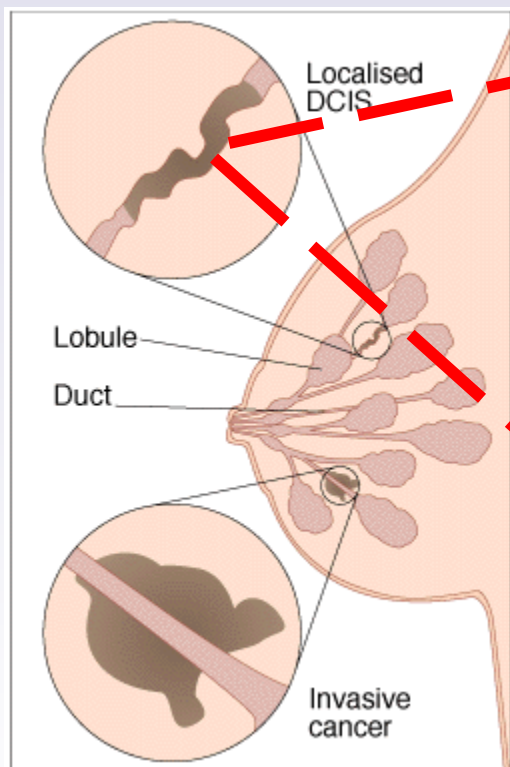
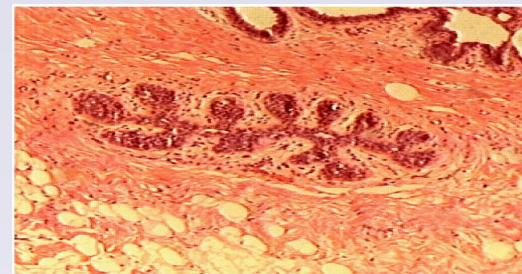
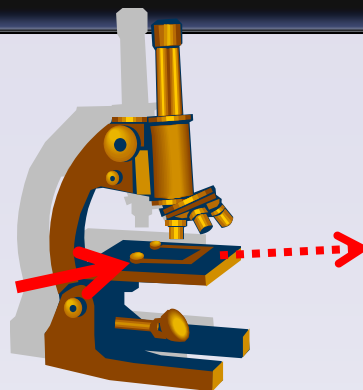


Laserowe Metody Diagnostyki i Terapii

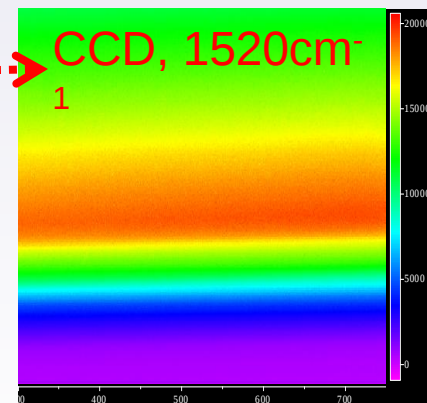
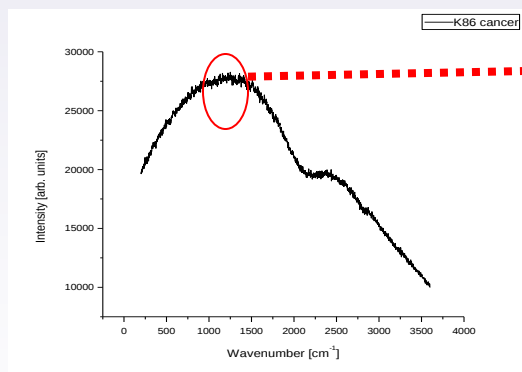
Podstawowe techniki histopatologiczne



ductal cancer in situ (DCIS)



