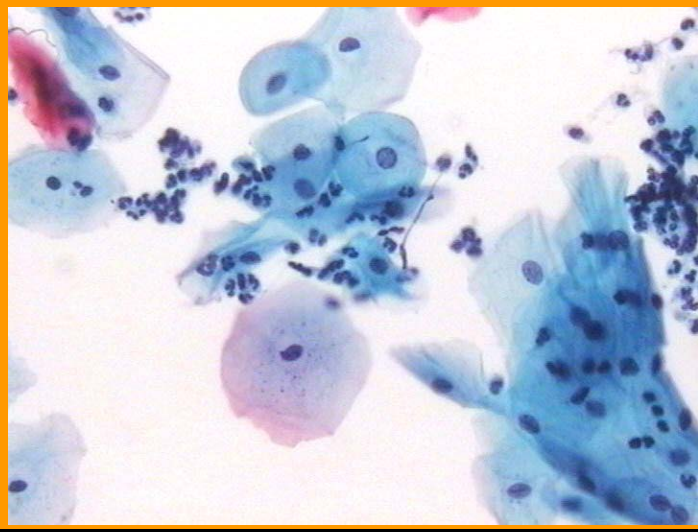


- Πολυχρωμική χρώση
- Παγκοσμίως αποδεκτή ως βασική χρώση εξέτασης κυτταρολογικών επιχρισμάτων
  - Ποικίλες παραλλαγές από εργαστήριο σε εργαστήριο (εύκολα αναγνωρίσιμες τόσο με το μάτι όσο και αναλυτικά)

Πολυχρωμική χρώση

- **Πυρήνες**
  - **Καλή αναγνώριση κατανομής της χρωματίνης**
  - **Καλή αναγνώριση πυρηνίων**
- **Κυτταρόπλασμα**
  - **Διαφοροποίηση**
  - **Διαφάνεια**





Παραλλαγές

- **Τεχνική 1 (**Regressive)
- **Τεχνική 2 (**Progressive)
- **Τεχνική** Gills 1 (Regressive**) για επιχρίσματα φίλτρου** nucleopore
- **Τεχνική** Gills 1 (Progressive**) για επιχρίσματα φίλτρου** nucleopore
- **Τεχνική** Miller **για επιχρίσματα μονιμοποιημένα σε** carbowax
- **Τεχνική** Saccomanno **για επιχρίσματα πτυέλων μονιμοποιημένα σε** carbowax
- **Τεχνική** Durfee **για επιχρίσματα ούρων**
- **Οικολογική χρώση Παπανικολάου**
- On site **ταχεία Παπανικολάου**

Ακόμα και αν ένα εργαστήριο χρησιμοποιεί τα ίδια διαλύματα ακριβώς με ένα άλλο, το αποτέλεσμα της χρώσης δεν είναι το ίδιο

Παράγοντες που επηρεάζουν τη χρωστική αντίδραση/εμφάνιση

1. **Τύπος μονιμοποιητικού**
2. **Επιλογή διαλύματος αιματοξυλίνης**
3. **Επιλογή διαλυμάτων** orange G **και** polychrome
4. **Διάρκεια παραμονής στα χρωστικά διαλύματα**

Παράγοντες που επηρεάζουν τη χρωστική αντίδραση/εμφάνιση

5. **Αριθμός επιχρισμάτων**
6. pH **και χημική σύνθεση του νερού της βρύσης**
7. **Θερμοκρασία του νερού βρύσης**
8. **Υγρασία περιβάλλοντος**
9. pH **των διαλυμάτων και των χρώσεων**

Παράγοντες που επηρεάζουν τη χρωστική αντίδραση/εμφάνιση

10. **Γήρανση χρωστικών**
11. **Κροκίδωση του διαλύματος χρωστικής**
12. **Επιμολύνσεις στα διαλύματα αφυδάτωσης/ενυδάτωσης**
13. pH **του δείγματος**
14. **Παρουσία ιδίων στοιχείων φλεγμονής**
15. **Ποιότητα επιχρίσματος**

Τύπος μονιμοποιητικού

- **Υγρή μονιμοποίηση**
  - **Αιθανόλη**
  - **Μεθανόλη**
  - **Προπανόλη**
  - **Ισοπροπανόλη**
- **Μονιμοποίηση με** spray
  - **Λακ μαλλιών με υψηλή συγκέντρωση αλκοόλης**
  - Carbowax
  - Diaphane
- **Ειδικά** spray

Τεχνική 1 (Regressive)

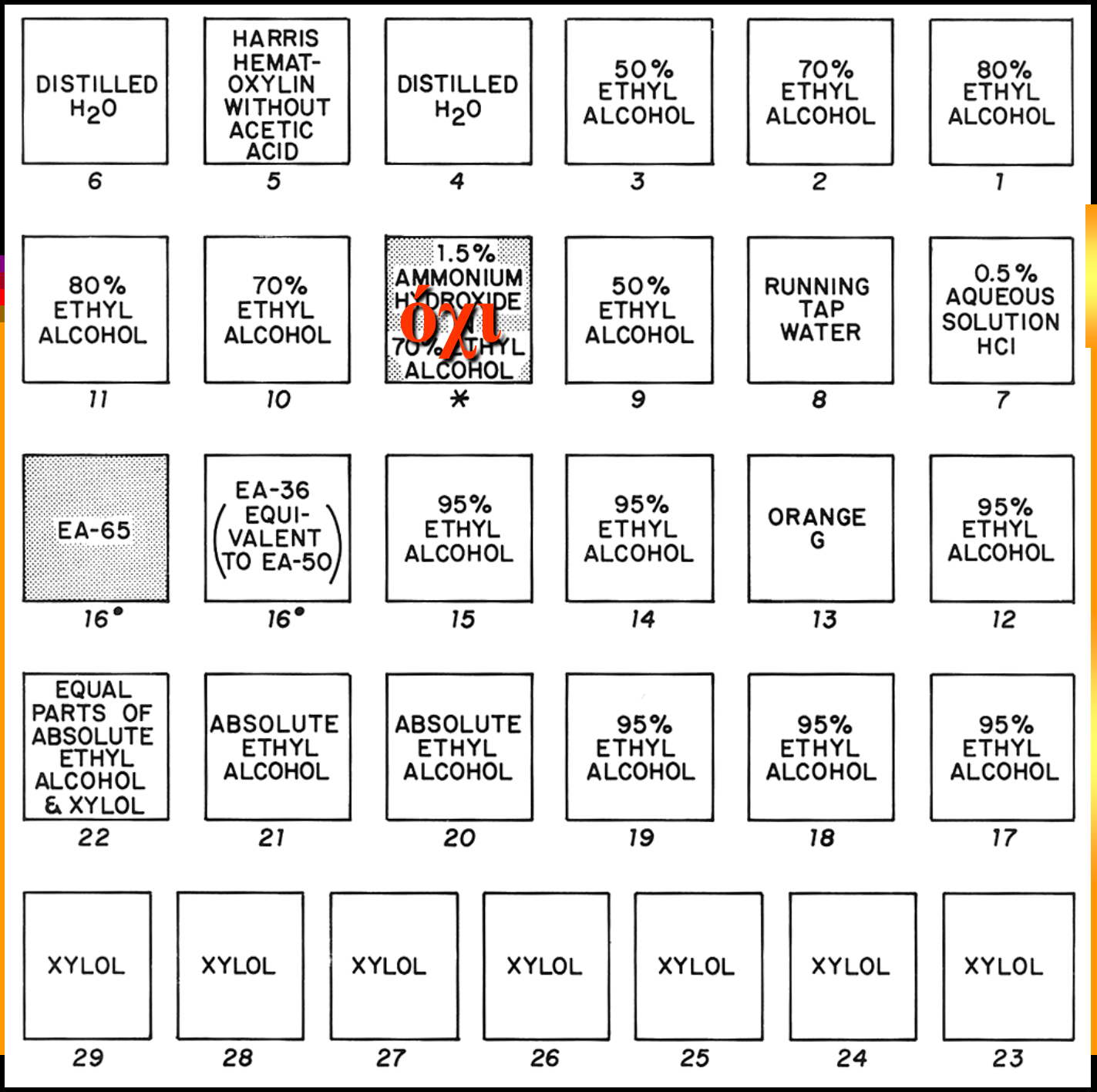
- **Παπανικολάου 1954**
- **Η περίσσεια χρώσης αφαιρείται με διάλυμα** HCl
- Η **περίσσεια του** HCl **αφαιρείται με νερό βρύσης**
- **Ως συχνότερο αποτέλεσμα η υποχρωμία του πυρήνα**

Τεχνική 2 (Progressive)

- **Παπανικολάου 1960**

- **Η πλέον συνήθης τεχνική**
  - **Η σταθερότητα και ο έλεγχός της είναι σχετικά εύκολες διαδικασίες**
- **Ο πυρήνας χρωματίζεται με αιματοξυλίνη μέχρι την επιθυμητή από τον κυτταρολόγο ένταση**

- **Σταθεροποιητικοί παράγοντες**
  - **Ανθρακικό λίθιο**
  - Scotts tap water
  - **Νερό βρύσης** pH>8
  - NH_3OH **δεν χρησιμοποιείται πλέον σήμερα λόγω της αστάθειας του διαλύματος όχι μόνο από μέρα σε μέρα αλλά και κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας**



Διάλυμα Orange G

- ✓Orange G
- ✓Φωσφοβολφραμικό οξύ

EA 36

- ➢Light green
- ➢Brun Bismark
- ➢Ηωσίνη
- ➢Φωσφοβολφραμικό οξύ
- ➢Ανθρακικό λίθιο

Orange G

- **Όξινη χρώση**
  - **Κερατίνη έντονα φωτεινό πορτοκαλόχρουν χρώμα**
- **Ελαφρά διαλυτή σε 95% αιθανόλη**
- **Έντονα διαλυτή στο νερό**
- **Το οξικό οξύ επιταχύνει τη χρωστική αντίδραση επειδή θετικά ιόντα Η στρέφουν τις ισορροπίες του φορτίου από το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών προς την όξινη πλευρά**
- **Η προσθήκη φωσφοβολφραμικού οξέος σταθεροποιεί τη χρωστική αντίδραση**

ΕΑ

- **Πολυχρωμική χρώση**
  - Light green 65%
    - **Όξινη χρώση**
    - **Ανιχνεύει μεταβολικά ενεργά κύτταρα**
  - Eosin Y 80%
    - **Όξινη χρωστική**
    - **Ανιχνεύει άτομα βρωμίου**
      - **Αυξημένη συγκέντρωση ατόμων βρωμίου → βαθύ κόκκινο χρώμα**
      - **Χαμηλή συγκέντρωση ατόμων βρωμίου → κίτρινο χρώμα**
  - Bismarck brown Y 45%
    - **Κατακρημνίζει το φωσφοβολφραμικό οξύ, γεγονός που επιτρέπει την διακριτή χρωστική αντίδραση του** Light green **και** Eosin

ΕΑ

- **Τρεις τύποι**
  - 36
    - **Κυρίως γυναικολογικά επιχρίσματα**
  - 50
    - **Εμπορικά τροποποιημένη ΕΑ 36, η σύνθεση της οποίας ποικίλλει από κατασκευαστή σε κατασκευαστή**
  - 65
    - **Τροποποιημένη 36 με σκοπό τη βελτίωση της χρωστικής αντίδρασης σε παχιά επιχρίσματα**

