

Margareta Strojjan Fležar¹

Osnove diagnostične citopatologije

Principles of Diagnostic Cytopathology

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: citološka diagnostika, novotvorbe – patologija

Citopatološka preiskava je diagnostična metoda, ki temelji na svetlobnomikroskopski preiskavi celic. Proučujemo celice, ki se spontano odluščijo s telesnih površin ali pa so iz telesa odvzete z različnimi postopki. Citopatološka preiskava omogoča osnovno diagnostiko bolezenskih procesov, predvsem pomembna je hitra diagnostika malignomov in njihovih predstopenj. Najpogostejša citopatološka preiskava je pregled brisa materničnega vratu – test PAP, ki se uporablja v presejalnih testih za zgodnje odkrivanje predrakavih sprememb in raka na materničnem vratu. Vzorci za citopatološko preiskavo morajo biti pravilno odvzeti, ustrezno fiksirani in pravilno označeni ob odvzemu, da je citopatološka diagnoza zanesljiva. V laboratoriju pa morajo biti nadaljnji postopki obdelave vzorcev standardizirani in morajo ustrezati zahtevam kakovosti dela v laboratorijih.

ABSTRACT

KEY WORDS: cytodagnosis, neoplasms – pathology

Cytopathologic examination is a diagnostic method which encompasses light-microscopic examination of cells that exfoliate spontaneously from body surfaces or are obtained through various diagnostic procedures. Basic diagnostic evaluation of a diverse range of pathologic processes can be conducted by performing the cytopathologic examination of cells, most importantly for quick diagnosis of malignant neoplasms and its precursors. The Pap test which represents the cervical smear is the most common cytopathologic specimen used in screening programs for the early detection of precancerous lesions and cervical cancer. It is mandatory to obtain cell samples in accordance with professional guidelines, and to properly fix and accurately label them on the spot in order to make a reliable cytopathologic diagnosis. Laboratory procedures should be standardized and quality assurance and quality control measures should be implemented.

¹ Doc. dr. Margareta Strojjan Fležar, dr. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

UVOD

Citopatologija je umetnost in znanost proučevanja celic človeškega telesa, ki se spontano odluščijo s telesnih površin ali pa jih iz telesa odvezamo z različnimi postopki. Je veja patologije in tako tudi medicine (1, 2).

Citopatološka preiskava omogoča osnovno diagnostiko bolezenskih procesov in spremljanje bolezni. Najpomembnejšo diagnostično vlogo ima v onkologiji, saj s svetlobnomikroskopsko preiskavo celic ocenjujemo primarne, metastatske in ponovljene maligne neoplazme in njihove predstopnje, lahko pa spremljamo tudi učinke zdravljenja (3). Najpogosteje citopatološko preiskavo uporabljamo v presejalnih testih za zgodnje odkrivanje predrakavih sprememb in raka na materničnem vratu (1, 4, 5, 6).

Bistvena značilnost vseh celičnih vzorcev je, da ne glede na način in mesto odvzema, struktura tkiva ni ohranjena. Zato svetlobnomikroskopska citopatološka preiskava temelji na ocenjevanju celičnih morfoloških značilnosti, organizaciji celičnih skupin in drugih izvenskičnih sestavin v vzorcu, ne moremo pa ocenjevati strukture obolelega tkiva in njegovega strukturnega odnosa do žil, živcev ali zdravega tkiva (1).

Pogoj za osnovno diagnostiko malignomov in njihovih predstopenj je poznavanje normalnih celic človeškega telesa in morfoloških sprememb, ki nastanejo zaradi fizioloških procesov ali kot odziv na različne škodljive dejavnike (proliferacija, regeneracija, metaplazija, degeneracija). Poznati moramo tudi morfološke značilnosti benignih neoplazij in spremembe na celicah, ki so posledica zdravljenja (iatrogene spremembe). Če so morfološke značilnosti celic v celičnem vzorcu dovolj razpoznavne, lahko neoplazmo natančneje opredelimo in postavimo specifično diagnozo, čeprav v citološkem vzorcu struktura tkiva ni ohranjena (1).

Citopatološka preiskava je hitra, zanesljiva, večinoma bolniku prijazna (tj. neinvazivna) in poceni diagnostična metoda, pri kateri so zapleti redki in večinoma blagi.

ZGODOVINA

Diagnostična citopatologija je plod večstoletnih opazovanj in raziskovanj. Zgodovina

opazovanja celic je nujno povezana z razvojem mikroskopa (1, 7). Prve mikroskope so sestavili v Italiji in Holandiji (17. stoletje), najbolj uporaben pa je bil mikroskop Antonija van Leewenhoeka (1632–1723) z Nizozemske, ki je omogočal 275-kratno povečavo. Opazoval in poročal je o bakterijah in semenčicah. Tajnik Kraljevega kolegija v Londonu Robert Hooke je leta 1665 prvi uporabil besedo »cella«, da je opisal sestavne dele spužev in plute, vendar pomena celic niso poznali še nadaljnjih 200 let.

