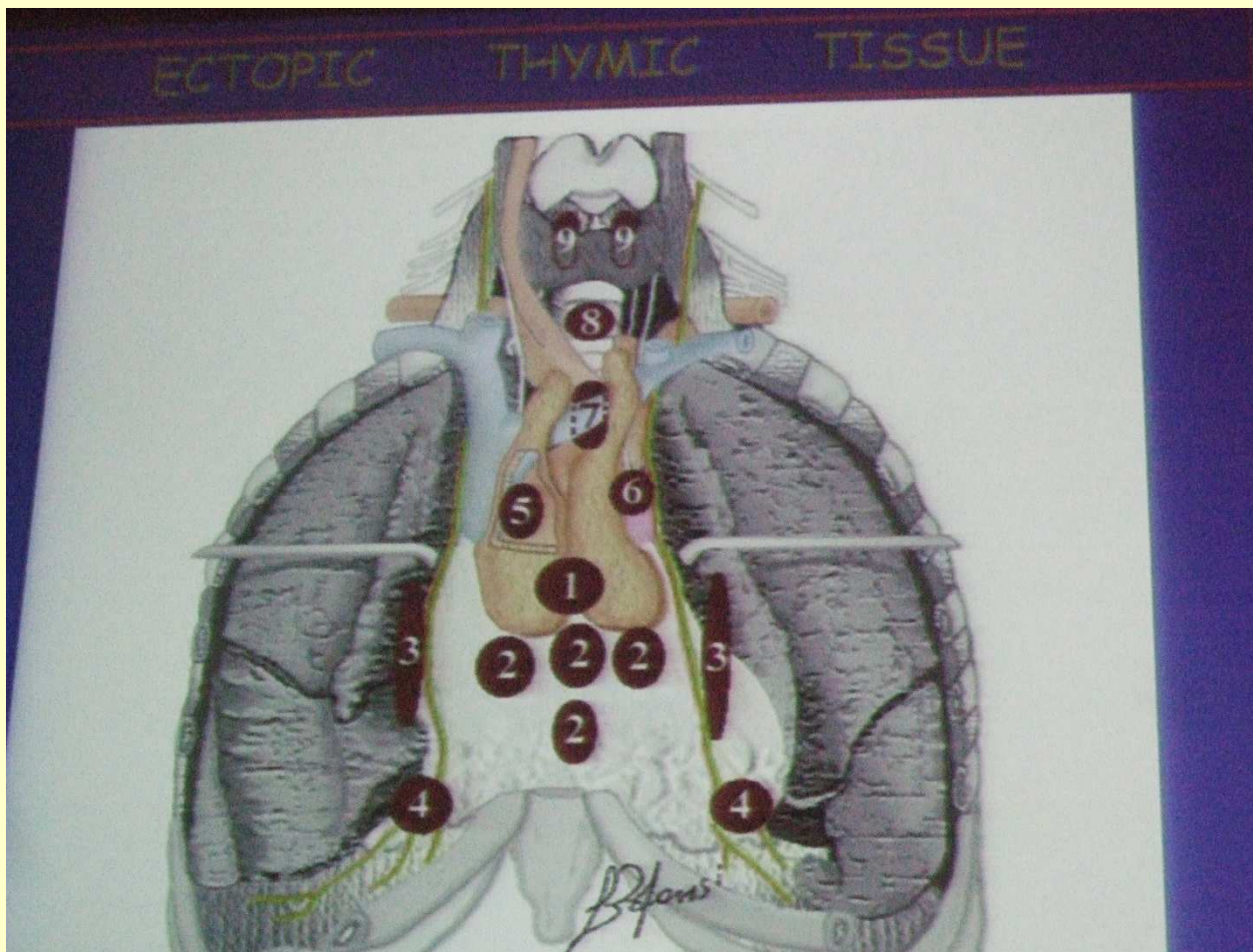


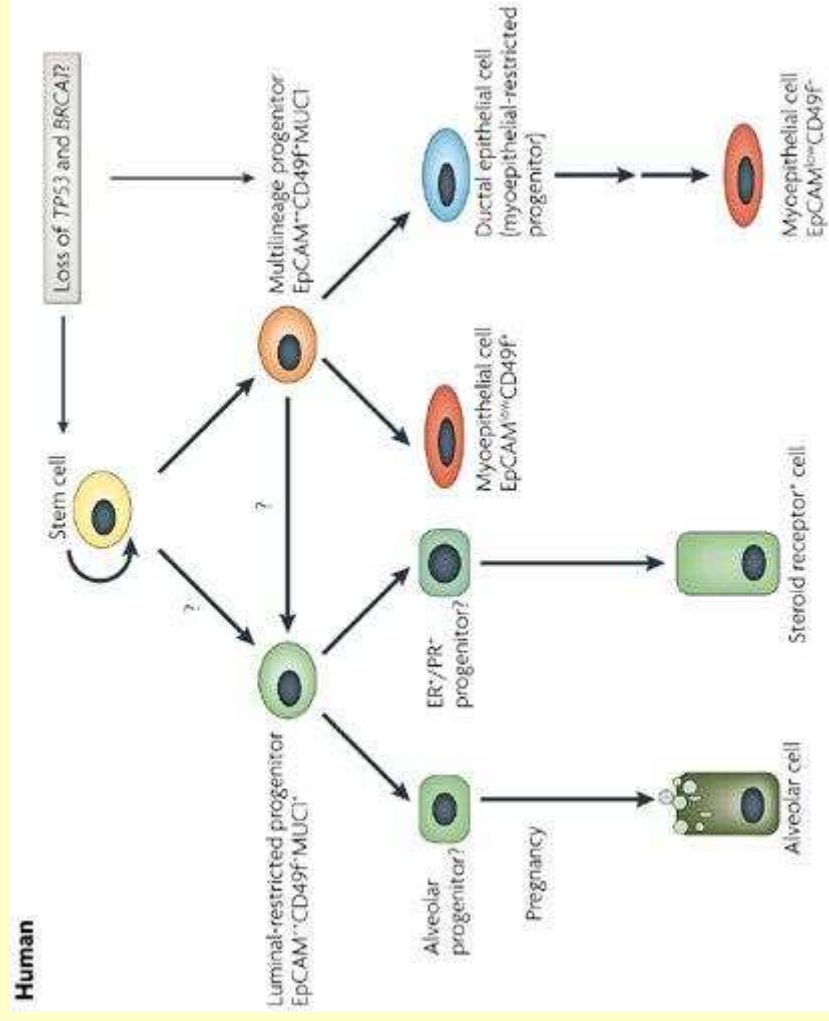
Методи в патологията
Роля на патолога за
туморната диагностика

Конвенционална диагностика на туморите

- **Признаци и симптоми на солидните тумори**
 - **Палпаторна подутина, болка**
 - **Повишена температура, умора, повишение или загуба на телесно тегло**
 - **Нарушен метаболизъм**
- **Лабораторни тестове –туморни маркери –PSA, CA 15-3, AFP .**
- **Образна диагностика: X-Ray, CT, MRI, PET.**
- **Златен стандарт-диагностични патологични методи.**

Ектопична тимусна тъкан

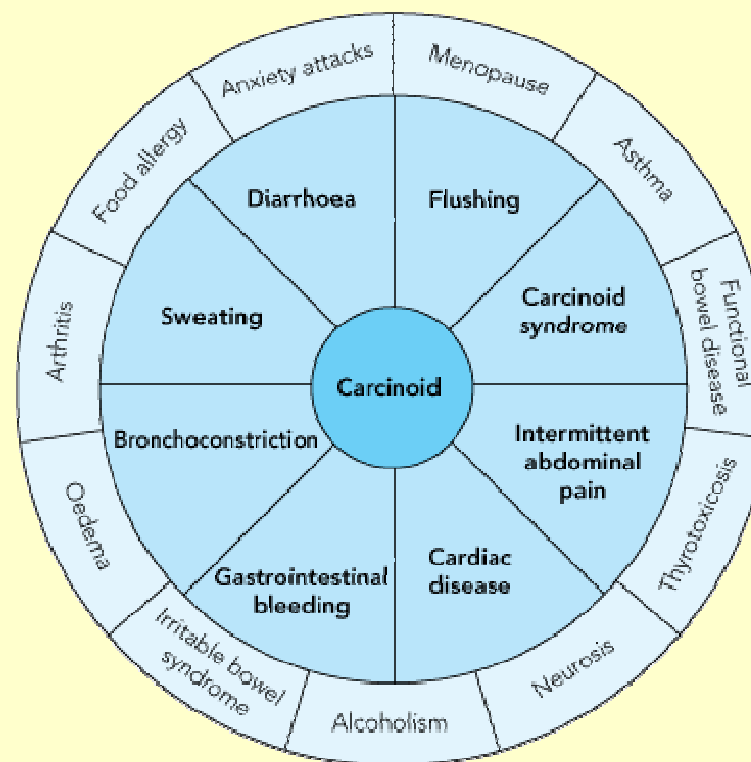




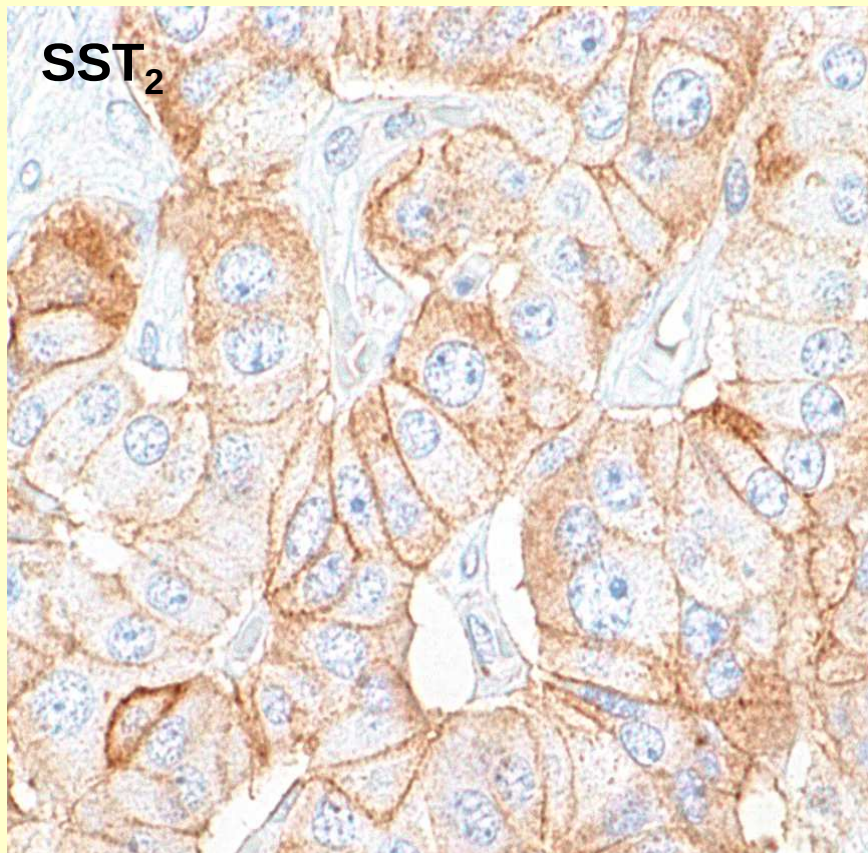
Симптоми на НЕТ- С карциноиден синдром (10%)

без карциноиден синдром (90% от туморите)

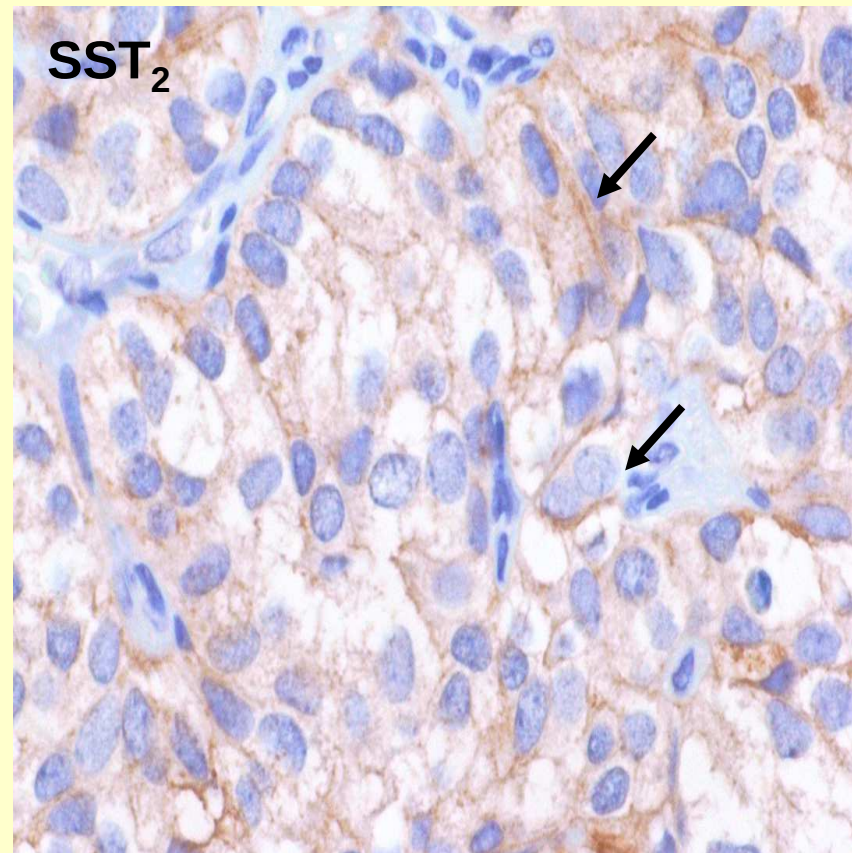
- Продуциращите серотонин (5-НТ), и биогенни амини тумори имат следната симптоматика:
- Зачервяване
- Диария или усилена перисталтика
- Загуба на тегло или надебеляване
- Сърдечни палпитации
- Конгестивна сърдечна недостатъчност
- Астма
- Акромегалия
- Cushing's syndrome



Експресия на соматостатинови рецептори в НЕТ от нивото им зависи успеха на PRRT

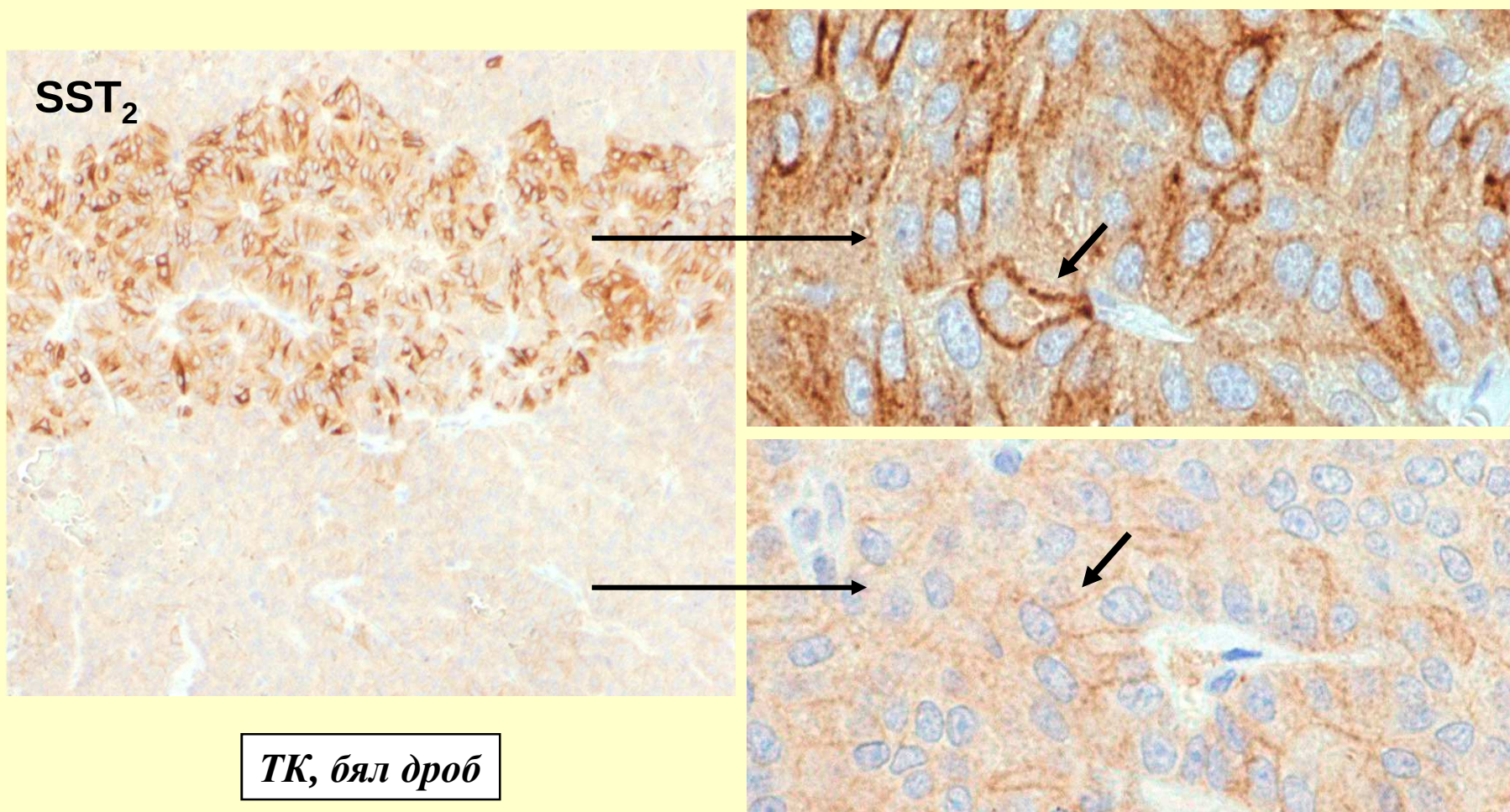


Pancreas, NF tumor

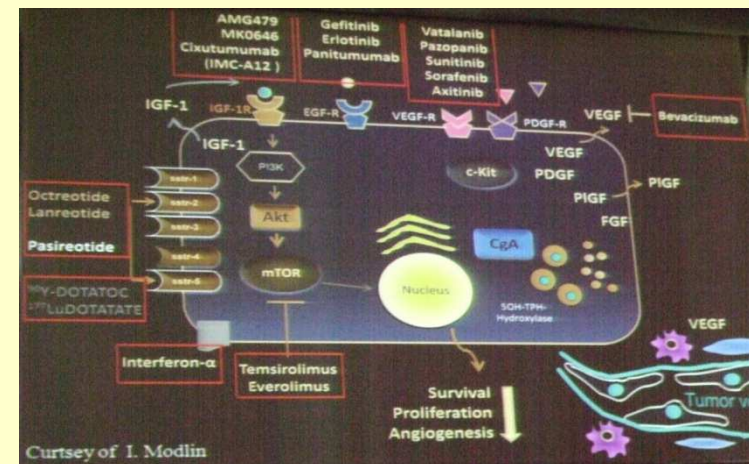
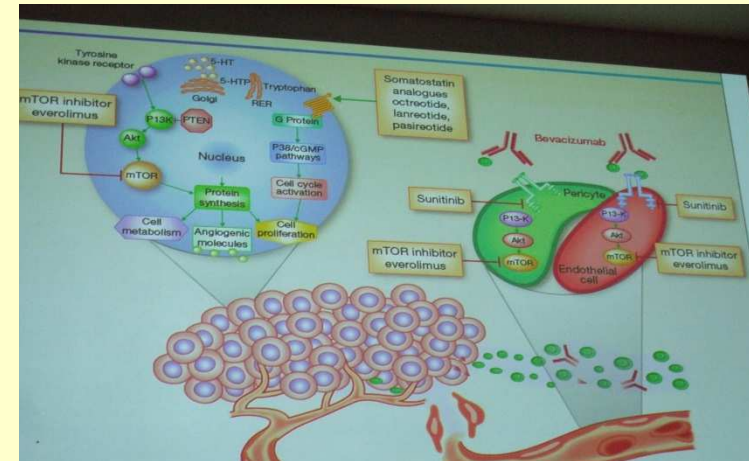