Σφάλματα Progressive

- **Υπερχρωματικός πυρήνας**
  - **Οφείλεται σε πυκνό διάλυμα NH_3OH**
- **Υποχρωματικός πυρήνας**
  - **Οφείλεται σε αραιό διάλυμα NH_3OH**
  - **Δεν αφαιρέθηκε σωστά το** carbowax
  - **Ο χρόνος στην αιματοξυλίνη δεν ήταν αρκετός**
  - **Το νερό της βρύσης είχε** pH < 8
  - **Υπερβολική αφαίρεση της αιματοξυλίνης**
  - **Δεν αντικαταστάθηκε η αιματοξυλίνη μετά από 2000 επιχρίσματα ή μετά από 6-8 εβδομάδες**
  - **Δεν αφαιρέθηκαν τα υαλοειδή σταγονίδια πριν το στάδιο της αιματοξυλίνης**

Σφάλματα Regressive

- **Υπερχρωματικοί πυρήνες**
  - **Παρατεταμένη παραμονή στο διάλυμα αιματοξυλίνης** Harris
  - **Μη ορθή αφαίρεση της περίσσειας της αιματοξυλίνης** Harris
  - **Η συγκέντρωση του** HCl **είναι χαμηλή**
  - **Μη επαρκής χρόνος δράσης του** HCl

Ανεπαρκής χρώση κυτταροπλάσματος

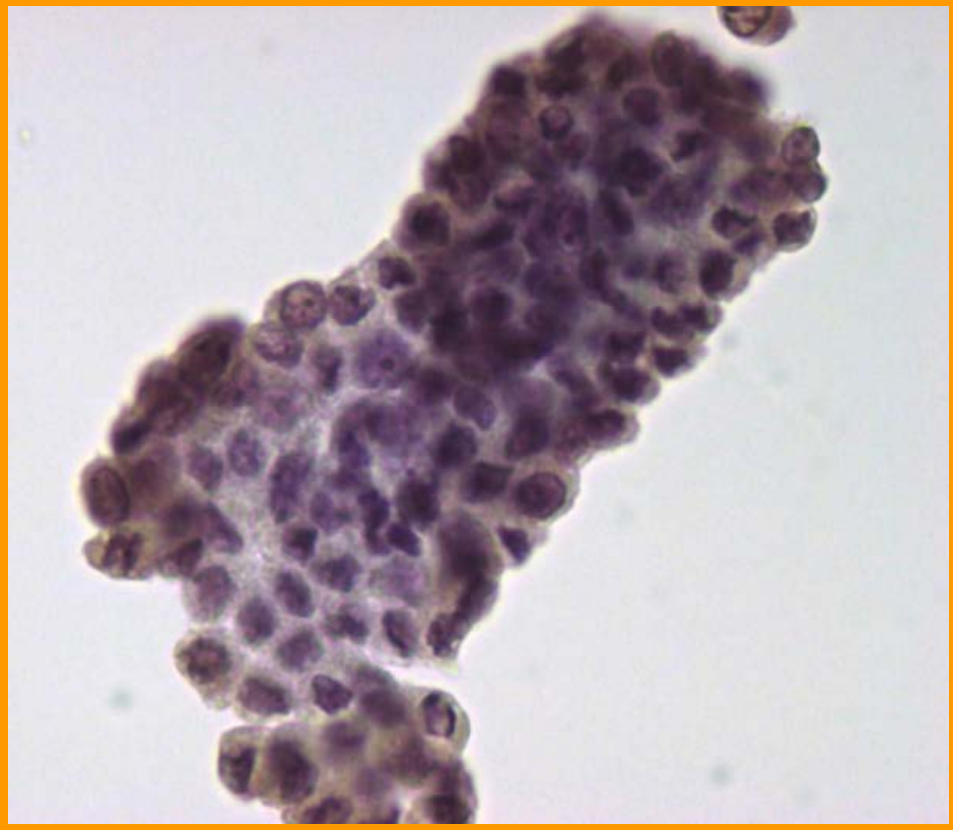
- **Παρατεταμένη παραμονή επιχρίσματος εκτός μονιμοποιητικού**
- **Μη σεβασμός της ιδιαίτερης διαχείρισης της χρώσης ανάλογα με τον τύπο του μονιμοποιητικού**
- **Επιχρίσματα άλλοτε άλλου πάχους**
- **Έκθεση των επιχρισμάτων σε εστίες θερμότητας πριν τη χρώση**
- **Παρατεταμένη παραμονή στην αιματοξυλίνη**
- **Ανεπαρκές ξέπλυμα**
- **Μη τήρηση του χρόνου παραμονής στις χρωστικές**
- pH **νερού βρύσης < 8**
- pH EA **μικρότερο του 4.5 ή μεγαλύτερο του 5.0**
- **Η θερμοκρασία του νερού βρύσης ποικίλλει από μέρα σε μέρα**
- **Το** pH **του επιχρίσματος ποικίλλει**

Κυτταρόπλασμα έντονα πράσινο

- Λανθασμένη αναλογία συστατικών ΕΑ
- Εσφαλμένη επιμήκυνση χρόνου παραμονής των επιχρισμάτων στο ΕΑ

Κυτταρόπλασμα ασθενώς πράσινο

- ✓ Μη επαρκής παραμονή στο ΕΑ
- ✓ Εξασθενημένη χρωστική



Επιμολύνσεις

- Επιμόλυνση από αφυδατικά και διαυγαστικά διαλύματα
- Μη επαρκής αφαίρεση μονιμοποιητικού
- Μη ορθή αντικατάσταση των διαλυμάτων
- Μη ορθή φύλαξη αντικειμενοφόρων πλακών και καλυπτρίδων

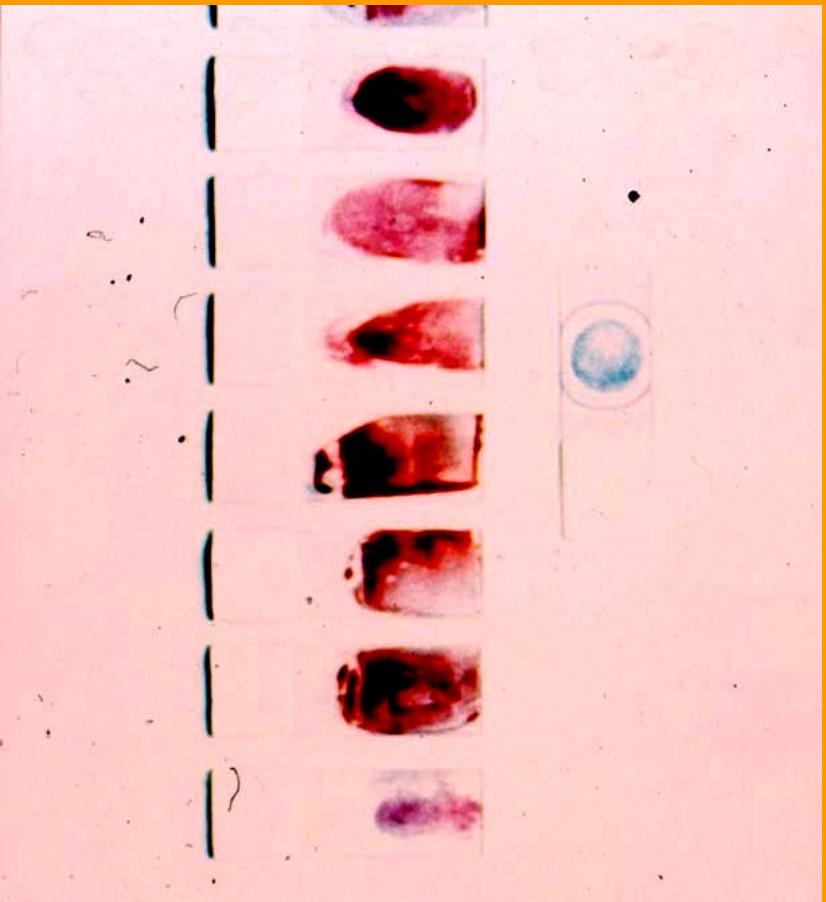
Διορθωτικές κινήσεις

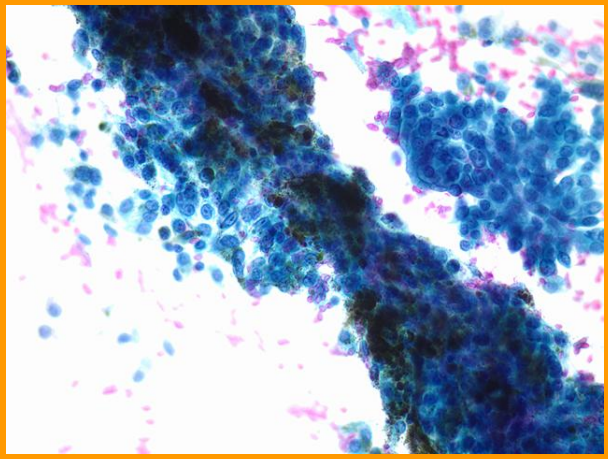
- Η διήθηση των χρωστικών οφείλει να ακολουθεί συγκεκριμένες διαδικασίες με τη χρήση διαφορετικής χοάνης ανάλογα με το διάλυμα
- Τα φίλτρα πρέπει να αντικαθίστανται όταν η ροή μέσω αυτών δεν είναι επαρκής
- Οι χρωστικές πρέπει να φυλάσσονται σε αεροστεγή δοχεία

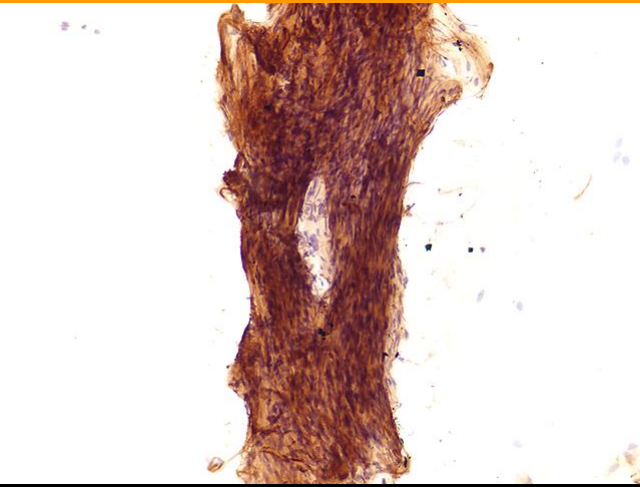
Διορθωτικές κινήσεις

- **Συνεχής και επαρκής αφαίρεση εμφανών στοιχείων στα διαλύματα**
- **Ιδιαίτερη προσοχή στη διαχείριση μετά τον καθαρισμό**
- **Αλλαγή των ενυδατικών και αφυδατικών διαλυμάτων δύο φορές την ημέρα**
- **Αλλαγή του νερού μετά από κάθε χρήση**
- **Αντικατάσταση των διαλυμάτων διαφοροποίησης τουλάχιστον μία φορά την ημέρα**
- **Χρώση μάρτυρα πριν την αντικατάσταση του σετ χρώσεων και αμέσως μετά την αντικατάσταση τους**
- **Έλεγχος ότι ο δείκτης διάθλασης καλυπτρίδων αντιστοιχεί προς 1.515**±0.015

