

Uvod:

Da bi se odgovarajuće pristupilo liječenju bolesnika sa bubrežnim bolestima često je potrebno napraviti patohistološku obradu. Za to nam je nužna biopsija bubrega kojom dobivamo 1-4 cilindra tkiva. Patohistološka dijagnostika biopsije bubrega obuhvaća analizu svjetlosnim mikroskopom (SM), imunofluorescentnu analizu (IF), te elektronsku mikroskopiju (EM).



slika 1 primjer raspodjele materijala biopsije bubrega

Elektronskim mikroskopom postižu se povećanja veća nego svjetlosnim (do 10000x) te se mogu vizualizirati promjene na razini ultrastrukture tkiva.

To je moguće zahvaljujući fizikalnim svojstvima elektrona, koji imaju mnogo manju valnu dužinu od svjetlosti.



slika 2. elektronski mikroskop Zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb

Cilj:

Prikazati pripremu preparata biopsije bubrega za analizu elektronskim mikroskopom u laboratoriju Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb te kroz prikaz slučaja ukazati na njezino značenje u dijagnostici bubrežnih bolesti.

Metode:

Priprema uzoraka za ultrastrukturnu mikroskopiju odvija se kroz više faza a njezino trajanje je minimalno 7 dana.

1. Fiksacija - vrlo je bitna za očuvanje ultrastrukture tkiva - mješavina formalinskog i glutaraldehidnog fiksativa
2. Postfiksacija - osmijevi tetroksid - kontrastnost te stabilizacija lipidnih membrana na koje se taloži.
3. Dehidracija i prožimanje smolom - uzlazni niz acetona - istiskivanje vode iz tkiva i intermedij do uklapanja u epoksi smolu
4. Polimerizacija - stvrdnjivanje materijala u smoli - 3 dana u termostatu na 60°
5. Rezanje - prvo polutankih (orijentacijskih) rezova debljine 250-600 nm bojenih toluidinom, da bismo odredili koji dio preparata će ići dalje u obradu, a nakon toga ultratankih rezova debljine do 100 nm koji se hvataju na bakrene mrežice
6. Kontrastiranje mrežica - solima teških metala koje se talože na pojedine strukture stanica kako bi se postigla kontrastnost



slika. 3. ultratanki rezovi prilikom rezanja na ultramikrotomu



slika 4. ispiranje mrežica prilikom kontrastiranja

Zaključak:

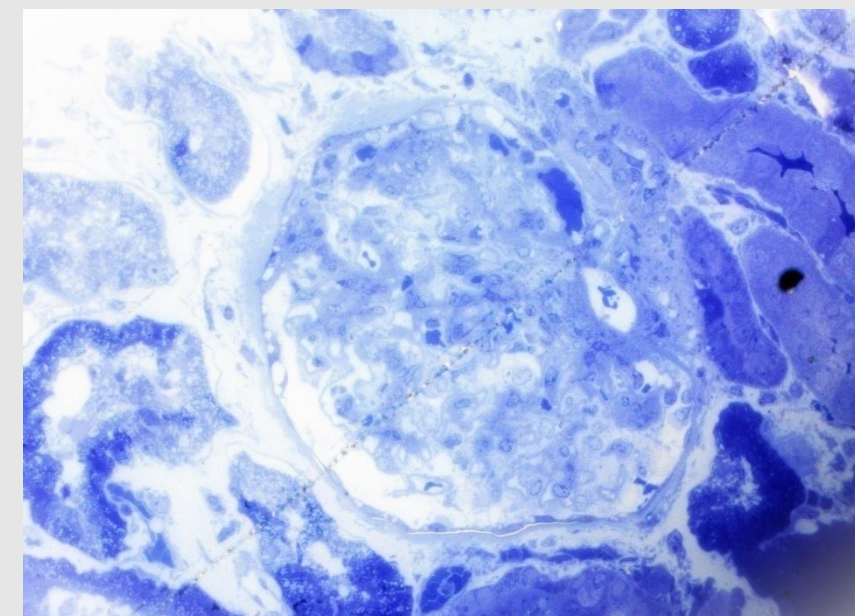
Elektronska mikroskopija je zahtjevna analiza zbog složenosti i dugotrajnosti pripreme uzoraka, što zahtjeva stručnost i osposobljenost histotehnologa u izradi i obradi materijala, kao i potrebe znanja patologa o radu sa elektronskim mikroskopom te stručnosti i educiranosti u području ultrastrukture tkiva. Unatoč svojoj zahtjevnosti elektronska mikroskopija nam daje uvide u ultrastrukturu tkiva biopsije bubrega koje nam ne daju druge metode te uz svjetlosnu mikroskopiju (SM), imunofluorescentnu analizu (IF) i u nekim slučajevima imunohistokemiju (IH) omogućuje postavljanje patohistološke dijagnoze.