Pancreas, malignant insulinoma

80% от типичните карциноиди експресират somatostatin рецептори SST2 и somatostatin рецептор сцинтиграфията е информативна



- НЕТ са хетерогенни неоплазми, възникващи от pluripotent stem cells, синтезиращи биогенни амини и пептиди.
- Новата молекулярно таргетна терапия използва характеристиките им-наличие на соматостатинови и ТК рецептори, пептиди и много добра васкуларизация
- **Serotonin**- метаболичен път за диагноза и лечение- отговорен за клиниката на НЕТ заболяване
- **SSA**(октапептиди)-висок афинитет към SSR 2 и 5
- **PRRT**-пептид рецепторна радионуклеонидна терапия – комбинация от SSA + радиоизотопи $^{111}\text{Indium}$, $^{90}\text{Yttrium}$, $^{177}\text{Lutetium}$



Диагностично уточняване на НЕТ

Лабораторни тестове

Общи маркери:

- Хромогранини
- Неврон-специфична енолаза

Специфични маркери:

- 5-хидрокси-индол-оцетна киселина и др.

Образни изследвания

Компютърна и Магнитно-резонансна томография

Функционални образни изследвания:

- Соматостатин-рецепторна сцинтиграфия
- Позитронноемисионна томография
- Хибридни образни методи

Ендоскопски изследвания и други подходи:

- Бронхоскопия
- Медиастиноскопия
- Видео-асистирана торакоскопия

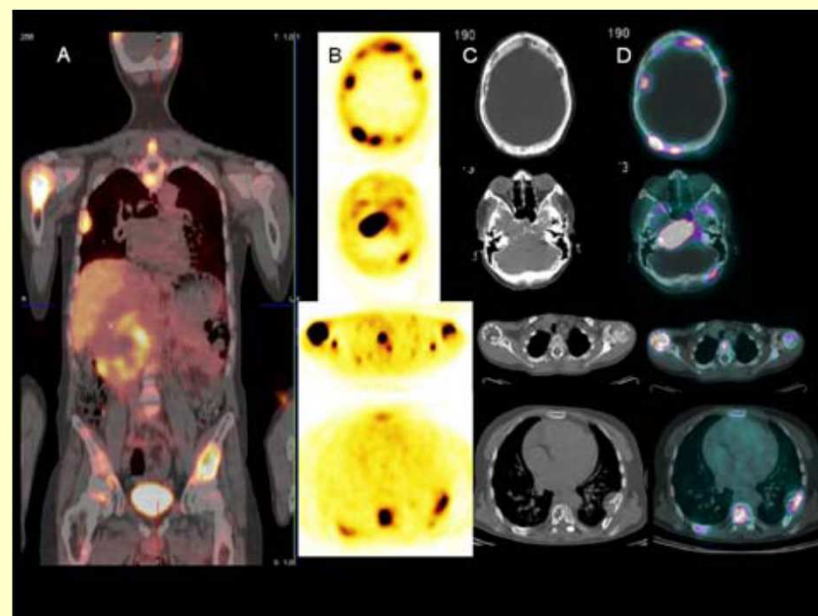
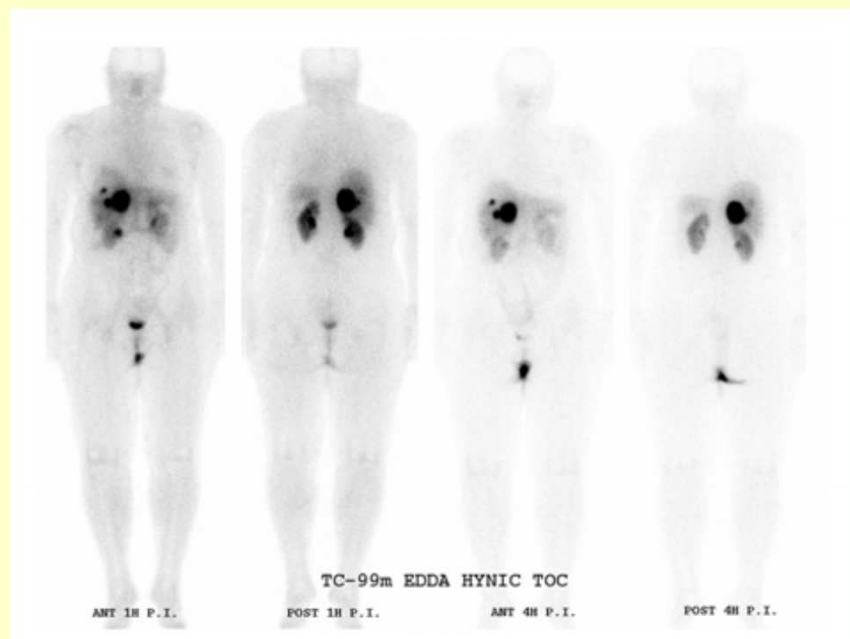
Клинико-морфологични методи за диагностика

Цитологично изследване

Биопсия-в зависимост от локализацията на тумора

Патоморфологично изследване на резециран тумор или метастаза, митотичен индекс

Имунохистохимични изследвания (Ki67, и НЕ маркери)



P 68Ga DOTA-NOC receptor PET/CT ET/CT 24 год пациент с paraganglioma остеолитични лезии на хумерус, ребра и череп

Методи на диагностичната патология

- Класически методи
- Аутопсия
 - Цитологична диагноза: Тънкоиглена аспирационна биопсия
 - Абразивна цитология
 - Ексфолиативна цитология
 - Хистологична диагноза : Биопсия или ексцизия
 - Интраоперативна диагностика –гефрир.
 - Хистохимия
 - Имунохистохимия
 - Електронна микроскопия
- Модерни технологии
 - Молекулярни биологични методи
 - Дигитална патология и телепатология
 - Генно секвениране

Методи на диагностичната патология

Класически методи

- Аутопсия

*The Anatomy Lesson of
Dr. Nicolaes Tulp 1632*



АУТОПСИЯ

„Hic locus est ubi mors gaudet succurrere vitae.“

„Това е мястото, където смъртта с радост помага на живота.“

Основните цели на аутопсията са:

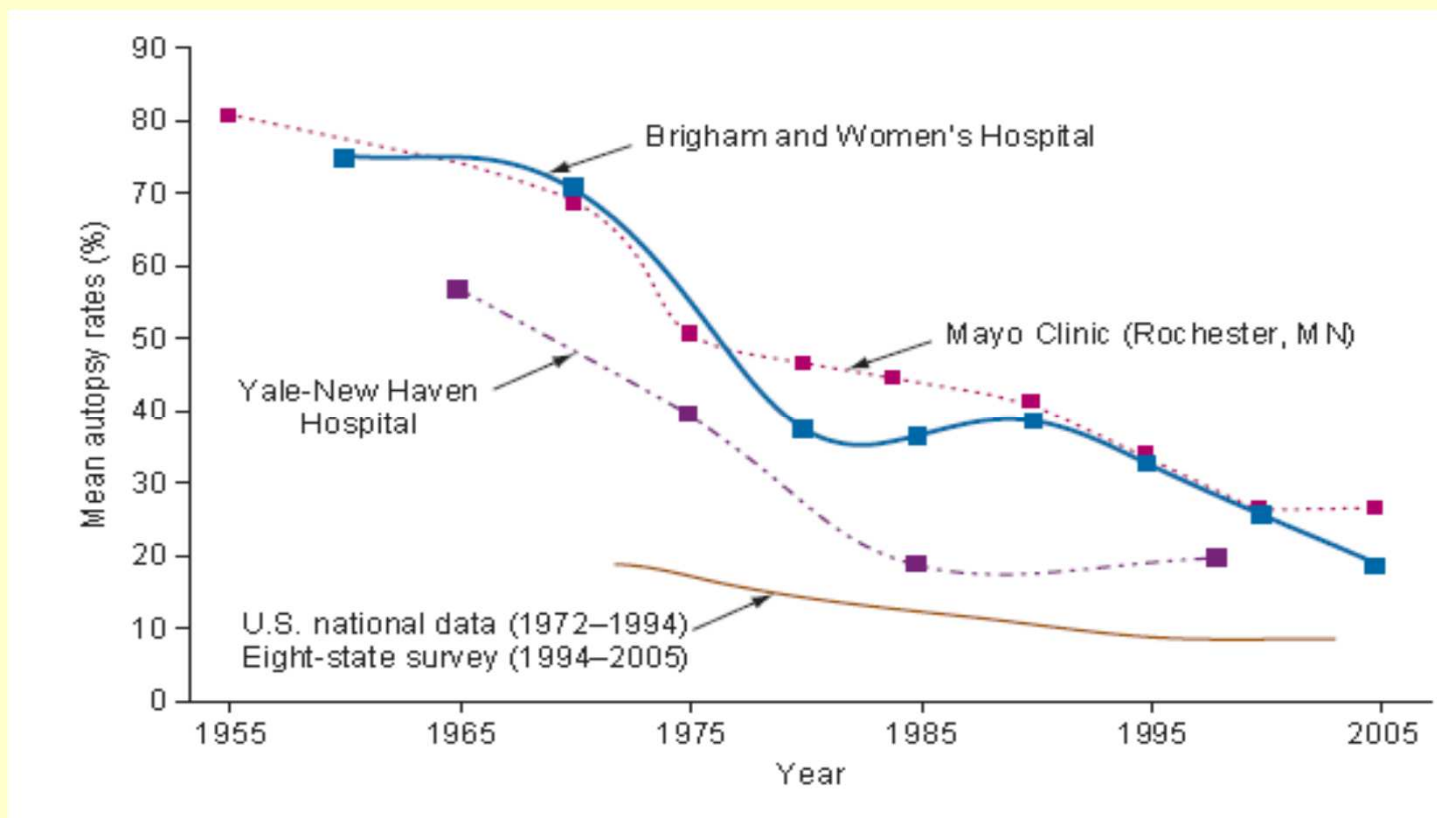
1. Осигуряване на качествена диагностика на пациентите чрез:

- Потвърждаване на причините за смъртта
- Създаване на окончателната диагноза
- Оценка на терапевтичния отговор към лечението

2. Обучение и контрол на диагностичната работа в клиничните звена чрез :

- аутопсионно диагностициране на често пропусками заболявания
- откриване на нови заболявания
- демографско и епидемиологично проучване на болестите
- обучение на лекари и студенти

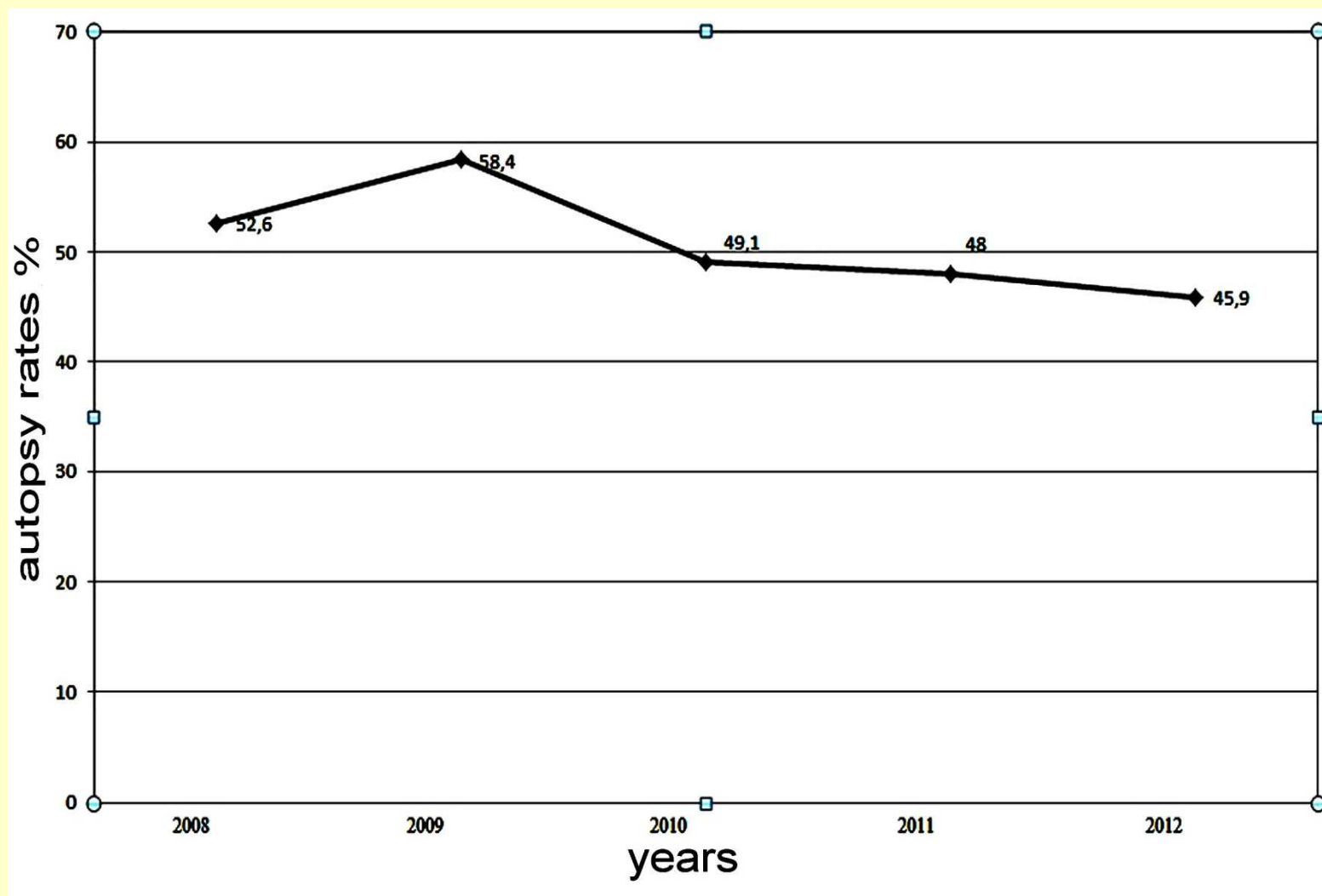
Намаляване на процента на аутопсии



Намаляването на процента аутопсии днес се дължи на :

1. Подобрена диагностика благодарение на напредъка в образните технологии - СТ, MRI, PET, ангиография и т.н.
2. Избягване на юридическа отговорност при лекарска грешка.

