

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LEKÁRSKÝCH VIED



DIPLOMOVÁ PRÁCA

Vplyv fixácie na spracovanie trepanobiopsí kostnej drene

Bc. Miroslava Panócová

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Ivana Němečková, PhD.

Konzultant: Mgr. Katarína Šoltésová

HRADEC KRÁLOVÉ, 2022

Podakovanie

V neposlednom rade chcem vyjadriť poďakovanie školiteľke RNDr. Ivane Němečkovej, PhD. za jej cenné rady, trpezlivosť a metodické usmernenia. Vďaka patrí aj konzultantke Mgr. Kataríne Šoltésovej a celému tímu klinických patológov a laborantov, najmä za ich odborné vedenie pri realizácii štúdie a možnosť jej vykonania v priestoroch Diagnostického centra patológie v Prešove.

„Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, 12.05.2022

.....

OBSAH

OBSAH	4
ABSTRAKT.....	6
ABSTRACT.....	7
1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
2.1 Spracovanie biologického materiálu - fixácia	9
2.1.1 Typy fixácie	9
2.1.2 Fixačné roztoky	10
2.1.3 Koagulačné fixatíva.....	10
2.1.4 Nekoagulačné fixatíva	12
2.1.5 Fixačné zmesi.....	15
2.1.6 Zásady správnej fixácie a požiadavky na fixačný roztok.....	17
2.2 Kost'.....	18
2.2.1 Medzibunková hmota.....	18
2.2.2 Bunky kostného tkaniva	19
2.2.3 Periost a endost.....	22
2.2.4 Typy kostného tkaniva.....	23
2.3 Kostná dreň	27
2.3.1 Štruktúra kostnej drene.....	27
2.3.2 Cievne zásobenie kostnej drene.....	29
2.3.3 Typy kostnej drene	30
2.4 Trepanobiopsia.....	32
2.4.1 História trepanobiopsie	32
2.4.2 Odberová bioptická ihla	33
2.4.3 Miesto odberu kostnej drene.....	34
2.4.4 Veľkosť vzorky trepanobiopsie	35
2.4.5 Indikácie, kontraindikácie a komplikácie odberu kostnej drene.....	35
2.4.6 Odber trepanobiopsie	37

2.5	Spracovanie trepanobiopsie	39
2.5.1	Fixácia	39
2.5.2	Dekalcifikácia	40
2.5.3	Prístrojové spracovanie, zalievanie a rezanie.....	42
2.5.4	Farbenie a montovanie.....	43
2.5.5	Hodnotenie preparátu kostnej drene	46
3.	ZADANIE A CIEĽ PRÁCE	48
4.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	49
4.1	Spracovanie trepanobiopsie	49
4.1.1	Príjem trepanobiopsie	49
4.1.2	Spracovanie trepanobiopsie pred excidáciou	49
4.1.3	Ďalšie spracovanie trepanobiopsie	51
4.1.4	Príprava preparátov trepanobiopsie	53
4.2	Databáza trepanobiopsí	66
4.3	Výber skúmaného súboru	70
5.	VÝSLEDKY	72
6.	DISKUSIA	81
7.	ZÁVER.....	83
8.	POUŽITÉ SKRATKY	84
9.	ZOZNAM TABULIEK.....	85
10.	ZOZNAM OBRÁZKOV	86
11.	ZOZNAM GRAFOV.....	87
12.	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	88

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lekárskeho vied

Názov diplomovej práce: Vplyv fixácie na spracovanie trepanobiopsií kostnej drene

Autor: Bc. Miroslava Panáčová

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Ivana Němečková, PhD.

Cieľ práce: Cieľom tejto diplomovej práce je zistiť, či dĺžka fixácie ovplyvňuje spracovanie trepanobiopsií kostnej drene.

Metódy: Táto štúdia bola vykonávaná na dvanástich vzorkách trepanobiopsie kostnej drene fixovaných v 10% pufrovanom formalíne (NBF). Vzorky boli rozdelené do dvoch skupín na základe diagnózy. Skúmané boli tri dĺžky fixácie (24 hodín, 48 hodín a viac ako 48 hodín). Fixované vzorky boli v laboratóriu štandardne spracované, ofarbené vo farbiacom automate Shandon Varistain Gemini a odovzdané klinickému patológovi na hodnotenie.

Výsledky: Jednotlivé dĺžky fixácie dosiahli skóre hodnotenia laborant/klinický patológ: skóre 24-hodinovej fixácie bolo 6,71/7,71, skóre 48-hodinovej fixácie bolo 6,57/7,71 a skóre viac ako 48-hodinovej fixácie bolo 7,42/8,42. Z hľadiska rozdelenia do skupín je v skupine C fixácia dĺžky 24 hodín ohodnotená na 6/7,66, fixácia dĺžky 48 hodín na 6,33/7,66 a fixácia viac ako 48 hodín na 8,33/9. V skupine D mala 24-hodinová fixácia skóre 7,25/7,75, 48-hodinová fixácia mala skóre 6,75/7,75 a viac ako 48-hodinová fixácia mala skóre 6,75/8.

Záver: Ako najoptimálnejšia sa ukázala dĺžka fixácie viac ako 48 hodín. Ďalšou, pomerne vhodnou dĺžkou je 24-hodinová fixácia. Najnižšie hodnotenie získala fixácia dĺžky 48 hodín, ktorá nie je odporúčaná pre spracovanie trepanobiopsií kostnej drene.

Kľúčové slová: dĺžka fixácie, 10% pufrovaný formalín, kostná dreň, trepanobiopsia, farbenie hematoxylín-eozín

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Title of Diploma Thesis: Impact of various fixation methods on bone marrow trepanobiopsies processing

Author: Bc. Miroslava Panáčová

Supervisor of Diploma Thesis: RNDr. Ivana Němečková, PhD.

Background: The aim of this diploma thesis is to determinate whether the length of fixation influences the processing of bone marrow trepanobiopsies.

Methods: This study was performed on twelve bone marrow trepanobiopsy specimens fixed in 10% neutral buffered formalin (NBF). The samples were divided into two groups based on diagnosis. Three fixation lengths (24 hours, 48 hours, and more than 48 hours) were examined. The fixed samples were processed in the laboratory as standard, stained in a Shandon Varistain Gemini staining machine and handed over to a clinical pathologist for evaluation.

Results: Individual fixation lengths achieved the following laboratory technician/clinical pathologist scores: the 24-hour fixation score was 6.71/7.71, the 48-hour fixation score was 6.57/7.71, and the more than 48-hour fixation score was 7.42/8.42. In terms of division into groups, in group C, the 24-hour fixation is rated at 6/7.66, the 48-hour fixation at 6.33/7.66, and the more than 48-hour fixation at 8.33/9. In group D, the 24-hour fixation score was 7.25/7.75, the 48-hour fixation score was 6.75/7.75, and the more than 48-hour fixation score was 6.75/8.

Conclusions: The fixation length of more than 48 hours was found to be the most optimal. Another, relatively suitable length is the 24-hour fixation. The lowest rating was obtained by fixation for 48 hours, which is not recommended for bone marrow trepanobiopsies processing.

Keywords: fixation length, 10% neutral buffered formalin, bone marrow, trepanobiopsy, Hematoxylin and Eosin stain

1. ÚVOD

V dnešnej, veľmi hektickej a uponáhľanej, dobe nás obklopuje množstvo ochorení nádorového aj nenádorového pôvodu. Jednou zo skupín chorôb sú aj ochorenia krvi a krvotvorných orgánov. K ich diagnostike sa využíva široká škála laboratórnych testov a postupov, ku ktorým patrí aj aspirácia a biopsia kostnej drene. Oba tieto výkony sú invazívne a vykonávajú sa len pri jasnej klinickej indikácii. Trepanobiopsia je komplexnejšou metódou ako aspirácia, pretože poskytuje informácie nielen o numerických a cytologických znakoch buniek kostnej drene, ale aj o priestorových vzťahoch medzi bunkami a o celkovej štruktúre kostnej drene. Tak, ako pri každom biologickom materiáli, aj jej spracovanie podlieha presne vymedzeným kritériám. Veľmi dôležitým, ak nie vôbec najdôležitejším kritériom je práve proces fixácie vzorky. Ten by mal zabrániť poškodeniu tkaniva a napomáhať k zachovaniu čo najväčšieho počtu mikroskopických štruktúr. Proces fixácie ovplyvňuje voľba fixačného roztoku aj dĺžka trvania fixácie.

Väčšina štúdií sa zameriava na využitie rôznych druhov fixačných roztokov využívaných pri biopsii kostnej drene a v oveľa menšej miere je preskúmaný vplyv dĺžky fixácie. V tejto práci je skúmaný práve vplyv dĺžky fixácie na spracovanie trepanobiopsí kostnej drene.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 *Spracovanie biologického materiálu - fixácia*

Fixácia je zväčša prvým a nevyhnutným krokom v procese spracovania biologických vzoriek po ich odbere. Zachovanie, pokiaľ možno všetkých, aj najmenších štruktúr buniek a tkanív v stave, ktorý sa čo najviac zhoduje s morfológickým usporiadaním týchto štruktúr za živa, je kľúčové pre stanovenie správnej diagnózy. Fixáciu je možné definovať ako rýchle a násilné, ale zároveň šetrné usmrtenie živej hmoty buniek a tkanív prostredníctvom denaturácie natívnych bielkovín protoplazmy buniek a tkanív. Účelom fixácie je konzervácia buniek a tkanív, ktorá zabráni autolýze inaktiváciou lyzozomálnych enzýmov a zastaví rast plesní a baktérií. Výber typu fixácie závisí od analýzy, ktorá sa má vykonať. (Kocianová a kol., 2018; Vacek, 1996)

2.1.1 Typy fixácie

Poznáme 2 typy fixácie, a to fyzikálny typ a chemický typ. Oba spôsoby sú podrobnejšie opísané v nasledujúcich podkapitolách.

2.1.1.1 Fyzikálny typ fixácie

Fyzikálny typ fixácie nie je veľmi často využívanou technikou v rutínnej praxi lekárskej alebo veterinárnej patológie, anatómie a histológie. Patrí sem:

- fixácia teplom, ktorá je najjednoduchšou fixáciou. V histopatológii sa zväčša používa ako doplnková metóda na urýchlenie iných foriem fixácie.
- mikrovlnná fixácia, ktorej základom je mikrovlnné žiarenie. Táto metóda je takisto vo veľkej miere iba doplnkovou. V prípade hrubých vzoriek a histologických rezov dokáže skrátiť časy fixácie z viac ako 20 hodín na menej ako 20 minút. Využitie tejto formy fixácie zahŕňa isté nebezpečenstvo pri mikrovlnnom ohreve tkanív uložených vo formalíne kvôli vzniku nebezpečných výparov. Alternatívou je využívanie fixačných roztokov na báze glyoxalu.
- technika tzv. "freeze-drying" (fixácia sušením mrazom), ktorá je pokladaná za užitočnú pri štúdiu rozpustných materiálov a malých molekúl. Tkanivá narezané na tenké rezy sú ponorené do tekutého dusíka a voda sa odstráni pri -40°C vo

vákuovej komore. Takto fixované tkanivo je možné ešte dofixovať parami formaldehydu. V klinickej praxi táto metóda nenašla uplatnenie a využíva sa len zriedkavo. (Eltoum a kol., 2001; Suvarna a kol., 2013)

2.1.1.2 Chemický typ fixácie

Chemická fixácia je značne používanjšiu fixáciou. K zachovaniu štruktúr využíva rôzne organické alebo anorganické roztoky, nazývané fixačné roztoky, alebo aj fixatíva, ktoré budú bližšie opísané v nasledujúcej podkapitole.

2.1.2 Fixačné roztoky

Chemické fixačné roztoky sú využívané pre pomerne ľahkú prípravu a jednoduchú aplikáciu. Delia sa podľa mechanizmu pôsobenia na koagulačné a nekoagulačné fixačné roztoky (Obr. 1). (Megías a kol., 2022)

Koagulačné fixatíva	Nekoagulačné fixatíva
<ul style="list-style-type: none">• etanol• metanol• acetón• kyselina octová• kyselina pikrová• kyselina trichlóroctová	<ul style="list-style-type: none">• fomaldehyd• glutaraldehyd• chlorid ortuťnatý• oxid osmičelý

Obrázok 1 Fixačné roztoky

(upravené podľa: Jain, 2017)

2.1.3 Koagulačné fixatíva

Koagulačné fixatíva sú organické aj neorganické roztoky, ktoré precipitujú proteíny alebo vyvolávajú ich zhukovanie, čím ich robia nerozpustnými. Bunková architektúra je udržiavaná predovšetkým lipoproteínmi a vláknitými proteínmi (napr. kolagénom), pričom ich koagulácia udržiava tkanivovú histomorfológiu na úrovni svetelného mikroskopu. Bohužiaľ, pretože koagulačné fixatíva vedú k zlému zachovaniu mitochondrií a sekrečných granúl, nie sú užitočné v analýze ultraštruktúry. (Suvarna a kol., 2013)

Koagulačné fixatíva možno klasifikovať do 2 tried, a to dehydrant koagulačné fixatíva a kyslé koagulačné fixatíva.

Fixačný mechanizmus dehydrant koagulačných fixatív spočíva v dehydratácii a koagulácii proteínov, väčšinou cytozolických. Odstránenie a nahradenie voľnej vody z tkaniva má niekoľko účinkov na proteíny, a to najmä narušenie terciárnej štruktúry proteínov. Akonáhle je terciárna štruktúra rozpusteného proteínu modifikovaná, rýchlosť zvratu do usporiadanejšieho stavu je pomalá a väčšina proteínov po koagulácii ostáva nerozpustná aj po vrátení do vodného prostredia. Nevýhodou tejto skupiny fixatív je možná strata proteínov. Radíme k nim etanol, metanol a acetón. Práve pri fixácii acetónom je odhadovaná strata proteínov až 13%. (Kocianová a kol., 2018; Suvarna a kol., 2013)

Tzv. kyslé koagulanty menia náboje na ionizovateľných bočných reťazcoch proteínov a narušajú elektrostatické a vodíkové väzby. Taktiež môžu vložiť lipofilný anión do hydrofilnej oblasti a narušiť terciárnu štruktúru proteínu. Medzi tieto fixačné roztoky patrí kyselina octová, pikrová a trichlóroctová. (Suvarna a kol., 2013)

V ďalších podkapitolách nasleduje stručný prehľad koagulačných fixatív.

2.1.3.1 Etanol a metanol

Etanol (C_2H_5OH) a metanol (CH_3OH) sú fixatíva na báze alkoholu, ktoré ľahko prenikajú do buniek. Metanol má bližšie k štruktúre vody ako etanol, preto etanol silnejšie kompetuje v interakcii s hydrofóbnymi oblasťami molekúl ako metanol. Pre etanol začína koagulačná fixácia na koncentrácii 50-60%, zatiaľ čo pre metanol sa vyžaduje 80% a viac. (Suvarna a kol., 2013)

Vo všeobecnosti sa táto skupina fixačných roztokov používa pri fixovaní vzoriek malých rozmerov a na konzervovanie proteínov (enzýmy, glykogén a niektoré pigmenty). Etanol sa využíva najmä v neurohistológii a na dôkaz niektorých minerálnych látok (vápnik, železo). Pri vyhotovení krvných náterov je významným fixačným roztokom práve metanol. Nevýhodou týchto fixatív je, že spôsobujú stvrdnutie a zmrštenie tkaniva. Z tohto hľadiska je metanol lepší fixátor ako etanol, pretože tkanivo je lepšie zachované a menej stvrdnuté. (Kocianová a kol., 2018; Lukáš, 2008; Megías a kol., 2022)

2.1.3.2 Kyselina octová

Kyselina octová (CH_3COOH) koaguluje nukleové kyseliny (ďalej len NK), ale nefixuje ani nezráža proteíny. Účinok na tkanivá nie je priamou fixáciou, ale zmenou koloidného stavu bielkovín. Používa sa v koncentrácii 1-5%. Nevýhoda spočíva v deštrukcii mitochondrií a nie veľmi dobrej fixácii membrán a cytoplazmy. Najčastejšie sa pridáva do iných fixatív (napr. Bouin) ako prevencia proti strate NK. V niektorých roztokoch sa používa na potlačenie artefaktov, ktoré môžu spôsobiť etanol alebo kyselina pikrová. (Megías a kol., 2022; Suvarna a kol., 2013)

2.1.3.3 Kyselina trichlóroctová

Kyselina trichlóroctová (CCl_3COOH) môže prenikať do hydrofóbných domén proteínov a produkovaný anión reaguje s nabitými aminovými skupinami. Táto interakcia precipituje proteíny a extrahuje NK. (Suvarna a kol., 2013)

2.1.3.4 Kyselina pikrová

Kyselina pikrová ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$) sa mierne rozpúšťa vo vode za vzniku silne kyslého roztoku (pH 2,0). V reakciách vytvára soli s bázickými skupinami proteínov, čo spôsobuje koaguláciu bielkovín. Ak je roztok neutralizovaný, precipitovaný proteín sa môže znovu rozpustiť. Je dobrým fixačným prostriedkom na zachovanie bunkovej štruktúry ako aj glykogénu a lipidov. Fixácia kyselinou pikrovou vytvára jasnejšie sfarbenie, ale nízke pH roztoku kyseliny pikrovej môže zapríčiniť hydrolýzu a stratu NK, čo je považované za hlavnú nevýhodu. (Megías a kol., 2022; Suvarna a kol., 2013)

2.1.4 Nekoagulačné fixatíva

Nekoagulačné fixatíva sú roztoky, ktoré možno považovať za sekundárne fixatíva vzhľadom na ich potenciálny účinok vytvárania krížových väzieb v rámci alebo medzi proteínmi či NK, ako aj medzi NK a proteínmi. Tieto fixatíva šetrne denaturujú proteíny priečnym zosieťovaním, bez vzniku hrubých zrazenín. (Suvarna a kol., 2013)

Príklady fixačných nekoagulačných fixačných roztokov sú uvedené v nasledujúcich podkapitolách.

2.1.4.1 Formaldehyd (formalín)

Čistý formaldehyd (H_2CO) je para, ktorá po úplnom rozpustení vo vode tvorí roztok obsahujúci 37-40% formaldehydu. Táto vodná forma je známa pod názvom formalín, ktorý je považovaný za najbežnejšie používané fixatívum, pretože poskytuje výbornú štrukturálnu ochranu tkanív, je kompatibilný s väčšinou techník i histologických farbení a zachováva tkanivo po dlhú dobu. Je veľmi obľúbený, pretože je pomerne lacný, príprava roztoku k fixácii je jednoduchá a rýchla. Zväčša sa využíva v koncentrácii 4-10%. Reakcie formaldehydu s makromolekulami sú zložité. Viaže sa na funkčné skupiny proteínov a vytvára hemoacetálové skupiny, čo robí väčšinu enzýmov nefunkčnými, teda bráni degradácii tkanív hydrolytickými enzýmami. Formaldehyd sa viaže na aminoskupiny, sulfyhydrylové, guanidylové a alifatické hydroxylové skupiny, ich reakciou vznikajú hydroxymethylové zlúčeniny, ktoré reagujú s inými skupinami za vzniku methylenových mostíkov. Formaldehyd reaguje s jadrovými proteínmi, NK a lipidmi, neinteraguje so sacharidmi. (Kocianová a kol., 2018; Lukáš, 2008; Suvarna a kol., 2013)

Osobitnú pozornosť vyžaduje skladovanie formaldehydu. Je ho nutné uchovávať v tmavej fľaši, pretože pri styku formalínu so svetlom sa tvorí kyselina mravčia, ktorá má nepriaznivý vplyv na fixáciu. Formalín je vhodným fixatívom pre histologické preparáty, menej pre cytologické. Výhodou je rýchly prienik tkanivom, tkanivo je dobre konzervované a farbiteľné a môže sa vo formalíne ponechať aj dlhšiu dobu. Medzi nevýhody formalínu je možné uviesť vznik hnedých, tzv. „formolových zrazenín“, v krvotvorných orgánoch a určité napučanie tkaniva. (Kocianová a kol., 2018; Sundara, 2022; Vacek, 1996)

2.1.4.2 Pufrovaný formalín

V klasickej histochemii (ďalej len HCH) sa využíva formalín riedený s pufrovacím roztokom – 10% pufrovaný formalín (neutral buffered formalin – ďalej len NBF), ktorý poskytuje adekvátnu fixáciu, pričom zachováva neutrálne pH vnútorného prostredia. K neutralizácii je použitý uhličitan vápenatý. Tkanivá sa bežne v NBF fixujú 24 hodín, avšak znesú aj niekoľko dennú fixáciu. NBF je veľmi vhodným fixatívom pre prehľadné histologické preparáty a preparáty pre špeciálne farbenia. Bohužiaľ, vzorky, ktoré je

nutné vyšetrit' imunohistochemickými (ďalej len IHCH) metódami, značne ovplyvňuje predĺžený čas fixácie v negatívnom zmysle (strata antigénnych epitopov). (Čížková, 2018; Kocianová a kol., 2018; Travlos, 2006)

2.1.4.3 Glutaraldehyd

Glutaraldehyd ($C_5H_8O_2$) je v porovnaní s formaldehydom menej používaný, a preto je o jeho biologických účinkoch a efektoch na tkanivá známe menej. Je to bifunkčný aldehyd, ktorý sa pravdepodobne spája s rovnakými reaktívnymi skupinami ako formaldehyd. Vo vodných roztokoch polymerizuje za vzniku cyklických a oligomérnych zlúčenín, a tiež sa oxiduje na kyselinu glutárovú. Na rozdiel od formaldehydu má na oboch koncoch molekuly aldehydovú skupinu, takže pri každej reakcii prvej skupiny sa nezreagovaná aldehydová skupina môže zaniest' do proteínu a ďalej zosieťovať proteín. Alternatívne môžu aldehydové skupiny reagovať so širokým rozsahom iných HCH cieľov, napr. protilátky alebo enzýmy. Glutaraldehyd veľmi dobre zachováva ultraštruktúru, čo je významným predpokladom pre použitie elektrónovej mikroskopie. Nereaguje so sacharidmi, ani lipidmi, pokiaľ obsahujú voľné aminoskupiny. Pri laboratórnej teplote nesieťuje NK, to je možné pri teplote $45^\circ C$ a viac. Využíva sa pri fixácii punktátov obličiek a vzoriek kože odobraných „punch“ biopsiou. Medzi nevýhody tohto fixatíva možno zaradiť negatívne ovplyvnenie IHCH metód, vyššia cena, menšia stabilita a spomalenie penetrácie fixatíva tkanivom. (Jain, 2017; Kocianová a kol., 2018; Suvarna a kol., 2013)

2.1.4.4 Chlorid ortuťnatý

Chlorid ortuťnatý ($HgCl_2$) bol veľmi obľúbený pre svoje kvality zlepšovania farbiacich vlastností tkanív, najmä trichómov. V súčasnosti sa v klinických laboratóriách používa zriedkavo kvôli zdravotným a bezpečnostným problémom s používaním fixatíva obsahujúceho ortuť. Ďalšou a pomerne veľkou nevýhodou je tvorba usadenín intenzívne čiernych precipitátov ortuťového pigmentu v tkanivách. V čerstvo fixovaných tkanivách môžu byť precipitáty odstránené Lugolovým roztokom pri farbení, po ktorom nasleduje bielenie rezu v roztoku chlórnanu sodného. Tieto fixatíva sa nevyužívajú, okrem niektorých laboratórií na fixáciu hematopoetických tkanív. Potenciálnou náhradou je síran zinočnatý. (Suvarna a kol., 2013)

2.1.4.5 Oxid osmičelý

Oxid osmičelý (OsO_4) je toxická pevná látka, rozpustná vo vode, ako aj v nepolárnych rozpúšťadlách. Reaguje s hydrofóbnymi i hydrofilnými miestami zasahujúcimi do bočných reťazcov proteínov, čo môže potencionálne spôsobiť zasieťovanie proteínov. Je to fixatívum s dlhou tradíciou, a hoci je jedovatý, ako jeden z mála stabilizuje lipidy a patrí medzi roztoky najlepšie fixujúce membránové organely bunky. Používa sa ako sekundárny fixátor pri vyšetreniach elektrónovým mikroskopom a pri farbení lipidov v zmrazených rezoch. Nevýhodou je výrazné zhukovanie deoxyribonukleovej kyseliny (DNA), ktoré je však možné eliminovať predfixáciou hypermangánom draselným alebo postfixáciou uranylacetátom. Taktiež sa pri fixácii OsO_4 z tkanív uvoľňuje veľké množstvo bielkovín a sacharidov, čomu možno zamedziť počiatočnou fixáciou v glutaraldehyde. (Jain, 2017; Kocianová a kol., 2018; Suvarna a kol., 2013)

