



Faculty of Biological Science and Technology
Zoology and Botanical Department
Practical Animal Physiology

Differential Leukocyte Count (DLC)

Part 1- An introduction to blood cells & blood smear preparation

شمارش افتراقی گلبول های سفید

قسمت اول - مقدمه ای بر سلول های خونی و روش تهیه گسترش خونی

By: Shirin Kashfi

Ph.D in Animal Development

Sh.kashfi@staf.ui.ac.ir



- ▶ خون نوعی بافت پیوندی محسوب می شود که دارای سه جزء است:
 - ▶ سلول (گلبول های قرمز، گلبول های سفید و پلاکت ها)
 - ▶ مایع میان بافتی (پلازما)
 - ▶ رشته (فیبرین)
- ▶ ترکیب پلازما:

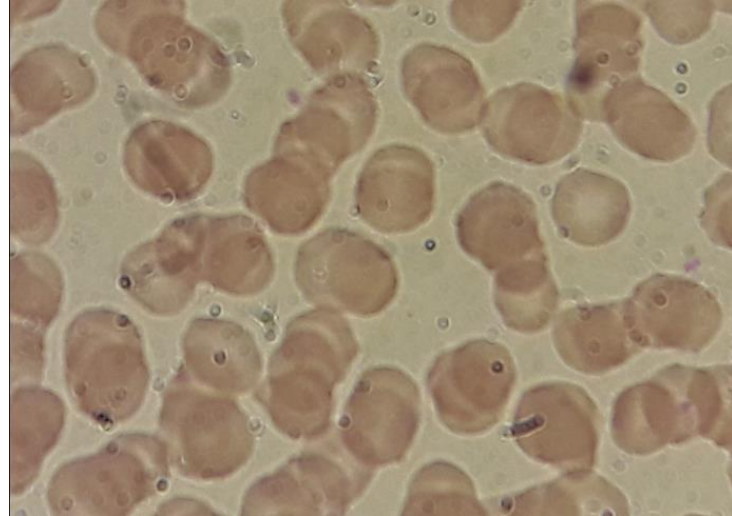
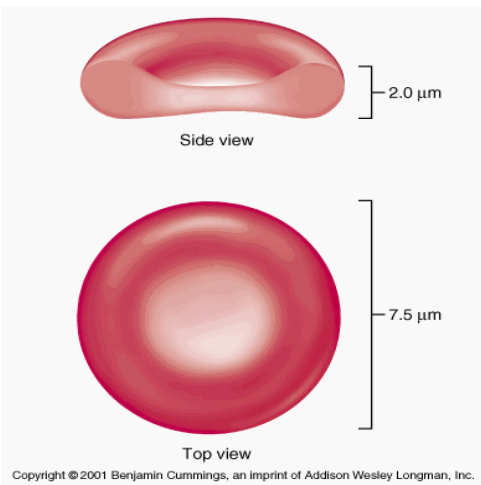
Water	Proteins	Other solutes
92% by weights	7% by weights Albumins 58% Globulins 37% Fibrinogen 4% Regulatory proteins 1%	1% by weights Electrolytes Nutrients Respiratory gases Waste products

From: Junqueira's basic histology, 2013

گلبول قرمز red blood cell (RBC) or erythrocyte



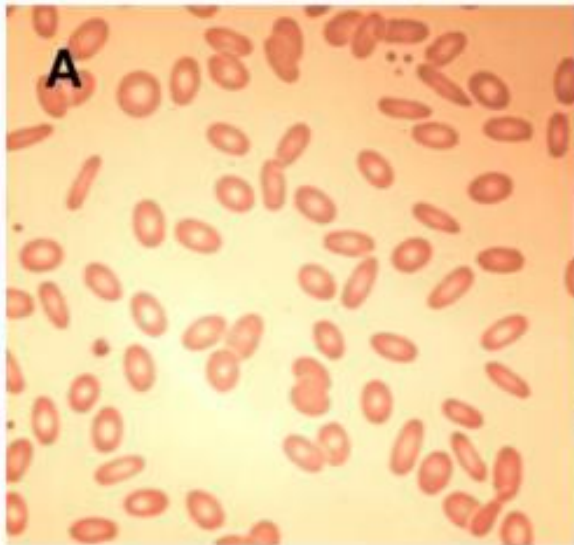
- ▶ فراوان ترین سلول های موجود در خون محسوب می شوند؛ تعداد آنها بسته به سن، جنس و ارتفاع محل سکونت از سطح دریا متفاوت است
- ▶ در انسان، گلبول قرمز به شکل دیسک مقعرالطرفین با میانگین قطر ۷/۵ میکرومتر است؛ ضخامت آن در بیشترین قسمت در حدود ۲ میکرومتر است
- ▶ در انسان و بسیاری دیگر از پستانداران فاقد هسته و ارگانل های سلولی و فقط کیسه ای مملو از هموگلوبین است
- ▶ رنگ قرمز خون به واسطه هموگلوبین موجود در گلبول های قرمز است
- ▶ غشاء گلبول قرمز بسیار انعطاف پذیر است
- ▶ وظیفه عمده گلبول قرمز حمل اکسیژن است



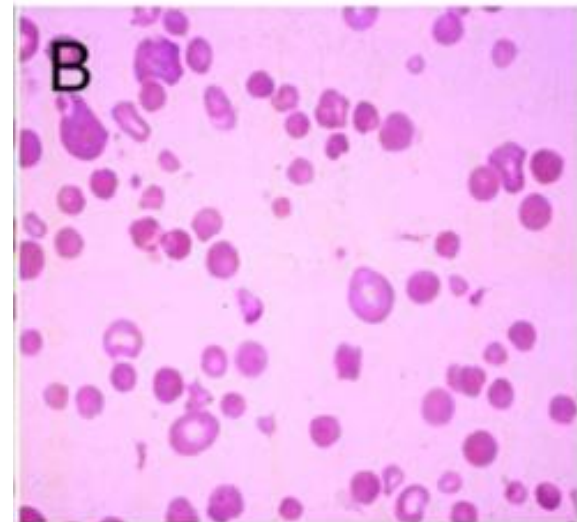


وجود ناهنجاری های ژنتیکی در پروتئین های شرکت کننده در ساختار غشای گلبول های قرمز منجر به تولید گلبول های قرمز غیر طبیعی می شود؛ مانند:

- ▶ اسفروسیتوزیس ارثی (hereditary spherocytosis): در این حالت به دلیل نقص در برخی از پروتئین های غشا (مانند α and β , ankyrin, spectrin, band 3) گلبول های قرمز کاملاً کروی می شوند. این قبیل گلبول های قرمز به دلیل کاهش نسبت سطح به حجم قابلیت تغییر شکل کمی دارند و بسیار شکننده هستند. در گسترش های خون محیطی به واسطه عدم وجود مرکز کم رنگ تر مشخص می شوند
- ▶ الیپتوسیتوزیس ارثی (hereditary elliptocytosis): در این حالت به دلیل نقص در برخی از پروتئین های غشا (مانند α and β spectrin, glycoprotein C, 4.2 protein) که برای پایداری و عملکرد غشا گلبول قرمز لازم هستند، گلبول های قرمز در خون محیطی بیضی شکل دیده می شوند



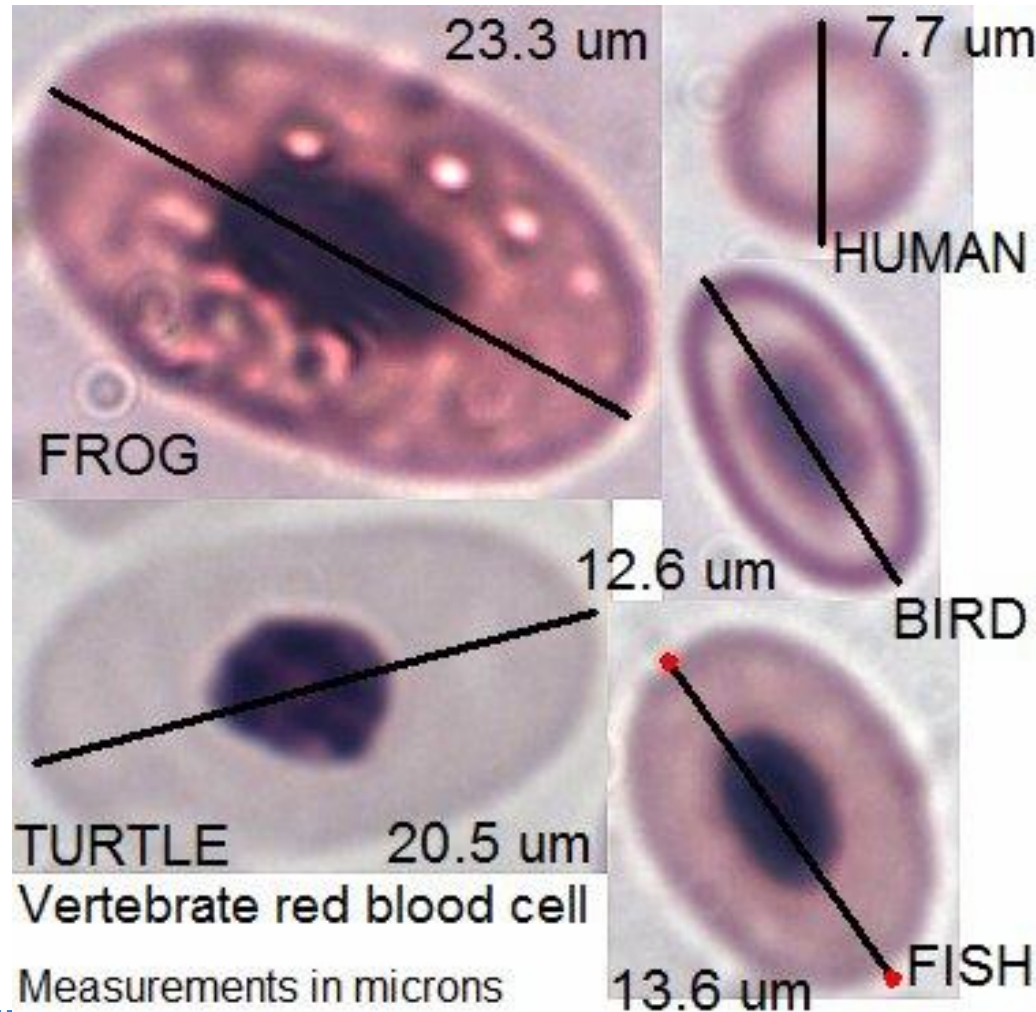
نمای گلبول های قرمز در گسترش خون محیطی فرد مبتلا به الیپتوسیتوزیس ارثی



نمای گلبول های قرمز در گسترش خون محیطی در فرد مبتلا به اسفروسیتوزیس ارثی



گلبول های قرمز همه مهره داران بجز پستانداران دارای هسته است



گلبول های سفید white blood cells (WBC) or leukocytes



▶ سلول های تخصص عمل یافته خون که توان مهاجرت از خون به بافت ها را داشته و دارای عملکردهای ایمنی گوناگونی هستند
▶ این سلول ها را بر اساس شکل هسته و گرانول های ویژه سیتوپلاسمی به دو دسته تقسیم می کنند:

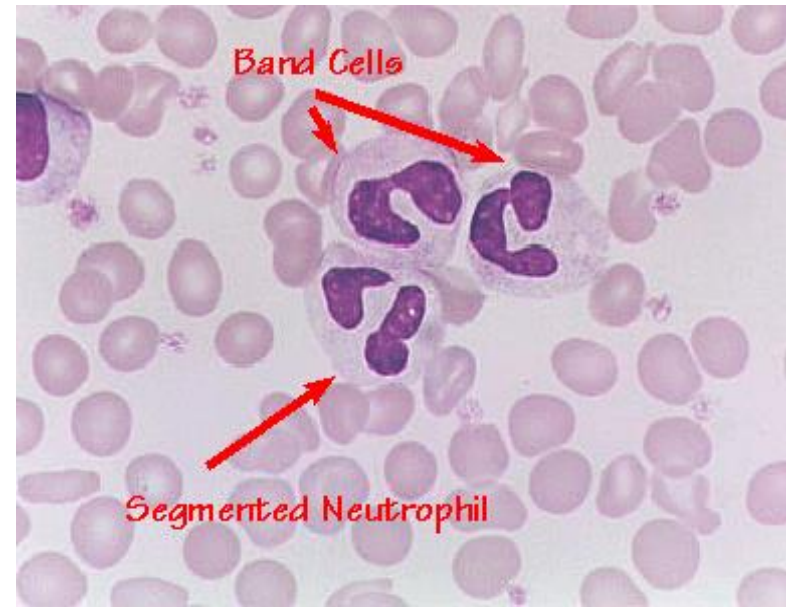
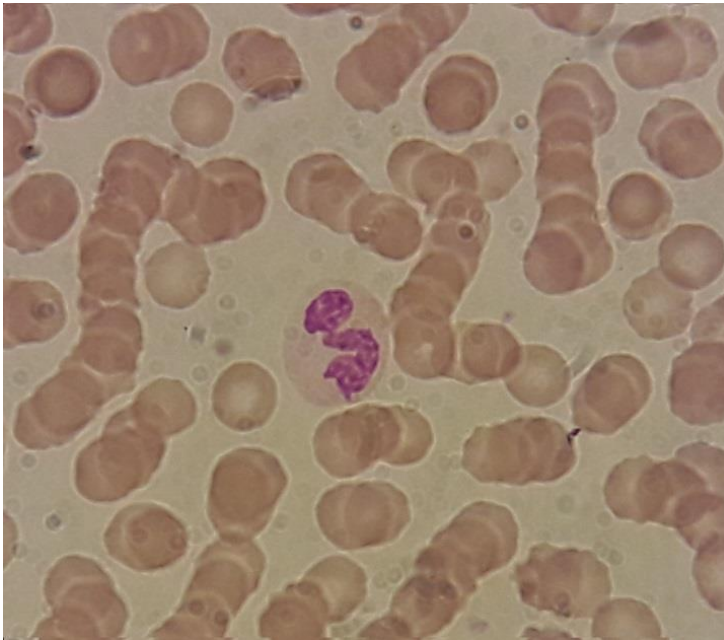
- ✓ granulocytes or polymorphonuclears
 - ✓ neutrophils
 - ✓ eosinophils
 - ✓ basophils
- ✓ agranulocytes or mononuclears
 - ✓ lymphocytes
 - ✓ monocytes

▶ گرانولوسیت ها حاوی دو نوع گرانول آزرورفیل (azurophil) و گرانول های ویژه هستند
▶ آگرانولوسیت ها فقط حاوی گرانول های آزرورفیل هستند

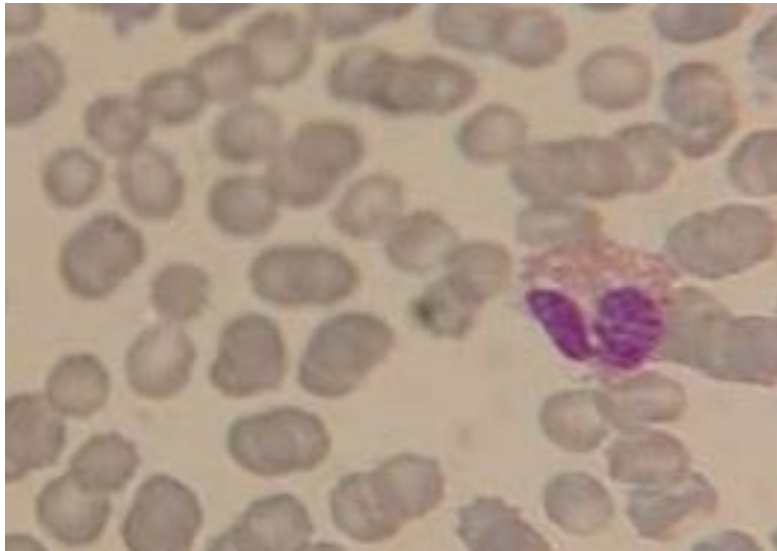
نوتروفیل Neutrophil



- ▶ فراوان ترین گلبول سفید موجود در خون محسوب می شوند
- ▶ در حدود ۱۵-۱۲ میکرومتر قطر دارند (تقریباً دو برابر قطر گلبول قرمز)
- ▶ نوتروفیل بالغ هسته ۳-۵ قسمتی دارد
- ▶ نوتروفیل جوان هسته قطعه نشده یا دو قسمتی دارد و N-band cell نامیده می شود
- ▶ سیتوپلاسم خاکستری یا آبی کم رنگ سرشار از گرانول دارد
- ▶ مهمترین وظیفه آن بیگانه خواری است



اُوزینوفیل (اسیدوفیل) Eosinophil (Acidophil)



- ▶ فراوانی کمتری دارند
- ▶ در حدود ۱۵-۱۲ میکرومتر قطر دارند
- ▶ ائوزینوفیل هسته دو قسمتی دارد
- ▶ سیتوپلاسم به رنگ زرد و سرشار از گرانول های همسان قرمز رنگ است
- ▶ در واکنش های حساسیتی و نیز مبارزه با انگل ها نقش دارد

■ گرانول های ائوزینوفیل حاوی هیستامیناز و پروتئین هایی ائوزینوفیلی مانند پراکسیداز، RNase، DNase، لیپاز، پلاسمینوژن و پروتئین بازی اصلی (major basic protein) است که در از بین بردن انگل ها موثر هستند

بازوفیل Basophil



- ▶ کم تعدادترین گلبول سفید در جریان خون هستند
- ▶ تقریباً هم اندازه نوتروفیل ها هستند
- ▶ دارای هسته دو قسمتی هستند که معمولاً توسط گرانول های بزرگ بنفش رنگ پوشیده شده است
- ▶ مانند سایر گرانولوسیت ها می تواند از جریان خون خارج شده و در بافت مستقر شود



