

Základní provoz

Základem zpracování tkáně v dnešní době je metoda FFPE (formalin fixed paraffin embeded). Při tomto způsobu zpracování je hodnocená tkáň fixována formalínem a následně odvodněna a prosycena parafínem. Tato tkáň je zalita do parafínových bloků a z nich jsou zhotovovány tkáňové řezy, které jsou opětovně zavodněny a vždy nejprve obarveny základním barvením. Vzniklé parafínové bloky je možné uchovávat (s minimálním ovlivněním kvality obsažené tkáně) po mnoho let a lze na ně aplikovat případné další potřebné testy i dodatečně, s velkým časovým odstupem. Jde o metodu zpracování, která je používána celosvětově, po mnoho desetiletí a je dostupná vybavením i finančně. I tento způsob fixace tkáně a přípravy tkáně ale má parametry, které je potřeba dodržovat.

Základním barvením histologických řezů je barvení hematoxylin-eozin (HE) a jeho modifikace. Při tomto barvení se bazické oblasti tkáně (typicky jádra) barví hematoxylinem (modrá až modrofialová barva) a eozinofilní oblasti (typicky cytoplazma a obecně oblasti bohaté na bílkoviny) barví v odstínech růžové.

Preparáty obarvené základním barvením (HE) jsou předkládány lékaři a ten, po jejich zhodnocení a identifikaci hlavních oblastí zájmu zadává požadavky na pokročilé metody.

Fixace

Zpracování biologického materiálu začíná jeho fixací, která slouží k zachování základních morfologických znaků tkáně. Zároveň vhodná fixace zachovává vlastnosti tkání pro další specializovaná vyšetření. Jde zejména o imunohistochemické vyšetření a metody molekulární patologie. Jsou různé metody fixace setkání: nejrozšířenější je fixace formalínem. Formalín je vodný roztok formaldehydu. Na pracovištích patologie se běžně používá 10 % roztok formalínu, který obsahuje 4 % formaldehydu. Formalín je široce dostupný a umožňuje výše zmíněné potřebné zachování tkáňových vlastností pro morfologická i specializovaná vyšetření.

Při formalínové fixaci platí určité pravidla pro vhodnou fixaci. Mezi tato pravidla patří, že fixačního roztoku má být výrazný nadbytek oproti fixované tkáni (10 až 20 násobek) a tkáň má být vložena do fixačního roztoku okamžitě po odběru (aby doba autolýzy byla co nejkratší). Tkáň má být v nádobě volně, tak aby byla ze všech stran omývána fixačním roztokem. Nádoba obsahující tkáň a fixační roztok nemá být vystavena výrazným tepelným změnám (tzn. nesmí přemrznout ani být vystavena extrémnímu slunečnímu záření). Fixace má trvat 24 až 48 hod., na průvodce by vždy měl být uveden údaj o čase, kdy byl materiál do fixativa vložen.

Přikrajování

Přikrajování nebo také blokování je dalším krokem zpracování biologického materiálu. V tomto kroku je biologický materiál připravován do plastových kazet, ve kterých dále dochází k prosycování tkáňových vzorků parafínem. V případě že se jedná o malé vzorky, např. endobiopsie (vzorky získané při endoskopických vyšetřeních např. při gastrokopii,

koloskopii, bronchoskopii či jehlové biopsie) je do kapsle vkládán veškerý materiál. V případě že se jedná o vzorky větší jako jsou excize (typicky kožní nebo slizniční excize) a nebo resekáty, je nutné tyto vzorky před dalším zpracováním rozdělit na části o velikosti zhruba 1 x 1 x 0,5 cm. Takto velké části tkáně je možné dále kvalitně prosytit parafínem. V případě že je nutné tkáňový vzorek řezat, velmi často je resekční plocha či resekční plochy označeny tuší. Takto se jednoznačně odliší resekční chirurgická linie (linie s tuší) od řezu, který provedl patolog (bez tuše). Pokud je nutné tkáň takto rozdělit, je vždy potřeba při zpracování myslet na to, jaké informace chceme následně získat. Tzn. že používáme standardizovaná schémata jakými se dané orgány a resekáty zpracovávají, a to především s ohledem na onkologickou problematiku. Typicky se materiál zpracovává tak, aby z tkáňového řezu mohla být doměřená např. celková velikost nádoru a dále typicky hloubka invaze v případě slizničních afekcí a vzdálenost nádoru k chirurgické resekční linii.