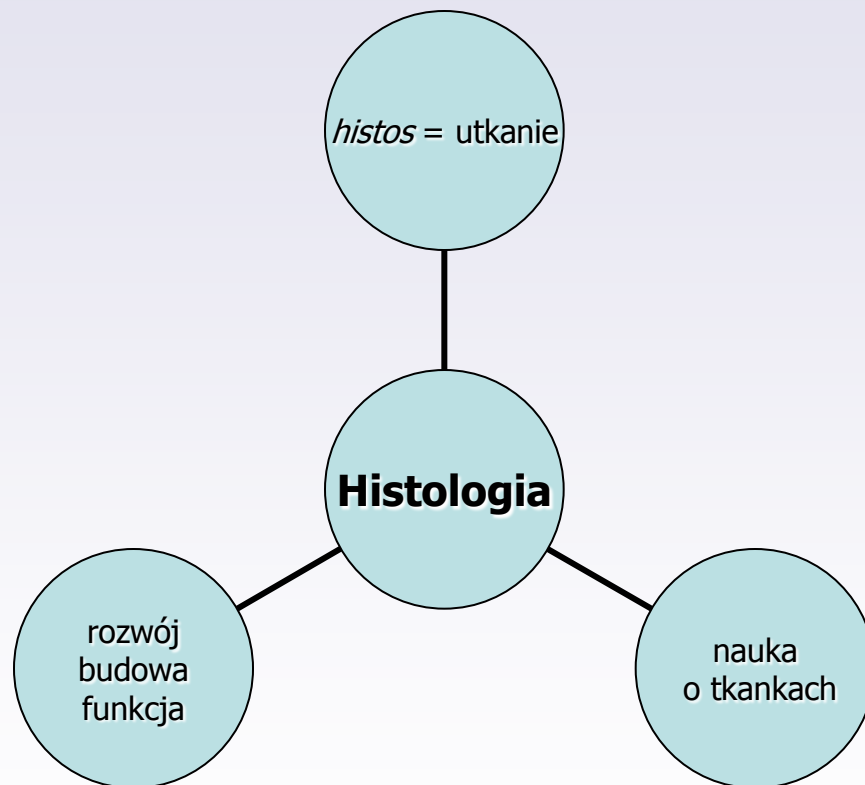
Badanie mikroskopowe



Spektroskopia Ramana
(w LLSM)

- Zarys histologii
- Technika histologiczna
- Histopatologia
- Badanie histopatologiczne

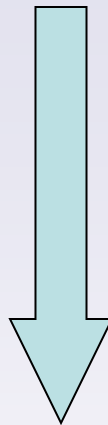
W rzeczywistości zakres zainteresowań histologii bywa traktowany szerzej, poza histologią ogólną obejmuje też histologię szczegółową (anatomię mikroskopową) - naukę o mikroskopowej budowie narządów oraz cytologię.



- zespół komórek i ich wytworów

TKANKI ZWIERZĘCE
- zwierzęta tkankowe

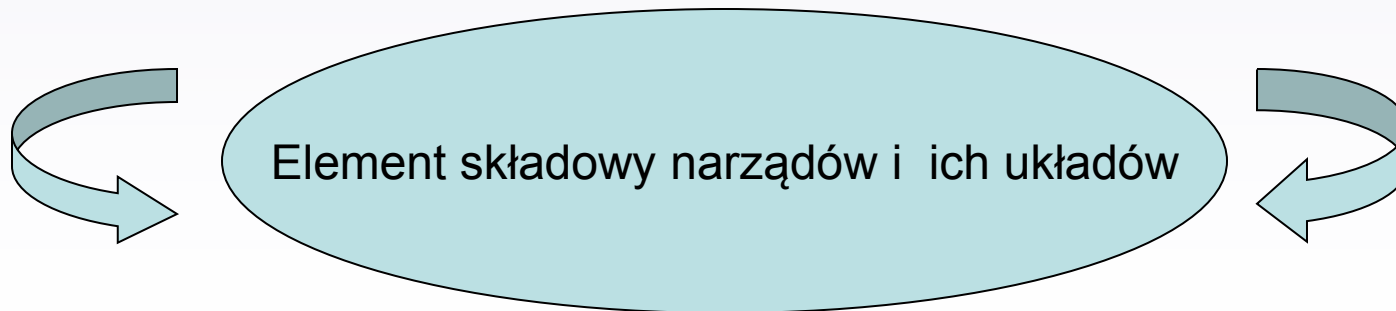
TKANKI ROŚLINNE
- rośliny wyższe



Podobne pochodzenie, budowa, przemiana materii



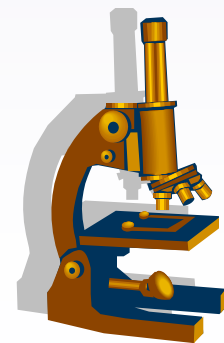
Przystosowane do określonej funkcji na rzecz całego organizmu



Wykonanie trwałego preparatu histologicznego jest procesem skomplikowanym.

Składa się on z szeregu złożonych czynności prowadzących do zachowania struktury tkanki najbardziej odpowiadającej jej stanowi za życia i uczynienia tych tkanek dostępnymi do badań mikroskopowych.

Badanie mikroskopowe jest końcowym elementem procedury nazwanej diagnostyką patomorfologiczną.



- Pobieranie materiału
- Utrwalanie
- Płukanie
- Odwadnianie
- Przeprowadzenie przez płyny pośrednie
- Zatapianie w parafinie
- Krajanie na mikrotomie
- Odparafinowanie skrawków
- Barwienie skrawków

do utrwalania
tkanek używamy
szeregu tzw.
utrwalaczy –
10%formalina
(4%formaldehyd)

zapobiega
destrukcji tkanek

zabezpiecza tylko tkankę
przed zmianami jej
struktury, nie czyni jej
natomiast odpowiednio
twardą, by można ją było
krajać na cienkie skrawki

zachowuje
strukturę zbliżoną
do takiej, jaka jest
w komórce żywej

usunięcie z utrwalonej
tkanki resztek substancji
utrwalających

Płukanie

Odwadnianie

zanurzenie utrwalonych
tkanek w alkoholu
o wzrastających stężeniach
poczynając od alkoholu 50%
aż do alkoholu absolutnego