■ Mast cells در بافت پیوندی عملکردی مانند بازوفیل دارد

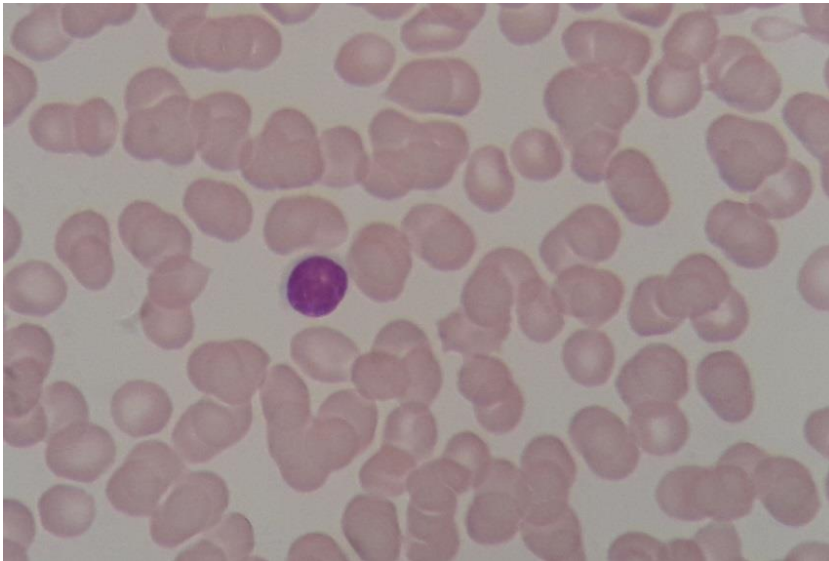
لنفوسیت lymphocyte



- ▶ جزء آگرانولوسیت ها است و از نظر تعداد پس از نوتروفیل ها پر تعدادترین گلبول سفید در جریان خون است
- ▶ در اندازه های مختلف دیده می شود؛ لنفوسیت های کوچک تقریباً هم اندازه گلبول های قرمز هستند؛ لنفوسیت های متوسط و بزرگ ۹-۱۸ میکرومتر هستند
- ▶ در بیشتر موارد دارای هسته گردی هستند که به شدت رنگ پذیر است ولی لنفوسیت هایی که هسته آنها کاملاً گرد نباشد هم در جریان خون دیده می شوند
- ▶ هسته معمولاً قسمت عمده حجم سلول را اشغال کرده است به طوری که در لنفوسیت های کوچک ممکن است فقط هاله ای از سیتوپلاسم دیده شود

انواع لنفوسیت ها

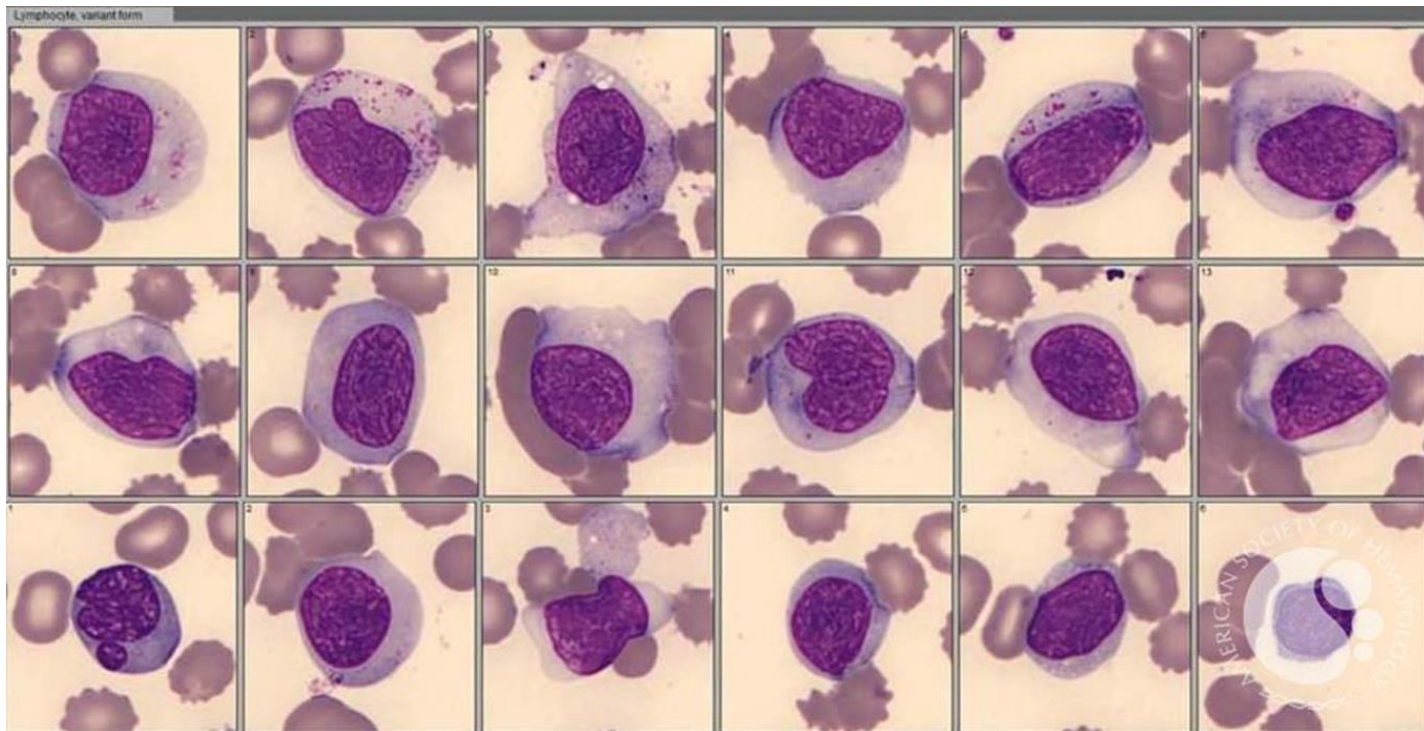
- B lymphocyte
- در پی برخورد با آنتی ژن می توانند به پلازما سل (plasma cell) تمایز یابند که آنتی بادی های ویژه ترشح می کند
- T-Lymphocytes
- در مقابله با عفونت های ویروسی، سلول های سرطانی و سلول های بیگانه نقش دارد
- Natural Killer Cells (NK Cells)
- در مقابله با سلول های سرطانی و سلول های آلوده به ویروس نقش دارد