Izboljšani mikroskopi so v 19. stoletju omogočili hitrejši razvoj proučevanja celic, tehnološki razvoj pa je omogočil, da so postali dostopni vsem, ki jih je zanimala struktura in delovanje celic. Vsa mikroskopska opazovanja, ne le v raziskovalne, ampak tudi v diagnostične namene, so v prvi polovici 19. stoletja temeljila na opazovanju celic. Ugotovili so, da se živalske celice različnih organov razlikujejo v velikosti in obliki in da so nekatere opremljene s specializiranimi organeli npr. cilijami. Iz tega obdobja (l. 1845) je prvi citološki atlas fotomikrografij mikroskopskih slik človeških celic, katerega avtor je bil André François Donné (1, 7).

Mikroskopskemu opazovanju celic je sledila klasifikacija normalnih celic, ki je osnova moderne citologije in kasneje histologije. Z razvojem tehnik za pripravo tkiva za mikroskopsko analizo v drugi polovici 19. stoletja je zanimanje za citologijo upadlo. Čeprav so v tem obdobju že uporabljali citološke vzorce za diagnostiko raka, je ostala v senci razvoja histopatologije.

Nobenega dvoma ni, da ima največje zasluge za vrnitev citologije med pomembne diagnostične metode dr. Papanicolaou, Američan grškega porekla (1, 7). Slaven je postal, ker je opazil – in sicer po naključju – rakaste celice v aspiratih sluzi iz nožnice žensk, pri katerih je raziskoval menstrualni cikel. Dr. Papanicolaou je prvič predstavil svoja opažanja na nekem strokovnem srečanju že leta 1928, vendar ni vzbudil zanimanja. Šele leta 1939 je začel sodelovati z ginekologom Herbertom Trautom, ki mu je pošiljal razmaze iz nožnic svojih bolnic. Kmalu sta potrdila, da lahko pri bolnicah brez bolezenskih težav in znamenj najdeta rakaste celice, ki so jih kasneje potrdili s histopatološkim pregledom. Leta 1941

sta objavila članek o odkrivanju prikritega raka maternice, dve leti kasneje pa še knjigo (1, 7). Metodo, ki so jo po dr. Papanicolaouu poimenovali test PAP, so rutinsko začeli uporabljati od leta 1950 dalje in jo še vedno vsak dan uporabljamo v presejalnih testih. Metodo so kasneje izpopolnili, vendar je osnovno načelo ostalo enako – odvzeti bris materničnega vratu z namenom zgodnjega odkrivanja predrakavih sprememb in raka na materničnem vratu. Ime dr. Papanicolaoua nosi tudi specifično barvanje za brise materničnega vratu, ki ga je sam razvil.

V istem obdobju kot Papanicolaou (leta 1927) je tudi Aurelio Babeş, romunski patolog, poročal, da lahko v razmazu, dobljenem z bakteriološko zanko z materničnega vratu in fiksiranjem v metanolu ter barvanem po Giemsi, odkrijemo raka na materničnem vratu. Članek, ki je bil objavljen naslednje leto, je predlagal, da lahko s to metodo odkrijemo raka v predinvazijski fazi, vendar njegovo delo ni vzbudilo večjega zanimanja (1, 7).

Vzporedno z razvojem eksfoliativne citologije sta Lebert in Kun že sredi 19. stol z iglo pridobivala citološke vzorce iz tipljivih tumorjev in jih mikroskopsko pregledovala.

V začetku 20. stoletja so v bolnišnici, ki je danes znana pod imenom Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, ZDA, začeli uporabljati najprej debelo iglo, kasneje pa tudi tanko, za aspiracijo celic, vendar širšega zanimanja za ta postopek v ZDA še dolgo ni bilo (1).

Nasprotno pa je metoda zaživela v Evropi. V začetku štiridesetih let sta jo preizkušala internista Lopes-Cardozo na Nizozemskem in Sonderstrom na Švedskem. Uporabljala sta tanke igle in hematološke tehnike. Zdravnika Sixten Franzén in Josef Zajicek (Radiumhemmet, Stockholm, Švedska) sta aspirirala mnogo organov in sprememb ter metodo izpopolnila (1, 7). Najpomembnejša izboljšava je držalo za brizgo ali »pištola«, s katero lahko izvedemo aspiracijsko biopsijo z eno roko, medtem ko z drugo fiksiramo tumor. Zajicek je leta 1974 objavil prvo monografijo o aspiracijski biopsiji s tanko iglo, katere osnova je bila histologija (8). V sedemdesetih letih prejšnjega stoletja so se pojavile klinike za aspiracijsko biopsijo s tanko iglo,

izdali so učbenike in metoda je postala sprejemljivo nadomestilo za tkivno biopsijo.

Metodo aspiracijske biopsije s tanko iglo je s Švedske v istem obdobju prenesla v Slovenijo in jo uvedla na Onkološkem inštitutu tudi Marija Us - Krašovec, kar jo uvršča med pionirje na tem področju.