Намаляване на процента аутопсии Университетска болница Плевен



Виртопсия: виртуална аутопсия

- Постмортен свободен от скалпел 3D образ СТ 3,500 среза, ангиография
- Преди 10 години в Швейцария и Великобритания ЯМР и СТ
- Виртопсията доказва локализация на фрагменти от проектили
- вътрешно кървене, път на куршума, фрактури, газ емболия, аспирация на кръв, които трудно се доказват
- Не се увреждат тъкани за визуализации
- Религиозни причини
- По-обективна от обикновената аутопсия
- При новородени



Виртопсия

- Роля на виртопсията в съдебната медицина



Цитологична диагностика

- Цитопатологията включва диагностични методи, които се използват за изследване на клетки от различни локализации, за определяне на **причината или естеството на заболяването**.
- Първият важен отговор при неясен случай е:
ДД на *възпаление /неоплазия*
- Вторият важен отговор е:
доброкачествен или злокачествен
- Цитологични диагностични методи:
- Тънкоиглена аспирационна биопсия
- Абразивна цитология
- Ексфолиативна цитология

Методи на диагностичната патология

- Класически методи
- Аутопсия
 - Цитологична диагноза:Тънкоиглена аспирационна биопсия
Абразивна цитология
Ексфолиативна цитология
 - Хистологична диагноза :Биопсия или ексцизия
Интраоперативна диагностика –гефрир.
Хистохимия
Имунохистохимия
Електронна микроскопия
- Модерни технологии
 - Молекулярни биологични методи
 - Дигитална патология и телепатология
 - Генно секвениране

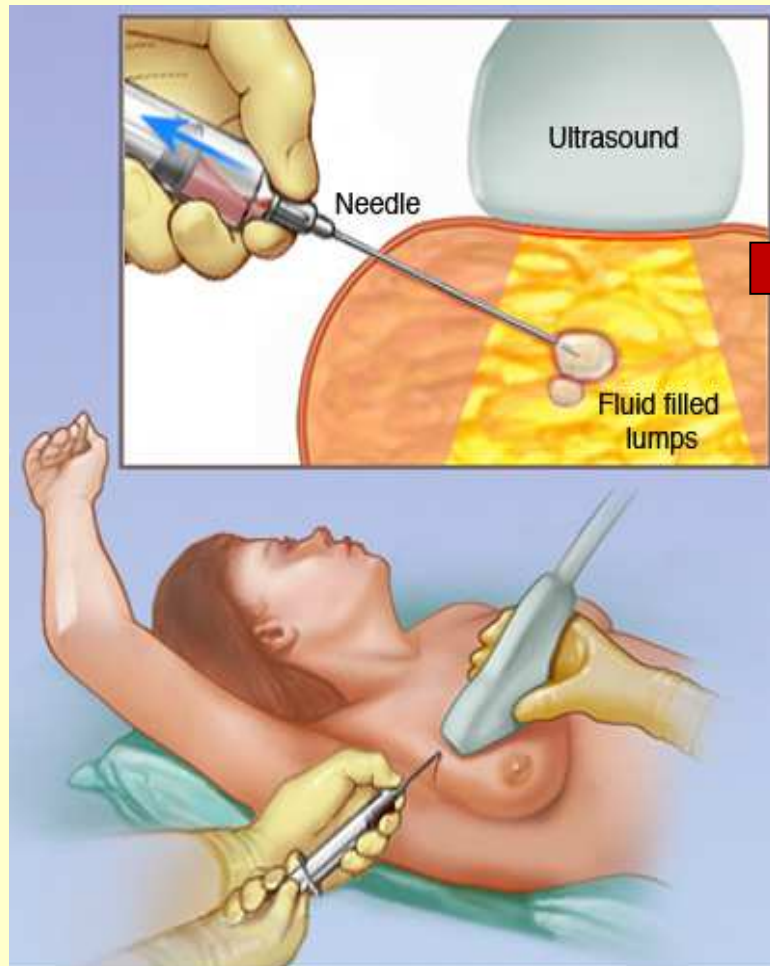
383 години по-късно-анатомо-генетичен урок...



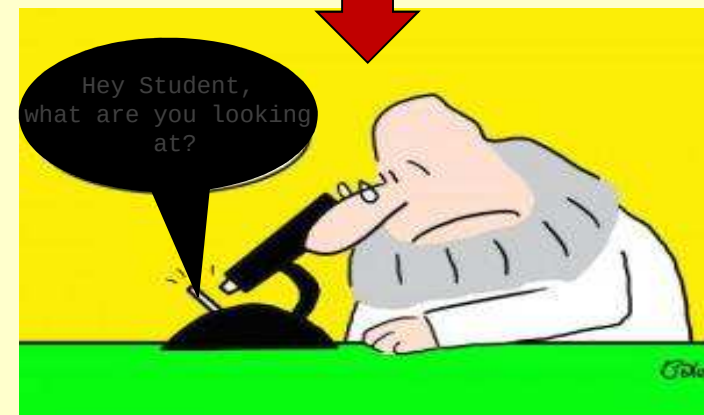
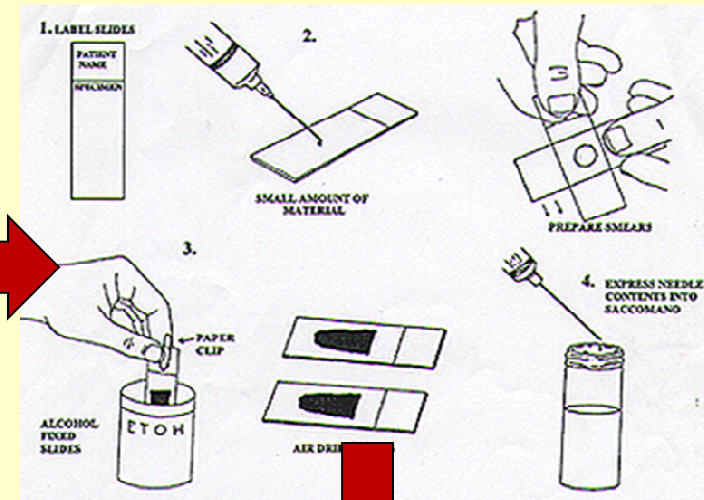
Тънкоиглена аспирационна биопсия-ТАБ

- Тънкоиглена аспирационна биопсия се прилага при следните клинични състояния:
- Изследване на палпируем тумор
- Изследване на непалпируем тумор, открит чрез образна диагностика , ангажиране на лимфни възли.
- Изследване при съмнение за локален рецидив на карцином
- Преценка на кистични лезии с атипични характеристики.
- Потвърждаване на диагноза за злокачествен тумор,когато биопсията не е възможна или е противопоказана.
- ТАБ е бърз и евтин метод
- Диагнозата за малигненост се последва от предоперативно обсъждане на възможните терапевтични подходи.
- Процедура, щадяща пациента и добиваща материал за морфологично и молекулярно изследване

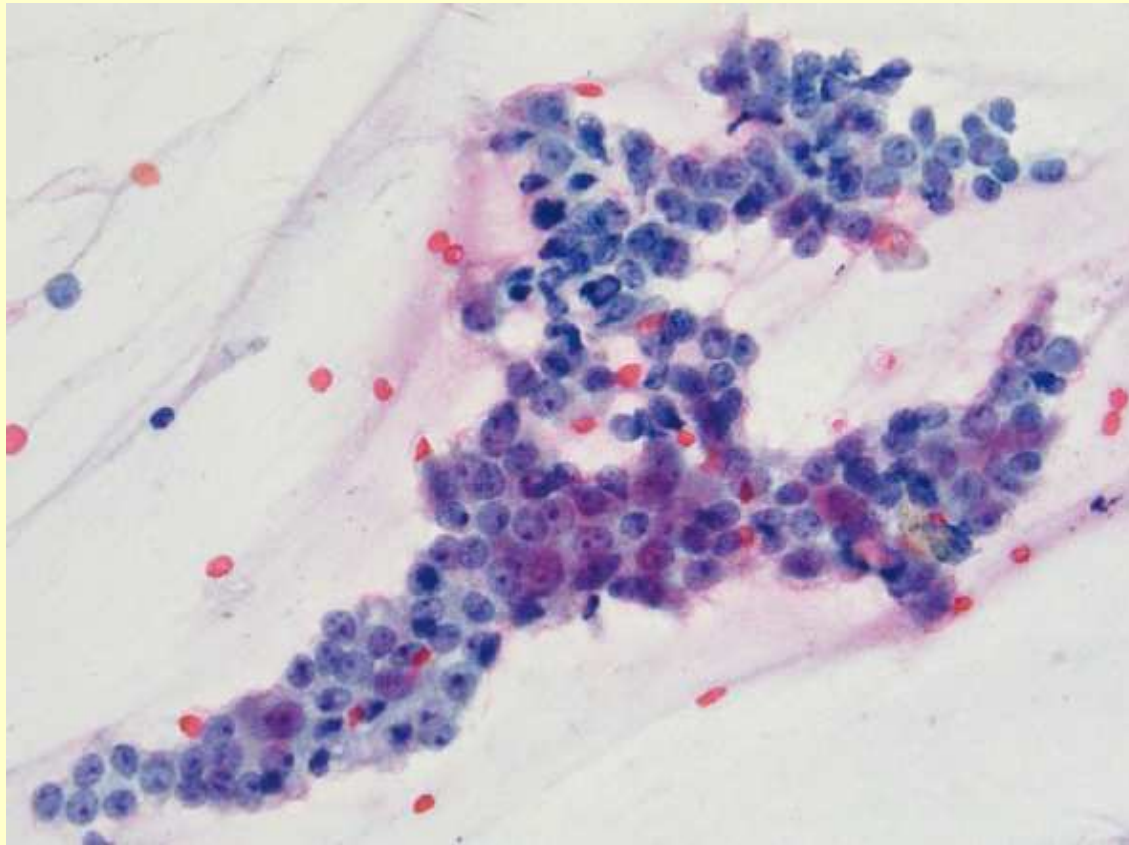
Тънкоиглена аспирационна биопсия



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.



Тънкоиглена аспирационна биопсия



•Fibroadenoma (FA). Обърнете внимание на ядрения атипизъм с проминентни нуклеоли. Плътноста на клетъчния клъстер на фона на единични биполярни клетки и оголени ядра са важни находки за избягване на свръхдиагностициран е на злокачествено заболяване (оцв.Раранicolaou).

Абразивна цитология

- Клетъчният материал се получава чрез остъргване на лезията (изкуствена механична десквамация).
- Цитонамазка или така наречения ПАП тест: извършва се със шпатула или четкова биопсия и позволява директно вземане на клетки от многослойният плосък епител на екзоцервикс и съседния ендоцервикален канал.
- Намазка от лигавицата на устната кухина.
- Кожно остъргване при различни лезии.
- Четковидни техники, чрез използване на ригидни ендоскопични и фиброоптични инструменти за събиране на проби на клетки от стомашно-чревния тракт, бронхиалното дърво и т.н.

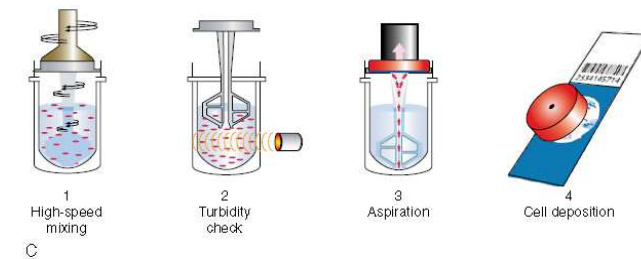
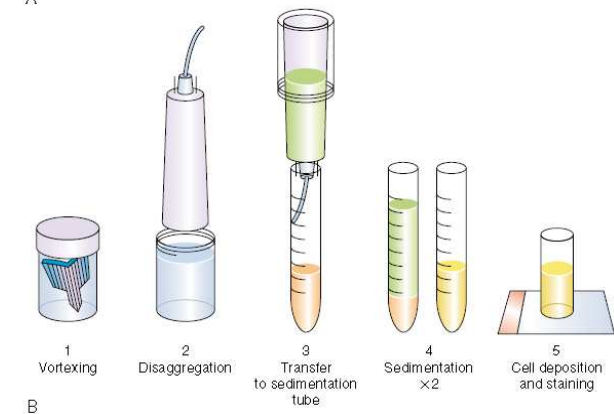
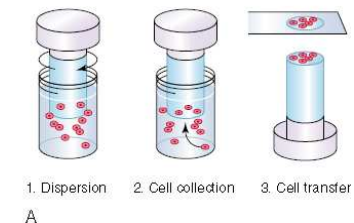
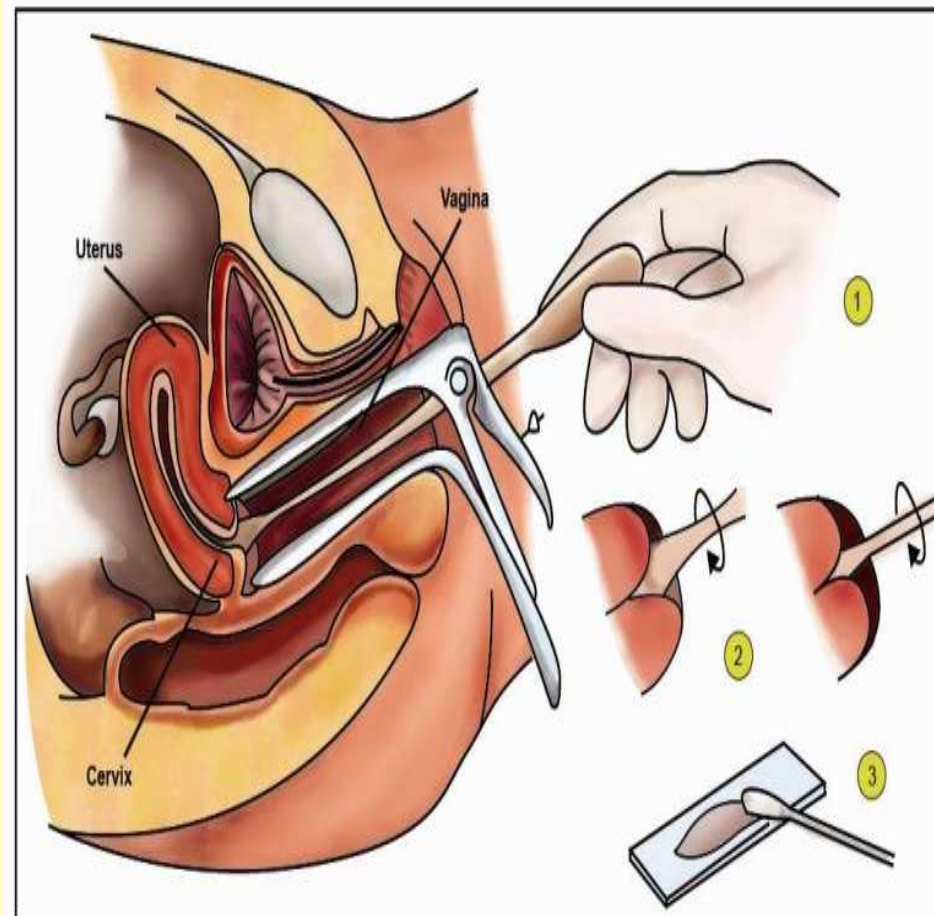
Абразивна цитология

ПАП тест

- Използва се за откриване на предракови и ракови лезии на маточната шийка.
- Ракът на шийката на матката е тумор, подлежащ на профилактика и ранна диагностика, като повечето от клетъчните промени водещи до карцином, могат да бъдат открити и съответно третираны на ранен етап, преди да прогресират.
- В повечето случаи цервикалният карцином се развива бавно (за период до 10 години), при което преминава в различни преканцерозни състояния, преди да достигне етапа на рак- наречени дисплазия или цервикална интраепителна неоплазия (CIN) или плоскоклетъчна интраепителна лезия (SIL):

Абразивна цитология

ПАП тест



Абразивна цитология

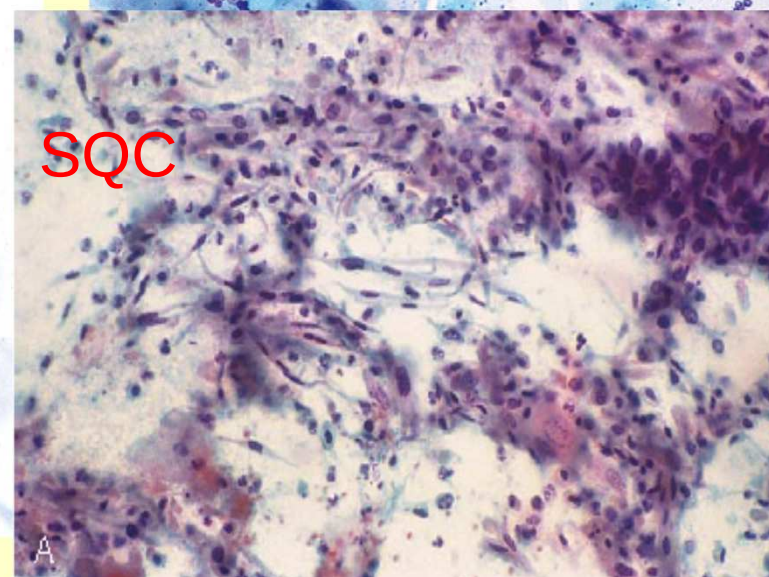
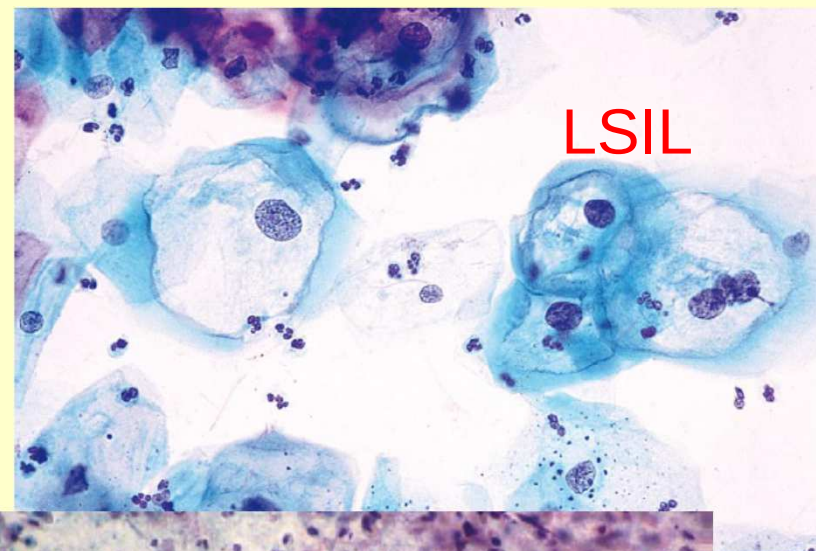
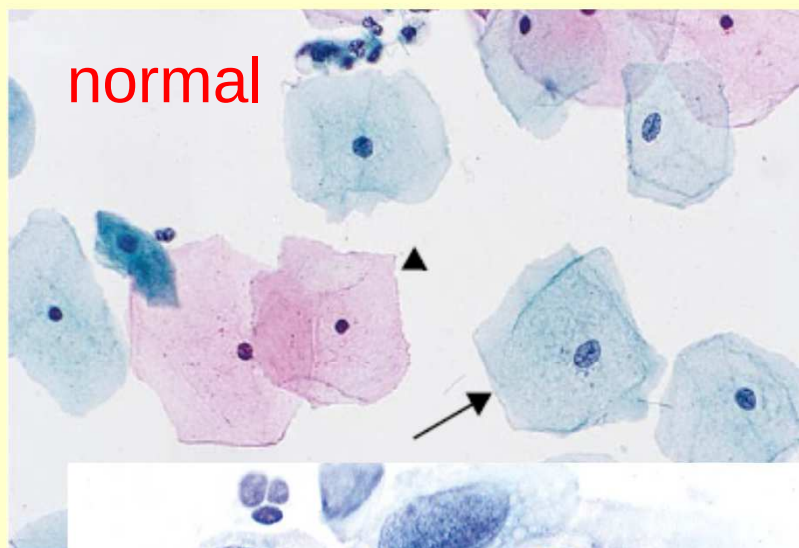
ПАП тест интерпретация

