

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
«ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»

«ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΝΗΘΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ
ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΤΙΣ ΝΕΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ
ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΕΩΣ»

Πτυχιακή Εργασία

Αννα Μαρούγκα – Χατζηγιάννη

ΛΑΡΙΣΑ
Μάιος 2003



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 2850/1

Ημερ. Εισ.: 01/07/2004

Δωρεά:

Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ

2003

ΜΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



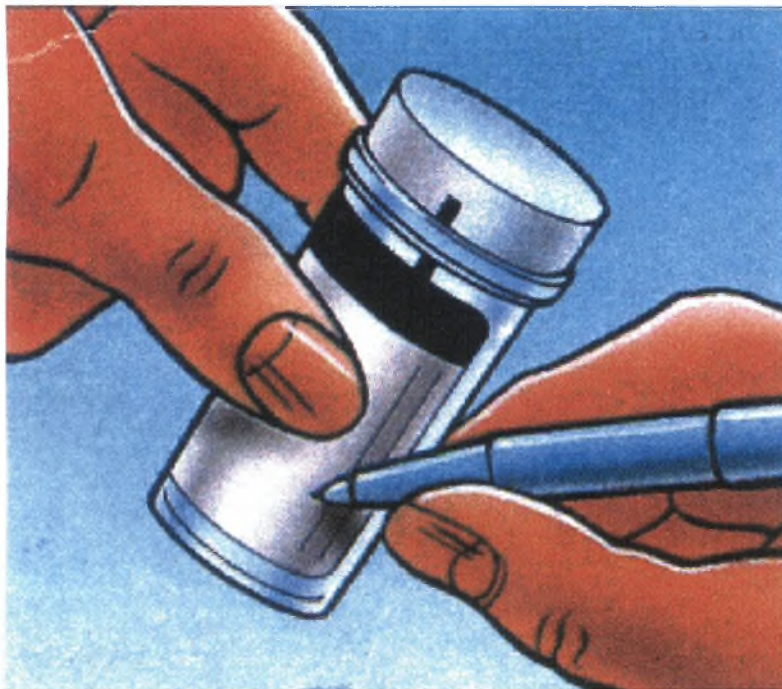
004000057001

✓

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
«ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»

«ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΝΗΘΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ
ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΤΙΣ ΝΕΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ
ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΕΩΣ»

Πτυχιακή Εργασία



Άννα Μαρούγκα – Χατζηγιάννη

ΛΑΡΙΣΑ
Μάϊος 2003

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Πρωτ. 07/05/2003
Αριθ. Πρωτ. 2526

Επιβλέπων καθηγητής:

Γεώργιος Αντωνακόπουλος

Καθηγητής Ανατομίας Ιστολογίας Εμβρυολογίας

Μέλη τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης:

Σοφία Μπονάνου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας

Δημήτριος Αρβανίτης

Καθηγητής Ανατομίας Ιστολογίας Εμβρυολογίας

«Ἐν τῇ πολλῇ ἐπιστήμῃ
σου καί ἐμπορία σου
ἐπλήθυνας δύνάμιν σου
ὕψωθῃ ἡ καρδιά σου ἐν
τῇ δυνάμει σου...
ἐπειδὴ δέδωκας τὴν
καρδίαν σου ὡς καρδίαν
Θεοῦ, ἀντί τούτου ἰδοὺ
ἐγώ
ἐπάγω ἐπὶ σέ ἄλλοτρίους
λοιμούς ἀπὸ ἐθνῶν...(ἵνα)
μὴ λέγων ἔρεῖς Θεός εἰμί
ἐγώ... σύ δέ εἶ ἄνθρωπος
καί οὐ Θεός»
(Ιεζεκ. κη' 5-9)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας αποτελούσε και αποτελεί ένα εκ των πλέον συνηθών τύπων καρκίνων στις γυναίκες. Εδώ και πενήντα χρόνια ο καρκίνος αυτός μπορεί και ανιχνεύεται σε πολύ πρώιμα στάδιά του με επιτυχία χάρις τόσο στο κλασσικό Pap test όσο και στο προσφάτως εισαχθέν Thin prep Pap.

Ευχαριστώ θερμά τους καθηγητές κ.κ. Σοφία Μπονάνου και Δημήτριο Αρβανίτη για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Επιτροπή επιστασίας της πτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον καθηγητή του τμήματος Ιατρικής κ. Γ.Ν. Αντωνακόπουλο για την επιστασία της πτυχιακής μου ως επιβλέπων καθηγητής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Επιβλέπων καθηγητής- Μέλη τριμελούς επιτροπής	Σελ.	2
Αγιογραφικόν χωρίον	Σελ.	3
Πρόλογος	Σελ.	4
Περιεχόμενα	Σελ.	5
Κατάλογος εικόνων και πινάκων	Σελ.	8
Περίληψη	Σελ.	9
<u>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	Σελ.	10
ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	Σελ.	11
<u>ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	Σελ.	15
ΦΩΤΟΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ	Σελ.	18
Προετοιμασία- Ζωντανό παρασκεύασμα- Μονιμοποίηση- Αφυδάτωση και Διαύγαση-Σκλήνωση- Λήψη τομών- Επικόλληση και Χρώση		
Ιστοχημεία	Σελ.	23
Ανοσοκυτταροχημεία	Σελ.	26
Αυτοραδιογραφία	Σελ.	27
Εξέταση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	Σελ.	28
Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο		
Τάξεις μεγενθύσεων		
Μονιμοποίηση		
Χρώση		
Κρυόθραυση	Σελ.	30
ΚΥΤΤΑΡΟ	Σελ.	31
ΕΞΕΤΑΣΗ ΜΕ ΤΟ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ	Σελ.	32
Βιοψία		
Καλλιέργεια ιστών		
Κυτταρόπλασμα		
Οργανίδια		

ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΘΗΛΕΟΣ ...	Σελ.	35
Κόλπος	Σελ.	38
Τράχηλος	Σελ.	38
ΕΙΚΟΝΑ ΤΩΝ ΚΟΛΠΙΚΩΝ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΝΕΟΓΝΟ ΕΩΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ	Σελ.	39
Νεογέννητο		
Παιδική ηλικία		
Αναπαραγωγική ηλικία		
Εμμηνόπαυση		
Η ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΚΑΤΑ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ (Pap test) ΜΕΘΟΔΟΙ ΛΗΨΕΩΣ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΩΝ	Σελ.	42
 <u>ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ ΚΟΛΠΟΥ ΚΑΙ ΤΡΑΧΗΛΟΥ</u>		
«ΤΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑ»	Σελ.	46
Κύτταρα κοιλιακού επιθηλίου	Σελ.	47
Επιθηλιακά κύτταρα τραχήλου	Σελ.	47
Εξωτράχηλος		
Ενδοτράχηλος		
Ενδομητρικά κύτταρα	Σελ.	48
Λευκοκύτταρα	Σελ.	49
Ιστιοκύτταρα (μακροφάγα)	Σελ.	49
ΚΥΡΙΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΚΟΛΠΟΤΡΑΧΗΛΙΚΟΥ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΟΣ	Σελ.	49
 <u>ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΤΟΥ ΚΟΛΠΟΥ</u>	Σελ.	51
 <u>ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ</u>		
Λοίμωξη- Φλεγμονή μικροοργανισμού	Σελ.	53
ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	Σελ.	55

<u>ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ</u>	Σελ.	59
Εισαγωγή		
Προληπτικός έλεγχος		
Διαγνωστική κυτταρολογία		
Ερευνητική κυτταρολογία		
Κολπικό επίχρισμα		
Λήψη τραχηλικού επιχρίσματος	Σελ.	61
Λήψη κολποτραχηλικού επιχρίσματος (Pap test)	Σελ.	61
Οδηγίες για τη λήψη κολποτραχηλικού επιχρίσματος	Σελ.	62
Η ΝΕΑ ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΕΩΣ ΣΕ		
ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΚΛΑΣΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ	Σελ.	64
Το κείμενο διαφημιστικού ενημερωτικού φυλλαδίου της		
κατασκευάστριας εταιρείας του μηχανήματος κυτταρολογίας		
υγρής φάσεως	Σελ.	66
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	Σελ.	69

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ Standard

<i>A ΚΛΑΣΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ (PAP TEST)</i>	Σελ.	70
ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΗ ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ	Σελ.	71
<i>B ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΕΩΣ (THIN PREP)</i>	Σελ.	72
ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΝΕΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ (ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ ΥΓΡΗΣ		
ΦΑΣΕΩΣ)	Σελ.	73
Προετοιμασία πλακιδίων		
Διαδικασία		
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Α´	Σελ.	74
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Β´	Σελ.	77
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	Σελ.	79
SUMMARY	Σελ.	81
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	Σελ.	82

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ.1 Πορεία ακτίνων στο οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	Σελ.	16
Εικ.2 Πυρήνες κυττάρων	Σελ.	20
Εικ.4 Σχηματική απεικόνιση γεννητικού συστήματος θήλεος	Σελ.	35
Εικ.5 Σχηματική απεικόνιση ορμονικών αλληλεπιδράσεων στο γεννητικό σύστημα του θήλεος	Σελ.	36
Εικ.6 Τοποθέτηση στο κόλπο πλαστικού κολποδιαστολέα	Σελ.	43
Εικ.7 Λήψη υλικού με βαμβακοφόρο στυλεό από τον οπίσθιο κολπικό θόλο	Σελ.	44
Εικ.8 Λήψη υλικού με βαμβακοφόρο στυλεό από τον εξωτράχηλο	Σελ.	44
Εικ.9α Λήψη με σπάτουλα τύπου Ayte	Σελ.	45
Εικ.9β Λήψη με ψήκτρα από τον ενδοτράχηλο	Σελ.	45
Εικ.10 Επίστρωση υλικού σε αντικειμενοφόρο πλάκα	Σελ.	46
Εικ.11 Βακίλλοι του Doderlein	Σελ.	51
Εικ.12 Μικτή χλωρίδα του κόλπου αποτελούμενη από πολλούς βακίλλους και κόκκους	Σελ.	57
Εικ.13 Τριχομονάδες	Σελ.	58
Εικ.14 Επίστρωση και μονιμοποίηση των τριών δειγμάτων σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα	Σελ.	62
Εικ.15 Διαφημιστικό - ενημερωτικό φυλλάδιο της κατασκευάστριας εταιρείας του μηχανήματος κυτταρολογίας υγρής φάσεως	Σελ.	68

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πιν. 1 Συνήθεις ιστολογικές χρώσεις και χρωστικά αποτελέσματα	Σελ.	25
Πιν. 2 Κύριες ορμόνες επιδράσεις στο γεννητικό σύστημα του θήλεος	Σελ.	37

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία εξετάστηκαν κολπικά επιχρίσματα παρασκευασμένα τόσο με την συνήθη τεχνική όσο και με τη μέθοδο υγρής φάσης, προκειμένου να εξετασθούν επισταμένως οι δυνατότητες της κυτταρολογικής εξέτασεως για την ταυτοποίηση των υπάρχοντων στον κόλπο μικροοργανισμών φυσιολογικών ή παθολογικών, όσο και τα συγκριτικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των δύο τεχνικών.

Μελετήθηκε επίσης λεπτομερώς και η συχνά παρατηρούμενη συνδυασμένη παρουσία διαφόρων ειδών μικροβίων. Το υλικό προερχόταν από ενήλικες γυναίκες, κατοίκους κατεξοχήν του Νομού Λαρίσης αστικής ή αγροτικής προέλευσης. Οι εξετασθείσες γυναίκες είχαν ηλικία από 15-74 ετών και μέσο όρο ηλικίας 42,5 έτη.

Εκ της μελέτης του υλικού μας διαπιστώθηκε ότι η κυτταρολογική κατά Παπανικολάου εξέταση κολπικών επιχρισμάτων αναδεικνύει τους μικροοργανισμούς του κόλπου, γεγονός που επιτρέπει την εύκολη και λεπτομερή εξέτασή των με τον ξηρό αντικειμενικό φακό X40. Επίσης προσφέρει την ταχεία (εντός ολίγων ωρών αναγνώριση τους είδους του φυσιολογικού ή παθογόνου μικροβίου ή συνδυασμών μικροβίων σε όλες τις περιπτώσεις, με εξαίρεση τα διάφορα είδη των βραχέων βακίλλων. Στην εν λόγω περίπτωση εξ αιτίας ομοιότητας των διαφόρων ειδών όσον αφορά το μέγεθος και τις χρωστικές ιδιότητές των, η διάκρισή τους σε επιμέρους είδη είναι ανέφικτος και απαιτεί την χρήση μικροβιολογικών μεθόδων.

Ως αναμενόταν στο ήμισυ περίπου των περιπτώσεων η χλωρίδα του κόλπου απετελείτο από βακίλους του Doderlein. Στη συντριπτική πλειονότητα των εμμηνόπαυσιακών γυναικών η εν λόγω χλωρίδα απετελείτο από κοκκοβακτηρίδια. Η συγκριτική μελέτη της συνήθους τεχνικής επιστρώσεως των κυτταρολογικών επιχρισμάτων με εκείνη της υγρής φάσεως έδειξε ότι η συνήθης τεχνική υπερτερεί ως προς την απεικόνιση των αδενικών κυττάρων και την παρουσία στοιχείων της χλωρίδας, ενώ η νέα τεχνική της υγρής φάσεως υπερτερεί ως προς ότι επιτρέπει την ανοσοκυτταροχημική μελέτη του υλικού, ωσάκις αυτό χρειάζεται, χωρίς την ανάγκη νέας λήψεως υλικού. Σημαντικό μειονέκτημα της νέας μεθόδου είναι το κόστος των απαιτούμενων αντιδραστηρίων, γεγονός που καθιστά απαγορευτική την χρήση της για προγράμματα μαζικού ελέγχου (screening) του γυναικείου πληθυσμού.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η⁷ Κυτταρολογία είναι η βιολογική επιστήμη που ασχολείται με την μελέτη των κυττάρων και σχετίζεται τόσο με την βιολογία όσο και με τη γενετική.

Η Κυτταρολογία άρχισε να αναπτύσσεται μετά την ανακάλυψη του κυττάρου και μάλιστα το 1665, όταν ανακαλύφθηκε το ζωικό κύτταρο από τον Άγγλο φυσικό Robert Hooke. Ο ίδιος δύο χρόνια αργότερα, το 1667 περιέγραψε για πρώτη φορά τα «κύτταρα» (cells) ή «κουτάκια» (little boxes) στο φελό.

Ο πυρήνας των κυττάρων, που ανακαλύφθηκε από τον Robert Brown το 1831, αποτέλεσε «το κύριο αναγνωριστικό στοιχείο του κυττάρου». Γενικότερα η κυτταρολογία, αναπτύχθηκε ραγδαία μετά το 1870 όταν οι νεότεροι κυτταρολόγοι, οι Strasburger, Butchli και Flemming διευκρίνισαν την φύση του πυρήνα.

Ένας εκ των πλέον σημαντικών κλάδων της κυτταρολογίας είναι η *διαγνωστική κυτταρολογία*.

Ιστολογία⁴ είναι ο κλάδος της ανατομικής που μελετά τους ιστούς των ζώων και των φυτών. Υπό την ευρεία του έννοια ο όρος *ιστολογία* χρησιμοποιείται σαν να ήταν συνώνυμος με τον όρο μικροσκοπική ανατομική, επειδή η ύλη της περιλαμβάνει όχι μόνον την μικροσκοπική δομή των ιστών αλλά επίσης εκείνη των κυττάρων, των οργάνων και των οργανικών συστημάτων.

Το σώμα αποτελείται από κύτταρα, μεσοκυττάρια ουσία και μια ρευστή ουσία, το υγρό των ιστών (εξωκυττάριο υγρό), το οποίο περιλούει αυτά τα στοιχεία.

Η ιστολογία δεν ασχολείται πλέον μόνον με την δομή του σώματος. Ασχολείται επίσης και με την λειτουργία του. Στην πραγματικότητα, η ύλη της ιστολογίας σχετίζεται άμεσα με άλλους κλάδους και είναι απαραίτητη για την κατανόησή τους. Ως εκ τούτου, συνυφαίνονται οι κλάδοι της κυτταρικής βιολογίας, της βιοχημείας, της φυσιολογίας και ως θα έδει, της παθολογικής ανατομικής.

Υπάρχουν τρεις τρόποι εξέτασης των κυττάρων.

1. Εξέταση των εκδηλώσεων της ζωής του κυττάρου σε καλλιέργεια ιστού.
2. Εξέταση του νεκρού κυττάρου με το οπτικό και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.
3. Ανάλυση των εκδηλώσεων της ζωής του κυττάρου στο επίπεδο του οπτικού και του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Ο¹³ 20^{ος} αιώνας αποτελεί τον αιώνα των μεγάλων ανακαλύψεων στη θεραπευτική αντιμετώπιση ποικίλων ασθενειών. Ωστόσο, βασικό δόγμα και της σύγχρονης θεραπευτικής εξακολουθεί πάντοτε να παραμένει το απόφθεγμα «κάλλιον το προλαμβάνειν του θεραπεύειν».

Υποστηρικτής ένθερμος αυτής της θεωρίας υπήρξε ο Έλληνας γιατρός Γεώργιος Παπανικολάου. Αποτελεί όχι μόνο τον διασημότερο νεοέλληνα γιατρό αλλά και μία από τις πλέον σημαντικές επιστημονικές προσωπικότητες του 20^{ου} αιώνα. Γεννήθηκε στην Κύμη Ευβοίας το 1883, από πατέρα που ήταν γιατρός και βουλευτής Καρυστίας. Σε ηλικία μόλις δεκαπέντε ετών εγγράφεται στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών απ' όπου απεφοίτησε. Παράλληλα μελετούσε μουσική, ξένες γλώσσες, φιλοσοφία και λογοτεχνία. Ονειρεύεται για τον εαυτό του σπουδές και σταδιοδρομία στο εξωτερικό. Προικισμένος με ισχυρή θέληση που την ενίσχυσαν ακόμη περισσότερο τα φιλοσοφικά βιβλία που διάβαζε, φεύγει το 1907 για σπουδές στη Γερμανία. Επιλέγει τον κλάδο της βιολογίας και μεταβαίνει στην Ιένα όπου θα παρακολουθήσει τα μαθήματα του καθηγητή Ερνέστου Χέκελ, ινδάλματος των φοιτητικών χρόνων του.

Το 1908 θα συνεχίσει τις σπουδές του στο Φράμπουργκ και τέλος στο Μόναχο όπου το 1910 θα του απονεμηθεί ο τίτλος του διδάκτορα της φιλοσοφίας για την εργασία του «περί των συνθηκών της διαφοροποιήσεως του φύλου των Δαφνιδών». Στη Γερμανία ο Παπανικολάου αγάπησε την έρευνα και εξοικειώθηκε με τις εργαστηριακές μεθόδους.

Τα χρόνια της Γερμανίας σφράγισαν βαθύτατα την προσωπικότητά του κι είχαν καθοριστική επίδραση στο σύστημα εργασίας στους σκοπούς και στα εσωτερικά βιώματά του.

Παντρεύεται⁸ το 1910 τη Μάχη Μαυρογένους, γόνο της γνωστής ιστορικής οικογένειας της Μυκόνου. Πράγματι η Μάχη στάθηκε απολύτως αφοσιωμένη στο έργο του πιστή σύντροφος και απαράμιλλη συνεργάτιδα. Μαζί της φεύγει για το Μονακό όπου ο Γεώργιος εργάζεται ένα χρόνο στο εκεί Ωκεανογραφικό Ινστιτούτο.

Το 1913 αναχώρησαν για την Νέα Υόρκη όπου αμφότεροι αναγκάστηκαν να μετέλθουν ποικίλα χειρωνακτικά επαγγέλματα μέχρις ότου εκείνος επιτύχει διορισμό σε θέση παρασκευαστή στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του New York Hospital.

Το 1914 προσλαμβάνεται στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Cornell της Νέας Υόρκης, όπου το 1916 προάγεται σε επιμελητή της ανατομικής. Μελετά τα κύτταρα που έχουν αποφολιδωθεί (αποκολληθεί) από τα τοιχώματα στον αυλό του κόλπου κατώτερων θηλαστικών και διαπιστώνει πλήρη αντιστοιχία των μεταβολών της μορφολογίας των εν λόγω κυττάρων με τις περιοδικές μεταβολές της λειτουργίας των ωοθηκών και κατ' επέκταση των φάσεων του ορμονικού κύκλου. Πράγματι το 1920, με εθελοντικός προσφερθέν υποκείμενο πειραματισμού τη γυναίκα του, αρχίζει νέα σειρά μελετών. Όπως είχε κάνει και με το πειραματικό υλικό του περισυνέλεγε κύτταρα από τον αυλό του κόλπου, τα επέστρωσε σε αντικειμενοφόρες πλάκες και αφού τα χρωμάτιζε με δικής του επινόησης χρωστική μέθοδο (Pap stain) η οποία αποτελούσε παραλλαγή της κλασικής χρώσεως αιματοξυλίνης – ηωσίνης, προσέφερε ευρύτερο χρωστικό φάσμα από εκείνην και επομένως, εξασφάλιζε ευχερέστερη ανίχνευση ποικίλων κυτταρικών δομών. Μελετούσε επισταμένως τις μεταβολές τις οποίες παρουσίαζαν τα κύτταρα υπό την επίδραση των ορμονών που εκκρίνονταν από τις ωοθήκες. Καρπός αυτών των μελετών υπήρξε η πλήρης καταγραφή και μικροσκοπική αναγνώριση όλων των καταμηνίων μεταβολών του γυναικείου κόλπου, καθώς και εκείνων που συνέβαιναν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.

Μια¹³ απλή αλλά άκρως σημαντική εξέταση ετίθετο σε εφαρμογή η κυτταρολογική εξέταση που σήμερα φέρει παγκοσμίως το συγκεκριμένο όνομα του επινοητή της (PAP TEST), ενώ παράλληλα γεννιόταν ένας νέος κλάδος της ιατρικής επιστήμης η **αποφολιδωτική κυτταρολογία**.

Ακόμη επεκτείνει τις μελέτες του σε παθολογικές καταστάσεις του κόλπου και του τραχήλου της μήτρας. Αφορμή στάθηκε η εκ μέρους του οξυδερκούς ερευνητή αναγνώριση καρκινικών κυττάρων σε κάποιο από τα χιλιάδες τραχηλικά επιχρίσματα που εξέταζε με τη βοήθεια φωτομικροσκοπίου. Καθώς ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αρχίζει από την επιφάνεια του οργάνου, η κυτταρολογική μέθοδος του θα επέτρεπε, εάν εφαρμοζόταν εγκαίρως, την εντελώς πρόωμη ανίχνευσή του.

Η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου θα αποτελούσε γεγονός σωτήριο για την πάσχουσα μια και θα επέτρεπε τη ριζική θεραπεία. Πλήρως πεπεισμένος για την αξιοπιστία της μεθόδου του, ανακοινώνει το 1928 τη νέα διαγνωστική μέθοδο ανίχνευσης του καρκίνου (New Cancer Diagnosis). Δυστυχώς όμως η μέθοδός του δεν έτυχε ευμενούς υποδοχής. Η κρατούσα άποψη ήταν, ότι εφ' όσον η βιοψία του τραχήλου της μήτρας αποτελούσε σχετικώς εύκολη επέμβαση, η κυτταρολογική εξέταση επιχρίσματος υλικού ήταν περιττή. Κατόπιν τούτου ο Παπανικολάου

περιορίστηκε σχεδόν αποκλειστικά επί μία δεκαετία στη μελέτη των κυτταρολογικών μεταβολών του γεννητικού συστήματος των θηλέων ατόμων. Το 1939 το Πανεπιστήμιο Cornell αποφάσισε την επανεκτίμηση της κυτταρολογικής μεθόδου του Παπανικολάου για την πρόωμη ανίχνευση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Η προαιρετική εξέταση μεγάλου αριθμού γυναικών απέδειξε την ορθότητα και την αξιοπιστία της μεθόδου. Η ανακοίνωση των αποτελεσμάτων της έρευνας στη Γυναικολογική Εταιρεία της Νέας Υόρκης το Μάρτιο του 1941 προκάλεσε αίσθηση. Η ώρα της δικαίωσης και της παγκόσμιας καταξίωσης είχε φτάσει για τον Παπανικολάου. Το ενδιαφέρον των επιστημόνων για τη μέθοδό του συνεχώς μεγαλώνει, ενώ η εφαρμογή της και σε άλλα όργανα του σώματος διευρυνόταν γρήγορα για να καθιερωθεί διεθνώς.

Σήμερα χάρη στην αξιοπιστία της, την ευκολία με την οποία λαμβάνεται το υλικό της, τα απλούστατα μέσα που απαιτεί και το χαμηλό κόστος της, αποτελεί μια από τις πλέον συχνά εκτελούμενες ιατρικές εξετάσεις, ακόμη και σε φτωχές χώρες.

Το συγγραφικό έργο του Γεωργίου Παπανικολάου αποτελείται από εκατόν πενήντα οκτώ άρθρα και πέντε συγγράμματα. Τα εν λόγω συγγράμματα ιδιαίτερος, μάλιστα, ο περίφημος *Ατλας Αποφολιδατικής Κυτταρολογίας*, αποτελούν βιβλία σταθμούς όχι μόνον για τον κλάδο της κυτταρολογίας αλλά και για ολόκληρη την ιατρική βιβλιογραφία του 20^{ου} αιώνα.

Ο Παπανικολάου τιμήθηκε με πολλές διακρίσεις. Προτάθηκε μάλιστα και για το βραβείο Νόμπελ. Το Πανεπιστήμιο Cornell, τον ανακήρυξε το 1957 ομότιμο καθηγητή της κλινικής ανατομικής. Διετέλεσε, επίσης, σύμβουλος ιατρός (consultant) του περίφημου MEMORIAL HOSPITAL της Νέας Υόρκης. Το 1949 η Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών ονόμασε τον Παπανικολάου επίτιμο διδάκτορά της ενώ η Ακαδημία Αθηνών το Νοέμβριο του 1957 τον ανακήρυξε παμψηφεί επίτιμο μέλος της.

Πέθανε το 1962 στο Μαϊάμι της Φλόριδας, όπου είχε εγκατασταθεί από το προηγούμενο έτος, προκειμένου να οργανώσει το εκεί Καρκινολογικό Ινστιτούτο, το οποίο μετά το θάνατό του έλαβε το όνομά του (PAPANIKOLAOU CANCER RESEARCH INSTITUTE). Μετά θάνατον του απενεμήθη και το βραβείο του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών. Άνθρωπος με σπάνιο ήθος, σεμνότητα και ανιδιοτέλεια, μαζί με την γυναίκα του, ευτύχησε να δει την πλήρη δικαίωση του ακάματου μόχθου του. Είδε, επίσης, τις διαγνωστικές μεθόδους του και τις τεχνικές

του να εφαρμόζονται ευρύτατα σε παγκόσμια κλίμακα και χάρη σε αυτές να σώζονται εκατομμύρια ζωές. Πενήντα χρόνια μακριά από την Ελλάδα παρέμεινε Έλληνας για τον οποίο “οι ευγενείς παραδόσεις” της μητέρας πατρίδας αποτελούσαν πάντοτε “την μεγαλύτερη πηγή εμπνεύσεως και ιδεολογίας”. Οι Έλληνες πρέπει να είναι περήφανοι που ο τόπος τους γέννησε αυτό τον μεγάλο γιατρό του 20^{ου} αιώνα.

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα⁷ τεχνικά μέσα που διαθέτουμε για τη γνώση των δομικών στοιχείων είναι ο γυμνός οφθαλμός το οπτικό μικροσκόπιο και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ο γυμνός οφθαλμός, για να διακρίνει τα δομικά στοιχεία χρησιμοποιεί το σχήμα (οζίδια, ίνες, κυστίδια κλπ.) το χρώμα καθώς και την εικόνα που παρουσιάζουν οι τομές του υλικού.