VZORCI ZA CITOPATOLOŠKO PREISKAVO IN POSTOPKI OB ODVZEMU

Spontano odlučene celice – eksfoliativna citopatologija

Luščenje (eksfoliacija) celic je bodisi fiziološki proces zaradi obnavljanja sluzničnih površin, lahko pa je posledica bolezenskih procesov. Vzorci, ki vsebujejo odlučene celice in predstavljajo osnovno eksfoliativno citopatologijo, so: izloček iz nožnice, izmeček (sputum) in izpljunek, izcedki (npr. iz dojke), telesne tekočine (urin, izlivi v telesne votline, likvor) ter vsebine cist in psevdocist (1). Vzorci so sestavljeni iz spontano odlučene celice, deloma dobro ohranjenih celic in celic v različnih fazah propadanja (degeneracije). V vzorcih lahko najdemo tudi makrofage, levkocite, mikroorganizme, krvne celice, tujke, kristale, pri nekaterih izločkih pa tudi sluz.

Pri vsakdanjem delu na področju eksfoliativne citopatologije najpogosteje pregledujemo vzorce izlívov v telesne votline (pleuralni, perikardialni in abdominalni izliv ali ascites) in urine, dokaj pogosti pa so tudi izcedki iz bradavice dojke in vzorci likvorja (1, 9, 10, 11).

Spontano odlučene celice dobimo na enostaven način, ko npr. s površine bradavice dojke z objektim stekelcem pobereмо kapljico spontano izločenega izcedka ali ko bolnik zbere urin v poseben lonček. Nasprotno je odvzem izlívov v telesne votline ali likvorja invaziven poseg v človeško telo, ki ga ob diagnostičnem postopku ali v terapevtske namene po vseh pravih stroke opravi izbrani zdravnik.

Kadar pošiljamo v citopatološko preiskavo telesne tekočine v ustreznih posodah ali pa v brizgah (vsebine iz cist, psevdocist), je zelo pomembno, da jih pred in med prenašanjem ustrezno zaščitimo. Razlit material je potencialno kužen, po drugi strani pa razlitje

pomeni izgubo celic za diagnozo bolezenskega procesa. Zagotoviti moramo tudi čim hitrejši prenos v laboratorij, da se izognemo nadaljnemu propadanju celic, ali pa sekundarnemu razrastu mikroorganizmov, ki pospešujejo razkroj celic. Še posebej so k hitremu propadanju nagnjene celice v vzorcih likvorja, ki jih moramo zato prenesti ohlajene na ledu.

Izjema so vzorci, kjer telesne tekočine dobimo v kapljah (npr. izcedek iz dojke). V teh primerih iz kaplje, ki jo pobereмо na objektno steklo, takoj naredimo tanek in enakomeren razmaz ter ga takoj ustrezno fiksiramo.

Celice, odstranjene s pomočjo loparčka, krtačenja, igle ali s spiranjem – eksfoliativna in/ali abrazivna citopatologija

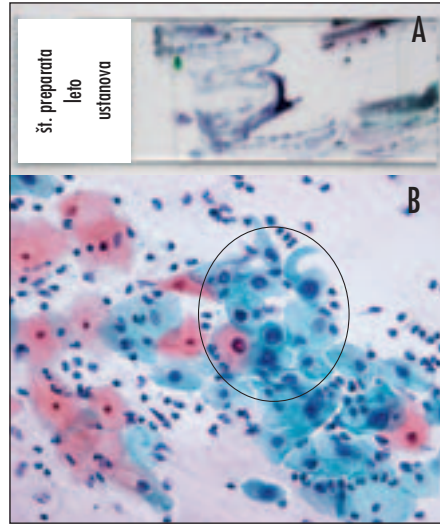
Celice odluščimo oziroma odstranimo s površine telesa in/ali globljih slojev tkiva s pomočjo različnih pripomočkov, zato tovrstne vzorce nekateri avtorji ločijo od eksfoliativne citologije in jo poimenujejo abrazivna citologija (1). Najbolj znan primer takšnega vzorca je bris materničnega vratu, ki je tudi najpogostejša vrsta celičnega vzorca po vsem svetu (slika 1).

Vzorec sestavljajo celice, ki smo jih dobili neposredno s površine epitelija, zato v njem običajno prevladujejo celice istega tipa. Včasih lahko zajamemo tudi celice iz bolezenskih sprememb pod epitelijem. Praviloma so te dobro ohranjene.

Od enostavnega jemanja brisa materničnega vratu z lesenim loparčkom ali Ayrovo spatulo, s katero je jemalec brisa odvezel celice s transformacijske cone na materničnem vratu, smo z leti prešli na dvojno jemanje brisa – z loparčkom odvezamemo bris s transformacijske cone, s krtačko pa iz kanala materničnega vratu (3, 4, 12).

