

Bloed en bloedcelvorming

Docenten dr. P.J.M. Leenen , prof. dr. H.R. Delwel

1 Toelichting

1.1 Achtergrondinformatie

Bloedcellen en nieuwvorming ervan in het beenmerg zijn essentieel voor het handhaven van de homeostase. Bij de behandeling van kankerpatiënten met cytostatica blijkt dat het beenmerg, met het darmepitheel, van de gezonde weefsels het meest gevoelig is voor deze farmaca die snel delende cellen doden. Hieruit blijkt dat beenmerg een van de organen is met de meest actieve celdeling. Alle bloedcellen, behalve T-lymfocyten, komen na uitrijping direct vanuit het beenmerg in het perifere bloed. Voorlopers van T-lymfocyten gaan uit het beenmerg eerst naar de thymus, waar ze een aantal rijpingsstappen doormaken voordat ze als rijpe cellen in de circulatie komen.

In dit practicum staat het herkennen van verschillende typen bloedcellen en hun voorlopercellen in het beenmerg centraal. We richten ons in eerste instantie op de normale situatie en oefenen de strategie om verschillende typen rijpe cellen en voorlopercellen in m.n. de erythrocytaire en de granulocytaire reeks te onderscheiden. Aan de hand van een enkele casus met (niet-leukemische) aandoening wordt de verandering in het hematopoietisch systeem bij ziekte geïllustreerd.

Dit practicum hangt nauw samen met de ZO Bloed en Beenmerg over de normale ontwikkeling van bloedcellen.

1.2 Literatuur

Ross, Pawlina: Histology, 7th ed. Ch. 10. Blood (pp. 270-313)

1.3 Overige informatie

Dit practicum wordt gegeven in de computerzaal, gebruik makend van virtuele microscopie.

Studiebelasting

Het volgen van dit practicum neemt twee uur in beslag (exclusief voorbereidingstijd).

Vorbereiding

We realiseren ons dat intensieve voorbereiding van dit practicum lastig is, omdat het aan het begin van het blok plaatsvindt. Kijk in ieder geval de ZO Bloed en Beenmerg en het bijbehorende schema goed door (ook achterin deze handleiding).

Planning

Dit practicum bestaat uit het bestuderen van microscopische preparaten en foto's van:

- Perifeer bloed:
Preparaat 1: uitstrijk normaal perifeer bloed (May-Grünwald Giemsa)
Preparaat 2: uitstrijk perifeer bloed patiënt met ziekte van Pfeiffer
- Beenmerg
Preparaat 3: uitstrijk normaal humaan beenmerg (MGG)

- Thymus
Preparaat 4: thymus (rat; HE kleuring)
Preparaat 5: thymus epitheel (muis, immunohistologie)
Afbeelding 1: thymus reticulair bindweefsel (muis, immunohistologie)
- Centrale nabespreking van de bevindingen (ongeveer 20 minuten)

Deel, voordat je begint, je tijd goed in. Blijf niet te lang hangen op een deelaspect, maar spaar een aantal vragen op en bespreek die met een assistent.

2 Handleiding

2.1 Perifeer bloed

2.1.1 Uitstrijk normaal perifeer bloed

Preparaat 1: uitstrijk normaal perifeer bloed (May-Grünwald Giemsa)

Cellen in het perifere bloed kunnen het best worden bekeken op een uitstrijk die gekleurd is met May-Grünwald Giemsa. De belangrijkste kenmerken van deze kleuring leer je in de ZO Bloed en Beenmerg.

- Bestudeer de uitstrijk op een locatie waar de cellen los van elkaar liggen (in de zgn. 'baard' van de uitstrijk en identificeer erythrocyten, trombocyten en leukocyten. Als het nodig is, kun je dit preparaat scherpstellen met de PgUp / PgDn toetsen.

Leukocyten in bloed en beenmerg kunnen naar morfologie en functie verder onderverdeeld worden.

