

3.4.b Colorazione di uno striscio di sangue con il metodo May Grünwald – Giemsa

Questo esperimento usa una tecnica standard per la colorazione di strisci di sangue. Questa colorazione viene impiegata anche nei laboratori d'analisi per individuare varie forme di leucemia. E' un metodo che si basa sull'uso di due soluzioni coloranti neutre, che prendono il nome degli scienziati che ne hanno elaborato la composizione: una è la May-Grünwald (eosinato di blu di metilene), e l'altra la Giemsa. Entrambe le soluzioni si trovano già pronte in commercio, ed è inutile e dispendioso prepararle da sé, perché sono composte da molte sostanze e coloranti diversi. A differenza del metodo usato nell'esperienza precedente questa colorazione permette di distinguere le famiglie dei granulociti.

Attenzione: entrambe le soluzioni coloranti usano come solvente alcool metilico, che è tossico. Attenzione a non inalare e a non entrare in contatto con la pelle.

Tempo richiesto: 20 minuti

Difficoltà: bassa

Reagenti: liquido di May-Grünwald, soluzione di Giemsa, acqua distillata, xilene, balsamo del Canada

Procedura: si deposita una goccia di sangue vicino al bordo di un portaoggetto ed si effettua uno striscio che andrà fatto asciugare bene all'aria. Si versa sullo striscio 1 ml di liquido di May-Grünwald e si attenda 3 minuti. Qui si ha la fissazione dello striscio perché i coloranti sono in soluzione in alcool metilico. Si diluisce il colorante direttamente sopra allo striscio con 2 ml di acqua distillata e si lascia agire per 5 o 6 minuti: in questa fase si ha la dissociazione dell'eosinato di blu di metilene in eosina (colorante acido) e blu di metilene (colorante basico). L'eosina colorerà le strutture acidofile, mentre il blu di metilene quelle basofile (ad es. i nuclei). Far scolare il colorante inclinando il vetrino. Si cosparga il vetrino con una soluzione composta da 3 ml di acqua distillata e 3 gocce di soluzione di Giemsa. Lasciar agire il colorante per 7 minuti. Si lavi il vetrino abbondantemente in acqua di fonte mediante immersione dello stesso in un bicchiere pieno d'acqua o sotto il getto moderato di un rubinetto. Si lasci asciugare all'aria il vetrino. La faccia inferiore del vetrino (quella senza striscio) è possibile asciugarla con carta assorbente. Lo striscio è pronto per essere osservato. Se si vuol rendere permanente il preparato si seguano le stesse indicazioni riportate per l'esperimento precedente.

Risultati:

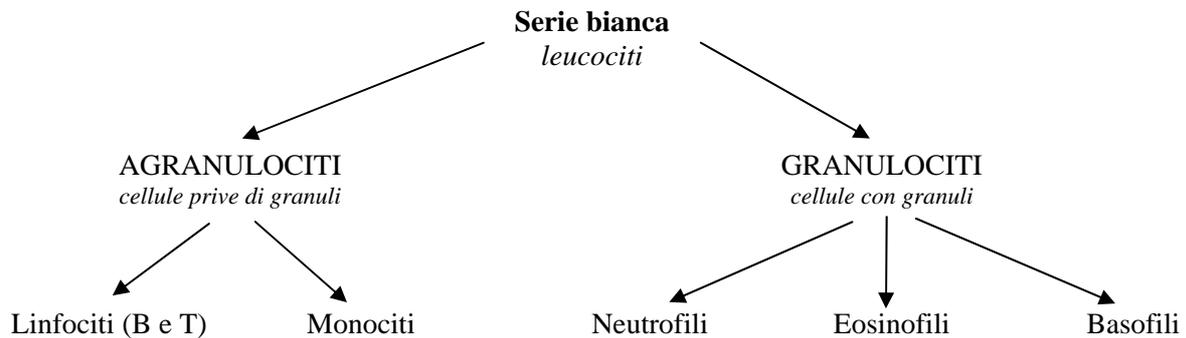
Nuclei	Viola
Citoplasmi basofili	Blu
Citoplasmi acidofili	Rosso
Granuli neutrofili	Blu scuro – marrone
Granuli eosinofili	Rosa carico – rosso
Granuli basofili	Blu oltremare

Descrizione del preparato: il sangue è un tessuto che rientra nella definizione di tessuto connettivo, infatti le cellule non sono a contatto tra di loro e sono immerse in una sostanza intercellulare. La matrice, contrariamente ad altri connettivi, è del tutto amorfa e liquida e non può essere riconosciuta tramite tecniche di microscopia convenzionali. Gli elementi figurati di tutti i vertebrati si dividono in serie rossa (eritrociti), serie bianca (leucociti) e piastrine.