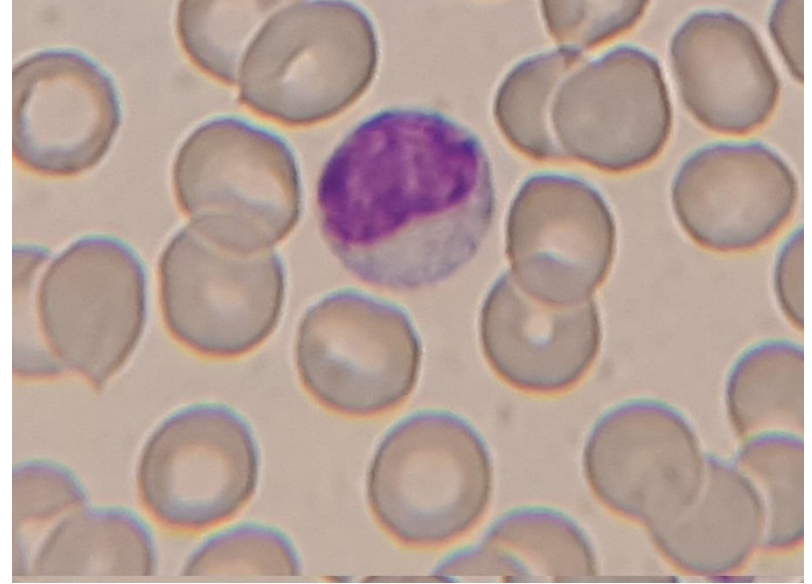


لنفوسیت های آتیپیک atypical lymphocytes



- ▶ لنفوسیت های آتیپیک به لنفوسیت هایی گفته می شود که در پاسخ به عفونت ها (ویروسی، باکتریایی یا انگلی)، استرس، بیماری های خود ایمنی یا برخی درمان های دارویی فعال می شوند
- ▶ این قبیل لنفوسیت ها معمولاً از مورفولوژی عمومی سایر لنفوسیت های موجود در جریان خون عمومی تبعیت نمی کنند مثلاً ممکن است به اندازه مونوسیت ها باشند و نسبت هسته به سیتوپلاسم آنها مشابه مونوسیت ها باشد یا دارای هسته های تورفته باشند
- ▶ حضور آنها تا حد ۱۲٪ کل لنفوسیت ها در جریان خون محیطی طبیعی است






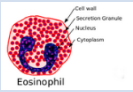
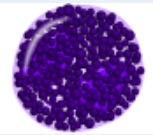

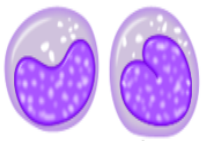
مونوسیت monocyte



- ▶ جزء آگرانولوسیت ها است و از نظر اندازه بزرگترین گلبول سفید محسوب می شوند
- ▶ هسته کلیوی یا لوبیایی شکل دارند؛ در مونوسیت های مسن تر فرورفتگی هسته بیشتر است
- ▶ بیگانه خوارهای فعالی هستند



- مونوسیت هایی که از جریان خون خارج شده و در بافت پیوندی مستقر شده اند ماکروفاژ نامیده می شوند

Type	Nucleus	Specific granules	Differentiated count (%)	Life time	function	morphology
Granulocytes						
neutrophil	3-5 lobes	bright pink	57-67	1-4 d	Phagocytosis	
eosinophil	2 lobes	red/dark pink	1-3	1-2 w	Remove parasites/ regulate local inflammation	
Basophil	2 lobes/ S shape	Blue//dark purple	0-0.75	few months	Modulates inflammation, release histamin or heparin	
Agranulocytes						
Lymphocyte	Relatively round	-	25-33	Few hours /few years	Innate or acquired immunity	
monocyte	Jagged or C shape	-	3-7	Few hours /few years	Phagocytosis	

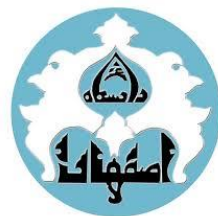
From: Junqueira's basic histology, 2013



پلاکت platelet or thrombocyte

- ▶ قطعات سلولی فاقد هسته که در جریان خون هستند و در انعقاد خون نقش دارند
- ▶ پلاکت ها کروی شکل به قطر ۲-۴ میکرون هستند ولی در گسترش های خونی ستاره ای شکل دیده می شوند
- ▶ معمولاً به صورت مجتمع دیده می شوند





روش تهیه گسترش خونی و رنگ آمیزی آن با گیمسا





▶ مواد و وسایل مورد نیاز

- ▶ خون کامل (می توان از خون گرفته شده از ورید روی ضد انعقاد استفاده کرد یا با لانست از سر انگشت یک قطره خون گرفت)
- ▶ الکل متانول
- ▶ رنگ گیمسا (1 به 10 رقیق شده)
- ▶ آب مقطر
- ▶ لام
- ▶ وسیله مناسب برای برداشت خون
- ▶ ظروف مناسب رنگ آمیزی (جار)
- ▶ میکروسکوپ



