

Procedury pobierania materiału i przygotowywania preparatów do badań histopatologicznych

Małgorzata Ponikowska

ze Specjalistycznej Przychodni Weterynaryjnej dla Małych Ssaków „Ogonek” w Warszawie

Procedures of sampling and trimming for histopathological examination

Ponikowska M., Specialized Veterinary Surgery for Small Mammals
“Ogonek” in Warsaw

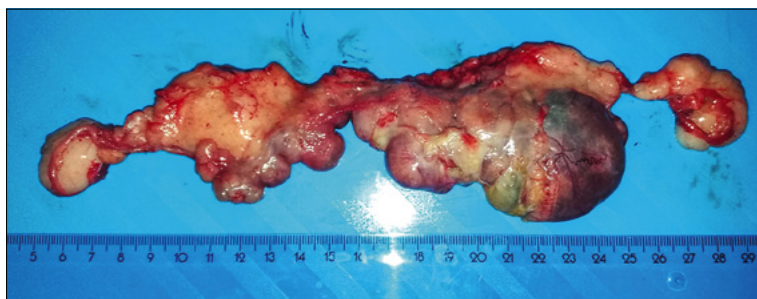
Correct tissue collection and preparation of a sample for histopathological examination play a key role for the proper diagnosis and, when biopsy is performed, often also for the prognosis of a treated patient. In this aspect, the collection, preservation/fixation and transportation of a specimen are crucial to obtain reliable results. Each sample must be send with accompanying submission form. In this article, methods of tissues sampling and sample preparation for histopathological examination are described and compared.

Keywords: biopsy, material collection, histopathological examination, fixation.

Badania histopatologiczne jako jeden z filarów badań dodatkowych w medycynie weterynaryjnej są szczególnie przydatne w diagnostyce chorób nowotworowych. Dostarczają one wiele informacji o strukturze tkanek oraz typie komórek zaangażowanych w chorobę. Szerokie spektrum barwień oraz technologii daje wiele możliwości różnicowania i stawiania diagnozy oraz jest pomocne w określeniu rokowania pacjenta. Badania histopatologiczne przydatne są w diagnostyce przyżyciowej tkanek pobranych metodą biopsji lub podczas zabiegów chirurgicznych. Są też nieodłącznym elementem badań sekcyjnych. Artykuł ma na celu zebranie i podsumowanie procedur dotyczących postępowania podczas pobierania materiału, przechowywania i transportu próbek oraz postępowania w laboratorium histopatologicznym od otrzymania materiału do powstania preparatu na szkiełku mikroskopowym.

Pobieranie materiału

Ważnym elementem dla uzyskania prawidłowych i wiarygodnych wyników badań histopatologicznych jest prawidłowe pobranie materiału do badania.



Ryc. 1. Macica królika zmieniona nowotworowo, usunięta podczas zabiegu owariohisterektomii

Materiał musi być świeży i zabezpieczony jak najszybciej, aby zminimalizować zafałszowania wynikające z procesów autolitycznych oraz gnilnych. Należy zminimalizować ingerencję w tkanki, cięcie wykonać ostrym skalpelem, unikając zgniatania materiału (1).

Pobranie przyżyciowe

Materiał do badania histopatologicznego przyżyciowo uzyskuje się na dwa główne sposoby – całe narządy lub twory patologiczne pobiera się podczas zabiegu chirurgicznego ich usunięcia, a fragmenty lub wycinki tkanek podczas zabiegu biopsji. Analiza histopatologiczna może mieć na celu zdobycie informacji na temat typu zmiany, jej charakteru nowotworowego i jego złośliwości, postawienie diagnozy oraz ocenę rokowania (2).

Pobranie materiału podczas zabiegu chirurgicznego odbywa się w sterylnych warunkach. Pobrany materiał może stanowić cały narząd, jak w przypadku badań macicy po zabiegu kastracji (ryc. 1) lub nerki po nefrektomii. W takim przypadku zabieg należy przeprowadzić zgodnie z ogólnymi zasadami chirurgii, a materiał zabezpieczyć jak najszybciej po jego pobraniu. Badanie całej zmiany odbywa się po usunięciu chirurgicznym w całości, z zachowaniem marginesu zdrowej tkanki. W przypadku dużych zmian zaleca się nacięcie tkanki dla lepszej penetracji środków utrwalających do jej wnętrza. (2) Można również jeszcze przed utrwaleniem materiału wybrać reprezentatywne wycinki ze zmiany patologicznej.