Belangrijke morfologische criteria bij deze indeling zijn:

- de **grootte** van de cel (vergelijk altijd met de erytrocyt: Ø 7,5 µm)
- de **vorm van de kern**: rond / gedeukt / gelobd
- de aanwezigheid en kleur van **granula**
- de hoeveelheid en kleur van het **cytoplasma**.

De verschillende leukocyten in het bloed ingedeeld volgens deze criteria:

Type	Kenmerken
neutrofiele granulocyt	1,5 - 2x Ø ery; gelobde kern met gecondenseerd chromatine; nauwelijks zichtbare neutrofiele granula
eosinofiele granulocyt	1,5 - 2,5x Ø ery; kern meestal twee lobben; eosinofiele granula
basofiele granulocyt	1,5 - 2x Ø ery; kern onregelmatig van vorm; basofiele granula
lymfocyt	kleine lymfocyt: 1 - 1,4x Ø ery; grote lymfocyt: 1,4 - 2x Ø ery; kern rond of iets gedeukt; geen granula; kleine lymfocyt heeft weinig cytoplasma
monocyt	2 - 3x Ø ery; kern gedeukt tot hoefijzervormig met dispers chromatine; soms enkele azurofiele granula; egaal, licht basofiel cytoplasma

- Concentreer je nu op de leukocyten en zoek voorbeelden van de verschillende typen. Waarschijnlijk zul je basofiele granulocyten niet tegenkomen, omdat deze slechts in zeer lage frequentie in het normale bloed voorkomen. Vergelijk je eigen schatting van de frequenties van voorkomen met de onderstaande tabel voor de normaalwaarden.

<i>type leukocyt</i>	<i>Percentage in normaal bloed</i>
neutrofiële granulocyt	40 - 80 %
eosinofiele granulocyt	0 - 6 %
basofiele granulocyt	0 - 2 %
lymfocyt	15 - 50 %
monocyt	2 - 10 %

Morfologisch onderscheiden we binnen de lymfocyten nog kleine (rustende) en grote (geactiveerde) lymfocyten.

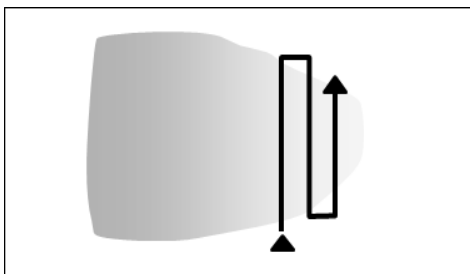
- 1 Zijn de lymfocyten in het normale perifere bloed voornamelijk rustend of geactiveerd?

2.1.2 Uitstrijk perifeer bloed patiënt met ziekte van Pfeiffer

Preparaat 2: uitstrijk perifeer bloed patiënt met ziekte van Pfeiffer (MGG)

Infecties en andere aandoeningen kunnen belangrijke verschuivingen teweegbrengen in de leukocytsamenstelling van het perifere bloed. Het volgende preparaat is een bloeduitstrijk van een patiënt met de ziekte van Pfeiffer ('infectieuze mononucleosis', veroorzaakt door infectie met het Epstein-Barr virus; EBV).

- Maak van dit preparaat een (te) kleine differentiële telling van 25-50 cellen. Zorg dat je daarbij hetzelfde veld niet meer dan eenmaal telt, door het preparaat te scannen volgens het onderstaande schema. Tel echter alleen de gebieden waar de erythrocyten los van elkaar liggen; kapotte cellen en andere artefacten worden niet geteld.



<i>type leukocyt</i>	<i>percentage</i>
neutrofiële granulocyt	 %
eosinofiele granulocyt	 %
basofiele granulocyt	 %
kleine lymfocyt	 %
grote lymfocyt	 %
monocyt	 %

- 2 Wat zijn de belangrijkste verschillen met het preparaat van het normale bloed?
- 3 Hoe kun je dit relateren aan de veroorzaker van de ziekte?

