

MÓZG, RDZEŃ KRĘGOWY

DARIUSZ ADAMEK¹, WIESŁAWA GRAJKOWSKA²

¹Katedra Patomorfologii, *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

²Zakład Patologii, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie

1. Spis procedur chirurgicznych

- Biopsja mózgu i rdzenia
- Zabieg chirurgiczny

2. Biopsja mózgu lub rdzenia

2.1. Zalecenia dla lekarza wykonującego badanie biopsyjne

Materiał tkankowy pobierany jest z mózgu lub rdzenia drogą biopsji otwartej, a w przypadku mózgu także stereotaktycznej bądź endoskopowej. Wymagana jest informacja o liczbie i miejscu pobranych wycinków oraz o obrazie radiologicznym (skierowanie winno zawierać wszystkie istotne dane kliniczne, w szczególności główne manifestacje choroby i czas, jaki upłynął od chwili pojawienia się pierwszych objawów, które można przypisać diagnozowanej zmianie w mózgu lub rdzeniu, jak również wyniki badań neuroobrazowych w postaci opisu radiologa oraz kopii badań na płytach CD lub wydrukach).

Wycinki pobrane drogą biopsji stereotaktycznej, jeśli pochodzą z różnych topograficznie punktów pobrania, powinny być przysłane w osobnych naczyniach wraz z opisem miejsca ich pobrania. Jeśli biopaty tworzą ciąg wzdłuż trajektorii wyznaczonej przez igłę biopsyjną, powinny być przysłane w konsekwentnie ponumerowanych naczyniach. Jeśli jest możliwość wykonania doraźnej diagnostyki („intry”), jest konieczne, aby materiał biopsyjny był przekazywany do zakładu lub pracowni neuropatologii bez utrwalenia, niezwłocznie po jego pobraniu na świeżo, tj. bez utrwalenia. W przypadku gdy nie ma takiej możliwości, materiał biopsyjny należy utrwalić w sposób, jak opisano poniżej.

2.2. Postępowanie z materiałem tkankowym

Dopuszczalne jest stosowanie techniki rozmazowej do celów zarówno doraźnej („introwej”) wstępnej oceny biopatów, jak i do wykonania potrzebnych odczynów immunohistochemicznych, jednak wyłącz-

nie przy założeniu, że przynajmniej połowa materiału zostanie przeprowadzona do bloczków parafinowych.

Drobne wycinki umieszczane są bezpośrednio w utrwalaczu, materiał większy może być przysłany na świeżo w celu zabezpieczenia części materiału do badań molekularnych, jednak decyzje zawsze podejmuje patolog lub neuropatolog (biorąc pod uwagę z oczywistych powodów bardzo małą ilość materiału biopsyjnego, poświęcenie nawet niewielkiej jego części na badania molekularne jest usprawiedliwione jedynie wtedy, gdy nie utrudni to ustalenia rozpoznania histopatologicznego).

Materiał należy utrwalić w 10-procentowym wodnym roztworze zbuforowanej formaliny. Czas utrwalania wynosi maksymalnie 24–48 godzin. Wycinki do badań molekularnych umieszczane są w ciekłym azocie i następnie przechowywane w zamrażarce niskotemperaturowej. Próbkę można umieścić również w „RNA-later™”.

2.3. Zatapianie materiału biopsyjnego w bloczkach parafinowych i skrawanie bloczków

W procesie zatapiania w parafinie: wycinek z biopatu należy ułożyć wzdłuż długiej osi.

Krojenie skrawków powinno się odbywać metodą trymowania bloczka w celu uzyskania przekrojów na różnej głębokości pobranego materiału.

2.4. Rutynowe barwienie skrawków

Zalecane barwienia, reakcje immunohistochemiczne i badania molekularne:

- podstawowe: hematoksylina i eozyna;
- barwienia specjalne (PAS, mucikarmin, Kluver-Barrera, Perdrau, barwienia używane w celu identyfikacji różnych typów złożeń czy drobnoustrojów);
- reakcje immunohistochemiczne: GFAP, synaptofizyna, NF, NeuN, S-100, CD34, CD56, IDH1, Olig1, cytokeratyny, Ki67 lub inne panele w zależności od rodzaju zmiany (przerzut, chłoniak, inne);
- badania molekularne: delecja 1p19q, amplifikacja N-myc, C-myc, mutacje IDH1 i IDH2, metylacja promotora genu *MGMT*, określenie grup transkrypcyjnych rdzeniaków.

3. Zasady opracowania materiału pooperacyjnego

3.1. Zalecenia dla neurochirurga

Materiał z operacji neurochirurgicznych w miarę możliwości powinien być przysłany do zakładu lub pracowni neuropatologii na świeżo (bez utrwalenia) i w całości. W przypadku gdy nie ma możliwości niezwłocznego dostarczenia materiału do laboratorium, winien on być utrwalony w 10-procentowym wodnym roztworze zbuforowanej formaliny.