2.1.5 Fixačné zmesi

Každý fixačný roztok má svoje výhody, no žiaľ, aj veľa nevýhod. Medzi nevýhody možno zaradiť opuch alebo naopak zmrštenie tkanív počas procesu fixácie, zmeny v kvalite HCH a IHCH farbenia, či nízka schopnosť udržiavať bunkové štruktúry organel. Je potrebné uvedomiť si, že neexistuje ideálne fixatívum, preto boli za účelom kombinácie dobrých vlastností a obmedzenia neželaných účinkov vyvinuté fixačné zmesi. (Suvarna a kol., 2013)

2.1.5.1 Carnayova tekutina

Carnayova tekutina obsahuje 100%-ný etanol, chloroform a ľadovú kyselinu octovú. Radí sa medzi najoptimálnejšie fixatívum ribonukleovej kyseliny (RNA) a pri dôkaze glykogénu. Využíva sa na fixáciu vyhotovených kryostatových rezov z rýchlych peroperačných biopsií, alebo v IHCH pri spracovaní hormoreceptorov. (Kocianová a kol., 2018)

2.1.5.2 Bouinova tekutina

Bouinova tekutina, ktorá obsahuje kyselinu pikrovú, formaldehyd a kyselinu octovú, dobre zachováva polysacharidy (najmä glykogén, ale aj jadrové detaily bunky). Podľa

niektorých autorov je veľmi vhodná na fixáciu, nakoľko môže byť vďaka kyseline octovej použitá aj na dekalifikáciu. Medzi výhody patrí rýchly prienik tkanivom a nízke zmršťovanie tkaniva. Jej nevýhodou je nutnosť sledovať dĺžku fixácie, pretože pri predĺženej fixácii sa tkanivá stávajú tvrdými a krehkými. Takisto lyzuje erytrocyty a znižuje množstvo preukázateľného Fe^{3+} . (Junqueira a kol., 1997; Kocianová a kol., 2018; Sundara, 2022)

2.1.5.3 Zenkerova tekutina

Zenkerova tekutina obsahuje řadovú kyselinu octovú, dichróman draselný, chlorid ortuťnatý, síran sodný a vodu. Je vhodným fixačným roztokom v prípade, že je potrebné zachovať štruktúru bunkových jadier. Kvôli kyseline octovej však rozkladá erytrocyty. Je to netolerantné činidlo, takže po umytí vodou by mali byť tkanivá skladované v 70% etanole. (Kocianová a kol., 2018; Rolls, 2022)

2.1.5.4 Hellyho tekutina a B5 fixátor

Hellyho tekutina má podobné zloženie ako Zenkerova tekutina, namiesto řadovej kyseliny octovej sa pridáva neutrálny formol. Je považovaná za vynikajúcu pre fixáciu kostnej drene a sleziny. (Čížková, 2018)

Fixátor B5 obsahuje chlorid ortuťnatý, formaldehyd, bezvodný octan sodný a vodu. Používa sa pri fixácii krvotvorného a lymfoidného tkaniva, je odporúčaný pre IHCH. (Kocianová a kol., 2018)

Obe tieto posledné dve zmesi fixačných roztokov sú často odporúčanými, avšak menej často používanými, fixačnými roztokmi kvôli zdĺhavej a komplikovanejšej príprave. Hellyho tekutina aj B5 musia byť pred použitím čerstvé a tkanivá musia byť umyté, alebo ošetrené Lugolovým jódom, aby sa odstránili pigmenty. Po krátkej fixácii (1-2 hodiny) sa musia preniesť do alkoholu, inak tvrdnú a krehnú. Navyše, fixačná zložka chloridu ortuťnatého je toxická a ľahko sa absorbuje pokožkou. (Rolls, 2022; Travlos, 2006)

2.1.6 Zásady správnej fixácie a požiadavky na fixačný roztok

Pre optimálnu fixáciu tkaniva je nutné dodržiavať isté zásady:

- správna voľba fixačného činidla,
- dostatočne veľká a uzatvárateľná odberová nádoba,
- odobratý materiál sa musí vložiť do fixačnej tekutiny čo najskôr po odbere,
- dostatočné množstvo fixačného roztoku – 10- až 50-násobne viac, ako je objem odobratej vzorky,
- prístup fixatíva ku tkanivu zo všetkých strán,
- zachovanie potrebného času na fixáciu. (Kocianová a kol., 2018)

Neexistuje ideálne fixatívum pre všetky tkanivá, líši sa to od tkaniva ku tkanivu. Nasledujúca tabuľka (Tab. 1) je súhrnom všeobecných požiadaviek na dobré fixatívum.

Tabuľka 1 “Desatoro“ dobrého fixačného roztoku

(upravené podľa: Jain, 2017)

Dobrý fixačný roztok
podporuje vysokú kvalitu a konzistentné základné farbenie
zabraňuje krátkodobej a dlhodobej deštrukcii mikroarchitektúry tkaniva
usmrcuje infekčné agens
je málo toxický a horľavý
umožňuje obnovu makromolekúl (proteíny, mRNA, DNA) bez rozsiahlych biochemických úprav
je užitočný v širokej škále tkanív
rýchlo preniká a fixuje tkanivá
má trvanlivosť minimálne 1 rok
je kompatibilný s modernými automatizovanými tkanivovými procesormi
je finančne nenáročný

2.2 Kost'

Kosť je charakterizovaná ako najviac diferencované spojivé tkanivo belavej až nažltlej farby vzniknuté procesom tzv. osifikácie. Je jedným z najtvrdších tkanív v ľudskom tele a po chrupavke je druhé najodolnejšie tkanivo, ktoré je schopné vzdorovať mechanickým otrasom. Kosť tvorí pevnú oporu pre mäkké tkanivá a je miestom úponu pre svaly. Plní ochrannú funkciu, nakoľko chráni životne dôležité orgány. Podieľa sa na udržiavaní homeostázy, nakoľko medzi kostným tkanivom a krvnou plazmou prebieha výmena vápnika, ktorá zaisťuje stálu koncentráciu vápnikových iónov v krvnej plazme. Je zásobárňou vápnika, fosfátov a iných iónov. V jej dreni sa nachádza krvotvorný orgán – kostná dreň. (Čihák, 2011; Junqueira a kol., 1997; Vacek, 1995)

Mikroskopicky sa kostné tkanivo skladá z kostných buniek a zväpnatej medzibunkovej hmoty, ktorá je produkovaná práve týmito bunkami a objemom nad nimi prevyšuje. (Konrádová a kol., 2000)

2.2.1 Medzibunková hmota

Medzibunková hmota, inak nazývaná aj kostná matrix, sa skladá z dvoch zložiek, organickej a anorganickej.

2.2.1.1 Organická zložka

Organická zložka (osteoid) kostnej matrix je tvorená vláknitou (fibrilárnou) a amorfnou zložkou. Kolagénne vlákna sú zastúpené kolagénom typu I, ktorý tvorí 95% organickej zložky, a tvoria vláknitú zložku. Amorfná zložka je tvorená proteoglykánmi (glykosaminoglykán, chondroitínsulfát a keratosulfát) a štrukturálnymi glykoproteínmi (osteonektín, sialoproteín, osteokalcín). Organická zložka predstavuje väčšinu objemu medzibunkovej hmoty a je nositeľom pružnosti. (Balko a kol., 2016; Konrádová a kol., 2000; Kyselovič, 2015)

2.2.1.2 Anorganická zložka

Anorganická (minerálna) zložka tvorí asi 50% suchej hmotnosti kosti. Najviac zastúpený je vápnik a fosfor, najmä vo forme fosforečnanu vápenatého. Vo veľkej miere je usporiadaný ako hydroxyapatit ($3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$) alebo v amorfnej (nekryštalickej)

forme. Ďalšími anorganickými látkami vyskytujúcimi sa v medzibunkovej hmote sú hydrogénkarbonát, citrát, horčík, draslík a sodík. Anorganická zložka podmieňuje pevnosť a tvrdosť kosti. (Balko a kol., 2016; Konrádová a kol., 2000; Kyselovič, 2015)

Pomer medzi zložkami sa starnutím mení, stúpa podiel anorganickej zložky, čím sa kosti v starobe stávajú krehkejšími a ľahšie zlomiteľnými. Pre predstavu, kosť novorodenca má cca 48% neústrojných látok, v dospelosti sa ich podiel zvyšuje až na 60% a viac. Neústrojnú a ústrojnú zložku medzibunkovej hmoty možno od seba oddeliť. Kosť po zbavení anorganickej zložky stráca tvrdosť, nemení tvar a ohybnosťou je podobná šľache. Odstránením organickej zložky kosť zachováva tvar, avšak je veľmi krehká a ľahko sa láme. (Tichý a kol., 2000; Vacek, 1995)

2.2.2 Bunky kostného tkaniva

Medzi bunky kostného tkaniva možno zaradiť osteoprogenitorové bunky, osteocyty, osteoblasty a osteoklasty. Podrobne budú opísané v nasledujúcich podkapitolách.

2.2.2.1 Osteoprogenitorové bunky

Osteoprogenitorové (osteogénne) bunky sú charakterizované ako kmeňové bunky derivujúce z mezenchýmu. Zachovávajú si schopnosť mitotického delenia a diferenciácie v zrelé kostné bunky. Sú to vretenovito pretiahnuté elementy s oválnym až pretiahnutým jadrom. Bunková membrána je obťažne rozoznateľná. Osteoprogenitorové bunky sú zastúpené na povrchu kosti, na vnútornej strane periostu, v endoste a v kanálikoch kompaktnej kosti pozdĺž krvných ciev. Z týchto buniek vznikajú preosteoblasty s bohatým granulárnym endoplazmatickým retikulom (ďalej len ER) a malým Golgiho aparátom (ďalej len GA). Ďalšou diferenciáciou vznikajú osteoblasty. (Tichý a kol., 2000)

2.2.2.2 Osteoblasty

Z mezenchýmových kmeňových buniek vznikajú osteoblasty, ktoré syntetizujú organickú komponentu kostnej matrix kosti (kolagén typu I, proteoglykány a glykoproteíny). Ukladanie anorganickej zložky do matrix do značnej miery tiež závisí na prítomnosti činných osteoblastov. Novovytvorené látky sú z bunky vylučované na

povrchu obrátenom k medzibunkovej hmote. Osteoblasty majú cytoplazmatické výbežky, ktorými nadväzujú vzájomný kontakt. Ich veľkosť je 15-20 μm . Nachádzajú sa výhradne na povrchu trámcov kostného tkaniva v jednej vrstve, ktorá pripomína jednovrstvový epitel. (Frisch a Bartl, 1999; Junqueira a kol., 1997; Tichý a kol., 2000)

Pokiaľ sa zúčastňujú syntézy medzibunkovej hmoty majú kubický až cylindrický tvar, bazofilnú cytoplazmu a vysokú aktivitu alkalickéj fosfatázy (ďalej len AF). V priebehu syntetickej činnosti vykazuje ultraštruktúra veľké svetlé jadro umiestnené excentricky, veľké množstvo granulárneho ER, množstvo mitochondrií, početné sekrečné vezikuly v bazálnej oblasti a veľký GA rozložený do niekoľkých polí. Akonáhle ich syntetická aktivita poklesne, bunky sa oplošťujú a znižuje sa bazofília cytoplazmy aj hladina AF. (Junqueira a kol., 1997; Tichý a kol., 2000)

Novo syntetizovaná kostná matrix, ktorá ešte nebola mineralizovaná a nachádza sa v tesnej blízkosti osteoblastov, sa nazýva osteoid. Akonáhle sa osteoblast obklopí medzibunkovou hmotou, do ktorej je následne uzatvorený, stáva sa osteocytom. Osteocyt už matrix takmer vôbec nesyntetizuje, ale za istých okolností sa môže dediferencovať opäť v osteoblasty, alebo aj preosteoblasty. (Konrádová a kol., 2000)

2.2.2.3 Osteocyty

Osteocyty sú uložené v malých komôrkach, tzv. lakunách, ktoré sú súčasťou medzibunkovej hmoty. V jednej lakune sa nachádza stále len jeden osteocyt. Vysielajú tenké dlhé cytoplazmatické výbežky, prostredníctvom ktorých sa navzájom spájajú. Tieto výbežky sú uložené v úzkych kanálikoch v kostnej matrix (canaliculi ossium). Filopodiálne výbežky susedných osteocytov sú v kontakte s početnými nexami. Tieto spojenia umožňujú komunikáciu medzi osteocytmi navzájom, ale i s vonkajším a vnútorným povrchom kosti. Zaisťujú výmenu iónov a malých molekúl (hormónov kontrolujúcich rast a vývoj kostí) medzi bunkami. (Konrádová a kol., 2000; Tichý a kol., 2000)

Osteocyty a osteoblasty sa líšia vzhľadom aj štruktúrou. Osteocyty sú oploštené, vretenovito pretiahnuté bunky, ktoré v cytoplazme obsahujú signifikantne menšie množstvo granulárneho ER, malý GA, malý počet lyzozómov a tmavé jadro s kondenzovaným chromatínom. (Frisch a Bartl, 1999; Tichý a kol., 2000)

Osteocyty sú potrebné pre existenciu kostnej matrix, v malej miere majú schopnosť syntetizovať matrix a zúčastňujú sa jej resorpcie. Po resorpcii kostného tkaniva buď degradujú, alebo sa môžu premeniť na osteoblasty. (Konrádová a kol., 2000)

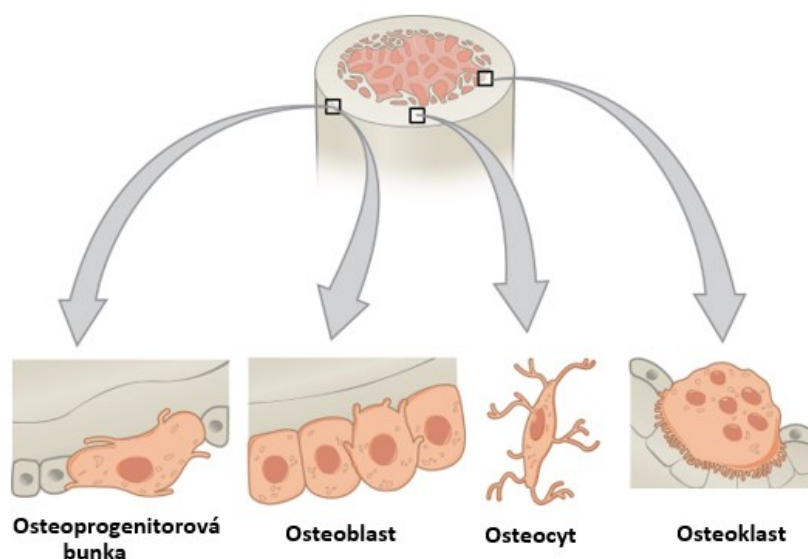
2.2.2.4 Osteoklasty

Osteoklasty sú veľké, bohato vetvené, pohyblivé bunky s početnými výbežkami, ktoré sú nepravidelné. Ich veľkosť je cca 100 μm a obsahujú priemerne 50 jadier. Predstavujú voľné bunky kostného tkaniva. Predpokladalo sa, že prekursori osteoklastov sú osteoprogenitorové bunky, a že teda majú rovnaký pôvod ako osteoblasty. Avšak tieto bunky patria do monocytomakrofágového systému. Vytvárajú sa z hemocytoblastu, ktorý predstavuje hematopoetickú kmeňovú bunku (ďalej len HSC) nachádzajúcu sa v kostnej dreni. Bezprostredné prekursori sú monocyty, ktorých splývaním vznikajú osteoklasty. (Junqueira a kol., 1997; Konrádová a kol., 2000; Tichý a kol., 2000)

Zvyčajne majú acidofilnú cytoplazmu, ktorá obsahuje početné voľné polyzomy, lyzozomy, mitochondrie, výrazný GA a nie príliš vyvinuté granulárne ER. (Konrádová a kol., 2000)

Prítomnosť osteoklastov svedčí o prestavbe kosti (pri regeneračnom alebo rekonštrukčnom procese), ktorá je vždy spätá s resorpciou kosti. Najčastejšie sa vyskytujú v jamkách na povrchu resorbovanej kosti v drobných priehlbínach, tzv. Howshipových lakunách. Aktívny osteoklast vytvára invaginácie, alebo aj husto zriadený okraj – tzv. zvlnený lem, ktorý výrazne zväčšuje resorpčný povrch bunky. Od ostatnej cytoplazmy je oddelený svetlou zónou, v ktorej nie sú zastúpené bunkové organely. Osteoklasty obsahujú proteolytické enzýmy, najmä kyslú fosfatázu a kolagenázu, ktoré rozrúšajú štruktúru kostnej hmoty a odbúravajú kostnú matrix. Pôsobením osteoklastov vznikajú dutiny, ktoré sú však opäť vyplnené kostnými lamelami pôsobením osteoblastov. Tento proces kostnej prestavby prebieha po celý život. (Junqueira a kol., 1997; Konrádová a kol., 2000)

Uloženie a tvar buniek kostného tkaniva znázorňuje nasledujúci obrázok (Obr. 2).



Obrázok 2 Bunky kostného tkaniva

(upravené podľa: Biga a kol., 2022)

Ďalšie charakteristiky kostných buniek sú uvedené v tabuľke (Tab. 2).

Tabuľka 2 Charakteristika kostných buniek

(upravené podľa: Ross a Pawlina, 2015)

	Osteoblast	Osteocyt	Osteoklast
Uloženie	povrch trámcov kostného tkaniva	lakuny a kanáliky kostnej matrix	povrch resorbovanej kosti
% z kostných buniek	> 5%	~ 95%	> 1%
Dĺžka života	týždne (~12 dní)	rok (~10-20 rokov)	dni (~3 dni)

2.2.3 Periost a endost

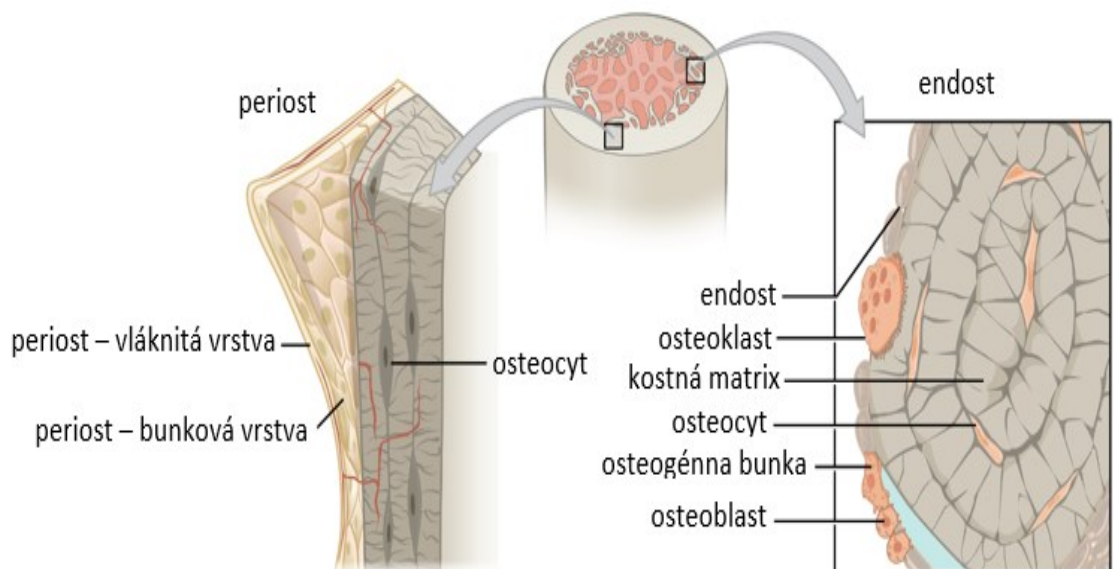
Periost, nazývaný aj okostica, je pevná väzivová blana, ktorá pokrýva vonkajší povrch kosti (Obr.3). Tvoria ho dve vrstvy:

- vonkajšia vrstva (stratum fibrosum) je tvorená hustým kolagénym väzivom. Nachádzame tu fibroblasty, kolagénne a nervové vlákna a cievy. Zväzky kolagénnych vlákien, ktoré penetrujú z vonkajšej vrstvy do kostnej matrix (tzv. Sharpeyove vlákna), viažu periost pevne ku kosti. Periost je vysoko inervovaný a bohato cievne zásobený, takže je veľmi citlivý na bolesť.

- vnútorná vrstva (stratum osteogenicum) prilieha tesne ku kosti a obsahuje osteoprogenitorové bunky, ktoré majú schopnosť mitotického delenia a diferenciácie na osteoblasty. (Konrádová a kol., 2000; Tichý a kol., 2000)

Endost pokrýva vnútorný povrch kosti a je tenší ako periost. Je tvorený jednou vrstvou oploštených osteoprogenitorových buniek a nepatrného množstva väziva, kde sa vyskytujú početné drobné cievy (Obr.3). (Tichý a kol., 2000)

Hlavnou funkciou periostu aj endostu je výživa kostného tkaniva a nepretržitý prísun nových osteoblastov určených k rastu, prestavbe a náhrade kostného tkaniva. (Junqueira a kol., 1997; Konrádová a kol., 2000)



Obrázok 3 Štruktúra kosti – endost a periost

(upravené podľa: Biga a kol., 2022)

2.2.4 Typy kostného tkaniva

Podľa usporiadania a priebehu kolagénnych fibríl v základnej hmote možno rozoznať kostné tkanivo vláknnité a lamelárne.

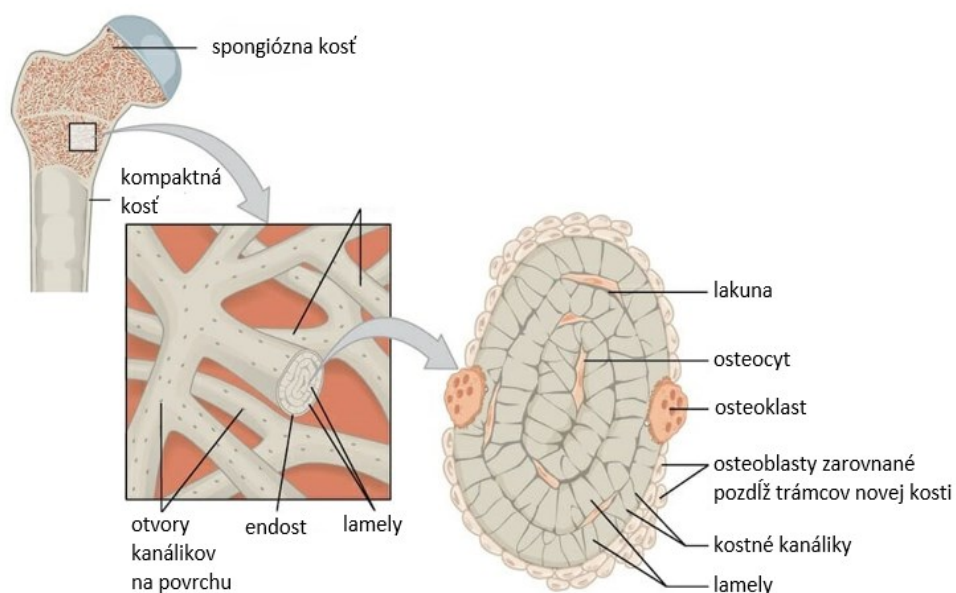
2.2.4.1 Vlákňité kostné tkanivo

Vlákňitá kosť sa vyznačuje tým, že kosťná matrix je zložená z nepravidelne prepletaných kolagénnych fibríl, často združených v hrubých zväzkoch a prestúpených interfibrilárnou hmotou. Medzi zväzkami vlákien sa v lakunách nachádzajú bohato vetvené osteocyty. Na jednotku objemu tkaniva obsahuje pomerne viac osteocytov a málo minerálnych látok. Toto tkanivo radíme k veľmi rýchlo vznikajúcim dočasným štruktúram, objavuje sa v priebehu tvorby kosti alebo pri hojení a býva nahradené lamelárnym kostným tkanivom. V dospelosti je týmto tkanivom tvorené okolie lebečných švov, labyrintu vnútorného ucha, časť zubných alveol a kostné drsnatiny. (Konrádová a kol., 2000; Tichý a kol., 2000)

2.2.4.2 Lamelárne kostné tkanivo

V tomto type kostného tkaniva je vlákňitá zložka medzibunkovej hmoty pravidelne usporiadaná. V lamele prebiehajú kolagénne vlákna paralelne a sú spojené interfibrilárnou hmotou. Lamely sú ďalej buď radené k sebe a vytvárajú tak rôzne silné trámce kosti spongióznej, alebo rôzne zložené systémy lamiel kosti kompaktnej. Výskyt lamelárneho tkaniva je v porovnaní s vlákňitým vyšší, tvorí takmer všetky kosti ľudskej kostry. (Tichý a kol., 2000)

Spongiózna (hubovitá) kosť sa skladá z kostných trámecov alebo platničiek navzájom prepojených, medzi ktorými sú dutinky. Trámce sú usporiadané tak, aby vyhovovali nárokom na zaťaženie kosti. Každý trámec je zložený z kostných lamiel prebiehajúcich zväčša súbežne s povrchom trámca, na ktorom sú drobné lakuny s osteocytmi a kostnými kanálkami. Spongiózne tkanivo je porézne, jeho dutinky sú vyplnené červenou kostnou dreňou. Štruktúra kosti je znázornená na obrázku (Obr. 4). Spongiózna kosť tvorí kosti krátke, diploe plochých kostí lebky a konce dlhých kostí (epifýzy). Takisto vyplňa telá stavcov a relatívne ploché kosti panvy. Tvorí asi 20% celkového objemu kosti, zvyšných 80% tvorí kompaktná kosť. (Tichý a kol., 2000; Vacek, 1995).