U ludzi w przypadku operacyjnego usuwania nowotworów stosuje się śródoperacyjne badanie histopatologiczne, którego wynik uzyskuje się w czasie do 30 minut od pobrania materiału. W badaniu tym przygotowanie materiału do badania mikroskopowego polega na zamrożeniu zmiany w kriostacie w temperaturze poniżej -20°C . Tak zamrożony fragment tkankowy jest skrawany na skrawki grubości 4–5 μm . Skrawki barwi się w przyspieszonej procedurze hematoksyliną i eozyną, odwadnia w trzech zmianach alkoholu po kilkanaście sekund oraz w acetonie, a następnie prześwietla ksylenem i zatapia w medium. Badanie śródoperacyjne nie ma na celu postawienia rozpoznania, a jedynie wykluczenie lub potwierdzenie zmiany złośliwej.

Badania wycinka tkanki można dokonać po pobraniu materiału drogą biopsji wycinkowej, biopsji gruboigłowej igłą o średnicy 1,2 mm (tru-cut) lub biopsji endoskopowej (3, 4). Pobranie materiału metodą biopsji jest jednak obciążone ryzykiem. W związku z często znacznym uszkodzeniem tkanek wynik może być niewiarygodny. Wybrany wycinek może nie

być reprezentatywny dla reszty zmiany lub narządu, lub może być za mały, co uniemożliwia np. ocenę złośliwości nowotworu (6) Nie jest możliwa także ocena marginesu histopatologicznego (2).

Pobranie pośmiertne

Pośmiertnie materiał pobiera się podczas sekcji. Do stwierdzenia przyczyny zgonu potrzebne jest badanie wycinków narządów mięsnych. W przypadku zmian rozrostowych zmienione narządy lub guzy pobiera się w całości do oceny rodzaju patologii. Próbkę powinny być pozbawione nadmiaru tkanki tłuszczowej oraz krwi (7). W przypadku oceny tkanek pobranych podczas sekcji należy wziąć pod uwagę czas od śmierci do pobrania wycinków i możliwość wystąpienia procesów autolitycznych.

Przechowywanie i transport materiału

W przypadku natychmiastowej wysyłki materiału do laboratorium wystarczające jest umieszczenie go w szczelnych pojemnikach z tworzyw sztucznych chroniących przez zgnieceniem oraz wysychaniem. Taki materiał powinien dotrzeć do laboratorium w przeciągu kilku godzin. Należy pamiętać, że małe wycinki tkanek są szczególnie podatne na wysychanie i taki rodzaj transportu nie będzie odpowiedni dla uzyskania wiarygodnego wyniku.

W przypadku dłuższego przechowywania niezbędne jest utwalenie materiału z roztworze konserwującym. Uniwersalnym środkiem jest 10% roztwór formaliny, a więc 4% roztwór formaldehydu (3). Do badań immunohistochemicznych zalecane jest użycie formaliny buforowanej fosforanami. Inne roztwory na bazie formaliny mogą być wzbogacone o sól, cynk, wapń (roztwór Bakera; 5) Wśród utwalczy można też wymienić stosowane głównie w przebiegu badań naukowych: aceton, kwas octowy lodowaty, roztwór Carnoya (etanol i kwas octowy lodowaty), kwas pikrynowy, kwas chromowy, alkohol metylowy, alkohol etylowy, azotan srebra, dwuchromian potasu, płyn Bouina, roztwór Zenkera, roztwór Helly (5).