3.2. Postępowanie z materiałem operacyjnym

Materiał z operacji neurochirurgicznych w miarę możliwości powinien być przysłany na świeżo.

Patolog lub neuropatolog po wstępnej ocenie otrzymanego materiału z operacji neurochirurgicznej w pierwszej kolejności zabezpiecza wycinki tkankowe do badań molekularnych. Wycinki te mogą być użyte do badań molekularnych dopiero po dokonaniu pełnego ostatecznego rozpoznania histopatologicznego. W przypadku materiału o dużej objętości dokonuje się wstępnego rozcięcia większych kawałków i zapewnia optymalne warunki utrwalenia, w tym naczynie odpowiedniej wielkości ze standardowym utrwalczem formalinowym (10-procentowy roztwór zbuforowanej formaliny). Czas utrwalania wynosi 24–48 godzin.

3.3. Ocena makroskopowa materiału operacyjnego

Materiał z operacji neurochirurgicznych jest w większości przypadków znacznie pofragmentowany i rzadko pozwala na topograficzną orientację operowanej zmiany. Przypadki, w których istotna jest właściwa ocena i opis topograficzny materiału, to resekcje padaczkorodnych zmian kory mózgowej, w których istotne jest dokonanie dokładnego opisu wyciętej zmiany oraz pobranie jej do bloczków parafinowych w taki sposób, aby można było uzyskiwać na skrawkach przekroje w płaszczyźnie prostopadłej do powierzchni kory mózgowej. Ocena marginesów resekcji jest wymagana tylko w przypadku guzów osłonek nerwów, o ile zostały usunięte w jednym bloku, lub tkanek otaczających resekowane guzy opon.

Makroskopowy opis materiału powinien zawierać dane dotyczące:

- ilości: do 5 fragmentów ich liczba powinna być podana dokładnie; powyżej wystarczy określenie: „liczne”;
- wielkość – największy rozmiar największego (jeśli więcej niż 1) w centymetrach lub milimetrach; ogólna oszacowana objętość w centymetrach lub milimetrach sześciennych;
- najważniejszych dostrzegalnych makroskopowo cech (np. obfita treść krwawa) lub szczegółów anatomicznych (np. obecność opony twardej towarzyszącej oponiakowi, kości itp.).

3.4. Pobieranie wycinków

Poza szczególnie dużymi oponiakami i zmianami kostnymi lub obejmującymi kość, zasadą powinno być pobranie i przeprowadzenie do bloczków parafinowych całego materiału z operacji neurochirurgicznych, w tym również treści krwawiaków, ponieważ często znajdują się w niej „ukryte” naczyniowe zmiany malformacyjne albo nacieki nowotworowe (krwotok do nowotworu jest dość częstym zjawiskiem, a niekiedy nawet ujawniającym obecność guza mózgu). Wszystkie operowane zmiany o relatywnie dużych rozmiarach, tzn. duże oponiaki lub resekcje znacznej części płata mózgu, które mogą się zmieścić w 8 standardowych bloczkach parafinowych (kasetkach), powinny być pobrane i przeprowadzone do parafiny w całości. Jeśli materiał jest większy, niż można w sposób właściwy umieścić w 8 bloczkach, należy dokonać selekcji, pomijając np. strefy martwicy lub krwotoku. **Limit 8 bloczków nie dotyczy materiałów osobno przysyłanych i opisywanych na skierowaniu oraz w szczególności materiałów obejmujących liczne drobne fragmenty tkanek, a także w przypadkach, gdy w całym pobranym do 8 bloczków materiale jest wyłącznie lub niemal wyłącznie treść krwawa lub martwicza, lub tkanka mózgu histologicznie w granicach normy.** Materiały średniej wielkości (łączna objętość ok. 0,5–4 cm³) powinny być zainicjowane w całości w 3–5 bloczkach parafinowych.

Minimalna liczba wycinków, którą patolog jest **obowiązany** pobrać w ramach niniejszej procedury, wynosi:

- dla mikromateriału biopsyjnego – 2,
- dla materiału operacyjnego średniej wielkości (0,5 do 4 cm³) – 3,
- dla większych materiałów – 6.

3.5. Barwienia podstawowe, histochemiczne, immunohistochemiczne i molekularne

Ze wszystkich pobranych materiałów wykonuje się preparaty barwione hematoksyliną i eozyną. Barwienia specjalne, w tym w szczególności immunohistochemiczne (IHC), wykonuje się na skrawkach z wybranych bloczków parafinowych.

Zalecane reakcje IHC i badania molekularne:

- reakcje immunohistochemiczne (jak również barwienia specjalne) jak w punkcie 2.4,
- skąpodrzewiaki: badanie utraty heterozygotyczności LOH 1p/19q,
- glejaki: status promotora genu *MGMT*,
- gruczolaki przysadki: obligatoryjnie profil immunokspresji hormonów,
- przerzuty – panele reakcji immunohistochemicznych,
- immunokspresja zmutowanego produktu genu *IDH1* (wspomagająca różnicowanie gwiaździstaka i gliozy odczynowej).