S krtačko jemljemo tudi vzorce iz zgornjega dela dihal (sapnika ali bronhov), redkeje pa iz prebavil, kjer je za odvzem najdotopnejši požiralnik. Občasno pregledujemo tudi vzorce krtačenja velikih žolčnih vodov. V navedenih primerih vzorce s področij z bolezenskimi spremembami jemlje zdravnik specialist med endoskopsko preiskavo in odvzem vidno nadzoruje.

Z iglo strgamo celice s sprememb na zunanji površini telesa – s kože (1). Metoda je uporabna za osnovno diagnostiko kožnih

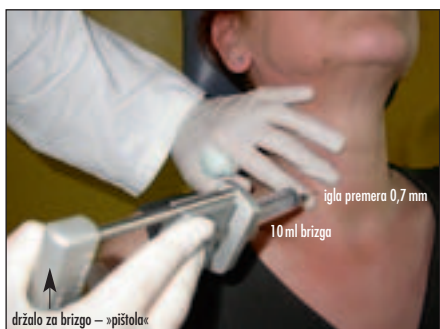


Slika 1. a) razmaz brisa materničnega vratu na objektnem stekelcu; levi del stekelca je razmaz vzorca, odvzetega z loparčkom, desni del pa razmaz vzorca, odvzetega s krtačko; b) mikroskopska slika istega vzorca (400-kratna povečava), barvanega po Papanicolaou; med normalnimi celicami ploščatega epitelija so celice, ki pripadajo predrakavi spremembi.

karcinomov, prepovedano pa je strganje celic s pigmentiranih kožnih sprememb. Iz citološkega vzorca namreč ne moremo zanesljivo opredeliti primarnega malignega melanoma, s poškodovanjem pri strganju pa lahko otežimo ali celo onemogočimo zanesljivo oceno melanoma pri kasnejši histopatološki preiskavi ali sprožimo razsoj.

Celični vzorec, ki smo ga odvezeli z loparčkom, krtačko ali iglo neposredno razmazemo na objektno stekelce. Pogoj za kakovostno oceno in diagnozo je tanko in enakomerno razmazan vzorec, ki mora biti dobro fiksiran takoj po odvzemu, nato pa ustrezno obarvan v laboratoriju (slika 1a in b).

Spiranje ali lavažo najpogosteje uporabljamo za pridobivanje celic iz respiratornega trakta (bronhoalveolarna lavaža – BAL) in sečnega mehurja (izpirek), zdravnik urolog lahko selektivno spere tudi enega od sečevodov ali ledvičnih mehov za usmerjeno diagnostiko sprememb v delu urinarnega trakta (1, 10). Izjemoma se izvaja spiranje prebavil ali trebušne votline (peritonealna lavaža). Večinoma organe spiramo ob nadzoru z endoskopskimi instrumenti. S fiziološko raztopino speremo



Slika 2. Aspiracijska biopsija s tanko iglo tumorja na vratu.

preiskovani del in odlučimo celice z notranje površine organa, tekočinski vzorec nato aspiriramo in shranimo v ustrezni posodi. Za prenos veljajo enaka priporočila kot za druge tekočinske vzorce (glej zgoraj).

Aspiracijska biopsija s tanko iglo (ABTI)

S to metodo lahko dobimo celične vzorce iz tumorjev, ki jih otipamo na površini telesa (slika 2) (3, 13, 14, 15, 16). Iz organov oziroma tumorjev v notranjosti telesa pa lahko vzorce odvezamemo ob nadzoru s slikovnimi metodami (RTG, CT, UZ) (17). Občasno uporabljajo ABTI za odvzem vzorcev iz sprememb, ki jih odkrijejo med operacijo. Kadar celični vzorec odvzamejo med endoskopsko preiskavo, je poseg bolj obremenjujoč za bolnika.

ABTI je poseg, pri katerem s pomočjo tanke igle posesamo celice iz bolezenske spremembe za svetlobnomikroskopsko preiskavo. Poseg je enostaven, hiter, neinvaziven, skoraj neboleč, učinkovit in poceni.

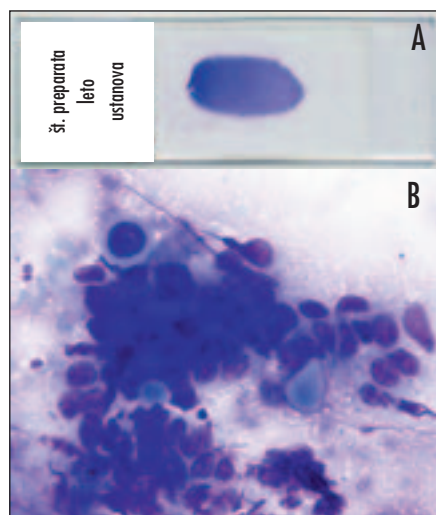
Zapleti so redki in vključujejo predvsem lokalni hematoma, včasih sinkopo, izjemoma pride na mestu vboda do vnetja. V literaturi navajajo anekdotične primere pnevmotoraksa. Na Onkološkem inštitutu, kjer so v Sloveniji prvi uvedli diagnostiko z ABTI, so ga v 40-letni praksi zabeležili le trikrat po ABTI tumorjev ali bezgavk v nadključnični kotanji.

