

Luuüdi aspiraadi tsütoloogiline, tsütokeemiline ja histoloogiline kompleksuuring

Laboratoorse hematoloogia ja üldkliiniliste analüüside osakond, tel. 731 9321, 731 9309

Normaalse vereloome korral leiduvad luuüdis kõikide rakuliinide eellasrakud erinevates küpsusastmetes ja kindlates proportsioonides. Luuüdi aspiraadist valmistatud äige- ja fragmendiäige preparaatides ning fragmentide histoloogilistes preparaatides saab hinnata rakkude koosseisu, omavahelisi arvulisi suhteid, küpsust ja morfoloogiat. Samuti on võimalik teha otsustusi vereloome struktuuri, võimaliku maliigse infiltratsiooni ja selle iseloomu või maliigse transformatsiooni kohta.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

Punkteerides spetsiaalse nõelaga rinnaku ülemist kolmandikku või puusaluuharja, aspireeritakse 0,3–1,0 mL luuüdi. Natiivmaterjalist tehakse kohe (enne hüübimise algust) 6–8 mõõduka paksusega äigepreparaati ning 6–8 fragmendiäiet.

Kui sama punktsiooni käigus on vajalik võtta luuüdi ka immuunfenotüpeerimiseks või tsütogeneetiliseks uuringuks, siis toimitakse järgmiselt: aspireeritakse esimene, väiksem kogus materjali (kuni 1 mL), väljutatakse materjal uuriklaasile ja kasutatakse täielikult ära äieteks ning histoloogiliseks uuringuks. Ühendades teistkordselt süstla luus oleva nõelaga, aspireeritakse suurema vere lisandusega materjal, mis sobib muudeks vajalikeks uuringuteks. Punktsiooni selline taktika tagab raku- ja fragmendirikkama materjali saamise morfoloogilisteks uuringuteks. Kui samal päeval ei ole võetud perifeerset verd hemogrammi uuringuks, tuleb lisaks võtta kapillaarverd K2E/K3E-mikrokatsutisse ning valmistada 2 äigepreparaati mikroskoopiliseks uuringuks.

Fragmendiäiged on luuüdi tsütoloogilise uuringu modifikatsiooniks, mis suurendavad oluliselt tulemuste tõepärasust, kuna neis leiduv vere lisandusega rakuline materjal võimaldab adekvaatsemalt hinnata rakuliinide ja eri küpsusastmete proportsioone ning maliigse kloni osakaalu. Fragmendiäige tegemiseks valitakse värskest aspiraadist silmaga nähtavaid koetükke ning tõmmatakse need kerge survega kahe esemeklaasi vahel laiali (ühast fragmendist saab kaks äiet).

Luuüdi histoloogiliseks uuringuks eraldatakse uuriklaasile väljutatud aspiraadist plastiklusika abil silmaga nähtavaid luuüdi fragmente ja kogutakse need kämbuks. Kämpu veeretatakse mööda uuriklaasi serva, et eralduks üleliigne veri. Hüübinud kämp asetatakse fikseerivasse lahusesse ja saadetakse edasiseks töötlemiseks patoloogiateenistuse laborisse.

Säilivus	Äigepreparaadid säilivad valguse eest kaitstuna nädalaid. Luuüdi materjal peab olema fikseerivas lahuses vähemalt kaks tundi ning soovitatavalt mitte üle 12 tunni.
----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti

Analüüsimeetod: morfoloogiline meetod

Vastuse vorm

Esitatakse lühidalt morfoloogilise leiu kirjeldus koos viidetega mõnede olulistele arvulistele tulemustele (nt mõned indeksid, maliigsete rakkude osakaal jne) ja morfoloogilistele detailidele või muutustele. Vajadusel antakse maliigse kloni täpsem iseloomustus. Diagnoosi täpsustamiseks teostatakse vajadusel täiendavaid tsütokeemilisi uuringuid ning kasutatakse eriuuringute andmeid (nt PCR, immuunfenotüpeerimine).

Laboriarsti diagnostiline otsus on kokkuvõtlik seisukohavõtt, mis põhineb konkreetse kompleksuuringu kõikide meetodite tulemustel. Leid võib olla piisav diagnoosi tegemiseks, osalise diagnostilise tähendusega või mittespetsiifiline.

Näidustus ja kliiniline tähendus

Peamisteks näidustusteks on kahtlus maliigsetele vereloomehaigustele ja aneemiade diferentsiaaldiagnostika. On ka mitmeid muid näidustusi, nagu organomegaliate, düsproteineemiate, üldseisundi progresseeruvate häirete jt haiguslike muutuste põhjuste väljaselgitamine.

