

<b>Gjelder:</b>	Elevoppgave for VGS	<b>Emne:</b>	<b>Dato:</b>	06.02.2009
<b>Fag:</b>	Patologi	<b>Laboratorieuka 2009 Biologi 1</b> <b>Bioingeniørutdanning-patologi</b>	<b>Side:</b>	Side 1 av 5
<b>Ansvarlig:</b>	Bioingeniørutdanning			

## PRØVETAKING

Start øvelsen med å lage et celleutstryk, av det flerlagede plateepitelet i munnhulen.

1. Merk et objektglass med navn
2. Skrap av celler fra overflaten i munnhulen, med en bomullspinne
3. Rull pinnen over objektglasset
4. Spray på fiksativ
5. La glasset tørke i varmeskap.
6. Farg snittet med Papanicolaous fargemetode. En rutinefarge for celleprøver.

### Papanicolaou fargemetode (rutinefarge for cytologi preparat)

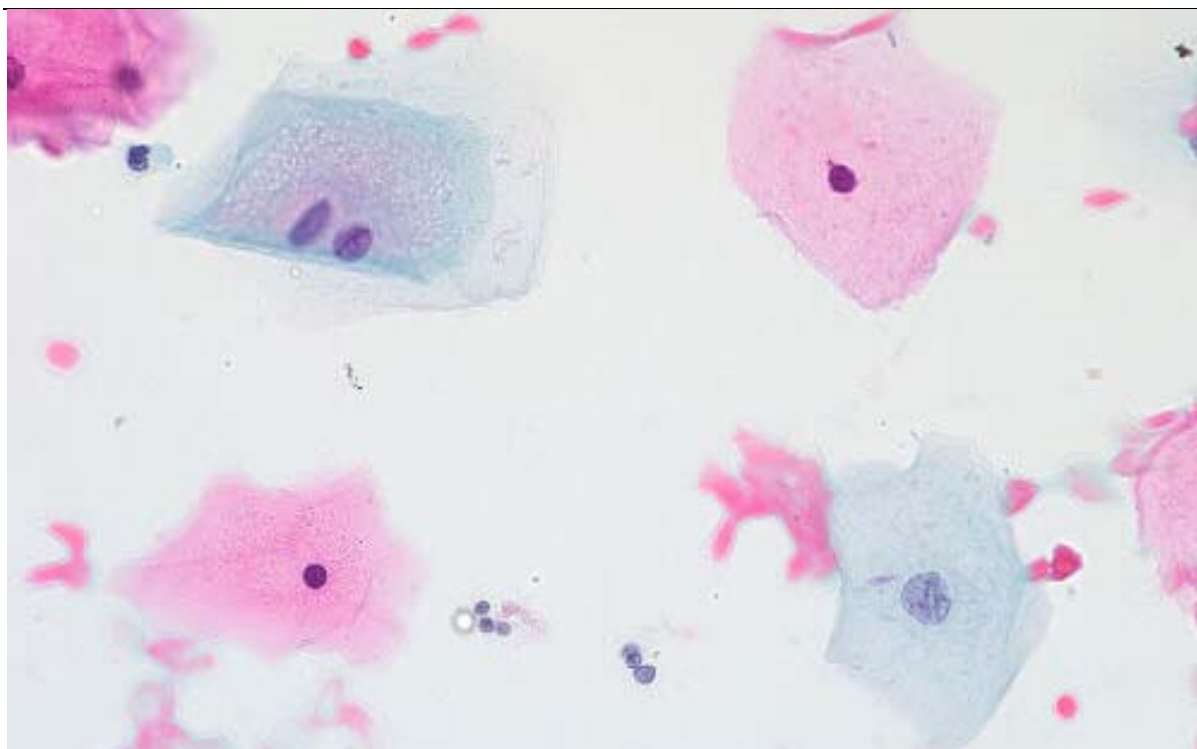
1. 5 min.....Snitt i 96% alkohol
2. 5 min.....70% alkohol
3. Skyll i vann
4. 3min 30 sek...Harris Hematoxylin
5. Skyll kort i vann
6. 3 dypp .....0.5% HCl
7. 5 min.....Blånes i varmt vann
8. ca 1 min .....70% alkohol
9. ca 1 min .....96% alkohol
10. 1 min 30 sek...Orange G 6
11. 1 min .....96% alkohol
12. 3 min 3 sek ....EA 50 (eosin/light green)
13. 1 min .....Abs. Alkohol
14. ca 30 sek.....Abs alkohol
15. Legg på dekkglass