Cytological classification (used for screening)		Histological classification (used for diagnosis)	
Pap	Bethesda system	CIN	WHO descriptive classifications
Class I	Normal	Normal	Normal
Class II	ASC-US ASC-H *	Atypia	Atypia
Class II	LSIL	CIN 1 including flat condyloma	Koilocytosis
Class III	HSIL	CIN 2	Moderate dysplasia
Class III	HSIL	CIN 3	Severe dysplasia
Class IV	HSIL	CIN 3	Carcinoma in situ
Class V	Invasive carcinoma	Invasive carcinoma	Invasive carcinoma

* ASC-US atypical squamous cells of undetermined significance ,ASC-H-atypical squamous cells HSIL

Абразивна цитология

ПАП тест интерпретация



Ексфолиативна цитология

- Ексфолиативната цитология се основава на спонтанно отделяне на клетки, получени от лигавицата на орган в кухина, където те могат да бъдат отстранени с неабразивни средства.
- Типични примери са:
 - Вагинална намазка
 - Урина
 - Цереброспинална течност
 - Храчка
 - Секрет от мамила
 - Изливи в телесни кухини (плевра, перикард, перитонеум)

Цитологична диагноза

Предимства и Недостатъци

- Предимства
 - Пробите се събират бързо и лесно
 - Икономични
 - Малък риск за пациента
 - Показва причината или естеството на заболяването:
 - *Специфично или неспецифично възпаление*
 - *Възпаление или неоплазия*
 - Директна терапия
 - Определя следващите диагностични процедури
- Недостатъци

Не винаги е възможно да:

 - Локализира неопластичната лезия
 - Отграничи неинвазивен от инвазивен тумор
 - Отграничат реактивни от диспластични и неопластични промени
 - Определи типа на тумора

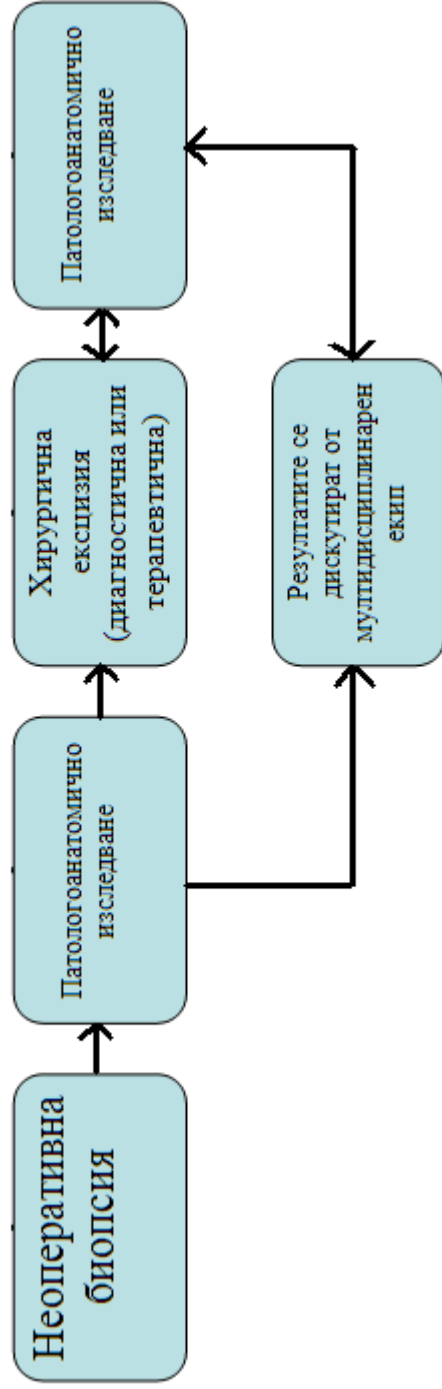
- **Класификация на лезиите на гърдата според степента на подозрителността на лезията**
- R1 – нормална бенигнена находка
- R2 – дискретна лезия с бенигнен вид
- R3 – неопределен тип лезия
- R4 – подозрителна за малигнена лезия
- R5 – малигнена лезия

- **R=U**
- **C1 : Неадекватна (незадоволителна)**
- **C2 : Бенигнена промяна**
- **C3 : Атипия, вероятно бенигнена**
- **C4 : Подозрителна за малигненост**
- **C5 : Малигнена находка**

Хистопатологична диагноза

- Хистопатология-класически,доказан с времето метод на макроскопско и микроскопско изследване на органи и тъкани.
- Хистопатологът изследва тъкани отстранени от пациентите за да идентифицира болестните процеси, документира хирургичните процедури и взема материал за изследване.
- Материалите за изследване биват:
- Течности, клетки и тъкани.
- Продукти на зачатието.
- Медицински изделия, които са били имплантирани в тялото.Временни изделия (като интравенозни катетъри и др.) обикновено не се изследват.
- Чужди тела, отстранени от тялото, включващи обекти въведени от травма като например куршуми.

- **B1 – Невъзможност за интерпретация / Нормални тъкани-мастна, фиброзна, лобули, канали, микрокалцификати в атрофични лобули.**
- **B2 – Бенигнена находка- ФА, фиброкистична болест**
- **B3 – Лезия с неясен малигнен потенциал-папиларни лезии, филоден тумор, ADH**
- **B4 – Подозрителна за малигнена лезия-DCIS**
- **B5 – Малигнена лезия:**
 - **а/ In situ карцином**
 - **в/ Инвазивен карцином**
 - **с/ Невъзможна за преценка инвазивна компонента на тумора**
 - **д/ Друга малигнена лезия**



Проблеми

- Малки или неадекватни за лезията биопсии
- Недостатъчен материал
- Липсващи или непълни клинични данни
- Липса на данни за предходни биопсии
- Липса на комуникация между звената



- R2/C3/B3

- R2 – дискретна лезия с бенигнен вид
- C3 : Атипия, вероятно бенигнена
- B3 – Лезия с неясен малигнен потенциал-папиларни лезии, филоден тумор
- Препоръчва се ексцизия

Хистопатологична диагноза

1.Вземане на материали за изследване:

-*Биопсия:*

насочена биопсия

инцизионна биопсия

ексцизионна биопсия

-*Хирургична ексцизия:*

регионални лимфни възли

органи и тъкани с тумори

2.Изпращане на материали за изследване

-Искане за хистопатологично изследване

Идентификация на пациента

Преценка на метода

Дата и време на процедурата

Адекватни клинични данни

Идентификация на материала за изследване



Хистопатологична диагноза

Примери на материали, изискващи специална обработка

Тип на материала за изследване или искано изследване	Състояние на материала за изследване	Коментар
Подагра	Нефиксиран	Кристалите на пикочната киселина се разтварят във воден разтвор на формалин. Тъканта следва да се фиксира в 100% етанол за водна обработка.
Ч.дроб:остра чернодробна стеатоза	Нефиксиран	Липидите се разтварят при рутинна обработка. Доказването на стеатоза изисква замразяване и специално оцветяване.
Ч.дроб: мед	Специален	Материалът не трябва да се докосва с метални инструменти,за избягване на следи от метални йони.

Хистопатологична диагноза

3. Транспорт – трябва да бъде бърз и сигурен

-Автолиза започва веднага и имунореактивността намалява за някои маркери (например за рецепторите при карцинома на гърдата).

В някои случаи е удачно за клиницистите да поставят материалите директно във фиксаторите в обем 15-20 пъти по-голям от обема на тъканта. Типът на фиксатора и времето на фиксиране на материала за изследване трябва да бъдат означени на контейнера.

-Опасност- всички тъкани може да са опасни и трябва да се транспортират по безопасен начин.

4. Приемане на материалите за изследване

-Лаборантът, приемащ биопсичния материал винаги трябва да сравнява идентификационния номер на пациента от биопсичния фиш с този на биопсичния контейнер. При рутинната обработка на тъканите, чрез парафинови блокчета тъканта трябва да бъде поставена или в подходящ фиксационен разтвор (10% буфериран формалин) или приета нефиксирана. За замразяващите срези тъканта е винаги нефиксирана.

Хистопатологична диагноза

5. Фиксатори

- Изборът на фиксатор може да ограничи възможностите за други специални изследвания. Преди да се фиксира тъканта трябва да се помисли за цитогенетично(клетъчни култури) изследване и замразена тъкан(РНК и ДНК анализ), които изискват или са най-добре изпълнени върху нефиксирани тъкани.

- **Формалин** -10% фосфатно-буфериран формалин.

Стандартен фиксатор и се използва за различни изследвания със специални оцветявания и имунохистохимия. Той фиксира повечето тъкани добре и е съвместим с повечето хистологични оцветявания.

Формалинът прониква в тъканите със скорост 0,4см за 24ч. Префиксирането може да намали имунореактивността.

Хистопатологична диагноза

- Неформалинови фиксатори

Течност на Буен –Пикринова киселина, формалдехид и ледена оцетна киселина- за всякакви тъкани(но особено за малките биопсии). Тя може да улесни намирането на малки лимфни възли. Те остават бели, а мазнините се оцветяват в жълто.

Пикриновата киселина може да причини деградация на ДНК и РНК и може да влияе при използването на специални изследвания, изискващи интактна ДНК като например PCR (полимеразо-верижна реакция).

Хистопатологична диагноза

В-Plus –Буфериран формалин с 0.5% цинков хлорид. Използва се за рутинна фиксация на лимфни възли, слезка и други тъкани ,ако се предполага имунопролиферативно заболяване.

Течност на Ценкер -Калиев бихромат, живачен двухлорид и ледена оцетна киселина. Може да се използва за костномозъчни биопсии. Изисква между 8 и 12 часа за декалцинация и оптимално цитологично консервиране.

Лоша пенетрация и дълъг период за фиксация. Лошо антигенно запазване за имунохистохимично изследване.

Глутаралдехид-Фиксиране на тъкани за електронна микроскопия.

Алкохол-Етанолът и метанолът бързо изместват водата и денатурират протеините.

Цитонамазки и замразяващи срезове се фиксират в метанол преди да се оцветят.

Хистопатологична диагноза

Декалцинация-В костите и други калцинирани тъкани (някои тератоми, менингиоми, овариални тумори и т.н.) калцийт трябва да бъде премахнат, за да може материалът да се реже с микротом.

Някои фиксатори (напр. тези на Буен и Ценкер) фиксират и декалцинират тъканите.

Други декалциниращи агенти не са фиксатори и тъканите първо трябва да се фиксират преди да се използват такива агенти.

Декалцинацията засяга неблагоприятно хистологичните детайли и запазването на някои нуклеарни антигени, особено ER, PR, p53 и Ki-67.

Може да бъде невъзможно да се приложи FISH или други анализи, изискващи интактна ДНК в декалцинираните тъкани.

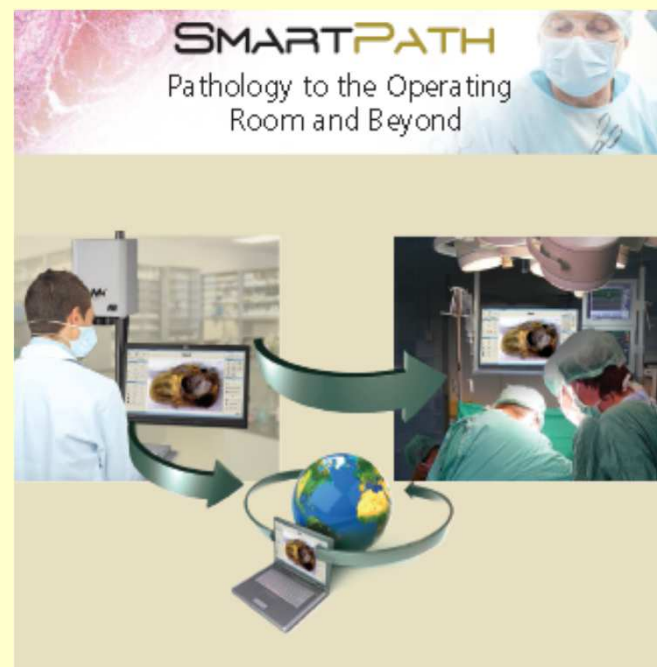
Декалцинацията с 10% EDTA дава най-добри резултати при молекулярните изследвания.

Хистопатологична диагноза

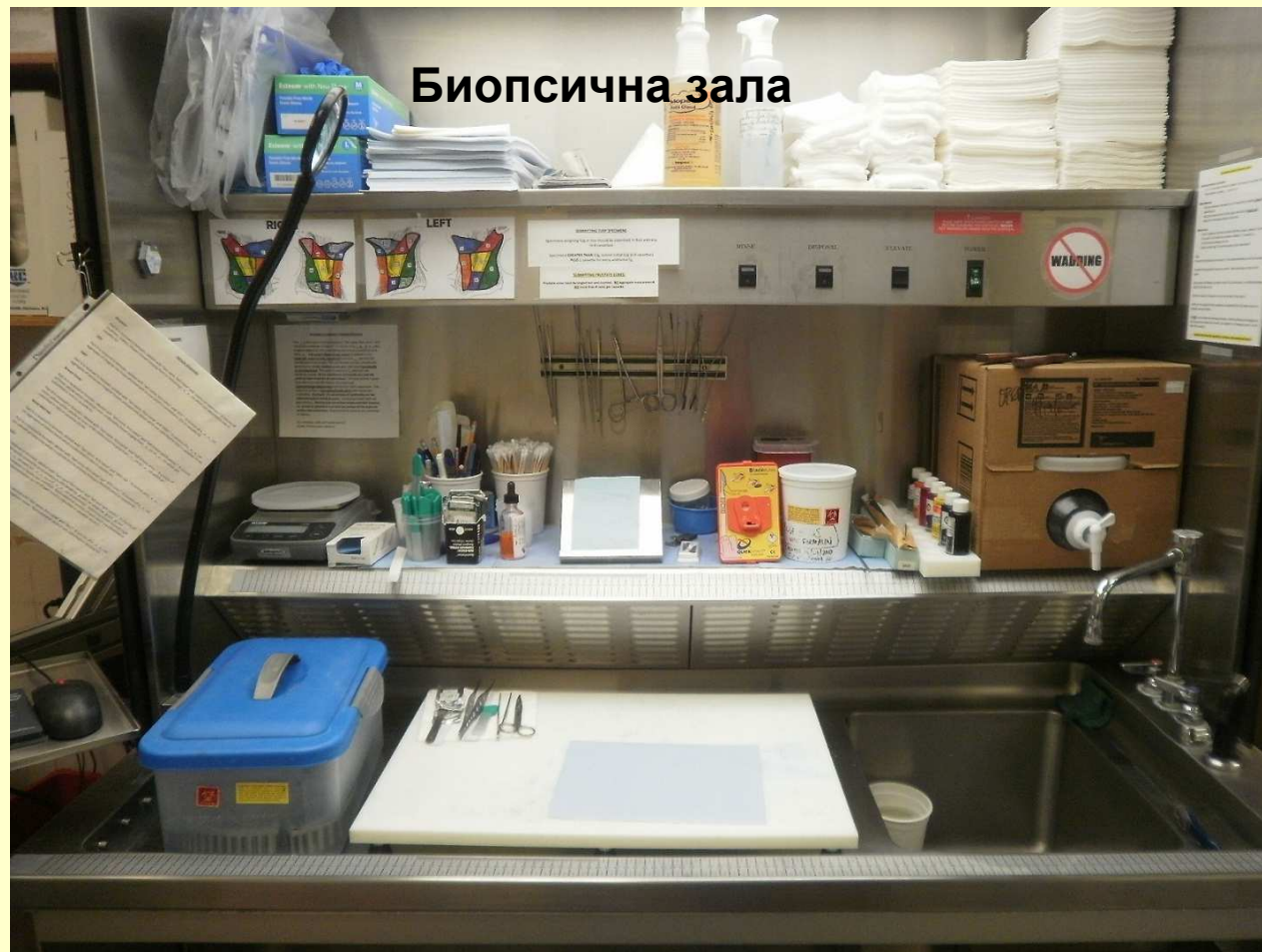
6. **Макроскопско изследване** на получените материалите е следващата важна стъпка. Правилното срязване на тъканите, макроскопското описание и селекцията на репрезентативните части от тъканта при големи материали е от решаващо значение за патологичното изследване.

Грешките на този етап не могат да бъдат отстранени на по-късно и може да се наложи вземане на тъкан наново, ако материала е достатъчно голям, а това забавя хистопатологичния резултат или ако биопсията е малка и се изгуби при обработка, цялата хирургична процедура може да се наложи да бъде повторена.