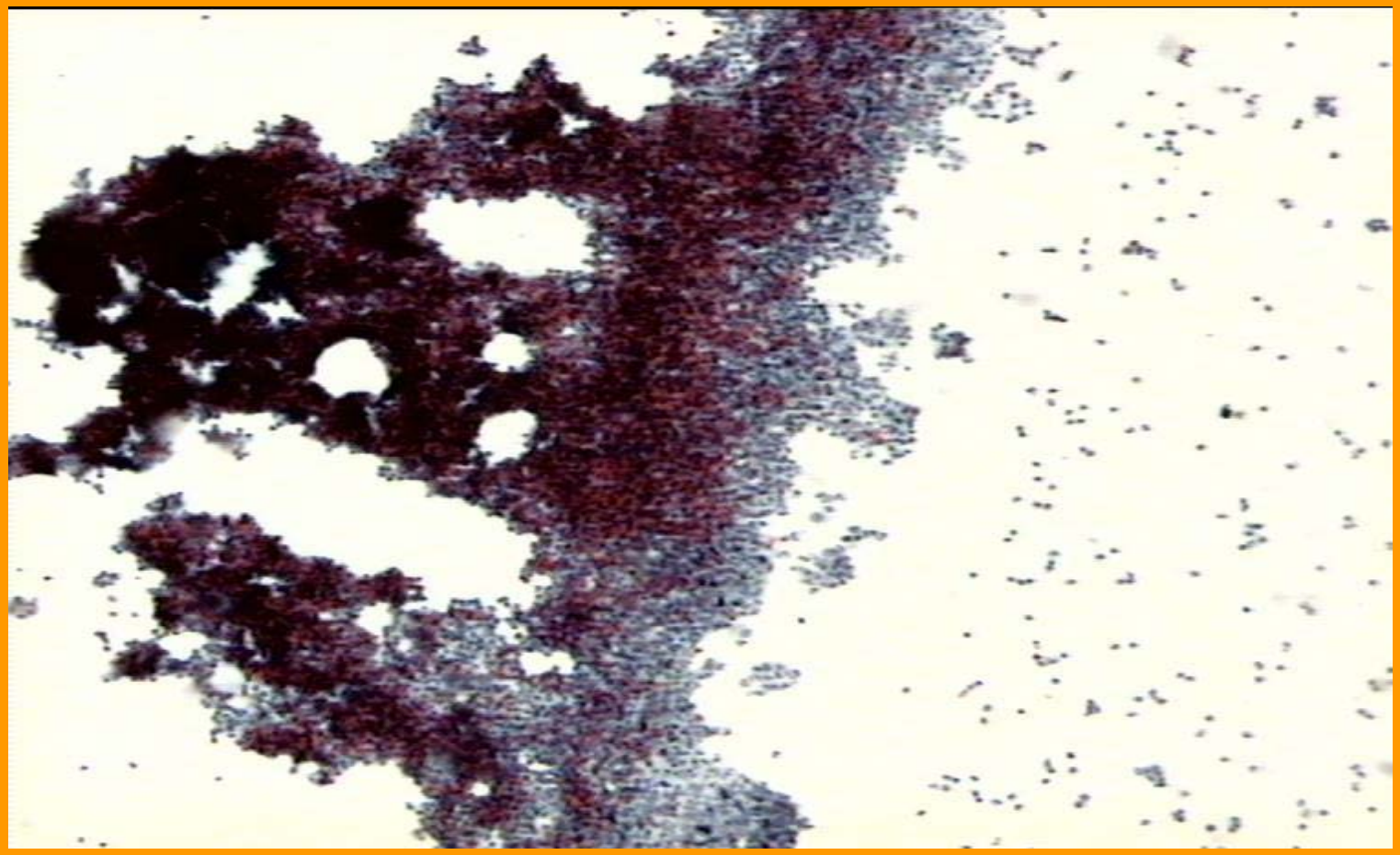
Μακροσκοπική Εμφάνιση Επιχρισμάτων



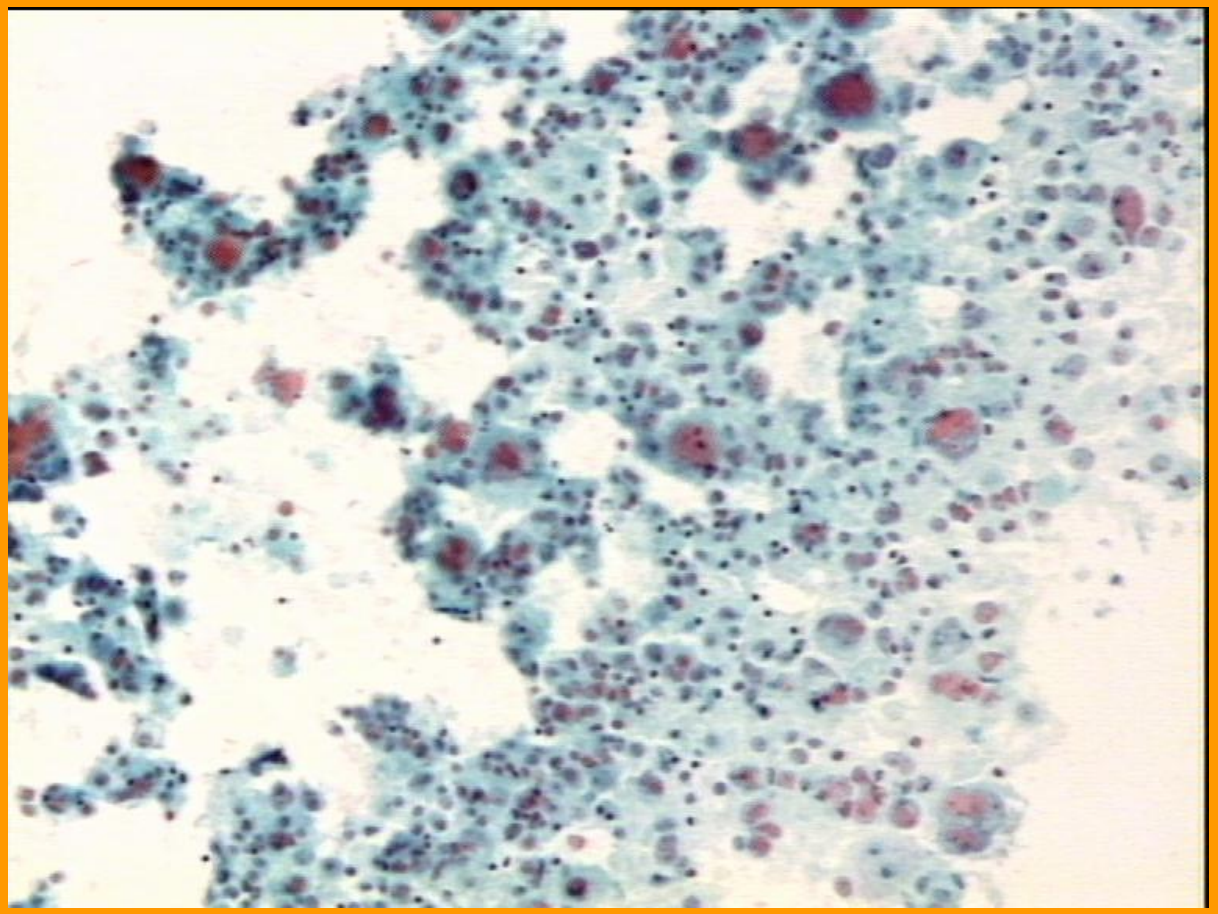




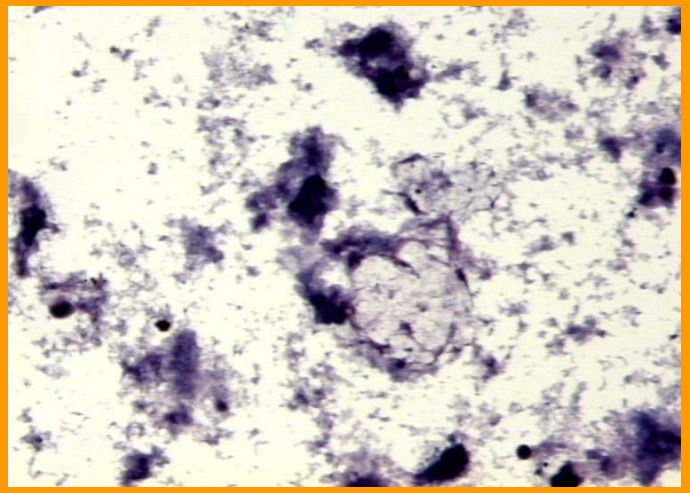
Αυξημένη Κυτταρικότητα

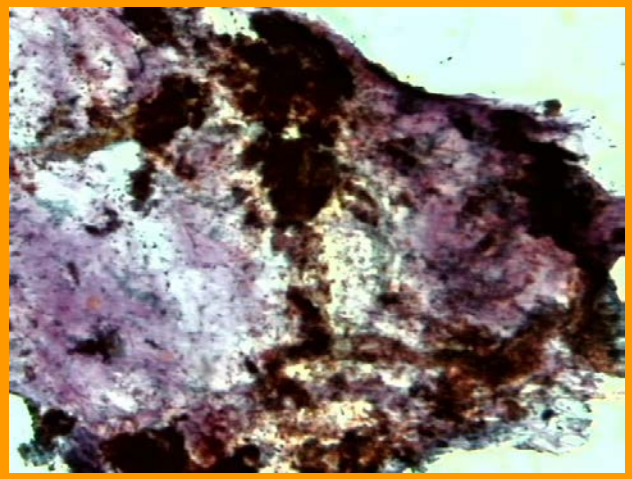


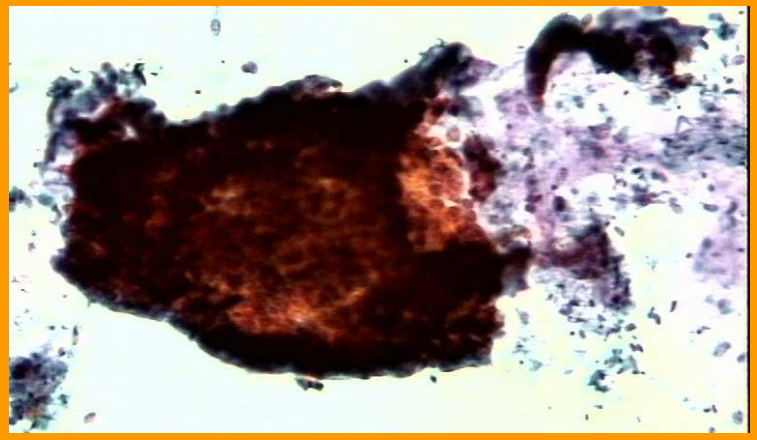
Φλεγμονώδες Υλικό



Ατελής Βλεννόλυση

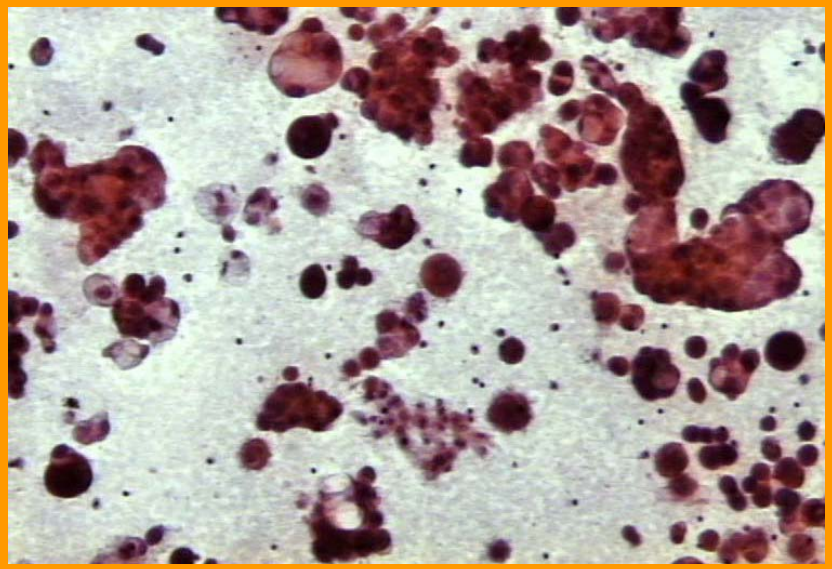


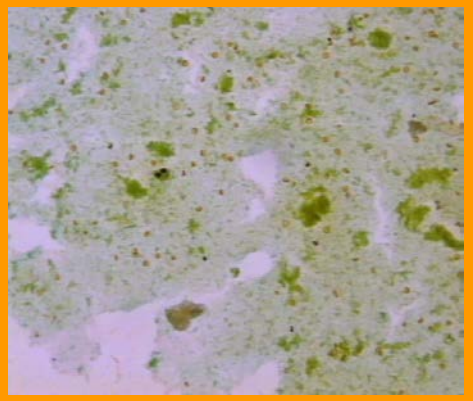




Επίδραση οξείδωσης

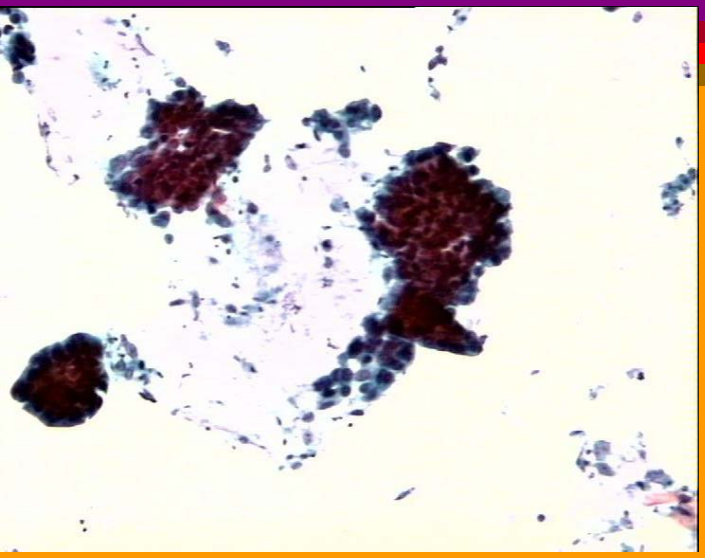
Συμβατικό επίχρισμα

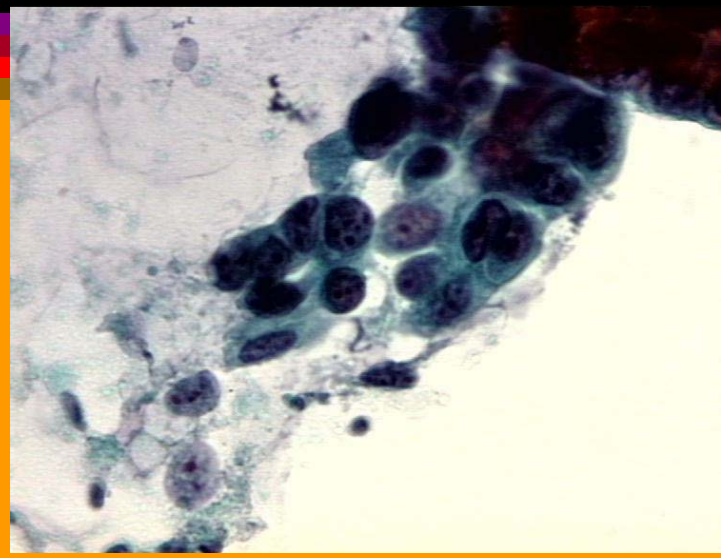


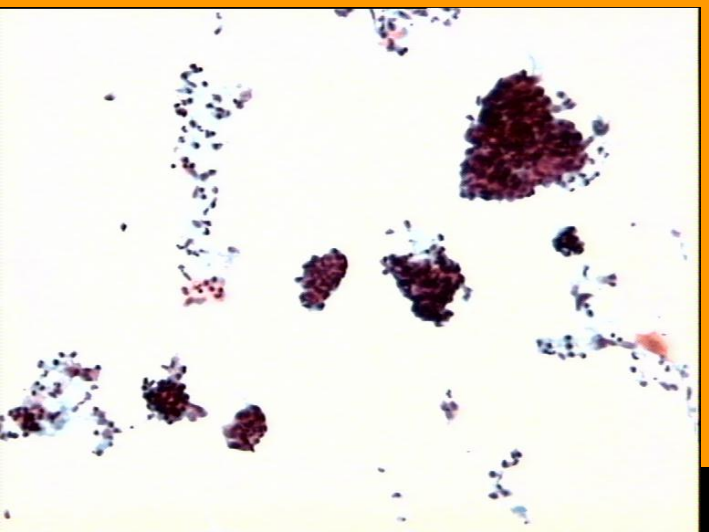


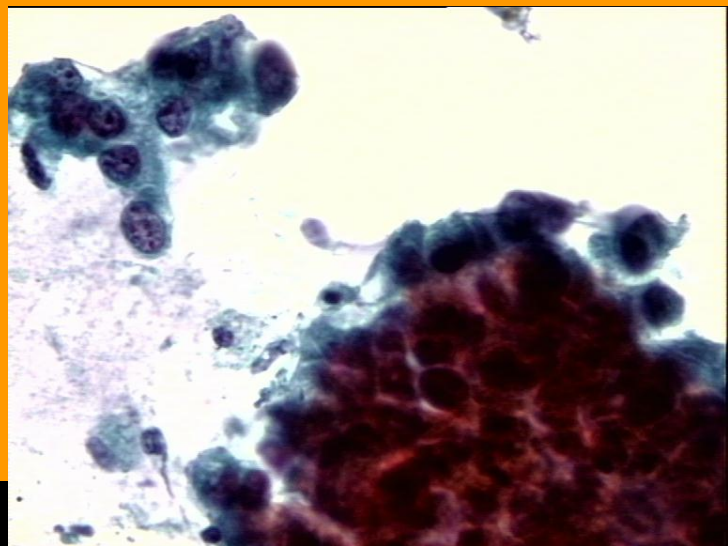
Επίχρισμα ThinPrep

Ατελής μονιμοποίηση

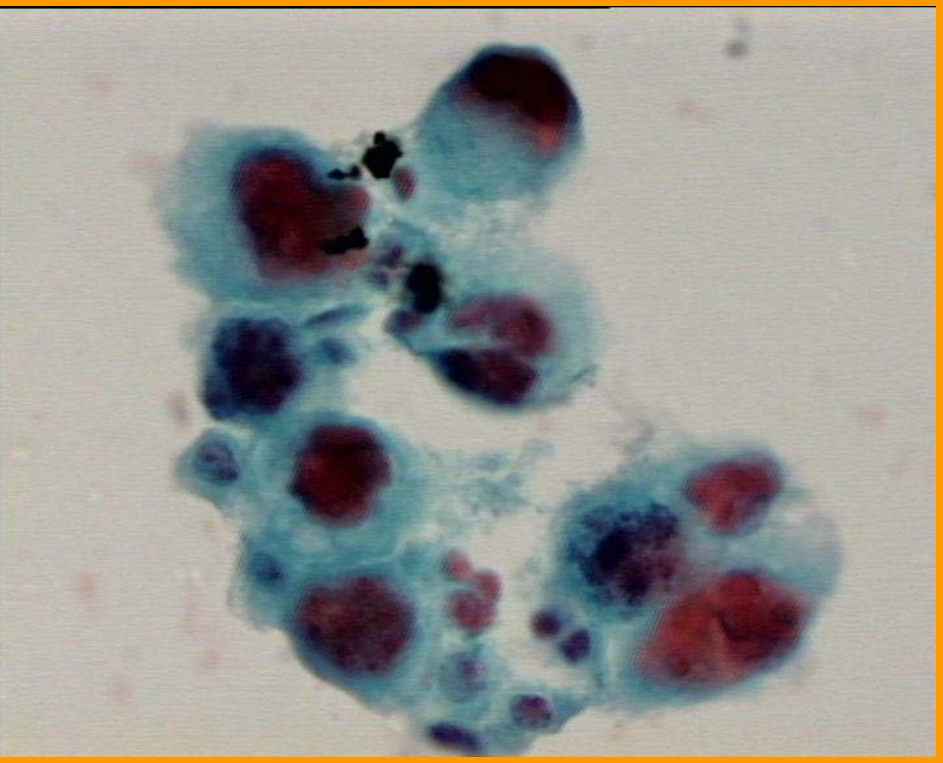


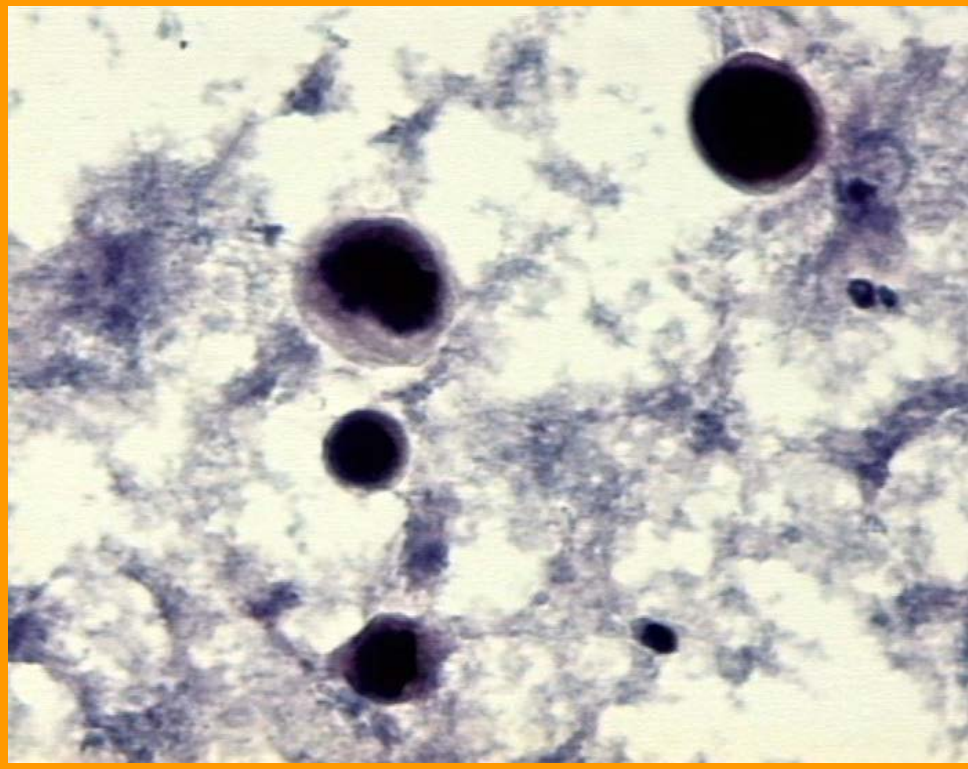




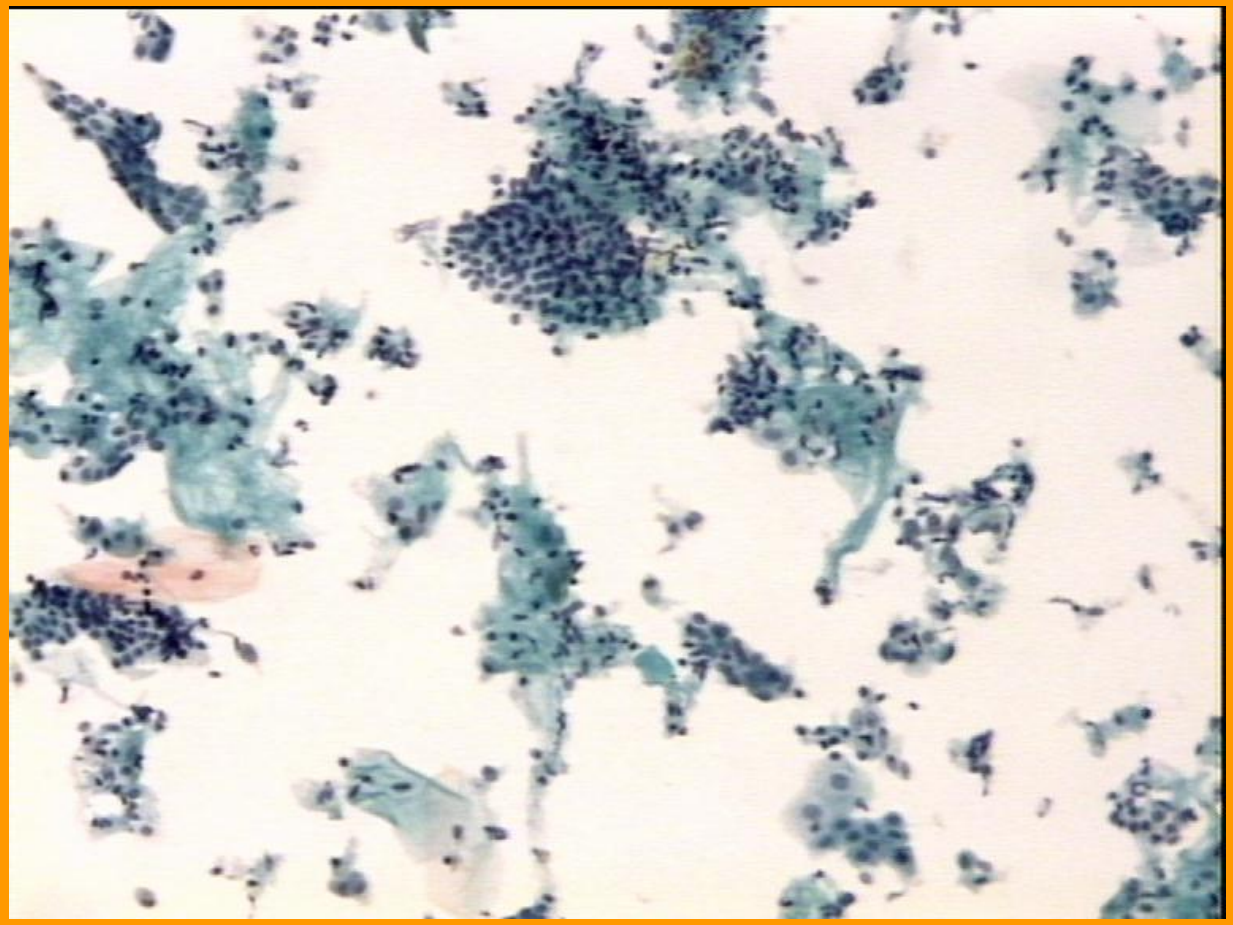


Ατελής Διαφοροποίηση





Καλής Ποιότητας Επίχρισμα



Διαδικασίες αποχρωματισμού και επαναχρωματισμού

- Είναι δυνατόν να εφαρμοστούν σε όλα τα επιχρίσματα, με την προϋπόθεση ότι το κυτταρικό δείγμα έχει μονιμοποιηθεί σωστά
- Αφαίρεση της καλυπτρίδας μετά από παραμονή ποικίλου χρονικού διαστήματος σε ξυλόλη