#### Fargerresultat:

Kjerner	mørk blå
Cytoplasma i basale og parabasale celler	blått/grønnlig
Cytoplasma i intermediære celler	lys blått
Cytoplasma i superfisielle celler	rosa
Cytoplasma i keratiniserte celler	orange
Cytoplasma i sylinderepitelceller	lys blått

I celleprøven kan vi se plateepitleceller med ulik modning. Keratiniserte døde celler ligger på overflata og har oransje farge. Modne celler har rosa cytoplasma og liten tett mørk cellekjerne, de ligger under de keratiniserte cellene. Underst ligger de umodne cellene som har blått cytoplasma og litt større cellekjerne.

<b>Gjelder:</b>	Elevoppgave for VGS	<b>Emne:</b>	<b>Dato:</b>	06.02.2009
<b>Fag:</b>	Patologi	<b>Laboratorieuka 2009 Biologi 1</b> <b>Bioingeniørutdanning-patologi</b>	<b>Side:</b>	Side 2 av 5
<b>Ansvarlig:</b>	Bioingeniørutdanning			



### *PAPANICOLAOU FARGEMETODE*

De forskjellige fargemolekylene konkurrerer om å farge cytoplasma i celler.

Denne metoden benyttes i de fleste laboratorier som rutinefarge for cytologiske preparater. Konkurransen mellom fargemolekylene, gjør at en ved fargeforskjeller kan skille mellom umodne, modne og keratiniserte epitelceller.

Prinsippet bygger på fargestoffers evne til å binde seg til forskjellige grupper i vevet ved forskjellig pH, samt fargemolekylens diffusjonshastighet, størrelsen på fargemolekylene og vevsstrukturens permeabilitet.

**Hematoxylin** benyttes som kjernefarge. Hvor en her benytter seg av regressiv farging, og fjerner overskuddsfarge med HCl (ekstraherer med syre).

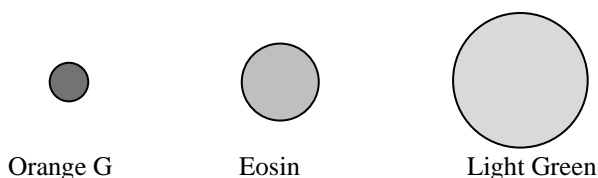
**Orange Gold** (kationfarge) penetrerer tette strukturer og binder seg til positive komponenter ved ionebinding. Fargen er løselig i alkohol og konkurrerer med **Eosin** og **Light Green** ved pH 6,5. Ved hjelp av disse får en farget proteinene i cytoplasma, men også pyknotiske kjerner, høyt keratinisert cytoplasma og erythrocytter. Fargen blir gul-oranger.

**Eosin** (kationfarge) bindes ved pH > 6,0 til proteiner og farger modne epitelceller, nukleoler og cilier. Større fargemolekyl enn Orange G. Eosin farger cytoplasma rødt i superficielle celler.

**Light Green** (kationfarge) ved pH 2,0 farger basale, parabasale, intermediære, metaplastisk -og sylinderepitel. Denne fargen bindes også ved ionebinding til positivt ladede komponenter i cytoplasma.

<b>Gjelder:</b>	Elevoppgave for VGS	<b>Emne:</b>		<b>Dato:</b>	06.02.2009
<b>Fag:</b>	Patologi	<b>Laboratorieuka 2009 Biologi 1</b> <b>Bioingeniørutdanning-patologi</b>		<b>Side:</b>	Side 3 av 5
<b>Ansvarlig:</b>	Bioingeniørutdanning				

Diffusjonshastigheten er omvendt proporsjonal med molekylvekten.