Luuüdi aspiraadi tsütoloogiline ja histoloogiline kompleksuuring võib piisava uurimismaterjali leidumisel olla aluseks enamuse maliigsete või mittemaliigsete vereloomehaiguste diagnostikale. Uuring võib anda ka suunavaid viiteid paljude sekundaarse iseloomuga vereloomehäirete interpreteerimiseks.

Luuüdi aspiraadi mittespetsiifiliste esteraaside tsütokeemiline värving (Bm-NASDA)

Esteraasid on grupp hüdrolaase, mis on aktiivsed laias pH vahemikus. Neid leidub luuüdi mitmetes rakuliinides. Leukotsüütides kirjeldatakse üheksat esteraasi isoensüümi, neist nn spetsiifilised esteraasid (1., 2., 7., 8. ja 9.) leiduvad granulotsüütides ja nn mittespetsiifilised (3., 4., 5. ja 6.), mis on tundlikud naatriumfluoriidile (NaF), leiduvad monotsüütides, megakarüotsüütides ja trombotsüütides. Enamik isoensüümidest reageerib naftool-AS-D-atsetaadiga (NASDA), mispuhul granulotsütaarse ja monotsütaarse rea rakkudes värvuvad esteraasisõmerad siniseks. Paralleelselt värvitud preparaadis inhibeeritakse nn mittespetsiifilised esteraasid naatriumfluoriidiga, mille järgselt tuhmuvad esteraasi-sõmerad monotsütaarse rea rakkudes, graanulid säilivad aga granulotsütaarse rea rakkudes. Seega, kahe preparaadi võrdlev hindamine teeb võimalikuks rakuliinide eristamise.

Uuritav materjal

Uuringuks on vaja vähemalt kaks fikseerimata ja värvimata preparaati.

Analüüsimeetod: tsütokeemiline värving naftool-AS-D-atsetaadiga ja reaktsiooni inhibeerimine naatriumfluoriidiga

Tõlgendus

Mittespetsiifiliste esteraaside värvingul hinnatakse positiivse reaktsiooni andnud rakkude osahulka ja granulaarsuse vähenemist inhibeerimisreaktsioonil.

Näidustus ja kliiniline tähendus

Valikmeetod monotsütaarse rea rakkude määratlemiseks. Sobib ägeda müeloidse leukeemia alatüüpide M4 ja M5 eristamiseks M1 ja M2-st ning monotsütaarse komponendi osakaalu hindamiseks M4 ja kroonilise müelomonotsütaarse leukeemia puhul.

Luuüdi aspiraadi müeloperoksüdaasi tsütokeemiline värving (Bm-MPO)

Müeloperoksüdaas (MPO) on lüsoosomaalne ensüüm, mida sisaldavad neutrofiilse rea rakkude primaarsed ja sekundaarsed graanulid, eosinofiilide ja basofiilide spetsiifilised graanulid ning monotsütaarse rea rakkude azurofiilsed graanulid. Lümfotsütaarse, erütrotsütaarse ja megakarüotsütaarse rea rakkude tsütoplasmas MPO puudub.

MPO esinemise korral tekib rakkudes reaktsioonil bensidiiniga rohekassinine granulatsioon.

Uuritav materjal

Uuringuks on vaja vähemalt kaks fikseerimata ja värvimata preparaati. **NB!** MPO on tundlik valguse suhtes, seetõttu tuleb ägepreparaat hoida värvimiseni pimedas.

Analüüsimeetod: tsütokeemiline reaktsioon bensidiiniga

Tõlgendus

Hinnatakse MPO-positiivsete ja -negatiivsete rakkude osahulka ning MPO värvingu intensiivsust. MPO aktiivsus on suurem küpsemates granulotsüütides, noortes granulotsüütides ja monotsüütides on aktiivsus vähene.

Näidustus ja kliiniline tähendus

Ägeda müeloidse leukeemia eristamine ägedast lümfoidsest leukeemiast. MPO aktiivsuse hindamine neutrofiilides.

Ägedate müeloidsete leukeemiate puhul (alatuübid M1 kuni M6) loetakse üle 3% MPO-positiivsete blastide leidumist kokkuleppeliselt müeloidse rakuliini tõestuseks.

MPO puudus põhjustab neutrofiilide fagotsütaarse aktiivsuse vähenemist ning krooniliste põletikuliste haiguste sagenemist.

MPO defitsiit on enamasti omandatud (intoksikatsioonid, müeloproliferatiivsed haigused). Kaasasündinud puudulikkuse puhul on neutrofiilide ja monotsüütide MPO aktiivsus vähenenud, eosinofiilidel aga mitte. Homosügootidel on täielik, heterosügootidel osaline MPO puudulikkus.