Obrázok 4 Štruktúra spongiózneho kosti

(upravené podľa: Biga a kol., 2022)

Kompaktná kosť sa skladá zo zložitých systémov kostných lamiel usporiadaných tak, aby dodávali kosti čo najväčšiu pevnosť v ťahu aj pri ohybe. V každej lamele prebiehajú kolagénne fibrily paralelne, avšak v susedných lamelách vždy rôznym smerom – priečne, pozdĺžne, kruhovito alebo špirálovito. Medzi lamelami sú osteocyty, ktoré vysielajú do vnútra lamiel početné výbežky, ktoré sú uložené v úzkych kanálikoch. (Vacek, 1995)

Rozoznávame tri druhy lamiel v kompaktnom kostnom tkanive:

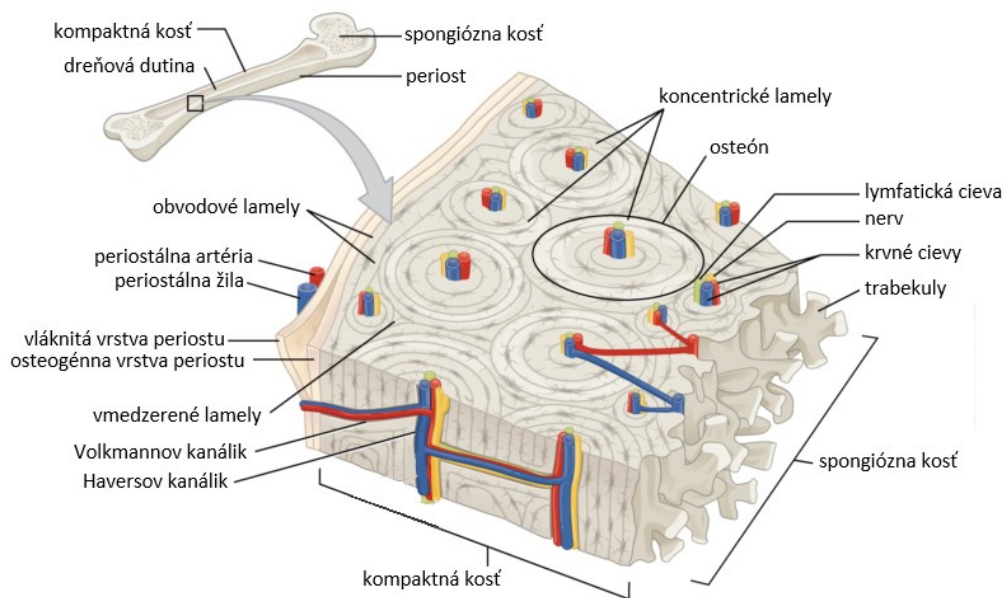
- osteóny (Haversov systém) sú základnou stavebnou jednotkou kompakty. Stavba systému je založená na tesnom priestorovom vzťahu medzi kostnými lamelami a cievami. Je to komplex koncentricky usporiadaných kostných lamiel okolo centrálného kanálu, tzv. Haversovho kanáliku, ktorý je vystlaný endostom, obsahuje krvné a lymfatické cievy, riedke väzivo a nervové vlákna. Haversove kanáliky sú prepojené priečnymi spojovacími perforujúcimi kanálmi, tzv. Volkmannovými kanálikmi. Prostredníctvom nich Haversove kanáliky komunikujú navzájom, ale i s periostom a dreňovou dutinou. (Konrádová a kol., 2000; Vacek, 1995)

Na priečnom reze je osteón okrúhly, mierne oválny, s priemerom 100-400 μm a je tvorený 4-20 koncentrickými lamelami. Haversov systém reprezentuje dlhý,

často sa rozdvajujúci valec, ktorý prebieha rovnobežne s dlhou osou kosti. Kolagénne fibrily v lamelách prebiehajú rovnobežne v špirálovitom usporiadaní. (Konrádová a kol., 2000; Vacek, 1995)

- systém plášťových (obvodových) lamiel je zložený z lamiel prebiehajúcich súbežne s vonkajším aj vnútorným povrchom kosti, tvorí teda akýsi súvislý plášť po celom obvode kosti. Vonkajšie plášťové lamely na nachádzajú tesne pod periostom a vnútorné ohraničujú dreňovú dutinu. Medzi systémami sa rozkladajú Haversove systémy. (Vacek, 1995)
- vmedzerené lamely sú nepravidelného či trojuholníkového tvaru, ktoré vyplňajú priestory medzi Haversovými systémami. Predstavujú ich pozostatky, ktoré vznikajú následkom stále prebiehajúcej prestavby kosti. (Vacek, 1995)

Štruktúra kosti je znázornená na obrázku (Obr. 5). Kompaktné kostné tkanivo tvorí telá dlhých kostí, tenkú vrstvu na povrchu epifízy, na endo- a exokraniálnej strane plochých kostí lebky a vrstvu na povrchu krátkych kostí. (Tichý a kol., 2000)



Obrázok 5 Štruktúra kompaktnej kosti

(upravené podľa: Biga a kol., 2022)

2.3 Kostná dreň

Kostná dreň (medulla ossium, ďalej len KD) je vysoko organizované a špecializované tkanivo, makroskopicky rôzneho vzhľadu, ktoré vyplňa dreňovú dutinu dlhých kostí a priestory medzi trámami spongiózy. Je hlavným hematopoetickým orgánom a primárnym lymfoidným tkanivom. Patrí medzi jeden z najväčších orgánov tela (asi 4-4,5% z celkovej hmotnosti), celková hmotnosť KD je 1600-3700 g. (Čihák, 2011; Tichý a kol., 2000)

Hlavnou funkciou KD je produkcia krvných elementov a ich uvoľňovanie do cirkulácie. Zároveň v nej dochádza aj k deštrukcii starých i poškodených erytrocytov a slúži ako skladisko iónov železa pochádzajúcich z hemoglobínu (ďalej len Hgb) odbúraných erytrocytov. (Tichý a kol., 2000)

2.3.1 Štruktúra kostnej drene

Štruktúra KD je variabilná, pretože zmes bunkových a nebunkových zložiek KD sa mení vekom. Všeobecne sa KD skladá z hematopoetických buniek a stromy.

2.3.1.1 Stroma

Stroma zaberá intertrabekulárne priestory drene a tvorí ju všetko tkanivo, ktoré sa priamo nezúčastňuje na hematopoéze. Stromálne bunky tvoria rozsiahlu a hustú sieť, v ktorej sú uložené hematopoetické prekurzory. (Tichý a kol., 2000)

Medzi štruktúry, ktoré sú súčasťou stromy patria:

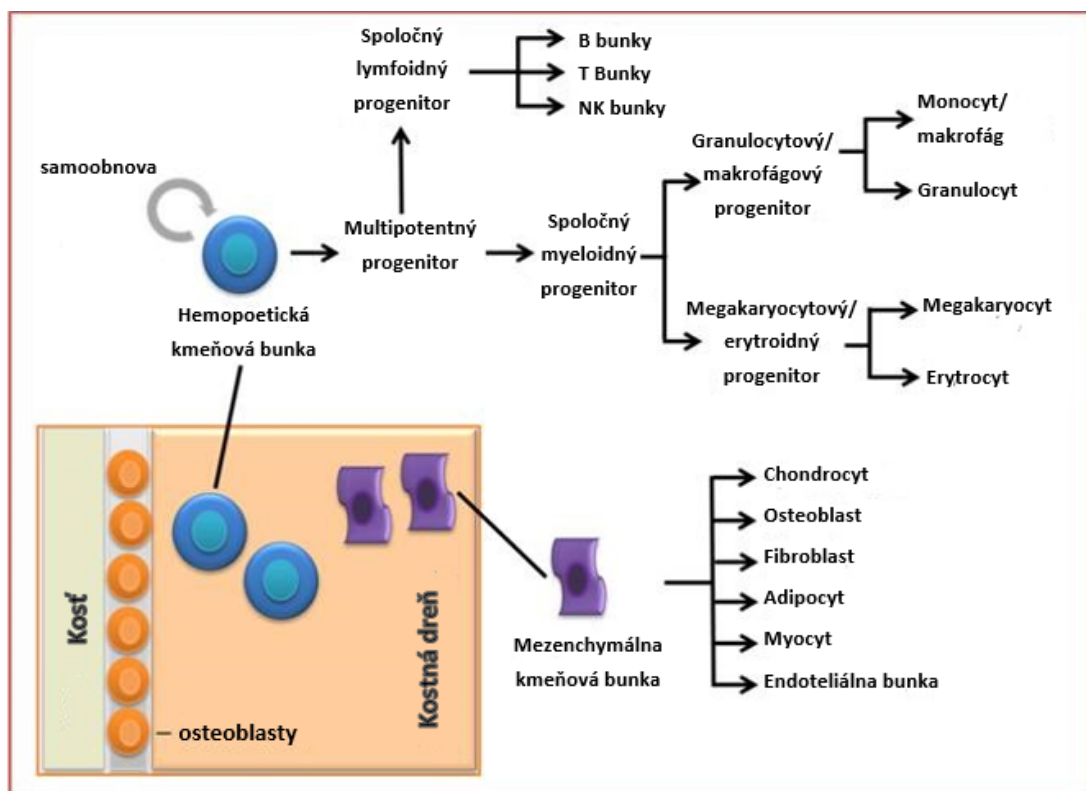
- retikulárne väzivo, ktoré sa skladá z retikulárnych buniek a retikulárnych vlákien obsahujúcich kolagén I a III, proteoglykány, fibronektín a laminin. Ojedinele môže obsahovať aj nediferencované mezenchymálne bunky, ktoré majú schopnosť diferencovať sa do stromálnych línií znázornených na Obr.6.
- adipocyty.
- makrofágy, ktoré pochádzajú z hematopoetického prekurzora. Fagocytujú vytlačené jadrá zrelých erytrocytov a apoptických buniek. Ukladá sa tu aj železo, ktoré je uvoľnené z Hgb.
- endotelové bunky tvoriace stenu sínusoid.

Tieto bunky môžu poskytovať mikroprostredie, ktoré ovplyvňuje funkciu a diferenciáciu krvotvorných buniek. (George a Arber, 2018; Tichý a kol., 2000)

2.3.1.2 Krvotvorné bunky

Hematopoetické bunky sú v KD priestorovo charakteristicky usporiadané v strome. Ležia v povrazcoch alebo klinoch medzi sínusoidami. Hematopoéza je obmedzená na interstícium, v prípade patologického stavu môže dôjsť k hematopoéze aj v sínusoidách. Krvotvorné bunky sú nesmierne dôležité pre zabezpečenie stálej a dlhodobej krvotvorby, majú schopnosť diferenciácie a samoreplikácie. (Bain a kol., 2019)

Počas hematopoézy sa HSC delí a jedna dcérska bunka ostáva v KD, aby pokračovala v obnove zásoby HSC. Ďalšia dcérska bunka je ďalej diferencovaná do niekoľkých línií buniek, ktoré sú znázornené na nasledujúcom obrázku. (Obr. 6) (McLarnon, 2022)



Obrázok 6 Kmeňové bunky kostnej drene

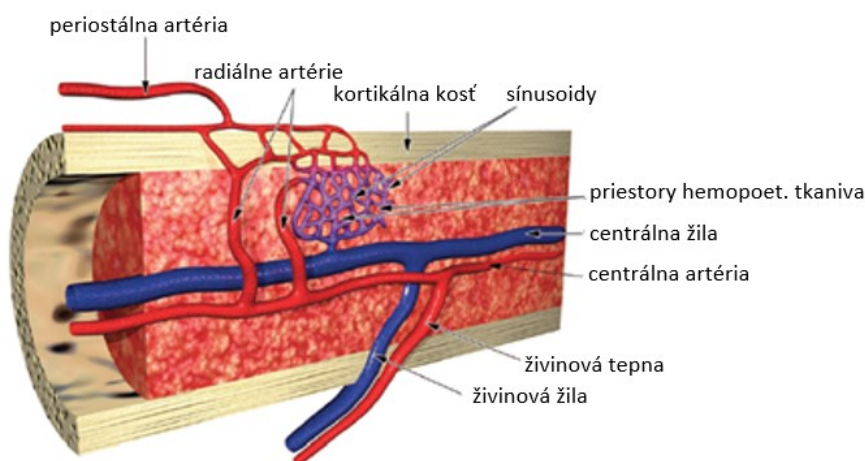
(upravené podľa: McLarnon, 2022)

2.3.2 Cievne zásobenie kostnej drene

Krvné zásobenie KD je zabezpečené tými istými tepnami, ktoré poskytujú živiny okolitej kosti a je znázornené na obrázku (Obr. 7). KD je zásobovaná živinami najmä z centrálnej živnej tepny a doplnkové krvné zásobenie je z kortikálnych kapilár, ktoré do kosti prenikajú z periostu. (Porwit a kol., 2011)

Centrálna tepna vstupuje do dlhých kostí v strednej časti drene a rozvetvuje sa na 2 pozdĺžne radiálne tepny. Vetvy centrálnej tepny vedú k vzniku arteriol a kapilár, ktoré smerujú k endostu, vstupujú do kosti, následne sa otáčajú späť k dreni a ústia do siete tenkostenných sínusoid, ktoré sú umiestnené v centrálnej časti kruhového obehu. Len veľmi malá časť kapilár môže vstúpiť priamo do sínusoid bez predchádzajúceho zásobenia kosti. Prostredníctvom sínusoid sa do obehu dostávajú novovytvorené hematopoetické bunky. Z hľadiska štruktúry sínusoid je stena tvorená nesúvislou endotelovou výstelkou s 3 μm širokými štrbinami. Vonkajší povrch je pokrytý adventiciálnymi bunkami, ktoré pravdepodobne pochádzajú z fibroblastov. (Bain a kol., 2019; Crumbie, 2022)

Sínusoidy sa spájajú do výrazne väčších žíl, ktoré tvoria živinové žily. Tie potom opúšťajú kosť tými istými kanálmi, ktorými vstupujú tepny. Čo sa týka lymfodrenáže KD, doteraz neboli identifikované a popísané lymfatické kanály v dreňovej dutine. (Crumbie, 2022; Porwit a kol., 2011)



Obrázok 7 Cievne zásobenie KD

(upravené podľa: Travlos, 2006)

2.3.3 Typy kostnej drene

2.3.3.1 Červená kostná dreň

Červená KD (medulla ossium rubra) je hematopoeticky aktívna. Vzhľadom na prevahu červených krviniek a ich prekursorov má farbu červenú. Do 8. mesiaca vnútromaternicového vývoja je jediným hematopoetickým orgánom. Skladá sa zo stromy, ktorá pozostáva zo siete jemných retikulárnych fibríl a buniek, nediferencovaných buniek mezenchýmových a ojedinele tukových buniek. Ďalšou súčasťou červenej KD sú povrazce hematopoetického tkaniva uložené v strome a prítomné sú aj mnohonásobne prepletené sínusoidné kapiláry. Tento typ KD je najpočetnejšie zastúpený vo všetkých kostiach až po piaty rok života. Postupne sa výskyt redukuje na spongiózu sterna, stavce, rebrá, kľúčnu kosť, panvu, ploché kosti lebky a proximálnu epifýzu dlhých kostí. V ostatných kostiach sa mení na žltú, inaktívnu, KD. (Balko a kol., 2016; Čihák, 2011; Junqueira a kol., 1997; Tichý a kol., 2000)

2.3.3.2 Žltá kostná dreň

Žltá KD (medulla ossium flava) vzniká z červenej KD, keď je retikulárne väzivo postupne prestúpené tukovými bunkami. Skladá sa z najmä tukových buniek, vyskytujú sa však aj nediferencované mezenchýmové bunky a bunky retikulárne. Oproti červenej KD jej chýbajú sínusoidné kapiláry. Obsah tuku v dreni a množstvo hematopoetického tkaniva sa mení v nepriamej úmere. Zvýšenie obsahu tuku je podmienené stratou kostnej hmoty s pribúdajúcim vekom. Žltá KD predstavuje rezervné hematopoetické tkanivo, ktoré je v prípade potreby (napr. hypoxia, ťažké krvácanie) schopné reaktívácie na červenú KD. Plní aj funkciu zásoby lipidov v organizme, nakoľko tuk zo žltej KD je posledným, ktorý sa stráca pri hladovaní. (Balko a kol., 2016; Junqueira a kol., 1997; Konrádová a kol., 2000)

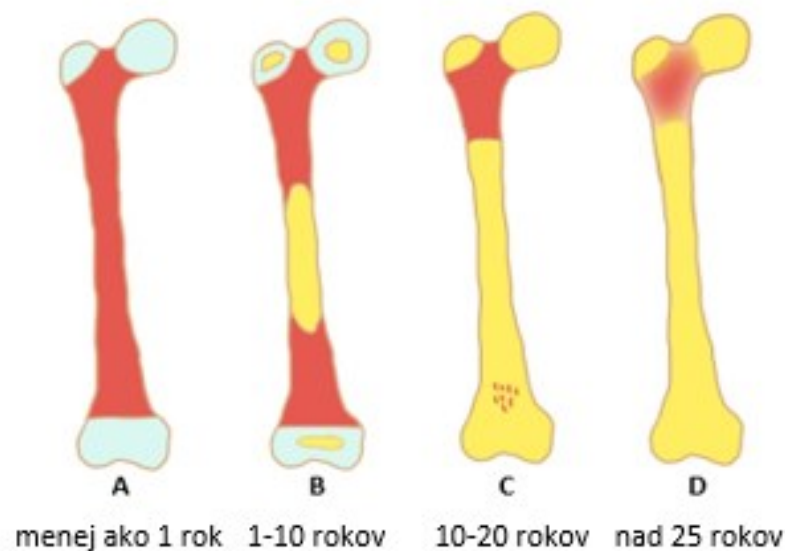
2.3.3.3 Sivá kostná dreň

Sivá KD (medulla ossium grisea) vzniká zo žltej KD. Je želatínového charakteru priesvitnej farby. Premena na sivú KD je zapríčinená stratou tuku a je charakteristická pre neskorší vek. (Čihák, 2011)

2.3.3.4 Distribúcia jednotlivých typov kostnej drene

Distribúcia hematopoetickej KD je závislá na veku. Novorodenec má celú dutinu KD obsadenú proliferujúcimi hematopoetickými bunkami. Pri dosiahnutí prvého roka života sú všetky krvotvorné bunky v terminálnych falangách nahradené tukovými. K nárastu tukových buniek medzi bunkami hematopoetickými v dreňových dutinách dochádza do približne 4. roku života jedinca. Postupne sa žltá KD začína objavovať v strede dlhých kostí. Medzi 10. až 14. rokom sú hematopoetické bunky v strede dlhých kostí prakticky kompletne nahradené tukovými bunkami. Následne sa tieto zóny neaktívnej KD šíria proximálne a distálne, avšak distálne šírenie je rýchlejšie a okolo 25. roku života sú proximálne časti femuru a humeru jedinými miestami dlhých kostí, ktoré obsahujú červenú KD. Samozrejme, medzi jedincami existujú rozdiely v rozdelení hematopoeticky aktívnej KD. (Bain a kol., 2019; Crumby, 2022)

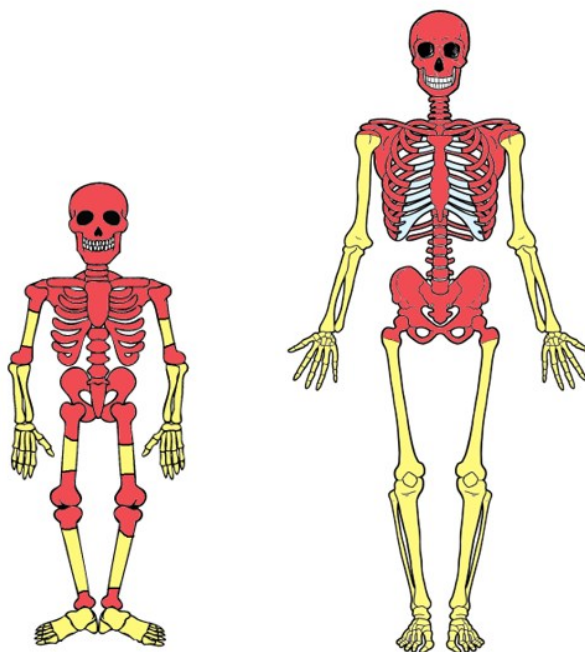
Obr. 8 a Obr. 9 znázorňujú rozdiely v distribúcii hematopoetickej KD v závislosti od veku.