odbywa się stopniowo

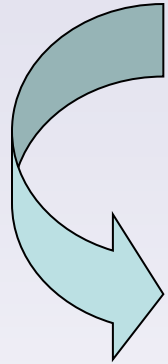
skrawki przepaja się mieszaniną
alkoholu absolutnego i ksylenu w stosunku 1 : 1

skrawki przenosi się do 2-3 razy zmienianego czystego ksylenu,
gdzie ostatecznie zostają oczyszczone
z resztek alkoholu i ulegają tzw. prześwietleniu

po przepojeniu tkanek ksylenem
przenosi się je do mieszaniny
ksylenu i parafiny w stosunku 1 : 1

rozcieńczona
w ksylenie parafina
łatwiej wnika do tkanki

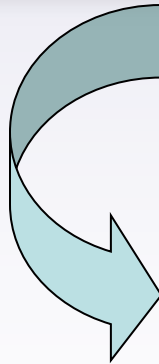
tkanki przenosimy do czystej parafiny,
która przepaja je gruntownie wypierając
równocześnie resztki ksylenu



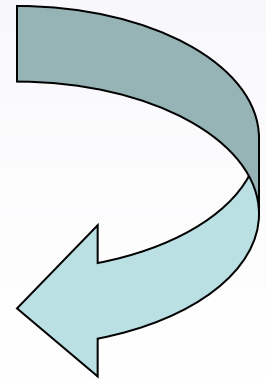
Krajanie na mikrotomie



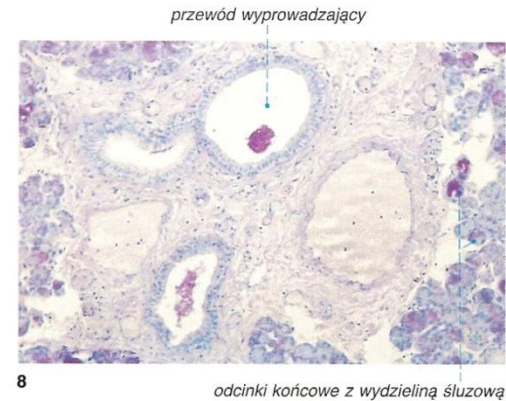
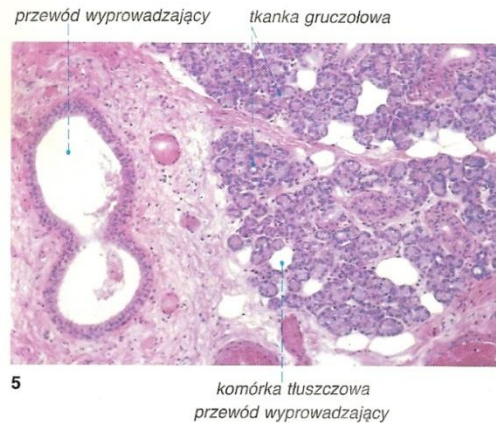
Odparafinowanie i uwodnienie skrawków



Barwienie



Zamknięcie w środku konserwującym

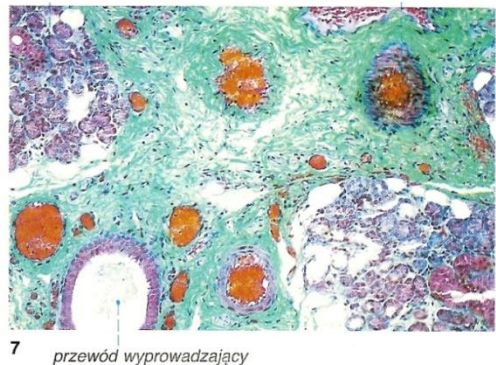


Ryc. 5–12 w identycznym powiększeniu (100 ×) na tym samym materiale tkankowym, tzn. tkance łącznej prowadzącej naczynia krwionośne w śliniance podżuchwowej, przedstawiają osiem najczęściej stosowanych barwień histologicznych (dalsze szczegóły dotyczące barwienia komórek i składników tkankowych zob. tab. 1 na s. 240).



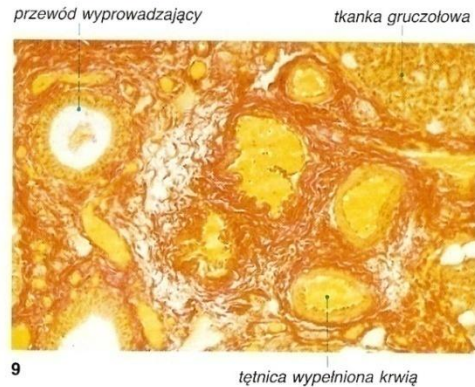
Ryc. 5. Barwienie hematoksyliną i eozyną, w skrócie H+E, jest zdecydowanie najczęściej stosowanym rutynowym barwieniem w histologii prawidłowej i patologicznej.