Stosunek objętości roztworu do objętości tkanek powinien mieścić się w przedziale 10–20:1 (1). Fragmenty tkanek powinny być możliwie jak najcieńsze, aby ułatwić dyfuzję płynu utwalcjącego. Tkanek dobrze jest umieścić na płasko, a w przypadku małych fragmentów przypiąć je do podłoża na przykład za pomocą szpilek, w miarę możliwości rozprostowane. Tkanek podatne na zwijanie, jak na przykład pęcherz moczowy, warto zabezpieczyć przez umieszczenie w kasetce (3). Cały materiał powinien być przykryty roztworem, dlatego w przypadku tkanek unoszących się na powierzchni zaleca się przykrycie ich nasączoną bibułą lub przeciągnięcie przez nie nylonowej nitki i umieszczenie pod poziomem płynu. Próbkę o dużej objętości można podzielić na mniejsze części i opisane przesłać w kilku pojemnikach (3). W przypadku braku możliwości utwalenia tkanek dopuszczalne jest przechowywanie ich w warunkach chłodniczych (1). Proces utwalenia jest zależny od rodzaju tkanki, wielkości wycinka, rodzaju utwalcza oraz planowanego barwienia.

W przypadku najpowszechniej stosowanej formaliny dziesięcioprocentowej za optymalny czas uznaje się 24 godziny. Przedłużone utrwalanie nie jest wskazane, może bowiem spowodować kruchość preparatu, a konsekwencją zbyt krótkiego czasu jest nieprawidłowy obraz wielu struktur komórkowych.

Przygotowanie preparatu histopatologicznego

Wybór wycinka

Wycinki zmienionych tkanek lub narządy o małej powierzchni przekroju badane są w całości. Większe zmiany badane są poprzez wybór wycinków z tkanki. Najbardziej popularną metodą wykrawania jest badanie przekrojowe (cross-section), w którym fragment tkanki czy guz nowotworowy przecina się najpierw pośrodkowo wzdłuż krótszego boku, a następnie dłuższego boku, uzyskując ćwiartkę. Wadą tej metody jest błędne założenie, że zmiana jest symetryczna (3). Inną metodą jest krojenie w równych odstępach, jednak w związku z większymi kosztami tej procedury wykorzystywana jest ona głównie w medycynie człowieka (6). W przypadku badania zmian nowotworowych, gdy są wątpliwości co do zachowanego marginesu chirurgicznego, można wykorzystać metodę skrawania tkanki polegającą na usunięciu wierzchniej warstwy przesłanego materiału (shaved edge sections, „orange peel”). Tkanek ocenia się pod kątem występowania cech nowotworu. Stwierdzenie takich cech świadczy o niezachowanym marginesie onkologicznym. (3)

Odwapnianie

Etap odwapniania powinny przejść przede wszystkim wycinki kości oraz zębów.

Odwapnianie polega na usunięciu wapnia mineralnego i odbywa się na drodze elektrolizy lub przez poddanie materiału działaniu 5–7,5% kwasu azotowego lub innym środkiem odwapniającym, dostępnym komercyjnie gotowym roztworom. Proces jest prowadzony najczęściej w temperaturze pomiędzy 18 a 30°C. W czasie odwapniania, które może trwać kilka dni, płyn powinien być wymieniany kilkakrotnie (8). Po uzyskaniu pożądanego efektu tkanki należy wypłukać, a następnie zneutralizować w wodzie amoniakalnej.

Odwadnianie

Ponieważ tkanki zwierzęce są stosunkowo miękkie, ich skrawanie może odbywać się jedynie po przepojeniu i zatopieniu w twardszym materiale. Przygotowanie do tego etapu polega na odwodnieniu tkanek. Aby nie uszkodzić struktur komórkowych proces ten przeprowadza się stopniowo. Proces odwadniania prowadzony jest etapami, poprzez umieszczanie tkanki w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu w tzw. szeregu odwadniającym, począwszy od alkoholu 50% poprzez 70%, 80%, 90%, 96% i bezwodny (absolutny 99,8%), do mieszaniny etanol-ksylen i czystego ksyleny. Ma to na celu usunięcie alkoholu z preparatu.

Zatopianie materiału w parafinie

Fragmenty materiału zatapia się w substancjach przenikających do tkanek i nadających im odpowiednią twardość. Umożliwia to przygotowanie odpowiednio cienkich skrawków. Rutynowo stosuje się do tego parafinę. W technice histologicznej wykorzystuje się również celoidynę, specjalne żywice organiczne oraz pewne związki polimerowe.