**Figur 9:** Små molekyler vil vandre raskest i cellene, men ved lang fargetid vil større fargemolekyl fortrenge de små, der et er plass til dem.

Den tettete strukturen finnes i de fullt modne plateepitelcellene, de keratiniserte cellene og her vil de minste fargemolekylene lettest trenge inn.

### MIKROSKOPERING

En cytologisk prøve undersøkes ved hjelp av mikroskop. Mikroskopet består av flere enkeltdeler. Øverst på mikroskopet er det to okularer som normalt forstørrer 10x. Midt på mikroskopet sitter "revolveren" med objektiver som f.eks. forstørrer 4x, 10x, 25x, 40x og 100x. Den samlede forstørrelsen får man ved å gange okularenes forstørrelse med objektivenes forstørrelse. Med de her nevnte forstørrelsene oppnås en total forstørrelse på 40x, 100x, 250x, 400x og 1000x.

- 4x objektivet er et oversiktsobjektiv som blant annet benyttes ved avmerking av funn som man ønsker å diskutere
- 10x objektivet benyttes ved rutinemessig mikroskopi av et cytologisk preparat
- 25x objektivet benyttes når man ønsker å se nærmere på for eksempel en cellekjerne
- 40x objektivet gir en bedre forstørrelse og enda flere detaljer
- 100x objektivet benyttes normalt ikke i cytologi (benyttes gjerne i mikrobiologi til studering av bakterier)

Preparatet legges på objektbordet med nummeret til venstre. Med "krysskruene" beveger man seg gjennom preparatet i loddrette baner på en sånn måte at synsfeltet flyttes et halvt synsfelt om gangen. Dermed oppnår man at hver celle ses to ganger. Det er svært viktig å bevege seg i tette baner for å sikre seg at cellene på glasset blir sett.

### Plateepitel

Huden er kledd av et flerlaget *forhornet* plateepitel. Forhorningen gir god beskyttelse mot bl.a. fordamping, men ødelegges av konstant fuktighet. Slimhinner er kledd av et flerlaget uforhornede plateepitelet som kan motstå konstant fuktighet.

Plateepitelet er bygget opp av mange lag av celler. Det nederste cellelaget, basalcellene, er celler som deler seg og videre modnes mot overflaten. Basalcellene står på en *basalmembran*, som skiller epitelet fra det underliggende vevet. Når basalceller deler seg blir celler "dyttet opp til" neste lag, det parabasale laget, og etter hvert som det dannes nye celler under den, og cellen samtidig blir mer moden, når den det intermediære og superficelle cellelaget. Til slutt når cellen overflaten og avstøtes.

<b>Gjelder:</b>	Elevoppgave for VGS	<b>Emne:</b>	<b>Dato:</b>	06.02.2009
<b>Fag:</b>	Patologi	<b>Laboratorieuka 2009 Biologi 1</b> <b>Bioingeniørutdanning-patologi</b>	<b>Side:</b>	Side 4 av 5
<b>Ansvarlig:</b>	Bioingeniørutdanning			

## CELLER VI KAN FINNE I AVSKRAP FRA MUNNHULEN

### Epitelceller

#### Basale og parabasale plateepitelceller

De basale cellene danner grunnlaget for fornyelsen av epitelet. De basale cellene er ca.  $200 \mu\text{m}^2$  og ses som små runde eller ovale celler med en ca.  $50 \mu\text{m}^2$  stor sentralt plassert kjerne. Kjernen er gjennomskinnelig med et fint kromatinmønster og fyller en stor del av cytoplasmaet. Kjernen farges mørk blå og cytoplasmaet er blågrønt.

Parabasale celler er litt større enn de basale, ca.  $300 \mu\text{m}^2$ , runde eller ovale med ca.  $50 \mu\text{m}^2$  stor sentralt plassert kjerne. Farges litt lysere blågrønt enn de basale cellene.