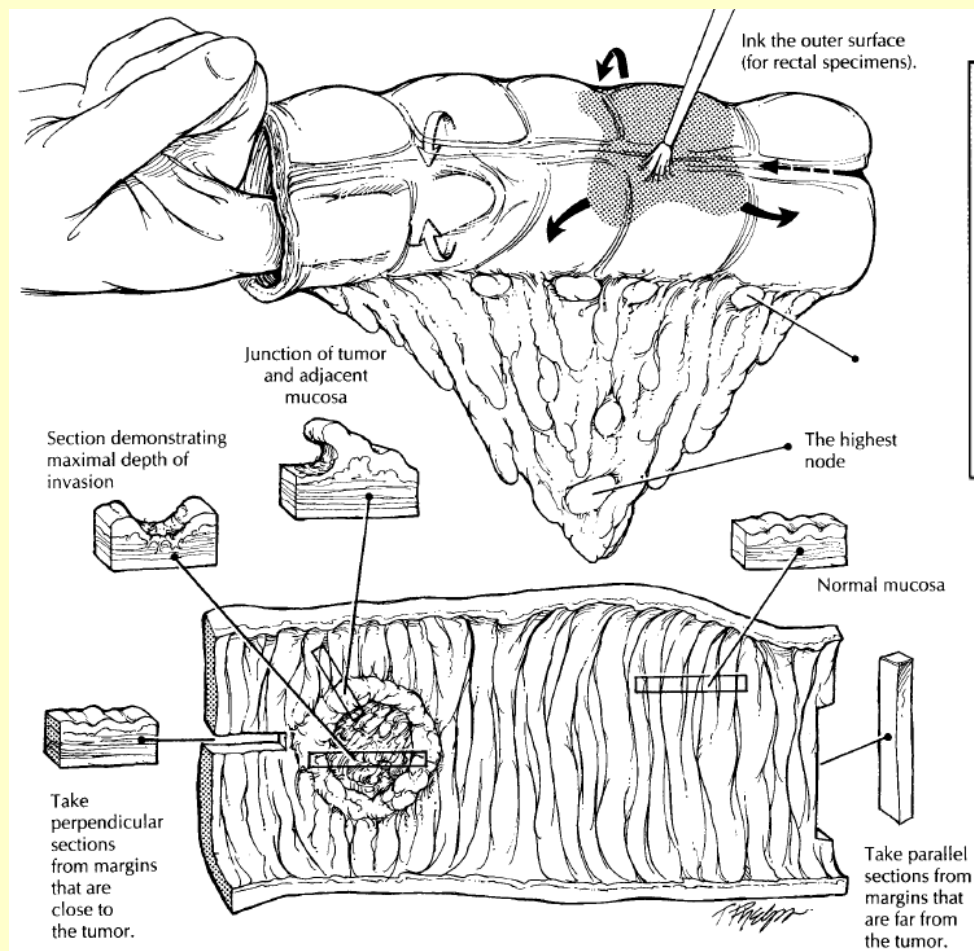
Система за макроскопско записване



Хистопатологична диагноза

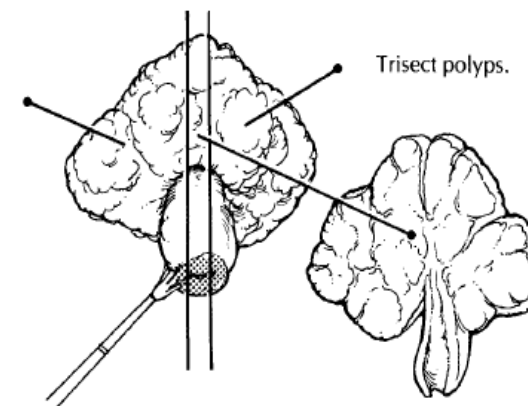


Хистопатологична диагноза



Resections of Intestinal Neoplasms

1. Orient the specimen. Record its length and diameter proximal and distal to the tumor. Describe the serosa.
2. Open the bowel on the side opposite the tumor. Record the size of the tumor and the distance to each margin. Section the tumor, and document its deepest gross penetration.
3. Remove the mesentery, and submit representative sections of each node by level. Look for vascular invasion.
4. Submit sections of tumor to demonstrate its deepest penetration and relationship to normal mucosa. Submit sections of the proximal and distal margins, other lesions, normal mucosa, all lymph nodes, and any attached structures or organs.



Хистопатологична диагноза

7. **Замразени срези - гефрир** - елиминират всички етапи на обработка на тъканите и включването им в парафиново блокче. Вместо това тъканта е бързо замразена до лед при около -25°C , което действа като включваща среда и тогава се режат. Срезове са готови за оцветяване. Замразените срези са бърза интраоперативна диагностична процедура за тъкани, преди радикално хирургично отстраняване. Замразените срези рутинно се оцветяват с Н&Е или с толуидин блу.

Специални оцветявания могат да се приложат и при двата метода в зависимост от нуждите. Срезове се поставят на предметно стъкло, оцветяват се и се изпращат за микроскопско изследване.

Хистопатологична диагноза



Криостат-микротом



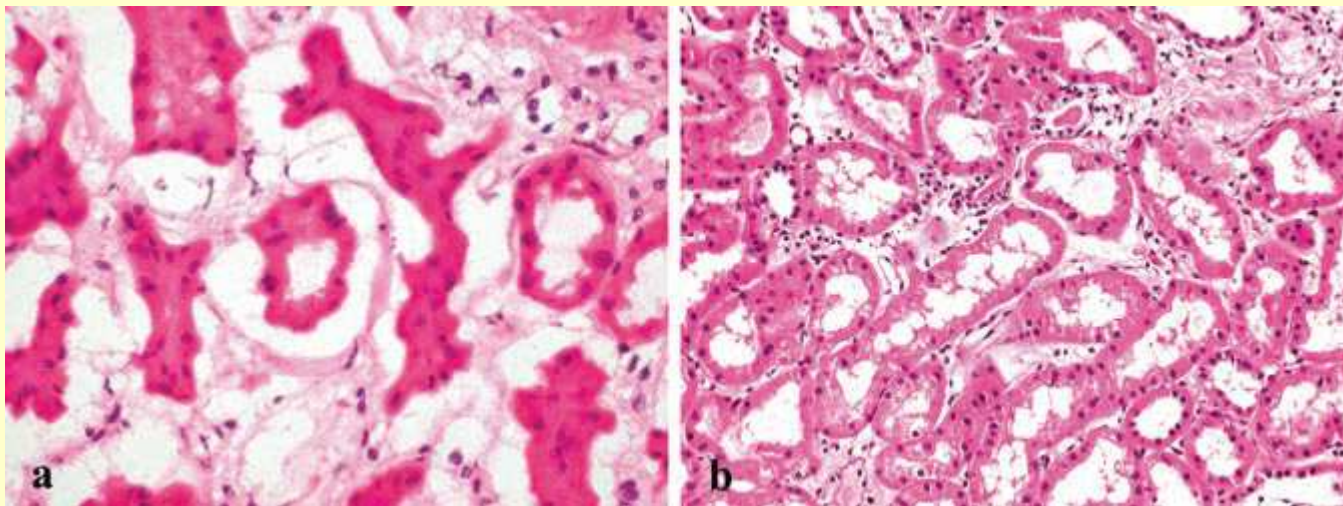
Хистопатологична диагноза

Парафинови срези vs Замразени срези

	Парафинови срези	Замразени срези
Материал	Фиксирани тъкани	Пресни тъкани
Време за изработване	24-48 часа	10-20 минути
Съхранение	Постоянно	Месеци
Морфология под микроскоп	Ясна	Неясна или променена от замръзяването
Приложение	Патологична диагноза	Интраоперативна консултация-гефрир

Хистопатологична диагноза

Тъкани включени в парафиново блокче и замразени срези



Компресионни артефакти. Фиг. (а) е микроскопия на замразен срез от бъбречна тъкан при увел.400х. Вижда се компресията на бъбречните тубули от подобни на мехурчета кристали, образувани в заобикалящата хидратирана строма. Фиг. (b) тъканта, използвана за приготвяне на слайда, е включена в парафиново блокче. Хидратираната строма е налице, но компресия не се наблюдава .

Хистопатологична диагноза

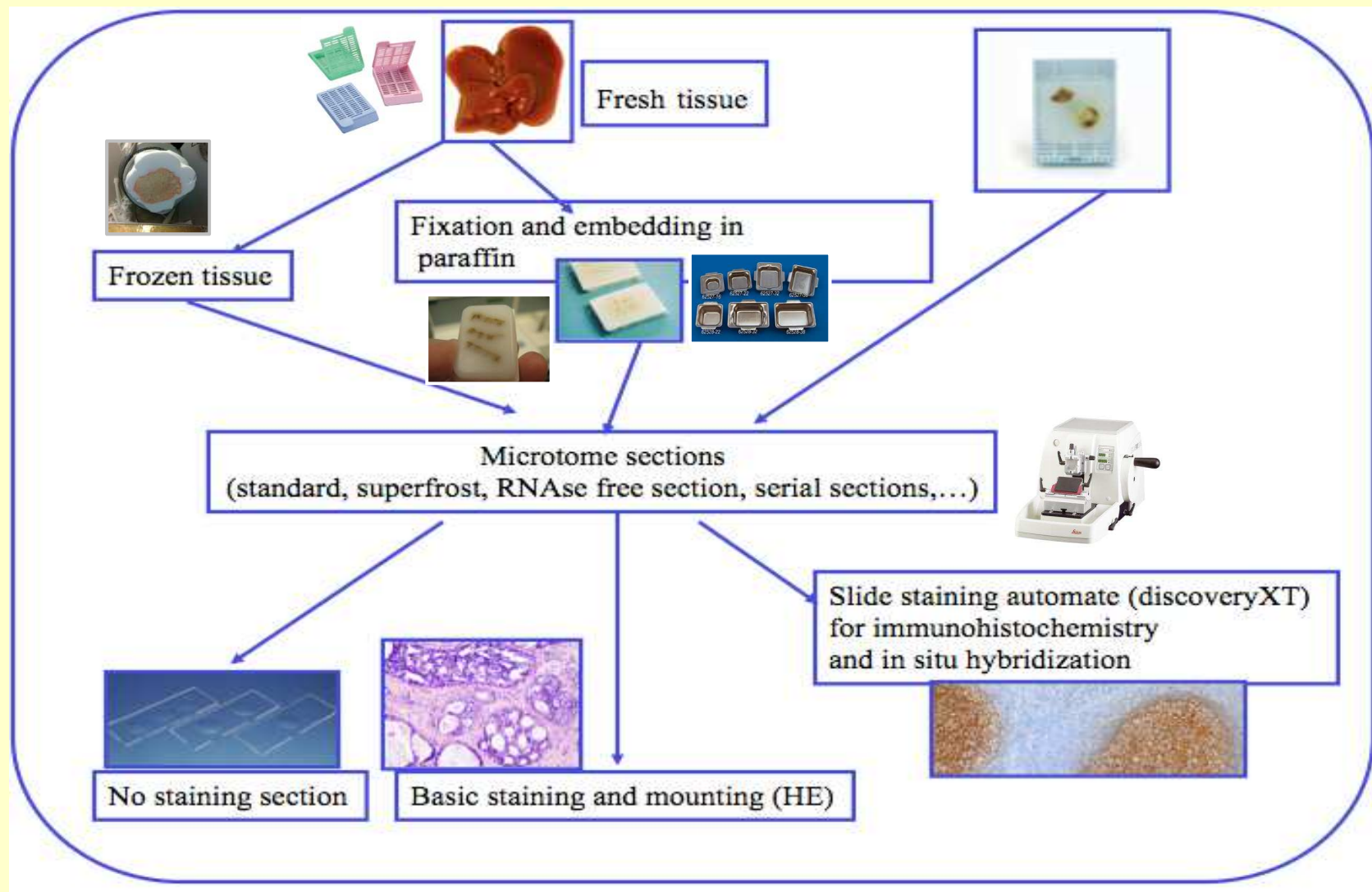
8. Тъкани включени в парафинови блокчета – Тъканните касети заедно с уникален номер даден в биопсичната зала за тъканните проби преминават през лабораторни процедури.

- фиксация в 10% неутрален формалин: 12 - 24 часа
- промиване на течаща вода
- покачващи се градуси на алкохол (70%, 95% до 100%) за дехидратация за около 5 часа.
- последователна двукратна обработка в ацетон (ксилол) по един час на стайна температура.
- импрегниране с течен парафин при 56°C за 6 часа.
- включване в парафиново блокче

Блокчетата се режат с микротом и се поставят на предметно стъкло.

Рутинното оцветяване на такива срезове е с хематоксилин/еозин (H & E).

Хистопатологична диагноза



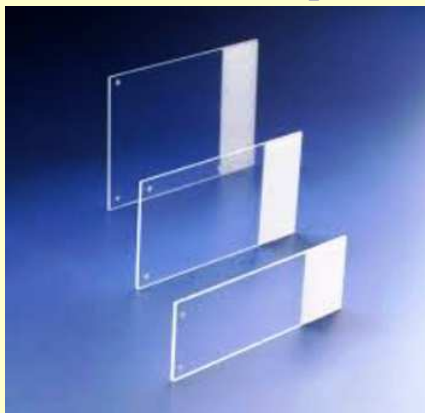
Хистопатологична диагноза

9. Оцветявания

Staining	Presented structures	Examples from forensic practice	Staining	Presented structures	Examples from forensic practice
Alcian blue	Detection of acid mucopolysaccharides	Mucoid lakes, for example, in cases of idiopathic cystic Erdheim-Gsell medial necrosis and dissected aortic aneurysm	Nissl stain	Detects cell nuclei and tigroid bodies in nerve cells; cell nuclei and Nissl substance violet, nerve cells light blue, the rest is colorless	Detection of nervous tissue
Azan staining (azo carmine and aniline blue)	Connective tissue staining (red): azo carmine stains cell nuclei, erythrocytes, fibrin, fibrinoid, acidophilic cytoplasm, epithelial hyalin; Aniline blue (blue): collagen fibers, fibrous hyalin, basophil cytoplasm, mucus	Differentiates basophilic and chromophobe cells in the hypophysis; loss of detectability, for example, in the case of Sheehan syndrome	Orcein stain	Detection of elastic fibers, used to identify the Australia HBsAG	Hepatocellular single cell necrosis in the case of active hepatitis B – detection of hepatitis B surface antigen; result should be checked immunohistochemically
Best's carmine stain	Classified as a glycogen stain, but is not specific; also stains mucus, fibrin, gastric glands, and mast cell granules	Glycogen detection in kidney distal tubular cells in the case of hyperglycemia (Armanni-Ebstein cells)	Papanicolaou stain	Cells are blue to black, nucleoli are black to red, cytoplasm is blue-green (cyanophil) to pink-red (eosinophil); erythrocytes are bright red	Standard stain for vaginal wet mount
Elastin staining according to Weigert	Stains elastic fibers violet-black	For example, elastic fibers in the aortic media	PAS (periodic acid-Schiff's reagent)	Stains carbohydrates, in particular glycogen, purple-red (magenta) and epithelial mucin	Glycogen positive Armanni-Ebstein cells in the renal tubules in the case of diabetic coma
Elastika van Gieson (EvG)	Combined staining of collagen fibers (red) and elastic fibers according to Weigert (black and brown); cytoplasm, musculature, amyloid, fibrin, and fibrinoid (yellow)	Fibrotic zones in the myocardium, fibrosis in other organs, liver cirrhosis, cystic medial necrosis	Periodic acid – silver	Stains basal membranes, Alzheimer's plaques, and fungi black	Detection of basal membranes, for example, in the kidney
Iron stain (Prussian blue reaction)	Stains trivalent iron, in particular hemosiderin; detection of iron deposits	Siderosis of the lung, posttraumatically deposited siderophages, e.g., for wound age determination	PTAH	Phosphotungstic acid-hematoxylin according to Mallory	Used to differentiate between smooth and striated muscle fibers, detects fibrin; suitable in the case of muscle damage, also in the myocardium
Fibrin staining according to Weigert	Blue: fibrin and bacteria Red: cell nuclei; is not considered a specific fibrin stain	Detection of microfibrin in the placenta, hyaline membrane in the lung post shock event	Prussian blue	Blue: hemosiderin, Fe III	Siderosis of the lung, hemosiderin macrophages full of pigments
Gomori's stain	Argyrophilic reticular fibers (silver)	Glomerular basal membranes in the case of a membrane-proliferative glomerulonephritis type I (MPGN) – so-called tram tracks; reticular fiber network in the case of hepatic peliosis	Reticulin stain	Silvering of fine (pre-) collagen reticulin fibers	Basal membranes, newly formed fibers
Grocott stain	Ideal fungal stain: fungal conidia, fungal fibers stain black	Fungal infection	Sudan III	Fat stain; lipids stain yellowish-red; Sudan IV stains more orange-red	Fat embolisms, fatty liver
Haematoxylin-eosin (H&E) staining	Acidophilic cytoplasm is red, basophil nuclei are blue, erythrocytes are red	Routine staining	Toluidine blue	Detects striation of muscle fibers and metachromatic substances	Striated muscle tissue, mast cell granules
Congo red stain	Amyloid stain	Amyloidoses of any type, in particular cardiovascular	Silvering	Black: reticular fibers, nervous fibers Brown: collagen fibers	Hepatic peliosis, glomeruli
Kossa stain	Calcified bone tissue stains black in a non-calcified specimen	Sediments in renal tubules and vascular walls following ethylene glycol intoxication	Ziehl-Neelsen stain	Acid-resistant rods, mycobacteria (also lepra bacteria) stain bright red	In particular tuberculosis; microscopy x1000, oil immersion
Luxol fast blue (LFB)	Evidence of myelin and phospholipids	Myelin sheath staining	There are numerous other simple and combined staining methods that are described in the relevant literature		
Mallory's stain	Trichrome stain; collagen and reticular connective tissue is light-blue, nuclei are red, smooth musculature is violet, striated musculature orange-red, mucus is blue	Connective tissue stain, for example, in the case of liver cirrhosis			
Masson-Goldner stain	Red-orange: parenchyma and fibrin Green: mesenchyme Black: cell nuclei	Hyaline fibrin thrombi in the case of shock			
May-Grünwald-Giemsa stain (MGG)	Nuclei are purple-red, nucleoli are blue, cytoplasm is light blue-gray to red-violet, erythrocytes are pink to orange (except in the case of alkaline pH where they are green-blue)	Hematopoietic marrow, differentiation of cells of the myeloid and lymphatic line; eosinophil granula is red			
Methylene blue	Nuclei are sharp blue, plasma cells are deep blue, erythrocytes are greenish	Suitable to detect agents, e.g., Helicobacter pylori			
Naphthol AS-D chloroacetate esterase stain (Moloney et al. 1960) (enzyme-histochemical stain; abbreviated to ASD)	Neutrophil myeloid cells with all preliminary stages stain wine red	Mostly selective detection of neutrophil granulocytes in purulent inflammation of all kinds (phlegmons, abscesses)			

Хистопатологична диагноза

10. Микроскопия - Светлинен микроскоп



- Обикновен микроскоп
- Фазово контрастен микроскоп
- Поляризационен микроскоп
- Имунофлуоресценция
- Електронен микроскоп (ЕМ)

11. Хистопатологичен резултат –Последната и най-важна задача на патологичната лаборатория е издаването на бърз, акуратен, кратък и прогностично значим хистопатологичен резултат.