Ryc. 6. Barwienie hematoksyliną żelazistą wg Heidenhaina było dawniej najczęściej stosowaną metodą w mikroskopii świetlnej do przedstawiania szczegółów cytologicznych, jak mitochondria, centriole i tonofilamenty (por. ryc. 40 i 478).



Ryc. 7. Metoda trójbarwna wg Goldnera (zwana też Massona-Goldnera) uwypukla przede wszystkim łącznotkankowe włókna kolagenowe dzięki wybarwieniu ich na kolor zielony w przeciwieństwie do cytoplazmy komórek, która barwi się na kolor czerwony do fioletowego.

Ryc. 8. Reakcja PAS (skrót od periodic-acid-Schiff, czyli kwas nadjodowy – odczynnik Schiffa) barwi glikogen oraz muko- i glikoproteiny na kolor czerwono-fioletowy. Tutaj szczególnie wyraźnie widoczne są odcinki końcowe gruczołu produkujące śluz (por. z ryc. 53, 168, 335). Jądra komórkowe dla kontrastu wybarwiono za pomocą hemalaunu (rodzaj hematoksyliny).



Ryc. 9. Barwienie wg van Gieson jest również trójbabarne i należy do najczęściej stosowanych barwień rutynowych w patologii, ponieważ dzięki wyraźnemu wybarwieniu włókien kolagenowych na kolor czerwony pozwala na szybką ocenę liczby tych włókien, co jest bardzo ważne w rozpoznaniu wielu procesów chorobowych (włóknienie, stwardnienie).

Ryc. 10. Barwienie rezorcyno-fuksyną przedstawia wyłącznie włókna elastyczne w barwach ciemnofioletowo-czarnych. Ten rodzaj włókien musi być specjalnie barwiony (innym barwnikiem dla elastyny jest orceina), ponieważ żadne z normalnie stosowanych barwień ich nie uwidacznia. Jądra zostały wybarwione za pomocą czerwieni jądrowej.

Ryc. 11. Barwienie błękitem alcjanu (podobnie jak błękitem astra) służy do specyficznego wykrywania kwaśnych mukopolisacharydów, które można zaobserwować dzięki niebieskiemu zabarwieniu w kilku odcinkach końcowych gruczołów produkujących śluz.

Ryc. 12. Barwienie azan (pochodzi od nazw barwników azokarmin i anilinblau = błękit aniliny) jest klasycznym barwieniem stosowanym w histologii i uwypukla przede wszystkim włókna kolagenowe i retikulinowe oraz śluz w różnych odcieniach niebieskiego.

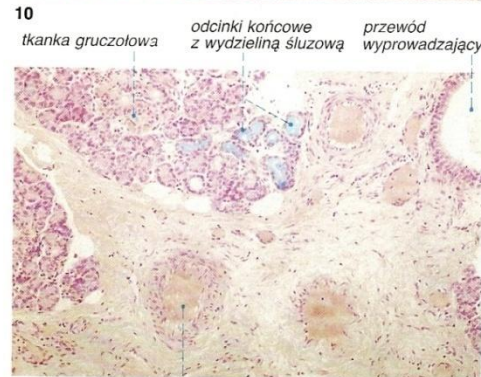
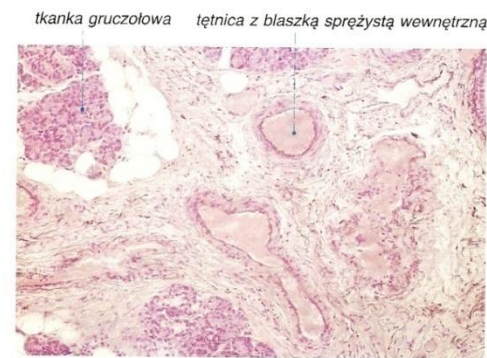