انواع جار رنگ آمیزی

رنگ گیمسا Giemsa stain

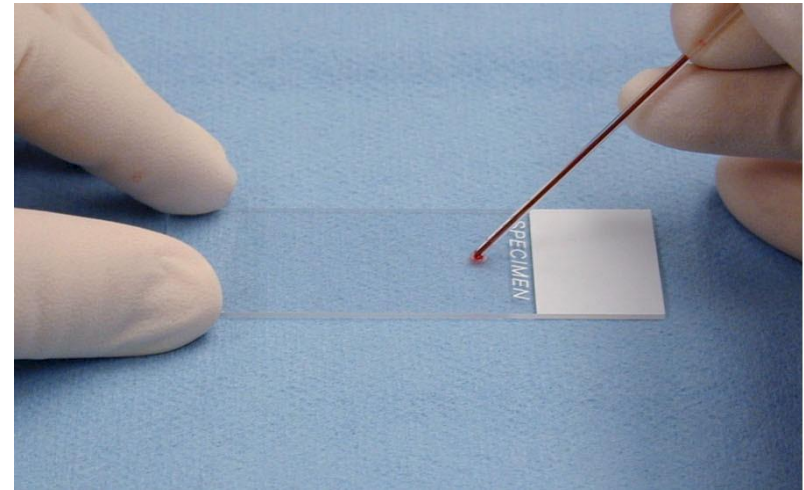
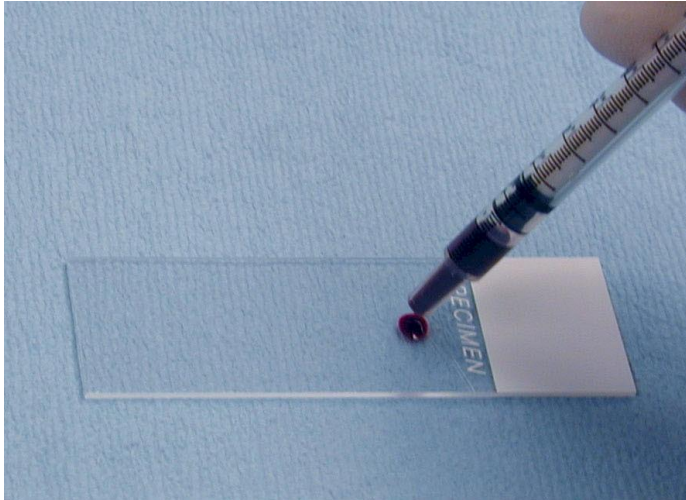


1. مهمترین اجزاء تشکیل دهنده رنگ گیمسا متیلن بلو و انوزین است. با استفاده از این روش رنگ آمیزی سیتوپلاسم به رنگ نارنجی تا صورتی یا آبی خاکستری تا آبی تیره و کروماتین هسته طیفی از رنگ های قرمز تا سرخابی و بنفش را به خود می گیرند. همچنین گرانول های گلبول های سفید نیز تمایل زیادی به اجزاء رنگی تشکیل دهنده این نوع رنگ ها دارند
2. برای تهیه رنگ گیسما ۱ به ۱۰ از محلول گیمسا خالص باید ۱ میلی لیتر گیمسا را با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی لیتر رساند



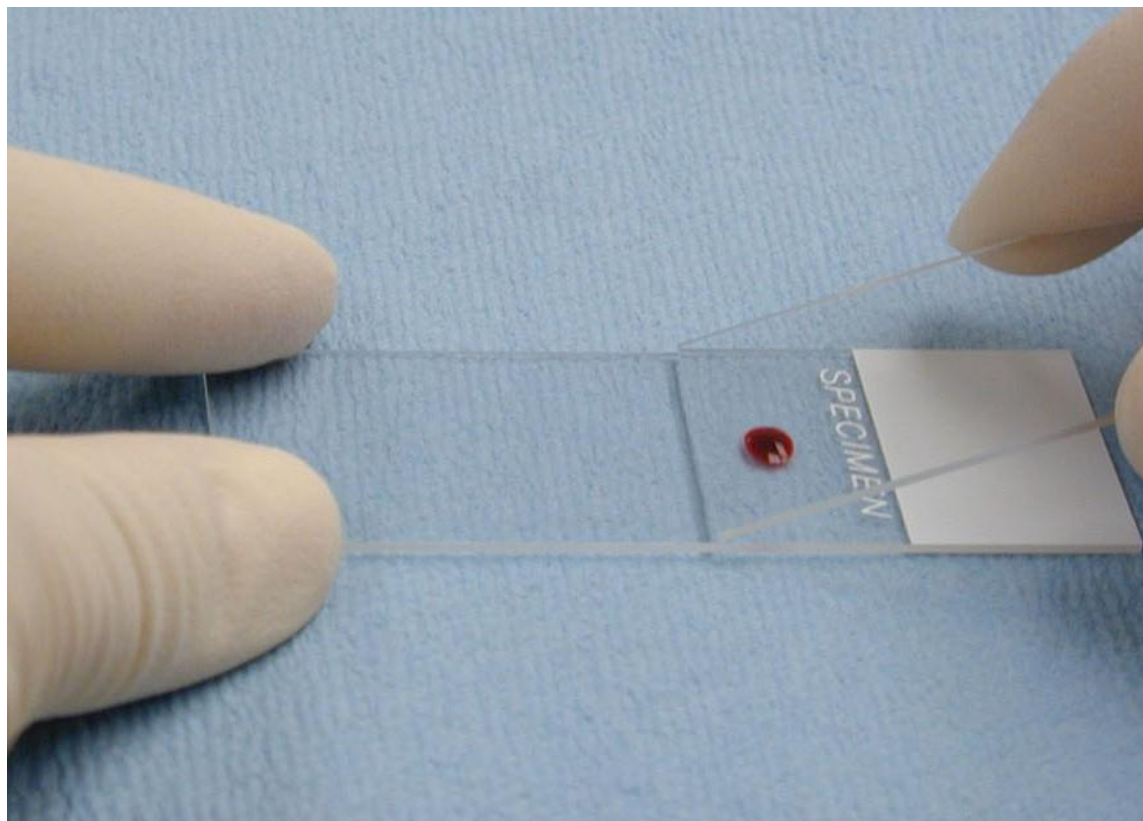
تهیه گسترش خونی (blood smear)

- یک قطره خون بر روی لام کاملاً تمیز و خشک قرار دهید
- برای اینکار می توان از لوله هماتوکریت، سرنگ انسولین یا پپیت پاستور استفاده کرد
- قطره خون نباید خیلی بزرگ یا خیلی کوچک باشد