Obrázok 8 Distribúcia červenej kostnej drene v dlhej kosti v závislosti od veku

(upravené podľa:

<https://epos.myesr.org/posterimage/esr/essr2019/151432/mediagallery/840461>)



Obrázok 9 Výskyt jednotlivých typov kostnej drene v detstve a dospelosti

(vlastné spracovanie)

2.4 Trepanobiopsia

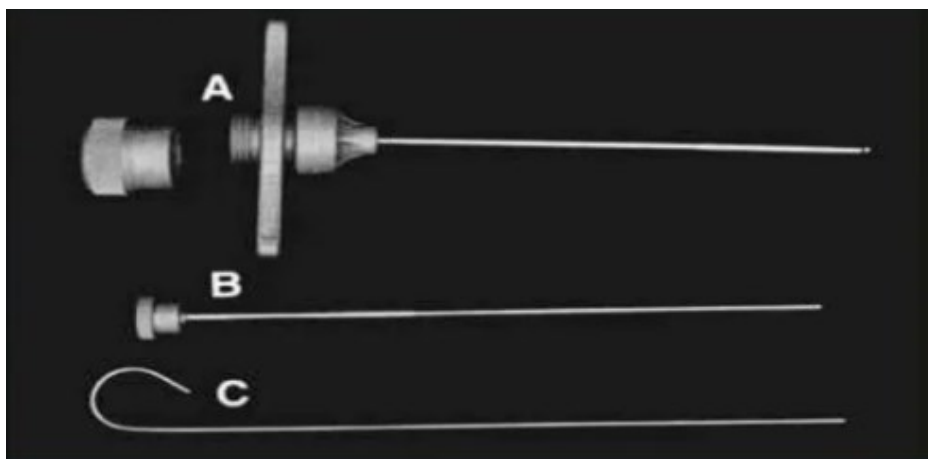
Vyšetrenie KD je integrálnou zložkou diagnostických postupov v hematológii a onkológii. Na vyšetrenie sa získava vzorka KD pomocou aspirácie alebo biopsie KD, tzv. trepanbiopsie. Oba tieto postupy získavania vzorky radíme medzi invazívne, pri ktorých je rozhodujúca dobrá technická zručnosť nielen pri získavaní vzoriek, ale aj pri samotnej diagnostickej interpretácii. Z toho dôvodu by trepanobiopsiu mali vykonávať vyškolení jedinci (väčšinou konzultanti hematológov alebo histopatológov) v súlade so štandardným pracovným postupom (ďalej len ŠPP). (Bain, 2001b; Trejo-Ayala a kol., 2015)

2.4.1 História trepanobiopsie

Trepanobiopsia patrí k jednej z najstarších chirurgických operácií, ktoré boli popísané na človeku. V minulosti bola biopsia KD zväčša využívaná na terapeutické účely (napr. ako liek proti bolesti hlavy). Za účelom diagnostiky bola prvýkrát trepanobiopsia odobraná v prvých rokoch 20. storočia. (Trejo-Ayala a kol., 2015)

2.4.2 Odberová bioptická ihla

Ihla na trepanobiopsiu je špeciálne navrhnutá tak, aby bolo možné získať valcovité fragmenty kosti – trepanbioptické valčeky. História vývoja ihiel je bohatá, využívali sa ihly s bočným otvorom na uľahčenie zavlažovania dutiny drene, ihly so zúbkovaným koncom a uvažovalo sa aj o využívaní elektrických vŕtačiek, ktorých používanie sa, vzhľadom na dostupnosť vynikajúcich nemechanických bioptických ihiel, neodporúča. Bioptické ihly sú rôznej veľkosti a tvaru, výber záleží na veku, pohlaví a telesnej hmotnosti pacienta. V súčasnosti je najviac využívaná tzv. Jamshidi ihla (Obr. 10). Tá bola revolučným objavom v procese získavania neporušených jadier kosti a KD, pretože je prepracovaná tak, aby sa znížil vnútorný priemer distálnej časti, čo umožňuje tkanivu voľne vstúpiť do lumenu. (Porwit a kol., 2011; Trejo-Ayala a kol., 2015)



Obrázok 10 Jamshidi ihla

A – dutá ihla so skoseným koncom; B – obturátor/stylet; C – sonda na vybratie biopsie z ihly

(zdroj: Kaur, 2016)

V otázke využívania opakovane použiteľných ihiel alebo jednorazových ihiel sa odporúčania jednoznačne prikláňajú k využitiu jednorazových ihiel, najmä z dôvodu obmedzenia rizík spojených s čistením ihiel, čím sa znižuje riziko kontaminácie a infekcie. (Bain, 2001a)

2.4.3 Miesto odberu kostnej drene

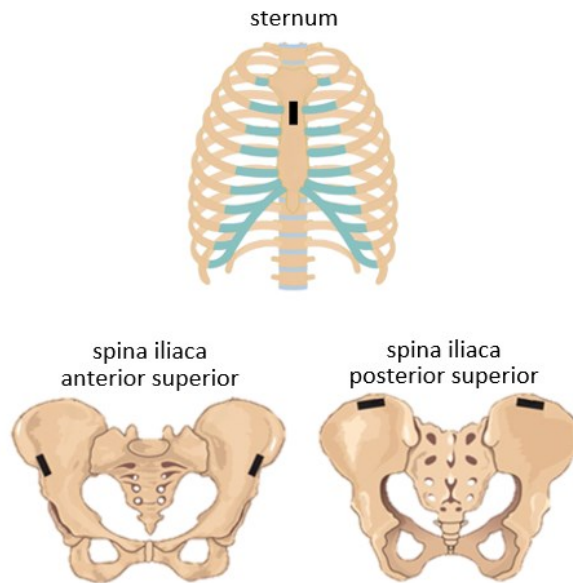
Nakoľko sa KD u dospelého človeka nachádza na viacerých miestach znázornených na Obr. 9, diskusie ohľadom adekvátneho miesta boli rozporuplné. Napriek tomu, že pomerne veľké zastúpenie KD sa nachádza v panve (až 50%), nerozmyšľalo sa o nej ako o vhodnom mieste pre odber. Udialo sa tak až v 50-tych rokoch 20. storočia, kedy Bierman navrhol použiť zadný horný trň bedrovej kosti (spina iliaca posterior superior – ďalej len SIPS), ktorý je preferovaný ako pre aspiráciu tak aj biopsiu, z dôvodu relatívnej bezpečnosti a čo najvyššieho pohodlia pacienta. V zásade je možné vykonávať odber aj z predného horného trňa bedrovej kosti (spina iliaca anterior superior –ďalej len SIAS). (Bain, 2001b; Trejo-Ayala a kol., 2015)

Odber zo sterna nie je odporúčaný vzhľadom na veľké riziko zranenia okolitých orgánov pri nesprávnom postupe. Odber zo sterna je relatívne kontraindikovaný pri podozrení na myelóm plazmatických buniek, alebo pri iných poruchách spojených s resorpciou kostí. Vykonáva sa len v prípade nemožnosti odberu z panvy v dôsledku jej predchádzajúceho ožiarenia, alebo iných okolností znemožňujúcich odber z panvy. (Lee a kol., 2008; Vöhringer, 2016)

Z hľadiska veku pacienta a preferovaného miesta odberu je to nasledovné: u detí a dospelých je možno úspešne vykonávať biopsie zo SIPS, u novorodencov bola popísaná modifikovaná technika použiteľná na píštalú. (Bain, 2001b)

Zvláštnu, veľmi veľkú pozornosť je nutné venovať správne výberu miesta odberu u rizikovej skupiny pacientov, do ktorej patria obézni a imobilní pacienti, ďalej pacienti po rádioterapii, alebo pacienti s lytickými kostnými léziami či nekrózou KD. (Lee a kol., 2008).

Vo všeobecnosti sa pri trepanobiopsii uvažuje zväčša o troch možných miestach odberu KD, ktoré sú zobrazené na obrázku (Obr. 11). (Kaur, 2016)



Obrázok 11 Preferované miesta odberu KD

(vlastné spracovanie)

2.4.4 Veľkosť vzorky trepanobiopsie

Dĺžka trepanobiopsického valčeka je jednou z premenných, ktoré ovplyvňujú spracovanie a hodnotenie vzorky, a teda aj stanovenie správnej diagnózy. Akékoľvek tvrdenie o „správnej“ dĺžke valčeka nie je relevantné, všeobecne platí pravidlo: čím viac tkaniva, tým väčšia pravdepodobnosť detekcie fokálnych lézií. Bishop a kol. vykonali štúdiu, v ktorej skúmali kvalitu 767 biopsií KD, ktorej výsledky naznačujú, že priemerná dĺžka vzorky pred spracovaním bola 1,59 cm a po spracovaní 1,15 cm. Z toho vyplýva, že počas spracovania sa dĺžka valčeka skrúti o približne 25%. Na základe týchto výsledkov odporúčaná minimálna primeraná dĺžka je 1,5 – 2 cm. V prípade neúspešného odberu dostatočnej dĺžky valčeka by sa malo zvážiť zopakovanie postupu, prípadne odber z kontralaterálneho iliakálneho hrebeňa. (Bain, 2001b, Dvořák, 2008; Trejo-Ayala a kol., 2015)

2.4.5 Indikácie, kontraindikácie a komplikácie odberu kostnej drene

Odber KD je pre pacienta nepríjemným výkonom, ktorý so sebou prináša isté riziká, preto by sa mal vykonávať len pri existujúcej jasnej klinickej indikácii, zároveň je nutné brať v úvahu možné kontraindikácie a komplikácie.

2.4.5.1 Indikácie trepanobiopsie

Indikácie odberu KD sú vypísané v tabuľke (Tab. 3).

Tabuľka 3 Indikácie trepanobiopsie

(zdroj: Cotelingam, 2003; Grindem, 1989; Kaur, 2016; Vöhringer, 2016)

Indikácie trepanobiopsie
diagnostika, štádium a sledovanie malígnych hematologických porúch <ul style="list-style-type: none">• akútne a chronické leukémie• myelodysplastický syndróm• chronické myeloproliferatívne poruchy• lymfómy, myelóm plazmatických buniek• amyloidóza, mastocytóza
diagnostika suspektných metastatických nádorov
nevysvetliteľná organomegália
vyšetrenie abnormálnej morfológie náteru periférnej krvi naznačujúcej patológiu KD
hodnotenie zásob železa
hyperproteinémia alebo hyperkalcémia neznámeho pôvodu
ďalšie posúdenie nejasných zmien krvného obrazu (cytopénia/cytóza)
podozrenie na fibrózu drene
diagnostika skladovacích chorôb
vylúčenie hematologického ochorenia u potenciálnych darcov alogénnych transplantátov kmeňových buniek
pacienti po transplantácii KD (autológnej aj alogénnej), kvôli suspektnému relapsu a posúdeniu prihojenia transplantátu
neadekvátna alebo neúspešná aspirácia kostnej drene
vykonanie ďalších cytologických, histologických, imunologických a molekulárne-genetických výskumov

2.4.5.2 Kontraindikácie trepanobiopsie

Trepanobiopsia nemá žiadne absolútne kontraindikácie, ale môžu existovať relatívne kontraindikácie súvisiace so všeobecným stavom pacienta, alebo rizikom anestézie/ hlbkej sedácie, medzi ktoré patrí:

- aktívna infekcia na navrhovanom mieste – vyriešiť sa to dá alternatívnym miestom,
- alergie (latex, anestetikum, sedatívum, antiseptiká),
- trombocytopénia, alebo iné poruchy krvácania. (Bain, 2001a; Malempati a kol., 2009)

2.4.5.3 Komplikácie trepanobiopsie

Komplikácie odberu trepanobiopsie sú zriedkavé (incidencia 0,12-0,30%) a patria k nim: krvácanie (najmä hematóm v mieste vpichu), perforácie a zranenia vzniknuté zväčša v dôsledku nesprávneho vykonania odberu (tržné rany na vetve gluteálnej tepny, zlomeniny kostí) a infekcie. (Malempati a kol., 2009; Vöhringer, 2016)

2.4.6 Odber trepanobiopsie

Odber KD patrí medzi štandardné diagnostické bioptické odbery a radí sa k zväčša ambulantným zákrokom. Odber je možné realizovať pod rádiologickou kontrolou, v lokálnej alebo celkovej anestézii, najmä u úzkostlivých alebo pediatrických pacientov. (Trejo-Ayala a kol., 2015)

2.4.6.1 Príprava pacienta pred zákrokom

Príprava pacienta zahŕňa laboratórnu kontrolu hladiny krvných doštičiek a plazmatickej zrážanlivosti, tieto vyšetrenia sú povinné. Aj napriek zistenej trombocytopénii však nie je odber úplne kontraindikovaný a podávanie krvných doštičiek nie je nevyhnutné. Nakoľko biopsia KD je zákrok s nízkym rizikom krvácania, liečba nízkymi dávkami kyseliny acetylsalicylovej a perorálnymi antikoagulanciami môže pokračovať bez zmeny. (Vöhringer, 2016)

2.4.6.2 Poučenie pacienta

Pred každým zákrokom je nutné poučenie pacienta, získanie anamnézy (možné alergie, ktoré môžu byť kontraindikáciou odberu) a súhlasu s postupom. Ak je zákrok v celkovej anestézii alebo pri silnej sedácii, je nutné získať písomný súhlas. Ak je pacient pri plnom vedomí, považuje sa za dostatočný ústny súhlas. Je žiadúce a veľmi potrebné pacientovi čo najpodrobnejšie a najzrozumiteľnejšie vysvetliť účel a spôsob, akým bude odber vykonávaný. Je to veľmi dôležité najmä pre upokojenie pacienta, pri dôkladnom poučení sú riziká nízke a komplikácie zriedkavé. (Bain, 2001a; Bain, 2001b)

2.4.6.3 Poloha pacienta pri odbere

Rutinnou polohou je ľah na boku, horná končatina leží nad spodnou a obe sú zároveň uložené mierne šikmo. V takej polohe je panva mierne naklonená nahor, čo zlepšuje prístupnosť k miestu odberu. Alternatívou je ľah na bruchu, ktorý však musí pacient tolerovať. Tento spôsob sa využíva najmä u obéznych ľudí. Oba tieto spôsoby sú rovnocenné. (Vöhringer, 2016)

2.4.6.4 Samotný odber kostnej drene

Po dôkladnej príprave a poučení pacienta sa môže pristúpiť k ďalšej časti procesu – samotnému odberu KD. Odber sa riadi ŠPP a má isté zásady, personál musí dodržiavať všetky aseptické podmienky, používa rukavice (najlepšie práškové) na svoju ochranu aj ochranu pacienta. Odber trepanobiopsie nasleduje zväčša až po aspirácii KD. (Bain, 2001b; Wilkins a Clark, 2009)

Postup:

1. Označenie preferovaného miesta, jeho dezinfekcia a prekrytie sterilnou tkaninou.
2. Podanie anestézie – využíva sa lokálne anestetikum s 1% lidokaínom (3 ml) na kožu a podkožie, potom aplikovanie lidokaínu v rôznych bodoch na kortikálnej kosti (1 ml pri každej injekcii).
3. V prípade odberu aspirácie sa odsávací ihla zavedie cez kožu až ku kosti. Otočným pohybom sa posúva ihla cez kostnú kôru do dreňovej dutiny. Na

takto zavedenú ihlu sa pripojí injekčná striekačka (zväčša o objeme 20 ml) a odsaje sa tekutá kostná dreň.

4. Zostavená bioptická ihla sa vloží do miesta odberu vzorky buď priamo, alebo po malom reze (0,2 cm) pomocou lancety, či ostrého okraja dutej ihly, ktorá bola použitá na lokálnu anestéziu.
5. Ihla sa zatlačí do kosti pomocou otáčania okolo svojej osi. Je vhodné ukazovákom pridržiavať ihlu pri zatláčaní do kosti, pretože slúži ako „brzda“ v prípade neželaného náhodného pošmyknutia.
6. Po dosiahnutí požadovanej hĺbky sa vytiahne stylet a ihla ďalej rotuje okolo osi.
7. Hĺbka ihly sa meria pomocou styletu – vzorka by mala mať aspoň 2 cm.
8. Ak je zaistená požadovaná dĺžka vzorky, ihla sa otáča v opačnom smere, aby sa vzorka uvoľnila. Ihla spolu so vzorkou sa vytiahne pomocou rotačného pohybu a vzorku je nutné okamžite fixovať. (Trejo-Ayala a kol., 2015)

V niektorých prípadoch, ako je napríklad nezískanie adekvátneho aspirátu alebo urgentnosť výsledkov vyšetrenia, je vhodné vyhotoviť odtlačok. Ten sa získa jemným valcovaním vzorky KD po sklíčku. (Vöhringer, 2016)

Po odbere sa prelepí miesto vpichu, na ktoré sa odporúča umiestniť vreco s pieskom na minimálne 20 minút. Následne môže pacient vstať a pohybovať sa, sprchovanie a ťažšia fyzická námaha sa odporúča až nasledujúci deň. (Vöhringer, 2016)

2.5 Spracovanie trepanobiopsie

Po odbere trepanobiopsie nasleduje jej transport do laboratória, kde sa príjem vzoriek riadi ŠPP konkrétneho laboratória. V tejto podkapitole bude definované všeobecné spracovanie trepanobiopsií.

2.5.1 Fixácia

Okamžitá fixácia v správnom fixačnom činidle po odbere je základným predpokladom kvalitného spracovania a správnej interpretácie diagnózy. Fixačné roztoky a zásady fixácie boli podrobne opísané v podkapitolách 2.1.2 – 2.1.6. (Wilkins a Clark, 2009)

Do laboratória prichádzajú odobrané bioptické vzorky KD už fixované. Nakoľko neexistuje ideálne fixatívum, k fixácii trepanobiopsí sa využívajú najmä: 10% NBF, Zenkerova tekutina, Bouinova tekutina, B5, formaldehyd a glutaraldehyd. Doba fixácie závisí od veľkosti vzorky a bežne sa pohybuje od 1-24 hodín. Po skončení fixácie nasleduje vypieranie vzorky v tečúcej vode pre dokonalé odstránenie fixačného roztoku a kvôli následnej dekalifikácii. (Lee a kol., 2008)

2.5.2 Dekalcifikácia

Nakoľko trepanobiopsie obsahujú časti kostného tkaniva vyznačujúceho sa obsahom minerálnych substancií, tieto časti sa musia odstrániť procesom tzv. dekalifikácie. Existuje množstvo spôsobov odvápnenia a takisto je na trhu dostatočne široká škála komerčne dostupných dekalifikačných roztokov. Typ roztoku a spôsob odvápnenia je významný pri potrebe zachovania reaktivity enzýmov alebo antigénnych miest. (Travlos, 2006)

2.5.2.1 Dekalcifikačné roztoky

Organické kyseliny (napr. mravčia, octová) sú šetrné ku tkanivu, ale odvápnujú veľmi pomaly. Minerálne kyseliny (napr. chlorovodíková, dusičná) sa používajú na dekalifikáciu rýchleho typu, odvápnujú dokonale, ale poškodzujú tkanivá. Pre obe skupiny kyselín platí, že pre správne odvápnenie musí byť okolo vzorky rovnomerné rozloženie kyseliny. Následkom nadmernej dekalifikácie je deštrukcia tkaniva, preto je nutné stupeň odvápnenia pravidelne kontrolovať. Pre dokonalé odvápnenie vzoriek je niekedy potrebná výmena roztoku. Všeobecne sa dekalifikácia organickými a minerálnymi kyselinami neodporúča pri vzorkách potrebných na enzýmovú HCH a IHCH farbenie. (Travlos, 2006)

Oproti predchádzajúcemu typu dekalifikačného roztoku sa chelatačné činidlá (napr. kyselina etyléndiamíntetraoctová, ďalej len EDTA) odporúčajú na odvápnene vzoriek potrebných na enzýmovú HCH a IHCH. Sú pomalšie v porovnaní s kyselinami, avšak nevyžadujú pravidelnú kontrolu a výmenu roztoku. Účinok EDTA závisí od pH (čím vyššie, tým rýchlejšia dekalifikácia), ale vysoké pH (napr. 10) už nie je žiadúce kvôli deštrukcii tkaniva. (Travlos, 2006)

2.5.2.2 Metódy dekalifikácie

Spôsoby odvápnienia možno rozdeliť na základe techniky takto:

- ponorná metóda je síce najpomalšia z metód, avšak spôsobuje najmenšie arteficiálne poškodenie tkaniva. Spôsobom odvápnienia je umiestnenie tkanív do vhodného dekalifikáčného roztoku pri laboratórnej teplote.
- mikrovlnná technika využíva na zahriatie vodného kúpeľa, v ktorom je umiestnená nádoba s tkanivom ponoreným v dekalifikáčnom roztoku, mikrovlnnú rúru. Úroveň odvápnienia je lepšia, no je nutné myslieť na riziko poškodenia tkaniva teplom.
- sonikačná technika je založená na ponorení tkanív do sonikátora obsahujúceho dekalifikáčny roztok a následná sonikácia. Rýchlosť odvápnienia sa výrazne skraca.
- pri elektrolytickej metóde je základom uloženie tkaniva v dekalifikáčnom roztoku kyseliny medzi 2 elektródy a prechod slabého elektrického prúdu, čím dôjde k urýchleniu času odvápnienia. Táto metóda je rýchlejšia ako ponorná metóda, ale je oveľa menej využívaná.
- odvápnenie pomocou iónovej výmeny používa živicu sekvstrujúcu vápnik v kombinácii s dekalifikáčným roztokom kyseliny. Živica sa umiestni na dno nádoby, do ktorej sa pridá kyselina mravčia ako odvápnovač a tkanivo. Taktiež je rýchlejšia ako ponorná metóda, ale jej nevýhodou je dostupnosť a náklady na živicu. (Travlos, 2006)

Veľmi podstatným krokom v procese dekalifikácie vzoriek je stanovenie demineralizácie. Nadmerná dekalifikácia deštruuje tkanivo a naopak, nedostatočné odvápnenie má za následok nedostatočnú dehydratáciu a infiltráciu, čo v konečnom dôsledku ovplyvňuje proces rezania vzorky. (Travlos, 2006)

Medzi postupy, ktorými sa stanovuje stupeň demineralizácie patrí röntgenová metóda, ktorá vyžaduje vhodné prístrojové vybavenie. Nie je vhodná pri tkanivách, ktoré boli ošetrené fixačnými roztokmi obsahujúcimi ortuť a iné ťažké kovy. Metóda chemického zrážania (napr. šťavelanu vápenatého) je veľmi spoľahlivým a použiteľným postupom po odvápnovaní kyselinami a po modifikácii aj odvápnovaní EDTA. Najľahším

a najviac používaným spôsobom stanovenia demineralizácie je mechanické ohýbanie. Mínusom tejto metódy je možné riziko narušenia architektúry tkaniva. Rezanie vzorky je tiež jedným z uznávaných spôsobov stanovenia demineralizácie. (Travlos, 2006)

Po dostatočnej dekalifikácii a stanovení stupňa mineralizácie nasleduje dôkladné odstránenie dekalifikačného roztoku z tkaniva pomocou vypierania v destilovanej vode a samotná excidácia trepanobiopsie. (Wilkins a Clark, 2009)

2.5.3 Prístrojové spracovanie, zalievanie a rezanie

2.5.3.1 Prístrojové spracovanie

Po vyexcidovaní je pre úspešné zaliatie do média potrebné odvodnenie, presýtenie a prejasnenie tkaniva. Časový interval jednotlivých krokov spracovania je uvedený v tabuľke (Tab. 4). Odvodnenie zabezpečuje odstránenie vody pomocou prechodu tkaniva vzostupnou radou koncentrácií etanolu (70 – 100%). Ak nie je k dispozícii etanol, môže sa použiť metanol či acetón. Etanol sa nahradí rozpúšťadlom miešateľným so zalievacím médium, ktoré zabezpečí pevnú konzistenciu – proces presýtenia tkaniva. V prípade zalievania do parafínu je rozpúšťadlom xylén. Ďalšími rozpúšťadlami môžu byť toluén, benzén alebo chloroform. Tkanivo sa po presýtení javí priesvitne a môžeme povedať, že došlo k prejasneniu tkaniva. Takto prejasnené tkanivo sa prenáša do parafínu, ktorý je roztopený v termostate pri 58-60°C. Rozpúšťadlo sa pri tejto teplote odparí a je nahradené parafínom. (Balko a kol., 2016; Junqueira a kol., 1997; Mohan, 2007)

Tabuľka 4 Prístrojové spracovanie trepanobiopsie

(zdroj: Junqueira a kol., 1997)

Štádium prístrojového spracovania	Časový interval
dehydratácia vzostupnou radou koncentrácií alkoholu	6-24 hod
presýtenie a prejasnenie rozpúšťadlom	1-6 hod
presýtenie tkaniva parafínom	1-3 hod

2.5.3.2 Zalievanie

Zalievacím médiom je zvyčajne parafín, ktorý je najbežnejšie zalievacie médium. Výhody a nevýhody zalievania do parafínu sú zhrnuté v tabuľke (Tab. 5) (Junqueira a kol., 1997)

Tabuľka 5 Zalievanie do parafínu - výhody a nevýhody

(zdroj: Brown a Gatter, 1993)

Výhody	Nevýhody
jednoduchý postup	zmrštenie tkanív vplyvom vysokej teploty
pri rutinnom postupe štandardné výsledky	poškodenie jemných cytologických detailov
možnosť krájať aj pomerne tenké rezy, série rezov	nevhodné pre tuhé tkanivá, ktoré obsahujú veľa väziva

2.5.3.3 Rezanie

Po dostatočnom stuhnutí parafínu získame pevný bloček, ktorý je možné krájať na stroji nazývanom mikrotóm. Podľa pohyblivej a statickej časti rozoznávame mikrotómy sánkové alebo rotačné. Parafínové bločky je možné rezať oceľovým nožom na rezy hrúbky 1 až 10 μm . Ideálna hrúbka rezu je 3 μm kvôli dobrej hodnotiteľnosti bunkových morfológických detailov. (Junqueira a kol., 1997)

2.5.4 Farbenie a montovanie

Odobrané tkanivá sú väčšinou bezfarebné, čo komplikuje ich pozorovanie vo svetelnom mikroskope. Z tohto dôvodu boli vyvinuté farbiace metódy, vďaka ktorým sa tkanivá stanú viditeľné a zároveň navzájom odlišiteľné, čo vo veľkej miere napomáha diagnostikovi pri určení diagnózy. Na farbenie sa používajú zmesi farbív, ktoré viac, či menej selektívnym spôsobom farbía tkanivové zložky. Väčšina farbív sa chová ako zlúčeniny kyslej alebo zásaditej povahy, ktoré majú tendenciu vytvárať elektrostatické väzby s ionizovateľnými radikálmi tkanív. Rozlišujeme:

- bázičné farbivá (toluidínová modrá, methylenová modrá, hematoxylín), ktoré farbía bazofilné štruktúry (nukleoproteíny, glykosaminoglykány),

- kyslé farbivá (oranž G, eozín, kyslý fuchsín), ktoré farbia prevažne bázické komponenty cytoplazmatických proteínov,
- neutrálne farbivá predstavujú zmes kyslých a bázických farbív, v tkanivách sa viažu na bazofilné aj acidofilné štruktúry,
- amfotérne farbivá môžu fungovať ako bázické alebo kyslé farbivá, reakcia je závislá na pH. (Čížková, 2018; Junqueira a kol., 1997)

Väčšina farbív je rozpustná vo vode alebo v alkohole. Pred farbením je nutné rozpustiť z rezov už teraz nadbytočný parafín a previesť rezy zostupnou alkoholovou radou opäť do hydrofilnej fázy. (Balko a kol., 2016)

Nasleduje prehľad rutinne používaných farbív pri procese spracovania trepanobiopsií. V prípade nutnosti je možné využiť aj ďalšie, špeciálne, farbenia alebo IHCH farbenia. (Wilkins a Clark, 2009)