Хистопатологичният резултат трябва да съдържа:

- Анамнеза (ако е на разположение на патолога)
- Точно макроскопско описание
- Кратко микроскопско описание на находките
- Морфологична диагноза
- Допълнителни коментари,когато е необходимо

Хистопатологична диагноза

Хистопатологичният резултат за неоплазми

Доброкачествени vs злокачествени

е комплексен и включва:

1. Макроскопско описание

Препарат: описание

Тумор: локализация

размер

изглед

ръбове

2. Хистологичен тип

3. Диференциация/грейдинг

4. Наличие на локална

туморна инфилтрация

5. Лимфоваскуларна

инвазия

6. Лимфни възли

7. Ексцизионни граници

8. Друга патология

9. Друг малигнитет

10. Стадиране

Характеристики	Доброкачествени	Злокачествени
Морфология и Диференциация	Добре диференцирани Структура на тъканта близка до нормалната Липса или лекостепенна анаплазия	Обикновено има нарушение в диференциацията Структурите често са атипични Различна степен на анаплазия
Бързина и начин на растеж	Бавен, прогресивен растеж Редки и нормално изглеждащи митози	Бавен до бърз растеж Чести, понякога атипични митози
Локална инвазия	Няма инвазия Кохезивен и експанзивен растеж Капсулиран	Локална инвазия Инфилтративен растеж Некапсулиран
Метастазирание	Няма метастази	Чести метастази (определящ критерий за малигнитет)
Увреждане на функцията	Относително по-рядко	Относително по-често
Прогноза	Добра	Лоша

Хистопатологична диагноза

Пример: Хистопатологичен резултат за колоректален карцином

1. Макроскопско описание

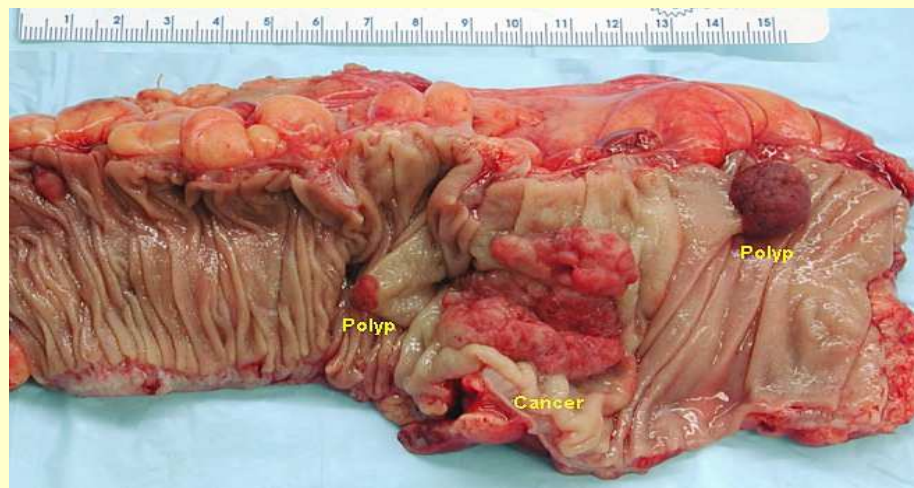
- Ректална/сигмоидна/колоно -биопсия
- Локална резекция
- Лява или дясна хеми/трансверзна/сигмоидна/ субтотална или тотална колотомия
- Тегло (g) и размер/дължина (cm), брой на фрагментите.

Тумор:

- Локализация

- caecum
- colon ascendens
- flexura hepatica
- colon transversum
- flexura lienalis
- colon descendens и sigma
- rectum
- мултифокални

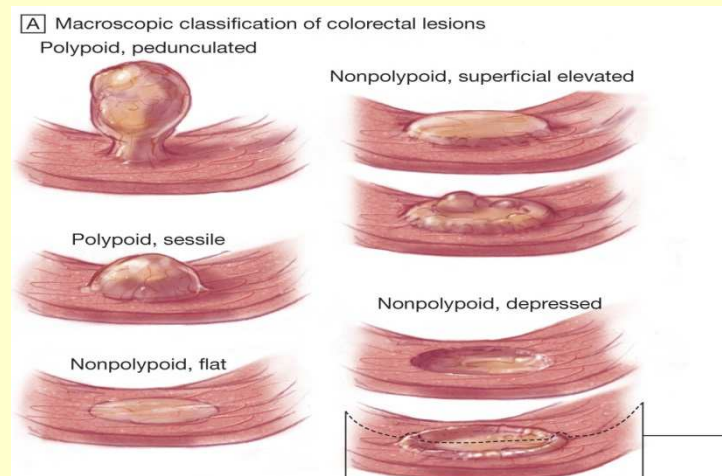
- размер - дължина×широчина×дълбочина (cm) или максимален циркуферентен размер (cm).



Хистопатологична диагноза

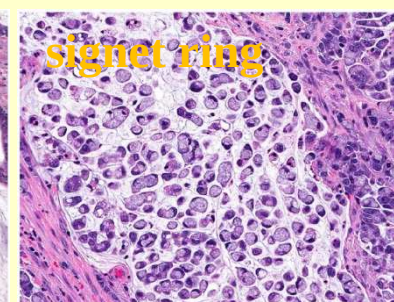
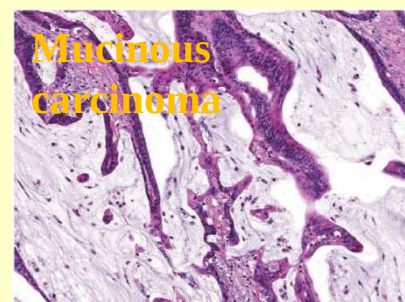
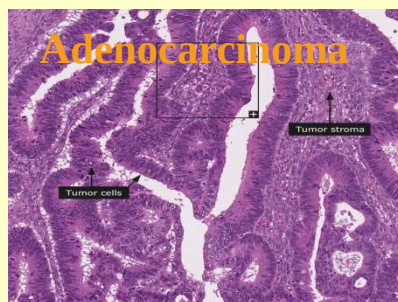
-Изглед

- полипоиден
- ануларен
- разязвен
- мукоиден
- linitis plastica
- стриктури
- плаковиден.



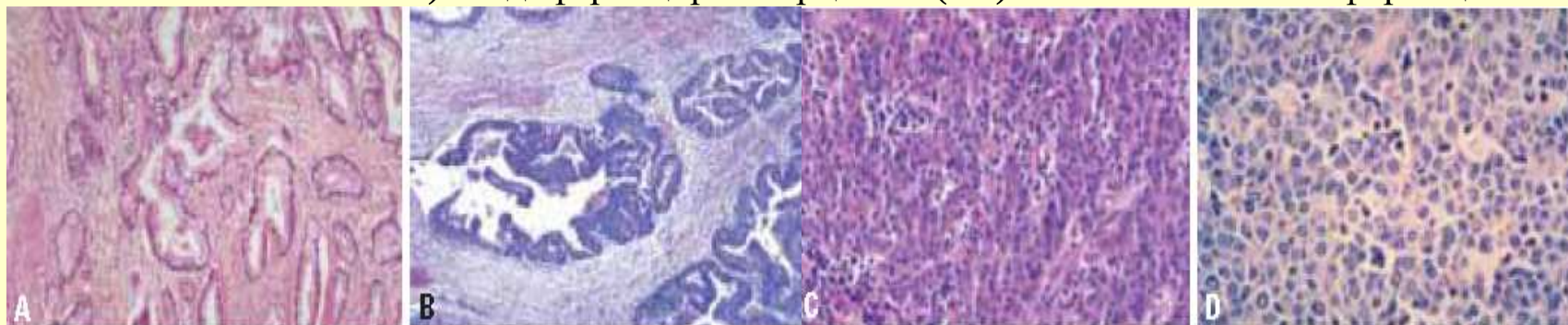
- Ръбове - отграничени/неправилни (лош прогностичен белег).
- Перфорация - налице/липсва.

2. Хистологичен тип- адено,муцинозен, signet ring, невроендокринен, др.



Хистопатологична диагноза

3. Диференциация/грейдинг-високо/умерено/ниско/недиференциран, или, Grade 1/2/3/4 базирано на процента формирани туморни жлези (високо/G1 > 95 %: умерено/G2 50–95 %:ниско/G3 < 50 %). Недиференциран карцином (G4) не показва жлезни формации.

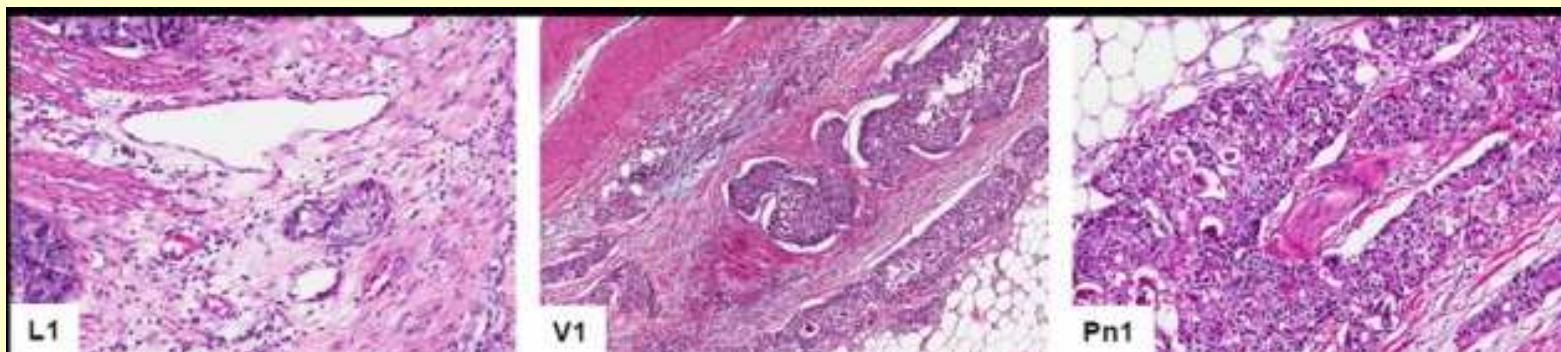


4. Локална туморна инвазия: притискане/инфилтрация. Лимфоцитна реакция: видима/незначителна.



Хистопатологична диагноза

5. Лимфоваскуларна инвазия - налице/липсва. интра/екстрамурална.
лимфоваскуларна венозна неврална инвазия



6. Лимфни възли - Лимфните възли и черния дроб са най-честите метастатични локализации. Други локализации са перитонеум, бял дроб, яйчници, вагина и пикочен мехур,където метастазите могат да имитират първичен аденокарцином на тези органи.
7. Ексцизионни граници – ангажирани/неангажирани.Разстояние от тумора до проксимална и дистална резекционна линия.

Хистопатологична диагноза

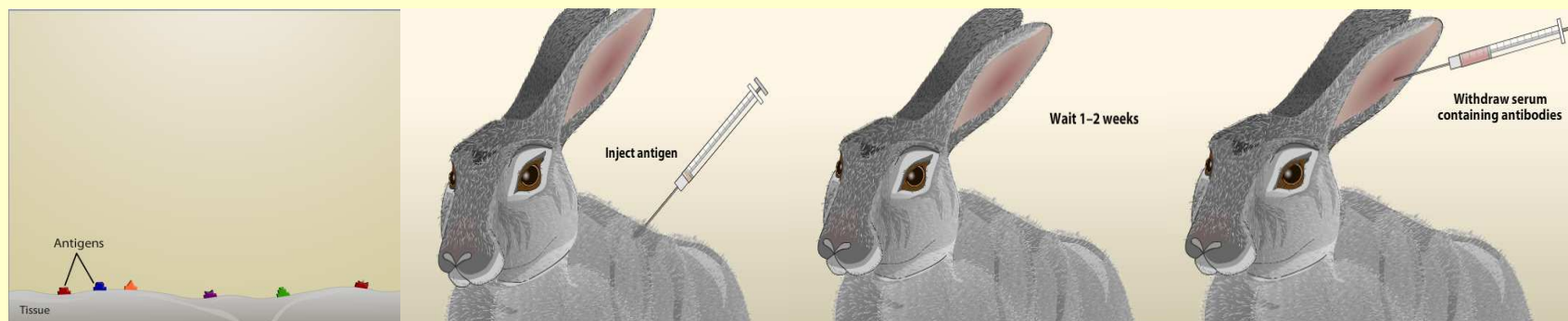
- 8. Друга патология-
възпалителна, неопластична.
- 9. Друг малигнитет.
- 10. Стадиране.

Staging of Malignant Neoplasms	
Stage	Definition
Tis	In situ, non-invasive (confined to epithelium)
T1	Small, minimally invasive within primary organ site
T2	Larger, more invasive within the primary organ site
T3	Larger and/or invasive beyond margins of primary organ site
T4	Very large and/or very invasive, spread to adjacent organs
N0	No lymph node involvement
N1	Regional lymph node involvement
N2	Extensive regional lymph node involvement
N3	More distant lymph node involvement
M0	No distant metastases
M1	Distant metastases present

Хистопатологична диагноза

12.Имунохистохимия- метод за идентифициране на клетъчни или тъканни структури-антигени с помощта на антиген-антитяло реакции като мястото на свързване антиген/антитяло се визуализира чрез директно маркиране на антитялото или чрез употребата на вторичен маркиращ метод.

Антигени- Антигенът е молекула, която индуцира формирането на антитяло. Това са високоспецифични региони, състоящи се от малък брой аминокиселини или монозахаридни единици, известни като епитопи.

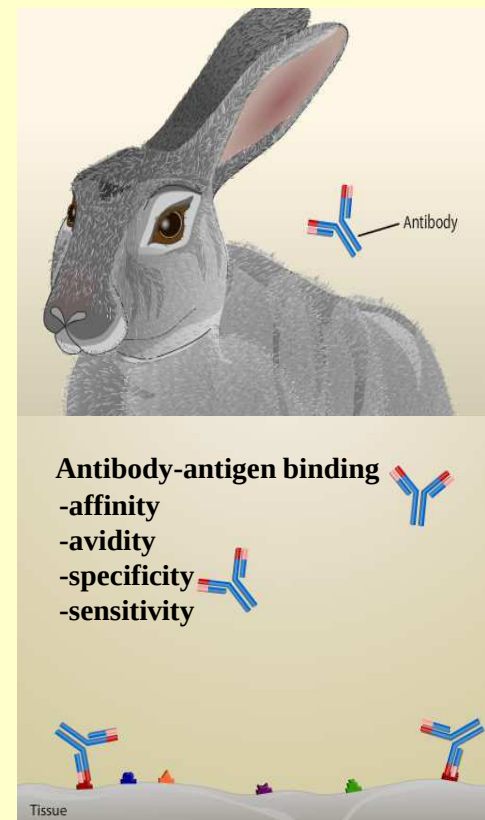


Хистопатологична диагноза

Антитяло - Антителата принадлежат към клас от серумни протеини- имуноглобулини. Те се формират в хуморалната имунна система от плазматичните клетки, крайните клетки на В-лимфоцити.

Антиген - антитяло свързване

Антигена и антитялото си съответстват –геометрично,химично и електрично,като ключалка и ключ,което обуславя и високата специфичност на антиген - антитяло свързването.



Хистопатологична диагноза

Типове антитела:

Поликлонални антитела – за получаването им се използват имунизирани животни (най-често зайци) като в серума им се произвеждат голямо количество клонове на активирани плазматични клетки (поликлонални). Всеки клон продуцира антитяло леко различаващо се, съобразно разнообразието от епитопи презентирани от имуногена.

Моноклонални антитела – Плазматичните клетки, които са зрели „В” лимфоцити са специализирани в производството на антитела. Една плазматична клетка е отговорна за производството на едно антитяло, което се нарича моноклонално (Monoclonal antibody (MAb)). Всяко MAb реагира специфично с точно определен антиген, който като мишена привлича антителата и лимфоцитите.

Маркери- Това са ензими, колоидни метални маркери, флуоресцентни маркери и радиомаркери, продуциращи стабилна цветна реакция подходяща за микроскопиране.

Хистопатологична диагноза

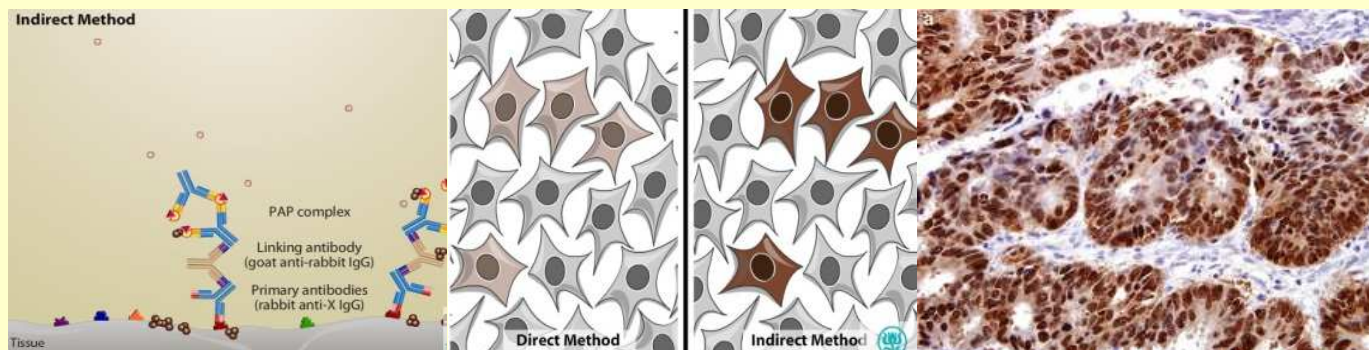
Имунохистохимични методи

Традиционен директен метод - Първичното антитяло е конюгирано директно с маркера. Конюгатът може да бъде или флуорохром (най-често) или ензим. Маркираното антитяло реагира директно с антигена на хистологичен или цитологичен препарат. Методът е бърз и лесен за употреба, но предлага малко усилване на сигнала и липса на чувствителност, постигана с другите методи.