#### Intermediære plateepitelceller

Intermediære plateepitelceller ses som store,  $800\text{-}1200 \mu\text{m}^2$ , mangekantede celler med en ca.  $35 \mu\text{m}^2$  stor sentralt plassert kjerne. Cellenes størrelse varierer avhengig av plasseringen i epitelet, jo høyere i epitelet cellene er plassert jo større er cellene. Cytoplasmaet farges lyst blått i en optimalt farget prøve.

#### Superficielle plateepitelceller

Superficielle plateepitelceller er store (ca.  $1600 \mu\text{m}^2$ ) celler med en ca.  $20 \mu\text{m}^2$  stor sentralt plassert, ugjennomskinnelig, skruppet kjerne. Cytoplasmaet er lyst, skarpt avgrenset og farges rosa i et optimalt farget preparat. De superficielle cellene er døde celler som har gjennomgått degenerasjon, derav den skruppete kjernen. De mange lagene i plateepitelet gir god beskyttelse av det underliggende vevet. En ytterligere beskyttelse kan oppnås ved at plateepitelet danner *forhorning* (keratinisering). Det vil da forekomme store, polygonale plateepitelceller uten kjerner (anukleære celler). Cytoplasmaet farges sterkt orange. Sammen med disse cellene ses ofte superficielle plateepitelceller med små, brune granula (keratohyalinkorn) som tegn på kraftig hyalinisering.

Når man skal bedømme om en celle er av intermediær eller av superficiell opprinnelse ser man altså på kjernes utseende og cytoplasmaets farge.

### Andre celler man kan se:

#### **Erytrocytter:**

Erytrocytter (røde blodlegemer) er kjerneløse celler, måler ca.  $40 \mu\text{m}^2$ , og er bikonkave, skiveformede. De ses derfor med et lysere farget sentralt område. De inneholder hemoglobin, som er ansvarlig for transporten av oksygen fra lungene til vevene og av karbondioksid fra vevene til lungene. Erytrocytter i normale utstryk ses ved sårdannelse og ved blødning som følge av prøvetakingen.

#### **Leukocytter**

Leukocytter (hvite blodlegemer) er betegnelsen for en gruppe kjerneholdige celler som stammer fra blodbanen. De er på forskjellige måter involvert i kroppens forsvar mot infeksjoner. Cellene

<b>Gjelder:</b>	Elevoppgave for VGS	<b>Emne:</b>	Laboratorieuka 2009 Biologi 1 Bioingeniørutdanning-patologi	<b>Dato:</b>	06.02.2009
<b>Fag:</b>	Patologi			<b>Side:</b>	Side 5 av 5
<b>Ansvarlig:</b>	Bioingeniørutdanning				

inndeles etter deres utseende i *granulocytter, histocytter, lymfocytter og plasmaceller*. Granulocytterne har mer eller mindre lappedelt kjerne og inneholder mange granula i cytoplasmaet.

### **Nøytrofile granulocytter**

Cellene er ca. 100  $\mu\text{m}^2$  store med en kjerne som er delt i 3-6 lapper. Kjerneformen varierer mye fra celle til celle. Nøytrofile granulocytter ses ved akutt betennelse

### **Monocytter / histocytter / makrofager**

Monocytter kommer fra blodbanen og er forstadium til histocytter / makrofager. Histocytter / makrofager finnes utenfor blodbanen i vevene. Makrofagene er vanligvis 200-300  $\mu\text{m}^2$  store, uregelmessig formede celler. Cytoplasmaet er rikelig, vakuolisert og svakt lyseblått. Kjernen varierer og kan være uregelmessig avrundede eller nyreformede. Cellene kan inneholde fra en til mange kjerner avhengig av cellens aktivitet. De mangekjernede cellene kalles *kjempeceller*. Makrofagene er fagocyterende celler og kjempecellenes fagocyterende evne er større enn enkjernede makrofagers.