Kako su kod dijela bubrežnih bolesti promjene na svjetlosnomikroskopskoj i imunofluorescentnoj analizi nespecifične, a dijagnoza se postavlja na osnovi ultrastrukturnih promjena, elektronska mikroskopija je i dalje važan i neizostavan dio patohistološke analize biopsije bubrega.

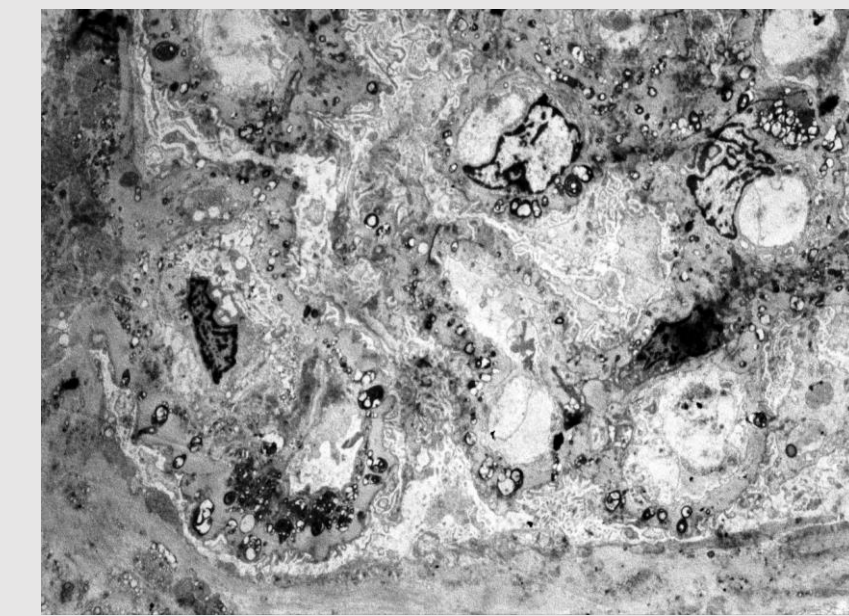
Rezultati:

Kroz protekle tri godine u našem Zavodu bilježimo stalni porast ukupnog broja uzoraka, kako i uzoraka biopsije bubrega koji su upućeni na analizu elektronskim mikroskopom.

Prikaz slučaja 38-godišnjeg muškog pacijenta s transplantiranim bubregom: na analizu su zaprimljena 4 cilindra tkiva bubrega duljine 0.4-0.9 cm, od kojih je jedan uzet za imunofluorescenciju (IF), sa svakog kraja preostala tri cilindra je uzet 1 komadić dužine 1 mm za elektronsku mikroskopiju (EM), a preostali materijal je obrađen po protokolu za svjetlosnu mikroskopiju (SM). Primljeni materijal za elektronsku mikroskopiju obrađivan je i uklopljen po našem standardnom protokolu. U primljenom materijalu na nivou svjetlosne mikroskopije (SM), nalaz je odgovarao graničnim promjenama suspektim na akutno odbacivanje posredovano T-limfocitima. Imunofluorescentna analiza (IF) je bila negativna, a ultrastrukturnom analizom (EM) nađeni su žarišni lipidni depoziti. Nalaz elektronske mikroskopije pokazao se značajnim jer je jedini ukazao na rani povrat osnovne bolesti (LCAT deficijencije).



slika 5. polutanki (toluidinski) rez – dio uzorka određen za daljnju obradu (povećanje 400x)



slika 6. ultratanki rez - glomerul s karakterističnim lipidnim depozitima (povećanje 2800x)

Literatura:

Praktikum iz patohistologije-grupa autora
Diagnostic Transmission Electron Microscopy of Tumors- Robert A. Erlandson

Ključne riječi:

Elektronska mikroskopija, biopsija bubrega