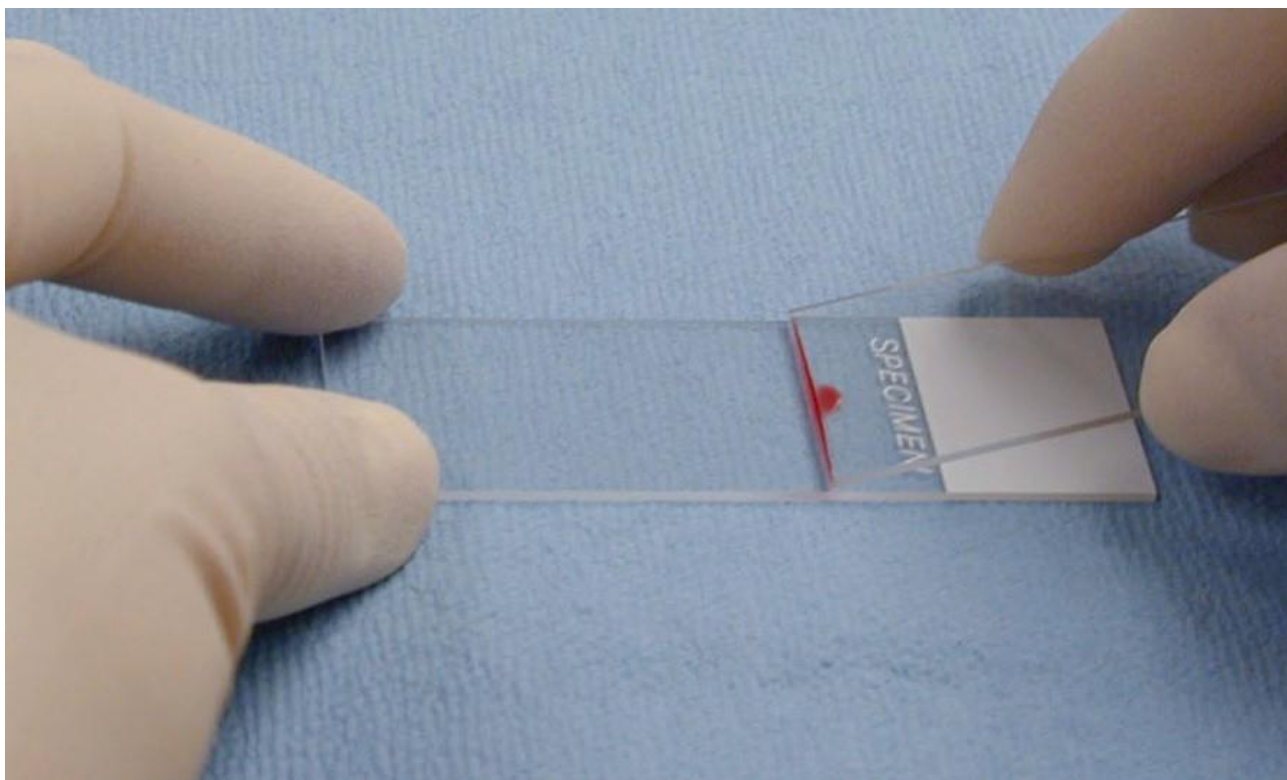


- قرار دادن لام گسترش دهنده با زاویه ۳۰ تا ۴۵ درجه جلوی قطره خون
- اگر زاویه بیشتر باشد، گسترش به دست آمده ضخیم خواهد بود



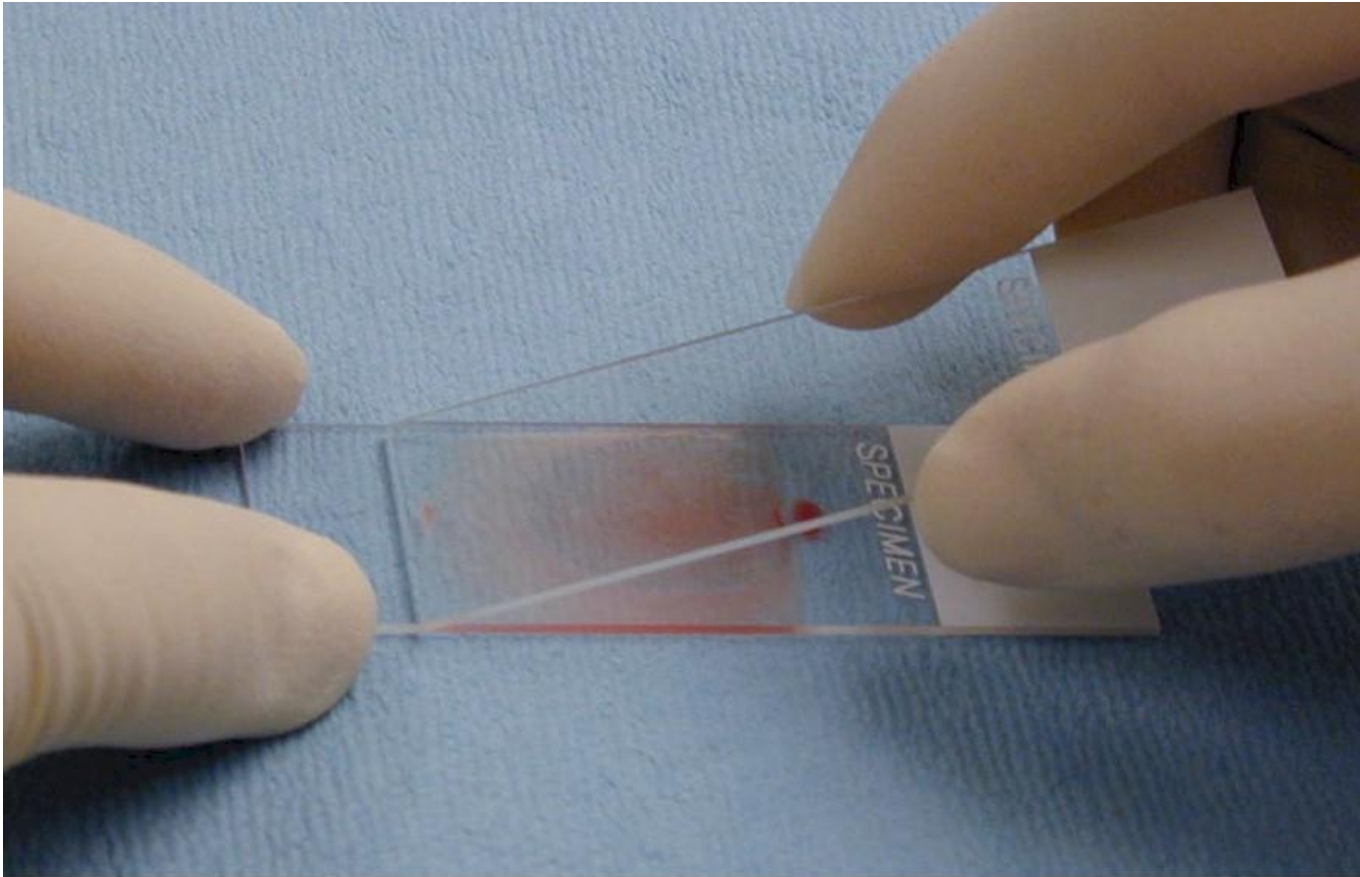


■ لام گسترش دهنده را به سمت عقب حرکت دهید تا با قطره خون تماس پیدا کند. خون طبق خاصیت موئینگی در زیر تیغه لام گسترش دهنده پخش می شود