Ήδη μ' αυτόν τον τρόπο διαπιστώνει κανείς ότι κάθε όργανο αποτελείται από ανόμοια στοιχεία. Η πρώτη ιστολογική εξέταση του είδους έγινε από τον Αριστοτέλη περίπου το 350 π.Χ. (η διδασκαλία της Ομοιομέρειας).

Η προσπάθεια διάκρισης των δομικών στοιχείων έχει ως όριο την οπτική διακριτική ικανότητα του ανθρώπινου οφθαλμού. Το σύνθετο μικροσκόπιο που πρωτοκατασκευάστηκε στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, προχωρεί έτι περαιτέρω και με την κατά 100 φορές ισχυρότερη μεγέθυνσή του επιτρέπει την διάκριση νέων σχηματισμών.

Οι πρώτες απόψεις για την δομή βιολογικών αντικειμένων προέκυψαν από τις παρατηρήσεις με το οπτικό μικροσκόπιο κατά τα τελευταία 100 χρόνια, οπότε η ανακάλυψη του κυττάρου απετέλεσε το κλειδί για την κατανόηση της δομής των ζωντανών οργανισμών. Πριν από 50 χρόνια, με την ανακάλυψη του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, κατέστησαν ορατοί σχηματισμοί άγνωστοι μέχρι τότε και κατέστη δυνατή η διαπίστωση της πραγματικής δομής τους.

Για να έχουμε όμως ολοκληρωμένη εικόνα της δομής των βιολογικών σχηματισμών πρέπει να συνδυάζονται τα δεδομένα όλων των τάξεων μεγέθυνσης : μεγέθυνση με κοινό φακό, με οπτικό και με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. (εικ. 1)

Όρια της διακριτικής ικανότητας:

Του γυμνού οφθαλμού περίπου 0,08 mm

Του οπτικού μικροσκοπίου περίπου 0,3 μm

Του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου περίπου 0,3 nm = 3Å⁰

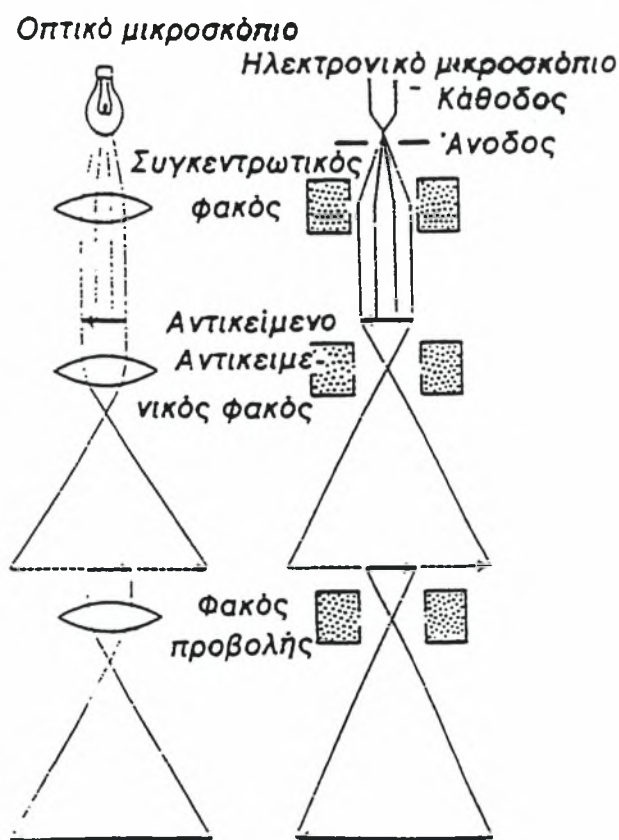
Φακός

Ο απλός μεγεθυντικός φακός χρησιμοποιείται ως βοηθητικό μέσο για να διακρίνονται στο χώρο οι αδρές σχέσεις ανάμεσα σε διαφόρους σχηματισμούς. Επειδή οι τελευταίες δεν είναι πλέον διακριτές στο επίπεδο των μικροσκοπικών μεγενθύσεων, η παρατήρηση με τον απλό φακό βοηθάει αποφασιστικά. Το όριο της

διακριτικής ικανότητας, δηλ της ελάχιστης απόστασης που επιτρέπει σε δύο σημεία να διακρίνονται ως ξεχωριστά μεταξύ τους, βρίσκεται για τον γυμνό οφθαλμό στα 0,08 mm. Για παράδειγμα στα όρια αυτά διακρίνονται οι εντερικές λάχνες, οι κεντρικές φλέβες των ηπατικών λοβίων, τα γαστρικά βοθρία κ.ά.

Οπτικό μικροσκόπιο αποτελεί σύνθετο σύστημα φακών, όπου η τελική μεγέθυνση επιτυγχάνεται σε δύο στάδια. Το μεγεθυμένο πραγματικό ανεστραμμένο είδωλο που σχηματίζει ο αντικειμενικός φακός, παρατηρείται με τον μεγεθυντικό προσοφθάλμιο φακό. Το όριο της διακριτικής ικανότητας του οπτικού μικροσκοπίου βρίσκεται πάνω από 0,1 μ m.

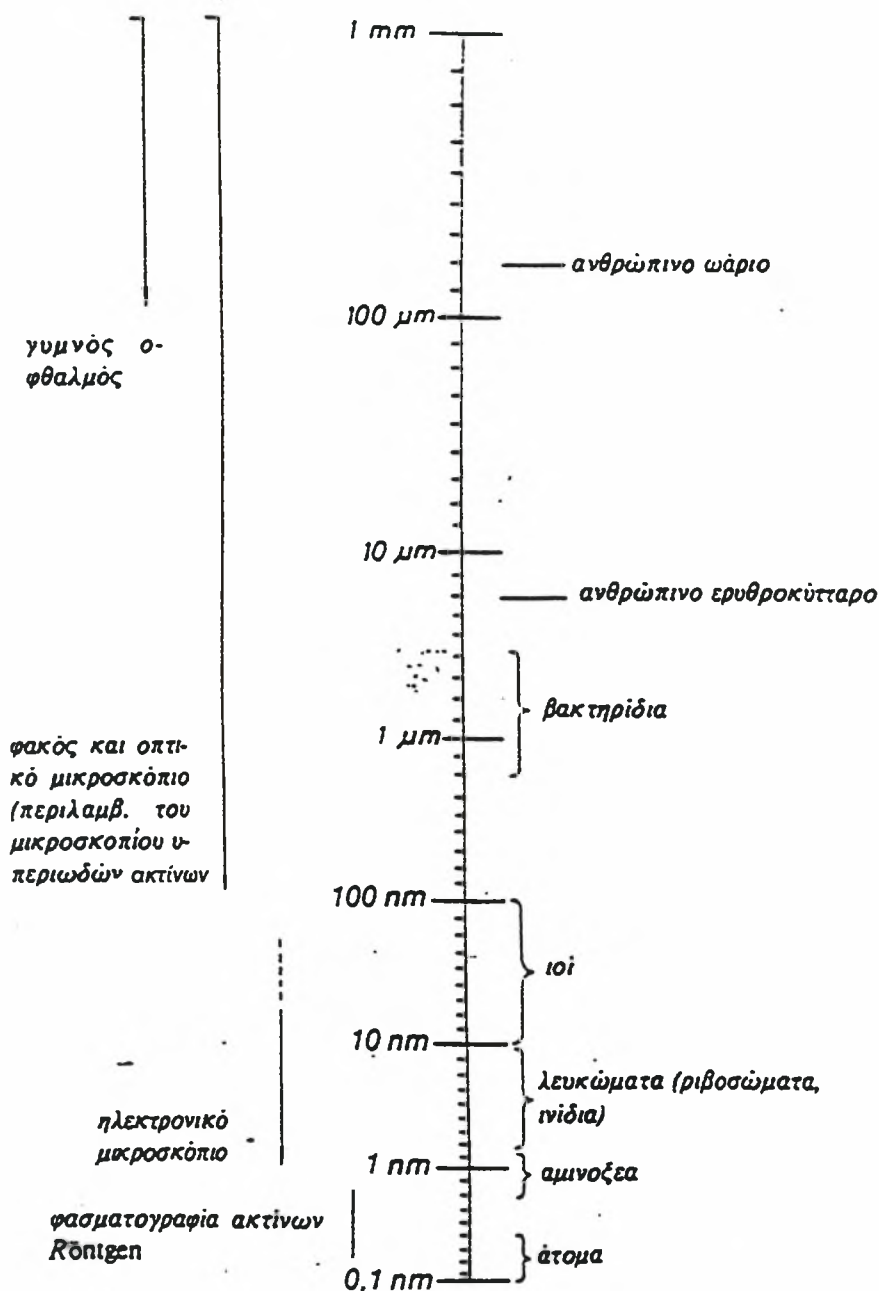
Η μικροσκόπηση σε σκοτεινό πεδίο επιτρέπει ακόμη καλύτερες επιδόσεις. Ως μέτρο μετρήσεως τα οπτικά παρασκευάσματα μπορεί να χρησιμεύσει το ερυθροκύτταρο (το οποίο σε μονιμοποιημένη κατάσταση έχει διάμετρο 7,7 μ m) καθώς και οι κυτταρικοί πυρήνες (με διάμετρο 4-10 μ m).



Εικ. 1 Πορεία των ακτίνων στο οπτικό και στο ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο.

Μεγέθη

- $1 \text{ mm} = 1.000 \text{ } \mu\text{m}$ (μικρά ή μικρόμετρα)
 $1 \text{ mm} = 1.000.000 \text{ nm}$ (νανόμετρα ή μιλλιμικρά nm)
 $1 \text{ mm} = 10.000.000 \text{ \AA}$ (μονάδες Angström)



Για να αναχθεί η μία μεγέθυνση σε άλλη χρησιμοποιούνται κυρίως δύο σχέσεις:

$$1 \text{ nm (ή } 10 \text{ \AA)} \text{ (μονάδα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου)} = 1/1000 \text{ } \mu\text{m}$$

$$1 \text{ } \mu\text{m (μονάδα οπτικού μικροσκοπίου)} = 1/1000 \text{ mm}$$

ΦΩΤΟΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Προετοιμασία

Στα⁷ απαιτούμενα στάδια προετοιμασίας των ιστών για εξέταση με την φωτομικροσκοπία περιλαμβάνεται (1) η μονιμοποίηση, (2) η αφυδάτωση και η διαύγαση, (3) η σκλήνωση, (4) η λήψη ιστολογικών τομών και (5) η επικόλληση σε αντικειμενοφόρες πλάκες καθώς και η χρώση των εν λόγω τομών.

Για την μελέτη των ιστών έχουν αναπτυχθεί ποικίλες τεχνικές επεξεργασίας τους ώστε μετά απ' αυτήν να μοιάζουν πολύ με την φυσιολογική έμβια κατάστασή τους. Στα στάδια αυτών των τεχνικών περιλαμβάνεται η **μονιμοποίηση** (fixation), η **αφυδάτωση** (dehydration), η **διαύγαση** (clearing), η **σκλήνωση** (embedding), στο κατάλληλο υλικό, η **λήψη τομών** (sectioning) εξαιρετικά λεπτών ώστε να επιτρέπουν την επισκόπησή τους με διερχόμενο φωτισμό, καθώς επίσης και η **χρώση** (staining), ώστε οι διάφοροι ιστοί και τα κυτταρικά στοιχεία να αποκτήσουν ποικίλες χρωματικές αποχρώσεις, που επιτρέπουν την διάκριση μεταξύ των.

Ζωντανό παρασκεύασμα.

Λεπτά αντικείμενα όπως π.χ. το μεσεντέριο μικρών ζώων, τα επιχρίσματα αίματος και άλλα μπορούν να διαπεραστούν από το φως.

Το φως που τα διαπερνά τροποποιείται από αυτά παρέχοντας σημαντικές διαγνωστικές δυνατότητες. Με το υπεριώδες φως που παράγεται από λαμπτήρα υδραργύρου (από το οποίο αφαιρείται με φίλτρο το ορατό φως) φωτίζονται ορισμένα τμήματα του κυττάρου, προϊόντα μεταβολισμού κ.ά. Από αυτόν τον αυτόματο φθορισμό πρέπει να διακρίνουμε την χρώση τμημάτων του κυττάρου με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες:

Φθορίζουσα χρώση εν ζωή.

Το πολωμένο φως, που πάλλεται μόνο σε ένα επίπεδο, όταν περάσει από σχηματισμό με υπομικροσκοπικό προσανατολισμό των μορίων, τους διασπάται σε δύο μέρη παλλόμενα σε κάθετα μεταξύ τους επίπεδα (ανισοτροπία η διπλοθλαστικότητα), ενώ όταν περάσει από σχηματισμούς χωρίς συγκεκριμένο προσανατολισμό αυτοί συμπεριφέρονται ισότροπα (απλή διάθλαση). Οι ανισότροποι σχηματισμοί φαίνονται φωτεινοί στη διαγώνιο μεταξύ δύο διασταυρουμένων πολωτών. Κατά τη μικροσκόπηση σε σκοτεινό πεδίο το αντικείμενο φωτίζεται από

την περιφέρεια και κατ' αυτόν τον τρόπο καθίσταται δευτερογενής πηγή φωτός. Έτσι οι διάφοροι σχηματισμοί φαίνονται φωτεινοί μέσα σε σκοτεινό φόντο.

Μονιμοποιημένο παρασκεύασμα.

Ενώ⁷ κατά την εξέταση ζωντανού αντικειμένου μεταβάλλεται μόνο η συμπεριφορά του στο φως κατά την εξέταση του μονιμοποιημένου παρασκευάσματος επιτελείται μεταβολή του ίδιου του αντικειμένου με μονιμοποίηση και χρώση. (Εικ 2.)

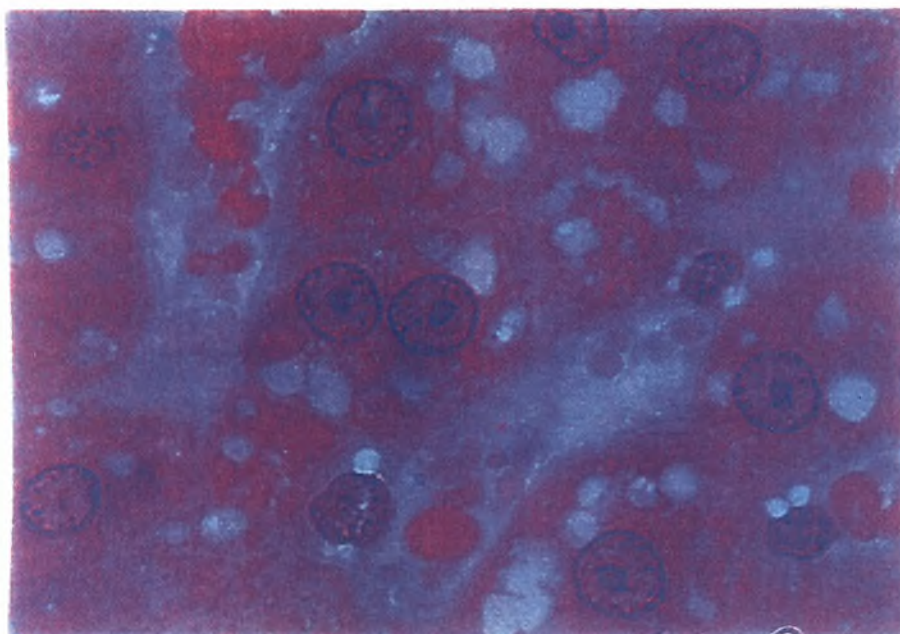
Μονιμοποίηση

Μονιμοποίηση (fixation) είναι η επεξεργασία των ιστών με χημικές ουσίες, οι οποίες όχι μόνο επιβραδύνουν τις αλλοιώσεις των ιστών μετά τον θάνατο του ατόμου (ή την αφαίρεσή τους από το σώμα αλλά επιπλέον διατηρούν την φυσιολογική αρχιτεκτονική τους. Ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος μονιμοποιητικός παράγων στη φωτοmikροσκοπία είναι η ουδέτερη ρυθμισμένη **φορμόλη** (formalin) και το υγρό του **Bouin** (Bouin's fluid). Αμφότερα τα εν λόγω μονιμοποιητικά υγρά διασυνδέουν πρωτεΐνες, διατηρώντας τοιουτοτρόπως μια εικόνα των ιστών με εκείνη που παρουσίαζαν εν ζωή.

Τα βιολογικά αντικείμενα αποσυντίθεται ταχύτατα όταν αποκοπούν από τις προϋποθέσεις της ζωής τους. *Αυτόλυση* ονομάζεται η αποδόμηση των ιστών εξ' αιτίας των ενζύμων που ήδη υπάρχουν μέσα σε αυτούς. Η ταχύτητα της αποσύνθεσης εξαρτάται από την ποσότητα ενζύμων και από την θερμοκρασία. Αν στην αποσύνθεση συμμετέχουν και βακτήρια τότε πρόκειται για πλάγια τυπογραφικά στοιχεία (σάπισμα). Για να μπορεί να διατηρηθεί μονίμως το παρασκεύασμα, πρέπει να αντιμετωπιστεί η αυτόλυση και η σήψη. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μονιμοποίηση. Κατά τη μονιμοποίηση ο ιστός νεκρώνεται με τη βοήθεια οργανικών και ανόργανων ουσιών οπότε αδρανοποιούνται τα λευκώματα. Η μονιμοποίηση είναι μη αναστρέψιμη διαδικασία. Έτσι αποκτάμε τη “στιγμιαία –ακινητοποιημένη- εικόνα” μιας βιολογικής διεργασίας.

Όμως η “στιγμιαία εικόνα” αυτή είναι “παραμορφωμένη” και αν θέλουμε να μελετηθεί σωστά πρέπει να “αποσαφηνιστεί” (π.χ. συγκρίνοντας την με ευρήματα άλλων μεθόδων εξέτασης). Τα αίτια της “παραμόρφωσης” βρίσκονται και στον ίδιο τον ιστό και στα υλικά της μονιμοποίησης. Μεταξύ μονιμοποιητικών υλικών και λευκωμάτων επιτελούνται χημικές αντιδράσεις, συχνά δε οξειδώσεις.

Η σημαντική στην πράξη μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη ή γλουταραλδεΰδη προκαλεί δικτύωση των λευκωμάτων λόγω σχηματισμού εκ μέρους της μονιμοποιητικής ουσίας μεθυλικών γεφυρών μεταξύ των μορίων. Τα μόρια των λευκωμάτων από τη διαλυτή κατάσταση μεταπίπτουν σε κατάσταση γέλης (πηκτής) και διατάσσονται κατά συγκεκριμένο τρόπο. Ομοίως το οσμικό οξύ προκαλεί δικτύωση των ακορέστων λιπιδίων. Οι χημικές ομάδες που απελευθερώνονται ή παραμένουν ελεύθερες μετά τη μονιμοποίηση αποτελούν αργότερα το υπόστρωμα για τη χρώση του ιστού. Επιπλέον ο σχηματισμός αλάτων παίζει ρόλο στη μονιμοποίηση. Οι μονιμοποιητικές ουσίες επιδρούν στην ηλεκτρική φόρτιση των πρωτεϊνικών σχηματισμών, οπότε μικρά, ξεχωριστά μεταξύ τους, τμήματα συρρέουν σε μεγαλύτερα συγκρίματα (πρόκληση κροκύδωσης).



εικ.2

Πυρήνες κυττάρων. Φωτομικρογραφία (X 1.323). Τυπικά κύτταρα, καθένα από τα οποία περιέχει ένα σφαιρικό πυρήνα.

Ο ιστός με τη μονιμοποίηση, όχι μόνο προφυλάσσεται από την καταστροφή, αλλά και σκληραίνει γεγονός που επιτρέπει τον εύκολο τεμαχισμό του. Η τοποθέτηση (σκήνωση) του ιστού μέσα σε τηγμένη παραφίνη ή σε ρητίνη βελτιώνει σημαντικά

τη δυνατότητα τομής. Από την ενιαία «μάζα» που προκύπτει μετά την ψύξη της παραφίνης κατασκευάζουμε λεπτές τομές (πάχους μερικών μικρών) με τη βοήθεια μικροτόμου που μπορούν να επικολληθούν σε αντικειμενική πλάκα και να χρωσθούν.

Αφυδάτωση και διαύγαση

Επειδή⁴ κάθε μεγάλο τεμάχιο ιστού περιέχει αρκετό νερό, χρησιμοποιείται ανιούσα σειρά οينوπνευματούχων λουτρών, αρχής γενομένης από οινόπνευμα (50%) και σταδιακά μέχρι το απόλυτο οινόπνευμα (100%), ώστε να αφαιρεθεί πλήρως το νερό (αφυδάτωση / dehydration). Στη συνέχεια, ο ιστός υφίσταται την επίδραση ξυλόλης, μιας χημικής ουσίας που έχει την ιδιότητα να αναμειγνύεται με την τηγμένη παραφίνη. Η εν λόγω διεργασία χαρακτηρίζεται ως **διαύγαση** (clearing), διότι η ξυλόλη καθιστά τους ιστούς διαφανείς.

Σκήνωση (Embedding)

Για να διακριθούν μεταξύ τους τα αλληλεπικαλυπτόμενα κύτταρα των ιστών και η εξωκυττάρια ουσία, οι ιστοί πρέπει να εγκλειστούν (σκηνωθούν) σε κατάλληλο μέσο και εν συνεχεία να κοπούν σε λεπτές φέτες (τομές). Στην φωτομικροσκοπία το σύνηθες υλικό σκήνωσης είναι η παραφίνη. Ο ιστός τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο που περιέχει τηγμένη παραφίνη, μέχρις ότου **διαποτισθεί** πλήρως από αυτήν. Μόλις αυτό συμβεί τοποθετείται μέσα σε μικρό υποδοχέα, καλύπτεται με τηγμένη παραφίνη, που εν συνεχεία αφήνεται να πήξει, σχηματίζοντας έναν κύβο παραφίνης, ο οποίος περιέχει τον ιστό.

Λήψη τομών (Sectioning)

Στη συνέχεια, οι κύβοι με τους ιστούς πλανίζονται ώστε να αφαιρεθεί η περίσσεια του υλικού σκήνωσης και μετά στερεώνονται σε βάση για να κοπούν με ειδικό όργανο που ονομάζεται **μικροτόμος**. Το εν λόγω όργανο είναι εφοδιασμένο με λεπίδα και βραχίονα, ο οποίος προωθεί τον κύβο του ιστού κατά καθορισμένα ίσα διαστήματα. Προκειμένου για την φωτομικροσκοπία το πάχος κάθε ιστολογικής τομής ανέρχεται σε περίπου 5-10μm.

Τομές είναι επίσης δυνατόν να ληφθούν από ιστολογικά παρασκευάσματα που υπέστησαν κατάψυξη είτε σε υγρό άζωτο είτε στον υποδοχέα κρουστάτη ταχείας

καταψύξεως. Τα εν λόγω παρασκευάσματα σκηνώνονται με την βοήθεια υλικού σκηνώσης ταχείας καταψύξεως και κόπτονται υπό θερμοκρασίες κάτω του μηδενός με την χρήση προψυγμένου ατσάλινου μαχαιριδίου. Οι τομές τοποθετούνται σε προψυγμένες γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες, αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία βάφονται με ειδικές χρωστικές ουσίες (ή υφίστανται επεξεργασία με ιστοχημικές και ανοσοϊστοχημικές τεχνικές).

Επικόλληση και χρώση (Mounting and staining)

Οι⁴ τομές παραφίνης επικολλώνται σε γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες και εν συνεχεία βάφονται με υδατοδιαλυτές χρωστικές, οι οποίες επιτρέπουν την διαφοροποίηση των ποικίλων κυτταρικών στοιχείων.

Οι τομές υλικού σκηνωμένου σε παραφίνη που προορίζονται για μελέτη με την συνήθη φωτοmikροσκοπία, κόβονται με ανοξειδωτά ατσάλινα μαχαίρια και **επικολλώνται** σε γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες επιστρωμένες με επικολλητική ουσία.

Δεδομένου ότι πολλά στοιχεία των ιστών παρουσιάζουν την ίδια περίπου οπτική πυκνότητα, πρέπει να χρωματιστούν ώστε να καταστούν κατάλληλα για φωτοmikροσκοπική εξέταση. Η **χρώση** (staining) των τομών για την εν λόγω εξέταση γίνεται ως επί το πλείστον με υδατοδιαλυτές χρωστικές ουσίες. Γι' αυτό τον λόγο, αφαιρείται πρώτα η παραφίνη από την τομή, εν συνεχεία η τομή ενυδατώνεται και κατόπιν χρωματίζεται. Μετά την χρώση της, η τομή αφυδατώνεται εκ νέου ώστε να καταστεί δυνατή η μόνιμη στερέωση της καλυπτρίδας πάνω στην τομή και στην αντικειμενοφόρο πλάκα με την βοήθεια του κατάλληλου επικαλυπτικού υλικού. Η καλυπτρίδα εκτός του ότι προστατεύει την τομή από φθορές είναι επίσης απαραίτητη για την εξέταση της τομής με το μικροσκόπιο.

Αν και υπάρχουν διάφορα είδη χρώσεων που έχουν επινοηθεί για να αναδείξουν οπτικώς πολλά στοιχεία των κυττάρων και των ιστών, είναι δυνατή η κατάταξή τους σε τρεις κατηγορίες:

- χρώσεις που αντιδιαστέλλουν τα όξινα από τα αλκαλικά στοιχεία του κυττάρου
- ειδικές χρώσεις που αναδεικνύουν τα ινώδη στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας

- μεταλλικά άλατα που καθιζάνουν στους ιστούς, σχηματίζοντας πάνω σε αυτούς μεταλλικές εναποθέσεις.

Η πλέον συχνά χρησιμοποιούμενη χρώση στην ιστολογία είναι η **χρώση** της αιματοξυλίνης και της ηωσίνης, συχνά αναφερόμενη στα κείμενα με τα ξενόγλωσσα αρχικά της **H & E**. Η αιματοξυλίνη (hematoxylin) είναι από χημικής απόψεως βάση, η οποία βάφει επιλεκτικώς τα όξινα στοιχεία των κυττάρων με κυανή απόχρωση. Επειδή τα πλέον όξινα εκ των εν λόγω στοιχείων είναι το DNA και το RNA, ο πυρήνας και περιοχές του κυτταροπλάσματος πλούσιες σε ριβοσώματα βάφονται βαθυκύανες. Αυτά τα στοιχεία χαρακτηρίζονται ως **βασεόφιλα**. Η **ηωσίνη** (eosin) είναι οξύ, το οποίο βάφει τα αλκαλικά στοιχεία του κυττάρου με ρόδινο χρώμα. Επειδή πολλά κυτταροπλασματικά στοιχεία έχουν αλκαλικό pH, αρκετές περιοχές του κυτταροπλάσματος βάφονται ροδαλές. Αυτά τα στοιχεία χαρακτηρίζονται ως **οξεόφιλα**. Κατά την προετοιμασία των παρασκευασμάτων για ιστολογική μελέτη, χρησιμοποιούνται και πολλές άλλες χρώσεις (Πίνακας 1-1).

Μόρια μερικών χρωστικών ουσιών, όπως το **κυανούν της τολουϊδίνης** (toluidine blue), πολυμερίζονται μεταξύ τους όταν εκτίθενται σε πυκνές συγκεντρώσεις πολυανιόντων των ιστών. Τα εν λόγω σύμπλοκα έχουν διαφορετικό χρώμα από τα μονομερή μόριά τους. Για παράδειγμα, το κυανούν της τολουϊδίνης βάφει τους ιστούς γαλάζιους, εκτός από εκείνους που είναι πλούσιοι σε πολυανιόντα (π.χ. η θεμέλια ουσία του χονδρικού ιστού και τα κοκκία των σιτευτικών κυττάρων), τους οποίους βάφει ιώδεις. Ο ιστός ή το κυτταρικό στοιχείο που βάφεται ιώδες με αυτή την χρωστική χαρακτηρίζεται ως **μεταχρωματικό**, ενώ για το κυανούν της τολουϊδίνης λέμε ότι εκφράζει **μεταχρωμία**.