2.2 Beenmerg

De verschillende rijpe bloedcellen ontwikkelen zich in een differentiatieproces vanuit de pluripotente hemopoietische stamcellen. Deze ontwikkeling gaat gepaard met een sterke toename in cel aantal. In kwantitatief opzicht vormen de granulocyttaire en erythrocytaire ontwikkelingsreeksen de belangrijkste componenten van het beenmerg. Vooral deze celtypen zullen we in meer detail bekijken.

In de ZO 'Bloed en beenmerg' maak je kennis met de principes van de morfologische herkenning van de verschillende voorlopercellen en de veranderingen die optreden tijdens hun maturatie. Gebruik deze informatie, en het determinatieschema dat in deze ZO is opgenomen bij het bestuderen van de cellen in de

uitstrijk van normaal beenmerg. Het doel van dit onderdeel is dat je de volgende celtypen van elkaar kunt onderscheiden:

- blasten: pro-erytroblasten, myeloblasten en promyelocyten
- erythrocytaire cellen vs. granulocytaire cellen
- relatief rijpe vs. relatief onrijpe stadia (toepassing van de maturatie-principes)
- lymfocyten en plasmacellen
- megakaryocyten

Preparaat 3: uitstrijk normaal humaan beenmerg (MGG kleuring)

- Selecteer bij lage vergroting (objectief 5x) een gebied met een redelijke celdichtheid in de nabijheid van de klontjes beenmergcellen (hier is de verdeling van voorlopercellen het meest representatief).

4 Wat zijn de grote ronde gaten in het uitstrijkpreparaat?

Zoek vervolgens enkele megakaryocyten: cellen die een grootte-orde groter zijn dan de andere kernhoudende bloedcellen. Let in het bijzonder op de kern van deze cellen. Megakaryocyten verkrijgen hun uitzonderlijke grootte door zgn. endomitose van megakaryoblasten.

5 Wat wordt met de term endomitose bedoeld?

- Ga bij hoge vergroting (40x) op zoek naar **blasten**: relatief grote cellen met weinig, basofiel cytoplasma en een grote kern met duidelijk zichtbare **nucleoli**. Bepaal vervolgens of je te maken hebt met een **pro-erytroblast** (perfecte ronde kern, sterk basofiel cytoplasma), **myeloblast** (min of meer ronde kern, tamelijk basofiel cytoplasma) of een **promyelocyt** (min of meer ronde kern, meer cytoplasma dan myeloblast, azurofiele granula).
- Bestudeer in detail de verschillende latere stadia van **erythrocytaire** en **granulocytaire** differentiatie. Ga hierbij als volgt te werk:
 - Bepaal van een cel eerst of je te maken hebt met een relatief onrijp of relatief rijp stadium. Gebruik hierbij de criteria van het schema (grootte, chromatine-condensatie, cytoplasma-kleur).
 - Bepaal vervolgens of je te maken hebt met een cel van de erythrocytaire of granulocytaire reeks (ronde vs. gedeukte kern, af- of aanwezigheid van granula). Maak voor de granulocyten onderscheid tussen cellen met **neutrofiele**, **eosinofiele** en **basofiele** granula. Net als in het bloed komen basofiele granulocytaire cellen erg weinig voor.
- Zoek enkele **kleine lymfocyten**. Het onderscheid tussen kleine lymfocyten en rijpere stadia van de erythrocytaire reeks kan gemaakt worden op basis van de aankleuring van de kern die bij een lymfocyt homogeen / glad is en bij een erythrocytaire cel sterk gekorrelt. Bovendien heeft een kleine lymfocyt veel minder cytoplasma.
- Zoek vervolgens enkele **plasmacellen**. Deze worden gekenmerkt door een excentrische kern en relatief veel, sterk basofiel cytoplasma.