Za ABTI potrebujemo držalo za brizgo, 10-mililitrsko brizgo in iglo premera 0,7 mm, dolžine 30 mm (slika 2) (16). Za globoko ležeče tipljive tumorje lahko uporabimo tudi daljše igle, dolge 40 ali 50 mm, premera 0,8 mm. Tumor držimo med dvema prstoma, kožo rahlo nategnemo, nato jo očistimo z razkužilom.

Bolnika opozorimo, prebodemo kožo in uvedemo iglo v tumor. Ko smo v tumorju, naredimo podtlak tako, da s pomočjo držala potegnemo bat v brizgalki navzgor. Podtlak obdržimo in postrgamo celice v več smereh. Ko se prikaže kaplja na bazi igle, podtlak popustimo, da ustavimo vsesavanje celic v vbodnem kanalu, in iglo izvlečemo.

Vsebinsko igle izbrizgamo na objektno stekelce in jo z drugim objektnim stekelcem tanko in enakomerno razmažemo (slika 3a in b). Običajno pripravimo dva razmaza, enega fiksiramo s sušenjem na zraku, drugega pa »mokra« fiksiramo. Če potrebujemo hitro orientacijsko diagnozo za usmeritev nadaljnjih diagnostičnih postopkov ali če želimo ugotoviti, ali je dobljeni material ustrezen za diagnozo, lahko naredimo dodaten razmaz, ki ga »mokra« fiksiramo in obarvamo s Hemacolorjem in takoj ob bolniku svetlobnomikroskopsko pregledamo ter ocenimo bolezenski proces.

Del celičnega vzorca, ki ostane v igli in brizgi lahko speremo v prilagojenem celičnem mediju in ga lahko uporabimo za dodatne preiskave (pretočno citometrične meritve, imunocitokemična barvanja, fluorescenčna in situ hibridizacija idr.), ki jih največkrat uporabljamo za natančnejšo opredelitev vrste



Slika 3. a) razmaz vzorca aspiracijske biopsije s tanko iglo; b) mikroskopska slika istega vzorca (400-kratna povečava), barvanega po Giemsi; na sliki so maligne celice metastatskega ploščatoceličnega karcinoma.

tumorja ali pa za opredelitev izvora zasevkov (18).

Izkušnje so pokazale, da najboljše vzorce tipljivih tumorjev z ABTI dobijo ustrezno usposobljeni citopatologi. Za odvzem materiala za citopatološko preiskavo pa se morajo dodatno usposobiti tudi zdravniki radiologi, če izvajajo aspiracijsko biopsijo, vodeno s katero od slikovnodiaagnostičnih metod. Pri usposabljanju naj sodeluje tudi citopatolog, saj izvajalca seznanja s pomenom zadostne količine kakovostnega vzorca in ustreznim ravnanjem po odvzemu, da ostane celični vzorec uporaben za citopatološko preiskavo. Enako velja za interniste ali kirurge različnih področij, če jemljejo celične vzorce ob nadzoru z endoskopskimi instrumenti.

Odtisi kirurških biopsij (uporaba tudi kot intraoperativna citologija)

Odtisi kirurških biopsij, odvzetih med operacijo, se uporabljajo za hitro ocenjevanje morebitnih zasevkov v prvi (varovalni) bezgavki pri karcinomu dojke, včasih tudi pri malignem melanomu, morda se bodo v prihodnosti uveljavili tudi pri drugih rakih, predvsem karcinomih (1, 19). Režno ploskev preiskovanega koščka tkiva (kirurško biopsijo) odtisnemo na objektno stekelce in fiksiramo s sušenjem na zraku, nato takoj pobarvamo z metodo »hitrega barvanja«; uporabljata se barvili Diffquick ali Hemacolor. Preparate, pripravljene za svetlobnomikroskopsko oceno, tako dobimo v nekaj minutah, kar je nujno za čimprejše nadaljevanje operativnega posega, kadar citopatološka preiskava potrdi zasevek v bezgavki.

OZNAČEVANJE VZORCEV IN NAPOTNIČA ZA CITOPATOLOŠKO PREISKAVO

Celične vzorce, ki jih pošiljamo v citopatološko preiskavo moramo pravilno označiti, da se izognemo napakam, ki so za bolnika lahko usodne. Za označevanje brisov materničnega vratu imamo natančna navodila, ki načeloma veljajo tudi za druge celične vzorce, vendar se v praksi pogosto dogaja, da jih zdravniki ne upoštevajo in zato povečujejo možnost, da



Slika 4. Pravilno označevanje vzorcev, ki jih zdravniki sami razmažujejo na objektna stekla in pošiljajo v citopatološko preiskavo.

pride do zamenjave vzorcev, posledice pa trpijo bolniki (12, 20). Objektno steklo z razmazom odvzetega vzorca ali posoda s telesno tekočino morata biti označena z bolnikovim priimkom. Če naenkrat pošiljamo več vzorcev istega bolnika, mora biti zabeleženo tudi mesto odvzema oziroma vrsta tekočine. Druge podatke napišemo na napotnico. Za pisanje podatkov na peskani del objektna stekla je primeren le navadni svinčnik, barve drugih pisal se raztopijo v kemikalijah med nadaljnjo obdelavo. Zgornji del prostora za označevanje (peskanega dela) na objektnem steklu mora ostati prazen, ker je namenjen za laboratorijsko identifikacijsko številko vzorca.