Ιστοχημεία

Ειδικά⁷ χημικά συστατικά των ιστών και των κυττάρων είναι δυνατόν να εντοπισθούν με την μέθοδο της **ιστοχημείας** (histochemistry) και της **κυτταροχημείας** (cytochemistry). Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στην ενζυμική δραστηριότητα, χημική αντιδραστικότητα και άλλα φυσικοχημικά φαινόμενα σχετιζόμενα με το συστατικό που μας ενδιαφέρει.

Χημικές ανιχνεύσεις που είναι γνωστές στο δοκιμαστικό σωλήνα, εφαρμόζονται στους ιστούς. Π.χ. μπορεί να ανιχνευτεί στον ιστό ο σίδηρος με την αντίδραση του κυανού του Βερολίνου, η δε αιμοσφαιρίνη με τη δοκιμασία της βενζιδίνης. Με

ιδιαίτερη διαδικασία η αντίδραση μπορεί να γίνει σε ένα σημείο του κυττάρου ή του ιστού (κυτταροχημεία, ιστοχημεία). Διαδικασία που βοηθάει σε αυτό είναι η ψυκτική ξήρανση. Κατά την ταχύτερη κατάψυξη και στη συνέχεια την ξήρανση σε ψηλό κενό, οι διάφορες ουσίες, παρακάμπτοντας την υγρή φάση, παραμένουν στη θέση τους. Ομοίως συμπεριφέρονται οι ουσίες κατά την αποτέφρωση της τομής (σποδογράφημα). Ραδιενεργές ουσίες ανιχνεύονται στους ιστούς με επικάλυψη από φιλμ ευαίσθητο στις ακτινοβολίες, στο οποίο με την επίδραση των ακτινών σχηματίζονται κοκκία αργύρου, των οποίων η θέση καθορίζεται στην τομή που στη συνέχεια χρωματίστηκε (αυτοακτινογραφία ή αυτοραδιογραφία). Ουσία που βοηθάει ουσιαστικά στην ιστοχημεία είναι το αντιδραστήριο του Schiff, (λευκανθείσα φουξίνη). Με τη βοήθειά του επιτελείται η πυρηνική αντίδραση του Feulgen και η αντίδραση PAS.

ΠΙΝΑΚΑΣ⁴ 1 Συνήθεις ιστολογικές χρώσεις και χρωστικά αποτελέσματα

ΧΡΩΣΤΙΚΗ	ΧΡΩΣΤΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
Αιματοξυλίνη	<i>Κυανούν:</i> πυρήνας, όξινες περιοχές του κυτταροπλάσματος, θεμέλια ουσία του χονδρικού ιστού
Ηωσίνη	<i>Ροδαλό:</i> αλκαλικές περιοχές του κυτταροπλάσματος, κολλαγόνες ίνες
Τριχρωματική χρώση (Masson)	<i>Βαθύ κυανούν:</i> πυρήνες <i>Ερυθρό:</i> μυϊκός ιστός, κερατίνη, Κυτταρόπλασμα <i>Γαλάζιο:</i> βλέννα, Κολλαγόνο
Χρώση ελαστικών Ινών με ορκεΐνη	<i>Καστανό:</i> Ελαστικές ίνες
Χρώση ελαστικών Ινών κατά Weigert	<i>Κυανούν:</i> ελαστικές ίνες
Χρώση αργύρου	<i>Μελανό:</i> δικτυωτές ίνες
Σιδηρούχος αιματιξυλίνη	<i>Μελανό:</i> εγκάρσια γράμμωση μυϊκών ινών, πυρήνες, ερυθροκύτταρα
Χρώση υπεριοδικού οξέος-αντιδραστηρίου του Schiff (PAS)	<i>Ερυθρό μαγεντίας (φούζια):</i> Γλυκογόνο και ουσίες Πλούσιες σε υδατάνθρακες
Χρώσεις Wright και Giemsa	Χρησιμοποιούνται για τον διαφορικό χρωματισμό κυττάρων του αίματος <i>Ρόδινο:</i> ερυθροκύτταρα, κοκκία ηωσινοφίλων λευκοκυττάρων <i>Ιώδες:</i> πυρήνες λευκοκυττάρων, κοκκία βασεοφίλων λευκοκυττάρων <i>Γαλάζιο:</i> κυτταρόπλασμα μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων

Σημαντικό μέρος της ιστοχημείας αποτελούν οι ανιχνεύσεις των ενζύμων (τα ένζυμα είναι λευκώματα με καταλυτική δράση, επιδρούν δε με την παρουσία τους σε διαδικασίες του μεταβολισμού). Στον κατάλληλα μονιμοποιημένο ιστό προστίθεται ουσία που αλλοιώνεται από το αναζητούμενο ένζυμο. Το προϊόν της μετατροπής μπορεί να φανεί μικροσκοπικώς ή με επιπλέον αντιδράσεις.

Στην ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιούνται ανοσοβιολογικά δεδομένα για την αναγνώριση και την ιστολογική και κυτταρολογική εντόπιση ορισμένων πρωτεϊνών ή άλλων ουσιών με αντιγονική δράση. Εδώ ακολουθείται η ακόλουθη διαδικασία: γίνεται ένεση καθορισμένου λευκώματος του οποίου θέλουμε την εντόπιση σε ζώο άλλου είδους. Το αντιγόνο που σχηματίζεται στο ζώο αυτό παραλαμβάνεται από το αίμα του και επιτίθεται στην τομή του ιστού του ζώου που εξετάζουμε και από το οποίο προέρχεται το λευκωμα. Το αντίσωμα σχηματίζει σύμπλεγμα αντιγόνου – αντισώματος με όλα τα στοιχεία της τομής που περιέχουν την συγκεκριμένη πρωτεΐνη (αντιγόνο). Οι ενώσεις αυτές μπορούν να καταστούν ορατές αφού συνδεθούν με έγχρωμη ουσία, που διακρίνεται στο οπτικό ή στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και δεν παρεμποδίζει την αντίδραση αντιγόνου – αντισώματος.

Ανάλογα με τη φύση της ουσίας που έγινε η σύνδεση, είναι δυνατός ο εντοπισμός της με μικροσκόπηση φθορισμού, με χρώση οπτικού μικροσκοπίου ή με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο: Αν η τεχνική εφαρμοστεί προσεκτικά, η ανίχνευση είναι πολύ ειδική και υπερέχει από τις περισσότερες ιστοχημικές μεθόδους. Η μέθοδος χρησιμοποιείται αποτελεσματικά για την αναγνώριση κυττάρων που π.χ. παράγουν πρωτεϊνικές ορμόνες ή λευκωματίνες του ορού, για την εντόπιση ενζύμων, την ανίχνευση συσταλών λευκωμάτων (ακτομυοσίνη) στα κύτταρα καθώς και για τη λύση πολυαρίθμων άλλων προβλημάτων.

Ανοσοκυτταροχημεία

Αν⁷ και οι ιστοχημικές μέθοδοι επιτρέπουν την σχετικώς καλή εντόπιση μερικών ενζύμων και μεγαλομοριακών ουσιών των κυττάρων ή των ιστών, περισσότερο επακριβής εντόπισή τους μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση της **ανοσοκυτταροχημείας** (immunocytochemistry). Αυτή η μέθοδος απαιτεί την παραγωγή αντισώματος έναντι της συγκεκριμένης μεγαλομοριακής ουσίας που

επιθυμείται η εντόπισή της, καθώς και την σήμανση του εν λόγω αντισώματος με φθορίζουσα χρωστική ουσία, π.χ. την φλουορεσεΐνη ή την ροδαμίνη.

Υπάρχουν δύο μέθοδοι σημάνσεως των αντισωμάτων, η άμεση (direct) και η έμμεση (indirect). Στην άμεση μέθοδο το αντίσωμα έναντι του μακρομορίου σημαίνεται με φθορίζουσα χρωστική. Στην συνέχεια, το αντίσωμα αφήνεται να αντιδράσει με την μεγαλομοριακή ουσία, το δε προκύπτον σύμπλεγμα εξετάζεται με μικροσκόπιο φθορισμού.

Στην έμμεση μέθοδο παρασκευάζεται φθορίζον αντίσωμα έναντι του πρωτογενούς αντισώματος, του ειδικού για την υπό εξέταση μεγαλομοριακή ουσία. Αμέσως μετά την αντίδραση του πρωτογενούς αντισώματος με το αντιγόνο, το παρασκεύασμα ξεπλένεται για να απομακρυνθεί το μη δεσμευθέν πρωτογενές αντίσωμα. Στην συνέχεια προστίθεται το σημασμένο αντίσωμα, το οποίο αντιδρά με το αρχικό σύμπλεγμα αντιγόνου – αντισώματος, σχηματίζοντας δευτερογενές σύμπλεγμα ορατό με μικροσκόπιο φθορισμού. Η έμμεση μέθοδος είναι περισσότερο ευαίσθητη από την άμεση μέθοδο επειδή πολυάριθμα σημασμένα αντισώματα συνδέονται με πρωτογενή αντισώματα, καθιστώντας ευκολότερη την απεικόνισή τους. Επιπροσθέτως, η έμμεση μέθοδος δεν απαιτεί σήμανση του πρωτογενούς αντισώματος, το οποίο συχνά είναι διαθέσιμο μόνο σε περιορισμένες ποσότητες.

Η ανοσοκυτταροχημεία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί σε παρασκευάσματα προοριζόμενα για ηλεκτρονική μικροσκόπηση, εάν αντί για την φθορίζουσα ουσία χρησιμοποιηθεί μια σκιερή στα ηλεκτρόνια ουσία, η φερριτίνη. Η σήμανση με φερριτίνη μπορεί να εφαρμοστεί τόσο στην άμεση όσο και στην έμμεση μέθοδο.

Αυτορραδιογραφία

Η ⁷ **αυτορραδιογραφία** (ραδιοαυτογραφία) αποτελεί ιδιαιτέρως χρήσιμη μέθοδο εντοπισμού και μελέτης σειράς ειδικών παροδικών αλληλοδιαδοχικών γεγονότων. Η μέθοδος απαιτεί την ενσωμάτωση κάποιου ραδιενεργού ισοτόπου-συνηθέστατα τριτίου (³H) – στο υπό εξέταση δομικό στοιχείο. Παράδειγμα αποτελεί η χρήση τριτωμένου αμινοξέος για την παρακολούθηση της σύνθεσης και της συσκευασίας των πρωτεϊνών. Μετά την έγχυση της ραδιοσημασμένης ουσίας σε πειραματόζωο λαμβάνονται δείγματα ιστών κατά επιλεγμένα διαστήματα. Τα εν λόγω δείγματα, μετά την συνήθη ιστολογική επεξεργασία, τοποθετούνται πάνω σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα, αλλά αντί η τομή να σφραγισθεί με καλυπτρίδα,

επικαλύπτεται με λεπτό στρώμα φωτογραφικού γαλακτώματος. Το παρασκεύασμα τοποθετείται σε σκοτεινό δοχείο επί μερικές ημέρες ή εβδομάδες, κατά την διάρκεια των οποίων σωματίδια που εκπέμπονται από το ραδιενεργό ισότοπο ανάγουν το γαλάκτωμα πάνω από τις θέσεις των κυττάρων όπου εντοπίζεται το ισότοπο. Το γαλάκτωμα εμφανίζεται και στερεώνεται με την χρήση φωτογραφικών τεχνικών, καταλείποντας μικρά κοκκία αργύρου πάνω από τις αναχθείσες θέσεις του γαλακτώματος. Εν συνεχεία, το παρασκεύασμα σκεπάζεται με καλυπτρίδα και εξετάζεται με φωτομικροσκόπιο.

Αυτή η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για να παρακολουθηθεί το χρονοδιάγραμμα της ενσωμάτωσης της τριτωμένης προλίνης στην βασική μεμβράνη που εντοπίζεται υπό τα ενδοδερματικά κύτταρα του λεκιθικού ασκού. Χρησιμοποιήθηκε μια προσαρμογή της αυτορραδιογραφικής μεθόδου για την ηλεκτρονική μικροσκοπία, η οποία έδειξε ότι η τριτωμένη προλίνη πρωτοεμφανίζεται στην κυτοσόλη των ενδοδερματικών κυττάρων, εν συνεχεία μεταχωρεί στο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο, εν συνεχεία στην συσκευή του Golgi, κατόπιν μέσα σε κυστίδια και τελικώς στην εξωκυττάρια ουσία. Με αυτόν τον τρόπο ανεδείχθη οπτικώς η αλληλουχία των διεργασιών που συμβαίνουν κατά την παραγωγή του κολλαγόνου τύπου IV, της κύριας πρωτεΐνης της πυκνής στιβάδας του βασικού υμένα.

Εξέταση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Ακτίνες⁷ ηλεκτρονίων με μικρό μήκος κύματος κατευθύνονται από ηλεκτρομαγνητικά πεδία, που ενεργούν σαν “φακοί” με τέτοιο τρόπο ώστε η πορεία των ακτινών να μοιάζει με εκείνη του οπτικού μικροσκοπίου.

Ο πυκνωτής, ο αντικειμενικός και η προσοφθάλμιος παρουσιάζουν αντιστοιχία μεταξύ των δύο μικροσκοπιών. Η μικρή διεισδυτική ικανότητα των ακτίνων από ηλεκτρόνια μας αναγκάζει να χρησιμοποιούμε υψηλό κενό από όπου περνούν οι ακτίνες. Αν πρέπει οι ακτίνες να το διαπεράσουν, το παρασκεύασμα πρέπει να έχει κατά κανόνα πάχος μικρότερο από 0,1mm. Η διακριτική ικανότητα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου φτάνει τα 0,3-0,5mm και δίνει μέγιστη μεγέθυνση 1,5 εκατομμύρια φορές. Το πρώτο πλήρες ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κατασκευάστηκε το 1938 από τους Γερμανούς B.V Borries και E. Ruska.

Τάξεις μεγεθύνσεων

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο συμπληρώνει το κενό στην παρατήρηση, μεταξύ αφ' ενός της εικόνας του οπτικού μικροσκοπίου, η οποία δεν έχει καμία συσχέτιση με τη μοριακή δομή και αφ' ετέρου της μοριακής δομής που είναι προσιτή από τη χημεία. Τα μυϊκά ινίδια, τα χρωματοσώματα και οι κολλαγόνες ίνες είναι προϊόντα πολυμερισμού των οποίων τα επιμέρους μακρομόρια είναι ορατά με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Οι δομές εκείνες που υπερβαίνουν τις δυνατότητες του οπτικού μικροσκοπίου ονομάζονται υπομικροσκοπικοί σχηματισμοί.

Μονιμοποίηση

Η τεχνική μας υποχρεώνει κατά την ηλεκτρονική μικροσκόπηση με ακτίνες που διαπερνούν το παρασκεύασμα να χρησιμοποιούμε κατά κανόνα μόνο μονιμοποιημένο υλικό. Η μονιμοποίηση ενός ιστού μεταβάλλει την πραγματική του κατάσταση. Όσο ισχυρότερη είναι η μεγέθυνση, τόσο εντονότερα φαίνονται οι αλλοιώσεις που οφείλονται στη μονιμοποίηση. Έπρεπε λοιπόν η ηλεκτρονική μικροσκόπηση να τελειοποιήσει τις μεθόδους μονιμοποίησης ούτως ώστε, οι δομές του ζωντανού ιστού να αλλοιώνονται στον ελάχιστο δυνατό βαθμό (συνήθως εγχύεται στο ζωντανό όργανο με γλουταραλδεϋδη και ακολουθεί μονιμοποίηση με υδατικό διάλυμα τετροξειδίου του οσμίου).

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρέχει εικόνες με ισχυρότερη μεγέθυνση και μεγαλύτερη σαφήνεια. Οι μέθοδοι μονιμοποίησης όμως που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτρονική μικροσκόπηση ελάχιστα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην οπτική μικροσκόπηση επειδή η έντονη δικτύωση των δομικών στοιχείων (πρωτεϊνών, λιπιδίων) που προκαλούν επιτρέπει λίγες μόνο χημικές αντιδράσεις, δηλ. ενώσεις με χρωστικές ουσίες.

Χρώση

Η πυκνότητα των διαφόρων ουσιών απεικονίζεται με διαβαθμίσεις άσπρου – μαύρου. Η εναπόθεση μεταλλικών αλάτων ενισχύει τις αντιθέσεις, αποκλείεται όμως η αναγνώριση χρωμάτων.

Έτσι για παράδειγμα, ο σίδηρος ανιχνεύεται ως μόριο φερριτίνης, με το χλωριούχο βάριο μπορούν να γίνουν ορατές οι ελεύθερες θειϊκές ομάδες (ηπαρίνη στα σιτευτικά κύτταρα, θειϊκή χονδροϊτίνη), πολυάριθμα δε ένζυμα (π.χ. ΑΤΡαση, αλκαλική φωσφατάση, κυττοχρωμοξειδάση κ.α.), μπορούν να καταστούν ορατά μέσω

αντιδράσεων, των οποίων τα τελικά προϊόντα περιέχουν βαρέα μέταλλα. Επίσης είναι δυνατή η εφαρμογή της ανοσοκυτταροχημείας, αν συνδεθούν οι ενώσεις αντιγόνου – αντισώματος με ουσίες μη διαπερατές από τα ηλεκτρόνια.

Σαρωτικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Scanning). Η διαδικασία σάρωσης με ηλεκτρόνια αποτελεί ιδιαίτερη μέθοδο «φωτισμού» κατά την ηλεκτρονική μικροσκόπηση, κατά την οποία μία ακτίνα ηλεκτρονίων “σαρώνει” την επιφάνεια του παρασκευάσματος, η οποία έχει καλυφθεί με μέταλλο. Η μέθοδος αυτή έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα και παρέχει στερεοσκοπικές εικόνες υψηλής ευκρίνειας και μεγάλου βάθους πεδίου.

Κρυόθραυση

Η⁴ μεγαλομοριακή δομή των εσωτερικών όψεων των μεμβρανών αναδεικνύεται με τη μέθοδο της *κρυόθραυσης*. Τα ταχέως καταψυχόμενα παρασκευάσματα, τα οποία προηγουμένως έχουν υποστεί επεξεργασία με κρυοπροστατευτικά μέσα, δεν σχηματίζονται κρύσταλλοι ύδατος κατά την διεργασία καταψύξεως και, ως εκ τούτου, δεν υφίσταται μηχανικές αλλοιώσεις. Καθώς το υπέρψυχρο μαχαίρι προσκρούει στο κατεψυγμένο παρασκεύασμα, προκαλεί την σχάση του εν λόγω παρασκευάσματος κατά μήκος επιπέδων θραύσεως, που αποτελούν περιοχές ήσσονων μοριακής συνοχής. Τα κύτταρα, η θραύση συμβαίνει μεταξύ του έσω και του έξω πετάλου των μεμβρανών. Η επιφάνεια θραύσεως επιμεταλλώνεται υπό γωνίαν με εξαχνωμένο λευκόχρυσο και άνθρακα, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται συναθροίσεις λευκοχρύσου στην μια πλευρά κάθε προεξοχής αλλά καθόλου συναθροίσεως του στην αντίθετη πλευρά, δημιουργώντας εκμαγείο της επιφανείας. Στη συνέχεια, ο ιστός πέπτεται και διαλύεται, ενώ το εκμαγείο εξετάζεται με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τύπου διελεύσεως. Αυτή η μέθοδος καθιστά εμφανείς τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των κυτταρικών μεμβρανών.

ΚΥΤΤΑΡΟ

Η⁷ μικρότερη μορφολογική μονάδα που μπορεί να ζήσει ανεξάρτητα, είναι το κύτταρο, το οποίο απαντάται ως ανεξάρτητος οργανισμός στους μονοκύτταρους οργανισμούς. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, τα μετάζωα, τα κύτταρα σχηματίζουν μεγάλες ενότητες, τους **ιστούς**.

Το κύτταρο εκτός από τον πυρήνα περιέχει πολυάριθμους μικρότερους σχηματισμούς, τα κυτταρικά οργανίδια. Το κύτταρο έχει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζεται (επομένως μπορεί να εξελίσσεται με μεταλλάξεις), να ερεθίζεται (προσλαμβάνει και απαντάει σε ερεθίσματα), είναι δε υποχρεωμένο να διατηρεί τη δομή του με την βοήθεια του μεταβολισμού διαφόρων ουσιών, σύμφωνα με το 2^ο θερμοδυναμικό αξίωμα (νόμο της εντροπίας).

Λόγω του μεταβολισμού, το κύτταρο είναι πολύ εξαρτημένο από την ανταλλαγή ουσιών. Πρόκειται για ένα “ανοιχτό σύστημα” μια “δυναμική ισορροπία”. Το κύτταρο ακολουθεί την αρχή του κύκλου της αυτορρυθμιζόμενης ανάδρασης (Feed back). Υπάρχουν πολλά είδη κυττάρων, το καθένα δε έχει συγκεκριμένο σχήμα, διαφοροποίηση και προορισμό.

ΕΞΕΤΑΣΗ ΜΕ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

Παρατήρηση ζωντανού υλικού.

ΒΙΟΨΙΑ:

Η⁷ συνεκτικότητα των κυττάρων στη εξωτερική επιφάνεια του σώματος είναι τόσο στενή ώστε τα επιμέρους κύτταρα διακρίνονται *in situ* εξαιρετικώς δύσκολα. Ενώ στο ανέπαφο σώμα μπορούμε να παρατηρήσουμε ζωντανά κύτταρα μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις, π.χ. σε φλεγμονή του διαφανούς επιπεφυκότα και του κερατοειδούς του οφθαλμού οπότε αναπτύσσονται σε αυτούς αιμοφόρα αγγεία.

Από την επιφάνεια του σώματος αποκολλώνται κατά κανόνα κύτταρα ή ομάδες κυττάρων και αντικαθίστανται από καινούργια. Αντιθέτως, ιστοί του οποίους λαμβάνουμε από το εσωτερικό του σώματος διαπερνώντας την επιφάνεια (με μαχαίρι ή βελόνα), κατά τη βιοψία, περιέχουν ζωντανά κύτταρα. Οι ιστοί αυτοί μπορούν να εξεταστούν για διαγνωστικούς σκοπούς αφού μονιμοποιηθούν και χρωστούν, μπορούν όμως και να διατηρηθούν ζωντανοί. Με τη μέθοδο της καλλιέργειας ιστών, ομάδες κυττάρων μπορούν να διατηρηθούν ζωντανές και να παρατηρούνται επί μέρες ή και χρόνια.

Καλλιέργεια ιστών

Ένα μικρό τεμάχιο ιστού πάχους 1mm περίπου, μεταφέρεται υπό άσηπτες συνθήκες σε χώρο όπου υπάρχει στερεό υπόστρωμα (π.χ. ινώδες), επάνω στο οποίο τα κύτταρα μπορούν να στηριχθούν και να κινηθούν. Το θρεπτικό υγρό που τοποθετείται πάνω από το υπόστρωμα και τον ιστό, πρέπει να περιέχει όλες τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες, βιταμίνες και ορμόνες (εικ. 4α).

Το θρεπτικό υγρό επίσης προσλαμβάνει τα προϊόντα της αποδόμησης των κυττάρων και ανανεώνεται τακτικά (με συνεχή ροή ή κάθε 2 περίπου ημέρες). Επίσης πρέπει να ληφθεί μέριμνα για την ανταλλαγή των αερίων. Στην παρυφή μιας τέτοιας καλλιέργειας είναι προσπελάσιμα με μονωμένα κύτταρα των οποίων μπορούμε να παρακολουθούμε τις εκδηλώσεις της ζωής και στα οποία μπορούμε να πραγματοποιήσουμε πειράματα. Οι εκδηλώσεις ζωής στην ιστοκαλλιέργεια δεν καθίστανται αντιληπτές κατά την παρατήρηση με γυμνό μάτι. Κατά την αργή φωτογράφιση διαπιστώνονται ζωικές εκδηλώσεις, που συνδέονται με κινήσεις των κυττάρων.

Οι ενδοκυτταρικές κινήσεις επιτελούνται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου όπως π.χ. τα ραβδοειδή, μήκους 1,2 μm, μιτοχόνδρια εμφανίζουν δικές τους οφιοειδείς κινήσεις. Άλλες μετακινήσεις του κυττάρου είναι οι αμοιβαδοειδείς κινήσεις που συνδέονται με την προβολή ψευδοποδίων (προβολές της κυτταρικής μεμβράνης). Όλα τα κύτταρα έχουν αυτή τη δυνατότητα μετακίνησης, αυτή είναι όμως πιο έκδηλη στα εμβρυϊκά κύτταρα και σε μερικά κύτταρα διαφοροποιημένων ιστών (κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα του αίματος, ιστιοκύτταρα του συνδετικού ιστού).

Κυτταρόπλασμα

Τα κύτταρα αποτελούν τις βασικές μονάδες των συνθέτων οργανισμών. Παρόμοια ή σχετιζόμενα μεταξύ των κύτταρα, που λειτουργούν κατά συγκεκριμένο τρόπο ή εξυπηρετούν κοινό σκοπό, συναθροίζονται σχηματίζοντας **ιστούς** (tissues). Οι τέσσερις βασικοί ιστοί (ο επιθηλιακός, ο συνδετικός, ο μυϊκός και ο νευρικός ιστός) που αποτελούν το σώμα διαπλέκονται σχηματίζοντας **όργανα**, τα οποία με τη σειρά τους σχηματίζουν **οργανικά συστήματα**. Η αποστολή κάθε οργανικού συστήματος είναι ειδική ως προς το ό,τι επιτελεί μια σειρά σχετιζομένων μεταξύ τους λειτουργιών, όπως η πέψη, η αναπαραγωγή ή η αναπνοή.

Αν και το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από άνω των 200 διαφορετικών τύπων κυττάρων, καθένας εκ των οποίων επιτελεί διαφορετική λειτουργία, όλα τα κύτταρα διαθέτουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά, και ως εκ τούτου μπορούν να περιγραφούν υπό γενικούς όρους. Κάθε κύτταρο περιβάλλεται από διπλολιπιδική κυτταρική μεμβράνη, διαθέτει οργανίδια που του επιτρέπουν να επιτελεί τις λειτουργίες του, συνθέτει μεγαλομοριακές ουσίες για τις δικές του ανάγκες ή προοριζόμενες για έκκριση, παράγει ενέργεια και είναι ικανό να επικοινωνεί με άλλα κύτταρα.

Το **πρωτόπλασμα**, η ζώσα ουσία του κυττάρου, διακρίνεται σε δύο επιμέρους στοιχεία: το **κυτταρόπλασμα**, που εκτείνεται από την κυτταρική μεμβράνη έως το πυρηνικό περίβλημα, και το **καρυόπλασμα** ή **πυρηνόπλασμα**, την ουσία που αποτελεί το περιεχόμενο του πυρήνα.

Μέγα μέρος του κυτταροπλάσματος αποτελείται από νερό (water), στο οποίο βρίσκονται διαλυμένες ή εναιωρούνται ποικίλες ανόργανες και οργανικές ουσίες. Το εν λόγω ρευστό στοιχείο του κυττάρου χαρακτηρίζεται ως **κυτοσόλη**. Η κυτοσόλη περιέχει **οργανίδια**, μεταβολικώς ενεργές δομές που επιτελούν συγκεκριμένες

λειτουργίες. Επιπροσθέτως, το σχήμα των κυττάρων, η ικανότητά τους να κινούνται, καθώς και οι ενδοκυττάρια οδοί, διατηρούνται από ένα σύστημα σωληνίσκων και νηματίων γνωστό ως **κυτταροσκελετός** (cytoskeleton).