Pierwszy etap, zwany przepajaniem, odbywa się w temperaturze 52°C i polega na umieszczeniu tkanki w mieszaninie parafiny z ksylenem, a następnie w ciekłej parafinie, w której przebywa kilkanaście godzin. Przepojony skrawek jest następnie zatapiany we wnętrzu bloczka parafinowego, który sporządza się, wlewając porcję parafiny do metalowej formy i wprowadzając doń fragment tkanki ustawiony w odpowiedniej orientacji przestrzennej. Proces ten może odbywać się w sposób częściowo zautomatyzowany, z wykorzystaniem urządzenia utrzymującego stałą temperaturę ciekłej parafiny. W końcowym etapie uzyskuje się bloczki parafinowe z zatopionymi w nich badanymi tkankami (ryc. 2).

Krojenie

Bloczki parafinowe muszą zostać pocięte na fragmenty za pomocą mikrotomu. Rozróżniane są mikrotomy

saneczkowe (ryc. 3) oraz obrotowe z nieruchomym nożem. Ostrza mogą być stalowe, szklane, diamentowe lub laserowe. Grubość skrawka ustawiana jest ręcznie za pomocą śruby lub automatycznie – najczęściej w granicach 3–4 µm.

Bloczek parafinowy umieszcza się w statywie mikrotomu i skrawa z niego skrawki o przekroju czworokąta (ryc. 4, 5). Do niepożądanych efektów występujących podczas tego procesu należy zaliczyć zwijanie się lub sklejanie się skrawków lub ich uszkodzenie. Efekty te można zminimalizować poprzez dobranie dostatecznie niskiej temperatury bloczka parafinowego, ostrego noża mikrotomu oraz odpowiedniego odwodnienia przed dalszą obróbką.

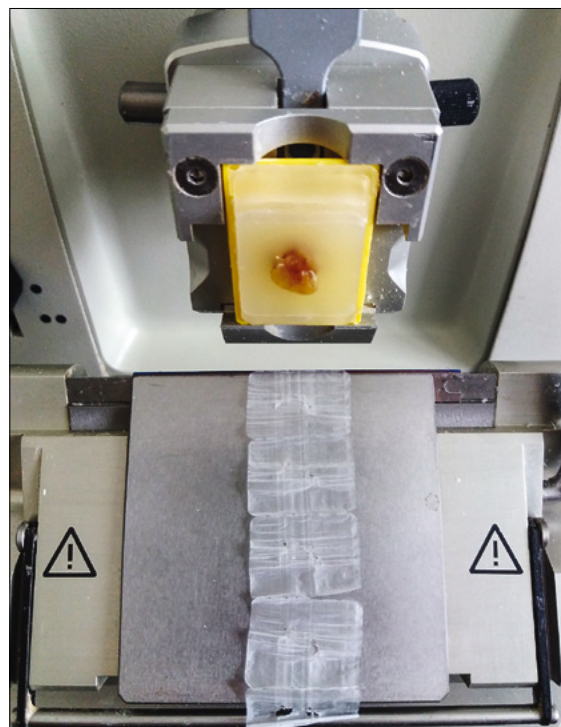
W kolejnym etapie skrawki parafinowe naklejane na uprzednio przygotowane (silanizowane, rzadziej nabiałkowane) szkiełka podstawowe. W pierwszej fazie naklejania skrawki umieszcza się na powierzchni ciepłej wody wypełniającej wanienkę. Pod wpływem podwyższonej temperatury skrawki początkowo pomarszczone rozprostowują się, nabierając gładkości. W tym momencie delikatnie naciąga się je na szkiełko