- Υπάρχουν διάφορες ακολουθούμενες διαδικασίες

Χρώση Giemsa

Η χρώση Giemsa **αποτελεί τη δεύτερη βασική χρώση στο κυτταρολογικό εργαστήριο**

Προέκυψε ως εργαστηριακό λάθος

Ιστορική αναδρομή

- **Ταχεία χρώση** methylene blue (1910)
- **Επιχρίσματα αίματος είχαν χρωσθεί με** methylene blue **αλλά είχαν παραμείνει επί μακρόν και είχαν οξειδωθεί, με αποτέλεσμα ο** Romanowsky **να αναγνωρίσει φωτεινό μωβ χρώμα σε αυτό που στη συνέχεια ονομάζουμε πυρήνες σε πλασμώδια ελονοσίας (1891)**
- **Τρία προϊόντα οξείδωσης της** methylene blue

Ιστορική αναδρομή

- Giemsa 1902-1935
- **Προσέθεσε στο αλκοολικό διάλυμα** Azure-B **γλυκερίνη, με αποτέλεσμα την καλύτερη σταθεροποίηση της χρώσης**
- **Ο** Pappenheim **προσέθεσε διάλυμα** May-Grünwald

Μονιμοποίηση

- Με διάλυμα μεθανόλης
- Σε επιχρίσματα αμονιμοποίητα
- Σε διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης
- Σε διάλυμα 5% φορμόλης

Κυτταρολογικά χαρακτηριστικά

- **Χρωματίζει την ευχρωματίνη και το** RNA **του πυρηνίου**

- **Σε σύγκριση με την αιματοξυλίνη, το δίκτυο της χρωματίνης είναι λιγότερο διαφανές και περισσότερο πυκνό, ενώ το πυρηνικό περίγραμμα σαφέστερο**