Za označevanje posod ali brizg s tekočinskimi vzorci je najprimernejša nalepka z identifikacijskimi podatki, ki jo bolnik dobi ob sprejemu v zdravstveno ustanovo.

Napotnica za citopatološko preiskavo mora vsebovati identifikacijske podatke o bolniku in pošiljatelju, času, vrsti in mestu odvzema vzorca ter o kliničnih podatkih in zdravljenju (tabela 1).

V določenih primerih lahko laboratorij vzorec, poslan v citopatološko preiskavo, zavrne. Najpogostejši vzroki za zavrnitev vzorca so: 1) vzorec ni označen (npr. ni zapisan priimek bolnika), 2) priimek bolnika na vzorcju in na napotnici se ne ujema, 3) objektno ste-

Tabela 1. Podatki, ki jih mora vsebovati napotnica za citopatološko preiskavo.

- ime in priimek bolnika
- bolnikov datum rojstva
- številka zdravstvenega kartona/bolnišničnega popisa bolezní
- naslov (oddelek, ambulanta, ustanova), kamor naj bo poslan izvid
- priimek zdravnika, ki naroča preiskavo, in telefonska številka
- datum (in čas) odvzema vzorca
- vrsta vzorca (npr. bris materničnega vratu, izliv/organ, likvor, urin, izpirek/organ, izcedek iz dojke, skarifikat)
- mesto odvzema vzorca (vzorci, odvzeti iz več različnih mest, morajo biti natančno označeni!)
- način odvzema vzorca (npr. UZ, rentgensko, CT-vodena ABTI)
- priimek zdravnika, ki je vzorec odvezel
- klinični podatki in podatki o zdravljenju
- izvidi prejšnjih citopatoloških ali histopatoloških preiskav

klo je razbito do take mere, da se ne da sestaviti, 4) vzorca ne spremlja napotnica z zahtevanimi podatki.

POSTOPKI PRIPRAVE VZORCEV V CITOPATOLOŠKEM LABORATORIJU

Del vzorcev, ki jih sprejmemo v citopatološkem laboratoriju, je že pripravljen za barvanje, saj jih zdravnik že ob odvzemu razmaže na objektno stekelce in ustrezno fiksira. To so vsi brisi materničnega vratu, brisi izcedkov iz bradavice dojk, krtačenja različnih organov, razmazi strganja z iglo in vsi vzorci ABTI. Pomembno je, da so nadaljnji postopki obdelave vzorcev v laboratoriju standardizirani in ustrezajo zahtevam kakovosti dela v laboratorijih (21, 22).

Priprava tekočinskih vzorcev

Nadaljnjo obdelavo v laboratoriju potrebujejo vsi tekočinski vzorci (izlivi v telesne votline, urin, likvor, tekočine iz cist in psevdocit, izpirki različnih organov) (1). Gostota celic v tekočinah je večinoma nizka, zato celice za svetlobnomikroskopsko citopatološko preiskavo koncentriramo s centrifugiranjem, potem usedlino razmazemo na objektno steklo. Če je tekočina malo (manj kot 0,5 ml) ali pa gre za likvor, vzorec neposredno centrifugiramo na stekelce v citocentrifugi (citospini). Celice iz nekaterih tekočinskih vzorcev (urin, izpir-

ke iz urinarnega trakta) ujamemo s filtracijo na membranski filter in jih nato odtisnemo na objektno steklo.

Del tekočinskega vzorca, zgoščenega s centrifugiranjem, lahko shranimo v modificiranem celičnem mediju za dodatne citopatološke metode – enako kot ostanke vzorcev ABTI (16, 18).

Fiksacija

Celične vzorce na objektnem steklu moramo takoj fiksirati, da preprečimo delovanje avtolitičnih encimov, ohranimo obliko in strukturo celic, dosežemo prepustnost celične membrane za barvila in pripravimo celične komponente za vezavo barvil.

V citopatologiji uporabljamo v grobem dve vrsti fiksacije – »suho« in »mokra«, ki ustrezata dvema osnovnima načinoma barvanja po Giemsi in Papanicolaouu (1). O »suhi« fiksaciji govorimo, kadar razmaz celičnega vzorca na objektnem steklu posušimo na zraku (za barvanje po Giemsi). Za »mokra« fiksacijo pa objektno steklo TAKOJ (v 2–3 sekundah) potopimo v fiksativ; morebitno sušenje celic pred fiksacijo pomembno vpliva na slabšo kakovost obarvanja po Papanicolaouu.