Τέλος, τα κύτταρα περιέχουν επίσης **έγκλειστα** (inclusions), τα οποία αποτελούνται από υποπροϊόντα του μεταβολισμού, εναποθηκευμένες μορφές ποικίλων θρεπτικών ουσιών ή αδρανείς κρυστάλλους και χρωστικές ουσίες.

Οργανίδια

Τα οργανίδια είναι μεταβολικώς ενεργές κυτταρικές δομές, οι οποίες επιτελούν ειδικές λειτουργίες.

Κυτταρική μεμβράνη

Η κυτταρική μεμβράνη σχηματίζει έναν επιλεκτικό φραγμό μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του εξωτερικού περιβάλλοντος.

Μοριακή σύσταση

Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από μονή φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα και συνδεδεμένες με αυτήν ένθετες και περιφερικές πρωτεΐνες.

Γλυκοκάλυκας

Ο γλυκοκάλυκας, συνήθως αποτελούμενος από υδατανθρακικές αλύσεις, καλύπτει την επιφάνεια του κυττάρου.

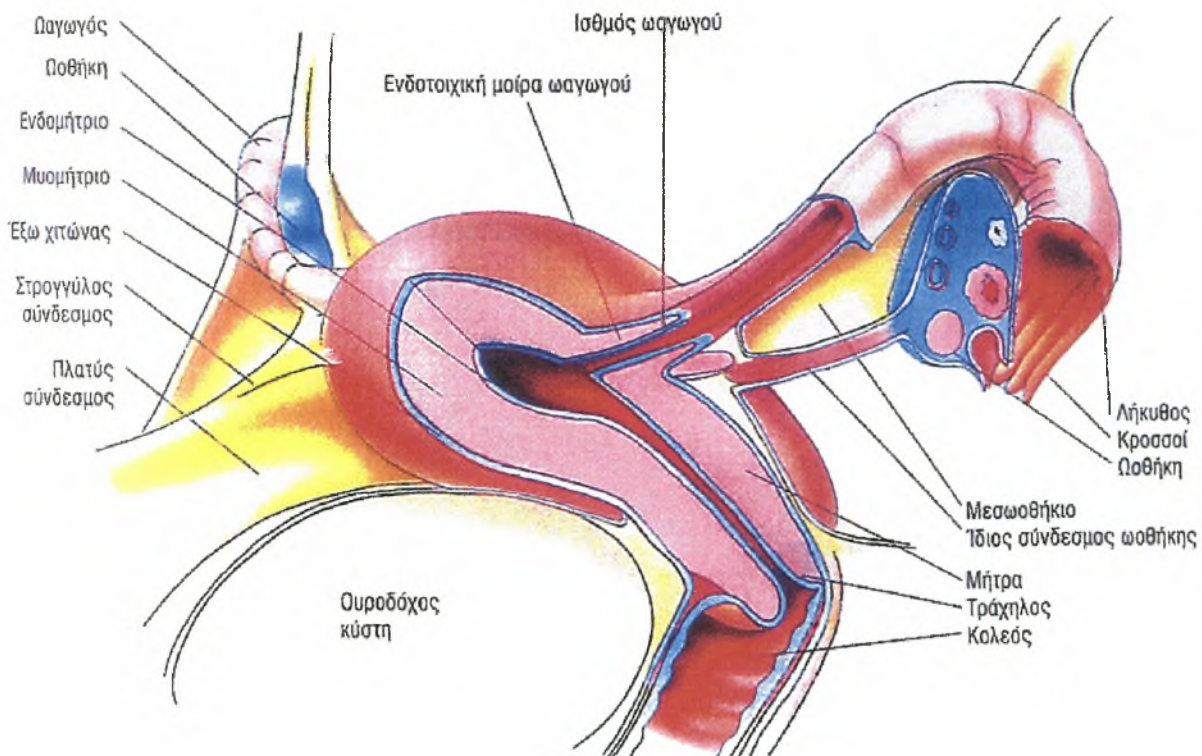
Μεμβρανικές πρωτεΐνες

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς διευκολύνει την διέλευση των υδατοδιαλυτών ουσιών και των ιόντων μέσω της κυτταρικής μεμβράνης.

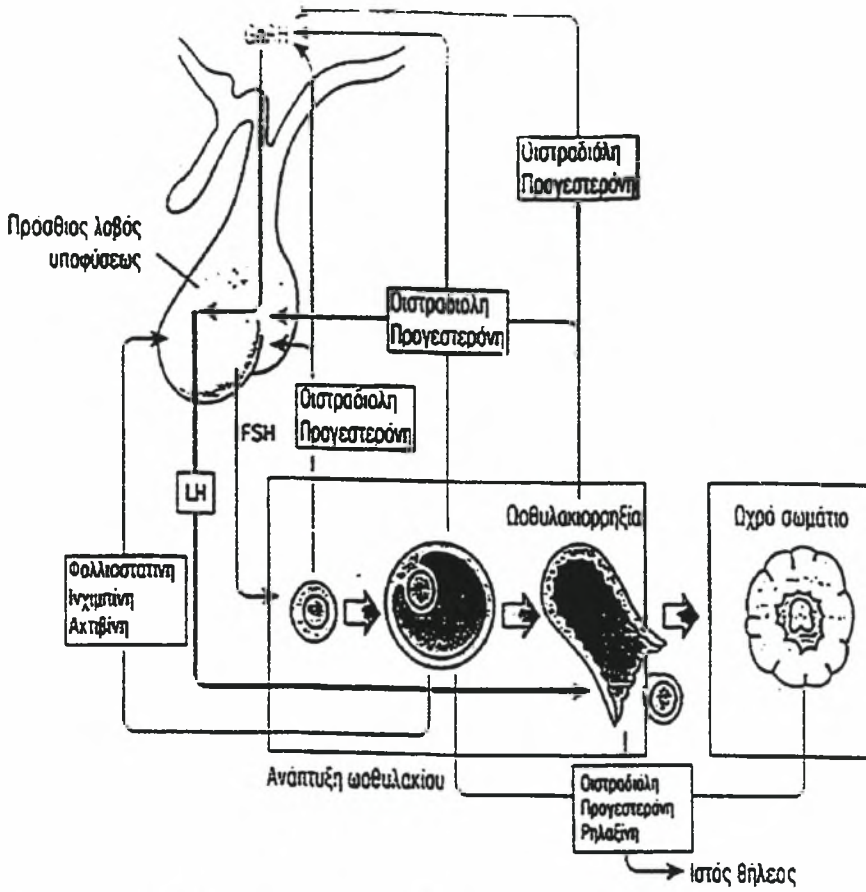
ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΘΗΛΕΟΣ

Το⁴ γεννητικό σύστημα του θήλεος αποτελείται από τα έσω γεννητικά όργανα (τις διφυείς ωοθήκες, τις διφυείς σάλπιγγες, την μήτρα και τον κολεό) και τα έξω γεννητικά όργανα (την κλειτορίδα, τα μεγάλα χείλη και τα μικρά χείλη του αιδοίου).

Τα αναπαραγωγικά όργανα είναι ατελώς ανεπτυγμένα και παραμένουν σε κατάσταση αδρανείας μέχρις ότου **γοναδοτρόπες ορμόνες** εκκρινόμενες από την υπόφυση σηματοδοτήσουν την έναρξη της ήβης. Μετά από αυτό το γεγονός επιτελούνται πολλές μεταβολές σε ολόκληρο το γεννητικό σύστημα, περιλαμβανομένης της περαιτέρω διαφοροποίησης των αναπαραγωγικών οργάνων που οδηγεί στην **εμμηνарχή**, επαναλαμβάνεται κάθε μήνα (28 ημέρες) καθ' όλα τα αναπαραγωγικά χρόνια, εκτός εάν διακοπεί από κύηση. Καθώς η γυναίκα προσεγγίζει το πέρας της αναπαραγωγικής ηλικίας, οι εμμηνορρυσιακοί κύκλοι της καθίστανται ακανόνιστοι καθώς αρχίζουν να μεταβάλλονται τα ορμονικά και τα νευρικά σήματα, με αποτέλεσμα την έναρξη της **εμμηνόπαυσης** (menopause). Επομένως, το αναπαραγωγικό σύστημα του θήλεος τελεί υπό την συντονισμένη επίδραση ορμονικών, νευρικών και ψυχικών παραγόντων.



Εικόνα 4 Σχηματική απεικόνιση γεννητικού συστήματος θήλεος.



Εικόνα 5

Σχηματική απεικόνιση των ορμονικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του υποθαλαμοϋποφυσιακού άξονα και του γεννητικού συστήματος του θήλαος. FSH, θυλακιοτρόπος ορμόνη, GnRH, ορμόνη ειλίνουσα γοναδοτροπίνες, LH, ωχρινικοποιητική ορμόνη.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2 Κύριες ορμόνες επιδρώσες στο γεννητικό σύστημα του θήλεος

ΟΡΜΟΝΗ	ΠΗΓΗ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
Εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπικών	Υποθάλαμος	Προάγει την έκκριση FSH και LH από την αδenoυπόφυση
Παράγων αναστολής της προλακτίνης	Υποθάλαμος	Αναστέλλει την έκκριση προλακτίνης από τα οξείφιλα κύτταρα της αδenoυπόφυσης
Θυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH)	Βασεόφιλα κύτταρα αδenoυπόφυσεως	Προάγει την έκκριση οιστρογόνων και την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (από τα δευτερογενή ωοθυλάκια και πέραν)
Ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH)	Βασεόφιλα κύτταρα αδenoυπόφυσεως	Προάγει το σχηματισμό οιστρογόνων και προγεστερόνης. Προάγει την ωοθυλακιορρηξία και τον σχηματισμό του ωχρού σωματίου
Οιστρογόνα	Κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης, κοκκιώδη-ωχρινικά κύτταρα του ωχρού σωματίου, καθώς και ο πλακούντας	Αναστέλλουν την έκκριση της FSH και της LHRH. Εκλύουν κύμα LH. Προαλούν πολλαπλασιασμό και νεοπλασία του μωμφριού. Προαλούν ανάπτυξη των φυλετικών χαρακτηριστικών του θήλεος, περιλαμβανομένων των μαστών και του λιπώδους ιστού του σώματος
Προγεστερόνη	Κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης, θηλακό-ωχρινικά και κοκκιώδη-ωχρινικά κύτταρα του ωχρού σωματίου. Επίσης ο πλακούντας	Αναστέλλει την έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο και της LH από τα βασεόφιλα κύτταρα της αδenoυπόφυσης. Προκαλεί την ανάπτυξη του ενδομητρίου και ρυθμίζει την ιξώδη σύσταση της βλέννας που παράγεται από τα αδένια του τραχήλου της μήτρας. Προκαλεί την ανάπτυξη των φυλετικών χαρακτηριστικών του θήλεος, περιλαμβανομένων των μαστών
Ινχμίνη	Κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης και κοκκιώδη-ωχρινικά κύτταρα του ωχρού σωματίου	Αναστέλλει την έκκριση FSH από τα βασεόφιλα κύτταρα της αδenoυπόφυσεως
Ακτιβίνη	Ωοκύτταρο	Προάγει τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων
Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG)	Πλακούντας	Συμβάλλει στην διατήρηση του ωχρού σωματίου. Προάγει την έκκριση προγεστερόνης
Ανθρώπινο πλακουντακό γαλακτογόνο	Πλακούντας	Προάγει την ανάπτυξη των μαστικών αδένων κατά την διάρκεια της κύησης. Προάγει την γαλακτογένεση
Ρηλαξίνη	Πλακούντας	Διευκολύνει τον τοκετό καθιστώντας μαλακό τον ενώδη χονδρικό ιστό της ηβικής συμπίσεως. Καθιστά μαλακό τον τράχηλο της μήτρας και διευκολύνει την διαστολή του κατά την προετοιμασία του για τον τοκετό
Ωντοκίνη	Υποθάλαμος μέσω της νευροϋποφυσεως	Διεγείρει τη συστολή του λείου μυϊκού ιστού της μήτρας κατά την διάρκεια του οργασμού και του τοκετού. Διεγείρει την συστολή των μυοεπιθηλιακών κυττάρων του μαστικού αδένος συμβάλλοντας στην εκροή του γάλακτος

ΚΟΛΠΟΣ

Ο⁹ κόλπος εκτείνεται από το αιδοίο έως τον τράχηλο. Το κοιλιακό του τοίχωμα έχει μήκος 8 εκ. ενώ το οπίσθιο τοίχωμα 11 εκ. Το τοίχωμα του κόλπου στερείται αδένων και αποτελείται από τρεις στιβάδες, τη βλεννογόνια, τη μυϊκή και την ινώδη στιβάδα. Το επιθήλιο της βλεννογονίας στιβάδας είναι πολύστιβο πλακώδες και έχει πάχος 150-200μm. Το χόριο του κοιλιακού βλεννογόνου αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό πλούσιο σε ελαστικές ίνες. Μεταξύ των κυττάρων παρατηρείται μεγάλος αριθμός λεμφοκυττάρων και πολυμορφοπυρήνων. Η μυϊκή στιβάδα αποτελείται από επιμήκεις δεσμίδες λείων μυϊκών ινών. Εξωτερικά, ο κόλπος καλύπτεται από χιτώνα πυκνού συνδετικού ιστού πλούσιο σε ελαστικές ίνες στον οποίο και οφείλεται η ελαστικότητά του.

ΤΡΑΧΗΛΟΣ

Ο⁹ τράχηλος (cervix) αποτελεί το κατώτερο τμήμα της μήτρας που προβάλλει εντός του κολεού. Ο αυλός του τραχήλου επενδύεται από βλεννοεκκριτικό μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο. Όμως, η εξωτερική επιφάνειά του, όπου ο τράχηλος προβάλλει μέσα στον κολεό, καλύπτεται από πολύστιβο πλακώδες μη κερατινοποιημένο επιθήλιο, όμοιο με εκείνο του κολεού. Το τοίχωμα του τραχήλου αποτελείται κατεξοχήν από πυκνό, κολλαγόνο συνδετικό ιστό, ο οποίος περιέχει όμως ελαστικές ίνες και μόνο λίγα λεία μυϊκά κύτταρα. Ο βλεννογόνος του τραχήλου περιέχει διακλαδιζόμενους τραχηλικούς αδένες. Αν και ο βλεννογόνος του τραχήλου παρουσιάζει μεταβολές κατά την διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου, δεν αποπίπτει κατά την εμμηνορρυσία.

Στο μέσον του εμμηνορρυσιακού κύκλου, περί τον χρόνο ωοθυλακιορρηξίας, οι τραχηλικοί αδένες εκκρίνουν ορώδες υγρό που διευκολύνει την είσοδο των σπερματοζωαρίων στην μήτρα. Σε άλλες όμως χρονικές περιόδους, καθώς και κατά την διάρκεια όμως κύησης, οι εκκρίσεις των τραχηλικών αδένων καθίστανται περισσότερο ιξώδεις, σχηματίζοντας βύσμα ημιστερεής βλέννας στο στόμιο του τραχήλου, μη επιτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο την είσοδο του σπέρματος και μικροοργανισμών στην μήτρα. Οι μεταβολές του ιξώδους των εκκρίσεων των τραχηλικών αδενίων ρυθμίζονται από την ορμόνη προγεστερόνη.

Κατά τον τοκετό, μια άλλη ωχρινική ορμόνη, η ρηλαξίνη προκαλεί λύση του κολλαγόνου τα τοιχώματα του τραχήλου. Η εν λόγω λύση καθιστά τον τράχηλο μαλακό, γεγονός που διευκολύνει την διαστολή του.

Το καρκίνωμα του τραχήλου αποτελεί έναν εκ των πλέον συνήθων τύπων καρκίνου στις γυναίκες, αν και είναι σπάνιος στις παρθένες και στις άτεκνες γυναίκες. Η συχνότητά του αυξάνει στις γυναίκες με πολλαπλούς ερωτικούς συντρόφους και με ερπητικές λοιμώξεις. Αναπτύσσεται από το πολύστιβο πλακώδες μη κερατινοποιημένο επιθήλιο του τραχήλου, όπου αποκαλείται ενδεπιθηλιακό καρκίνωμα. Εάν το καρκίνωμα ανιχνευτεί σε αυτό το στάδιο με το Τεστ Παπανικολάου είναι συνήθως δυνατόν να θεραπευθεί επιτυχώς με χειρουργική επέμβαση. Αν όμως δεν ανιχνευθεί νωρίς μπορεί να επεκταθεί και να χορηγήσει μεταστάσεις, μετατρέπόμενο κατ' αυτόν τον τρόπο σε διηθητικό καρκίνωμα, το οποίο έχει δυσμενή πρόγνωση.

Η ΕΙΚΟΝΑ ΤΩΝ ΚΟΛΠΙΚΩΝ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΝΕΟΓΕΝΝΗΤΟ ΕΩΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ

Νεογνόν

Τις πρώτες ημέρες της ζωής ενός νεογέννητου κοριτσιού, το επιθήλιο του κόλπου παρουσιάζει την ίδια δομή με εκείνη που παρουσίαζε το επιθήλιο της μητέρας στο τέλος της εγκυμοσύνης. Στο επίχρισμα, με την γέννηση, επικρατούν τα επιπολής κύτταρα, ενώ, αμέσως αρχίζουν να αντικαθίστανται από διάμεσα κύτταρα, που στο κυτταρόπλασμά τους, περιέχουν γλυκογόνο, λόγω παραμονής της επιδράσεως των μητρικών ορμονών στο αίμα του νεογέννητου. Βακτηρίδια και λευκοκύτταρα απουσιάζουν από το επίχρισμα. Μετά την πρώτη εβδομάδα της ζωής, εμφανίζονται λίγα κύτταρα.

Παιδική ηλικία

Από την 3^η εβδομάδα της ζωής, έως την εφηβεία, στο επίχρισμα παρατηρούνται μόνο παραβασικά κύτταρα. Η εικόνα αυτή μεταβάλλεται 2-3 εβδομάδες πριν από την έναρξη της εφηβείας.

Αναπαραγωγική ηλικία

Ο βαθμός ωριμάνσεως του πλακώδους επιθηλίου του γεννητικού συστήματος του θήλεος είναι ορμονοεξαρτώμενος και γι' αυτό χρησιμεύει ως δείκτης της ορμονικής καταστάσεως της γυναίκας. Για τον προσδιορισμό της ορμονικής καταστάσεως της γυναίκας, τα επιχρίσματα λαμβάνονται από το άνω έξω τριτημόριο του πλαγίου τοιχώματος του κόλπου. Κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας στα κολπικά επιχρίσματα, επικρατούν τα επιπολής και τα μεγάλα διάμεσα κύτταρα. Τα παραβασικά κύτταρα απουσιάζουν τελείως, ενώ τα μικρά διάμεσα παρουσιάζονται κατά μικρούς αριθμούς σε συγκεκριμένες φάσεις του κύκλου.

Η κυτταρολογική εικόνα στις διάφορες φάσεις του κύκλου είναι η εξής: **Κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρύσεως** (5 πρώτες ημέρες του κύκλου), στο επίχρισμα παρατηρούνται ερυθροκύτταρα, ενδομητρικά κύτταρα είτε μεμονωμένα είτε σε ομάδες πολυμορφοπύρηννα λευκοκύτταρα, πλακώδη κύτταρα. Την 4^η-5^η ημέρα προστίθεται η παρουσία βλέννας και ιστιοκυττάρων με φαγοκυτταρικές ιδιότητες.

Στην **παραγωγική φάση** (6^η-14^η ημέρα του κύκλου) αρχίζει η σταδιακή εξαφάνιση των ερυθροκυττάρων την 6^η και 7^η ημέρα του κύκλου. Οι σωροί των ενδομητρικών κυττάρων ελαττώνονται σταδιακά, ενώ αυξάνεται αριθμός των διαμέσων κυττάρων, που στη συνέχεια αντικαθίστανται από ώριμα επιπολής κύτταρα. Τα τελευταία επικρατούν κατά την **περίοδο της ωοθυλακιορρηξίας** μεταξύ 11^{ης}-14^{ης} ημέρας του κύκλου, οπότε παρατηρείται ελάττωση του αριθμού των λευκοκυττάρων και της ποσότητας της βλέννας, ενώ το υπόστρωμα του επιχρίσματος είναι καθαρό.

Στην **εκκριτική φάση** (14^η ημέρα έως την νέα έμμηνο ρύση), αρχίζει η έκκριση της προγεστερόνης από το ωχρό σωματίο. Την περίοδο αυτή, επικρατούν τα διάμεσα κύτταρα. Ο αριθμός των κολποβακτηριδίων αυξάνει την 24^η ημέρα του κύκλου και μέχρι την νέα έμμηνο ρύση, επικρατούν τα διάμεσα κύτταρα, το υπόστρωμα του επιχρίσματος δεν είναι καθαρό και εμφανίζονται πολυμορφοπύρηννα, ιστιοκύτταρα, βλέννα και γυμνοί πυρήνες.

Ο καθορισμός της φάσεως του κύκλου δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί με την λήψη ενός μόνο επιχρίσματος. Για το σκοπό αυτό, επιχρίσματα πρέπει να λαμβάνονται καθημερινά καθ' όλη τη διάρκειά του κύκλου και επί δύο ή περισσότερους διαδοχικούς κύκλους.

Ο ορμονικός προσδιορισμός είναι αδύνατος, όταν υπάρχει φλεγμονή. Η ερμηνεία της ορμονικής καταστάσεως του θήλεος, στην κυτταρολογία, γίνεται με τη βοήθεια ορισμένων δεικτών.

Δείκτης ωριμάνσεως. Εκφράζει την εκατοστιαία αναλογία των παραβασικών, διαμέσων και επιπολής κυττάρων του κολπικού επιθηλίου. Για παράδειγμα, δείκτης 0/10/90 σημαίνει, ότι στο επίχρισμα το ποσοστό των παραβασικών κυττάρων ήταν 0%, των διαμέσων κυττάρων 10% και των επιπολής κυττάρων 90%. Επομένως, παρατηρείται στροφή του δείκτη προς τα δεξιά και ένδειξη οιστρογονικής δράσεως. Όταν υπερτερούν τα παραβασικά κύτταρα, ο δείκτης στρέφεται προς τ' αριστερά και επομένως, υπάρχει έλλειψη οιστρογονικής δράσεως, ενώ όταν υπερισχύουν τα κύτταρα της διαμέσου στιβάδος ο δείκτης στρέφεται προς το μέσον και αυτό οφείλεται στην επίδραση της προγεστερόνης.

Εμμηνόπαυση

Το πλακώδες επιθήλιο γίνεται ατροφικό, μετά την εμμηνόπαυση. Παρατηρείται, δηλαδή λέπτυνση του επιθηλίου, ενώ η πολυστιβάδωση και η γλυκογένεση, σταδιακά υποχωρούν, ούτως ώστε το Scheeler's test καθίσταται είναι θετικό (αρνητικό στο ιώδιο), αν και απουσιάζει οποιαδήποτε επιθηλιακή ανωμαλία.

Στην **αρχή της εμμηνοπαύσεως** στο επίχρισμα επικρατούν τα διάμεσα κύτταρα το οποία βρίσκονται μεμονωμένα ή σε μικρές ομάδες. Τα κύτταρα, αρχικώς περιέχουν γλυκογόνο, ενώ το υπόστρωμα είναι πλούσιο σε κολποβακτηρίδια και γυμνούς πυρήνες (κυτταρόλυση).

Στην **προχωρημένη εμμηνόπαυση** τα επιπολής κύτταρα εξαφανίζονται και επικρατούν τα διάμεσα μικρά κύτταρα μαζί με μεμονωμένα παραβασικά κύτταρα. Στο επίχρισμα παρατηρούνται μόνο παραβασικά και βασικά κύτταρα, οπότε χαρακτηρίζεται «ατροφικό».

Αμηνόρροια, από βλάβη του ενδομητρίου, παρατηρείται σε καταστροφή του ενδομητρίου λόγω τραυματικής βλάβης, σε φυματίωση ή φλεγμονή του ενδομητρίου και στην αδενοκυστική υπερπλασία του ενδομητρίου που παρατηρείται στους κύκλους χωρίς ωοθυλακιορρηξία.

Τέλος, οι χρόνιες λοιμώξεις, οι γενικευμένες νεοπλασματικές εξεργασίες, οι ψυχώσεις, οι κακοήθειες παθήσεις του αίματος, ο υποθυρεοειδισμός, το σύνδρομο Cushing και η αστιτία μπορεί να οδηγήσουν σε διακοπή της εμμήνου ρύσεως. Οι αιτίες της δευτεροπαθούς αμηνόρροιας είναι δύσκολο να προσδιορισθούν με την

εκτίμηση των κολπικών επιχρισμάτων. Σε λίγες περιπτώσεις παρατηρούνται επιχρίσματα με υψηλή ωρίμανση ή ατροφικά.

Ατροφικού τύπου επιχρίσματα παρατηρούνται σε περιπτώσεις νόσου της υποφύσεως, όπως π.χ. οι βαρειά ιδιοπαθής υποφυσιακή ανεπάρκεια, όγκοι της υποφύσεως ή νεκρώσεις του οργάνου μετά από τον εργώδη τοκετό (Σύνδρομο Sheehan). Επίσης σε διαταραχές του υποθαλάμου, λειτουργικές ή ψυχογενείς, στο σύνδρομο Chiari Frommel και τέλος σε αμηνόρροιες που οφείλονται σε ωοθηκικά αίτια. Επιχρίσματα μέσης ωριμάνσεως, σχετίζονται με ψυχικές διαταραχές – έντονη καταπόνηση, ενδοκρινολογικές διαταραχές, όπως υπέρ και υποθυρεοειδισμό και σακχαρώδη διαβήτη. Επίσης, η διακοπή των αντισυλληπτικών δισκίων μπορεί να οδηγήσει σε αμηνόρροια.

Φυσιολογικά επιχρίσματα, επί δευτεροπαθούς αμηνόρροιας, μπορεί να παρατηρηθούν σε περιπτώσεις ατρησίας της μητρικής κοιλότητας ή του τραχηλικού σωλήνα λόγω φλεγμονής, τραυματισμού κατά τον τοκετό, αποξέσεων ή κωνοειδών εκτομών. Σε δευτεροπαθείς αμηνόρροιες, τέλος, είναι δυνατόν να παρατηρηθούν επιχρίσματα, με υψηλή ωρίμανση σε περιπτώσεις παραμονής κυστικών ωοθυλακίων και σε σπάνιους ορμονοπαραγωγούς όγκους της ωοθήκης.

Η κυτταρολογική εξέταση κατά Παπανικολάου

Το **τεστ Παπανικολάου** αποτελεί διαγνωστική μέθοδο ανιχνεύσεως του καρκίνου του τραχήλου. Επιτελείται με αναρρόφηση τραχηλικού υγρού από τον κολεό ή με λήψη επιχρισμάτων κατευθείαν από τον τράχηλο. Το λαμβανόμενο υλικό επιχρίεται σε αντικειμενοφόρες πλάκες, βάφεται και εξετάζεται για μεταβολές του κυτταρικού πληθυσμού, προκειμένου να ανιχνευθεί αναπλασία, δυσπλασία ή καρκίνωμα.