Εφαρμογές

- **Παρασιτολογία/βακτηριολογία**
- **Κύτταρα αιμοποιητικού**
- **Υλικό παρακέντησης διά λεπτής βελόνης**
- **Ταχεία κυτταρολογική**
- **Κυτταρολογία ούρων και ΕΝΥ**
- **ΔΔ βλέννας/μυξωματώδους υλικού/αμυλοειδούς**
- **Σωμάτια αμιάντου (**asbestos bodies)
- **Μεταχρωματικό στρώμα**

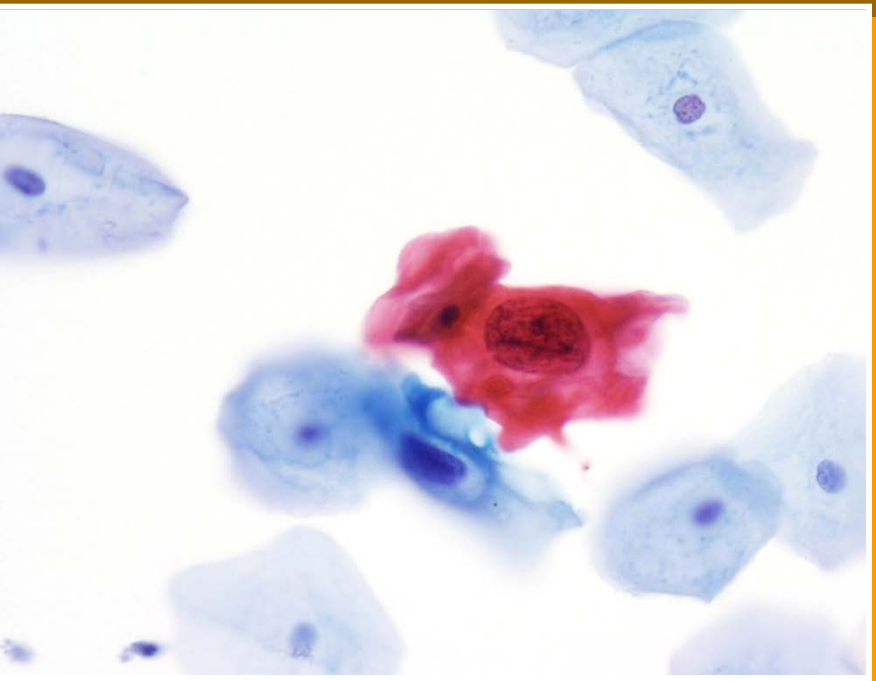
Σύγκριση επιχρισμάτων

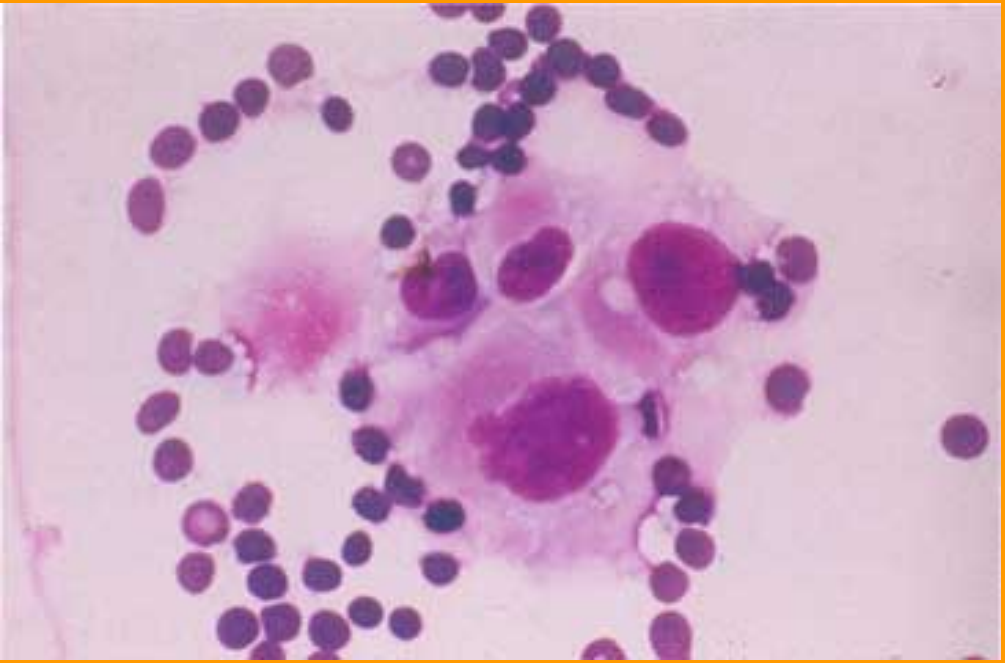
	MGG	PAP
Εξάρτηση από τεχνική επίστρωσης	**Έντονη**	**Μέτρια**
Ξερό επίχρισμα	**Καλή μονιμοποίηση**	**Συχνά** artifacts
Υγρή μονιμοποίηση	**Συχνά** artifacts	**Καλή μονιμοποίηση**
Ιστικά τεμαχίδια	**Δυσχερής αναγνώριση κυτταρικών χαρακτηριστικών**	**Μεμονωμένα κύτταρα με καλύτερη απεικόνιση**
Κυτταρικό μέγεθος	**Ποικίλα αυξημένο**	**Συγκρίσιμο με ιστολογικής τομής**
Κυτταροπλασματικά χαρακτηριστικά	**Καλά απεικονιζόμενα**	**Δυσχερώς απεικονιζόμενα**
Πυρηνικά χαρακτηριστικά	**Διαφορετικά από** PAP stain	**Άριστα**
Πυρήνια	**Όχι πάντα αναγνωρίσιμα**	**Άριστα αναγνωρίσιμα**
Στρώμα	**Καλά απεικονιζόμενα**	**Δυσχερώς απεικονιζόμενα**
Νεκρωτικός ιστός	**Δυσχερώς απεικονιζόμενα**	**Καλά απεικονιζόμενα**