Obecně také platí že čím méně je vidět makroskopicky (např. resekáty od pacientů po prodělané léčbě, s regresí nádoru), tím více tkáňových bloků se připravuje. Není tak výjimkou že např. z jednoho resekátu vznikne 30 ale i 50 nebo 70 tkáňových bloků. Jsou i vzorky, které se zpracovávají v celém rozsahu jako např. prostata s nádorem a dále vzorky které podléhají zvláštním režimu jako je například zpracování sentinelové mízní uzliny (zpracování v celém rozsahu, s blokováním po 1 mm tkáně) nebo slizniční excize adenomů trávicího traktu (které se rovněž zpracovávají v celém rozsahu při velmi jemném blokování).

V průběhu přikrajování je veškerý makroskopické nález zapisován, standardně jsou uváděny rozměry vzorku, rozměry zachycené afekce a popřípadě další makroskopicky nápadné znaky (krvácení, nekrózy apod.). V průběhu přikrajování se také využívají schématické nákresy a v případě obtížnějších vzorků se doplňuje i makrofotografie. Způsob přikrojení je dále podrobně zapisován (např. které bloky pocházejí z resekční linie, které z nádoru a nebo naopak z nádorem nepostižené oblasti).

Prosycování

Po zhotovení tkáňových bloků jsou tyto v uzavřených plastových kapslích postoupeny k dalšímu kroku. V tomto kroku procesu jsou tkáně postupně odvodňovány pomocí lázní ve vzestupné alkoholové řadě, následně mohl může být tkáň prosycena parafínem. V dnešní době již tento krok obstarávají automaty, nazývané autotechnikony, které automaticky dle nastaveného programu (např. tkáň s vysokým obsahem tukové komponenty jako je typicky prsní žláza, vyžadují zvláštní, intenzivnější program), přemísťují koše s plastovými kapslemi, které obsahují tkáňové vzorky, z jedné lázně do druhé. Výsledným krokem tohoto procesu je tkáň prosycená parafínem.

Zalévání

V tomto kroku procesu je tkáňový vzorek vyjmut z plastové kapsle a je zalit horkým parafínem. Jedna část kapsle (která je označena biotickým číslem) slouží jako základ (dno) tkáňového bloku. Při zalévání je potřeba dodržet takovou orientaci tkáně, aby následně zhotovený histologický řez splňoval požadavky, které jsou očekávány s ohledem na vytvoření (přikrojení) daného bloku. Při zalévání jsou tedy používány i poznámky jako

např. zalítí na hranu v případě že je slizniční vzorek v kapsli orientován na plochu, aby se tkáň dobře vyrovnala, ale následně požadujeme, aby tkáňový řez byl krájen kolmo, tedy tak, aby v řezu byly obsaženy všechny vrstvy stěny daného orgánu.

Při zalévání laborantky pracují s odlišnými teplotami: Tkáňový vzorek je zaléván horkým parafínem, který je tekutý, součástí zalévací linky je však i chlazená plocha, na níž vznikne parafínový blok, který obsahuje tkáňový vzorek. Výsledkem tohoto kroku je tedy standardní parafínový blok, který obsahuje tkáňový vzorek.