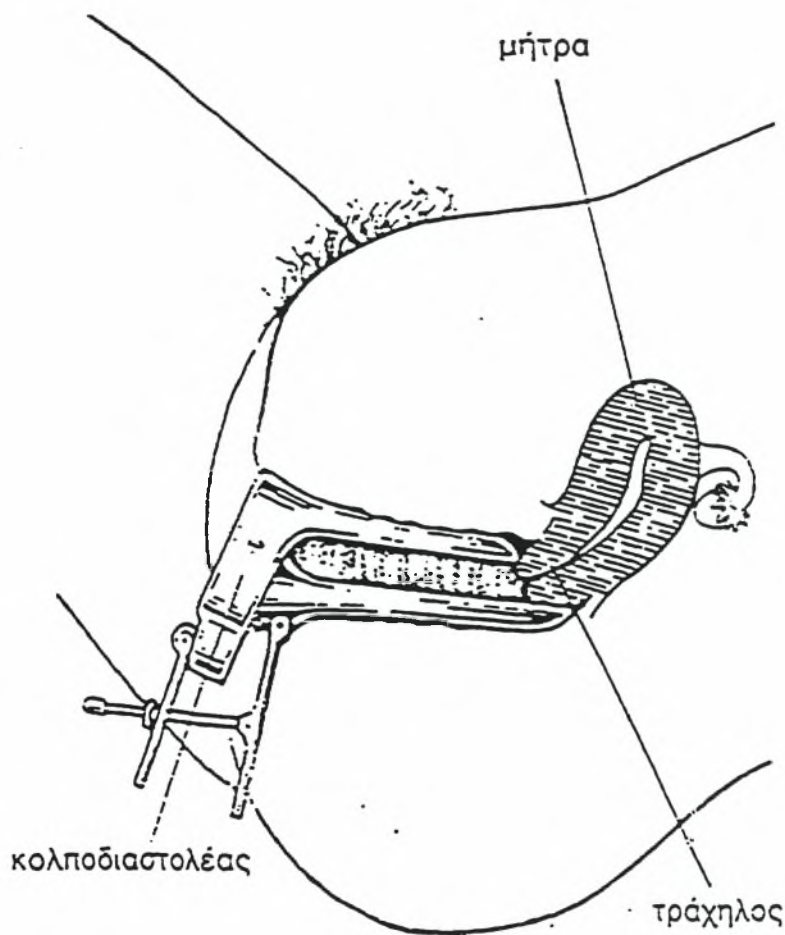
ΜΕΘΟΔΟΙ ΛΗΨΕΩΣ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΩΝ

Αρκετοί⁹ μέθοδοι έχουν περιγραφεί για την συλλογή υλικού από τον κόλπο και τον τράχηλο, κάθε μια από τις οποίες έχει τα πλεονεκτήματά της και τους περιορισμούς της. Πριν από τη λήψη του κυτταρολογικού υλικού τοποθετούνται βάλβες ή μητροσκόπιο. Η λήψη του κολπικού επιχρίσματος γίνεται από το άνω τριτημόριο του πλαγίου τοιχώματος του κόλπου με τη βοήθεια βαμβακοφόρου στυλεού ή σπάτουλας Ayte. Με το επίχρισμα αυτό μελετώνται, η ορμονική κατάσταση της γυναίκας, η χλωρίδα του κόλπου, φλεγμονώδεις αλλοιώσεις και κακοήθειες εξεργασίες. Από τον

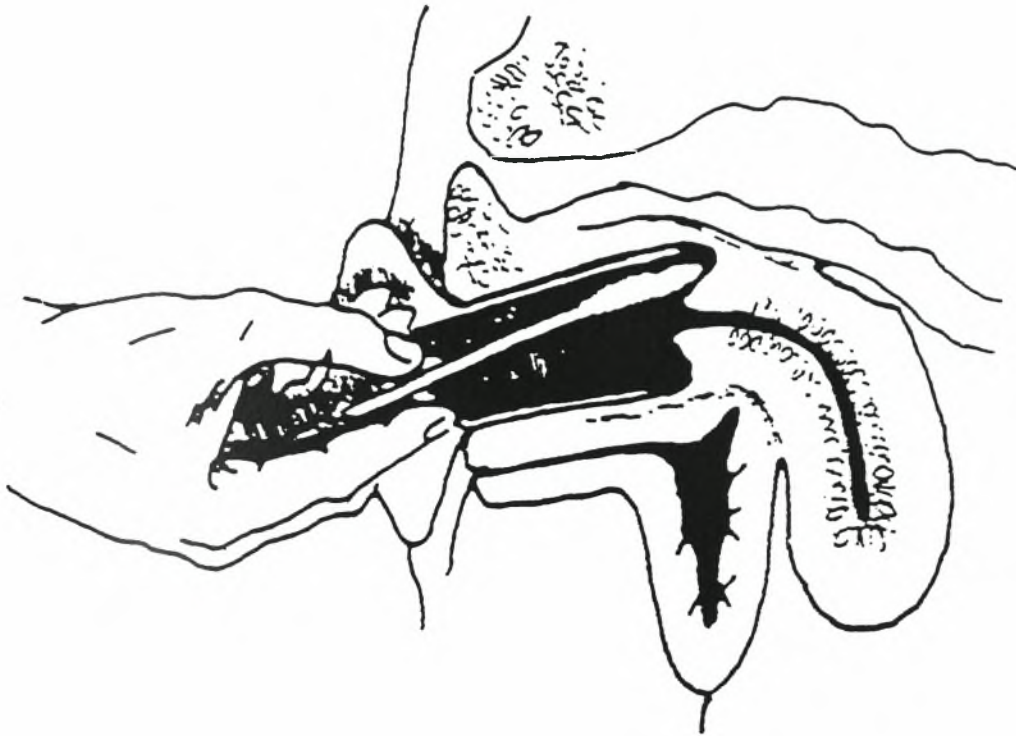
οπίσθιο κοιλιακό θόλο, όπου συσσωρεύονται στοιχεία απ' όλο το γεννητικό σύστημα της γυναίκας (τράχηλο, μήτρα, σάλπιγγες, ωθήκες) λαμβάνονται επιχρίσματα με βαμβακοφόρο στυλεό, με σπάτουλα Ayte ή με αναρρόφηση με πιπέττα, κυρίως, σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες ή σε γυναίκες που περιλαμβάνονται σε προγράμματα μαζικού ελέγχου του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Από τον εξωτράχηλο η λήψη του υλικού γίνεται με βαμβακοφόρο στυλεό, με σπάτουλα Ayte ή κατόπιν αναρρόφησης με πιπέττα. Από τον ενδοτράχηλο, το υλικό συλλέγεται με βαμβακοφόρο στυλεό, με τη μέθοδο της αναρρόφησης, με ψήκτρα καθώς και με ειδικούς δειγματολήπτες.

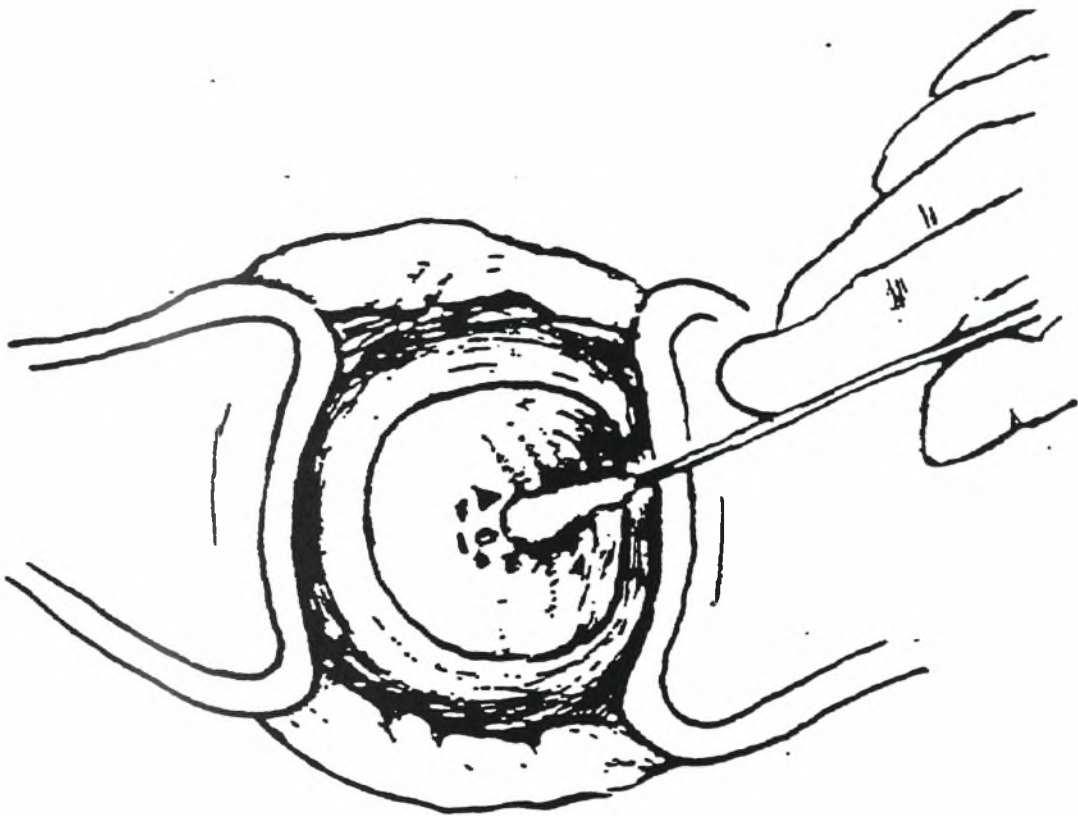
Το κυτταρικό υλικό, στη συνέχεια επιστρώνεται σε αντικειμενοφόρες πλάκες, σε λεπτή στρώση, στο αριστερό άκρο των οποίων έχει προηγουμένως χαραχθεί το όνομα της ασθενούς. Η μονιμοποίηση του επιστρωμένου υλικού γίνεται σε οινόπνευμα 96° επί 30'. Μια άλλη ικανοποιητική μέθοδος μονιμοποίησης του επιχρίσματος είναι με αεροβόλημα (spray). Για τη χρώση των επιχρισμάτων χρησιμοποιείται η χρώση κατά Παπανικολάου.



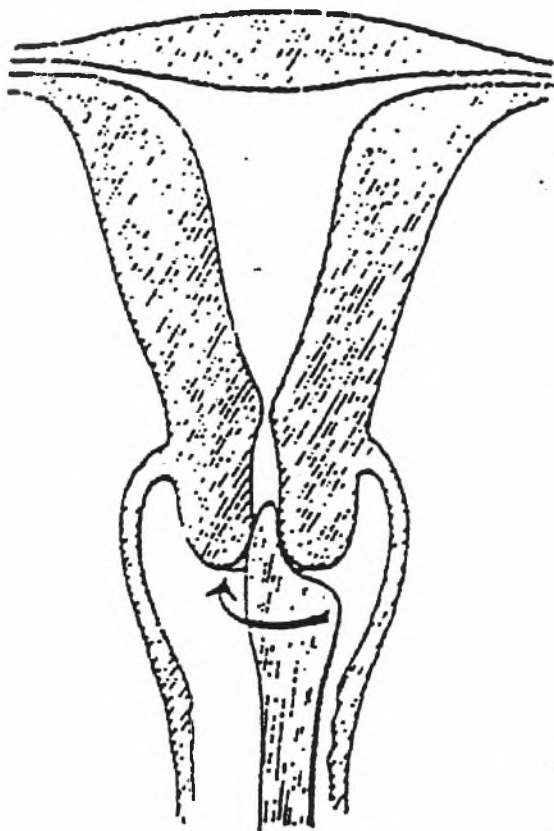
Εικόνα 6. Τοποθέτηση στον κόλπο πλαστικού κολποδιαστολέα μιας χρήσεως.



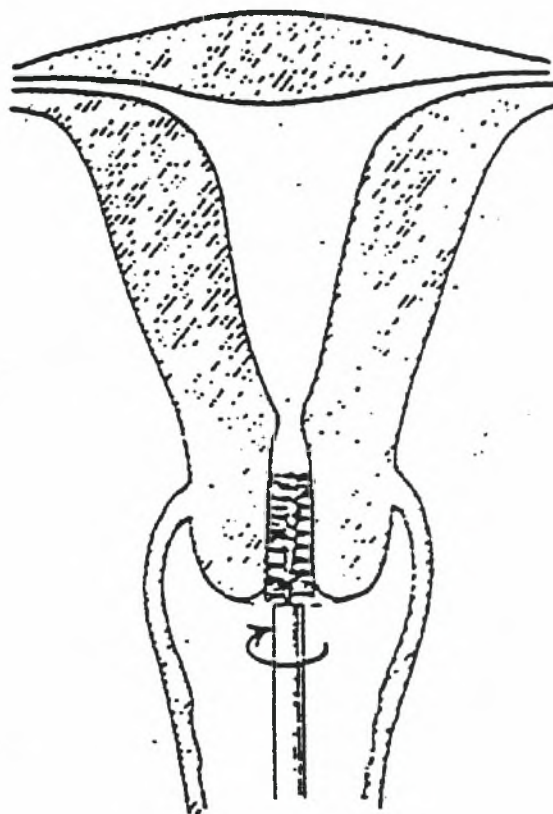
Εικόνα 7. Λήψη υλικού με βαμβακοφόρο στυλεό απ' τον οπίσθιο κολπικό θόλο



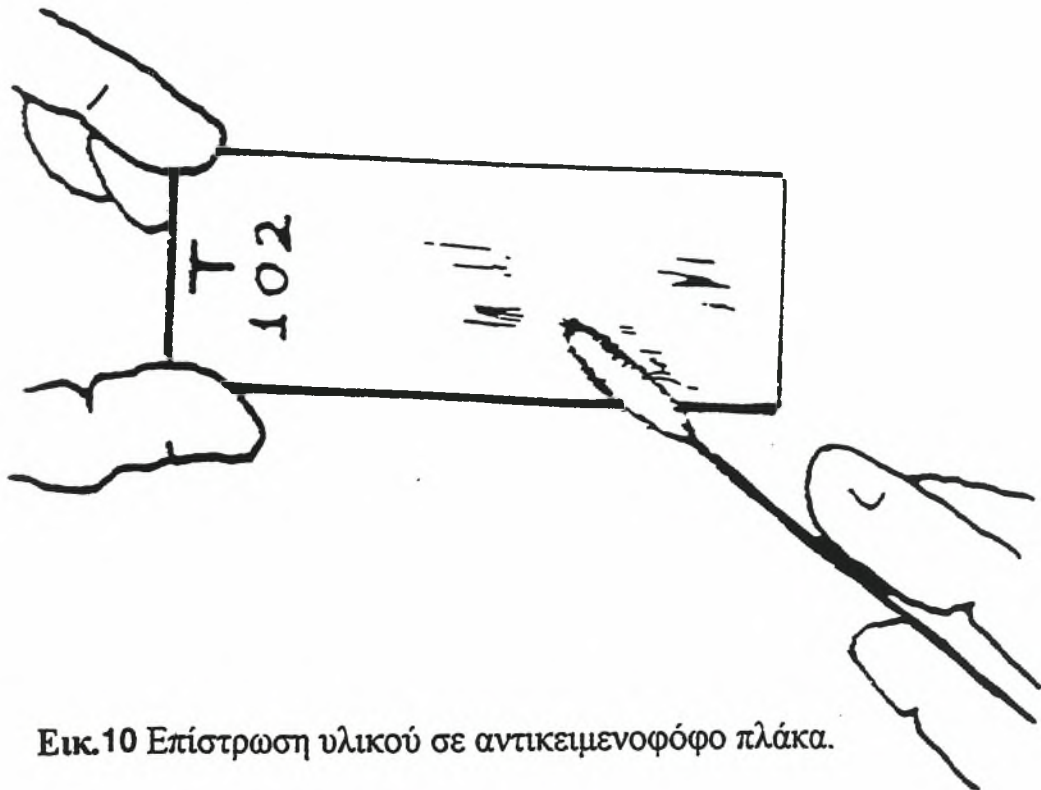
Εικόνα 8. Λήψη υλικού με βαμβακοφόρο στυλεό από τον εξωτράχηλο



Εικόνα 9.1. Λήψη με σπάτουλα
τύπου Ayre.



Εικόνα 9.2. Λήψη με ψήκτρα από
τον ενδοτράχηλο.



Εικ.10 Επίστρωση υλικού σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ ΚΟΛΠΟΥ ΚΑΙ ΤΡΑΧΗΛΟΥ «ΤΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑ»

Τα⁹ επιχρίσματα που λαμβάνονται από το φυσιολογικό κολπικό ή τραχηλικό επιθήλιο, περιέχουν τα παρακάτω κυτταρικά και μη στοιχεία:

1. Κύτταρα από το πλακώδες επιθήλιο του κόλπου ή του τραχήλου.
2. Κύτταρα από το κυλινδρικό επιθήλιο του ενδοτραχήλου.
3. Κύτταρα από άλλα μέρη του γεννητικού συστήματος π.χ. ενδομητρικά κύτταρα (σε ειδικές περιπτώσεις).
4. Λευκοκύτταρα.
5. Ιστιοκύτταρα.
6. Μικρόβια.
7. Επιπρόσθετα στοιχεία: σπερματοζωάρια, αμυλώδη κοκκία (τάλκ), λιπαντικά, οξύουροι και άλλα (όταν συντρέχουν λόγοι).

Κύτταρα κοιλιακού επιθηλίου

Στην αναπαραγωγική ηλικία ο κόλπος καλύπτεται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο, του οποίου η ωρίμανση και η διαφοροποίηση έχει άμεση σχέση με την ορμονική κατάσταση της γυναίκας. Οι τύποι των επιθηλιακών κυττάρων που το αποτελούν είναι: τα βασικά, τα παραβασικά, τα διάμεσα (μεγάλα και μικρά) και τα επιπολής κύτταρα.

Τα **βασικά κύτταρα** είναι τα μικρότερα κύτταρα του πλακώδους επιθηλίου, διαμέτρου 12 μm, έχουν σχήμα στρογγύλο ή ωσειδές, κεντρικό πυρήνα και κυανόφιλο κυτταρόπλασμα. Τα **λευκά παραβασικά κύτταρα** είναι μικρά, στρογγυλά και κυανόφιλα. Περιέχουν μεγάλο φυσαλιδώδη πυρήνα όμοιο με εκείνον των διαμέσων κυττάρων. Τα **διάμεσα κύτταρα** (μεγάλα και μικρά) έχουν φυσαλιδώδη πυρήνα με λεπτό δίκτυο χρωματίνης, λεία πυρηνική μεμβράνη και καμία φορά μικρό πυρήνιο ή σωματίο X-χρωματίνης. Μελέτες με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, έδειξαν την παρουσία κοκκίων γλυκογόνου στο κυτταρόπλασμα. Το γλυκογόνο χρώννυται κίτρινο με τη χρώση Παπανικολάου. Τα πιο ώριμα κύτταρα του πλακώδους επιθηλίου είναι τα **επιπολής κύτταρα**, τα οποία είναι μεγάλα, επίπεδα και πολυγωνικά, αναλόγως δε του χρώματος του κυτταροπλάσματος των διακρίνονται σε ηωσινόφιλα και κυανόφιλα. Το κυτταρόπλασμα των πιο ώριμων κυττάρων χρώννυται ροδόχρουν με την χρωστική ουσία Orange G, ενώ τα λιγότερα ώριμα κύτταρα χρώννυται με τη χρωστική ουσία Light Green της χρώσεως Παπανικολάου και παρουσιάζουν κυανοπράσινη απόχρωση.

Επιθηλιακά κύτταρα τραχήλου

Το επιθήλιο του τραχήλου είναι δύο τύπων: πλακώδες και κυλινδρικό.

Εξωτράχηλος

Το πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο καλύπτει το πρόσθιο κοιλιακό τμήμα του τραχήλου σε πάχος 0,5 mm. Συνέχεται με το πλακώδες επιθήλιο του κόλπου, αλλά είναι λιγότερο ευαίσθητο στην επίδραση των ορμονών. Φαίνεται να επηρεάζεται, από την ηλικία και από τον εμμηνορρυσιακό κύκλο, παρουσιάζοντας πλήρη ωρίμανση υπό την επίδραση των οιστρογόνων και ημιωρίμανση υπό την επίδραση της προγεστερόνης.

Ενδοτραχήλος

Μια στιβάδα, από υψηλά κυλινδρικά κύτταρα, αποτελεί το επιθήλιο του ενδοτραχηλικού σωλήνα. Δυο τύποι κυττάρων αναγνωρίζονται: τα εκκριτικά και τα κροσσωτά. Τα **εκκριτικά κύτταρα** παράγουν όξινη και ουδέτερη βλέννη, της οποίας η ποσότητα εξαρτάται από την ημέρα του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Η παρουσία της βλέννης καθίσταται εμφανής με τις χρώσεις Alcian Blue και PAS.

Τα **κροσσωτά κύτταρα** βρίσκονται διάσπαρτα ανάμεσα στα εκκριτικά κύτταρα και η κυρία αποστολή τους είναι να μεταφέρουν τη βλέννη κατά μήκος του επιθηλίου. Ανευρίσκονται, πιο συχνά, στο σημείο επαφής ενδοτραχήλου / ενδομητρίου, ενώ ένα άλλο είδος κυττάρων παρόμοιο με τα εκκριτικά, είναι τα **λευκά εμβόλιμα κύτταρα**.

Τα κύτταρα του ενδοτραχήλου έχουν εύθραυστο κυτταρόπλασμα που συνήθως εκφυλίζεται και καταστρέφεται, με συνέπεια στα επιχρίσματα να παρατηρούνται μόνο, οι γυμνοί πυρήνες των κυττάρων. Η βλέννη που παράγεται από τα κύτταρα του κυλινδρικού επιθηλίου αποτελεί σύμπλεγμα γλυκοπρωτεϊνών του οποίου η σύσταση ποικίλει κατά την διάρκεια του κύκλου.

Ζώνη μεταπτώσεως: Το πλακώδες επιθήλιο του εξωτραχήλου, εφάπτεται με το απλό κυλινδρικό επιθήλιο του ενδοτραχηλικού σωλήνα, σχηματίζοντας το σημείο επαφής πλακώδους / κυλινδρικού επιθηλίου. Η θέση του σημείου επαφής, εξαρτάται, από την ηλικία. Η ζώνη μεταπτώσεως του πλακώδους επιθηλίου του εξωτραχήλου στο κυλινδρικό επιθήλιο του ενδοτραχήλου είναι ειδικής σημασίας, διότι η πλειονότης των καρκινωμάτων του τραχήλου και οι προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις ξεκινούν από αυτή τη θέση.

Ενδομητρικά κύτταρα

Αδενικά κύτταρα ενδομητρίου παρατηρούνται φυσιολογικά κατά τη διάρκεια των 10 πρώτων ημερών του κύκλου. Είναι μικρότερα από τα ενδοτραχηλικά κύτταρα με λίγο κυανόφιλο κυτταρόπλασμα, ενίοτε κενοτοπιώδες. Από την 6^η έως την 12^η ημέρα του κύκλου τα ενδομητρικά κύτταρα σχηματίζουν συμπαγείς ομάδες, οι οποίες περιβάλλονται από μία ή περισσότερες στιβάδες μεγαλύτερων κυττάρων με ελαφροχρωματικό κυανόφιλο κυτταρόπλασμα που προέρχονται από το ενδομητρικό στρώμα. Αυτοί οι τυπικοί σχηματισμοί ονομάστηκαν «έξοδος» από τον Παπανικολάου.

Λευκοκύτταρα

Παρατηρούνται πολύ συχνά στην αρχή και στο τέλος του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα σπανίως παρατηρούνται σε φυσιολογικά επιχρίσματα.

Ιστιοκύτταρα (μακροφάγα)

Παρατηρούνται στο τέλος του εμμηνορρυσιακού κύκλου καθώς και κατά τη διάρκεια των 10 πρώτων ημερών του κύκλου. Προέρχονται από το ενδομητρικό στρώμα. Μπορεί να περιέχουν δύο ή περισσότερους πυρήνες. Τα πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλου αριθμού πυρήνων.

ΚΥΡΙΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΚΟΛΠΟΤΡΑΧΗΛΙΚΟΥ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΟΣ

Οι τύποι των επιθηλιακών κυττάρων που παρατηρούνται σ' ένα κολποτραχηλικό επίχρισμα καθορίζονται από τους παρακάτω παράγοντες:

1. Βαθμό ωριμάνσεως του επιθηλίου.
2. Θέση του σημείου επαφής πλακώδους-κυλινδρικού επιθηλίου.
3. Ημέρα του εμμηνορρυσιακού κύκλου που ελήφθη το επίχρισμα.

Ωρίμανση του επιθηλίου: Ο βαθμός ωριμάνσεως του πλακώδους επιθηλίου εξαρτάται από την επίδραση των ορμονών.

Κάτω από την επίδραση των οιστρογόνων το πάχος του επιθηλίου αυξάνουν και τα κύτταρα ωριμάζουν ταχύτατα. Αντιθέτως, όταν απουσιάζουν τα οιστρογόνα, το επιθήλιο ατροφεί και το επίχρισμα περιέχει παραβασικά κύτταρα. Επίσης, επιπολής κύτταρα, συχνά παρατηρούνται σε οξείες φλεγμονές (τριχομοναδική κολπίτις).

Θέση του σημείου επαφής (Ζώνη μεταπτώσεως) πλακώδους/κυλινδρικού επιθηλίου:

Η θέση του σημείου επαφής πλακώδους/κυλινδρικού επιθηλίου ποικίλει. Μετά την εμμηνόπαυση μετατίθεται στον ενδοτραχηλικό σωλήνα. Έτσι, τα επιχρίσματα που λαμβάνονται από εμμηνόπαυσιακές γυναίκες, σπανίως, περιέχουν ενδοτραχηλικά κύτταρα. Επιχρίσματα που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της κήσεως, περιέχουν άφθονο αριθμό ενδοτραχηλικών κυττάρων.

Ημέρα του εμμηνορρυσιακού κύκλου που ελήφθη το επίχρισμα:

Επίχρισματα που λαμβάνονται καθημερινά κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου παρουσιάζουν διάφορο βαθμό ωριμάνσεως των πλακωδών κυττάρων. Ενδομητρικά κύτταρα είναι δυνατόν να ανευρεθούν σε επίχρισματα που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρύσεως και κατά τη διάρκεια των δέκα πρώτων ημερών του κύκλου. Η παρουσία τους σε οποιαδήποτε άλλη χρονική περίοδο είναι παθολογικής σημασίας. Προς το τέλος της έμμηνου ρύσεως, δεν είναι ασύνηθες, να διαπιστώνεται η παρουσία αρκετού αριθμού ιστιοκυττάρων στο επίχρισμα.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΤΟΥ ΚΟΛΠΟΥ

Η⁹ χλωρίδα του κόλπου επηρεάζεται από τη φυσιολογική ή μη κατάσταση που επικρατεί στην περιοχή. Τα πιο συχνά σαπρόφυτα που παρατηρούνται στο κόλπο είναι το κολποβακτηρίδιο και το κολπικό καρυνοβακτηρίδιο.

Το κολποβακτηρίδιο είναι αναερόβιο gram + βακτηρίδιο και αποτελεί τη φυσιολογική χλωρίδα του κόλπου. (εικ. 11). Στο φωτομικροσκόπιο με τη χρώση Παπανικολάου εμφανίζεται με την μορφή μικρού βασεόφιλου πασσάλου. Η παρουσία μεγάλου αριθμού κολποβακτηριδίων, προκαλεί κυτταρόλυση, των διαμέσων κυττάρων του πλακώδους επιθηλίου με τον εξής μηχανισμό. Τα διάμεσα κύτταρα, είναι γνωστό ότι περιέχουν στο κυτταρόπλασμά τους κοκκία γλυκογόνου. Υπό την επίδραση, του κολποβακτηριδίου, το γλυκογόνο μεταβολίζεται σε γαλακτικό οξύ, το οποίο, στη συνέχεια, επιδρά καταστροφικά επί του κυτταροπλάσματος με αποτέλεσμα την απογύμνωση των πυρήνων (κυτταρόλυση).

