

PRIPRAVA TKIVA ZA MIKROSKOPSKI PREGLED

Alenka Kljun

UVOD

Moderna patologija zahteva od laboratorijske strokovne ekipe vse bolj obdelane tkivne vzorce. Obenem je število preiskav vsako leto večje. V patologiji že dolgo uporabljamo veliko število barvnih tehnik, v zadnjem času so prav zaradi novih zahtev postale za patologa pomembne nove, natančnejše metode: encimska histokemija, imunohistokemija, elektronska mikroskopija, molekularna biologija. S temi metodami lahko patolog prepozna tkivne strukture mnogo natančneje, kakor jih je iz klasičnih barvanj. Za uspešno aplikacijo teh metod na tkivnih vzorcih je zelo pomembno dobro strokovno sodelovanje med hospitalnimi oddelki in oddelkom za patologijo.

Biopsijski vzorec dobimo v laboratorij skupaj z napotnico za histološko preiskavo. Na njej morajo biti natančno vpisani podatki, ki jih potrebuje patolog. Tkivne vzorce in napotnice na patologiji oštevilčimo z zaporednimi številkami, ki spremljajo vzorec med vso obdelavo.

Iz tkiva, ki ga z različnimi posegi odvzamejo živemu človeku (biopsija) ali pri obdukciji, izdelamo v laboratoriju histološke preparate. S histološkimi tehnikami, ki obsegajo številne postopke, pripravimo tkivo za mikroskopski pregled.

Naslov avtorice: Alenka Kljun, ing. farmacije, Onkološki inštitut, Ljubljana

HISTOLOŠKE TEHNIKE

1. Histološki preparat je približno 3 mikrometre debela rezina tkiva na objektnem stekelcu, ki jo obarvamo po različnih barvnih metodah.

Osnovni postopki histološke tehnike, s katero iz tkivnih vzorcev izdelamo histološki preparat, so:

fiksacija, dehidracija, prepajanje, rezanje, barvanje.

2. Pravilna fiksacija je najpomembnejši postopek v izdelavi histoloških preparatov. Tkivo ohrani v čim bolj naravni obliki in ima naslednje učinke:

- prepreči avtolizo in gnitje tkiva,
- ohrani morfološko in kemijsko strukturo tkiva,
- daje tkivu primerno čvrstino.

Tkivo **takoj** po odvzemu fiksiramo v tistem fiksativu, ki je najprimernejši za vrsto postopkov in preiskav, ki potekajo v laboratoriju.

Najpogostejši in najprimernejši fiksativ je 10 % nevtralni pufran formalin (pH 7), ki ga uporabljamo tudi na našem oddelku. Priporočam, da ga laboratoriji za patologijo pripravljajo sami in ga razdelijo bolnišničnim oddelkom. Volumen fiksativa mora biti 10 x večji od volumna tkivnega vzorca.

3. Sveže tkivne vzorce takoj po prejemu označimo s številko, stehtamo in fiksiramo, ali pa shranimo v hladilniku pri 4° C.

Vzporedno s fiksacijo pripravimo pri nekaterih vrstah tumorjev tudi tkivo za dodatne postopke:

-Pri kirurško odstranjeni dojki vzamemo iz tumorja koščke za določitev estrogenih in progesteronskih receptorjev. Tkivo dojke mora biti prineseno v laboratorij na ledu, po odvzemu pa ga vložimo v tekoči dušik.

- Za elektronskomikroskopsko preiskavo in preiskavo kostnega mozga fiksiramo vzorce v glutaraldehidnem fiksativu.

- Nekateri tkivne komponente fiksativ delno ali povsem uniči. Za določanje teh komponent del tkivnega vzorca posebej pripravimo in shranimo na -70°C za kasnejše imunohistokemične in druge preiskave.

- Pri nekaterih tkivnih vzorcih odvajamo vzorec za pretočno citometrijo in ga shranimo pri -20°C .

Za vse te postopke imamo natančna navodila, ki jih moramo ob prejemu tkivnih vzorcev upoštevati.

4. Naslednje jutro patolog tkivne vzorce makroskopsko opiše, odvzame reprezentativne koščke tkiva, jih vriše v skico in položi v perforirane plastične kasete. Te so označene s številko vzorca in imajo odgovarjajočo oznako. Že fiksirani, manjši tkivni vzorci gredo takoj v avtomatsko obdelavo (dehidracija, bistrenje, prepa-janje s parafinom ali podobnim medijem). Reprezentativne koščke vzorcev, ki so bili čez noč v hladilniku, fiksiramo do naslednjega dne.