Хистопатологична диагноза

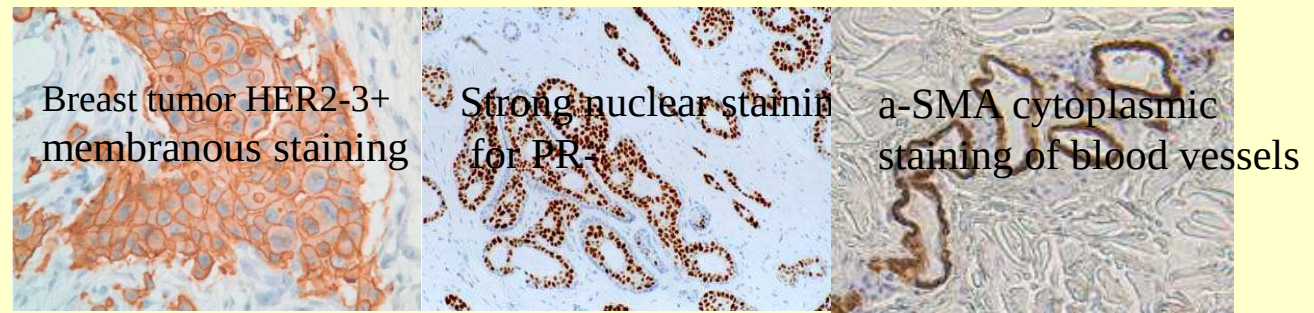
Индиректен метод- Маркирани вторични антители визуализират немаркираните първични антители насочени срещу специфичните антигени. Маркирането с пероксидаза е най-често използвано заедно с подходящия хромогенен субстрат. Методът е по-чувствителен отколкото традиционния директен метод защото множеството вторични антители може да реагират с различни антигенни локализации на първичното антитяло, което увеличава усилването на сигнала.



Силно и дифузно ядрено оцветяване
(с известна цитоплазмена позитивност)
за CDX2 при колоректален карцином.

Хистопатологична диагноза

За интерпретация на резултатите от имунохистохимичното оцветяване е важно да се отбележи, че различните антигени са локализирани на различни места в клетките (мембрана, цитоплазма или ядро) и съответно позитивното оцветяване се вижда и интерпретира в тези места, например ядреното оцветяване за естроген-прогестерон рецептори (ERPR), оцветяване на цитоплазмата за гладкомускулен актин (SMA) и т.н.



Имунохистохимичните оцветявания се използват при:

1. Тумори с неопределена хистогенеза.
2. Прогностични туморни маркери.
3. Преценка на терапевтичният отговор.
4. Инфекции.

Молекулярна патология

Молекулярната патология е нова дисциплина в рамките на патологията, която е фокусирана върху изследването и диагностицирането на заболяванията чрез изследване на молекулите в рамките на тъкани, органи или телесни течности.

Тя е мултидисциплинарна и се фокусира главно върху субмикроскопските аспекти на заболяването. Основното съображение е, че по-точна диагноза е възможна когато тя се основава както на морфологичните изменения в тъканите, така и на молекулярните изследвания.

Молекулярни диагностични методи

Полимеразно-верижна реакция (PCR) е метод за молекулярно генетично изследване с широки приложения в проучванията и диагностиката. Методът е базиран на принципа, че едноверижна ДНК има неограничен капацитет за амплификация и формиране на милиони копия.

При PCR една верига ДНК генерира друга чрез ДНК полимераза, използвайки кратък комплементарен ДНК фрагмент; това се прави като се използва праймер, който действа като шаблон.

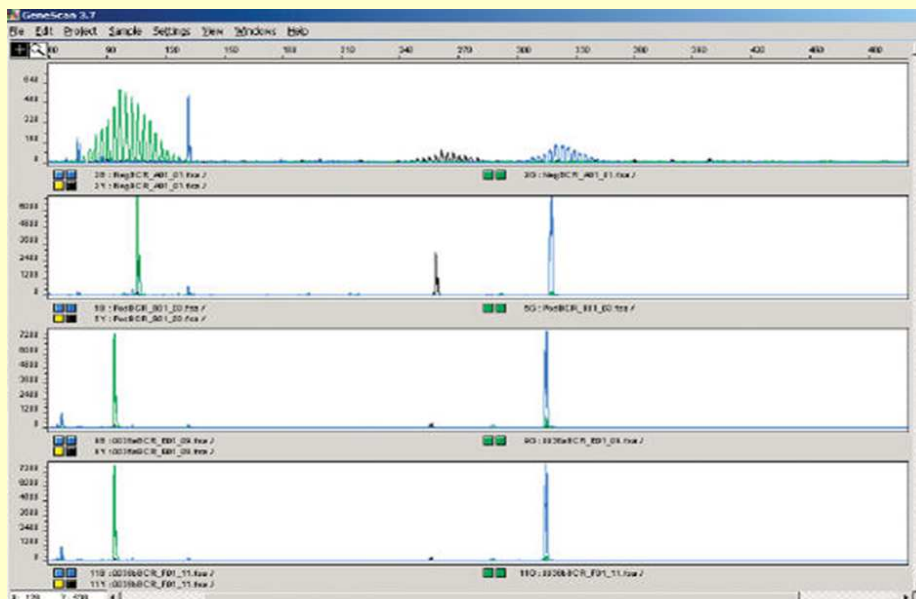
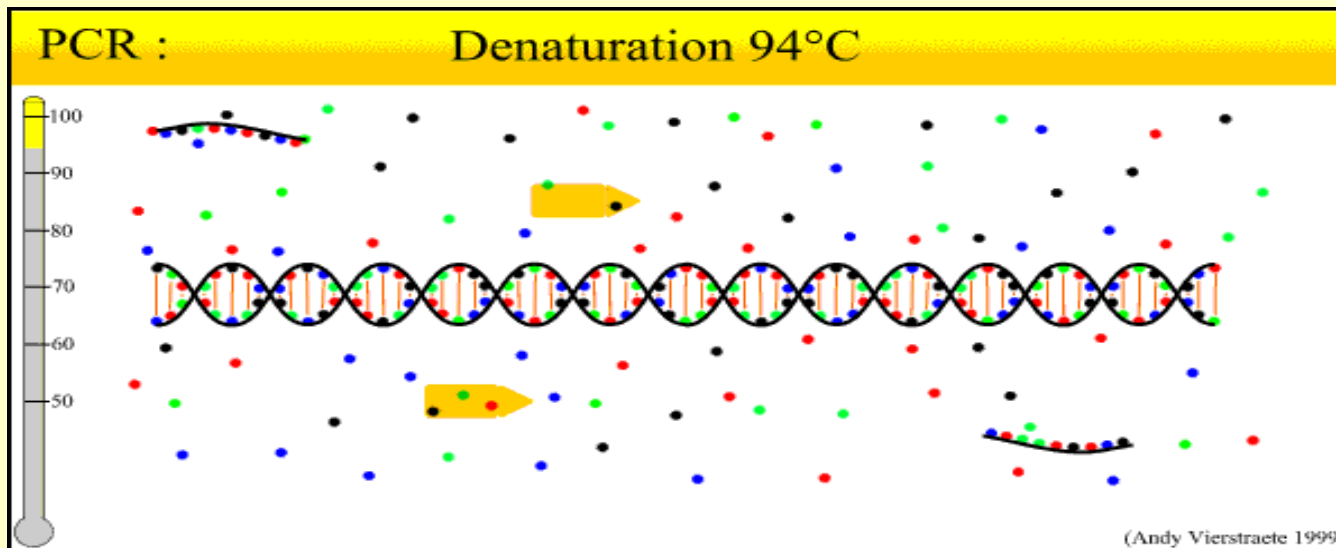
Молекулярна патология

Всеки PCR цикъл включва три основни стъпки:

- Денатуриране
- Хибридизация
- Полимеризация.

Процесът е мултицикличен и в резултат се генерират милиони идентични копия на оригиналната специфична ДНК .

Компютърен софтуер генерира графика, изобразяваща пика на флуоресценция на мястото на миграцията.



Капилярен
електрофоретичен анализ
на продукт на PCR,
използвайки секвенатор
за фрагментен анализ.
Пиковите стойности
показват позитивна
амплификация

Молекулярна патология

Ин ситу хибридизация (ISH) е метод за локализиране на таргетни нуклеинови киселини във фиксирани тъкани или клетки, което позволява да се получи информация за генната експресия и генните локуси в рамките на тъканта. Два са основните начини за визуализиране на РНК и ДНК таргети ин ситу-флуоресцентен (FISH) и хромографски (CISH). Характеристиките, присъщи на всеки от методите правят FISH и CISH полезни за широко приложение.

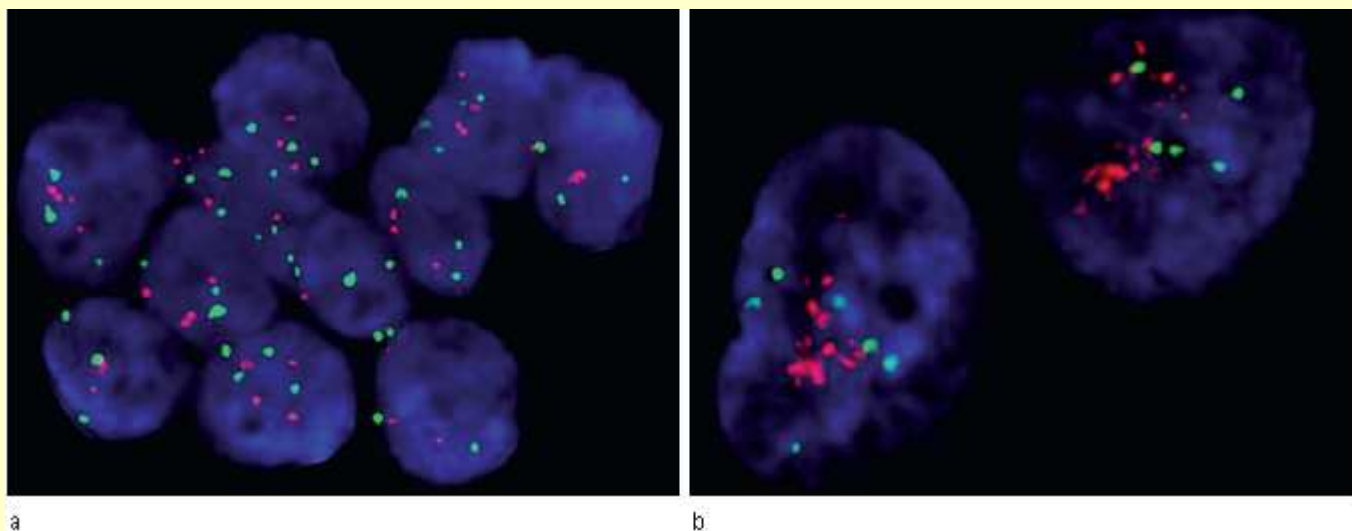
Флуоресцентна ин ситу хибридизация-FISH се базира на използването на флуоресцентно маркирани олигонуклеотидни проби, които специфично се прикрепят към тяхната комплементарна прицелна ДНК последователност на генома и маркират този регион с флуоресцентен цвят.

Маркирания регион след това може лесно да се визуализира с флуоресцентен микроскоп.

Понастоящем FISH се използва често за оценка на *HER2/neu* онкогенната амплификация при карцином на гърдата и за откриване на различни транслокации при хроничната и острата миелогенна левкемия .

Молекулярна патология

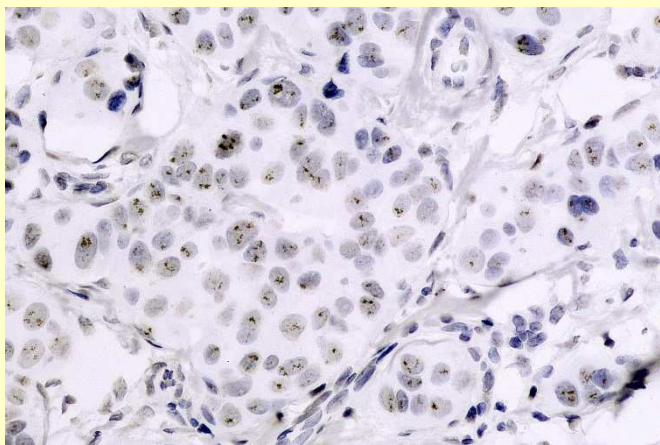
Нормалните клетки имат 2 копия от *HER2/neu* онкогена, едно за всяко от двете копия на хромозома 17. Използвайки за проба центромера на 17-та хромозома (зелен сигнал) в комбинация с алелно-специфичната проба за *HER2/neu* онкогена (оранжев сигнал) се очаква визуализация на 2 зелени и 2 оранжеви сигнала (съотношение 1). При рака на гърдата клетките са подложени на *HER2/neu* онкогенна амплификация, 4 или повече оранжеви сигнала се визуализират в ядрото, показвайки само 2 зелени сигнала (съотношение 2 или повече).



Representative FISH (a) The signal ratio of the two probes was determined to be 1.13 in this sample and, therefore, no amplification of the *HER2* gene was seen. (b) The signal ratio of the two probes was determined to be 5.48 in this sample and, therefore, amplification of the *HER2* gene was determined to have occurred.

Молекулярна патология

CISH, или **хромогенна ин ситу хибридизация**, е процес, при който белязаната комплементарна ДНК или РНК верига е използвана за локализиране на специфична ДНК или РНК последователност в тъканната проба. Методът CISH може да бъде използван за оценка на генната амплификация, генна делеция, хромозомна транслокация и броя на хромозомите. CISH използва конвенционални пероксидна или алкална фосфатаза реакции, визуализирани със стандартен светлинен микроскоп и е приложима за формалин-фиксирани, включени в парафин тъкани.



HER2 CISH при карцином на гърдата с HER2 амплификация.

Молекулярна патология

Flow цитометрия-анализира клетки белязани с флуорохром антитела. Изследваните клетки се намират в суспензия и анализът им се извършва автоматично.

Flow цитометричният анализ намира употреба в клиничната практика в следните случаи:

1. Имунофенотипизиране на хематологичните неоплазми - остри и хронични левкемии, лимфоми (ходжкинови и неходжкинови) и плазмоцитни неоплазми.
2. Измерване на пролиферативно-свързаните антигени - Ki67, PCNA и др.
3. Измерване съдържанието на нуклеинови киселини - измерване съдържанието на РНК в ретикулоцитите, определяне на количественото съдържание на ДНК при различни видове тумори.
4. Диагноза и прогнозиране на имунодефицитните състояния.
5. Диагностициране на причините за отхвърляне на присадката при бъбречна трансплантация.

Молекулярна патология

Анализ на клетъчната пролиферация-
Освен flow цитометрията, степента на пролиферация туморните клетки може да бъде определена чрез различни други методи:

1. Избраване на митозите.
2. Радиоавтография.
3. Микроспектрофотометричен анализ.
4. Имунохистохимия.

ДНК микрочипове

ДНК микрочипове

ДНК микрочиповете са ново приложение на технологията на силиконовите чипове за едновременно анализ на големи обеми от информация, отнасяща се към човешките гени, като откриване и количествено определяне на точкови мутации и единичен нуклеотиден плеоморфизъм.

Микрочипът представлява повърхност с прикрепени към нея проби, улавящи различни таргетни молекули на принципа хибридизация между комплементарни молекули. ДНК микрочиповете се използват за молекулярно профилиране на тумори, което цели достигане до специфична хистогенетична диагноза и прогноза.

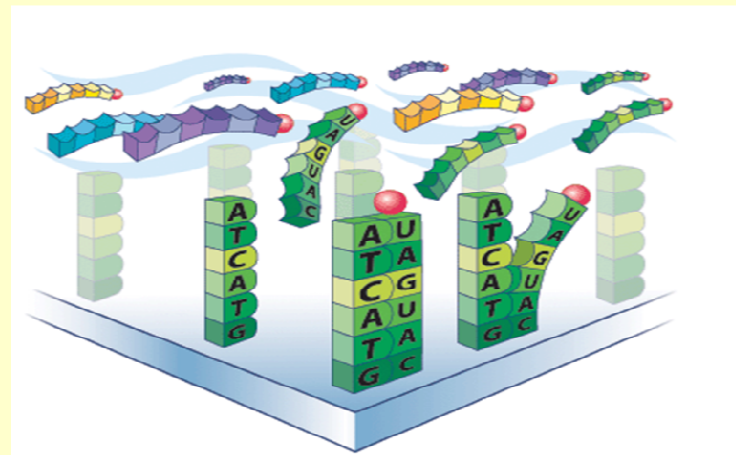
ДНК микрочипове

Хибридизация на маркираната
проба на микрочипа

Цел: множество едновременно
измервания чрез хибридизация
на маркирана проба.