2.5.4.1 Hematoxylín-eozín

Hematoxylín-eozín (ďalej len HE) je základná a najpoužívanejšia metóda farbenia v histológii, ktorá dokáže ofarbiť mnoho štruktúr tkaniva nachádzajúceho sa vo fyziologickom aj patologickom preparáte a dáva všeobecné informácie o preparáte. Odporúča sa ním farbiť všetky histologické vzorky. Hematoxylín je farbivo zásaditej povahy farbiace jadro a ribozómy, prípadne granulórne ER do tmavomodrých až tmavofialových farieb. Eozín je kyslé farbivo, ktoré farbí oranžovo až červeno kolagénne vlákna, cytoplazmu väčšiny buniek, Hgb a sarkoplazmu svalových buniek a vlákien. Na farbenie trepanobiopsie sa HE využíva, avšak neposkytuje konzistentnú diferenciáciu hematopoetických buniek. (Balko a kol., 2016; Travlos, 2006)

2.5.4.2 Giemsa

Farbenie podľa Giemsa zachytáva lepšie morfológické detaily ako HE. Umožňuje rozpoznanie mastocytov, zdôrazňuje prítomnosť zvýšeného počtu plazmatických buniek alebo eozinofilov, je nápomocné pri identifikácii lymfoidných buniek a pomáha rozlišovať medzi myeloblastami a proerytroblastami. Nevýhodou farbenia je predchádzajúca dekalifikácia kyselinami, nakoľko takéto odvápnenie vedie k strate

štruktúr bazofilného farbenia. Pri tomto farbení sa odporúča odvápnovanie chelátmi. (Bain, 2001b; Lee a kol., 2008; Travlos, 2006)

2.5.4.3 Perlsova reakcia

Pri tejto reakcii možno preukázať železo v hemosideríne, čo je pigment, ktorý vzniká rozpadom Hgb a je zásobárňou železa. Princípom je uvoľnenie Fe^{3+} z väzby na proteín denaturáciou pomocou kyseliny chlorovodíkovej. Po pridaní ferrokyanidu draselného (žltá krvná soľ, hexokyanoželeznatan draselný) reagujú železité ióny za vzniku berlínskej (pruskej) modrej. Výsledok je teda modré sfarbenie železa. Jadrá sa dofarbujú jadrovou červenou. Má výpovednú hodnotu o stave zásob železa v KD. Interpretácia absencie, alebo významného zníženia zafarbenia železa v častiach odvápnenej vzorky, musí byť opatrná, keďže dekalciфикаčné roztoky na báze kyselín môžu vymývať zásoby železa. (Bain, 2001b; Čížková, 2018; Dvořáková, 2008)

2.5.4.4 Gömöri

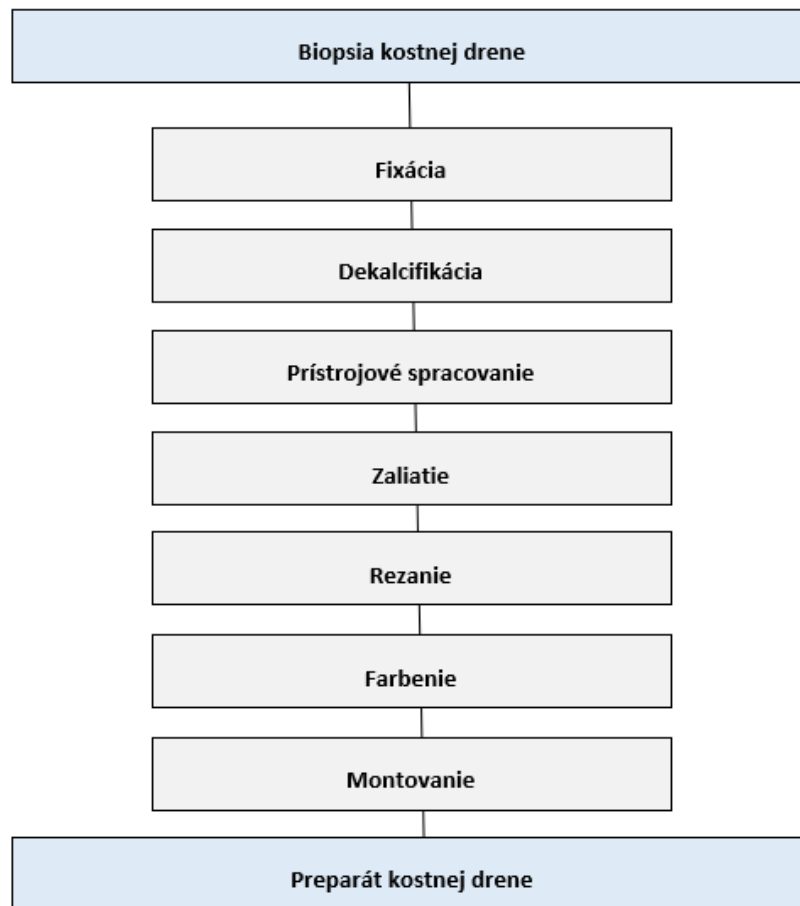
Metóda impregnácie striebrom na dôkaz retikulárnych vlákien sa nazýva Gömöriho metóda, pri ktorej by sa malo zaznamenať akékoľvek ohniskové zvýšenie ukladania retikulínu. Tkanivo sa pri tomto farbení presýti soľami striebra (napr. dusičnanom strieborným), ktoré sa vyredukuje na povrchu vlákien. Retikulárne vlákna sú ofarbené na čierne a jadrá buniek sú dofarbené jadrovou červenou na červeno. (Bain, 2001b; Čížková, 2018; Dvořáková, 2008)

2.5.4.5 Periodic Acid Schiff

Základná metóda pre dôkaz tkanivových polysacharidov je Periodic Acid Schiff (ďalej len PAS) reakcia. Princípom je oxidácia 1,2-hydroxylových skupín sacharidov kyselinou jodistou na aldehydy. Aldehydové skupiny potom reagujú so Schiffovým činidlom za vzniku purpurovo-červeného sfarbenia. PAS pozitívne štruktúry sú glykogén, retikulárne vlákna, hlien, medzibunková hmota hyalinnej chrupavky a bazálne membrány. (Čížková, 2018)

Montovanie je poslednou fázou vyhotovenia preparátu. Na ofarbený rez sa kvapne montovacie médium a prilepí sa sklíčko. Takto vzniknutý preparát je pripravený na hodnotenie. (Wilkins a Clark, 2009)

Celý proces od odberu KD až po vyhotovenie preparátu na hodnotenie je schematicky zhrnutý na obrázku (Obr. 12).



Obrázok 12 Zhrnutie spracovania trepanobiopsie

(vlastné spracovanie)

2.5.5 Hodnotenie preparátu kostnej drene

Histologické vyšetrenie biopsie KD má rozhodujúce postavenie pre diagnostiku rôznych hematologických ochorení, najmä v situáciách, kde je aspirácia KD neúspešná. Bioptické rezy by sa mali systematicky skúmať, zaznamenávať a hodnotiť by sa mali kosti, cievy, stroma, hematopoetické tkanivo a akékoľvek iné tkanivo. V správne fixovaných, odvápnených, zaliatych, narezaných a ofarbených preparátoch je možné hodnotiť

architektúru, celularitu, bunkové línie a odhad zásob železa a iných znakov (zápal, pigment, infekčné agens). Vo všeobecnosti je možné identifikovať zrelšie štádiá erytroidných a myeloidných buniek, adipocyty, mastocyty a megakaryocyty, naopak kmeňové bunky, nezrelé myeloidné, erytroidné, lymfoidné, monocytoidné a stromálne bunky nie je možné spoľahlivo určiť. (Bain, 2001b; Porwit a kol., 2011; Travlos, 2006)

Vzorky by sa mali skúmať v troch stupňoch zväčšenia:

- nízky (20, 50, 40 a 100x) – hodnotí sa adekvátnosť bioptickej vzorky, celulóznosť, prítomnosť ohniskových lézií (granulómy, fokálne infiltráty buniek lymfómu alebo karcinómu), počet megakaryocytov, abnormálne zhluky buniek, ich umiestnenie a štruktúra kosti;
- stredný (200, 400, 500x) – hodnotí sa hematopoetická aktivita (erytroidné, myeloidné, megakaryocytové línie, lymfoidné, plazmatické bunky a makrofágy) a povaha ohniskových lézií;
- vysoký (1000x, ponorenie do oleja) – hodnotia sa jemné bunkové detaily (Auerove tyčky, intracelulárne granuly), detekcia plesňových a protozoálnych infekcií a diagnostika akútnej leukémie, myelodysplastického syndrómu, megaloblastovej anémie a lymfómu. (Bain, 2001b; Lee a kol., 2008)

Pri hodnotení je veľmi dôležité uvedomiť si, že všetky predchádzajúce kroky spracovania biopsie KD môžu výrazne ovplyvniť kvalitu vzorky a je nutné ich brať do úvahy.

Hodnotenie je k dispozícii zvyčajne 24-72 hodín od odberu, tento čas závisí od režimu fixácie, dekalifikácie a laboratórnych postupov. V prípade, že sa jedná o urgentnú tkanivovú vzorku, hodnotenie by malo byť vydané do 3 hodín (ústne) a 24 hodín v písomnej forme. V menej naliehavých prípadoch je prijateľná doba 5 pracovných dní. Ďalších 24-48 hodín môže byť potrebných v prípade indikácie IHCH farbenia alebo iného špeciálneho farbenia. (Grindem, 1989; Lee a kol., 2008)

3. ZADANIE A CIEĽ PRÁCE

Hlavným cieľom práce je zistiť, či dĺžka fixácie ovplyvňuje spracovanie trepanobiopsií kostnej drene. Pre úspešné stanovenie tohto cieľa bolo nutné stanoviť si parciálny cieľ, a to naštudovanie riešenej problematiky a vytvorenie literárnej rešerše.

Stanovené hypotézy:

H1: Predpokladáme, že dĺžka fixácie nemá významný vplyv na spracovanie trepanobiopsie.

H2: Predpokladáme, že najoptimálnejšia dĺžka fixácie je 24 hodín.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Spracovanie trepanobiopsie

Trepanobiopsia je spracovávaná podľa ŠPP Diagnostického centra patológie v Prešove (ďalej len DCPvP).

4.1.1 Príjem trepanobiopsie

Príjem do laboratória vykonáva určená príjmová laborantka, ktorá zabezpečuje centrálny príjem materiálu pre všetky prevádzky. Príjem trepanobiopsie podlieha všeobecným zásadám príjmu vzoriek ako takých (kontrola materiálu, žiadanky).

Trepanobiopsia je ihneď po prijme označená a zaevidovaná v Bioptickej príjmovej knihe a v laboratórnom informačnom systéme (LIS). K príslušnému číslu sa do bioptickej knihy zaznamená, že materiálom na histologické vyšetrenie je KD. Nakoľko trepanobiopsia vyžaduje pred excidáciou osobitné spracovanie, hneď po zaevidovaní je vzorka zverená určenej laborantke, ktorá má na starosti jej ďalšie spracovanie.

4.1.2 Spracovanie trepanobiopsie pred excidáciou

Celkové spracovanie trepanobiopsie závisí na veľkosti a tvrdosti vzorky. Všeobecne platí postup uvedený v tabuľke (Tab. 6):

Tabuľka 6 Časový harmonogram spracovania trepanobiopsie

(vlastné spracovanie)

		Približný čas
1. deň	príjem vzorky	-
	Fixácia	-
2. deň - doobeda	vypieranie v tečúcej vode	7:00
	dekalifikácia	9:00
	vypieranie v destilovanej vode	12:00-15:00
2. deň - poobede	kontrola a odovzdanie žiadaniek na excidáciu	do 15:00
	dopísanie IHCH vyšetrenia	
	excidovanie	do 16:00

4.1.2.1 Fixácia

Odobraté trepanobioptické vzorky prichádzajú na oddelenie fixované v 10% NBF o pH 7,2 až 7,4. Formalín je nutné nahradiť čerstvým roztokom, v ktorom je vzorka ponechaná zväčša počas noci. Dĺžka fixácie je zväčša 12-24 hodín.

4.1.2.2 Vypieranie v tečúcej vode

Po skončení fixácie je nutné dokonale odstrániť formalín vypieraním v tečúcej (obyčajnej) vode, kvôli následnému pôsobeniu dekalcificačného roztoku. Vypieranie je realizované viacnásobnou výmenou vody, po dobu cca 1-2 hodín.

4.1.2.3 Dekalcifikácia

Ako odvápnujúci roztok je rutinne využívaný Chelatón III, ktorý nepoškodzuje štruktúru tkaniva a zachováva jeho dobrú farbitelnosť. Odvápnuje vzorku pri 37°C za občasného pretrepávania. Tvrdosť tkaniva sa priebežne kontroluje pohmatom a zaznamenáva na žiadanke. Podľa potreby je možné roztok opakovane vymeniť. Dekalcifikáciu netreba zbytočne predlžovať, aby nedošlo k zničeniu buniek KD na úkor kostného tkaniva. Štandardná dĺžka dekalifikácie je v rozmedzí 2 až 5 hodín.

4.1.2.4 Vypieranie v destilovanej vode

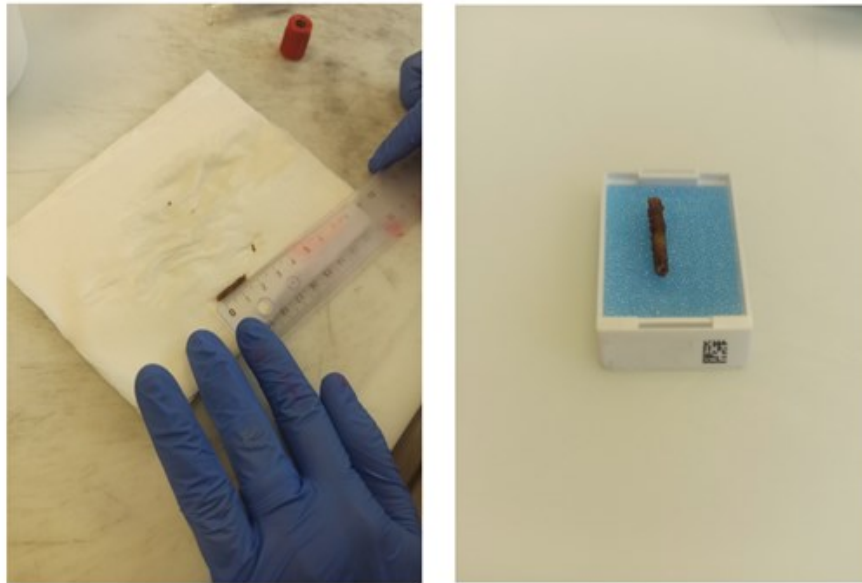
Po odvápnení vzorky musí byť Chelatón III z tkaniva dôkladne odstránený vypratím v destilovanej vode. Takto vyprané tkanivo už nesmie prísť do styku s formalínom ani s tečúcou vodou, aby sa opäť nenaviazali minerálne látky z vody. Vypieranie trvá 1-2 hodiny.

4.1.2.5 Excidovanie

Excidácia prebieha v popoludňajších hodinách a riadi sa všeobecne známymi, dohodnutými a platnými odbornými postupmi.

Pri excidovaní trepanobiopsie je do žiadanky zaznačený počet a dĺžka odobratých valčekov (Obr. 13). Excízie sú vložené do kapslí, ktoré budú v priebehu ďalšieho spracovania vložené do tkanivového procesoru. Sprievodný lístok je odovzdaný príjmovej laborantke, ktorá pripraví príslušné zalievacie bločky a sklíčka na rezanie.

Dĺžku vzorky zaznamená číslom v milimetroch, čím dá informáciu o vzorke pre laborantky zodpovedné za zalievanie do parafínu.



Obrázok 13 Excidácia trepanobiopsie

(vlastné spracovanie)

4.1.3 Ďalšie spracovanie trepanobiopsie

4.1.3.1 Prístrojové spracovanie

Po excidácii nasleduje prístrojové spracovanie v tkanivovom procesore zn. Leica TP1020 (Obr. 14). Ten slúži na spracovanie malých a prefixovaných excízií a takých, ktoré nesmú prísť do styku s formalínom a vodou (trepanobiopsie, dekalifikáty, cytobloky).

Ide o pracovný postup, ktorý je zväčša naplánovaný počas noci. Zahŕňa:

- dehydratáciu excízií, ktorá musí byť šetrná, aby nedošlo k zvráteniu tkaniva. Využíva sa vzostupný raz alkoholov, prípadne acetónov.
- prejasnenie a presýtenie tkaniva rozpúšťadlom, ktoré je zabezpečené pôsobením činidla miešateľného sa s alkoholom, resp. acetónom, ale súčasne je rozpúšťadlom pre parafín. Takým činidlom je xylén.
- presýtenie tkaniva parafínom, ktoré trvá minimálne 6 hodín pri teplote parafínu cca 52-60°C.

Pracovný postup:

1. Kapsle s excíziou priamo vložiť do benzínalkoholu
2. Dehydratácia tkaniva – 50%, 70%, 80%, 96% benzínalkohol
3. Prejasnenie a presýtenie rozpúšťadlom – 2x xylén
4. Presýtenie parafínom – 2x parafín

Takto spracovanú excíziu je možné zaliať do parafínu a vyhotoviť tkanivový blok určený na rezanie.



Obrázok 14 Tkanivový procesor zn. Leica TP1020

(vlastné spracovania)

4.1.3.2 Zalievanie

Zalievania do parafínu pomocou zalievacej linky HistoStar (Obr. 15) sú účastné 3 laborantky:

- laborantka pre vybaľovanie je zodpovedná za vybaľovanie excízie a priradenie príslušného zalievacieho bločku k excízii. Skontroluje, či súhlasí počet a dĺžka excízie a posunie materiál na vyhrievanú platničku.
- laborantka pre zalievanie skontroluje zhodnosť čísel, počet vzoriek, veľkosť, tvar a typ materiálu. Zorientuje tkanivo a excíziu zaleje parafínom. Zaliaty bloček presunie na chladiacu dosku.

- laborantka pre vylupovanie odoberie z chladiacej dosky vychladený bloček a zaradí ho do poradia podľa čísla. Spolu so žiadankou bloček putuje do bioptického laboratória na rezanie.



Obrázok 15 Chladiaca plocha a zalievacia linka HistoStar

(vlastné spracovanie)

4.1.4 Príprava preparátov trepanobiopsie

Príprava preparátov pozostáva z rezania parafínového bločku, vyhotovenia preparátov a ich následného sušenia, odparafínovania, farbenia a montovania.

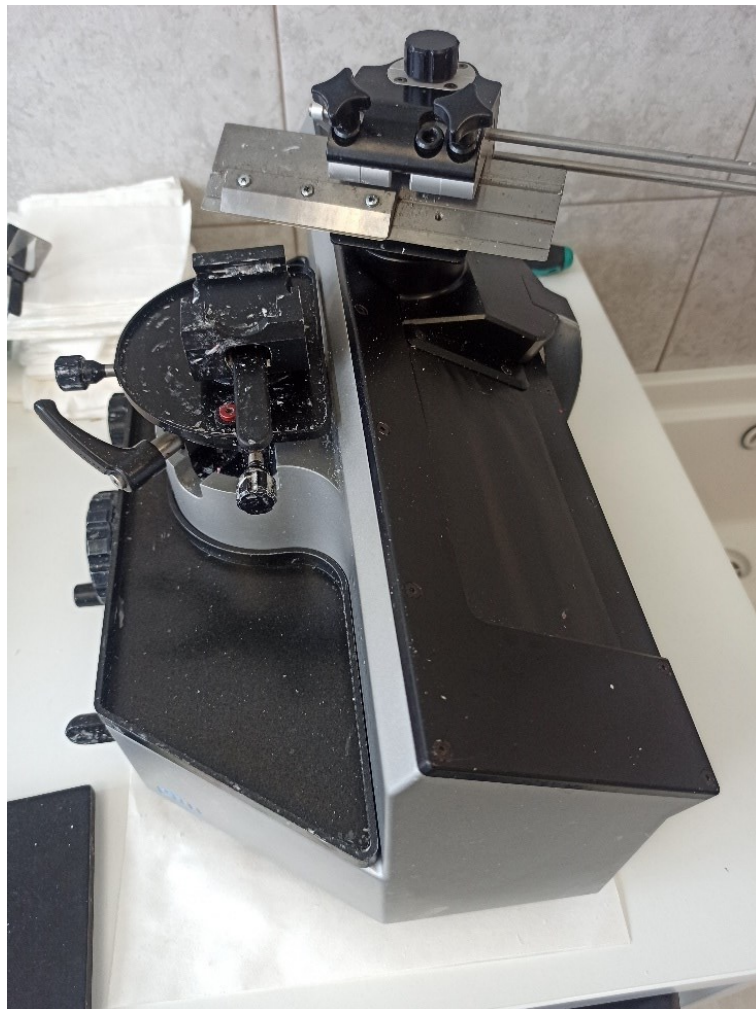
4.1.4.1 Rezanie parafínových bločkov

Na rezanie bločku sa využíva sánkový mikrotóm zn. PMF 4004 (Obr. 16).

Postup rezania na sánkovom mikrotóme:

1. Do svoriek na sánkach mikrotómu upevniť držiak s čepieľkou tak, aby jeho pozdĺžna os bola kolmá na smer rezu.
2. Makroskrutkou nastaviť výšku stolčeka tak, aby horná plocha bločku bola v rovine ostria noža.

3. Pomocou mikroskrutky definovať požadovanú hrúbku rezu.
4. Najprv nastavením hrubšieho rezu zrezať bloček, postupne znížiť hrúbku a zahľadiť mikroštrbiny na excízii. Nastaviť hrúbku rezu na 3-5 μm .
5. Pravou rukou uchopiť držadlo sánok (nikdy nie nôž) a rovnomerným ťahom sánok oproti bločku vytvoriť rez.
6. Ľavou rukou držať páčku posunu mikrometrickej skrutky, ktorá je nutné zatlačiť vždy pred pohybom sánky s čepeľou smerom k bločku.
7. Vhodné rezy zachytiť na podložnom sklíčku.



Obrázok 16 Mikrotóm zn. PMF 4004

(vlastné spracovanie)

4.1.4.2 Vyhotovenie preparátov

Postup:

1. Na čisté podložné sklíčko kvapnúť malú kvapku bielka a bruškom prsta ju rovnomerne rozotrieť po celej ploche sklíčka.
2. Na sklíčko preniesť parafínový rez a pipetkou ho podliať destilovanou vodou.
3. Pomocou preparačných ihiel rez vyrovať a preniesť sklíčko na vyhriatu piecku. Na piecke v prípade nutnosti rez dorovnať.
4. Prebytočnú vodu odsáť buničitou vatou a preparát vložiť do farbiaceho košíka.

4.1.4.3 Sušenie preparátov

Preparáty vo farbiacom košíku sa sušia v termostate pri teplote 50-55°C približne 10-20 minút. Voda sa odparí a tenká vrstva bielka pod rezom skoaguluje, čím je rez pevne prichytený na podložnom sklíčku.

4.1.4.4 Odparafínovanie preparátov

Odparafínovanie je dôležitou súčasťou farbiacich metód. Pred každým farbením sa parafínové rezy musia zbaviť parafínu, najčastejšie pomocou xylénu. Po odparafínaní sa prebytočný xylén odstráni premývaním v alkohole. Takto pripravené preparáty sú po opláchnutí v destilovanej vode pripravené na farbenie.

4.1.4.5 Farbenie preparátov

Rezy sú štandardne ofarbené základným farbením (HE), špeciálnymi farbeniami (PAS, Gömori, Giemsa, železo), HCH metódou na dôkaz chlóracetátsterázy (ďalej len CHAE) a podľa diagnózy aj IHCH metódami s využitím určených protilátok (napr. CD138, Kappa, Lambda a pod.), ktoré indikuje diagnostikujúci lekár. Na rutinné farbenie metódou HE a niektoré špeciálne farbenia slúži farbiaci automat Shandon Varistain Gemini (Obr. 17).



Obrázok 17 Farbiaci automat zn. Shandon Varistain Gemini

(vlastné spracovanie)

Postupy jednotlivých farbení sú zhrnuté v tabuľkách (Tab. 7-12) a ofarbené preparáty trepanobiopsie sú zachytené na obrázku (Obr. 18) pri dvadsaťnásobnom zväčšení.