Tabela 1. Barwienia

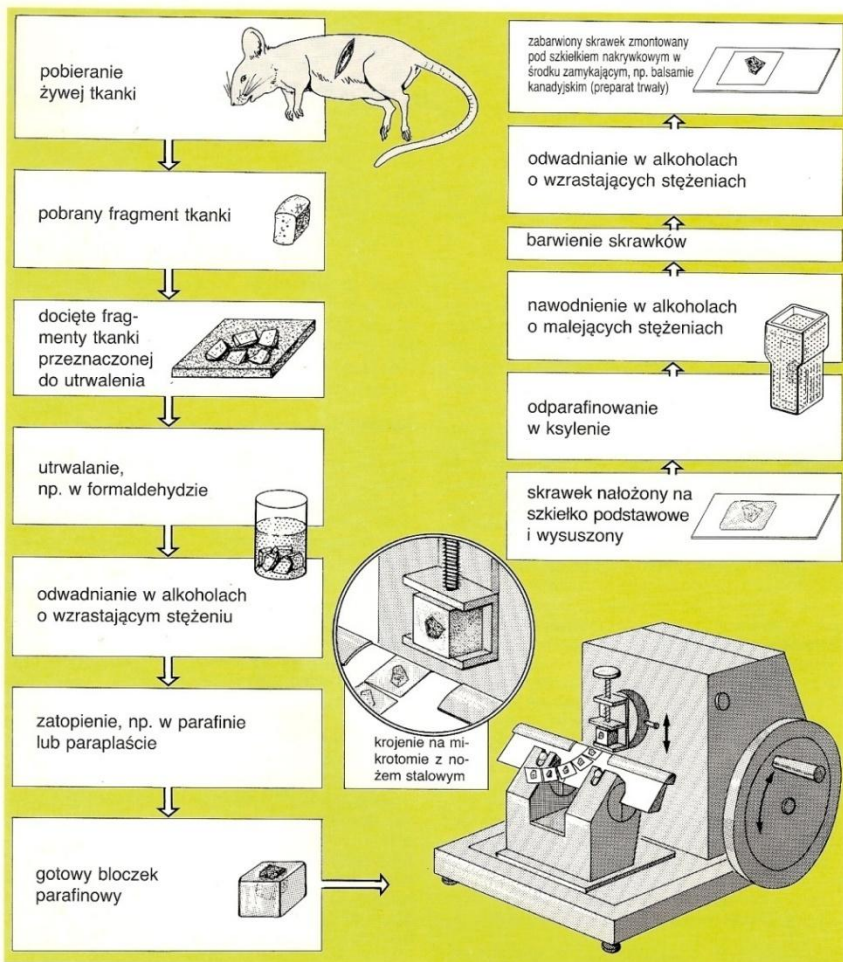
Barwienie	Jądra	Cytoplazma	Włókna kolagenowe	Włókna sprężyste
H+E = hematoksylina – eozyna	niebiesko-fioletowe	czerwona	czerwone	nie zabarwione lub jasnoróżowe
Azan = azokarmin – błękit anilinowy	czerwone	bladoróżowoczerwona lub słabo niebieska	niebieskie	nie zabarwione (tylko w przypadku gęstego utkania np. błony lub więzadła sprężyste: czerwone lub czerwono-niebieskie)
Barwienie na włókna elastyczne (rezorcyna – fuksyna lub orceina) najczęściej w połączeniu z czerwienią jądrową trwałą (dla zabarwienia jąder)	czerwone	bladoróżowa	szare	czarnofioletowe lub ciemnobrązowe
van Gieson (hematoksylina żelazista – kwas pikrynowy – fuksyna kwaśna)	czarne	żółta	czerwone	nie zabarwione (tylko w przypadku gęstego utkania np. błony lub więzadła sprężyste: żółte)
Metoda trójbarwna wg Massona-Goldnera (hematoksylina żelazista – ponceau – fuksyna kwaśna – azofloksyna – zieleń jasna)	brązowoczarne	ceglastoczerwona	zielone	nie zabarwione
Hematoksylina żelazista wg Heidenhaina (szczególnie przydatna dla przedstawienia organelli oraz poprzecznego prążkowania w mięśniach)	niebieskoczarne	—	—	jasnoszare



Nie należy nigdy podczas przygotowywania preparatów dążyć do zbyt szybkiego ich wykonania - nie opracowywać metod skróconych, bo prowadzą one z reguły do niesolidnej, bezwartościowej pracy.