6 Hoe verklaar je de basofiele kleuring van het cytoplasma van de plasmacellen?

2.3 Thymus

2.3.1 Thymus (HE)

In het beenmerg voltooien alle bloedcellen hun rijpingsproces, behalve de T-lymfocyten die al in een zeer onrijp stadium naar de thymus migreren. De ontwikkeling tot rijpe T-cellen in de thymus-'leerschool' gaat gepaard met sterke proliferatie van onrijpe cellen, maar ook met celdood van 'verkeerd geprogrammeerde' T-cellen. Tijdens hun differentiatie worden T-cellen geselecteerd op het vermogen te reageren op antigenen. Uiteindelijk slaagt slechts 2-4% van alle nieuwgevormde thymocyten in het selectieproces.

7 Hoe herkent een T-lymfocyt antigeen?

De thymus is een tweelobbig orgaan gelegen in de borstholte, vlak boven het hart. Elke lob wordt verder onderverdeeld in **lobuli**.

Preparaat 4: thymus (rat; HE kleuring)

Bestudeer de thymus bij lage vergroting. Onderscheid de lobuli die worden gescheiden door bindweefselsepten. Het lymfoïde weefsel in deze lobuli bestaat uit een donkerder gekleurde schors (**cortex**) en een centraal in de lobulus gelegen merg (**medulla**).

8 Hoe verklaar je het verschil in kleuring tussen het schors- en het merggebied?

9 Hoe is de morfologie en lokalisatie van de bloedvaten in de thymus?

De cortex bestaat voornamelijk uit voorloper T-cellen, epitheliale reticulumcellen en macrofagen. Proliferatie van de jongste voorloper-T-cellen vindt plaats in het buitenste schorsgebied, vlak onder het **kapsel**.

- Onderscheid bij hogere vergroting in de cortex de kleine, onrijpe **thymocyten** en de **niet-lymfocyttaire** cellen met een grotere, vaak onregelmatige kern. Ook zijn hier veel **capillairen** te vinden, en **apoptotische** cellen, herkenbaar aan het gecondenseerde chromatine.

In de **medulla** zijn de rijpere stadia van T-celontwikkeling gelokaliseerd.

- Onderscheid ook hier de thymocyten en de niet-lymfocyttaire cellen.

2.3.2 Thymus epitheel

De opbouw van de thymus is bijzonder, omdat het reticulum (het 'netwerk' dat de interne structuur vormt van de orgaan) is opgebouwd uit epitheelcellen.

10 Welke cellen vormen in andere organen het reticulum?

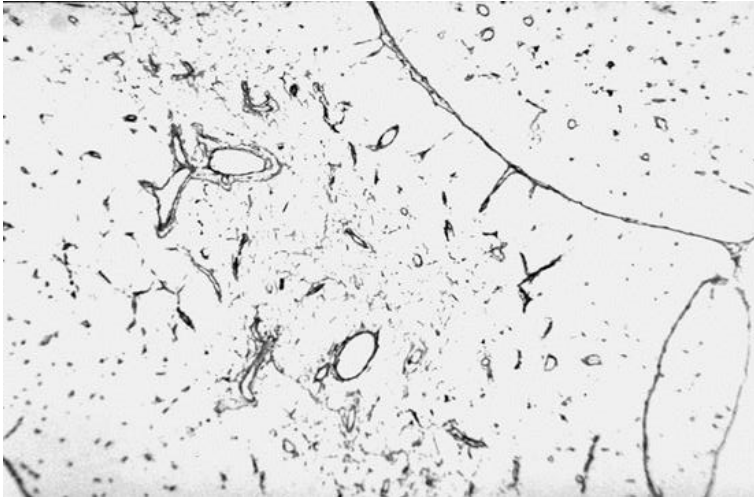
Het epitheel in de thymus heeft niet alleen een ondersteunende functie, maar speelt ook een belangrijke rol bij de ontwikkeling en 'opvoeding' van de T-lymfocyten, zodat deze als functionele cellen in de periferie wel lichaamsvreemde antigenen, maar niet lichaamseigen antigenen kunnen herkennen.