Tabuľka 7 Farbenie Hematoxylín-eozín

(upravené podľa: ŠPP.01.02, 2017)

Hematoxylín-eozín (HE)		
Využitie	základné farbenie v histológii	
Princíp	využíva bázičný hematoxylín (jadrá) a kyslý eozín (cytoplazma a okolie)	
Reagencie	Mayerov hematoxylín	
	1% vodný roztok eozínu	
	Karbolxylol	
Postup	xylén – odparafínovanie	10 min
	xylén – odparafínovanie	10 min
	96% BA – odmastenie	5 min
	96% BA – odmastenie	5 min
	destilovaná voda	oplach
	Mayerov hematoxylín	10 min
	tečúca voda – vypieranie	10 min
	destilovaná voda	oplach
	1% vodný roztok eozínu	1-2 min
	tečúca voda – vypieranie	1-2 min
	96% BA – odvodnenie	2-3 min
	karbolxylol – prejasnenie	3 min
	Xylén	1 min
	Xylén	2 min
	montovanie do pertexu	-
Výsledok	jadrá buniek – modré až modročierne	
	cytoplazma buniek a medzibunková hmota spojivového tkaniva – rôzne odtiene ružovej až červenej	

Tabuľka 8 Farbenie Periodic Acid Schiff

(upravené podľa: ŠPP.01.02, 2017)

Periodic Acid Schiff (PAS)		
Využitie	dôkaz polysacharidov (glykogénu, neutrálnych mukopolysacharidov, mukoproteínov a glykolipidov)	
Princíp	oxidáciou glykolov kyselinou jodistou vznikajú aldehydy, ktoré reagujú so Schiffovou reagensiou za vzniku farebného komplexu	
Reagencie	0,5% kyselina jodistá Schiffova reagensia	
Postup	xylén – odparafínovanie	10 min
	xylén – odparafínovanie	10 min
	zostupná etanolová rada – odvodnenie	5 min
	destilovaná voda – vypranie	5 min
	0,5% kyselina jodistá	15 min
	destilovaná voda	oplach
	Schiffova reagensia	20 min
	tečúca voda – vypieranie	20 min
	Mayerov hematoxylín na dofarbenie jadier	5 min
	tečúca voda – vypieranie	10 min
	96% BA – odvodnenie	2-3 min
	Xylén	1 min
	Xylén	2 min
	montovanie do pertexu	-
Výsledok	glycidové zlúčeniny od ružovočervenej až po purpurovočervenú	

Tabuľka 9 Farbenie Perlsova reakcia

(upravené podľa: ŠPP.01.02, 2017)

Perlsova reakcia		
Využitie	dôkaz železa	
Princíp	trojmocné železo prítomné v tkanivách v spojení s ferrokyanidom draselným a kyselinou chlorovodíkovou vytvára modré sfarbenie, tzv. berlínsku (pruskú) modrú	
Reagencie	roztok ferrokyanidu draselného	
	jadrová červená	
Postup	xylén – odparafínovanie	10 min
	xylén – odparafínovanie	10 min
	96% BA – odvodnenie	5 min
	96% BA – odvodnenie	5 min
	destilovaná voda	oplach
	ferrokyanid draselný	10-15 min
	destilovaná voda	oplach
	jadrová červená	5 min
	destilovaná voda	oplach
	96% BA – odvodnenie	2-3 min
	Xylén	1 min
	Xylén	2 min
	montovanie do pertexu	-
Výsledok	jadrá buniek – červené	
	solí železa, voľné železo a hemosiderín – berlínska modrá	

Tabuľka 10 Farbenie Gömöri

(upravené podľa: ŠPP.01.02, 2017)

Gömöri		
Využitie	impregnácia retikulárnych vlákien	
Princíp	presycovanie tkanivových rezov soľami striebra, ktoré sa vyredukujú na retikulárnych vláknach a tým ich zvýrazní	
Reagencie	amoniakálny roztok striebra	
	0,5% kyselý manganistan draselný	
	3% kyselina oxálová (šťavelová)	
	1% síran železito-amónny	
	10% neutrálny formaldehyd	
	0,2% chlorid zlatitý	
	1% tiosíran sodný	
	jadrová červená	
Postup	xylén – odparafínovanie	10 min
	xylén – odparafínovanie	10 min
	96% BA – odvodnenie	5 min
	96% BA – odvodnenie	5 min
	destilovaná voda	oplach
	kyselý roztok manganistanu draselného	½ min
	tečúca voda	oplach
	3% kyselina oxálová	½ min
	tečúca voda	oplach
	1% síran železito-amónny	3-5 min
	tečúca voda – vypieranie	5 min
	destilovaná voda	oplach
	utretie tekutiny v okolí rezu	-
	amoniakálny roztok striebra	2 min
	destilovaná voda	krátky oplach
	10% neutrálny formol	½ min
	tečúca voda – vypieranie	10 min
	destilovaná voda	oplach
	0,2% chlorid zlatitý	1 min

	destilovaná voda	oplach
	3% kyselina oxálová	1 min
	destilovaná voda	oplach
	1% tiosíran sodný	3 min
	destilovaná voda	oplach
	jadrová červená	5 min
	destilovaná voda	oplach
	96% BA – odvodnenie	2-3 min
	Xylén	1 min
	Xylén	2 min
	montovanie do entelénu	-
Výsledok	jadrá buniek – červené	
	retikulárne vlákna – čierne	

Tabuľka 11 Farbenie Giemsa

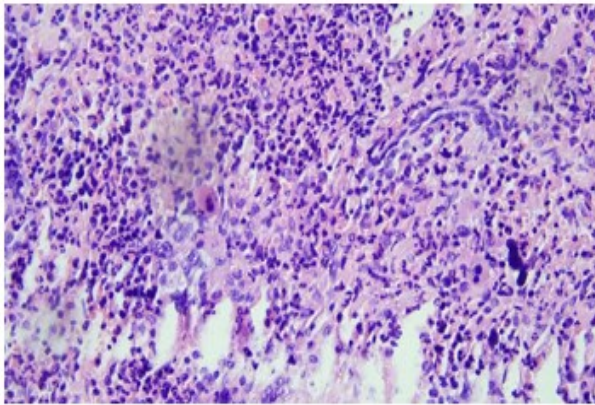
(upravené podľa: ŠPP.01.02, 2017)

Giemsa		
Využitie	trepanobiopsie, lymfatické uzliny a iné tkanivá	
Princíp	absorpcia roztoku organickými štruktúrami	
Reagencie	Giemsa-Romanovski	
	diferenciačný roztok	
Postup	xylén – odparafínovanie	10 min
	xylén – odparafínovanie	10 min
	96% BA – odvodnenie	5 min
	96% BA – odvodnenie	5 min
	destilovaná voda	oplach
	Giemsa-Romanovski	1 hod
	sušenie rezu medzi filtračnými papiermi, nesmie vyschnúť	-
	diferenciačný roztok	rýchly oplach
	96% alkohol	rýchly oplach
	sušenie rezu medzi filtračnými papiermi, nesmie vyschnúť	-
	kontrola pod mikroskopom	-
	Izopropylalkohol	5 min
	Izopropylalkohol	5 min
	Izopropylalkohol	5 min
	sušenie na vzduchu, nesmie vyschnúť	-
	Xylén	3 min
	montovanie do entelánu	-
Výsledok	jadrá buniek – tmavomodré až modrofialové	
	cytoplazma buniek – modrá, ružová až sivoružová	
	jadierka – červenofialové	
	lymfocyty, leukocyty – plazma modrá, jadrá modrofialové	
	erytrocyty – žltozelené	
	baktérie – koky a tyčinky tmavomodré až čierne, mycélie modré	
	blastospóry – modré	

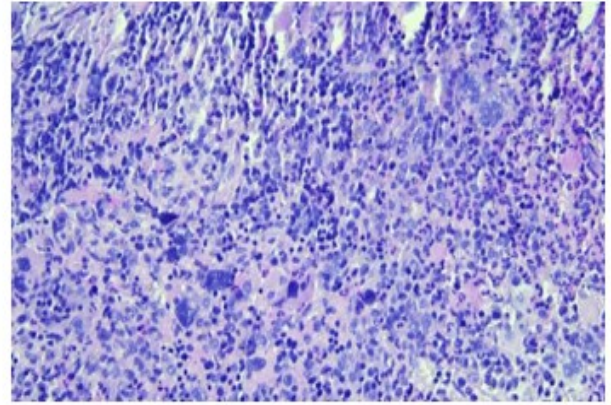
Tabuľka 12 Farbenie chlóracetátesteráza

(upravené podľa: ŠPP.01.02, 2017)

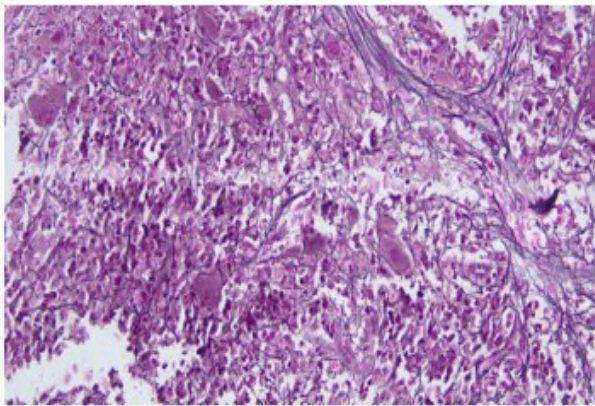
Chlóracetátesteráza (CHAE)		
Využitie	dôkaz granulocytov	
Princíp	hydrolytické štiepenie substrátu na naftol, ktorý kopuláciou s diazónovou soľou poskytuje v miestach výskytu enzýmu nerozpustnú farebnú zlúčeninu	
Reagencie	0,1 M fosfátový pufor (pH 6,3-6,5)	
	4% pararozanilín	
	4% dusitan sodný	
	hexazotovaný pararozanilín	
	inkubačný roztok	
Postup	xylén – odparafínovanie	2-24 hod
	96% BA – odvodnenie	5 min
	96% BA – odvodnenie	5 min
	96% BA – odvodnenie	5 min
	96% BA – odvodnenie	5 min
	96% BA – odvodnenie	5 min
	destilovaná voda	oplach
	osušenie na vzduchu, utretie sklíčka okolo rezu	-
	inkubačný roztok	30-140 min
	kontrola pod mikroskopom	-
	destilovaná voda	1 hod
	10% pufrovaný formalín	2-12 hod
	tečúca voda – vypieranie	30 min
	Mayerov hematoxylín	5-10 min
	tečúca voda – diferenciacia	10 min
	destilovaná voda	oplach
	montovanie do glycerín-želatína / Appathyho sirup ; resp.	-
	96% BA – odvodnenie	2-3 min
	Xylén	1 min
	Xylén	2 min
montovanie do pertexu/entelénu	-	
Výsledok	aktivita enzýmu – červené sfarbenie	



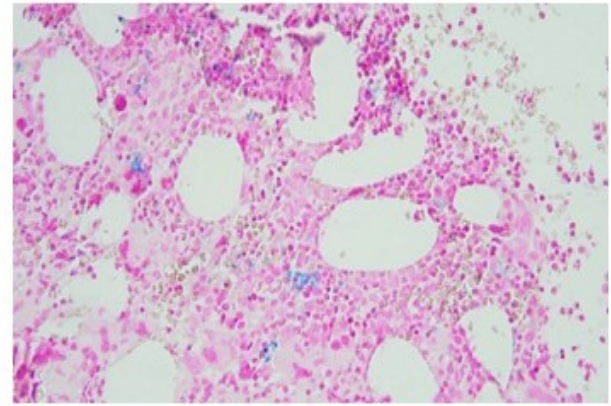
HE



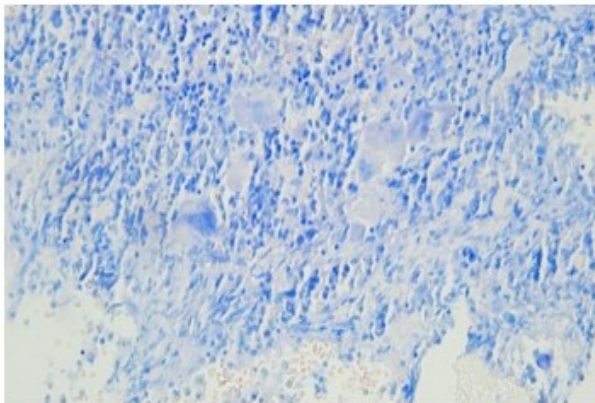
PAS



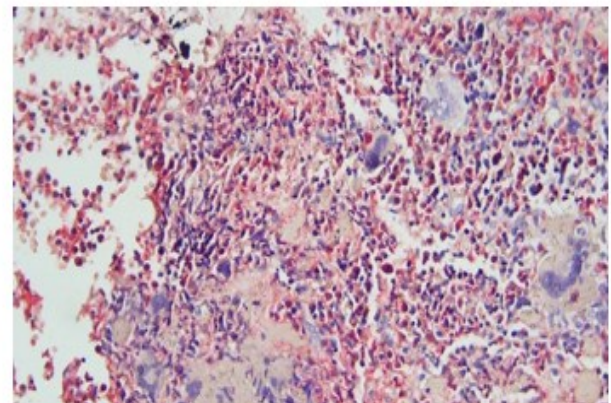
Gömöri



Perlsova reakcia



Giemsa



CHAE

Obrázok 18 Farbenia trepanobiopsie – reprezentatívny obrázok

Zväčšenie: 20x

(vlastné spracovanie)

4.1.4.6 Montovanie preparátov

Po ofarbení sú tkanivové rezy montované (prikryvané) pod krycie sklíčko do vhodného média buď prístrojovo, alebo manuálne.

Prístrojové prikryvanie pomocou prikryvacieho automatu ClearVue™ je využívané v rutinej bioptickej prevádzke. Preparáty sú montované do média miešajúceho sa s xylénom.

Manuálne prikryvanie sa využíva pri špeciálne ofarbených preparátoch a preparátoch na HCH a IHCH. Možno ich montovať do média miešajúceho sa s xylénom (Pertex, Entelán) alebo miešajúceho sa s vodou (čistý glycerín, glycerín-želatína, pufrovaný glycerín)

Postup manuálneho prikryvania:

1. Preparáty prikryvať z xylénu/vody (podľa prikryvacieho média).
2. Na čisté odmastené krycie sklíčko kvapnúť prikryvacie médium (1 kvapka).
3. Preparát okolo rezu otrieť gázou a preparát otočiť tak, aby bol rez ponorený do kvapky prikryvacieho média, ktoré spolu s krycím sklíčkom prilnie k podložnému sklíčku.
4. Jemným tlakom prsta na krycie sklíčko odstrániť prípadné vzduchové bubliny medzi krycím a podložným sklíčkom.
5. V prípade prikryvania do média miešajúceho sa s vodou nutnosť orámčekovať pertexom alebo parafínom okraje krycieho sklíčka. Zabráni sa vyschnutiu média a umožní sa archivácia preparátu.

Hlavnou zásadou montovania je, že počas prikryvania rezy nesmú uschnúť, aby tkanivo nepopraskalo a neznížila sa tým kvalita vyhotoveného preparátu.

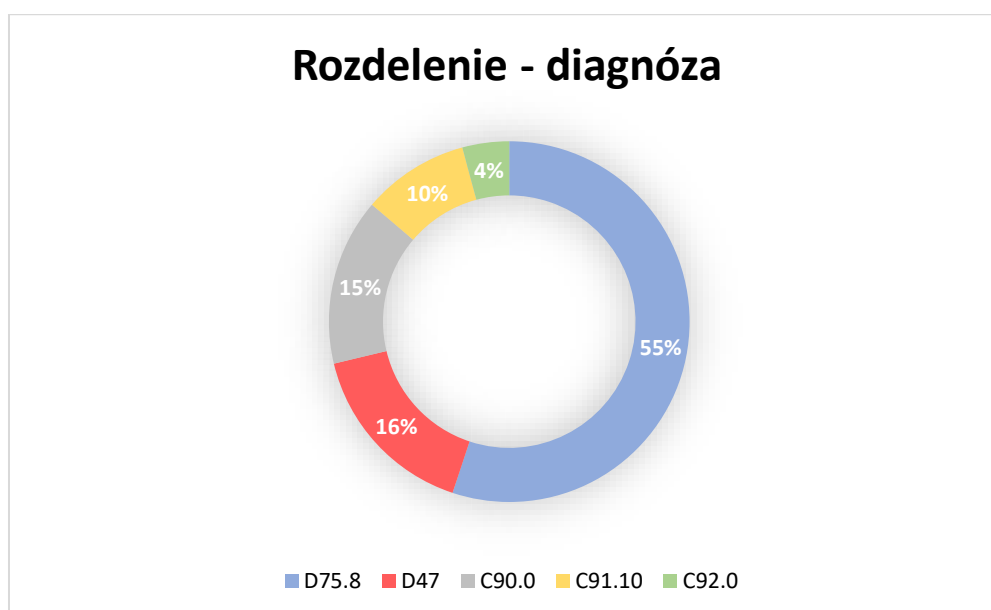
4.2 Databáza trepanobiopsií

Z databázy DCPvP sme vyseletovali pacientov s diagnózami uvedenými v tabuľke (Tab. 13), ktoré boli najpočetnejšie zastúpené pri prijatých vzorkách trepanobiopsií v období skúmania – od 01.08.2020 do 01.08.2021. Ich percentuálne rozdelenie znázorňuje príslušný graf (Graf 1). Diagnózy boli klasifikované podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb (ďalej len MKCH-10).

Tabuľka 13 Vybrané diagnózy podľa MKCH-10

(upravené podľa: NCZI, 2022a; NCZI, 2022b)

Diagnózy podľa MKCH-10	
D75.8	Iné špecifikované choroby krvi a krvotvorných orgánov
D47	Iné nádory lymfatického, krvotvorného a príbuzného tkaniva neurčitého alebo neznámeho správania
C90.0	Mnohopočetný myelóm
C 91.10	Chronická lymfatická leukémia
C92.0	Akútna myeloická leukémia



Graf 1 Diferenciácia pacientov na základe diagnózy

(vlastné spracovanie)

V danom období bolo v laboratóriu vyšetrených 167 pacientov, z toho 96 mužov a 71 žien. Zamerali sme sa aj na vekové zloženie pacientov a údaje sme matematicky zaznamenali v tabuľkách (Tab. 14, 15) a Grafe 2.

Tabuľka 14 Diferenciácia pacientov podľa pohlavia

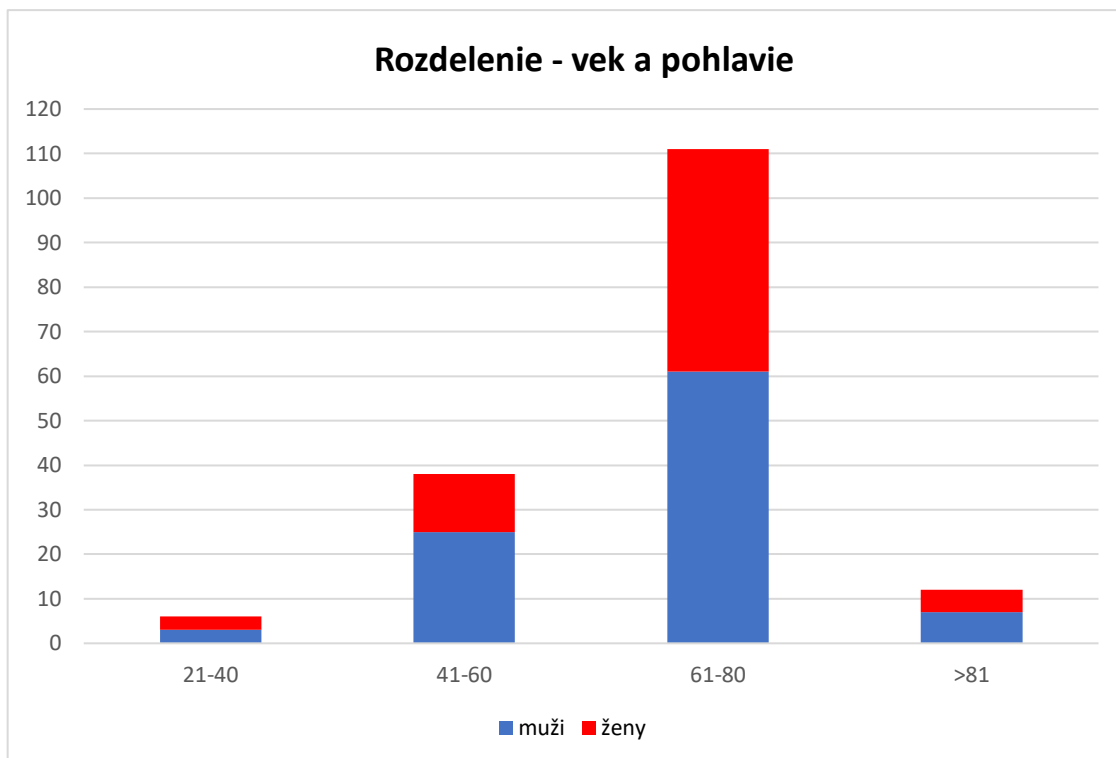
(vlastné spracovanie)

Diagnóza	Muži	Ženy	
D75.8	49	43	92
D47	17	10	27
C90.0	13	12	25
C91.10	12	4	16
C92.0	5	2	7
	96	71	167

Tabuľka 15 Veková diferenciácia pacientov

(vlastné spracovanie)

Diagnóza	21-40	41-60	61-80	➤ 81	
D75.8	4	22	58	8	92
D47	1	9	16	1	27
C90.0	1	3	18	3	25
C91.10	0	4	12	0	16
C92.0	0	0	7	0	7
	6	38	101	12	167



Graf 2 Diferenciácia pacientov na základe veku a pohlavia

(vlastné spracovanie)

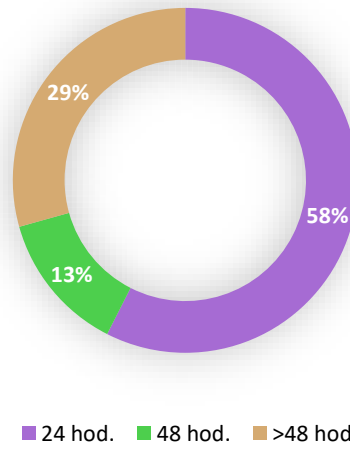
Hlavným cieľom našej práce je zistiť vplyv dĺžky fixácie na spracovanie a hodnotenie trepanobiopsií, takže bolo nutné rozdeliť pacientov podľa dĺžky fixácie ich vzoriek na 3 skupiny, a to 24 hod., 48 hod. a > 48 hod. Početné zastúpenie jednotlivých skupín je uvedené v tabuľke (Tab. 16). Percentuálne zastúpenie znázorňuje príslušný graf (Graf 3).

Tabuľka 16 Diferenciácie pacientov podľa dĺžky fixácie vzorky trepanobiopsie

(vlastné spracovanie)

Diagnóza	24 hod.	48 hod.	> 48 hod.	
D75.8	52	12	28	92
D47	15	3	9	27
C90.0	13	5	7	25
C91.10	14	1	1	16
C92.0	2	1	4	7
	96	22	49	167

Rozdelenie - dĺžka fixácie



Graf 3 Diferenciácia pacientov na základe dĺžky fixácie

(vlastné spracovanie)

4.3 Výber skúmaného súboru

Vzhľadom na počet trepanobioptických vzoriek prijatých v priebehu jedného roka bolo nutné vybrať reprezentatívnu vzorku, ktorú bude možné skúmať bližšie.

Skúmaný súbor tvoria náhodne vybrané vzorky rozdelené podľa diagnózy na dve skupiny (skupina C a D) a podľa dĺžky fixácie na tri skupiny (skupina 24, 48 a > 48). Vzájomnou kombináciou týchto dvoch kritérií vzniklo 6 podskupín, ktoré sú uvedené v tabuľke (Tab. 17). Tabuľka obsahuje údaje aj o veku a pohlaví pacientov.

Tabuľka 17 Charakteristika skúmaného súboru

(vlastné spracovanie)

Diagnóza	Podskupina	Vek (rokov)	Pohlavie (M/F)	Dĺžka fixácie (hod.)
C90.0 C91.10 C92.0	24-C	61	M	24
		69	M	
		77	M	
	48-C	78	F	48
		59	M	
		73	M	
	> 48-C	72	F	> 48
		80	F	
		72	M	
D75.8 D47	24-D	62	M	24
		78	F	
		64	F	
		67	M	
	48-D	68	F	48
		53	M	
		64	M	
		45	M	
	> 48-D	76	M	> 48
		55	F	
		67	M	
		80	F	

Vybrané trepanobioptické vzorky boli štandardne spracované podľa postupu uvedeného v podkapitole 4.1. Spracovanie trepanobiopsie. Vyhotovené preparáty boli následne odovzdané klinickému patológovi na hodnotenie.

5. VÝSLEDKY

Vyhodnotenie výskumu spočíva v dvoch hodnoteniach, a to hodnotenie laboranta a hodnotenie klinického patológa. Hodnotenie laboranta zahŕňa proces zalievania, rezania, farbenia a prikrývania. Lekár hodnotí už vyhotovený preparát, jeho adekvátnosť vzorky, celularitu a iné znaky, bližšie opísané v podkapitole 2.5.5 Hodnotenie preparátu kostnej drene.