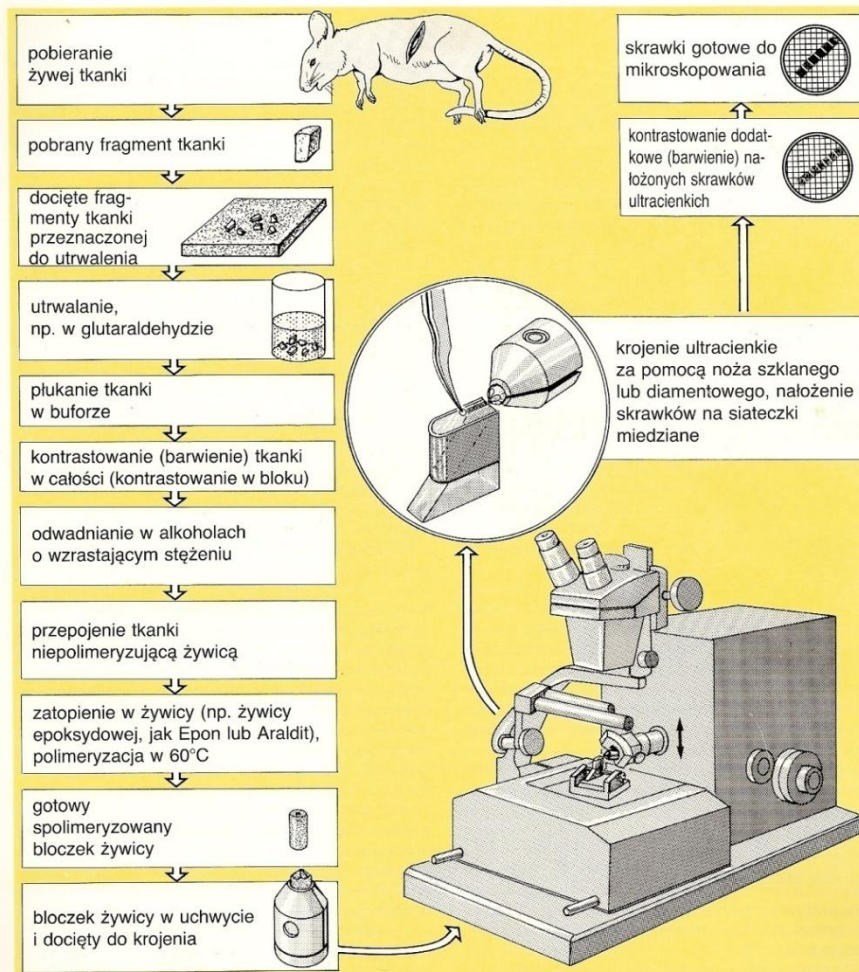


Etapy preparatyki w mikroskopii świetlnej

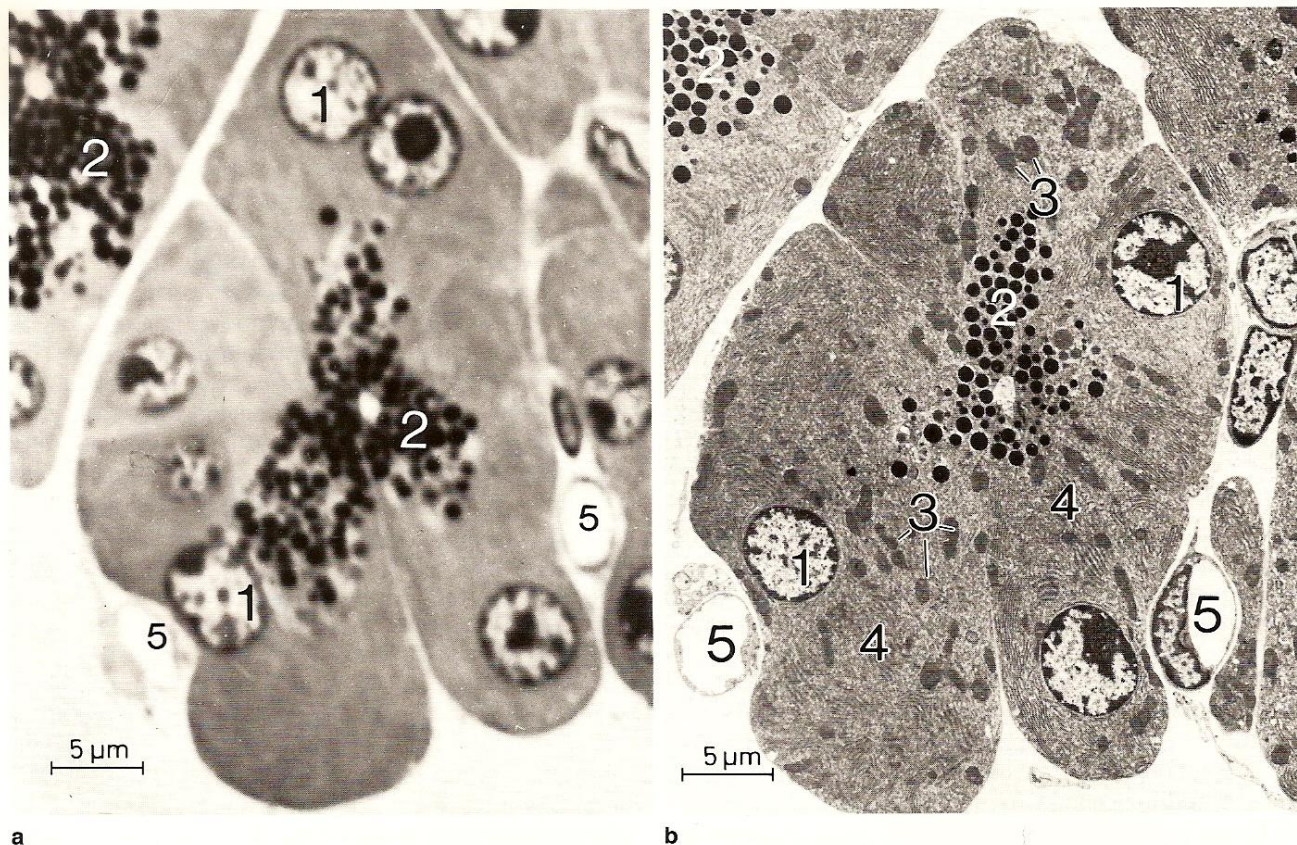


Ryc. 1. Schemat blokowy następujących po sobie etapów preparatyki koniecznych, aby ze świeżo pobranej tkanki uzyskać zabarwiony skrawek histologiczny (grubości $10\ \mu\text{m}$) przygotowany do mikroskopii świetlnej.