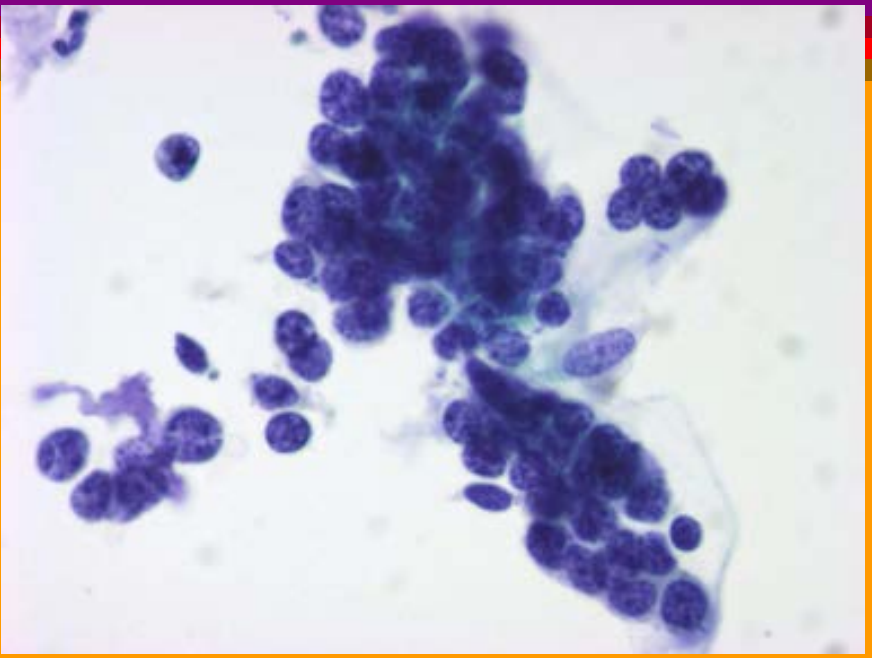
Σύγκριση MGG & PAP stain **ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο**

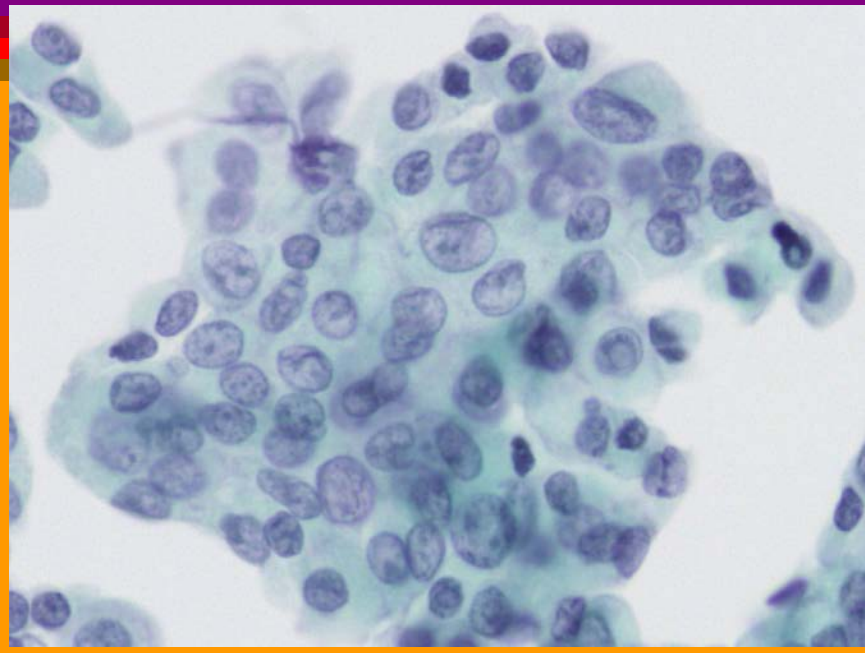
Ιστός	MGG	PAP stain
Επιθηλιακός	**Βλέννα, κολλοειδές, εκκριτικά κοκκία, κοκκία λιποφουσκίνης, κενοτόπια λίπους, βασική μεμβράνη, αμυλοειδές,**	**Πλακώδης διαφοροποίηση, ογκοκύτταρα, ψαμμώδη σωμάτια**
Λεμφικός	**Κυτταροπλασματική βασεοφιλία,** Lymphoid globulus, **κενοτόπια λίπους**	**Πυρηνικό περίγραμμα, δομή χρωματίνης, πυρήνια**
Μεσεγχυματικός	**Ινοχονδρομυξοειδής ουσία, οστεοειδές, βασική μεμβράνη, αμυλοειδές, κενοτόπια λίπους**	**πυρηνικά χαρακτηριστικά σε συμπαγείς αθροίσεις**
Νευροενδοκρινικός	**Κυτταροπλασματική κενοτοπίωση**	**Εμφάνιση χρωματίνης ως «αλατοπίπερο»**
Φλεγμονώδης	**Ηωσινόφιλα**	**Μακροφάγα**

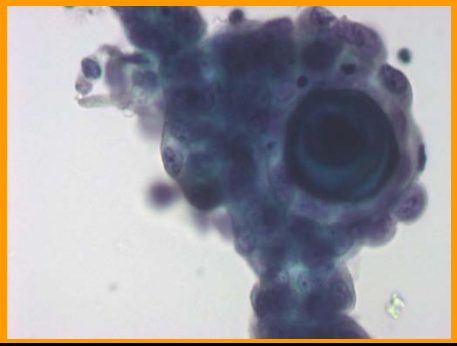
Σύγκριση MGG & PAP stain **ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο**