5. Avtomatska obdelava tkiva poteka v histokineti, kjer kasete s tkivom v kovinskem nosilcu potujejo skozi različne reagentne do medija za vklop. To je lahko čisti parafin s tališčem od $56-58^{\circ}\text{C}$, vedno pogosteje pa uporabljamo za našo tehniko posebej prirejen sintetični parafin.

Avtomatska obdelava tkiva traja 22 ur.

6. Iz tkiva, parafina in dela kasete naredimo parafinske bloke. Koščke tkiva položimo v kovinske modelčke, ki so na topli plošči. Na modelček položimo del kasete z oznako in vse troje zalijemo s parafinom. Modelčke nato položimo na hladno ploščo (-15°C), kjer se parafin strdi. Po 10 minutah parafinski blok odstranimo iz modelčka. S tem je tkivo pripravljeno za rezanje.

7. Na mikrotomu z mikrotomskim nožkom iz žlahtnega jekla odrežemo s parafinskega bloka približno 3 mikrometre debelo rezino tkiva, ki jo v vodni kopeli razprostremo in ujamemo na objektno stekelce, označeno z odgovarjajočo številko in oznako. Stekelce s tkivom 30 minut sušimo pri 60° C in nato obarvamo po rutinski hematoksilin-eozin (H-E) metodi. Dehidrirano tkivno rezino nato prekrijemo s sredstvom za mikroskopiranje in pokrovnim stekelcem. Tako izdelamo histološki preparat, ki je pripravljen za svetlobno mikroskopiranje.

8. H-E metoda je osnovna tehnika v laboratoriju za patologijo. Hematoksilin obarva jedra, eozin pa citoplazmo in njene organele.

Ob tej metodi uporabljamo še vrsto drugih metod, ki pogosto zahtevajo drugačno obdelavo tkiva:

- Na našem oddelku barvamo tkivne vzorce po približno 40 barvnih metodah (histološka barvanja), s katerimi prikažemo posamezne tkivne komponente.
- Kosti in kalcinirane vzorce dekalciniramo - kalcij raztapljamo v 10 % trikloroacetni kislini.
- Bioptične vzorce kostnega mozga vklopimo v akrilatno smolo in režemo na posebnem mikrotomu s steklenimi noži. S tem postopkom izvrstno ohranimo tkivno morfologijo.
- Za hitro postavljanje diagnoze med operacijo izdelamo preparat po metodi zmrzlega reza. Tkivo zmrznemo pri -15° C (fiksacija), odrežemo rezino in pobarvamo po H-E metodi v 10 minutah.
- Postopek zmrzovanja uporabimo tudi takrat, ko običajni postopki (fiksacija, dehidracija) uničijo tkivne komponente, ki jih želimo prikazati.
- Z metodo pretočne citometrije merimo količino DNA v tumorskih celicah in porazdelitev celic v posameznih fazah celičnega cikla. Ti podatki so dodaten prognostičen faktor in omogočajo spremljanje zdravljenja.

- Pri elektronskomikroskopski metodi s pomočjo prehoda elektronov skozi posebej obdelano tkivo opazujemo celične detajle, ki so povečani do 1.000 000-krat ali še bolj.

- Pomembno področje v histološki tehniki je imunohistokemija. Za to metodo je značilna reakcija med antigenom in specifičnim protitelesom, ki ga dodamo tkivu. Tako nastali kompleks (v neposredni ali večstopenjski reakciji) označimo z različnimi markerji in prikažemo mesto reakcije. Tkivni antigeni so občutljive tkivne komponente. Nepravilna obdelava tkiva jih lahko delno ali popolnoma uniči. Zato so prav rezultati imunohistokemijske tehnike ogledalo pravilnega in natančnega tehnološkega postopka v laboratoriju za patologijo.

V našem laboratoriju lahko z imunohistokemijsko tehniko dokažemo preko 100 antigenov.

8. Vse parafinske bloke in histološke preparate arhiviramo. Na našem oddelku imamo natančno voden in urejen arhiv histoloških preparatov (40 let), parafinskih blokov (35 let) in fiksiranih tkivnih vzorcev (15 let).

ZAKLJUČEK

Postopek od fiksacije do izdelave histološkega preparata traja 3 dni (čas poteka preko nedelje, 5 dni). Postopka ne moremo skrajšati. Vsi vzorci, brez izjeme, gredo v obdelavo takoj, ko jih dobimo na oddelek in so obdelani v najkrajšem možnem času.

Hitra in pravilna fiksacija tkiva in drugi standardizirani postopki v laboratoriju za patologijo nam omogočajo, da lahko vse barvne in druge metode izvedemo brezhibno in dobimo zato dobre rezultate. Ves postopek, od odvzema tkiva do izdelave dobrega histološkega preparata, je natančno predpisan. Obe ekipi, tako klinična kot ekipa oddelka za patologijo, morata vedeti, da ne smeta narediti nobene napake.