Άφθονο κολποβακτηρίδιο παρατηρείται στην προχωρημένη εκκριτική φάση του κύκλου και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ενώ ο αυξημένος αριθμός του σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες εγείρει την υπόνοια υπάρξεως σακχαρώδους διαβήτη.



Εικόνα 11. Βάκιλλοι του Doderlein (γαλακτοβάκιλλοι). Αποτελούν τη φυσιολογική χλωρίδα του κόλπου και στα κολπικά επιχρίσματα παρουσιάζουν χαρακτηριστική διάταξη «σαν χυμένα σπέρτα»

Χρώση Παπανικολάου X1320

Το κολπικό κορυνοβακτηρίδιο είναι ασυμπτωματικό όταν το pH του κόλπου είναι <4.5. Εάν το pH >5-6.5 ή όταν συνδυασθεί με άλλα βακτηρίδια, τότε είναι δυνατόν να δώσει κλινικά σημεία. Ποσοστό 40-50% των γυναικών με λοίμωξη από *G. Vaginalis* παραμένει ασυμπτωματικό.

Μια σειρά από βακτηρίδια αερόβια ή αναερόβια καθώς και κόκκοι συγκαταλέγονται, επίσης, στη φυσιολογική χλωρίδα του κόλπου. Όμως, η μεταβολή της ορμονικής καταστάσεως ή η επίδραση μηχανικών ή χημικών αιτιών, είναι δυνατόν να προκαλέσουν αλλοιώσεις, οι οποίες θα αποτελέσουν το υπόστρωμα για την παθογόνο ανάπτυξη αυτών των μικροοργανισμών.

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

ΛΟΙΜΩΞΗ – ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Η^ο ευαισθησία του γεννητικού συστήματος της γυναίκας, στις φλεγμονές εξαρτάται από την ηλικία της γυναίκας και την ανατομική εντόπιση της φλεγμονής.

Τα αίτια της φλεγμονής στις διάφορες ηλικίες είναι:

α. Παιδική ηλικία

- Τραύμα, συνήθως δευτερογενές.
- Μη ειδική βακτηριδιακή κολπίτις.
- Γονόρροια.
- Ιώσεις (έρπης τύπου II).
- Αλλεργικές συστηματικές νόσοι.
- Συγγενείς ανωμαλίες (π.χ. επικοινωνία μεταξύ κόλπου και εντέρου).
- Τριχομονάδες και μύκητες, (σπανίως).

β. Αναπαραγωγική ηλικία

- Τριχομονάδες, Μύκητες.
- Μη ειδικές βακτηριδιακές φλεγμονές (στρεπτόκοκκος, σταφυλόκοκκος).
- Τραύματα (διάβρωση, εξέλκωση).
- Γονόρροια.
- Ιοί (έρπης, HPV).
- Αλλεργικές νόσοι.
- Συστηματικές νόσοι (διαβήτης, υποθυρεοειδισμός).

γ. Εμμηνόπαυση

- Ορμονικοί παράγοντες (ατροφία).
- Μη ειδικές βακτηριδιακές φλεγμονές.
- Χρόνιοι ερεθισμοί (λευκοπλακία, νευροδερματίτις).
- Μύκητες, τριχομονάδες.

Προδιαθετικοί παράγοντες για την ανάπτυξη φλεγμονής θεωρούνται:

1. **Η μη πλήρης ωρίμανση του επιθηλίου**, που παρατηρείται πριν από την ήβη και σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες, η μείωση ή η απουσία των οιστρογόνων έχει ως αποτέλεσμα, τη λέπτυνση του επιθηλίου επειδή απουσιάζει η διάμεσος και η επιπολής στιβάδα καθώς και τη μεγάλη ευαισθησία του στην επίδραση τραυματικών βλαβών. Η κολπική έκκριση καθίσταται αλκαλική, μειώνεται το ενδοκυττάριο γλυκογόνο και ο αριθμός των βακίλλων Doderlein και δημιουργείται πρόσφορο έδαφος για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών.
2. **Ο τραυματισμός του επιθηλίου**, από διάφορους παράγοντες όπως η πρόπτωση της μήτρας, η παρουσία ενδογεννητικών ξένων σωμάτων (πεσσών) και η σεξουαλική επαφή.
3. **Η κυκλική μεταβολή του pH του κόλπου** κατά την διάρκεια της εμμήνου ρύσεως. Η μείωση του γλυκογόνου που περιέχεται στα κύτταρα οδηγεί σε υψηλό pH, η παρουσία του οποίου αυξάνει την ευαισθησία του επιθηλίου σε λοίμωξη από μικτά βακτηρίδια. Το αλκαλικό, επομένως, pH αποτελεί πρόσφορο έδαφος για την ανάπτυξη φλεγμονής. Το pH του κόλπου διαφοροποιείται με την ηλικία. Στο νεογέννητο η τιμή του είναι 5.5, ενώ στο παιδί 7.0. Στην ενήλικη γυναίκα 4.0 – 5.0. Στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες το pH του κόλπου κυμαίνεται από 6.0 – 7.5.
4. **Η κύηση**. Κατά την διάρκεια της κύσεως το pH του κόλπου κυμαίνεται από 3.8 – 4.4. Παρατηρείται οίδημα του κόλπου και του τραχήλου, απουσιάζει η επιπολής προστατευτική στιβάδα του επιθηλίου και αυξάνονται οι εκκρίσεις, με συνέπεια το επιθήλιο να καθίσταται περισσότερο ευπαθές στις δευρογενείς λοιμώξεις.
5. **Οι συγγενείς ανωμαλίες** όπως π.χ. η επικοινωνία εντέρου και γεννητικού συστήματος.
6. **Οι μεταβολικές διαταραχές** που παρατηρούνται σε ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη ή υποθυρεοειδισμό.
7. **Η ακτινοθεραπεία**. Η επίδραση της ακτινοβολίας προκαλεί ατροφία και εξέλκωση του επιθηλίου, νέκρωση και κοκκιωματώδη αντίδραση του βλεννογόνου.
8. **Η κρυοπηξία**. Αποτελεί, το θεραπευτικό μέσο επιλογής, των εντόνων φλεγμονών του τραχήλου και των προκαρκινωματοδών αλλοιώσεων.
9. **Η έλλειψη των βιταμινών Α και C**, έχει ως συνέπεια τη διαταραχή της κερατινοποίησης του πλακώδους επιθηλίου.
10. **Η νεοπλασία**. Θεωρείται ότι δρα ως ξένο σώμα, με συνέπεια την πρόκληση τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης.

ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Εκτός του κολποβακτηριδίου είναι δυνατόν σε ένα κολπικό επίχρισμα, να παρατηρηθούν διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί.

Οι πιο συχνοί από αυτούς είναι:

Ιοί:	Απλούς έρπης Κυτταρομεγαλοϊός. Ιός κονδυλώματος (HPV-human papilloma virus).
Βακτηρίδια:	Στρεπτόκοκκος. Σταφυλόκοκκος. Γονόκοκκος. Αιμόφιλος (<i>Gardnerella vaginalis</i>). Ακτινομύκης. Πρωτεύς. Μυκοβακτηρίδιο φυματιώσεως. <i>Treponema pallidum</i> .
Μύκητες:	<i>Candida albicans</i> . <i>Toxulopsis glabrata</i>
Παράσιτα:	Τριχομονάδα (<i>Trichomonas vaginalis</i>). Ιστολυτική αμοιβάδα. Σχιστόσωμα το αιματόβιο. Σχιστόσωμα <i>mansoni</i> . Τοξόπλασμα. Λεπτότριχες.
Έγκλειστα:	Χλαμύδια (<i>Chlamydia trachomatis</i>).

Βακτηρίδια

Παρατηρούνται σε ποσοστό 20% σε καλλιέργειες μη συμπτωματικών γυναικών.

Κόκκοι

Χαρακτηρίζονται ως μονήρεις κόκκοι gram⁺ (σταφυλόκοκκοι) ή gram⁻ διπλόκοκκοι (γονόκοκκοι) ή αλυσίδες από κόκκους (στρεπτόκοκκοι). Η παρουσία τους προκαλεί πυώδη κολπική έκκριση. Ο σταφυλόκοκκος βρίσκεται σε ποσοστό 5% στο κολπικό επίχρισμα φυσιολογικών γυναικών (εικ. 12).

Αιμόφιλος (*Gardnerella vaginalis*).

Μελέτες που έγιναν σε καλλιέργειες κολπικών εκκρίμάτων απέδειξαν ότι το 90% των μη ειδικών κολπιτίδων οφείλονται σε μόλυνση από το gram-βακτηρίδιο *Gardnerella vaginalis*, δηλαδή τον αιμόφιλο. Παρατηρείται σε ποσοστό 6% σε κορίτσια κατά την παιδική ηλικία.

Μορφολογικά αναγνωρίζεται από την παρουσία μικρών πασσαλοειδών σχηματισμών κυανής χροιάς, στο υπόστρωμα των κολπικών επιχρισμάτων, μαζί με πολυμορφοπύρρηνα και άλλα φλεγμονώδη στοιχεία. Χαρακτηριστική είναι η παρουσία των Clue cells, δηλαδή πλακωδών κυττάρων που η επιφάνεια του κυτταροπλάσματός τους καλύπτεται από αθροίσεις αυτών των βακτηριδίων.

Μύκητες (*Candida albicans*)

Πρόκειται για σαπρόφυτα, τα οποία βρίσκονται στο 50% των κολπικών επιχρισμάτων. Η διάμετρός τους είναι 3-5 μm, δηλαδή μικρότερη από εκείνη του ερυθροκυττάρου. Παρατηρούνται με τη μορφή μικρών εγκυστωμένων στρογγύλων ή ωοειδών οργανισμών (κονίδια) ή (υφών μακριά λεπτά ινίδια αποτελούμενα από επιμήκεις σπόρους σαν μπαμπού).

Η κάψα δεν διακρίνεται. Η συμπτωματολογία αφορά, κυρίως, κνησμό και λιγότερο λευκόρροια. Παρατηρούνται, σε μεταβολές του κυτταρικού γλυκογόνου, σε διαβητικές ασθενείς, σε εγκύους, σε γυναίκες που κάνουν χρήση κορτικοειδών, χημειοθεραπείας ή αντισυλληπτικών δισκίων και τέλος σε ανοσοκατεσταλμένες ασθενείς.

Λιγότερο από 10% των κολπικών μυκητιασικών λοιμώξεων οφείλεται στον βλαστομύκητα *totulopsis glabrata*. Έχει τους ίδιους μορφολογικούς χαρακτήρες με την *Candida*. Οι σπόροι σε επιχρίσματα χρωματισμένα με τη χρώση Παπανικολάου παρουσιάζουν την εικόνα μικρών μικρών, ομοιομόρφων οργανισμών.

Η άλως που τους περιβάλλει σαν κάψα συμβάλει στην αναγνώρισή τους. Οι εν λόγω μικροοργανισμοί δεν σχηματίζουν ψευδοϋφές.

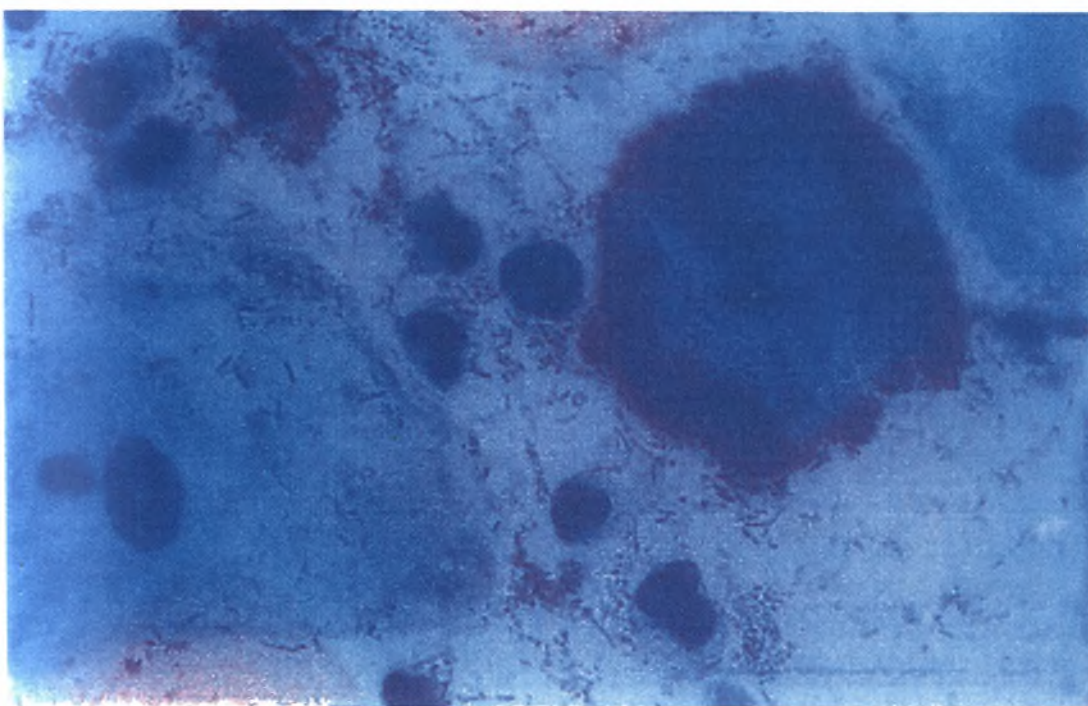
Άλλοι σπάνιοι μύκητες

Κοκκιδιομύκης, κύστεις του Τοξοπλάσματος, Ασπέργιλλος.

Λεπτότριχες

Ανήκουν στην κατηγορία των σαπροφύτων. Προκαλούν διαυγές κοιλιακό έκκριμα και ελαφρύ “κνησμό”. Έχουν σχήμα επίμηκες, είναι λεπτές, βρίσκονται μεμονωμένες ή πολλές μαζί και συχνά συνυπάρχουν με τριχομονάδες.

Σπανίως συνυπάρχουν με μύκητες. Εμφανίζονται κυρίως, σε νεαρές γυναίκες και κατά τη διάρκεια της κύησης και εμφανίζονται κυρίως σε νεαρές γυναίκες και κατά τη διάρκεια της κύησης και οφείλονται σε δύο τύπους μικροοργανισμών (γαλακτοβακίλλους και ένα βακτηρίδιο της οικογένειας του ακτινομύκητος).



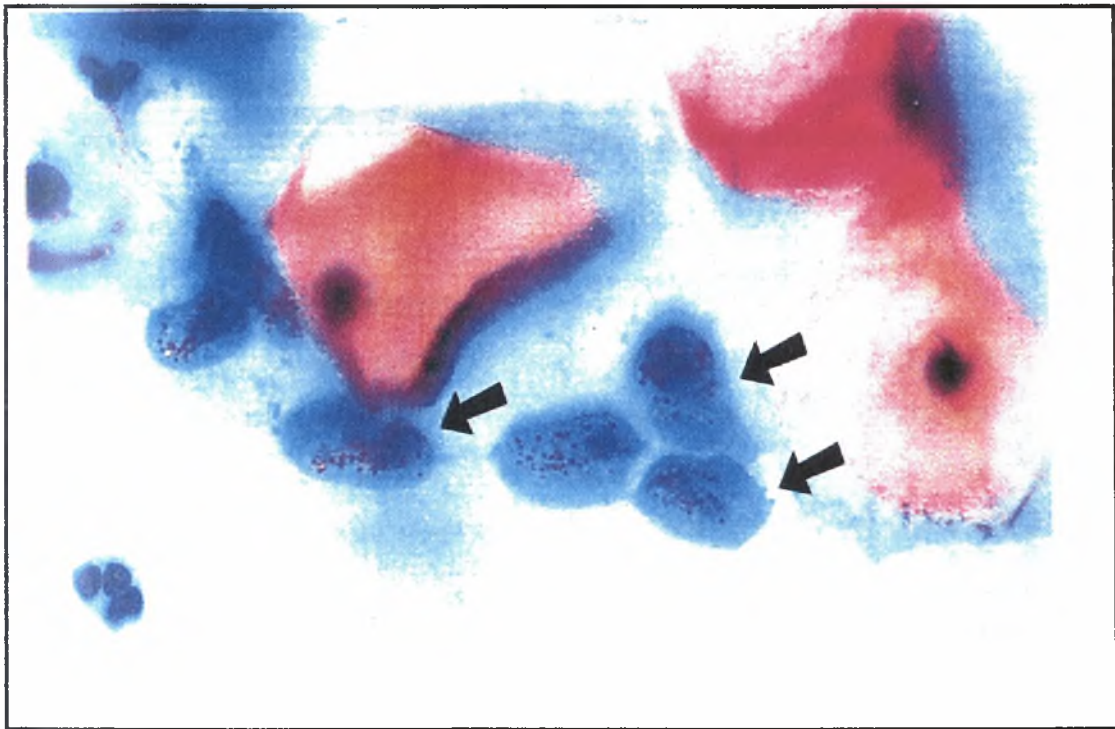
Εικόνα 12. Μικτή χλωρίδα κόλπου αποτελούμενη από πολλούς βακίλλους και κόκκους.
Χρώση Παπανικολάου X1320

Τριχομονάδες (*Trichomonas vaginalis*)

Συνήθως, μεταδίδονται κατά την διάρκεια της σεξουαλικής επαφής και απαντούν στο 25-50% των κολπικών επιχρισμάτων. Η παρουσία τους εξαρτάται από το pH του κόλπου. Αναπτύσσονται σε αλκαλικό pH. Η συμπτωματολογία τους περιλαμβάνει, κολπική έκκριση, λεπτή αφρώδη, δύσοσμο, κιτρινοπράσινης χροιάς. Μορφολογικά χαρακτηριστικά τους είναι το ωοειδές ή απιοειδές σχήμα, η γκριζοπράσινη χροιά και η έκκεντρος θέση του πυρήνος. (εικ.13).

Οι κυτταρικές αλλοιώσεις που προκαλούνται, από την παρουσία των τριχομονάδων είναι: παρουσία κυτταροπλασματικών κενотоπίων, εκφύλιση των κυτταροπλασματικών ορίων, ηωσινοφιλία του κυτταροπλάσματος, καρυοπύκνωση, πολυπυρήνωση και τέλος χαρακτηριστική περιπυρηνική άλως.

Η τριχομοναδική λοίμωξη είναι συχνή σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου, δεν υπάρχουν, όμως ενδείξεις, ότι οι τριχομονάδες αποτελούν προδιαθεσικό παράγοντα, για την ανάπτυξη, καρκίνου του τραχήλου.



Εικόνα 13. **Τριχομονάδες.** Οι εν λόγω μικροοργανισμοί παρουσιάζουν χαρακτηριστικό σχήμα, κυτταροπλασματικά έγκλειστα και πολύ μικρό πυρήνα.

Χρώση Παπανικολάου X1320

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Εισαγωγή

Όταν¹¹ ο Γεώργιος Παπανικολάου το 1928 ανακοίνωσε ότι, εξετάζοντας τα επιχρίσματα γυναικών που είχαν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, παρατήρησε κακοήθη κύτταρα, η διαγνωστική αξία της εξέτασης κυτταρικού υλικού αμφισβητήθηκε γιατί στηρίζεται σε κύτταρα και όχι σε ιστό. Αυτό σε μια δεύτερη προσέγγιση θεωρήθηκε πλεονέκτημα, διότι ενώ τα κύτταρα αποφολιδώνονται από εκτεταμένες περιοχές οργάνων, το βιοψιακό υλικό λαμβάνεται από περιορισμένο τμήμα ιστού.

Σήμερα, 66 χρόνια μετά από την πρώτη ανακοίνωση του Γ. Παπανικολάου, η Κυτταρολογία καθιερώθηκε και περιλαμβάνει τρεις τομείς: (α) τον προληπτικό έλεγχο (screening) (β) τη διαγνωστική κυτταρολογία και (γ) την ερευνητική κυτταρολογία.

(α) Προληπτικός έλεγχος

Στον προληπτικό έλεγχο η κυτταρολογική εξέταση εφαρμόζεται σε ασυμπτωματικά άτομα για πρόληψη του καρκίνου διαφόρων οργάνων, με πρωταρχικό στόχο την ανίχνευση προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας.

(β) Διαγνωστική κυτταρολογία

Η διαγνωστική κυτταρολογία στηρίζεται στη μορφολογική εξέταση των κυττάρων. Εφαρμόζεται για διάγνωση του καρκίνου σε γυναικολογικό και σε μη γυναικολογικό υλικό, όπως πτύελα, ούρα, υγρά κ.λ.π., καθώς και σε κυτταρολογικό υλικό, το οποίο έχει ληφθεί από παρακέντηση με λεπτή βελόνα (F.N.A.) ψηλαφητών ή μη ψηλαφητών όγκων διαφόρων οργάνων.

(γ) Ερευνητική κυτταρολογία

Η μεγάλη ανάπτυξη και τεχνολογική πρόοδος στην κυτταρική και μοριακή βιολογία, στη γενετική, στην ανοσοκυτταροχημεία καθώς και στην αυτοματοποιημένη κυτταρολογία προσφέρουν μακροπρόθεσμες προοπτικές που θα πλουτίσουν ή και θα μεταβάλλουν τις γνώσεις μας για τα κύτταρα. Με την εφαρμογή της ερευνητικής κυτταρολογίας, είμαστε σε θέση να ερμηνεύσουμε

τη μορφολογία του κυττάρου και να αποκτήσουμε περισσότερες πληροφορίες για τους ογκογενετικούς μηχανισμούς. Προς το παρόν όμως η ερευνητική κυτταρολογία βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο και επιπλέον οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι τόσο πολυδάπανες και εξειδικευμένες, που δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε καθημερινή βάση.

Η διαγνωστική αξία της κυτταρολογικής εξέτασης εξαρτάται τόσο από βιολογικούς παράγοντες όσο και από τη λήψη του υλικού.

Κολπικό επίχρισμα

Από τον κόλπο να ληφθούν τα ακόλουθα δείγματα:

- (1) **Επίχρισμα από το οπίσθιο τριτημόριο του πλαγίου κολπικού τοιχώματος.** Η λήψη γίνεται με σπάτουλα (ξύλινη ή πλαστική), μετά από εισαγωγή κολποδιαστολέων. Στο επίχρισμα παρατηρούνται πλακώδη κύτταρα, τα οποία προέρχονται από τις στιβάδες που βρίσκονται στην επιφάνεια του ορμονοεξαρτώμενου κολπικού επιθηλίου. Το επίχρισμα αυτό είναι κατεξοχήν κατάλληλο για ορμονικό έλεγχο. Όταν η λήψη των επιχρισμάτων γίνεται για ορμονικό έλεγχο του γεννητικού κύκλου, τα επιχρίσματα λαμβάνονται κάθε δεύτερη ή τρίτη ημέρα, σε όλη τη διάρκεια του κύκλου. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις αρκεί (η λήψη τριών ή τεσσάρων επιχρισμάτων, σε χρονικό διάστημα δεκαπέντε περίπου ημερών.
- (2) **Επίχρισμα από τα τοιχώματα του κόλπου.** Το επίχρισμα που έχει ληφθεί με σπάτουλα και από τα τέσσερα τοιχώματα του κόλπου, εκτός από τα αναμενόμενα πλακώδη κύτταρα, είναι δυνατόν να περιέχει:
 - (α) **Αδενικά και / ή μεταπλαστικά κύτταρα,** η παρουσία των οποίων είναι διαγνωστική κολπικής αδένωσης.
 - (β) **Δυσκαρυωτικά πλακώδη κύτταρα,** η παρουσία των οποίων είναι διαγνωστική ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας κόλπου.
 - (γ) **Κακοήθη κύτταρα** ενδεικτικά καρκίνου του κόλπου από πλακώδη ή αδενικά κύτταρα.

- (3) **Επίχρισμα από τον οπίσθιο κολπικό θόλο.** Στον οπίσθιο κολπικό θόλο συναθροίζονται πλακώδη κύτταρα από τον κόλπο, καθώς και κύτταρα που προέρχονται: (α) από τον τράχηλο της μήτρας (πλακώδη, αδενικά και πλακωδώς μεταπλασθέντα), (β) από το ενδομήτριο και (γ) σπανίως από τις σάλπιγγες και ωοθήκες.

Λήψη τραχηλικού επιχρίσματος

Η λήψη του τραχηλικού επιχρίσματος περιλαμβάνει δύο δείγματα:

ένα από τον εξωτράχηλο και ένα από τον ενδοτράχηλο.

Το εξωτραχηλικό δείγμα περιέχει κύτταρα από τη ζώνη μετάπλασης και η λήψη του είναι απαραίτητη για την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, διότι στην περιοχή αυτή εντοπίζονται τόσο οι ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις όσο και ο καρκίνος του πλακώδους επιθηλίου.

Το ενδοτραχηλικό δείγμα περιλαμβάνει κυρίως αδενικά κύτταρα, αλλά και πλακώδη ή πλακωδώς μεταπλασθέντα τραχηλικά κύτταρα. Τα αδενικά κύτταρα προέρχονται από το αδενικό επιθήλιο του ενδοτραχήλου, είναι όμως δυνατόν να έχουν αποφολιωθεί και από το αδενικό επιθήλιο του ανωτέρου γεννητικού συστήματος.

Λήψη κολποτραχηλικού επιχρίσματος (Pap test)

Η εξέταση κολπικού επιχρίσματος Παπανικολάου γίνεται προληπτικά σε γυναίκες που συμμετέχουν σε οργανωμένα προγράμματα ανίχνευσης (screening) του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και διαγνωστικά σε γυναίκες που προσέρχονται για γυναικολογική εξέταση ή για παρακολούθηση θεραπείας. Η λήψη μπορεί να γίνει από γενικούς ιατρούς, ειδικευμένους γυναικολόγους ή κυτταρολόγους και από μαιές.

Το κολπικό επίχρισμα, θα πρέπει να περιλαμβάνει τρία είδη κυττάρων: αδενικά κύτταρα από τον ενδοτράχηλο, μεταπλαστικά κύτταρα από τη ζώνη μετάπλασης και πλακώδη κύτταρα από τον κόλπο και από τον εξωτράχηλο. Το επίχρισμα όμως θεωρείται κατάλληλο για διάγνωση, έστω και αν περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο από τα τρία είδη επιθηλιακών κυττάρων που προαναφέρθηκαν.

Οδηγίες για τη λήψη κολποτραχηλικού επιχρίσματος

Πρέπει να γίνεται σύσταση στις γυναίκες να αποφεύγουν πριν από τη λήψη του επιχρίσματος:

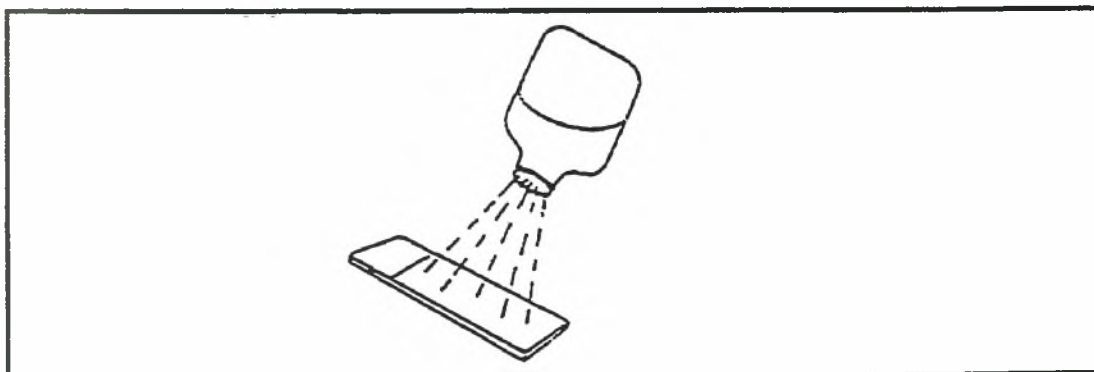
(α) κολπικές πλύσεις, (β) κολπικά υπόθετα ή αλοιφές και (γ) σεξουαλική επαφή τις δύο τελευταίες ημέρες πριν από τη λήψη.