Preparaat 5: thymus epitheel (muis, immunohistologie)

- Bestudeer bij lage vergroting het preparaat waarin de epitheelcellen specifiek (zwart) zijn aangekleurd. De kernen van alle cellen zijn met een tegenkleuring rood gekleurd. Onderscheid op basis van lokalisatie en dichtheid van cellen de cortex en de medulla.
- 11 Wat is het morfologische verschil tussen epitheliale cellen in de cortex en in de medulla?
- 12 Wat zou dit morfologische verschil kunnen betekenen voor de functie van deze cellen?

2.3.3 Thymus – reticulair bindweefsel

Hoewel epitheelcellen een belangrijke structurele rol spelen in de thymus, komt hier ook bindweefsel voor. Afbeelding 1 is een opname van een thymuscoupe waarin reticulair bindweefsel specifiek is aangekleurd.

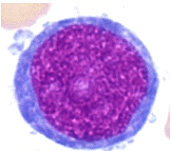
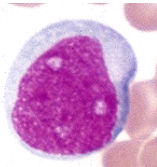
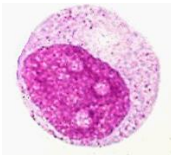
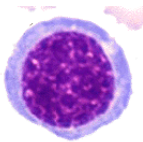
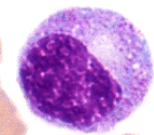
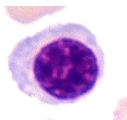
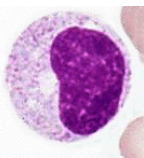
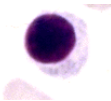
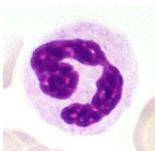


Afbeelding 1. Thymus (muis).
Immuunkleuring voor reticulair bindweefsel.
Eigendom Erasmus MC, afdeling Immunologie.

- 13 Hoe kun je in deze kleuring de cortex en de medulla van elkaar onderscheiden?
- 14 Wat is de belangrijkste functie van het reticulaire bindweefsel in de thymus?
(tip: met welke structuren is het reticulaire bindweefsel vooral geassocieerd)?

Determinatieschema voor kernhoudende voorlopers van de granulocyttaire en erythrocytaire reeks in beenmerg

onderscheidende kenmerken staan in de grijze kolom of zijn onderstreept

Ø 15-25 µm (2-3x ery) grote <u>ronde</u> kern met nucleoli en dispers chromatine, <u>sterk basofiel</u> cytoplasma  pro-erythroblast	nucleoli geen granula	Ø 15-22 µm (2-3x ery) grote <u>min of meer ronde</u> kern met nucleoli en dispers chromatine, <u>basofiel</u> cytoplasma  myeloblast
	azurofiele granula	Ø 20-30 µm (3x ery) min of meer ronde kern, tamelijk basofiel cytoplasma met <u>azurofiele granula</u>  promyelocyt
Ø 1,5-3x ery <u>gekorrelde</u> ronde kern centraal gelegen, kern : cytoplasma >1, basofiel cytoplasma  basofiele erythroblast	cytoplasma basofiel	specifieke granula kern ~ rond neutrofiel / eosinofiel / basofiel Ø 2-3x ery min of meer ronde kern, licht basofiel cytoplasma met specifieke granula en vaak ook azurofiele granula  myelocyt
Ø 1,5x ery ronde kern met gecondenseerd chromatine, kern : cytoplasma > 1, polychromatofiel cytoplasma  polychromatofiele erythroblast	poly-chromatofiel	ingedeukt Ø 2x ery ingedeukte kern, licht basofiel - neutrofiel cytoplasma + specifieke granula  metamyelocyt
Ø 1-1,5x ery excentrische ronde kern met sterk gecondenseerd chromatine, kern : cytoplasma ~ 1, acidofiel cytoplasma  acidofiele erythroblast	acidofiel	staaf-vormig Ø 1,5 - 2x ery staafvormige kern met gecondenseerd chromatine, neutrofiel - licht acidofiel cytoplasma + specifieke granula  staafkernige granulocyt
	gesegmenteerd	Ø 1,5 - 2x ery gesegmenteerde kern met gecondenseerd chromatine neutrofiel - licht acidofiel cytoplasma + specifieke granula  segmentkernige granulocyt