Za »mokra« fiksacijo uporabljamo koagulantne fiksative: eter/alkohol, 96 % etanol, 100 % metanol, 80 % propanol/izopropanol, Delaunayjev fiksativ (acetone: 96 % etanol 1 : 1 + 0,5 ml/l trikloroacetne kisline). Uporabljajo se tudi razpršilni fiksativi (alkohol in Carbowax – polietilen glikol), ki jih takoj v ustrezni razdalji (15–20 cm) enakomerno 2–do 3-krat razpršimo po celičnem vzorcu na objektnem steklu.

Barvanje

Celične preparate na objektnih steklih barvamo, da naredimo celične sestavine in ozadje (necelične sestavine oziroma druge elemente med diagnostičnimi celicami) vidne pod mikroskopom. V citopatologiji uporabljamo dva osnovna načina barvanja preparatov: barvanje po Giemsi (slika 3b) in barvanje po Papanicolaouu (slika 1b) (1). Vsako barvanje ima svoje značilnosti in prednosti, ki se dopolnjujejo, zato običajno celične vzorce razdelimo in pripravimo na oba načina.

Za barvanje po Giemsi uporabljamo barvila, ki so sestavljena iz kationskih (bazičnih),

npr. Azure B, in anionskih (kislih) barvil, npr. Eosin Y. Kationska barvila se vežejo na anionske celične strukture (DNK, RNK) in jih obarvajo modro-sivo, beljakovine in druge kationske strukture pa se obarvajo z anionskimi barvili oranžno-rdeče. Jedra so obarvana modro-vijolično, citoplazma pa je obarvana rožnato ali v različne odtenke modre barve.

Barvanje po Papanicolaou uporabljata za barvanje jeder hematoksilin. Hematoksilin ima afiniteto do negativno nabitih molekul in zato barva DNK, RNK in kisle proteine. Hematoksilin obarva jedra temno modro. Sledi barvanje citoplazme z Orange G in polikromno mešanico EA. Orange G je kislo barvilo z majhno molekulo, ki obarva keratin intenzivno oranžno. Polikromna mešanica EA je sestavljena iz eozina, light greena in Bismarck browna. Vsebuje tudi fosforvolframovo oziroma fosformolibdensko kislino, ki deluje kot zakisljevalec in poveča učinek light greena. Eozin se veže na beljakovine in citoplazmo zrelih superficialnih celic ploščatega epitelija, jedra, eritrocite in cilije barva svetlo rdeče. Light green je kislo barvilo, ki citoplazmo metabolno aktivnih celic (parabazalne in intermedialne celice ploščatega epitelija ter cilindrične žlezne celice) obarva zeleno. Dobro se veže na bazične proteine. Bismarck brown je bazično barvilo, njegova vloga ni pojasnjena in je v mnogih recepturah opuščena.

Pogosto uporabljamo tudi »hitra« barvanja, ki jih izvajamo ob odvzemu celičnega vzorca, zato so omenjena med postopki ob odvzemu.

Kakovostno obarvani vzorci so osnovni pogoj za zanesljivo citopatološko diagnozo. Poudariti moramo, da kakovost obarvanih vzorcev ni odvisna le od postopkov v laboratoriju (tehnike barvanja, dovolj pogoste menjave barvil, alkoholov in kisilola), ki morajo biti

standardizirani in tako ponovljivi. Na obarvanost pomembno vplivata tudi kakovost razmaza (debelina in enakomernost) in fiksacija takoj ob odvzemu, pa tudi celičnemu vzorcu lastne značilnosti (npr. pH) (1).

Na pobarvane preparate položimo krovno stekelce s kapljo sredstva za pokrivanje. Tako pripravljen preparat je primeren za svetlobno mikroskopsko preiskavo.

ZAKLJUČKI

Eksfoliativna citopatologija ali abrazivna citopatologija (kot jo imenujejo nekateri citopatologi) je pomembno prispevala k prepoznavanju zgodnjih oblik raka v mnogih organih, pripomogla je k razumevanju karcinogeneze in posledično dobila svoje mesto v preventivi, predvsem v zgodnjem odkrivanju predrakavih sprememb in raka na materničnem vratu. Eksfoliativna citopatologija in/ali abrazivna citopatologija je pomembna tudi za vsakodnevno rutinsko morfološko diagnostiko bolezenskih procesov v različnih organih.

Po drugi strani je ABTI pomemben diagnostični postopek, ki lahko nadomešča ali pa dopolnjuje tkivno biopsijo. Metoda je primerna za pridobivanje vzorcev iz vseh delov človeškega telesa. Citopatološka preiskava vzorca ABTI je dostikrat edina svetlobnomikroskopska morfološka preiskava, na kateri sloni zdravljenje, kadar tkivne biopsije ne moremo izvesti zaradi slabega stanja bolnika ali pa če je bolezenski proces težko dostopen kirurški biopsiji.