Ryc. 2. Zatopianie fragmentów tkanek w bloczkach parafinowych



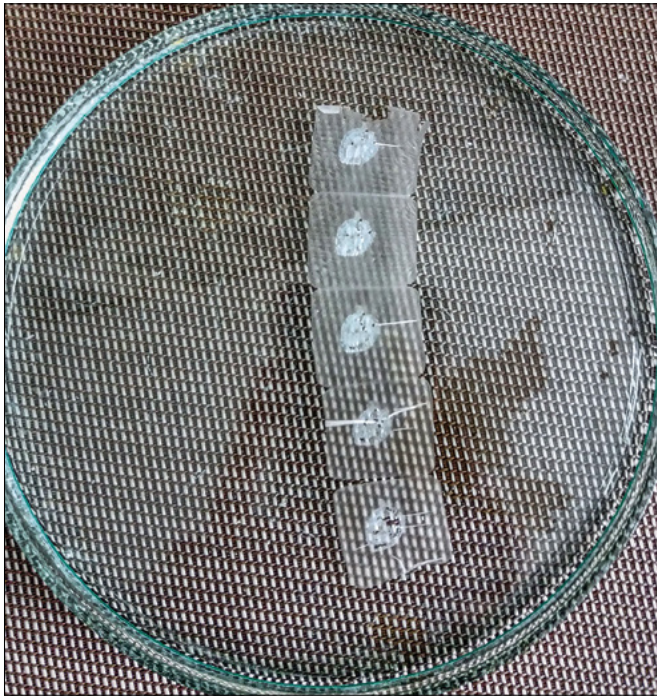
Ryc. 3. Mikrotom saneczkowy



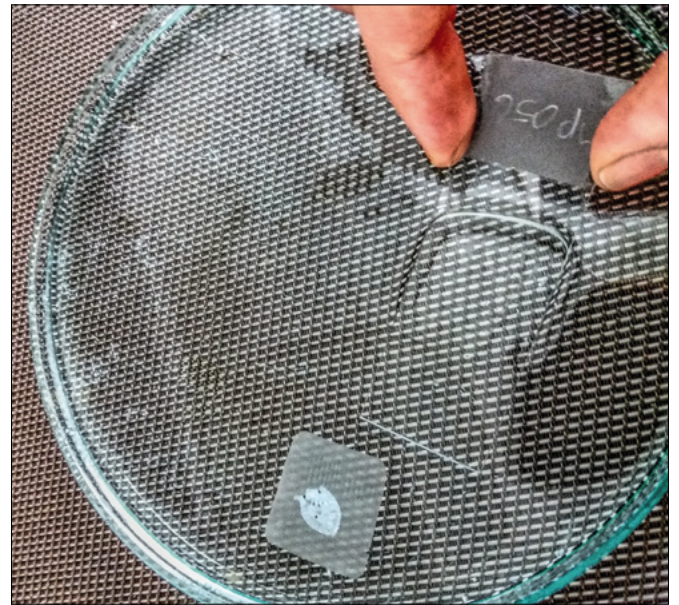
Ryc. 4. Umieszczony w mikrotomie bloczek parafinowy z widocznymi odcięciami skrawkami



Ryc. 5. Okrojony bloczek parafinowy z widoczną powierzchnią przekroju



Ryc. 6. Wstążka skrawków parafinowych na powierzchni wody



Ryc. 7. Nakładanie skrawka z powierzchni wody na szkiełko

podstawowe (ryc. 6 i 7). Dodatkowo stosować można mieszaninę białkowo-glicerolowo-tymolową dla lepszego przyklejenia tkanki do szkiełka.

Przyklejony do szkiełka podstawowego skrawek tkanki jest przepojony parafiną, zatem jest hydrofobowy. W tym stanie nie jest możliwe jego zabarwienie, bowiem większość barwników funkcjonuje w postaci roztworów wodnych. Konieczne jest zatem całkowite usunięcie ze skrawków parafiny, a następnie ich nawodnienie. Odparafinowanie odbywa się poprzez umieszczenie szkiełek w dwóch zmianach ksyłenu, natomiast nawodnienie w szeregu alkoholowym, złożonym podobnie jak szereg odwadniający z roztworów etanolu, jednak ustawionych w odwrotnej kolejności, począwszy od alkoholu absolutnego, aż do 70%. Z etanolu skrawki trafiają do wody, skąd mogą być bezpośrednio przeniesione do roztworów barwników.