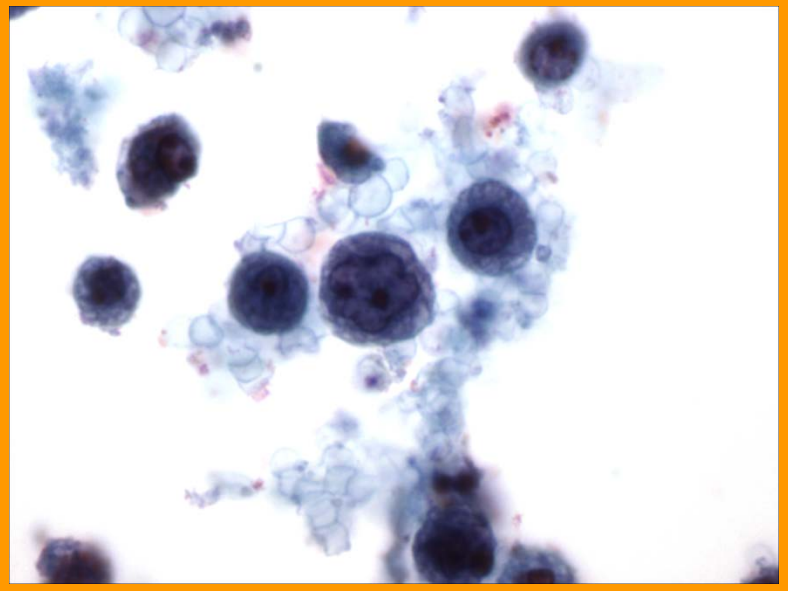


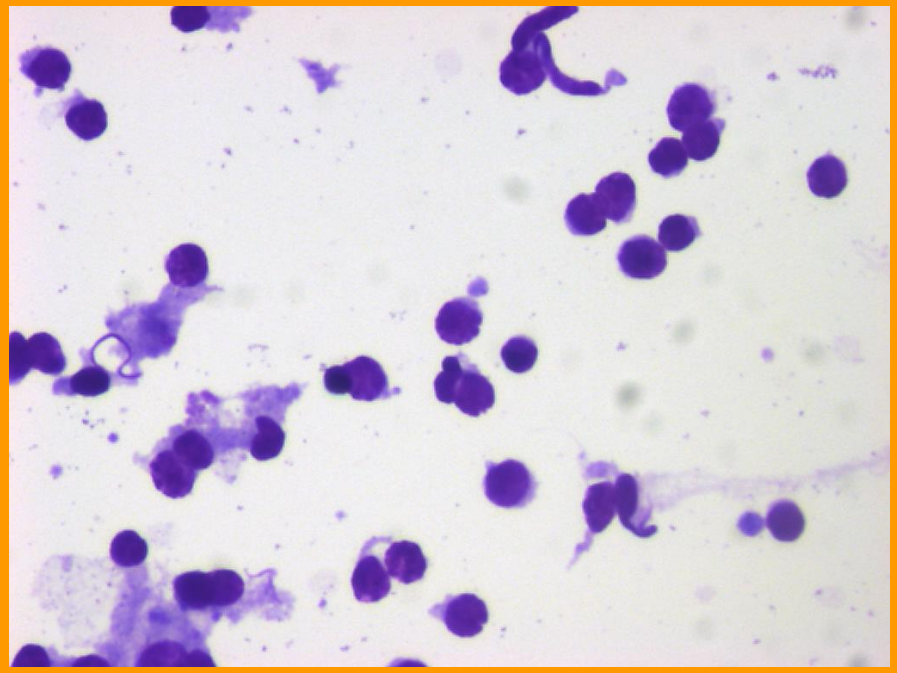




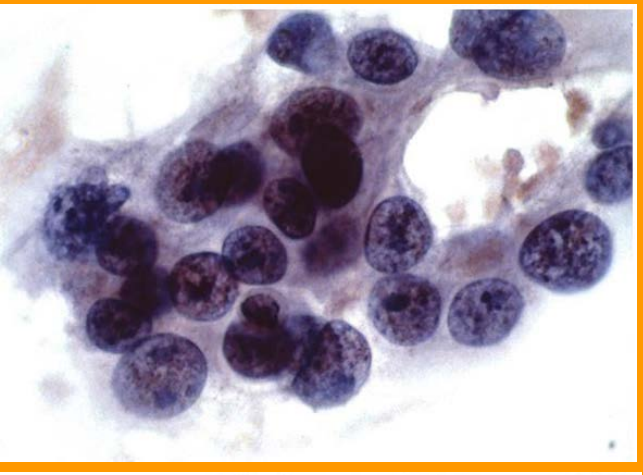


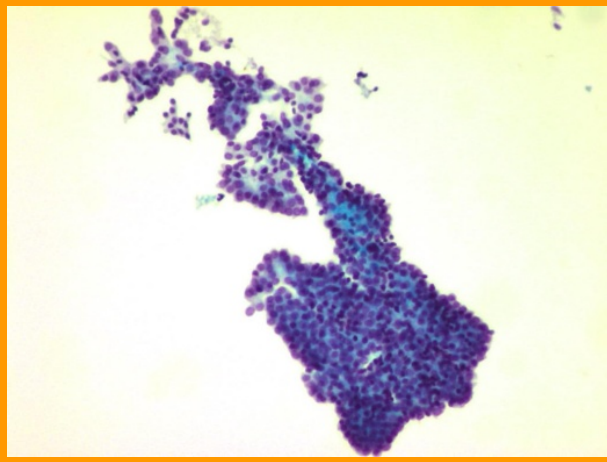
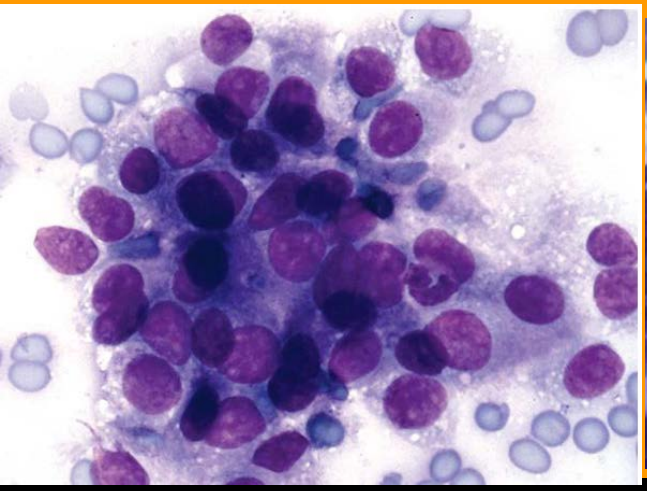
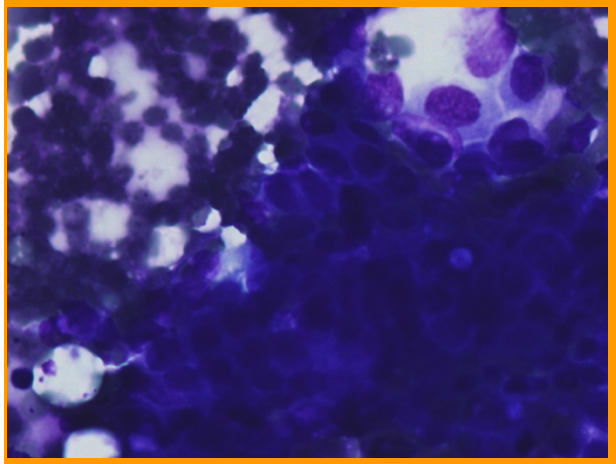
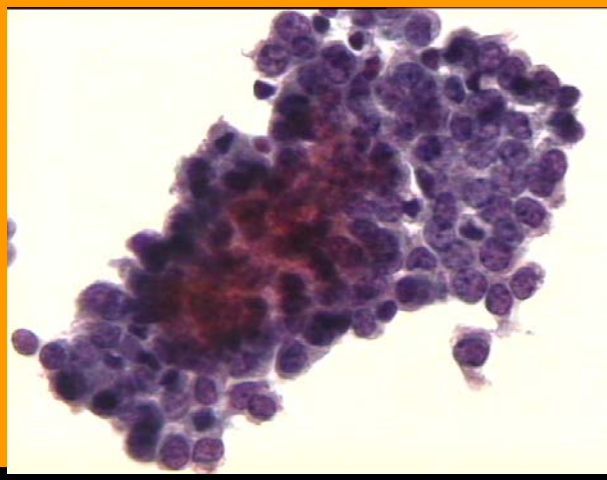
Σύγκριση MGG & PAP stain **σε επιχρίσματα** FNA **λεμφαδένα**



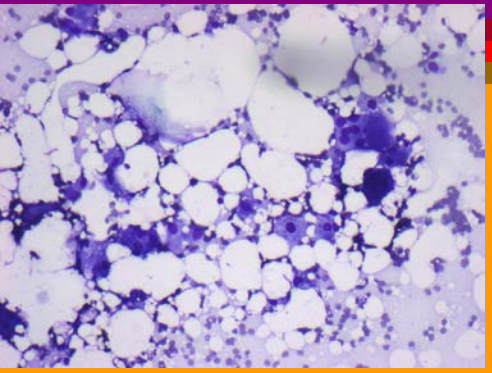


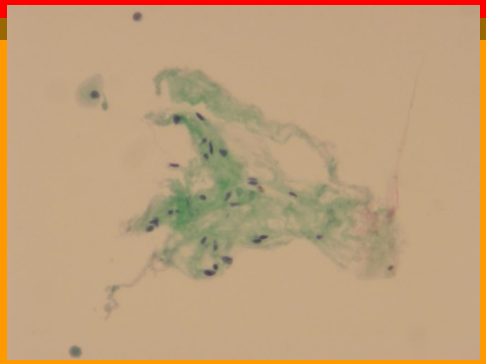
Σύγκριση MGG & PAP stain **σε επιχρίσματα** FNA **μαστού**

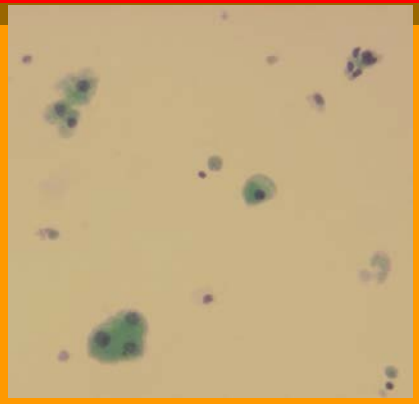


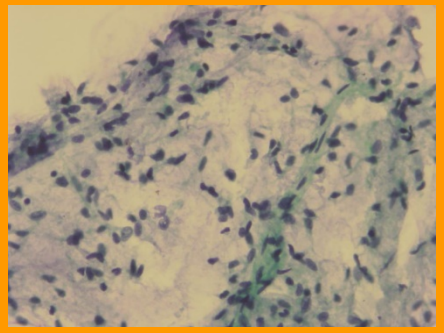





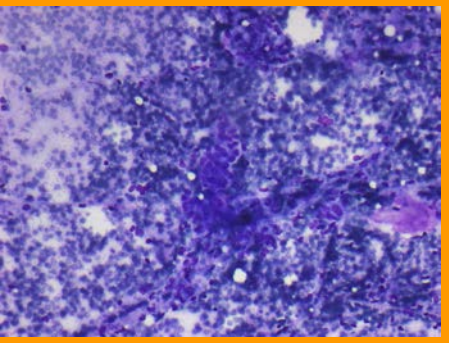
Σύγκριση MGG & PAP stain **σε επιχρίσματα** FNA **μαστού**