Luuüdi aspiraadi raua tsütokeemiline värving (Bm-Fe)

Organismi peamised rauadepood asuvad luuüdis, põrnas ja maksas. Raud transporditakse luuüdisse seotuna transferriniga. Erütroblastidesse sisenenud raud seotakse mitokondrites heemi koosseisu, raua ülejääk vereloomes deponeeritakse ferritiinina makrofaagidesse. Ferritiini osalisel degradatsioonil tekib hemosideriin.

Depooraua hulga hindamiseks makrofaagides ja erütroidsetes eellasrakkudes kasutatakse luuüdi ägepreparaatide tsütokeemilist värvingut Perlsi järgi, mille puhul hemosideriin annab rohekassinise pretsipitaadi.

Uuritav materjal

Uuringuks on vaja vähemalt kaks fikseerimata ja värvimata preparaati.

Analüüsimeetod: tsütokeemiline reaktsioon Perlsi järgi

Tõlgendus

Normipuhuselt on makrofaagide tsütoplasmas sedastatavad väikesed rauagraanulid, väheseid tsütoplasmaatilisi graanuleid võib leida ka 30–50% erütroidsetel eellasrakkudel (sideroblastid).

Näidustus ja kliiniline tähendus

Depooraua hulga ja raua kasutamise efektiivsuse hindamine.

Rauavaeguse korral luuüdi makrofaagides depoorauda ei leidu ning sideroblastide hulk (protsent erütroidsete rakkude koguhulgast) on vähenenud või puudub. Depooraua

puudus kujuneb ka primaarse polütsüteemia korral ning on üheks diagnostiliseks kriteeriumiks.

Depooraua hulk on normaalne või suurenenud kroonilise haiguse aneemia korral, samas sideroblastide hulk on vähenenud.

Depooraua ja sideroblastide hulk on suurenenud hemolüütilise ja megaloblastilise aneemia korral, samuti hemosideroosi ja hemokromatoosi puhul.

Sideroblastide osakaalu suurenemine viitab hemoglobiini sünteesi häiretele. Kui häiritud on vaid globiini süntees (nt talasseemia) või on tegemist raua üleküllusega, on graanulite jaotuvus rakkudes enamvähem ühtlane. Heemi sünteesi defekti korral kuhjuvad raua ülejäägid tuuma vahetus läheduses paiknevatesse mitokondritesse ja värvingul ilmestuvad rauagraanulid ringjalt ümber sideroblasti tuuma - tekivad nn. ringjad sideroblastid. Põhjuseks võib olla vereloome toksiline kahjustus (raskmetallid, ravimid vm) või tüviraku geneetiline defekt primaarse müelodüsplaasia (MDS) või müeloproliferatiivse haiguse korral. MDS puhul on ringjate sideroblastide hulk (> 15%) diagnostilise tähendusega alatüübi (RARS) määramisel.

Luuüdi aspiraadi happelise fosfataasi tsütokeemiline värving (Bm-ACP-T)

Happeline fosfataas (ACP) on üks happelistest hüdrolaasidest, mida leidub enamikes vereloome rakkudes. Tsütokeemilist värvingut ACP-le kasutatakse lümfo proliferatiivsete haiguste diferentsiaaldiagnostikas. Enamikes T-liini lümfoidsetes rakkudes on reaktsioon ACP-le intensiivselt positiivne, B-liini lümfoidsetes rakkudes on reaktsioon nõrk või puudub. Paralleelselt värvitud preparaadis inhibeeritakse reaktsioon tartraathappega ning ACP sõmeraid ei ole sedastatavad. Erandiks on B-liini kuuluv karvrakuline leukeemia, mille puhul leukeemilistes rakkudes esineb ACP tartraatresistentne isoensüüm (*tartrate resistant acid phosphatase*, TRAP). Reaktsioon karvrakkudes on tugevalt positiivne ja ei inhibeeru tartraathappega.

Uuritav materjal

Uuringuks on vaja vähemalt kaks fikseerimata ja värvimata preparaati.

Analüüsimeetod: tsütokeemiline värving happelisele fosfataasile ja reaktsiooni inhibeerimine tartraathappega

Tõlgendus

Värvingul happelisele fosfataasile hinnatakse positiivse reaktsiooni andnud lümfoidsete rakkude osahulka ja sõmeruse säilumist inhibeerimisel tartraathappega.

Näidustus ja kliiniline tähendus

Karvrakulise leukeemia eristamine teistest lümfo proliferatiivsetest haigustest.

Vt ka: Leukeemiate molekulaardiagnostilised uuringud
Vereloomehaiguste immuunfenotüpeerimine

Ain Rähni