Etapy preparatyki w mikroskopii elektronicznej



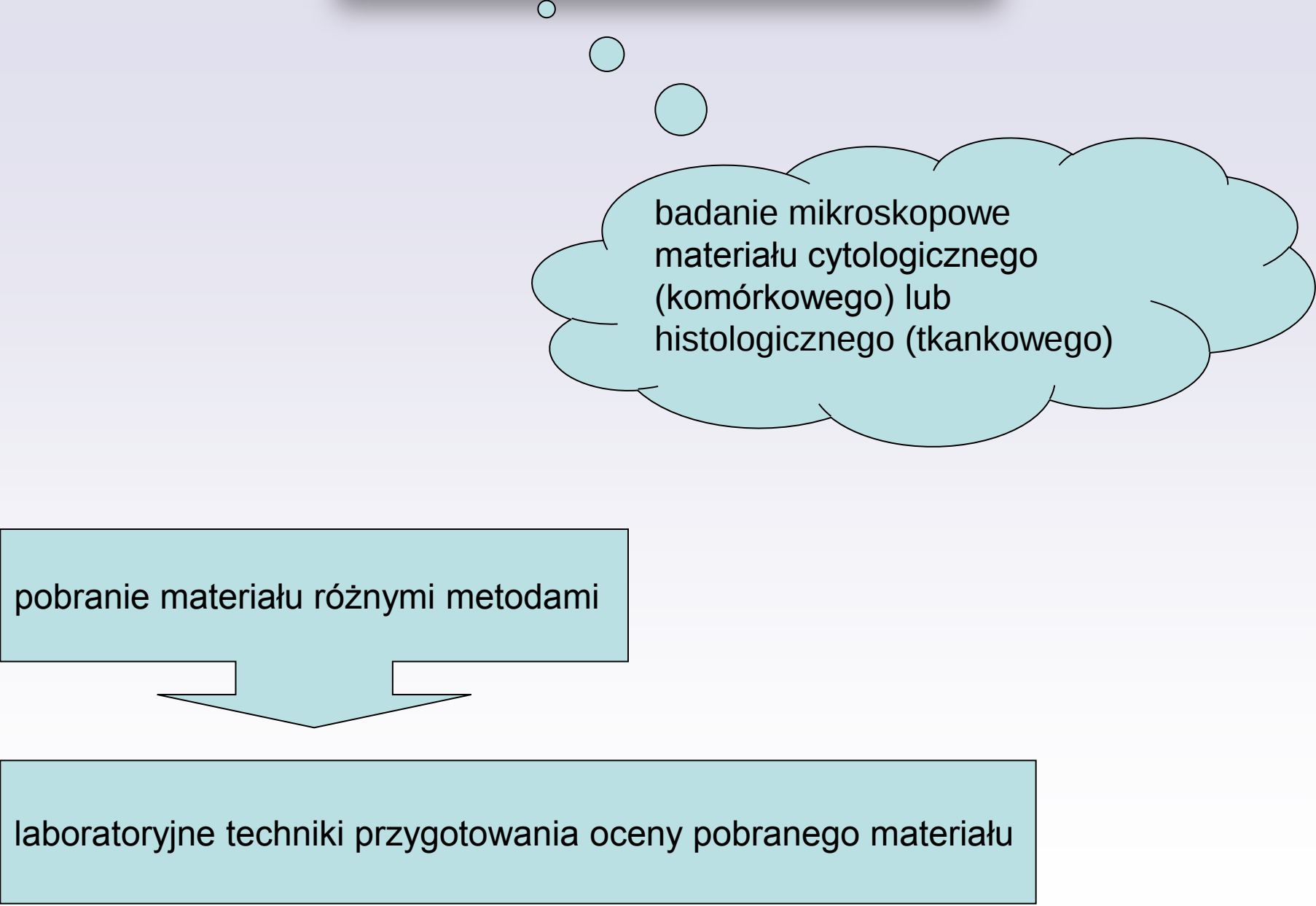
Ryc. 2. Schemat blokowy następujących po sobie etapów preparatyki koniecznych, aby ze świeżo pobranej tkanki uzyskać ultracienki skrawek (grubości $50\ \text{nm}$) ostatecznie przygotowany do mikroskopii elektronicznej.