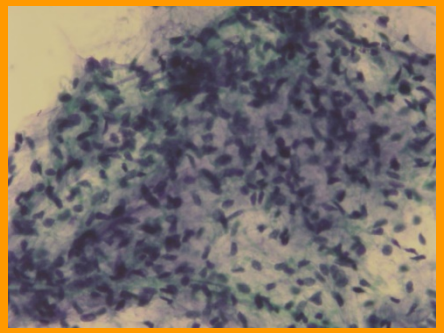




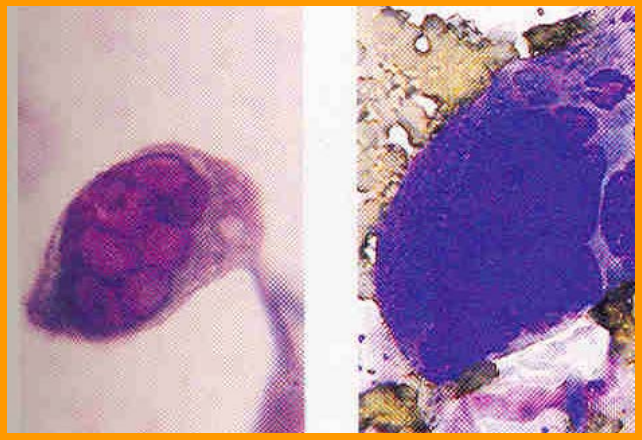


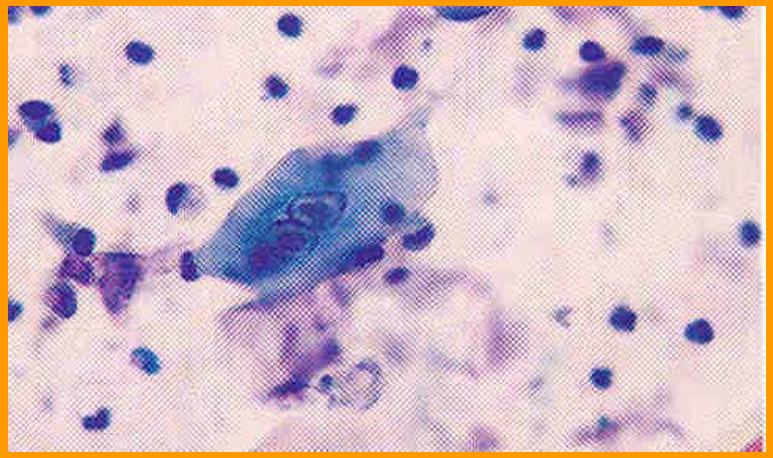


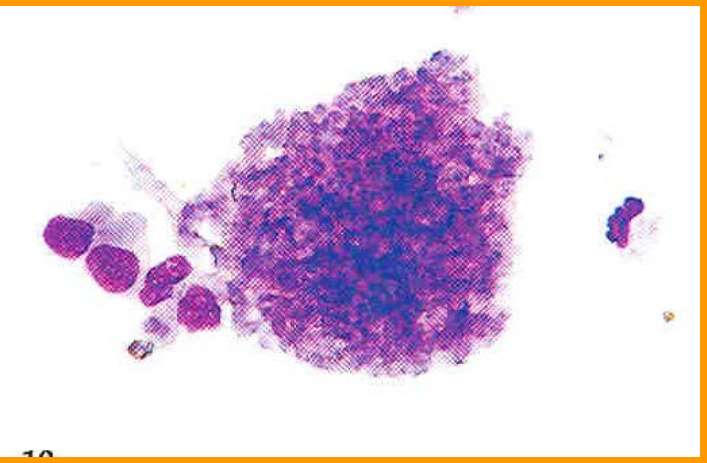


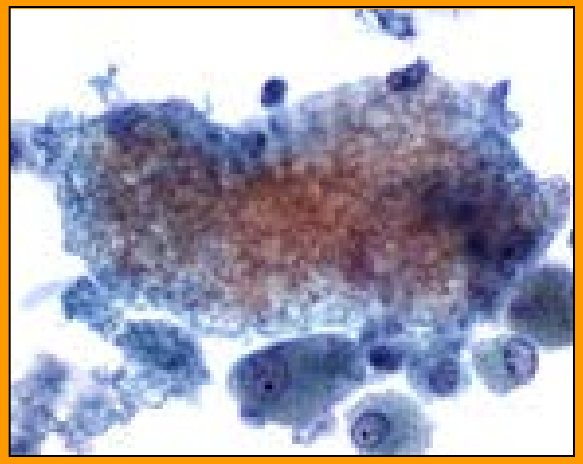


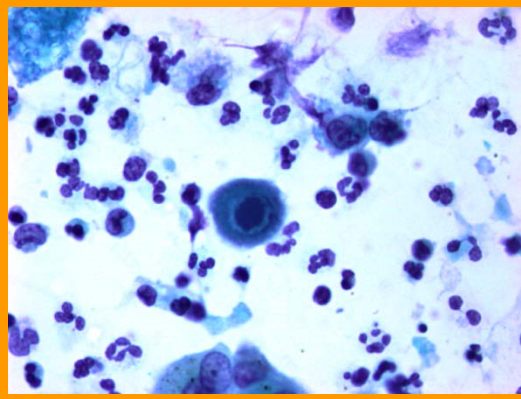
MGG vs. PAP stain σε λοιμώξεις







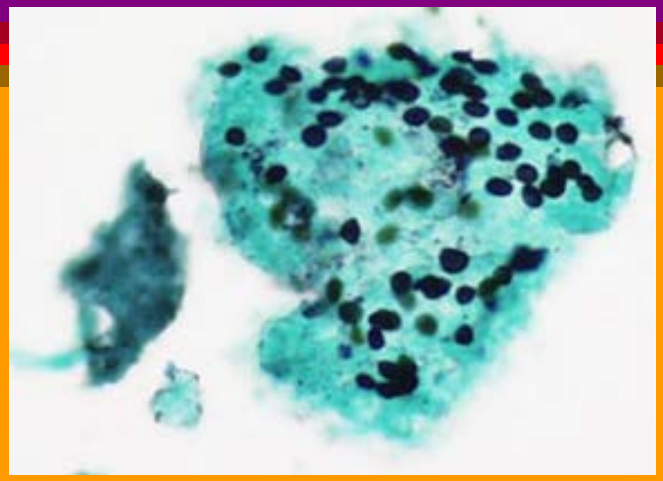


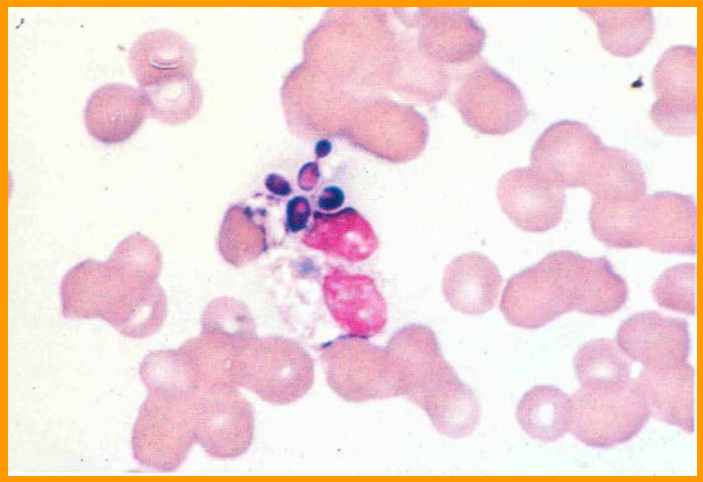


Ειδικές χρώσεις

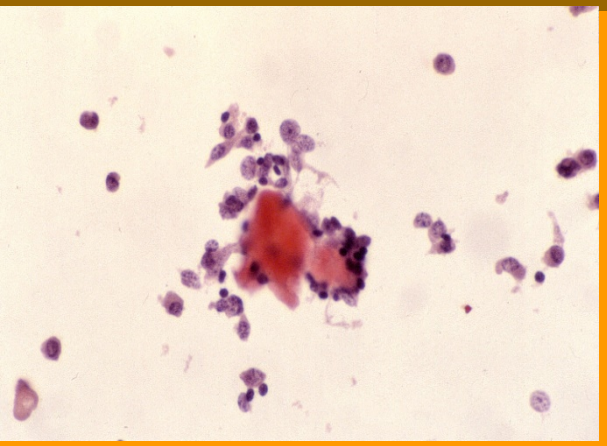
Ειδική χρώση	Ουσία
PAS	**Γλυκογόνο**
PAS/**Διαστάση**	**Βλέννα**
Alcian Blue	**Βλέννα**
Prussian Blue	**Σίδηρος**
Masson-Fontana	**Μελανίνη**
Grimelius	**Αργυρόφιλα κοκκία**
Gomori's Silver	**Για μικροοργανισμούς**
Oil-red-O	**Λίπος**
Fouchet's	**Κοκκία χολής**
Congo red	**Αμυλοειδές**

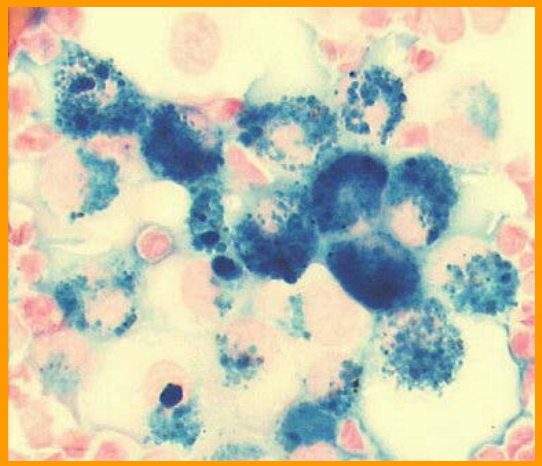
Ειδικές χρώσεις σε λοιμώξεις

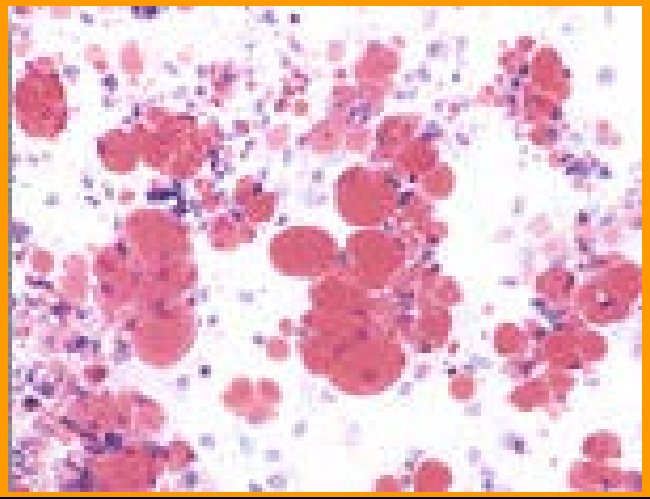




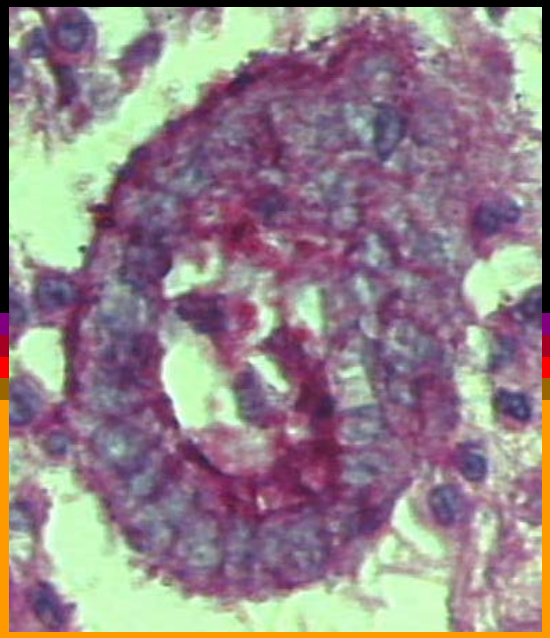
Ειδικές χρώσεις σε υλικό FNA και BAL

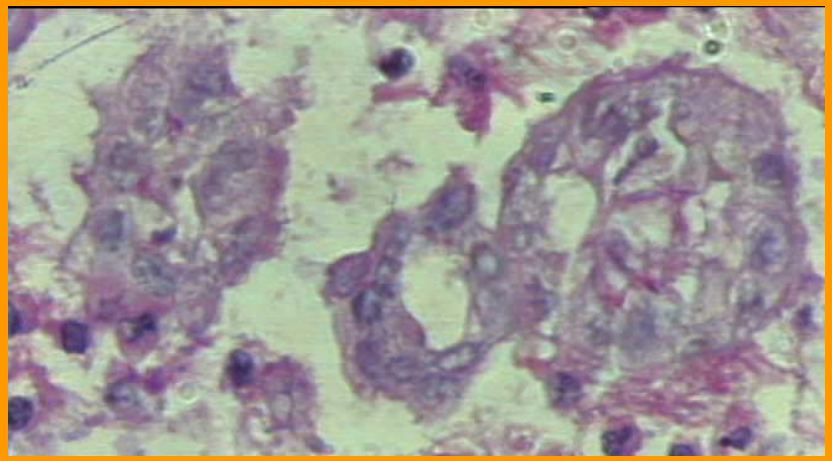


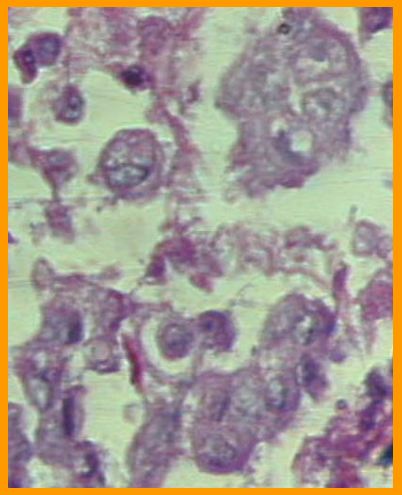
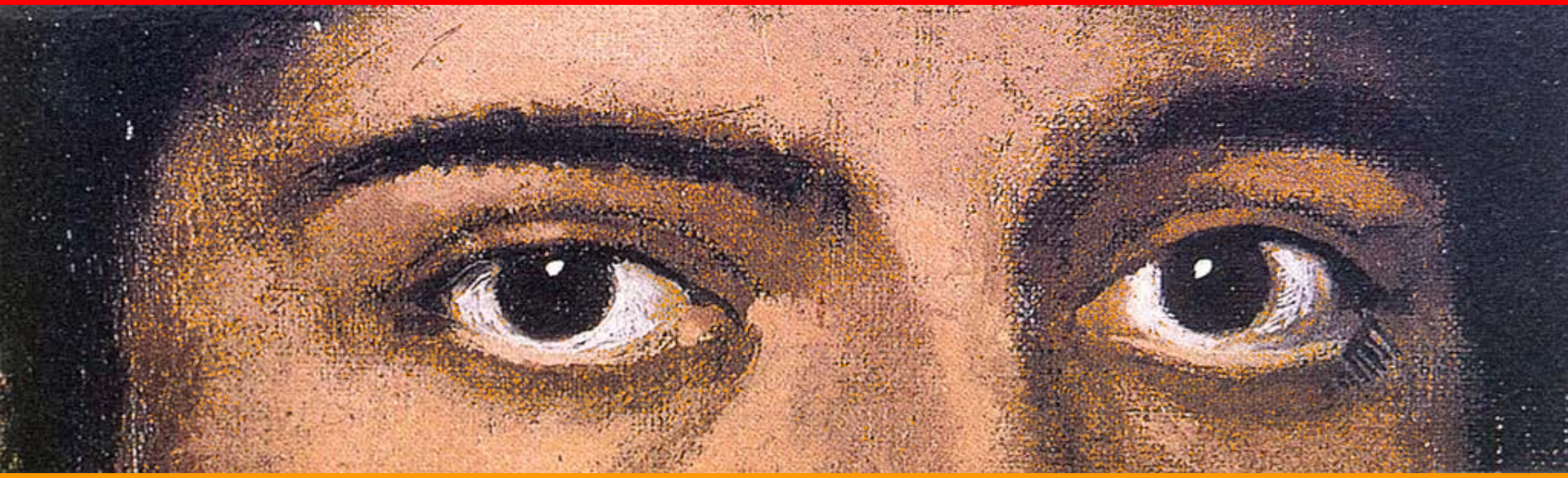




PAS (+)







PAS διαστάση (-)