Citopatološka diagnoza temelji na povezovanju vseh podatkov, ki jih imamo o bolniku, ne le na opazovanju posamezne celice. Zato je zanesljiva diagnoza mogoča le, če ima citopatolog ob celičnem materialu, ki je ustrezno odvzet in obdelan, vse potrebne klinične podatke.

LITERATURA

1. Koss GK, Melamed MR. Koss's diagnostic cytology and its histopathologic bases. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
2. DeMay RM. Art and science of cytopathology. Chicago: American Society for Clinical Pathology Press; 1996.
3. Us - Krašovec M. Aspiracijska biopsija v onkologiji. Onkologija 1998; 2: 9-10.
4. Koss GL, Gompel C. Introduction to gynecologic cytopathology with histologic and clinical correlations. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
5. DeMay RM. The Pap test. Chicago: American Society for Clinical Pathology Press; 2005.
6. ZORA - državni program zgodnjega odkrivanje predrakavih sprememb materničnega vratu. Dosegljivo na: <http://www.onko-i.si/zora/>

7. Grunze H, Spriggs AI. History of clinical cytology. A selection of documents. Darmstadt: G-I-T Verlag Ernst Giebler; 1980.
8. Zajicek J. Aspiration biopsy cytology. Part I: Cytology of supradiaphragmatic organs. Monographs in clinical cytology, Vol. 7. Basel-New York: S. Krager; 1974.
9. Shidham VB, Atkinson BF. Cytopathologic diagnosis of serous fluids. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007.
10. Rosenthal DL, Raab SS. Cytologic detection of urothelial lesions. In: Rosenthal DL, ed. Essentials in cytopathology series. New York (NY): Springer, 2006.
11. Walts AE. Cerebrospinal fluid cytology: selected issues. *Diagn Cytopathol* 1992; 8: 394–408.
12. Kirar - Fazarinc I, Uršič - Vrščaj M, Pogačnik A, et al. Navodila za odvzem brisa materničnega vratu in za izvajanje programa ZORA. 4. prenovljena izdaja. Ljubljana: Onkološki inštitut; 2006. Dosegljivo na: http://www.onko-i.si/zora/00za_izvajalce/Navodila_za_odvzem_brisa_maternicnega_vratu_in_za_izvajanje_programa_zora-4-prenovljena_izdaja.pdf
13. Orell SR, Sterrett GF, Walters MNI, Whitaker D. Manual and atlas of fine needle aspiration cytology. 3rd edition. London: Churchill Livingstone, 1999.
14. Pogačnik A, Us - Krašovec M. Analysis of routine cytopathology reports in 1,598 histologically verified benign breast lesions. *Diagn Cytopathol* 2004; 30: 125–30.
15. Fležar M. Rak dojke: značilnosti, ki jih lahko opredelimo iz vzorca aspiracijske biopsije s tanko iglo. *Med razgl* 2004; 43: 279–87.
16. Kloboves Prevodnik V, Strojani Fležar M. Citopatologija. In: Cerar A, Luzar B, Rott T, eds. Patologija. Izbrana poglavja iz patologije z navodili za vaje. 3. razširjena in prenovljena izdaja. Ljubljana: Katedra za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani; 2006.
17. Pogačnik A, Fležar M. Citodiagnostika netipljivih lezij v dojkah. *Radiol Oncol* 2004; 38 (Suppl 1): S93–7.
18. Fležar M, Kloboves - Prevodnik V. Novosti v citopatologiji. In: Bešič N, Anderluh F, Benedik J, et al., eds. Novosti v onkologiji in smernice za obravnavo bolnic z rakom dojke in bolnikov z malignim melanomom. Ljubljana: Kancerološko združenje Slovenskega zdravniškega društva: Onkološki inštitut: Zveza slovenskih društev za boj proti raku, 2004, 28–34.
19. Pogačnik A, Klopčič U, Grazio - Frković S, et al. The reliability and accuracy of intraoperative imprint cytology of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Cytopathology* 2005; 16: 71–6.
20. Pogačnik A, Kirbiš Srebotnik I, Fokter - Repše F, et al. Navodila za poenotne izvidov brisov materničnega vratu. 2. prenovljena izdaja. Ljubljana: Onkološki inštitut; 2005. Dosegljivo na: http://www.onko-i.si/zora/00za_izvajalce/Navodila_za_poenotenje_izvidov_brisov_maternicnega_vratu-2-prenovljena_izdaja.pdf
21. Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za pregledovanje brisov materničnega vratu. Dosegljivo na: <http://www.uradni-list.si/1/online.jsp?urlid=2004128&dhid=72857>
22. Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine. Dosegljivo na: <http://www.uradni-list.si/1/online.jsp?urlid=200464&dhid=70236>

Prispelo: 26. 11. 2007