a

b

Ryc. 4. Porównawcze przedstawienie obrazów w mikroskopie świetlnym (a) i elektronowym (b) tego samego pęcherzyka surowiczego z trzustki szczura ilustruje różnice pomiędzy określeniami „powiększenie” i „rozdzielczość”. Choć oba zdjęcia wykonane są w identycznym powiększeniu końcowym $2\,700\times$, na zdjęciu z mikroskopu świetlnego (lewym) poza jądrem (1), ziarnami wydzielniczymi (2) i światłem pęcherzyka nie można rozpoznać żadnych dalszych szczegółów cytologicznych. Zdjęcie mikroskopowo-elektronowe (prawe) wykonano przy dużo większym powiększeniu pierwotnym (dającym większą rozdzielczość) i dlatego widać dodatkowo różne inne organella, jak mitochondria (3), i dużą liczbę uporządkowanych pokładów cystern siateczki śródplazmatycznej ziarnistej (4). Wyraźniej i bardziej kontrastowo widoczne są także chromatyna jądrowa i granice naczyń włosowatych.



badanie mikroskopowe
materiału cytologicznego
(komórkowego) lub
histologicznego (tkankowego)

pobranie materiału różnymi metodami

laboratoryjne techniki przygotowania oceny pobranego materiału

- Cytologia złuszczeniowa
- Biopsja aspiracyjna cienkoigłowa (BAC, punkcja)
- Biopsja gruboigłowa (oligobiopsja)
- Biopsja wiertarkowa
- Biopsja otwarta
- Biopsja śródoperacyjna (badanie doraźne, intra)

preparaty barwione

preparaty mrożone

rozmaz

Zarówno przygotowanie, jak i ocena preparatów jest dokonywana przez histopatologa.

Preparaty barwione (wykonywane w tzw. trybie zwykłym) - tą techniką uzyskuje się najlepszą jakość preparatu histopatologicznego. Dzieje się to kosztem czasu potrzebnego do przygotowania preparatów - kilka dni.

Jednak tak przygotowany preparat histopatologiczny pozwala na łatwiejsze i dokładniejsze odróżnienie poszczególnych elementów komórkowych czy tkankowych.

Niekiedy, dla uzyskania dodatkowych informacji, pobrany materiał do badania poddaje się dodatkowym technikom laboratoryjnym np. immunohistochemicznej. Może to wydłużać czas przygotowania preparatu.

Preparaty mrożone (wykonywane w tzw. trybie doraźnym, intra, badanie śródoperacyjne) - przygotowanie preparatów tkankowych w ten sposób, pozwala na postawienie diagnozy w ciągu kilku minut od chwili pobrania materiału.

Odbywa się to jednak kosztem jakości preparatu, którego ocena jest trudniejsza aniżeli preparatu barwionego. Stąd, w przypadku takich nowotworów jak chłoniak, czerniak, mięsak, trudnych do oceny śródoperacyjnej (podczas zabiegu operacyjnego), jak i w każdym innym wątpliwym przypadku, ostateczną odpowiedź co do charakteru guza otrzymuje się po wykonaniu badań w tzw. trybie zwykłym.

Materiałem jest wydzielina, płyn lub aspirat uzyskany z biopsji cienkoigłowej.

Materiał cytologiczny rozmazuje się bezpośrednio na szkiełku podstawowym, które zanurza się w utrwalaczu, następnie barwi i ogląda pod mikroskopem.

Wstępem do każdego postępowania leczniczego jest zebranie, za pomocą dostępnych metod diagnostycznych, możliwie jak największej ilości informacji o chorobie nowotworowej.

Szczególne znaczenie, ważne dla wyboru metody leczniczej, rozległości zabiegu operacyjnego i rokowania, ma ustalenie typu histologicznego nowotworu i stopnia jego złośliwości.

W niektórych przypadkach wystarcza tylko stwierdzenie obecności komórek nowotworowych (bez określenia typu) dla podjęcia dalszych decyzji terapeutycznych.

Współczesne zasady onkologii zabraniają podejmowania decyzji terapeutycznych bez rozpoznania histopatologicznego. Lekarz musi zatem dążyć do ustalenia rozpoznania histopatologicznego. Do tego celu używa jednej lub kilku metod diagnostycznych.

Na wybór rodzaju badania zasadniczy wpływ mają takie czynniki jak: podejrzewany typ nowotworu, rodzaj nakłuwanej tkanki, osiągalność guza, użycie miejscowego lub ogólnego znieczulenia, metoda operacyjna w przypadku stwierdzenia nowotworu.

1. R. Kordek, L. Woźniak, W. Biernat, *Nowotwory. Zarys patologii onkologicznej*, Łódź 2001
2. W. Sawicki, *Histologia, podręcznik dla studentów medycyny*, Warszawa 2005
3. T. Cichocki, J.A. Litwin, J. Mirecka, *Kompendium histologii*, Kraków 1992
4. Atlasy histologiczne
5. S. Zawistowski, *Technika histologiczna, histologia oraz podstawy histopatologii*, Warszawa 1975



Zakład Cytofizjologii, Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

91-036 Łódź, ul Narutowicza 60

tel. 042 631 98 07 fax 042 630 66 18



<http://www.umed.lodz.pl/zchie/>

Dziękuję za uwagę!