Σαν τεχνικός εξοπλισμός πρέπει να υπάρχουν: καρέκλα τύπου Boom, καλός φωτισμός, πλαστικοί κολποδιαστολείς μιας χρήσης, ξύλινες ή πλαστικές σπάτουλες τύπου Ayte, με εγκοπή στο ένα άκρο, μικρές βούρτσες, αντικειμενοφόροι πλάκες, μονιμοποιητικό spray ή κοινή λακ μαλλιών.

Η λήψη του κολποτραχηλικού επιχρίσματος περιλαμβάνει τα ακόλουθα τρία δείγματα:

- (1) Κολπικό δείγμα από τον οπίσθιο κολπικό θόλο με το στρογγυλό άκρο της σπάτουλας.
- (2) Εξωτραχηλικό δείγμα από την ζώνη μετάπλασης με σπάτουλα που τοποθετείται με το μακρύτερο τμήμα της εγκοπής της μέσα στο έξω στόμιο του τραχήλου και περιστρέφεται κατά 360 μοίρες με την ίδια πάντα πίεση.
- (3) Ενδοτραχηλικό δείγμα, με εισαγωγή στον ενδοτράχηλο και περιστροφή κατά 360 μοίρες μιας μικρής ψήκτρας.

Τα τρία δείγματα, επιστρώνονται το ένα πλάι στο άλλο σε μία καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα και όχι σε τρεις πλάκες. Αυτό που προέχει είναι η ποιότητα και όχι η ποσότητα του δείγματος. Πρώτα επιστρώνεται το κολπικό δείγμα στο ένα άκρο της πλάκας, μετά επιστρώνεται το εξωτραχηλικό δείγμα δίπλα στο προηγούμενο και τέλος επιστρώνεται το ενδοτραχηλικό δείγμα, αφήνοντας ένα χώρο για να γραφεί στο Κυτταρολογικό Εργαστήριο ο αριθμός του πλακιδίου.



Εικόνα 14. Επίστρωση και μονιμοποίηση των τριών δειγμάτων σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα.

Ακολουθεί αμέσως η μονιμοποίηση των δειγμάτων πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα με ψεκασμό, χρησιμοποιώντας ειδικό spray ή κοινή λακ μαλλιών. Μονιμοποίηση μπορεί να γίνει και με εμβάπτιση της πλάκας σε δοχείο με οινόπνευμα 95° βαθμών.

Το επίχρισμα πρέπει να στέλνεται για εξέταση σε Κυτταρολογικό Εργαστήριο, διότι η εξέταση του επιχρίσματος μπορεί να γίνει μόνο από κυτταρολόγους. Κάθε επίχρισμα πρέπει να συνοδεύεται από σωστά συμπληρωμένη κάρτα με όλα τα στοιχεία της γυναίκας, με το ιστορικό και με τα ευρήματα της γυναικολογικής εξέτασης.

Τα στοιχεία της γυναίκας είναι: Ονοματεπώνυμο, ηλικία, επάγγελμα, οικογενειακή κατάσταση, όνομα συζύγου, επάγγελμα συζύγου, διεύθυνση με Τ.Κ. και τηλέφωνο.

Το ιστορικό περιλαμβάνει το οικογενειακό, ατομικό, και μαιευτικό ιστορικό (τοκετοί, εκτρώσεις), προηγηθείσες εγχειρήσεις, θεραπείες (ορμονοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία), έναρξη εμμηνου ρύσεως Ε.Ρ., διάρκεια Ε.Ρ., τελευταία Ε.Ρ.

Απαραίτητα πρέπει να αναγράφεται στην κάρτα η ημερομηνία λήψης, τα ευρήματα από τη γυναικολογική εξέταση και εάν η γυναίκα έχει ξανακάνει την εξέταση Παπανικολάου, τότε και τι ήταν το αποτέλεσμα, καθώς και αν προσέρχεται απλώς για έλεγχο ή παρουσιάζει ενοχλήματα.

Η κάρτα αφού συμπληρωθεί από τον/την κυτταρολόγο με την απάντηση του επιχρίσματος πρέπει το ταχύτερο δυνατόν και πάντως όχι αργότερα από δέκα ημέρες να αποστέλλεται και να παραμένει εκεί που έγινε η λήψη του επιχρίσματος, ούτως ώστε το επόμενο επίχρισμα από λήψη στην ίδια γυναίκα να συνοδεύεται πάλι από την ήδη συμπληρωμένη κάρτα.

Κάθε γυναίκα πρέπει να ενημερώνεται για το αποτέλεσμα της εξέτασης από γιατρό και να παίρνει την απάντηση γραμμένη σε άλλη μικρότερη κάρτα “Προληπτικών Εξετάσεων κατά Παπανικολάου” την οποία θα προσκομίζει κάθε φορά που θα κάνει την εξέταση στο ίδιο ή σε άλλο κέντρο.

ΝΕΑ ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΕΩΣ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΚΛΑΣΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ

Η^{1,2,3} τυπική μέθοδος του Παπανικολάου υπήρξε η κύρια μέθοδος για την πρόγνωση του καρκίνου στο αρχικό του στάδιο για περίπου 50 χρόνια, χωρίς βασικές αλλαγές στις τεχνικές που σχετίζονται με την Παρασκευή των κυτταρολογικών επιχρισμάτων και την ερμηνεία. Η νέα μέθοδος του “Thin prep” είναι μια αυτόματη τεχνική που έχει ως σκοπό να παράγει κυκλικού σχήματος επιχρίσματα διαμέτρου 1,3 εκ. καλύτερης ποιότητας σύμφωνα με την κατασκευάστρια εταιρεία.

Πάντοτε κατά την κατασκευάστρια εταιρεία το Thin prep έχει ανατρέψει το σκηνικό της διαγνωστικής κυτταρολογίας τόσο όσον αφορά την παρασκευή και τον χρόνο που απαιτείται από κλινικούς ιατρούς παρασκευαστές που συμμετείχαν στην μικροσκοπική εξέταση αυτών των επιχρισμάτων. Στη μεγίστη πλειονότητα των περιπτώσεων μόνο ένα ή δύο επιχρίσματα συγκρίθηκαν υποχρεωτικά με δύο ως τέσσερα επιχρίσματα, που παρασκευάστηκαν με την συνήθη χειρονακτική μέθοδο.

Το Thin prep χρησιμοποιεί μηχανική, αέριο και υγρή φάση για την συλλογή και τη μεταφορά του κυτταρολογικού υλικού. Παρ’ όλο που αυτό το μηχάνημα αρχικώς κατασκευάστηκε για τη γυναικολογική κυτταρολογία, χρησιμοποιείται κυρίως για τη διαγνωστική κυτταρολογία άλλων συστημάτων του ανθρώπινου οργανισμού^{5,6}.

Κατά την κατασκευάστρια εταιρεία ο χρόνος που εξοικονομήθηκε για τους κυτταρολόγους και τους παρασκευαστές υπήρξε σημαντικός. Τα τελευταία χρόνια το νέο τεστ-ΠΑΠ με το όνομα Thin prep, το οποίο αποτελεί εφαρμογή της κυτταρολογίας υγρής φάσης, τυγχάνει σταδιακά αυξανόμενης αποδοχής από μεγάλη μερίδα κυτταρολόγων. Οι θιασωτές του Thin Prep υποστηρίζουν ότι το τεστ αυτό έχει μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με το κλασσικό ΠΑΠ-τεστ, κυρίως όσον αφορά στις περιπτώσεις χαμηλού βαθμού αλλοιώσεων (LGSIL) αλλά και στα κύτταρα ASCUS (άτυπα πλακώδη κύτταρα αδιευκρίνιστης σημασίας), ενώ άλλοι είναι περισσότερο επιφυλακτικοί τονίζοντας τα μειονεκτήματα της μεθόδου (μικρότερος αριθμός κυττάρων, διαφορετικά διαγνωστικά κριτήρια λόγω της διαφορετικής μεθόδου μονιμοποίησης και επεξεργασίας, απουσία του χρήσιμου για τη διαφορική διάγνωση υποστρώματος). Το νέο τεστ-ΠΑΠ^{14,15}, πάντως, είναι ιδιαίτερα χρήσιμο διαγνωστικά όταν συνοδεύεται από εξέταση τυποποίησης του γονιδιώματος των HPVs(HPV-test), εξέταση μάλιστα που τεχνικά διευκολύνεται εφόσον δεν χρειάζεται δεύτερη δειγματοληψία (από το εναπομείναν υλικό της εξέτασης κατά Παπανικολάου γίνεται και το HPV-test). Η χρήση¹⁷ μεθόδων μοριακού υβριδισμού σε μεγάλες κλινικές έρευνες και μάλιστα του νέου τεστ Hybrid

Capture II για την αξιολόγηση γυναικών με ASCUS, έχει μειώσει την ανάγκη διενέργειας κολποσκόπησης κατά 45%. Φαίνεται ότι υπάρχει μια αξιοθαύμαστη αντιστοιχία της συχνότητας της διάγνωσης ASCUS και SIL στο τεστ-ΠΑΠ με την ανίχνευση ογκογόνων τύπων του ιού στο HPV test, γεγονός που υποδηλώνει την αναγκαιότητα συνδυασμού των δύο αυτών διαγνωστικών εξετάσεων για το σχεδιασμό της θεραπευτικής αντιμετώπισης. Άλλωστε¹⁶, με δεδομένο ότι το σύνολο σχεδόν των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων στον τράχηλο οφείλεται στη δράση ογκογόνων τύπων των HPVs, το HPV-test¹⁰ θεωρείται πιο αξιόπιστο στην αναγνώριση γυναικών με παθολογικό τράχηλο μήτρας, σε σχέση με το τεστ-ΠΑΠ, λόγω της αυξημένης του ευαισθησίας. Αξίζει πάντως να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες η κλινική σημασία της ανεύρεσης σπανίων κυττάρων ASCUS (RASC) σε δείγματα που ελήφθησαν με την μέθοδο Thin prep δεν είναι μεγάλη και σίγουρα μικρότερη της κλινικής σημασίας της ίδιας διάγνωσης στο επίχρισμα κατά Παπανικολάου.

Η διαδικασία του Thin prep ξεκινάει με τη συλλογή γυναικολογικού δείγματος από την ασθενή, με τη χρησιμοποίηση εκ μέρους του ιατρού μιας δειγματοληπτικής συσκευής. Το δείγμα του Thin prep σφραγίζεται, τοποθετείται η ετικέτα και στέλνεται στο εργαστήριο που είναι εξοπλισμένο με Επεξεργαστή Thin prep 2000^{18,19}.

Στο εργαστήριο το δείγμα τοποθετείται μέσα στον επεξεργαστή και εκεί το αίμα διαχωρίζεται σε βλέννα, μη διαγνωστικά κυτταρικά υπολείμματα και ολοκληρωτικά αναμειγνύει το δείγμα των κυττάρων. Τα κύτταρα τότε συγκεντρώνονται στο Tauscyt Filter που είναι ειδικά σχεδιασμένο για να συγκεντρώνει τα διαγνωστικά κύτταρα.

Ο επεξεργαστής Thin prep 2000 συνεχώς ελέγχει το ρυθμό ροής από το Tauscyt Filter κατά την διάρκεια της διαδικασίας της συλλογής ώστε να μην φαίνονται τα κύτταρα πιο αραιά ή πιο πυκνά.

Ένα λεπτό στρώμα κυττάρων επικάθεται σε αντικειμενοφόρο πλάκα σε κύκλο διαμέτρου 20 mm στη συνέχεια το παρασκεύασμα τοποθετείται σε στερεωτικό διάλυμα όπως και με το συμβατικό τεστ PAP οι διαφάνειες που προετοιμάζονται με το σύστημα Thin prep 2000 διασταυρώνονται με το ιατρικό ιστορικό του ασθενούς και με πληροφορίες που προέρχονται από άλλες διαγνωστικές πληροφορίες όπως η κολποσκόπηση, η βιοψία, το test HPV ώστε να καθοριστεί η θεραπευτική αγωγή της ασθενούς¹⁰.

Υπάρχουν περιορισμοί ως προς τα εργαλεία που θα χρησιμοποιηθούν και ως προς το προσωπικό που θα ασχοληθεί με τα διάφορα στάδια επεξεργασίας.

Το κείμενο διαφημιστικού ενημερωτικού φυλλαδίου της κατασκευάστριας εταιρείας του μηχανήματος κυτταρολογίας υγρής φάσεως

1. Τι είναι το τεστ Παπανικολάου ή το κολποτραχηλικό επίχρισμα

Το τεστ Παπανικολάου (Παπ τεστ) είναι μια προληπτική δοκιμασία ελέγχου που ανιχνεύει με επιτυχία κύτταρα ενδεικτικά καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ή κύτταρα που μπορεί μελλοντικά να εξελιχθούν σε καρκινικά κύτταρα. Εφευρέθηκε από τον Έλληνα Γεώργιο Παπανικολάου πριν από 50 χρόνια και ουσιαστικά δεν έχει αλλάξει από ποτέ.

2. Γιατί να κάνω τεστ Παπανικολάου

Τακτικά τεστ Παπανικολάου συμβάλλουν στην πρόληψη του καρκίνου της μήτρας. Τα κύτταρα του τραχήλου της μήτρας μπορεί να εξαλάσσονται χωρίς να υπάρχουν συμπτώματα ή πόνος. Ακόμα και μικρές αλλοιώσεις στα κύτταρα μπορεί να εξελιχθούν σε καρκίνο αν δεν αντιμετωπιστούν με θεραπεία.

Επίσης με το Παπ τεστ ελέγχεται η ορμονική λειτουργία όπως και η χορήγηση ορμονικών σκευασμάτων. Τέλος ανιχνεύονται φλεγμονές του κόλπου ή του τραχήλου (κολπίτιδες, τραχηλίτιδες) καθώς και αιτιολογικοί τους παράγοντες

5. Πώς διαφέρει το Thin prep

Παπ τεστ

Τα κύτταρα συλλέγονται κατά τον ίδιο τρόπο και χωρίς επιπρόσθετη ταλαιπωρία. Αλλα αντί να επιστρωθούν στη γυάλινη πλάκα, ο γιατρός τοποθετεί τα κύτταρα σε φιαλίδιο με διάλυμα συντήρησης. Επιπλέον, η επιστροφή στη γυάλινη πλάκα γίνεται αυτόματα με ειδική συσκευή. Αυτή η διαδικασία εξασφαλίζει τη συλλογή όλων των κυττάρων της λήψεως και τη σωστή συντήρηση και επιστροφή τους. Επιπλέον το Thin prep επιτρέπει πολλαπλές εξετάσεις στο ίδιο δείγμα χωρίς επαναληπτική επίσκεψη και λήψη.

6. Υπάρχουν στοιχεία ότι το Thin prep Παπ τεστ είναι πιο αποτελεσματικό

Εγκυρες κλινικές μελέτες που έχουν γίνει παγκοσμίως έχουν αποδείξει το Παπ τεστ με τη μέθοδο Thin prep δίνει ακριβέστερα αποτελέσματα από το συμβατικό κολπικό επίχρισμα. Το Thin prep Παπ τεστ αποτελεί σήμερα τη πιο ευαίσθητη μέθοδο προληπτικού ελέγχου και διάγνωσης βλαβών του τραχήλου της μήτρας.

(μικρόβια, ιοί, μύκητες, τριχομονάδες, κ.ά.).

Αν κάνετε τακτικά τεστ Παπανικολάου συμβάλλετε ενεργά στην σωματική σας υγεία.

3. Πώς γίνεται το τεστ Παπανικολάου

Ο γιατρός που κάνει το Παπ τεστ, ελαφρά ξύνει κύτταρα από τον τράχηλο της μήτρας με τη βοήθεια μια μικρής σπάτουλας και μιας βούρτσας. Τα κύτταρα επαλείφονται σε μία γυάλινη πλάκα την οποία και στέλνει στο εργαστήριο για μικροσκοπική εξέταση.

4. Υπάρχει περίπτωση βελτίωσης του τεστ Παπανικολάου

Η απλή επάλειψη στη γυάλινη πλάκα προκαλεί ακανόνιστη επίστρωση που δυσκολεύει την ακριβή αξιολόγηση. Επιπλέον, μελέτες έχουν αποδείξει ότι η πλειονότητα του υλικού των κυττάρων δεν επιστρώνεται στη γυάλινη πλάκα και απορρίπτεται με τη σπάτουλα ή το βουρτσάκι της λήψεως. Σήμερα, η τεχνική Thin prep δίνει λύσεις στους περιορισμούς του κλασσικού Παπ τεστ και αποτελεί τη πραγματική βελτίωση.

7. Τι γίνεται αν το Παπ τεστ δεν είναι φυσιολογικό

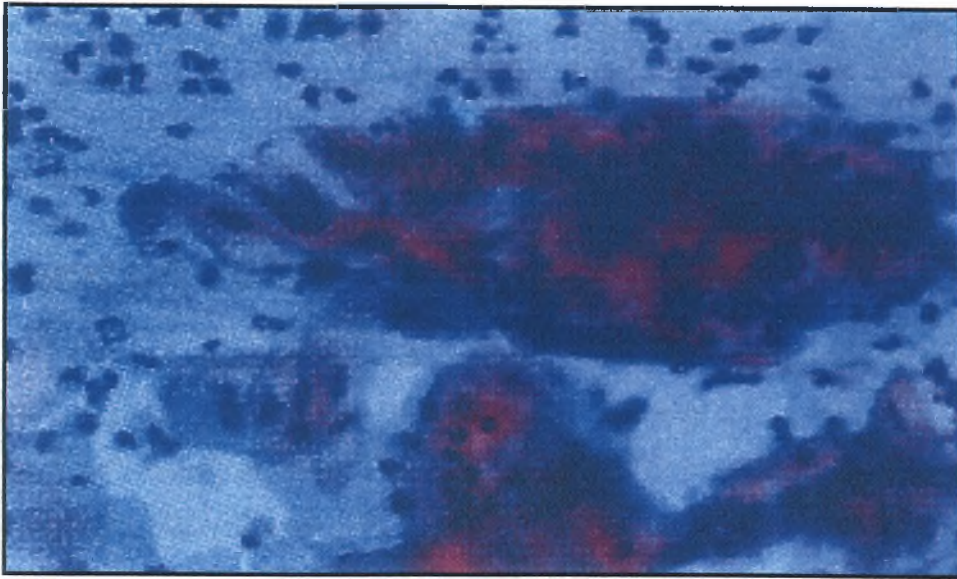
Αν το Παπ τεστ δεν είναι φυσιολογικό, αυτό δεν σημαίνει ότι έχετε καρκίνο! Αυτό συμβαίνει συχνά από κάποια φλεγμονή ή μόλυνση στον τράχηλο της μήτρας ή στον κόλπο. Όταν το Παπ τεστ δεν είναι φυσιολογικό, ο γιατρός σας θα σας συστήσει αμέσως τη πιο κατάλληλη θεραπεία για σας. Ζητήστε από το γιατρό να σας εξηγήσουν το τεστ και ό,τι θα επακολουθήσει.

8. Ποιός πρέπει να κάνει το τεστ Παπανικολάου

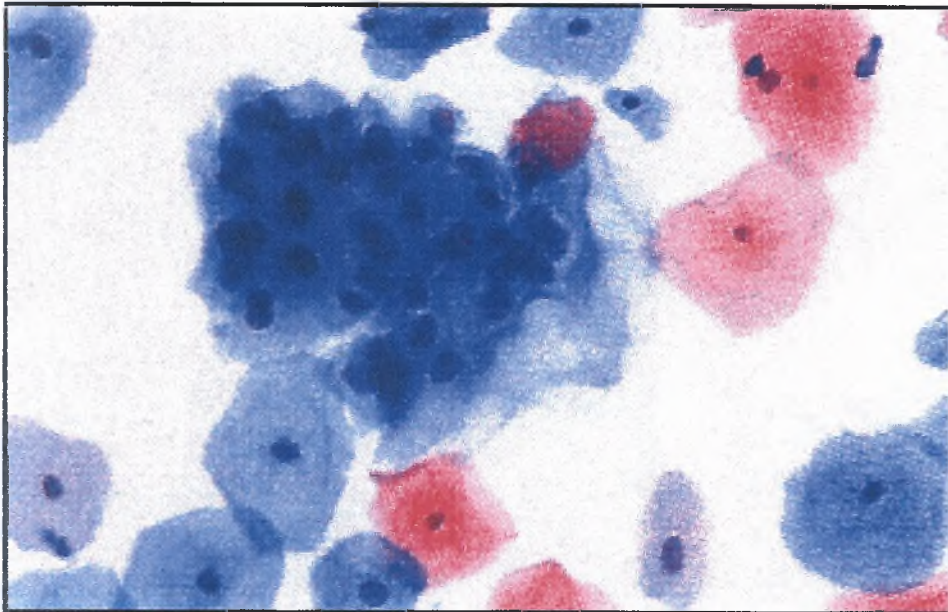
Όλες οι γυναίκες που είχαν ή έχουν ενεργή σεξουαλική ζωή πρέπει να κάνουν τακτικά το τεστ Παπανικολάου. Ακόμα κι αν δεν έχετε τώρα ενεργή σεξουαλική ζωή ή δεν έχετε περίοδο πια, πρέπει να κάνετε τακτικά τεστ Παπανικολάου.

9. Γιατί θα έπρεπε να ζητήσω το Thin prep Παπ τεστ

Το Thin prep Παπ τεστ είναι η πρώτη πραγματική βελτίωση του τεστ Παπανικολάου από την πρωτοεμφάνισή του πριν 50 χρόνια. Αυτό το νέο εξελιγμένο τεστ ενισχύει την εμπιστοσύνη σας για την πιστότητα της εξέτασης. Αποκτήστε τον έλεγχο του σωματός σας και ζηήστε από τον γιατρό σας το Thin prep Παπ τεστ σήμερα! (εικ. 15)



Κλασσικό επίχρησμα



Επίχρησμα με τη Thin Prep

Εικόνα 15.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η συγκριτική μελέτη των συνήθων τεχνικών της κυτταρολογίας (κλασσικό Pap test) με τις νέες μεθόδους της κυτταρολογίας υγρής φάσεως. (Thin prep Pap test). Περιλαμβάνει δείγματα που κατά καιρούς είχαν περισυλλεγεί από γυναίκες της Θεσσαλίας κατά την προηγούμενη επταετία και από δείγματα που είχαν εξεταστεί από την κατασκευάστρια εταιρεία του Thin prep. Οι δύο μέθοδοι σύγκρισης επιτελέστηκαν κατά την εξέταση αδενικών κυττάρων ενώ παράλληλα ελέχθησαν τα είδη της χλωρίδας που ανευρίσκονται στον κόλπο. Παρακάτω αναφέρονται τα πλεονεκτήματα της κάθε μιάς.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A' ΜΕΘΟΔΟΣ κλασσικό (Pap test)

Εξετάσθηκαν 7.040 κολπικά επιχρίσματα ισαριθμών γυναικών της Θεσσαλίας, ως επί το πλείστον κατοίκων του Νομού Λαρίσης, ηλικίας από 15-74 ετών, με μέσο όρο τα 42,5 έτη.

Τα κυτταρολογικά επιχρίσματα κατά Παπανικολάου λαμβάνονταν καθ' όλες τις ημέρες του κύκλου, πλην των ημερών της εμμηνου ρύσεως ή αιμορραγιών, καθώς και δύο ημέρες πριν και δύο ημέρες μετά την έμμηνο ρύση.

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη λήψη ήταν η αποχή από σεξουαλική επαφή και η μη εισαγωγή οιασδήποτε ουσίας στον κόλπο δύο τουλάχιστον ημέρες πριν από αυτή.

Στις γυναίκες που είχαν υποβληθεί σε τεχνητή έκτρωση, θεραπευτική ή δοκιμαστική απόξεση, η λήψη του Pap test γινόταν δύο μήνες μετά την εν λόγω επέμβαση.

Στις γυναίκες που γεννούσαν φυσιολογικά ή με καισαρική τομή, η λήψη γινόταν μετά την παρέλευση τριμήνου

Ουδέποτε ελήφθη υλικό κατά την κύηση.

Η λήψη του κυτταρολογικού επιχρίσματος κατά Παπανικολάου γινόταν με την βοήθεια μεταλλικών βαλβών, αποστειρωμένων σε ξηρό κλίβανο, σε θερμοκρασία 180 βαθμών Κελσίου επί δώρον και ήταν στεγνές, χωρίς χρησιμοποίηση οιασδήποτε λιπαντικής ή άλλης ουσίας.

Το επίχρισμα λαμβανόταν με ξύλινη σπάτουλα, εκ των πλαγίων τοιχωμάτων του άνω τριτημορίου του κόλπου.

Το υλικό επιστρωνόταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και εμονιμοποιείτο με cytospray (Zytologie Mezckofix της MERCK των 100 ml) από απόσταση 20-25 cm περίπου.

Την ίδια ημέρα ή τις αμέσως επόμενες 1-3 ημέρες ακολουθούσε η χρώση των επιχρισμάτων με την κλασσική κατά Παπανικολάου μέθοδο.

ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΗ ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ

Η επίστρωση του υλικού γίνεται σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Στη συνέχεια ακολουθεί η μονιμοποίηση του κυτταρολογικού επιχρίσματος, και αφού αφεθεί τουλάχιστον μισή ώρα για να στεγνώσει χρωματίζεται ως εξής:

- 1) Μονιμοποίηση σε οινόπνευμα 96° ή spray
- 2) 10 εμβαπτίσεις σε απεσταγμένο νερό
- 3) 10 εμβαπτίσεις σε 80° οινόπνευμα
- 4) 10 εμβαπτίσεις σε 70° οινόπνευμα
- 5) 10 εμβαπτίσεις σε 50° οινόπνευμα
- 6) 10 εμβαπτίσεις σε απεσταγμένο νερό
- 7) 5' (λεπτά) στην αιματοξυλίνη Harris
- 8) ξέπλυμα πολύ καλό σε τρεχούμενο νερό βρύσης 3-5'
- 9) 10 εμβαπτίσεις σε απεσταγμένο νερό
- 10) οξυνισμένο νερό 2-4 βουτιές
- 11) 10 εμβαπτίσεις σε απεσταγμένο νερό
- 12) 10 εμβαπτίσεις σε 50° οινόπνευμα
- 13) 10 εμβαπτίσεις σε 70° οινόπνευμα
- 14) 10 εμβαπτίσεις σε 70° οινόπνευμα
- 15) 10 εμβαπτίσεις σε 80° οινόπνευμα
- 16) 10 εμβαπτίσεις σε 90° οινόπνευμα
- 17) 5' (λεπτά) σε orange g
- 18) 10 εμβαπτίσεις σε 96° οινόπνευμα
- 19) 10 εμβαπτίσεις σε 96° οινόπνευμα
- 20) 5' (λεπτά) = σε E.A. 50 POLYCROM
- 21) 10 εμβαπτίσεις σε 96° οινόπνευμα
- 22) 10 εμβαπτίσεις σε 96° οινόπνευμα
- 23) 10 εμβαπτίσεις σε 100° οινόπνευμα
- 24) 10 εμβαπτίσεις σε acetone
- 25) διάγωση ξυλόλες από (1-5')
- 26) κάλυψη

Η εξέταση των κεχρωσμένων κυτταρολογικών παρασκευασμάτων γινόταν με φωτομικροσκόπιο OLYMPUS BX 40 υπό μεγέθυνση X100 και X400 φορές. Επιλεγμένες περιπτώσεις καταγράφονταν σε έγχρωμο αρνητικό φωτογραφικό φιλμ FUJICROME Sensia 100.

B' ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΕΩΣ THIN PREP

Με την δεύτερη μέθοδο (Thin Prep test) σύμφωνα με τον κατασκευαστή έχουμε μία αύξηση 55% πάνω από την τυπική κηλίδα PAP. Γι' αυτό έγινε εκτίμηση του Thin Prep Pap test σε κλινική πρακτική.

Το σχέδιο μελετών έγινε από 12 πρακτικούς, 60 ιατρούς και συμπεριελάμβανε ένα τμήμα του πληθυσμού. Ο ιατρός ήταν κατάλληλος και υπήρχε και συγκριτικό σώμα μελέτης. Οι ασθενείς εξετάστηκαν σε δύο στάδια πρώτα με την τυπική μέθοδο Pap test.

Αυτό επιτελέστηκε από τον Ιανουάριο έως τον Δεκέμβριο του 1996 ο αριθμός των οποίων έδωσε 18,613 δείγματα. Τον επόμενο χρόνο κατά τους μήνες Απρίλιο έως Σεπτέμβριο του 1997 εξετάστηκαν 8.574 δείγματα με την νέα μέθοδο του Thin prep Pap test. Τα δείγματα του Thin prep συγκεντρώθηκαν απευθείας σε φιαλίδια.

ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΝΕΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ (ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΕΩΣ)

Χρησιμοποιούνται πάντα γάντια χωρίς πούδρα.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΛΑΚΙΔΙΩΝ

Στο SLIDE COAT για 3'. Στέγνωμα στον αέρα. Τα πλακίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν εντός 3-4 ημερών.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Τοποθετούνται σε όλα τα σωληνάρια 1 γραμμή με μαρκαδόρο στα 4 ML.
2. Σε κάθε σωληνάριο τοποθετούνται 4 ML DENSITY REAGENT. Πρέπει το DENSITY REAGENT να τοποθετείται ΠΡΩΤΟ ΣΤΟ ΣΩΛΗΝΑΡΙΟ.
3. Ανακίνηση των φιαλιδίων με την ξύστρα και μεταφορά όλου του υλικού από το φιαλίδιο στο σωληνάριο σιγά σιγά για να μην αναμειχθούν τα δύο υγρά.
4. Τοποθέτηση στα ειδικά στατώ.
5. Τοποθέτηση στα στατώ της φυγοκέντρου.
6. Ζύγιση στα στατώ και μέριμνα ώστε να καταστούν ισοβαρή.
7. Φυγοκέντρηση στις 1080 στρ. για 2'.
8. Εξαγωγή των στατώ από τη φυγόκεντρο και πάω στον νεροχύτη όπου έχει τοποθετηθεί αναρροφητήρας.
9. Με αναρρόφηση αφήνοντας 4 ML σε κάθε σωληνάριο.
10. Ζύγιση.
11. Φυγοκέντρηση στις 2160 στρ. για 10'.
12. Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και στράγγισμα σε χαρτοβάμβακα.
13. Ετοιμάζονται στατώ (σωληνάρια, μύτες, πλακάκια). Αρίθμηση των πλακιδίων.
Τοποθέτηση κυλίνδρων πάνω στα πλακάκια.
14. Έγχυση 1 ML DW σε όλα τα σωληνάρια.
15. Τοποθέτηση 250 ML DW σε όλα τα κυλινδράκια CHAMBER.
16. Ανακίνηση των σωληναρίων με έγχυση 50 ML στο εσωτερικό κύλινδρο.
Προστίθενται στο σωληνάριο 2 ML DW και από αυτό βάζω 50 ML στο εξωτερικό σωληνάριο. Δηλαδή γίνεται αραιώση σε 1 ML και σε 3 ML. Πάντα η αραιώση πρέπει να έχει διαφορά 2 ML.
17. Μετακίνηση του κυανού πάματος.
18. Απόρριψη του ρύγχους της πιπέτας.
19. Σκούπισμα της πιπέτας.
20. Τοποθέτηση νέου ρύγχους.

Αναμονή επί τουλάχιστον 15'.

Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και στράγγισμα με χαρτοβάμβακα.

Στέγνωμα είτε σε κλίβανο επί 15-20 λεπτά ή με αεροβόλο συσκευή ή στον ατμοσφαιρικό αέρα.

ΧΡΩΣΗ

- Αιματοξυλίνη
- ORANGE
- POLYCHROME (E.A.)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Α΄ ΜΕΘΟΔΟΥ

H¹² εξέταση της κολπικής χλωρίδας 7.040 δειγμάτων γυναικών της Θεσσαλίας ελέγχθησαν με το κλασικό Pap test έδωσε τα εξής αποτελέσματα σύμφωνα με τη διδακτορική διατριβή του κ. Αθανασίου Ντάνου (ιατρού γυναικολόγου, μαιευτήρα)

ΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ

- 1) Στις ½ περίπου των περιπτώσεων (47%), η χλωρίδα αποτελούνταν από κολποβακίλλους Doderlein.
- 2) Σε ποσοστό 2,87%, η χλωρίδα αποτελούνταν όχι μόνον από συνήθων διαστάσεων κολποβακίλλους αλλά σε ποικίλη αναλογία και από επιμήκεις μορφές των.
- 3) Σε ποσοστό 0,003, η χλωρίδα απετελείτο από κολποβακίλλους και βραχείες μορφές των.
- 4) Σε αξιόλογο ποσοστό (14,685%), η χλωρίδα απετελείτο από βακίλλους οι οποίοι όμως είτε λόγω μεγέθους, είτε λόγω διατάξεώς των, είτε τέλος λόγω της αποχρώσεώς των έδειχναν να μην είναι κολποβάκιλλοι. Δεν επιχειρήθηκε διάκριση των εν λόγω βακίλων σε παθογόνους και σαπροφυτικούς βάσει της κλινικής εικόνας (κλινικά σημεία κολπίτιδας ή του αποτελέσματος της μικροβιολογικής εξέτασης).
- 5) Σε μικρό αριθμό περιπτώσεων (2,86%), η χλωρίδα απετελείτο από ποικίλων διαστάσεων (μήκους και πάχους) βακίλλους.
- 6) Σε ποσοστό 0,69%, η χλωρίδα αποτελούνταν από σπορογόνους βακίλλους, στο ποσοστό των οποίων πρέπει να προστεθεί το εντελώς ασήμαντο ποσοστό 0,01% που αφορούσε συνύπαρξη κολποβακίλων και σπορογόνων βακίλων

- καθώς επίσης το ποσοστό **0,01%** που αφορούσε επιμήκεις και σπορογόνους βακίλλους και το ποσοστό **0,01%** που αφορούσε ποικίλου μήκους βακίλλους μερικοί εκ των οποίων ήσαν σπορογόνοι (σύνολο **0,81%**).
- 7) Σε ποσοστό **0,03%**, η χλωρίδα απετελείτο από βραχείς και επιμήκεις αλλά, του ίδιου πάχους, βακίλλους.
 - 8) Σε ποσοστό **0,76%**, η χλωρίδα απετελείτο από αμιγώς βραχείς βακίλλους.
 - 9) Σε ποσοστό **0,02%**, η χλωρίδα απετελείτο από κολποβακίλλους και κορυνοειδή βακτηρίδια.
 - 10) Σε ποσοστό **1,45%**, από κολποβακίλλους και νηματώδεις βακίλλους.
 - 11) Σε ποσοστό **0,03%**, από ποικίλου μεγέθους και νηματώδεις μορφές των.
 - 12) Σε ποσοστό **0,01%**, από βραχείς και νηματώδεις βακίλλους.
 - 13) Σε ποσοστό **0,02%**, από επιμήκεις και νηματώδεις βακίλλους.
 - 14) Σε ποσοστό **0,01%**, από σπορογόνους και νηματώδεις βακίλλους.
 - 15) Σε ποσοστό **0,05%**, από αμιγώς κορυνοειδή βακτηρίδια.
 - 16) Σε ποσοστό **0,01%**, η χλωρίδα απετελείτο από κολποβακίλλους, επιμήκεις μορφές των και κορυνοειδή βακτηρίδια.
 - 17) Σε ποσοστό **0,02%**, η χλωρίδα απετελείτο από κολποβακίλλους και εξωκυττάριους διπλοκόκκους.
 - 18) Σε ποσοστό **0,06%**, η χλωρίδα απετελείτο από βακίλλους και στρεπτοκοκκικώς διατεταγμένους κόκκους.
 - 19) Σε ποσοστό **0,01%**, η χλωρίδα απετελείτο από βακίλλους, επιμήκεις μορφές των και στρεπτοκοκκικώς διατεταγμένους κόκκους. Ενώ επίσης σε ποσοστό **0,01%**, απετελείτο από βραχείς βακίλλους και στρεπτοκοκκικώς διατεταγμένους κόκκους.
 - 20) Σε ποσοστό **0,16%**, η χλωρίδα απετελείτο από βακίλλους και σταφυλοκοκκικώς διατεταγμένους κόκκους.
 - 21) Σε ποσοστό **0,02%**, η χλωρίδα απετελείτο από βραχείς βακίλλους και κόκκους χωρίς συγκεκριμένη διάταξη.
 - 22) Σε ποσοστό **0,01%**, η χλωρίδα απετελείτο από ποικίλου μεγέθους βακίλλους και κόκκους.
 - 23) Σε ποσοστό **0,07%**, η χλωρίδα απετελείτο από κόκκους, βακίλλους, κορυνοειδή βακτηρίδια και κόκκους.
 - 24) Σε ποσοστό **0,03%**, η χλωρίδα απετελείτο από βακίλλους και λεπτότριχες.

- 25) Σε ποσοστό **0,01%**, παρατηρήθηκαν βάκιλλοι διατεταγμένοι σε θυσανωτούς ή αλυσιδωτούς σχηματισμούς (στρεπτοβάκιλοι).
- 26) Σε ποσοστό **0,03%**, παρατηρήθηκαν βάκιλλοι και συμπλήματα ακτινομυκήτων.
- 27) Σε ποσοστό **0,02%**, παρατηρήθηκαν ποικίλου μεγέθους και σχήματος βάκιλλοι οι οποίοι σε ακραίες περιπτώσεις σχημάτιζαν «θηλιές».

ΚΟΚΚΟΙ

- 1) Σε ποσοστό **14,15%**, η χλωρίδα απετελείτο από άφθονα κοκκοβακτηρίδια (ως επί το πλείστον με τυπικούς κυτταρολογικούς χαρακτήρες κολπίτιδας από *Gardnerella vaginalis*).
- 2) Σε ποσοστό **0,2%**, η χλωρίδα απετελείτο από αμιγώς στρεπτοκοκκικώς διατεταγμένους κόκκους.
- 3) Σε ποσοστό **0,07%**, η χλωρίδα απετελείτο από αμιγώς σταφυλοκοκκικώς διατεταγμένους κόκκους.
- 4) Σε ποσοστό **0,02%**, η χλωρίδα απετελείτο από αμιγώς κατά ζεύγη διατεταγμένους κόκκους (διπλοκόκκους).

ΤΡΙΧΟΜΟΝΑΔΕΣ

- 1) Σε ποσοστό **0,91%**, η χλωρίδα απετελείτο από τριχομονάδες, μικρούς βακίλλους και κόκκους.
- 2) Σε ποσοστό **0,01%**, στα αμέσως προαναφερθέντα συνυπήρχαν ακτινομύκητες.

ΒΑΚΙΛΛΟΙ ΚΑΙ ΚΟΚΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ

- 1) Σε ποσοστό **5,13%**, συνύπαρξη βακίλλων και κοκκοβακτηριδίων (μικτή χλωρίδα κόλπου).
- 2) Σε ποσοστό **0,05%**, συνύπαρξη κανονικού μήκους βακίλλων, νηματώδων μορφών των και κοκκοβακτηριδίων.
- 3) Σε ποσοστό **0,17%**, η χλωρίδα απετελείτο από επιμήκεις βακίλλους και κοκκοβακτηρίδια.
- 4) Σε ποσοστό **0,10%**, από νηματώδεις μορφές βακίλλων και κοκκοβακτηρίδια.
- 5) Σε ποσοστό **0,04%**, από βακίλους, σπορογόνους βακίλλους και κοκκοβακτηρίδια.
- 6) Σε ποσοστό **0,05%**, από σπορογόνους βακίλλους και κόκκους.

ΜΥΚΗΤΕΣ

- 1) Σε ποσοστό **6,85%**, συνυπήρχαν μύκητες με κολποβακίλλους ή απροσδιορίστου είδους βακίλλους.
- 2) Σε ποσοστό **0,13%**, συνυπήρχαν μύκητες με κολποβακίλλους και επιμήκεις μορφές των.
- 3) Σε ποσοστό **0,13%**, συνυπήρχαν μύκητες με νηματώδεις βακίλλους.
- 4) Σε ποσοστό **0,01%**, συνυπήρχαν μύκητες με κορυνοειδή βακτηρίδια.
- 5) Σε ποσοστό **0,03%**, συνυπήρχαν μύκητες με βραχείς βακίλλους.
- 6) Σε ποσοστό **0,15%**, συνυπήρχαν μύκητες με βακίλλους και κοκκοβακτηρίδια.
- 7) Σε ποσοστό **0,01%**, συνυπήρχαν μύκητες με σπορογόνους βακίλλους και στρεπτοκοκκικώς διατεταγμένους κόκκους.
- 8) Σε ποσοστό **0,04%**, συνυπήρχαν μύκητες μόνον με κοκκοβακτηρίδια.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Β' ΜΕΘΟΔΟΥ

Σύμφωνα με την κατασκευάστρια εταιρεία

Το Thin Prep έδειξε μια αύξηση 55% στην ανίχνευση του HGSIL/CA (υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης πλακώδους επιθηλίου).

Το HGSIL/CA ανιχνεύεται στον τράχηλο.

Με το τυπικό PAP TEST το 0,45% δηλ. (83/18.569), ενώ με το Thin prep στο 0,7% (60/8541).

Συγκριτικά αποτελέσματα κυτταρικών αλλοιώσεων

Η προσωπική μου κυτταρολογική μελέτη των παρασκευασμάτων μέσω επίδειξης των δειγμάτων που μου παρουσιάστηκαν από τον κύριο Αντωνακόπουλο έδειξε ότι υπάρχει σημαντική μείωση του αριθμού των μικροβίων στα εν λόγω επιχρίσματα, σε σχέση με τους αριθμούς αυτών στα συνήθη κυτταρολογικά παρασκευάσματα.

Μοναδική εξαίρεση αποτελούσαν οι τριχομονάδες, οι οποίες ίσως λόγω του σχετικώς μεγάλου μεγέθους τους συμπεριφέρονταν σαν μικρά κύτταρα. Ως εκ τούτου η ημετέρα άποψις είναι ότι υπάρχει σαφής υπεροχή της κλασικής μεθόδου έναντι της κυτταρολογίας υγρής φάσεως όσον αφορά την μελέτη της χλωρίδας του κόλπου:

A) Σε ότι αφορά τα κύτταρα, στα μεν κολπικά επιχρίσματα όπου εξετάζουμε κυρίως την ορμονική κατάσταση της γυναίκας, η λεπτότερη επίστρωση των κυττάρων που προσφέρει η κυτταρολογία υγρής φάσεως δεν αποτελεί άξιο λόγου πλεονέκτημα.

B) Σε ότι αφορά τη μελέτη των κυττάρων στο τραχηλικό επίχρισμα παρατηρείται πράγματι λεπτή επίστρωση των πλακωδών κυττάρων σαφώς λεπτότερη απ' ότι επιτυγχάνεται με την κλασική μέθοδο. Αντιθέτως αδενικά κύτταρα απεικονίζονται μικρότερα καθώς με την κυτταρολογία υγρής φάσεως *επικάθονται* κάτω πλάγια στην αντικειμενοφόρο πλάκα ενώ με την κλασική μέθοδο *επιστρώνονται* πάνω σε αυτήν.

Κατά την κατασκευάστρια εταιρεία η ανίχνευση προκαρκινικών αλλοιώσεων, επιτυγχάνεται με μεγαλύτερη ακρίβεια απ' ότι με την κλασική μέθοδο. Αυτό όμως πρέπει να αποδειχθεί από ανεξάρτητους ερευνητές.

Πάντως και σ' αυτόν τον τομέα η κλασική μέθοδος υπερτερεί έναντι της κυτταρολογίας υγρής φάσεως ως προς το ότι εξετάζονται, όλα σχεδόν τα κύτταρα που αποσπώνται από τον τράχηλο. Ενώ από τα δείγματα της υγρής φάσεως εξετάζεται ένα μικρό ποσοστό κυττάρων αφού μέγας αριθμός αυτών παραμένει στο φιαλίδιο όπου αρχικώς τοποθετήθηκαν χωρίς ποτέ να εξεταστούν.

Βάσει των ανωτέρω φρονούμε ότι η κυτταρολογία υγρής φάσεως χρήζει περαιτέρω διευκρινήσεως και εκτιμήσεως των δυνατοτήτων και των σχετικών μειονεκτημάτων ή πλεονεκτημάτων αυτής.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Εκτός από τα όσα αναφέρονται από την κατασκευάστρια εταιρεία του Thin prep και την διδακτορική διατριβή του γυναικολόγου-μαιευτήρα η προσωπική εξέταση των δειγμάτων και με τις δύο μεθόδους (κλασικό Pap test και Thin prep) μας οδήγησε στα εξής συμπεράσματα:

Η τεχνική της λεπτής επιστρώσεως (thin layer) όχι μόνο ενισχύει τις δυνατότητες των κυτταρολογικών εργαστηρίων αλλά επίσης έχει και τα ακόλουθα πλεονεκτήματα. Συγκεκριμένα προσφέρει:

- α) Καθαρά, καλοδιατηρημένα επιχρίσματα.
- β) Αντιπροσωπευτικό δείγμα ολοκλήρου του κυτταρικού πληθυσμού.
- γ) Εξαιρετική διατήρηση της μορφολογίας.
- δ) Ομοιόμορφη επίστρωση
- ε) Εύκολη και ταχεία κυτταρολογική εξέταση

Ωστόσο σε κανένα από αυτά άμεσα, δεν υπερέρχει από το κλασικό Pap test. Τελικά η παρούσα μελέτη έδειξε ακόμη μια φορά ότι η κυτταρολογική εξέταση κατά Παπανικολάου αποτελεί ίσως μια από τις πλέον αξιόπιστες μακρόβιες, απλές και φτηνές εργαστηριακές εξετάσεις χωρίς να απαιτεί ιδιαίτερη υποδομή παρέχει τη δυνατότητα αντήσεως πολύτιμων πληροφοριών όχι μόνο για την ύπαρξη ή μη κακοήθειας στο κατώτερο γεννητικό σύστημα του θήλεος αλλά και πρόσθετες ακριβείς πληροφορίες α) για την αρμονική κατάσταση της γυναίκας, β) για την ύπαρξη αρμονίας ή δυσαρμονίας κατά τας ημέρας του κύκλου, της ορμονικής καταστάσεως, το είδος της χλωρίδας του κόλπου (παθολογικό ή φυσιολογικό) καθώς και της παρουσίας ή μη φλεγμονοδών κυττάρων.

Στην παρούσα μελέτη συγκρίθηκε η κλασσική μέθοδος Παπανικολάου με τη προσφάτως εισαχθείσα κυτταρολογία υγρής φάσεως. Η μελέτη των επιχρισμάτων με την κλασσική (χειρονακτική μέθοδο) άμεσης επιστρώσεως του κυτταρολογικού υλικού από την σπάτουλα και την ψήκτρα κατευθείαν στην αντικειμενοφόρο πλάκα έδειξε ότι η διατήρηση των κυττάρων είναι άριστη τα δε μικρά κύτταρα (αδενικά και λευκοκύτταρα) καθώς απλώνονται επάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα καθίσταται ευρύτερα και λεπτότερα γεγονός που επιτρέπει την καλύτερη παρατήρηση τους και την άντληση περισσότερων πληροφοριών. Η απλότης της κλασσικής μεθόδου και το

ασήμαντο κόστος της έχει επιστρέψει στην περιοχή της Θεσσαλίας τον κυτταρολογικό έλεγχο ακόμη και κτηνοτρόφων γυναικών.

Με την νέα τεχνική της κυτταρολογίας υγρής φάσεως το υλικό λαμβάνεται με ψήκτρα και τοποθετείται με τη μορφή εναιωρήματος κυττάρων μέσα σε φυαλίδιο περιέχων μονιμοποιητικό υγρό.

Κύτταρα εν του εν λόγω εναιωρήματος επιστρώνονται με φυγοκέντρηση επί αντικειμενοφόρου πλάκας και χρωματίζονται κατά τον συνηθή τρόπο. Η κατασκευάστρια εταιρεία διέθεσε τεράστια ποσά για την διαφήμιση της μεθόδου και την προβολή των αποτελεσμάτων της μέσω των περιοδικών κυτταρολογίας. Δυστυχώς η κατασκευάστρια εταιρεία με το πρόσχημα ενημερώσεως του κοινού διεφήμισε και στις γυναίκες τη μέθοδό της, γεγονός που είχε ως συνέπεια τον κλονισμό της εμπιστοσύνης των γυναικών προς την κλασική μέθοδο Παπανικολάου. Αυτό δυνητικά μπορεί να αποβεί εις βάρος των γυναικών και κυρίως εκείνων που ανήκουν στην ομάδα υψηλού κινδύνου (φτωχές γυναίκες με πολλούς ερωτικούς συντρόφους), οι οποίες κατά τεκμήριον δεν είναι εύκολο να διαθέσουν επιπλέον χρήματα για την νέα μέθοδο.

Η νέα μέθοδος υπερτερεί ως προς το ότι το περισσεύον κυτταρολογικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανοσοκυτταρολογικές μελέτες. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι αυτές οι ειδικές εξετάσεις απαιτούνται για πολύ μικρό ποσοστό των γυναικών και στις οποίες περιπτώσεις είναι εύκολη και ανώδυνη η εκ νέου λήψη κυτταρολογικού υλικού με τη κλασική μέθοδο. Ως εκ τούτου πιστεύουμε ότι ο κυτταρολογικός έλεγχος του κατωτέρου γεννητικού συστήματος του θήλεος πρέπει να γίνεται με τη κλασική μέθοδο Παπανικολάου, η δε κυτταρολογία υγρής φάσεως να φυλάσσεται για συγκεκριμένες μόνο περιπτώσεις, (κατ' εξοχήν για την ανίχνευση και ταυτοποίηση στελεχών του ιού HPV του ανθρώπου). Φρονούμε ότι η κλασική μέθοδος κατά Παπανικολάου παραμένει και κατά τα φαινόμενα θα παραμείνει πολύ ακόμη, μια από τις πλέον απλές, αξιόπιστες και φθηνές ιατρικές εξετάσεις γεγονός που καθιστά διαχρονική την πελώρια προσφορά προς την ανθρωπότητα του μεγάλου συμπατριώτη μας Γεωργίου Παπανικολάου.

S U M M A R Y

In the present diploma thesis vaginal smears which had been prepared both by the usual technique as well as by the liquid phase method were investigated in order to examine, the capabilities of the cytological examination in the identification of normal or pathologic flora present in the vagina, as well as the comparative advantages and disadvantages of the two techniques.

The frequently observed combined presence of various categories of microorganism was also studied in detail.

The material had been taken from adult women of urban or rural origin, mainly inhabitants of the Larissa prefecture. The women examined were 15 – 74 years of age with a mean age of 42,5 years.

From the study of our material we conclude that the pap test of vaginal smears distinguishes the different types of bacteria colonizing the vagina, a fact which allows their easy and detailed examination with the objective lens X 40 it also permits the quick (within a few hours) identification of the normal or pathologic microorganisms, or combination of microorganisms, in all instances with the exception of the various kinds of short bacilli.

In that case, because of the similarities of the various kinds of bacilli with regard to size and staining properties, distinguishing particular types is not feasible and requires microbiological methods.

As expected in approximately half the cases, the vagina flora consisted of Doderlein bacilli.

In the vast majority of postmenopausal women the flora consisted of cocobacilli. The comparative study of the usual technique of preparing cytological smears to that of the liquid phase revealed that the regular technique is superior in the depiction of glandular cells and elements of the flora where as the modern technique of liquid phase is better in so far as it allows.

The immunocytochemical study of the material, whenever this is required, without the necessity of obtaining new material. A very important disadvantage of the modern method is the cost of the required reagents, which is something that renders its use prohibitive, concerning programs of mass screening of the female population.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Coppleson LW, Brown B.** Estimation of screening error rate from the observed detection rates in repeated cervical cytology. *Am J Obstet Gynecol* 1974; 119: 953-958.
2. **Denher LP.** Cervicovaginal cytology, false negative results and standards of practice. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 45-47.
3. **Carr J. Human Papillomaviruses: Clinics in Laboratory Medicine,** Saunders W.B.Co. Philadelphia, 2000;20(2):235-437, 369-382
4. **Gartner L. P., Hiatt J. L.:** Ιστολογία, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα, 2002:1-10, 503-521.
5. **Gay JD, Donaldson LD, Goelner JR.** False negative results in cervical cytologic studies. *Acta Cytol* 1985; 29: 1043-1046.
6. **Goodman A, Hutchinson M.** Cell surplus on sampling devices after routine cervical cytologic smears. A study of residual cell populations. *J Reprod Med* 1996; 239-275.
7. **Helmut L.:** Ιστολογία, Κυτταρολογία και Μικροανατομία του Ανθρώπου (μτφρ: Ν. Νηφόρου), Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα, 1989: 1-20.
8. **Κόκκορη Μ.:** Γεώργιος Ν. Παπανικολάου- Μέσα από τη ζωή και το έργο του- Βιογραφικά, Επιστολές, Αναμνήσεις, Κέδρος.
9. **Κύρκου Κ. Α., Ιωακείμ-Λιόση Ι, Αθανασιάδου Π.:** Διαγνωστική Κυτταρολογία, Ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδη, 1995: 43-66, 73-89.
10. **Mould T.A.J., Singer A.S.:** Human Papillomavirus testing for diagnostic triage of minor grade cytological abnormalities: the European perspective, New developments in cancer screening and prevention, Edited by Eduardo Franco and Joseph Monsonego, Blackwell science Oxford, London, USA. 1997, PP:354-363

11. Μουτούση-Ευστρατιάδου Μ.: Γυναικολογική Κυτταρολογία, Επιστημονικές εκδόσεις «Γρηγόρης Παρισιάνος- Μαρία Γρ. Παρισιάνου», Αθήνα, 1996: 17-32.
12. Ντάνος Α.: Μορφολογική μελέτη δια της κυτταρολογικής μεθόδου της χλωρίδας του κόλπου στον γυναικείο πληθυσμό του νομού Λάρισας, διδακτορική διατριβή, Λάρισα, 2001: 55-60.
13. Παναγιωτόπουλος Β.: Πρόσωπα του 20^{ου} αιώνα Έλληνες που σημάδεψαν τον 20^ο αιώνα, Νέα Σύνορα Λιβάνη, Αθήνα, 2000.
14. Richart RM, Valiant HW. Influence of cell collection techniques upon cytologic diagnosis. *Cancer* 1965; 18: 1474-1478.
15. Rubio CA. The false negative smear: II. The trapping effect of collecting instruments. *Obstet Gynecol* 1977; 49: 576-580.
16. Sedlacek T.V.: Advances in the diagnosis and treatment of Human Papillomavirus infections, *Clinical Obst. And Gyn.*, 1999; 42(2):206-220.
17. Stoler M.H. Can new technologies eliminate the uncertainty in Pap smear cytology? United States and Canadian Academy of Pathology, 2000 Companion Meeting.
18. Van der Graaf Y, Vooijs GP, Gallard HLT, Go DMDS. Screening errors in cervical cytologic screenings. *Acta Cytol* 1987; 31: 434-438.
19. Vooijs GP, Elias A, van der Graaf Y, et al. The influence of sample takers on the cellular composition of cervical smears. *Acta Cytol* 1986; 30: 251-257.