Krájení

V průběhu krájení laborantky na specializovaných zařízeních nazývaných mikrotomy zhotovují z parafínových bloků, které obsahují tkáňový vzorek tkáňové (histologické) řezy. Mikrotomy mají nastavitelnou tloušťku řezu, která se pohybuje od 1 μm až po např. 7 μm . Tkáňový blok je upnut do mikrotomu a speciální nůž (žiletka), kterou laborantka ovládá buď přímo (sáňkový mikrotom) nebo otáčí kotoučem a tím ovládá žiletku (rotační mikrotom). Zhotovený tkáňový řez přenáší laborantka na podložní sklíčko. Na různých pracovištích jsou využívány různé postupy tohoto přenosu: Tkáňové řezy se například mohou nechat napnout na vodní hladině, na našem pracovišti laborantky využívají kapku želatiny, která je na podložním sklíčku a na tuto kapku přenáší zhotovené tkáňové řezy. Na ploténce pak dochází k přischnutí řezu na podložní sklíčko. Výsledkem tohoto kroku jsou neobarvené parafínové tkáňové řezy napnuté na podložní sklíčko.

Barvení

Základním barvením používaným na pracovištích patologie je hematoxylin eozin. Z každého tkáňového bloku musí být zhotoven nejméně jeden řez, který je nejprve obarven hematoxylin eozinem. Barvení může probíhat buď ručně anebo se dnešní době stále častěji používají barvicí automaty, často v kombinaci i s automaty montovacími. Barvicí automat nejprve musí tkáňový řez zbavit parafínu a opět ho zavodnit (sestupná alkoholová řada) a teprve poté je tkáň schopná přijmout barviva (hematoxylin eozin). Hematoxylin je barvivo bazofilní, které barví buněčná jádra. Jeho barva je modrá až modrofialová. Eozin je barvivo kyselé (eozinofilní), které barví cytoplazmu buněk v odstínech růžové. Po obarvení jsou podložní sklíčka s tkáňovými řezy překrytá svrchní vrstvou. Buď se používají krycí sklíčka nebo lepicí fólie. Podložní sklíčka se montují pomocí montovacího média, fólie se montuje pomocí chemické reakce do závorky (naleptání).

Výsledným produktem tohoto kroku procesu jsou obarvená a za montovaná skla (preparáty), která jsou následně předána k odečtení lékaři.

Cytologie

Cytologie je další metodou používanou pro bioptické vyšetření. Při tomto způsobu získání biologického materiálu je materiál aspirován tenkou jehlou nebo „setřen“ kartáčkem. Typicky jsou tímto způsobem vyšetřovány povrchově uložené orgány jako např. štítná žláza nebo slinné žlázy, duté orgány dostupné endoskopickému vyšetření

(např. stěr z bronchu nebo žlučových cest), široce využíván je stěr buněk z děložního čípku prováděný v rámci gynekologického vyšetření. Možné je využít i kombinaci metod, kdy je endoskop zaveden do dutého orgánu (např. bronchů nebo trávicího traktu) a přes jeho stěnu je tenkou jehlou aspirován materiál z okolní tkáně (např. mízní uzliny mediastina nebo pankreas).

Další materiál který je možné vyšetřovat cytologickou metodou je tekutý materiál tělních tekutin jako jsou typicky výpotky, např. výpotek pohrudniční či výpotek v peritoneální dutině (ascites) nebo laváže (bronchoalveolární laváž nebo např. laváž malé pánve jako součást některých gynekologických operací). Tekuté materiály jsou zpracovány metodou cytopsinu, při které jsou ve specializované centrifuze sedimentovány buňky výpotku. K barvení cytologických ne-gynekologických preparátů se standardně využívá barvení May-Grünwald-Giemsa, k barvení gynekologických cytologií se využívá barvení dle Papanicolaoua.

Oproti klasickému histologickému vyšetření je cytologické vyšetření méně invazivní a lze ho v podstatě bez omezení opakovat. Vzhledem k tomu, že jsou však získávány jednotlivé buňky, je výsledek limitován nemožností posoudit vztahy buněk ve tkáni, tedy typicky případnou invazivitu procesu (invazi přes bazální membránu).