V nasledujúcich tabuľkách (Tab. 18 a 19) je uvedené skóre hodnotenia klinického patológa i laboranta. Hodnotenie je vyjadrené číselnou škálou 1-10, pričom 1 je najhoršie a 10 najlepšie hodnotenie.

Tabuľka 18 Hodnotenie skupiny C

(vlastné spracovanie)

Podskupina	Vek (rokov)	Pohlavie (M/F)	Skóre laborant	Skóre patológ
24-C	61	M	5	7
	69	M	5	6
	77	M	8	10
48-C	78	F	6	7
	59	M	7	8
	73	M	6	8
> 48-C	72	F	8	9
	80	F	10	10
	72	M	7	8

Z tabuľky vyplýva, že vzorky fixované 24 hodín dosiahli priemerné skóre 6/7,66, vzorky fixované 48 hodín skóre 6,33/7,66 a vzorky fixované > 48 hodín skóre 8,33/9. Z hľadiska optimálnej fixácie dosiahla najlepšie hodnotenie > 48-hodinová fixácia.

Tabuľka 19 Hodnotenie skupiny D

(vlastné spracovanie)

Podskupina	Vek (rokov)	Pohlavie (M/F)	Skóre laborant	Skóre patológ
24-D	62	M	8	9
	78	F	6	8
	64	F	7	5
	67	M	8	9
48-D	68	F	9	9
	53	M	6	8
	64	M	6	7
	45	M	6	7
> 48-D	76	M	6	6
	55	F	6	8
	67	M	7	9
	80	F	8	9

Z tabuľky vyplýva, že vzorky fixované 24 hodín dosiahli priemerné skóre 7,25/7,75, vzorky fixované 48 hodín skóre 6,75/7,75 a vzorky fixované > 48 hodín skóre 6,75/8. Zo získaných informácií by sme mohli usúdiť, že všetky dĺžky fixácie sú porovnateľné a nemožno určiť jednoznačne najoptimálnejšiu dĺžku fixácie.

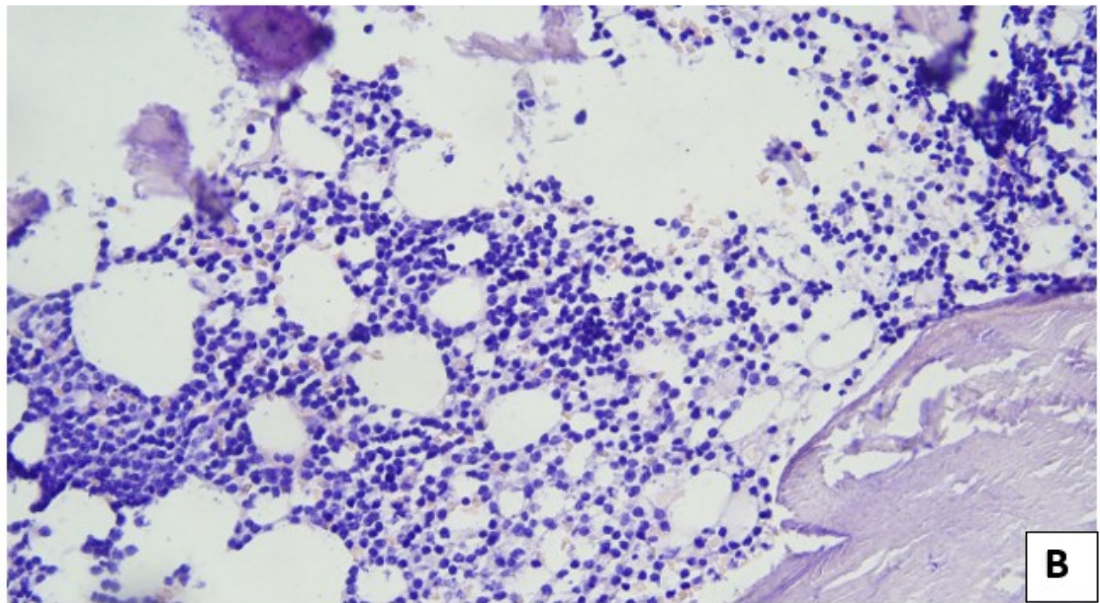
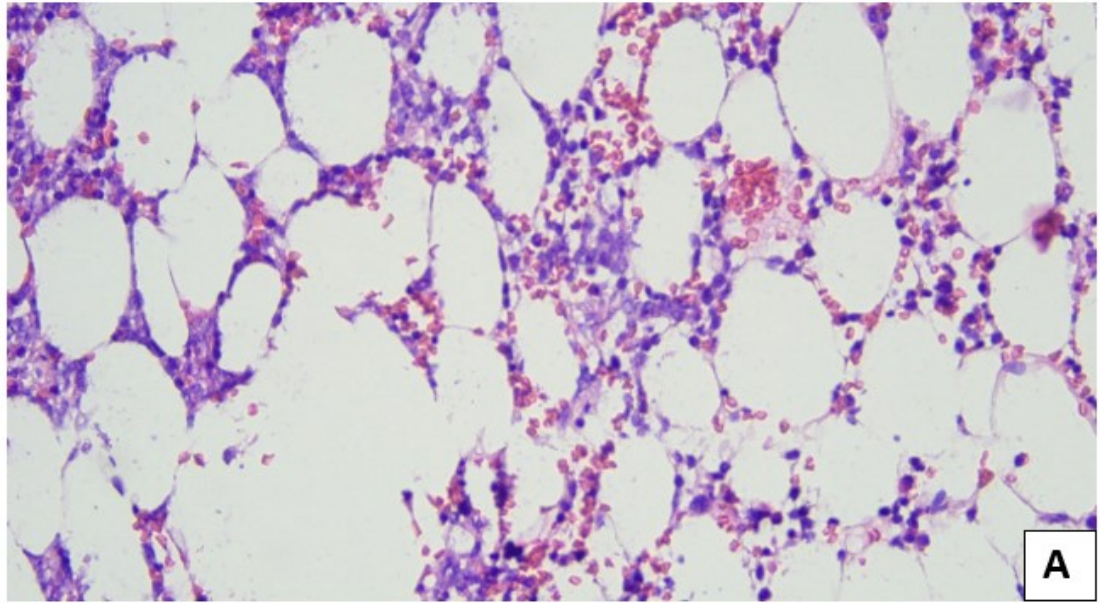
Nasledujúca tabuľka (Tab. 20) je súhrnom hodnotenia oboch skúmaných skupín a výsledné priemerné skóre je 6,71/7,71 u vzoriek fixovaných 24 hodín, vzorky fixované 48 hodín dosiahli skóre 6,57/7,71 a vzorky fixované > 48 hodín skóre 7,42/8,42.

Tabuľka 20 Súhrnné hodnotenie skupiny C a D

(vlastné spracovanie)

Dĺžka fixácie	Skóre laborant	Skóre patológ
24 hod	5	7
	5	6
	8	10
	8	9
	6	8
	7	5
	8	9
	6,71	7,71
48 hod	6	7
	7	8
	6	8
	9	9
	6	8
	6	7
	6	7
	6,57	7,71
> 48 hod	8	9
	10	10
	7	8
	6	6
	6	8
	7	9
	8	9
	7,42	8,42

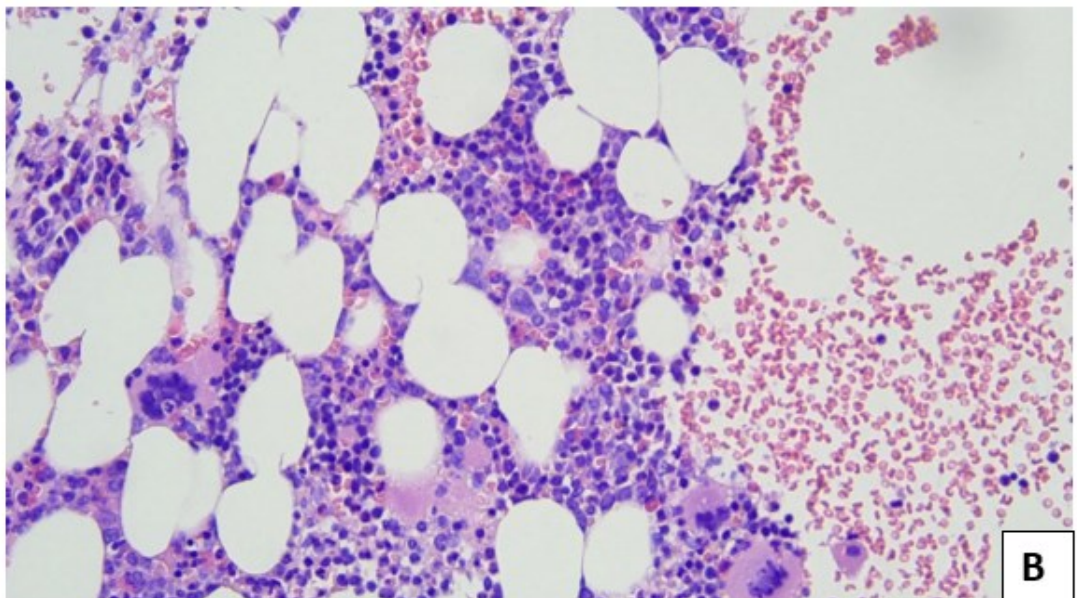
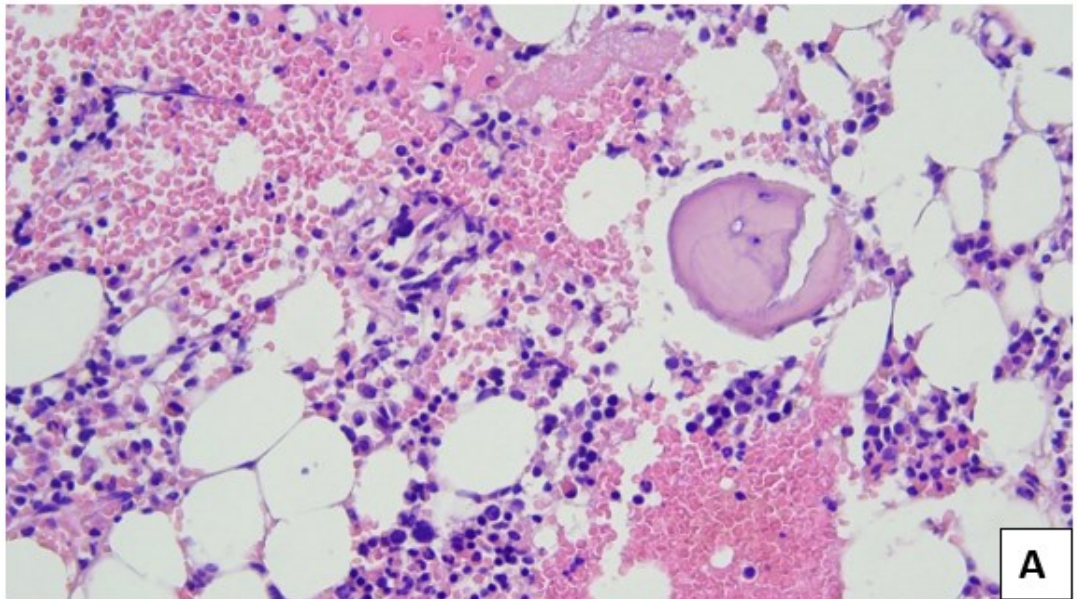
Nakoľko farbenie HE je základným farbením, obrázková časť je zameraná práve na toto farbenie (Obr. 19-24).



Obrázok 19 Preparáty fixované 24 hodín zo skupiny C

Farbenie HE. Zväčšenie: 20x

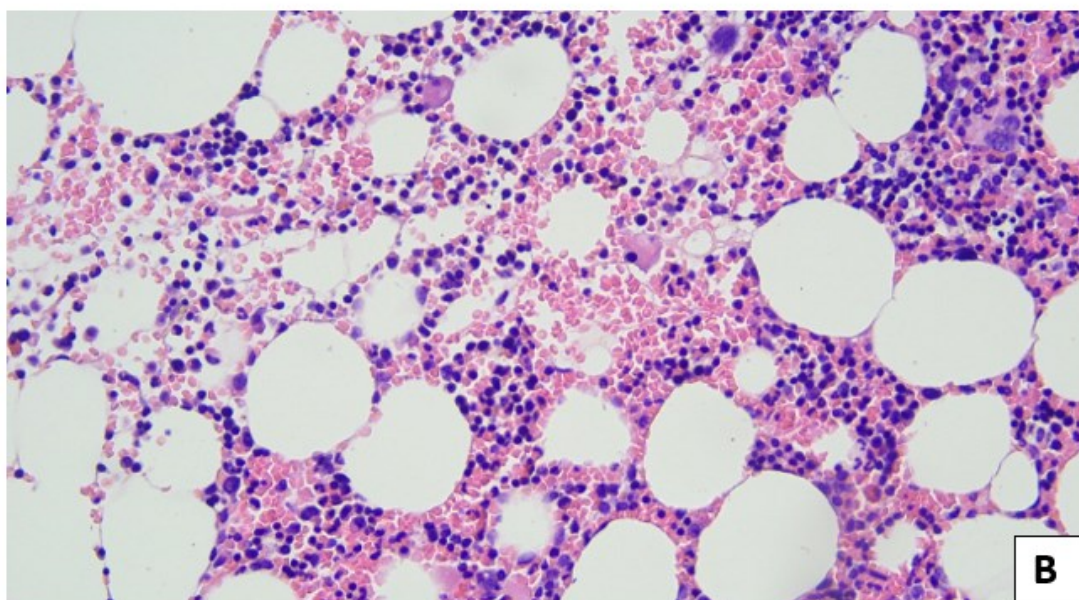
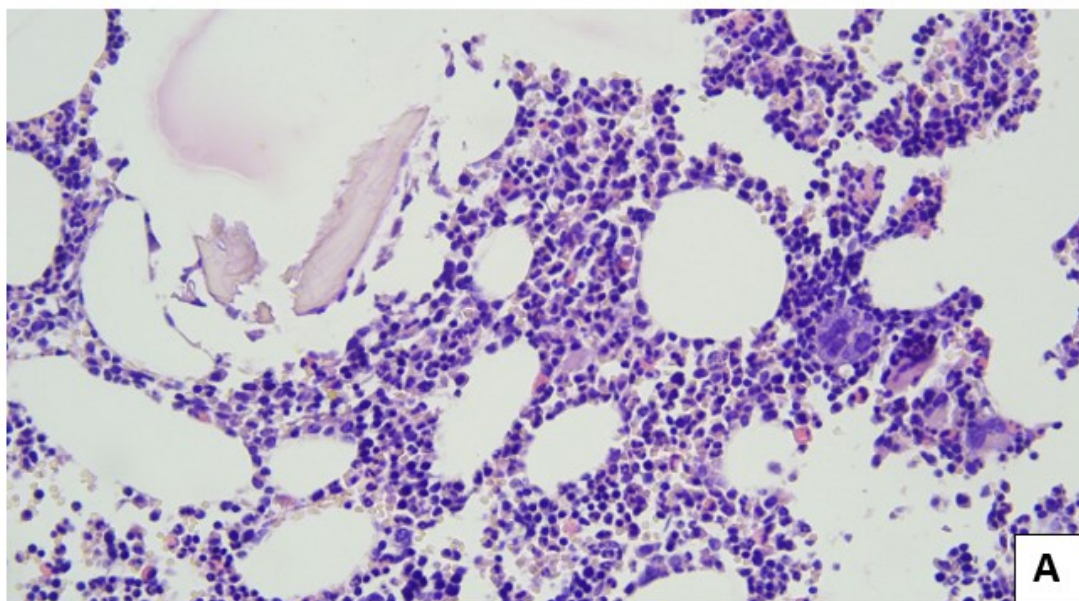
(vlastné spracovanie)



Obrázok 20 *Preparáty fixované 24 hodín zo skupiny D*

Farbenie HE. Zväčšenie: 20x

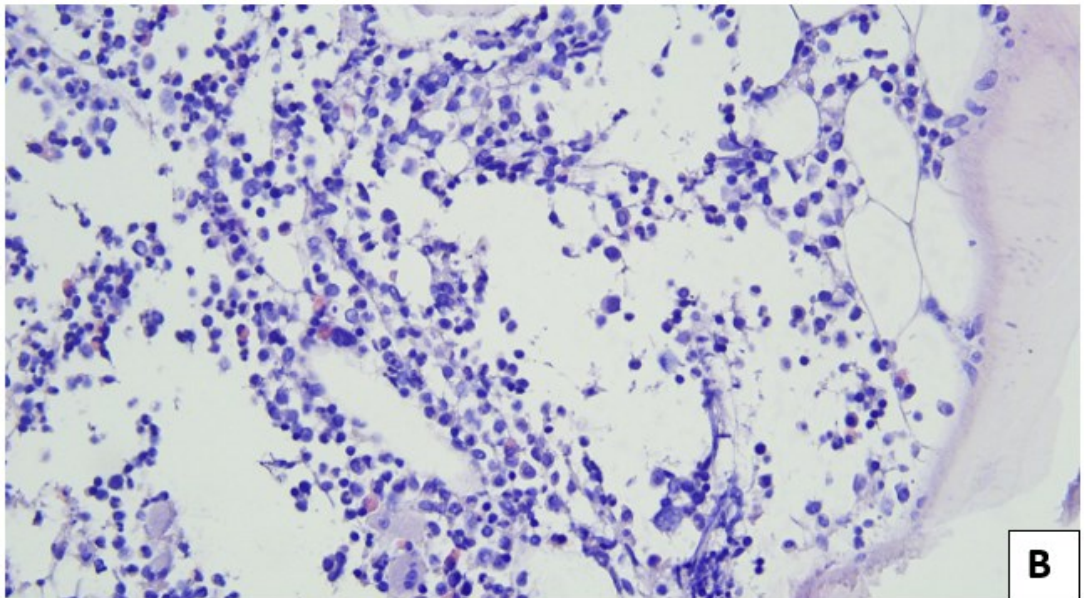
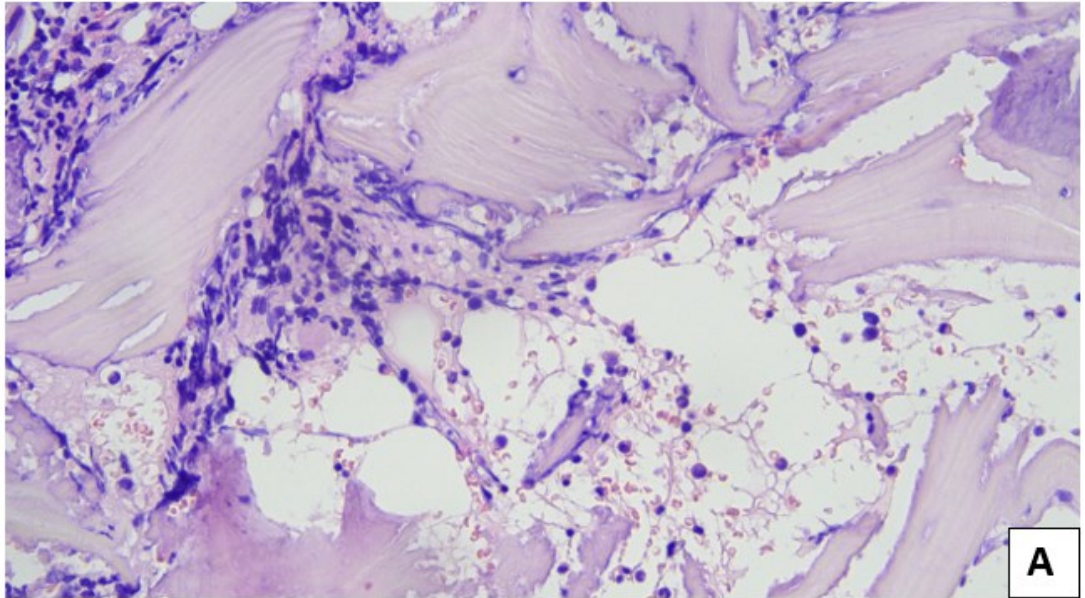
(vlastné spracovanie)



Obrázok 21 *Preparáty fixované 48 hodín zo skupiny C*

Farbenie HE. Zväčšenie: 20x

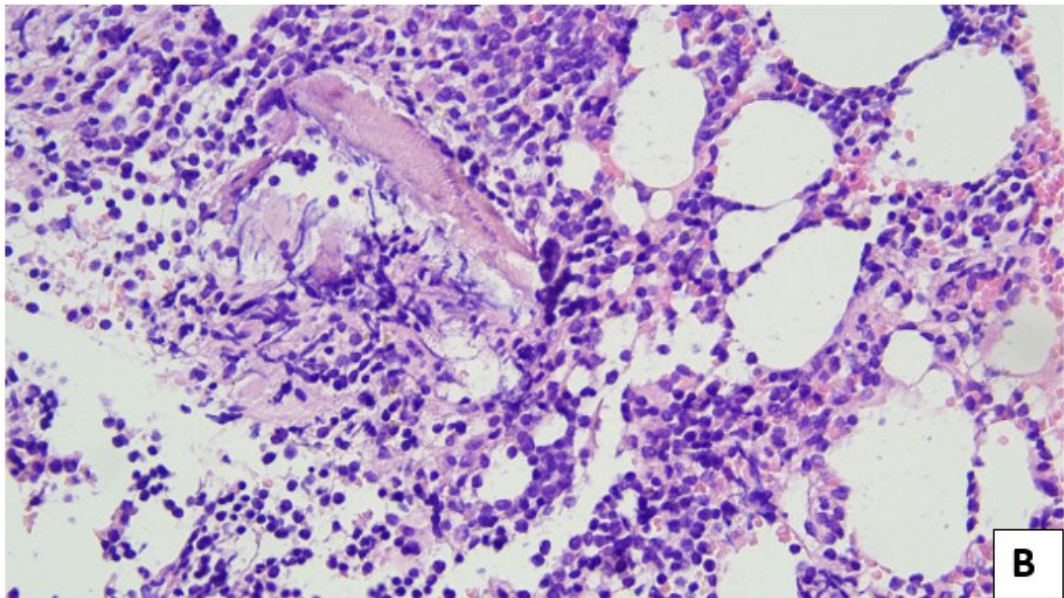
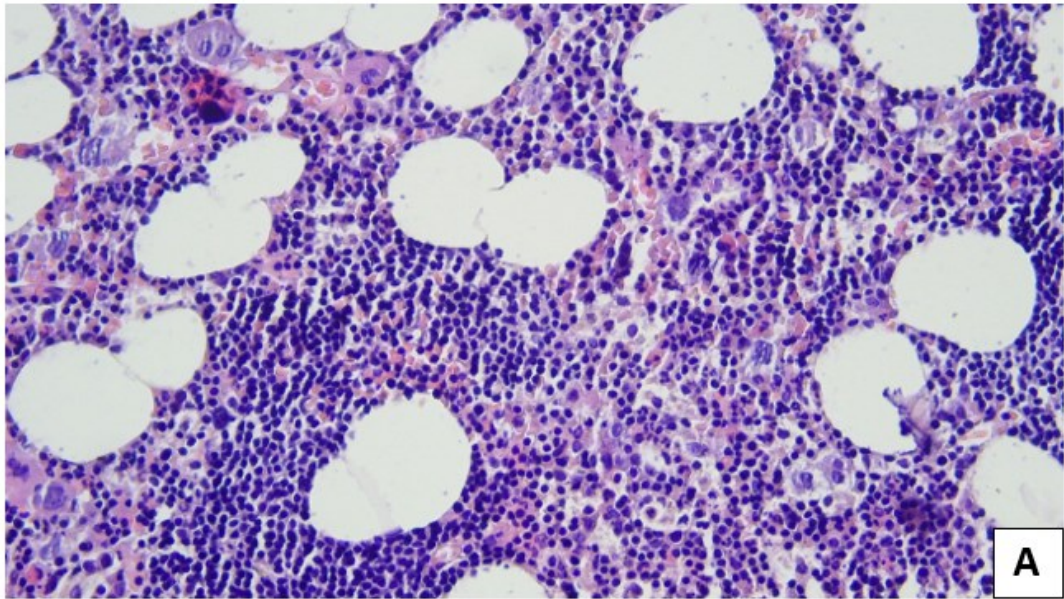
(vlastné spracovanie)