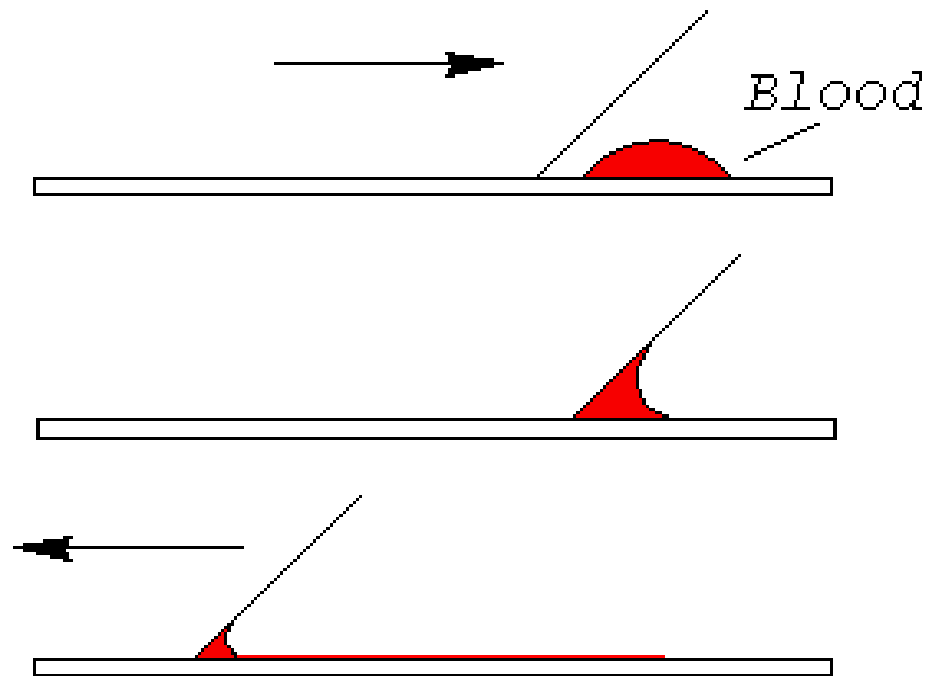




■ سریع و نرم لام گسترش دهنده را به سمت جلو حرکت دهید





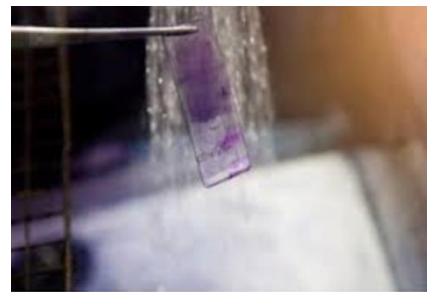
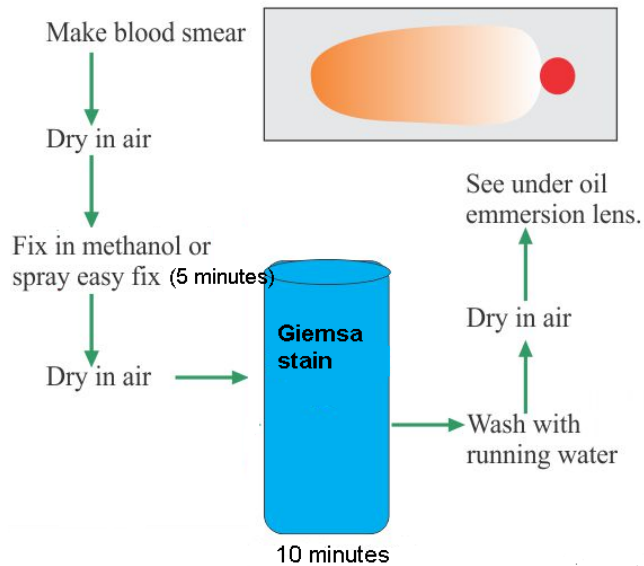


مرور مراحل تهیه لام گسترش خونی به ترتیب از بالا به پایین



تثبیت و رنگ آمیزی گسترش خونی

- گسترش خونی تهیه شده را با تکان دادن لام در هوا خشک نمایید. گسترش باید به سرعت خشک شود. خشک شدن گسترش باعث کنگره دار شدن گلبول های قرمز می شود
- گسترش خشک شده را به مدت ۳-۵ دقیقه در الکل متانول قرار دهید تا سلول های چسبیده به سطح لام تثبیت (fixation) شوند
- اجازه دهید متانول موجود روی سطح لام در هوا خشک شود
- گسترش خونی تثبیت شده را در محلول گیمسا (Giemsa) وارد کنید. مدت زمان قرارگیری در رنگ بستگی به غلظت رنگ به کار برده شده دارد و معمولاً بین ۱۰-۳۰ دقیقه است. هر چقدر غلظت رنگ کمتر باشد به مدت زمان بیشتری برای رنگ آمیزی نیاز است (معمولاً از گیمسا که ۱ به ۱۰ رقیق شده است استفاده می شود)
- در آخر برای زدودن رنگ اضافه لام شیشه ای واجد گسترش تهیه شده به آهستگی با آب شیر (یا آب مقطر) به آرامی شستشو دهید



نحوه شستشو لام پس از رنگ آمیزی



بالا گسترش خونی قبل از رنگ آمیزی و پایین گسترش خونی بعد از رنگ آمیزی

مراحل انجام تثبیت و رنگ آمیزی گسترش خونی با روش گیمسا