Najważniejszą standardową techniką obrazowania histologicznego jest barwienie hematoksyliną i eozyną (H-E). Jest to tzw. barwienie przeglądowe, pozwalające ocenić całość struktury tkanki poprzez kontrastowe zabarwienie cytoplazmy i jąder komórkowych.

Chcąc uczynić preparat trwałym, należy ponownie pozbawić go wody. Cel ten zostaje osiągnięty przez przeprowadzenia szkiełek z zabarwionym skrawkiem tkanki przez alkoholowy szereg odwadniający. W końcowym etapie preparaty trafiają do ksyłenu, a następnie są zamykane. Proces ten polega na naniesieniu na powierzchnię skrawka kropli medium zamykającego (obecnie stosowane są żywice syntetyczne, rzadziej naturalny balsam kanadyjski) i delikatnym umieszczeniu na nim szkiełka nakrywkowego.

Podsumowanie

Prawidłowa obróbka tkanek od momentu pobrania wycinka do momentu uzyskania preparatu na szkiełku podstawowym jest kluczowa dla uzyskania wiarygodnego wyniku badań histopatologicznych.

W zależności od typu materiału oraz planowanych badań i metod barwienia wskazane jest dobranie odpowiedniej metody utrwalenia oraz przechowywania materiału. Współpraca klinicysty z laboratorium na każdym etapie badania pozwala na najskuteczniejsze postawienie diagnozy, dobranie leczenia czy ustalenie rokowania. Podstawowe metody badań przedstawione w tym artykule wciąż ewoluują lub zostają wypierane przez nowe procedury i techniki.

Piśmiennictwo

1. Malicka E. (red.): *Materiały pomocnicze do ćwiczeń z histopatologii zwierząt*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2002.
2. Sapieryński R.: Badanie histopatologiczne w onkologii weterynaryjnej. Część I. Warunki uzyskania przydatnego wyniku. *Życie Wet.* 2017, 92, 884–891.
3. Kamstock D.A., Ehrhart E.J., Getzy D.M., Bacon N.J., Rassnick K.M., Moroff S.D., Liu S.M., Straw R.C., McKnight C.A., Amorim R.L., Bienzle D., Cassali G.D., Cullen J.M., Dennis M.M., Esplin D.G., Foster R.A., Goldschmidt M.H., Gruber A.D., Hellmén E., Howerth E.W., Labelle P., Lenz S.D., Lipscomb T.P., Locke E., McGill L.D., Miller M.A., Mouser P.J., O'Toole D., Pool R.R., Powers B.E., Ramos-Vara J.A., Rocca-bianca P., Ross A.D., Sailasuta A., Sarli G., Scase T.J., Schulman F.Y., Shoieb A.M., Singh K., Sledge D., Smedley R.C., Smith K.C., Spangler W.L., Steficek B., Stromberg P.C., Valli V.E., Yager J., Kiupel M.: Recommended guidelines for submission, trimming, margin evaluation, and reporting of tumor biopsy specimen in veterinary surgical pathology. *Vet. Pathol.* 2011, 48, 19–31.
4. Skokowski J.: *Encyklopedia Badań Medycznych. Badanie histopatologiczne*. Wydawnictwo Medyczne MAKmed, Gdańsk 1996.
5. Stickland N.C.: A detailed analysis of the effects of various fixatives on animal tissue with particular reference to muscle tissue. *Stain Technol* 1975, 50, 255–264.
6. Stromberg P.C., Meuten D.J.: Trimming tumors for diagnosis and prognosis. W: Meuten D.J. (edit.): *Tumors in Domestic Animals*, 5th edit, Wiley Blackwell, Ames 2017, s. 27–43.
7. Parkinson, C.M., O'Brien, A., Albers, T.M., Simon, M.A., Clifford, C.B., Pritchett-Corning, K.R.: Diagnostic Necropsy and Selected Tissue and Sample Collection in Rats and Mice. *J. Vis. Exp.* 2011, 54, doi: 10.3791/2966.
8. Mawhinney W.H., Richardson E., Malcolm A.J.: Control of rapid nitric acid decalcification. *J. Clin. Pathol.* 1984, 37, 1409–1413.

Lek. wet. Małgorzata Ponikowska, e-mail: ponikowskamal@gmail.com