Obrázok 22 *Preparáty fixované 48 hodín zo skupiny D*

Farbenie HE. Zväčšenie: 20x

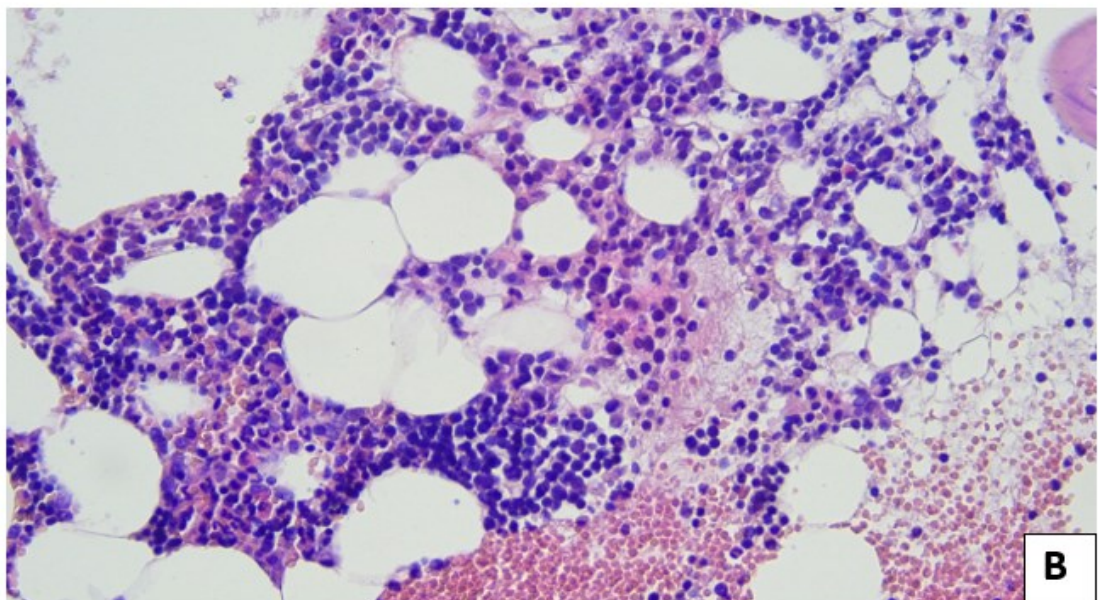
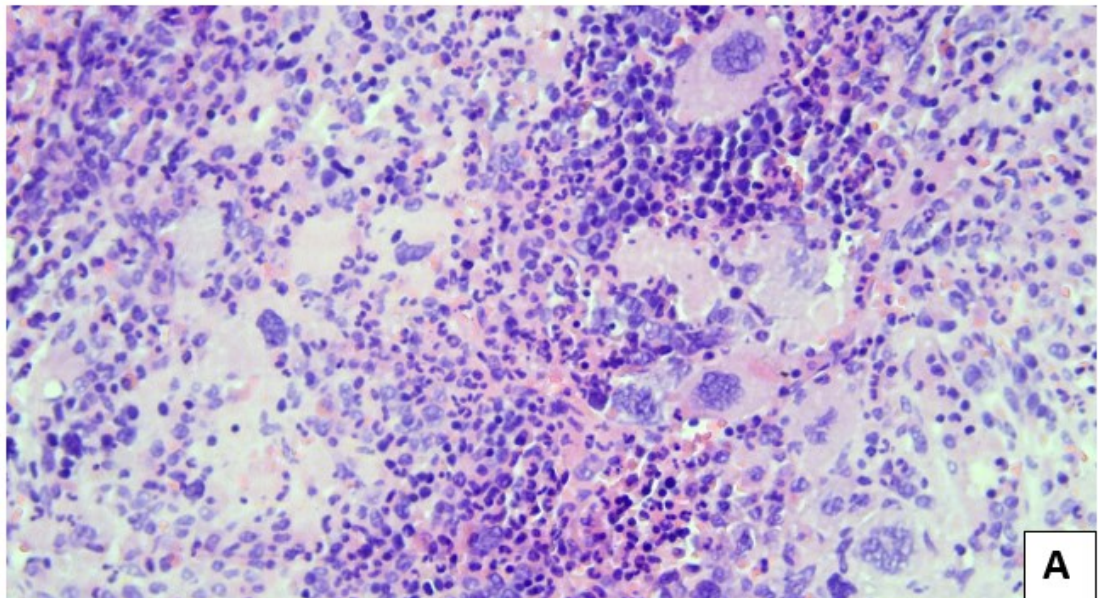
(vlastné spracovanie)



Obrázok 23 Preparáty fixované > 48 hodín zo skupiny C

Farbenie: HE. Zväčšenie: 20x

(vlastné spracovanie)



Obrázok 24 Preparáty fixované > 48 hodín zo skupiny D

Farbenie: HE. Zväčšenie: 20x

(vlastné spracovanie)

6. DISKUSIA

Hlavným cieľom práce bolo zistiť, či má dĺžka fixácie vplyv na spracovanie trepanobiopsií KD. Nakoľko je fixácia zväčša prvým a nevyhnutným krokom spracovania biologických vzoriek, je pochopiteľné, že v najväčšej miere ovplyvňuje proces ďalšieho spracovania, a v neposlednom rade aj samotnú hodnotiteľnosť preparátu. Tento výskum je zameraný na dĺžku fixácie roztokom 10% NBF. Literatúra uvádza, že najoptimálnejšou dobou, počas ktorej má byť vzorka fixovaná, je 24 hodín. (Čížková 2018)

V našom výskume sme sa zamerali na 3 rôzne dĺžky fixácie (24, 48 a > 48 hodín) v dvoch skupinách diagnóz (C a D skupina) s cieľom potvrdiť alebo vyvrátiť stanovené hypotézy.

V hypotéze 1 sme predpokladali, že dĺžka fixácie nemá významný vplyv na spracovanie trepanobiopsie. Danú hypotézu sme výskumom vyvrátili, keďže medzi jednotlivými dĺžkami fixácie boli objavené rozdiely. NBF je fixatívum, ktoré sa viaže na funkčné skupiny proteínov a vytvára hemoacetálové skupiny, čím znefunkčňuje väčšinu enzýmov. Možno predpokladať, že počas fixácie prebiehajú v rôznych časových intervaloch iné biochemické procesy, ktoré majú priaznivý či nepriaznivý vplyv na mikroštruktúru tkaniva. Zaujímavým zistením je, že práve podskupiny fixované 48 hodín vykazujú najhoršie výsledky, zatiaľ čo fixácia > 48 hodín dosiahla najvyššie hodnotenie. Možno teda vylúčiť možný predpoklad, že s rastúcou dĺžkou fixácie je tkanivo horšie hodnotiteľné.

Ako bolo spomenuté, v našom výskume boli vzorky roztriedené do dvoch základných skupín podľa diagnózy. V prípade skupiny D boli hodnotenia laboranta/patológa porovnateľné vo všetkých dĺžkach fixácie a dalo by sa povedať, že dĺžka fixácie nemá zásadný vplyv na spracovanie. Úplne iný výsledok bol dosiahnutý v skupine C, v ktorej sú rozdiely hodnotení v závislosti na dĺžke fixácie evidentné. Dĺžka fixácie by sa teda mala odvíjať aj od predpokladanej diagnózy.

Hypotéza 2 predpokladala najoptimálnejšiu dĺžku fixácie 24 hodín a táto hypotéza bola takisto vyvrátená. Na základe získaných výsledkov možno určiť rad na základe dĺžky fixácie od najlepšej po najhoršiu nasledovne: > 48 hodín, 24 hodín a 48 hodín.

Je nutné zdôrazniť, že hodnotenia laboranta a klinického patológa sú na sebe navzájom závislé. V prípade obťažného zalievania a rezania parafínového bloku, kedy sa rez stáča, rozmazáva alebo sa tkanivo drobí a vypadáva z rezu, je kvalita vyhotoveného preparátu znížená. Takýto rez sa ťažko hodnotí aj klinickému patológovi. Ďalším faktorom, ktorý je nutné brať do úvahy, je subjektivita hodnotenia laboranta a patológa. V našom prípade boli preparáty vyhodnocované klinickým patológom, ktorý je v DCPvP špecializovaný na tento druh bioptického materiálu. Vzhľadom na množstvo vyhodnotených vzoriek počas niekoľkých rokov je možné predpokladať správne vyhodnotenie kvality preparátu.

Vzhľadom na fakt, že trepanobiopsia je jedinečným materiálom získaným invazívnym a bolestivým spôsobom, je na jej hodnotenie kladené množstvo požiadaviek. Jednou z nich je spoľahlivé potvrdenie/vylúčenie diagnózy v čo najkratšom možnom čase. V niektorých prípadoch hrá čas významnú rolu, najmä pri podozrení na malígne ochorenie krvotvorby. V nesúlade s týmto odporúčaním je výsledok nášho výskumu, ktorý hovorí o fixácii > 48 hodín ako o najefektívnejšej a najlepšej. Existuje tak akýsi nesúlad, ktorý sa núti zamyslieť, čo je vhodnejšie v konkrétnej situácii.

7. ZÁVER

Cieľom tejto práce bolo zistiť, či dĺžka fixácie ovplyvňuje spracovanie trepanobiopsí kostnej drene. Pre splnenie cieľa bolo potrebné naštudovať riešenú problematiku. Tomuto čiastkovému cieľu sa venovala teoretická časť, ktorá pozostáva z 5 častí. Prvá časť sa venuje fixácii, fixačným roztokom a zásadám fixácie. Ďalšie dve časti opisujú kosť a kostnú dreň a štvrtá časť sa zaoberá trepanobiopsiou. Popisuje ober trepanobiopsie, miesto odberu a veľkosť vzorky, indikácie aj kontraindikácie. Posledná, piata časť je venovaná celkovému spracovaniu trepanobiopsie v laboratóriu.

V diplomovej práci boli stanovené dve hypotézy. Prvá hypotéza predpokladala, že dĺžka fixácie nemá významný vplyv na spracovanie trepanobiopsie. V priebehu výskumu sa nám podarilo túto hypotézu vyvrátiť, nakoľko dĺžka fixácie je významným činiteľom ovplyvňujúcim spracovanie vzorky. Druhá hypotéza predpokladala, že 24-hodinová fixácia je najoptimálnejšia. Z nášho výskumu však vyplýva, že najideálnejšia je viac ako 48-hodinová fixácia.

Za tejto práce vyplýva pár poznatkov, ktoré by sme zároveň chceli odporučiť pre klinickú prax, najmä pre Diagnostické centrum patológie v Prešove. Ak je to v kapacitných možnostiach laboratória, odporúčame dĺžku fixácie po zvážení klinickým patológom predĺžiť z rutinne využívaných 24 hodín na viac ako 48 hodín. Je žiadúce vyhnúť sa 48-hodinovej fixácii, tzn. vzorky, ktoré nie sú prijaté v deň odberu spracovávať až s minimálne jednodňovým oneskorením. Dĺžku fixácie je vhodné voliť s ohľadom na predpokladanú diagnózu a v závislosti na potrebe urýchleného potvrdenia/vylúčenia diagnózy.

8. POUŽITÉ SKRATKY

AF	alkalická fosfatáza
CHAE	chlóracetáteteráza
DCPvP	Diagnostické centrum patológie v Prešove
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
ER	endoplazmatické retikulum
GA	Golgiho aparát
HCH	histochémia
HE	hematoxylín-eozín
HGB	hemoglobín
HSC	hematopoetická kmeňová bunka
IHCH	imunohistochémia
KD	kostná dreň
MKCH-10	Medzinárodná klasifikácia chorôb
NBF	pufrovaný formalín
NK	nukleová kyselina
PAS	Periodic Acid Schiff
SIAS	predný horný trň bedrovej kosti
SIPS	zadný horný trň bedrovej kosti
ŠPP	štandardný pracovný postup

9. ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1 "Desatoro" dobrého fixačného roztoku	17
Tabuľka 2 Charakteristika kostných buniek	22
Tabuľka 3 Indikácie trepanobiopsie	36
Tabuľka 4 Prístrojové spracovanie trepanobiopsie	42
Tabuľka 5 Zalievanie do parafínu - výhody a nevýhody	43
Tabuľka 6 Časový harmonogram spracovania trepanobiopsie	49
Tabuľka 7 Farbenie Hematoxylín-eozín	57
Tabuľka 8 Farbenie Periodic Acid Schiff	58
Tabuľka 9 Farbenie Perlsova reakcia	59
Tabuľka 10 Farbenie Gömöri	60
Tabuľka 11 Farbenie Giemsa	62
Tabuľka 12 Farbenie chlóracetáttesteráza	63
Tabuľka 13 Vybrané diagnózy podľa MKCH-10	66
Tabuľka 14 Diferenciácia pacientov podľa pohlavia	67
Tabuľka 15 Veková diferenciácia pacientov	67
Tabuľka 16 Diferenciácie pacientov podľa dĺžky fixácie vzorky trepanobiopsie	68
Tabuľka 17 Charakteristika skúmaného súboru	70
Tabuľka 18 Hodnotenie skupiny C	72
Tabuľka 19 Hodnotenie skupiny D	73
Tabuľka 20 Súhrnné hodnotenie skupiny C a D	74

10. ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1 Fixačné roztoky	10
Obrázok 2 Bunky kostného tkaniva	22
Obrázok 3 Štruktúra kosti – endost a periost	23
Obrázok 4 Štruktúra spongióznej kosti.....	25
Obrázok 5 Štruktúra kompaktnej kosti.....	26
Obrázok 6 Kmeňové bunky kostnej drene.....	28
Obrázok 7 Cievne zásobenie KD	29
Obrázok 8 Distribúcia červenej kostnej drene v dlhej kosti v závislosti od veku	31
Obrázok 9 Výskyt jednotlivých typov kostnej drene v detstve a dospelosti	32
Obrázok 10 Jamshidi ihla.....	33
Obrázok 11 Preferované miesta odberu KD	35
Obrázok 12 Zhrnutie spracovania trepanobiopsie	46
Obrázok 13 Excidácia trepanobiopsie	51
Obrázok 14 Tkanivový procesor zn. Leica TP1020.....	52
Obrázok 15 Chladiaca plocha a zalievacia linka HistoStar	53
Obrázok 16 Mikrotóm zn. PMF 4004.....	54
Obrázok 17 Farbiaci automat zn. Shandon Varistain Gemini	56
Obrázok 18 Farbenia trepanobiopsie – reprezentatívny obrázok	64
Obrázok 19 Preparáty fixované 24 hodín zo skupiny C	75
Obrázok 20 Preparáty fixované 24 hodín zo skupiny D	76
Obrázok 21 Preparáty fixované 48 hodín zo skupiny C	77
Obrázok 22 Preparáty fixované 48 hodín zo skupiny D	78
Obrázok 23 Preparáty fixované > 48 hodín zo skupiny C.....	79
Obrázok 24 Preparáty fixované > 48 hodín zo skupiny D	80

11. ZOZNAM GRAFOV

Graf 1 Diferenciácia pacientov na základe diagnózy	66
Graf 2 Diferenciácia pacientov na základe veku a pohlavia.....	68
Graf 3 Diferenciácia pacientov na základe dĺžky fixácie	69

12. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BAIN, B. J. 2001a. Bone marrow aspiration, In: *Journal of Clinical Pathology*. Roč. 54, č. 9, s. 657-663. ISSN 1472-4146.
2. BAIN, B. J. 2001b. Bone marrow trephine biopsy. In: *Journal of Clinical Pathology*. Roč. 54, č. 10, s. 737-742. ISSN 1472-4146.
3. BAIN, B. J., D. M. CLARK, B. S. WILKINS. 2019. *Bone Marrow Pathology*. 5. vyd. Wiley Blackwell. ISBN: 978-1-1193-9889-9.
4. BALKO, J., Z. TONAR, I. VARGA a kol. 2016. *Memorix histologie*. 1. vyd. Praha: TRITON. ISBN 978-80-7553-009-7.
5. BIGA, L. M., S. DAWSON, A. HARWELL, R. HOPKINS, J. KAUFMANN, M. LEMASTER at al. 2022. *Anatomy & Physiology*. [online]. [cit. 2022-03-04]. Dostupné na internete: <https://open.oregonstate.education/aandp/chapter/6-3-bone-structure/>
6. BROWN, D. C, K. C. GATTER. 1993. The bone marrow trephine biopsy: a review of normal histology. In: *Histopathology*. Roč. 22, č. 5, s. 411-422. ISSN 1365-2559.
7. COTELINGAM, J. D. 2003. Bone marrow biopsy: interpretive guidelines for the surgical pathologist. In: *Advances in Anatomic Pathology*. Roč. 10, č. 1, s. 8-26. ISSN 1533-4031.
8. CRUMBIE, L. 2022. *Bone marrow histology* [online]. [cit. 2022-03-11]. Dostupné na internete: <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/histology-of-bone-marrow>
9. ČIHÁK, R. 2011. *Anatomie 1*. 3. vyd. Praha: Grada Publishing. ISBN: 978-80-247-3817-8.
10. ČÍŽKOVÁ, K. 2018. *Základy histochemických metod*. 1. vyd. Univerzita Palackého v Olomouci: Lékařská fakulta. ISBN: 978-80-244-5316-3.
11. DVOŘÁK, K. 2008. Histologické vyšetřovací metody v patologii, autopsie. In: *Základy histologických vyšetřovacích metod*. [online]. [cit. 2021-03-02]. Dostupné na internete: https://is.muni.cz/el/med/jaro2016/BLHM0422c/um/Zaklady_histopatologickych_vysetrovacich_metod.pdf
12. DVOŘÁKOVÁ, Z., 2008. Histopatologické barvicí metody. In: *Základy histopatologických vyšetřovacích metod* [online].[cit. 2021-12-17]. Dostupné na internete: https://is.muni.cz/el/med/jaro2016/BLHM0422c/um/Zaklady_histopatologickych_vysetrovacich_metod.pdf
13. ELTOUM, I., J. FREDENBURGH, R. B. MYERS, W. E. GRIZZLE.2001. Introduction to the Theory and Practice of Fixation of Tissues. In: *Journal of Histotechnology*. Roč. 24, č. 3, s. 173-190. ISSN: 2046-0236.

14. FRISCH, B., R. BARTL. 1999. *Biopsy Interpretation of Bone and Bone Marrow*. 2. vyd. Hodder Education Publishers. ISBN: 978-0-340-74089-2.
15. GEORGE, T. I., D. A. ARBER. 2018. *Atlas of Bone Marrow Pathology. Atlas of Anatomic Pathology*. 1.vyd. USA: Springer Science + Business Media. ISBN: 978-1-4939-7469-6.
16. GRINDEM, C. B. 1989. Bone marrow biopsy and evaluation. In: *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. Roč. 19, č. 4, s. 669-696. ISSN: 1878-1306.
17. JAIN, A., 2017. *Fixatives* [online]. [cit. 2021-12-04]. Dostupné na internete: <https://www.slideshare.net/AseemJain8/fixatives-79370986>
18. JUNQUEIRA, L. C., J. CARNEIRO, R. O. KELLEY. 1997. *Základy histologie*. 1. vyd. Jinočany: H&H. ISBN 80-85787-37-7.
19. KAUR, K. 2016. *Processing of bone marrow trephine biopsy*. [online]. [cit. 2022-02-24]. Dostupné na internete: <https://www.slideshare.net/kanwalpreet15/processing-of-bone-marrow-trephine-biopsy>
20. KOCIANOVÁ, Z., M. ADAMKOV, S. DRAHOŠOVÁ. 2018. Odber a fixácia materiálu určeného na histologické vyšetrenie. In: *Nové trendy a perspektívy v histológii IV*. Martin: Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine. s. 72-75. ISBN: 978-80-8187-047-7.
21. KONRÁDOVÁ, V., J. UHLÍK, L. VAJNER. 2000. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H. ISBN: 80-86022-80-3.
22. KYSELOVIČ, J. 2015. Kostné tkanivo – kosť. In: *Anatómia a fyziológia: teoretické a praktické návody na cvičenia pre farmaceutov*. Bratislava: Univerzita Komenského Bratislava, Farmaceutická fakulta, s. 22-31. ISBN: 978-80-223-3944-5.
23. LEE, S. H., W. N. EBER, A. PORWIT, M. TOMONAGA, L. C. PETERSON. 2008. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. In: *International Journal of Laboratory Hematology*. Roč. 30, č. 5, s. 349-364. ISSN: 1751-5521.
24. LUKÁŠ, Z., 2008. Histochemické metody v bioptické diagnostice. In: *Základy histologických vyšetřovacích metod*. [online]. [cit. 2021-12-17]. Dostupné na internete: https://is.muni.cz/el/med/jaro2016/BLHM0422c/um/Zaklady_histopatologických_vyšetřovacích_metod.pdf
25. MALEMPATI, S., S. JOSHI, S. LAI, D. A. V BRANER, K. TEGTMEYER. 2009. Bone marrow aspiration and biopsy. In: *The New England Journal of Medicine*. Roč. 361, č. 15. s. 28-30. ISSN 1533-4406.

26. MCLARNON, A. 2022. *Bone marrow*. [online]. [cit. 2022-02-07]. Dostupné na internete: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/organs-and-tissues/bone-marrow>
27. MEGÍAS, M., P. MOLIST, MA. POMBAL. 2022a. Histological techniques. Fixatives In: *Atlas of plant and animal histology*. [online]. [cit. 2021-11-24]. Dostupné na internete: <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/6-tecnicas/2-fijadores.php>
28. MOHAN, H. 2007. *Pathology Practical Book*. 2. vyd. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. ISBN: 81-8061-905-2.
29. NCZI. 2022a. *Nádory (C00 – D48)*. [online]. [cit. 2022-04-28]. Dostupné na internete: <https://data.nczisk.sk/old/infozz/mkch/mkch-10/cast0200.pdf>
30. NCZI. 2022b. *Choroby krvi a krvotvorných orgánov a daktoré poruchy imunitných mechanizmov (D50 – D89)*. [online]. [cit. 2022-04-28]. Dostupné na internete: <https://data.nczisk.sk/old/infozz/mkch/mkch-10/cast0300.pdf>
31. PORWIT, A., J. MCCULLUOGH, W. N. ERBER. 2011. *Blood and Bone Marrow Pathology*. 2. vyd. Londýn: Churchill Livingstone Elsevier. ISBN: 978-0-7020-3147-2.
32. ROLLS, G., 2022. *Fixation and Fixatives – Popular Fixative Solutions* [online]. [cit. 2021-11-23]. Dostupné na internete: <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/fixation-and-fixatives-4-popular-fixative-solutions/>
33. ROSS, M. H., W. PAWLINA. 2015. *Histology. A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*. 7. vyd. Lippincott Williams & Wilkins. ISBN: 978-1-4511-8742-7.
34. SUNDARA RAO, B. S., N. MOHAN RAO, V. SHANTHI. 2022. *Fixation* [online]. [cit. 2021-12-18]. Dostupné na internete: <http://www.histopathology.guru/academics/post-graduate-academics/fixation/>
35. SUVARNA, K. S., CH. LAYTON, J. D. BANCROFT. 2013. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 7. vyd. Londýn: Churchill Livingstone Elsevier. ISBN: 978-0-7020-5032-9.
36. ŠPP.01.01, 2016. *BIOPSIA: štandardný pracovný postup*. 5. vyd. Prešov: Klinická patológia Prešov, s. r. o.
37. ŠPP.01.02, 2017. *BIOPSIA – Histochemické a špeciálne farbiace metódy: štandardný pracovný postup*. 5. vyd. Prešov: Klinická patológia Prešov, s. r. o.
38. TICHÝ, F., D. HORKÝ, I. KOCIÁNOVÁ, A. GOROŠOVÁ. 2000. *Histologie – Cytologie a obecná histologie*. 1. vyd. Brno: Ediční středisko Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. ISBN: 80-85114-86-0.

39. TRAVLOS, G. S. 2006. Normal structure, function, and histology of bone marrow. In: *Toxicologic Pathology*. Roč. 34, č. 5, s. 548-565. ISSN 1533-1601.
40. TREJO-AYALA, R. A., M. LUNA-PÉREZ, M. GUTIÉRREZ-ROMERO, J. COLLAZO-JALOMA, M.C. CEDILLO-PÉREZ, C. O. RAMOS-PEÑAFIEL. 2015. Bone marrow aspiration and biopsy. Technique and considerations. In: *Revista Médica Del Hospital General De México*. Roč. 78, č. 4, s. 196-201. ISSN: 0185-1063.
41. VACEK, Z. 1995. *Histologie a histologická technika. Histologie I. část*. 1. vyd. Brno: Istitut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN: 80-7013-201-9.
42. VACEK, Z., 1996. *Histologie a histologická technika. Histologická technika II. část*. 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-202-7.
43. VÖHRINGER, M. 2016. Die Knochenmarkpunktion. In: *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. Roč. 141, č. 6, s. 410-413. ISSN: 1439-4413.
44. WILKINS, B. S., D. M. CLARK. 2009. Making the most of bone marrow trephine biopsy. In: *Histopathology*. Roč. 55, č. 6, s. 631-640. ISSN 1365-2559.