Nei mammiferi gli eritrociti sono anucleati e hanno una forma biconcava assottigliata al centro, mentre negli altri vertebrati non mammiferi sono ovoidali e nucleati. Gli anfibi hanno eritrociti molto grandi rispetto a quelli degli altri vertebrati perché contengono una maggiore quantità di DNA. La dimensione del genoma degli anfibi è centinaia di volte maggiore rispetto a quella del genoma umano. E' molto raro ma non impossibile osservare in strisci di sangue periferico umano i reticolociti, eritrociti nel cui citoplasma si osserva una sorta di reticolo azzurro. Essi sono eritrociti giovani e immaturi già presenti in circolo, i quali contengono ancora nel loro citoplasma residui di RNA ribosomiale che conferisce basofilia citoplasmatica. Nell'emopoiesi gli eritrociti derivano dagli eritroblasti, cellule progenitrici presenti nel midollo osseo delle ossa lunghe. Gli eritroblasti sono cellule nucleate provviste di una buona quantità di ribosomi a causa dell'elevata sintesi di emoglobina.

Serie bianca: la morfologia nucleare e la presenza o assenza di granulazioni consente di suddividere le cellule della serie bianca in alcuni gruppi. La colorazione May Grünwald – Giemsa permette di distinguere le caratteristiche di colorabilità dei granuli. Altri criteri classificativi sono le caratteristiche di colorabilità delle

granulazioni e la presenza o assenza di un'abbondante citoplasma attorno al nucleo. Le cellule della serie bianca si dividono in:



I linfociti sono caratterizzati da un nucleo tondeggiante e scarsissimo citoplasma. Sono provvisti di fini granulazioni basofile, ma siccome non sono cospicue sono classificati tra gli agranulociti. Rappresentano circa il 20 % della serie bianca. Non è possibile con le tecniche di microscopia ottica capire se un certo linfocita è B o T. I monociti sono agranulociti grandi con nucleo grosso e reniforme. Hanno un esteso citoplasma azzurrofilo con granulazioni non cospicue. Il neutrofilo è il tipo di granulocito più diffuso (70-80 %). Ha granulazioni che si colorano sia con i coloranti acidi sia con i coloranti basici. Nel complesso non esiste un'affinità dominante per i coloranti acidi e per i coloranti basici. Il nucleo dei neutrofili è polimorfonucleato e appare profondamente inciso e lobato, anche con quattro o cinque lobi. Un principiante spesso è tratto in inganno e pensa che si tratti di più nuclei, ma ciò non è vero perché osservando più attentamente i lobi appaiono uniti da sottili ponti cromatinici. Nei neutrofili delle femmine si nota sul nucleo una porzione a mazza di tamburo che contiene il cromosoma X, eterocromatico e inattivato, chiamata corpo di Barr. Il granulocito eosinofilo (acidofilo) rappresenta circa il 5 % della serie bianca. Ha grossi granuli affini ai coloranti acidi, che si colorano in rosa. Il nucleo è costituito da due lobi uniti da un sottile istmo. Il granulocito basofilo è il tipo di granulocito meno diffuso (< 1 %). Ha granuli grossi e colorati intensamente dai coloranti basici che spesso ostacolano la visione del nucleo.

Le piastrine nei mammiferi sono rappresentate da aggregati di frammenti cellulari positivi sia all'ematossilina sia all'eosina, derivati dai megacariociti presenti nel midollo osseo delle ossa lunghe. Contengono granuli basofili e servono a promuovere il processo di coagulazione sanguigna. In animali non mammiferi le piastrine prendono il nome di trombociti e hanno un nucleo ovoidale eterocromatico più piccolo dei globuli rossi. I trombociti rilasciano i fattori per la coagulazione.