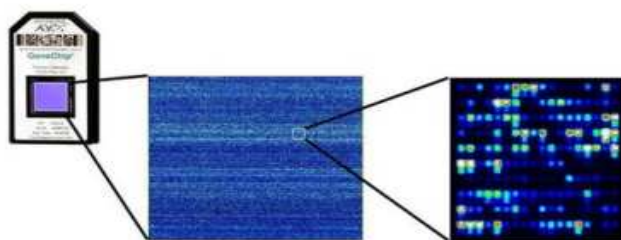
ДНК елементи могат да бъдат:

- Олигонуклеотиди
- Комплементарна ДНК
- Големи геномни клонове

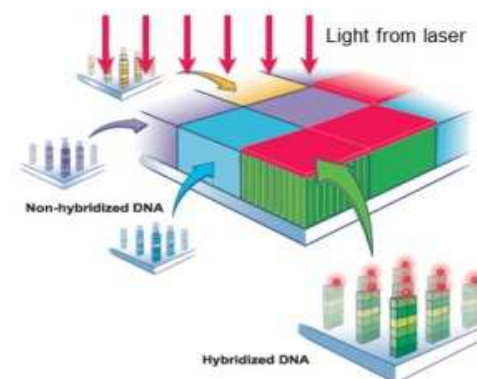


Откриване на хибридизация на
микрочипа

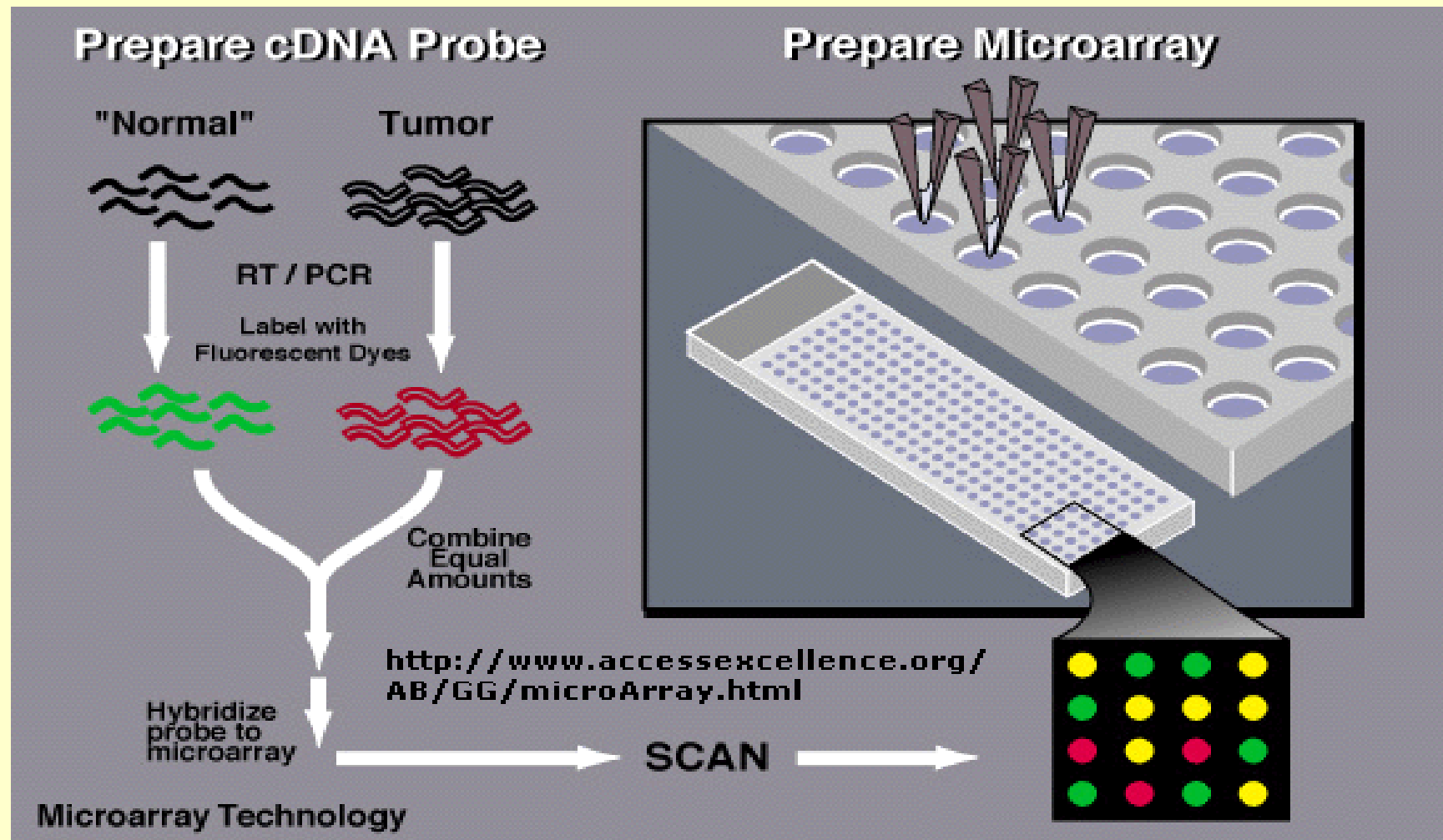
Hybridization intensities on
DNA microarray following laser scanning

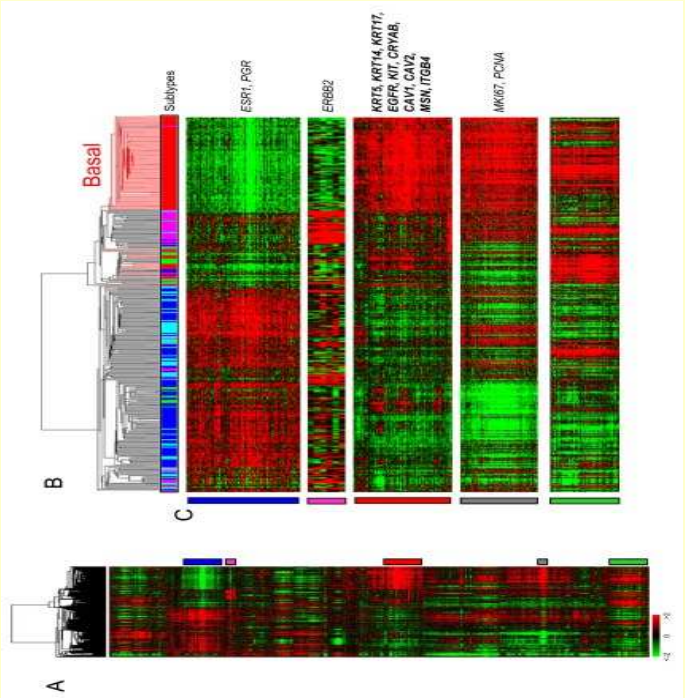


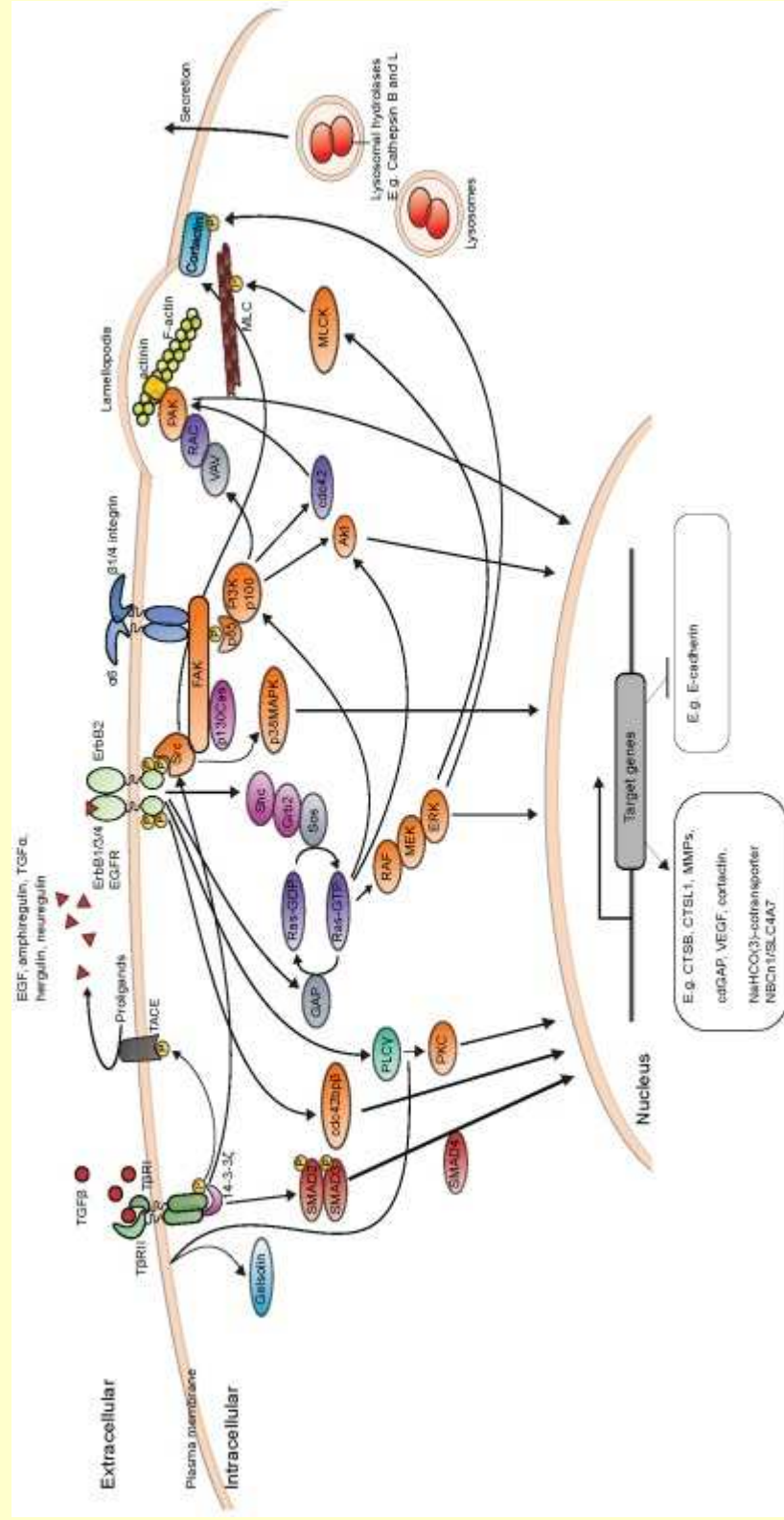
Detection of hybridization on microarray



Техника на приготвяне на генните чипове



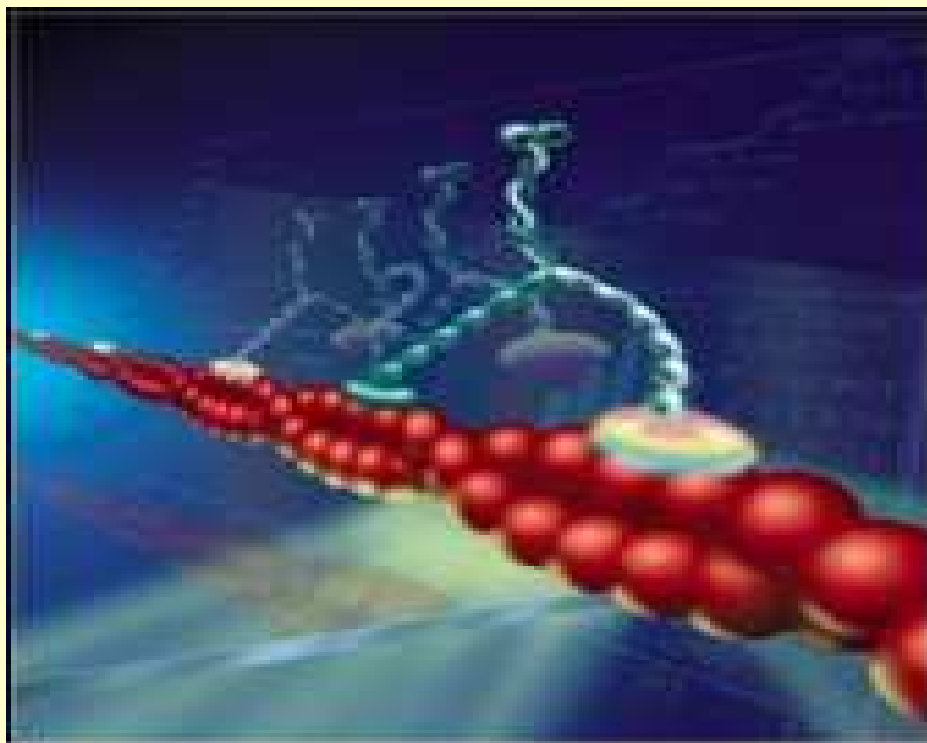




Б. Клинтън - "Научихме се да разбираме езика, на който Бог е
сътворил живота "

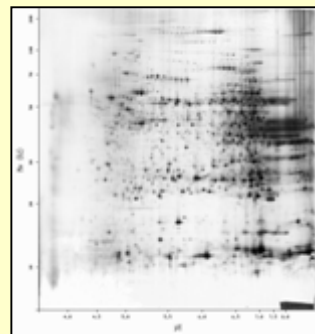
гени 22 000/ протеини 200 000-400 000

*Геномът е статична величина и само теоретично
предсказва какво би станало в клетката*



Принцип на протеомния анализ

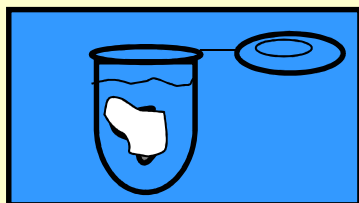
Протеома описва всички протеини експресирани в тъканта



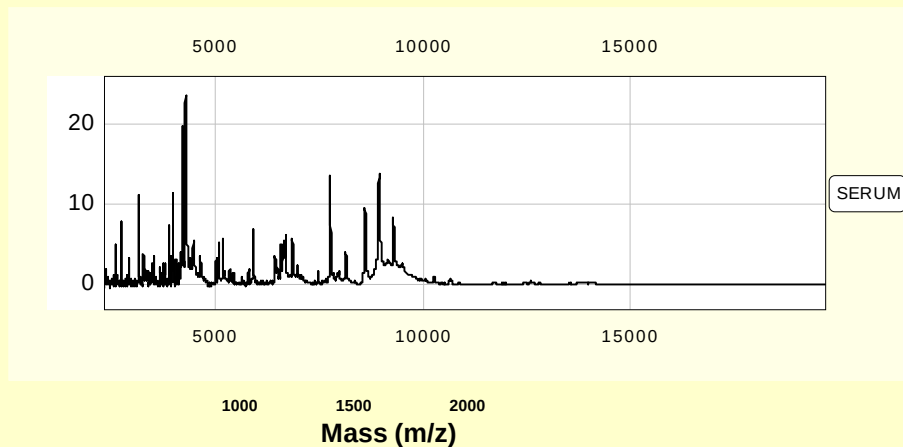
2D gel



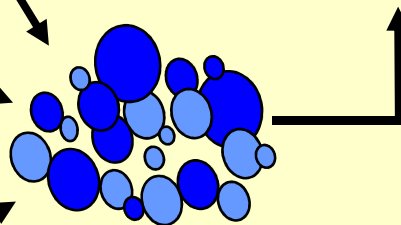
Туморна биопсия



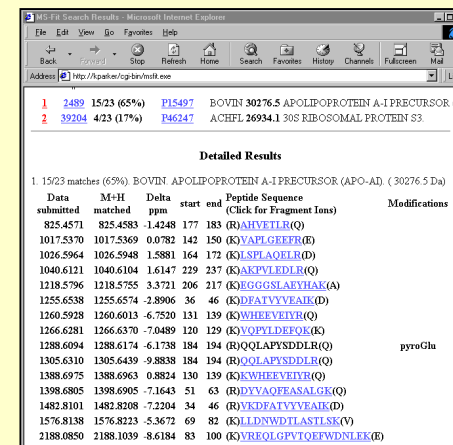
Серум



Анализ чрез
спектрометрия



Проба от
протеини

A screenshot of a database search results page, likely from the NCBI database. It shows a list of search results with columns for 'Data', 'M+H', 'Delta', 'start', 'end', 'Peptide Sequence', and 'Modifications'. The results are sorted by 'Relevance'.

Търсене в базата данни

Циркулиращи туморни клетки (CTCs)

за диагноза и прогноза на рака

Малък брой индивидуални дисеминирани туморни клетки могат да останат скрити за стандартните методи за изследване, като микроскопия или рутинно оцветени цито/хистологични препарати.

Тези клетки се считат за източник на метастази, главна причина за неуспех при лечението на пациенти с рак. Клетките, които метастазират от първичния тумор и попадат на вторично място се наричат Циркулиращи Туморни Клетки (CTCs).

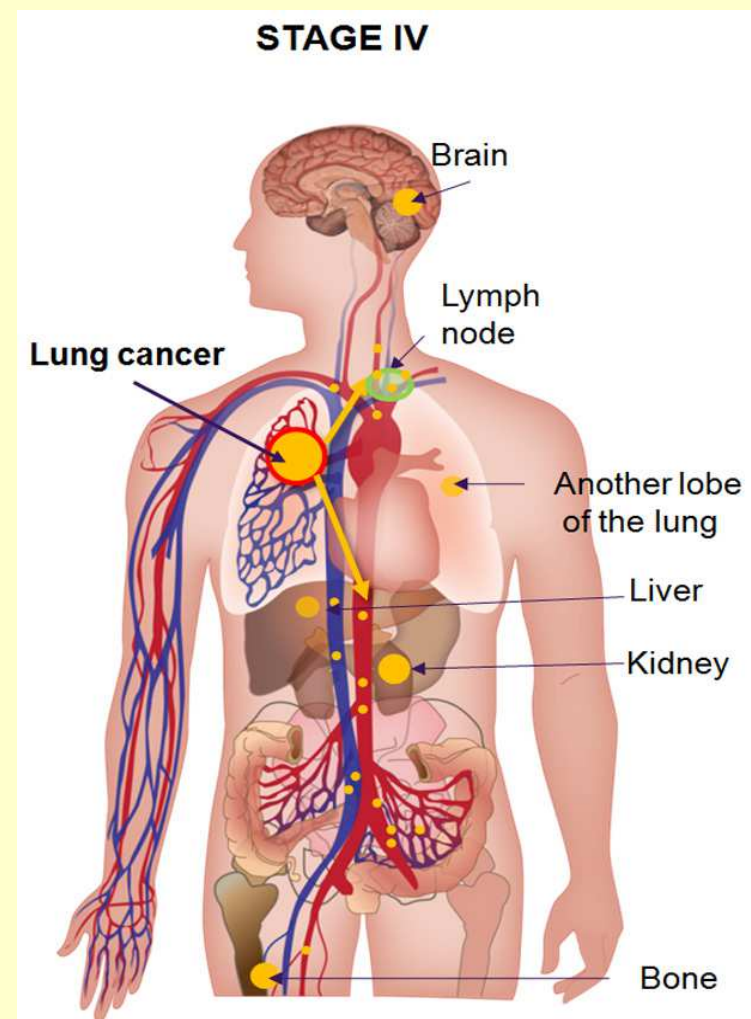
Метастатичното заболяване е най-честата причина за смърт, свързана с рак при пациенти със солидни тумори. Значителен брой доказателства показват, че туморните клетки се разпространяват от първичната туморна маса в ранните етапи на злокачествена прогресия. Част от тези клетки достигат чрез периферната кръв до места анатомично отдалечени от първичния тумор и формират метастази.

Откриването и характеризирането на тези клетки е обещаващ метод за диагнозата и клиничното поведение при пациенти с рак както и проследяване на терапевтичния отговор.

Циркулиращи туморни клетки

Има серия от стъпки, които туморната клетка трябва да премине преди да се появят метастази. В инвазивни стадии клетки навлизат в кръвообращението и достигат отдалечени локализации.

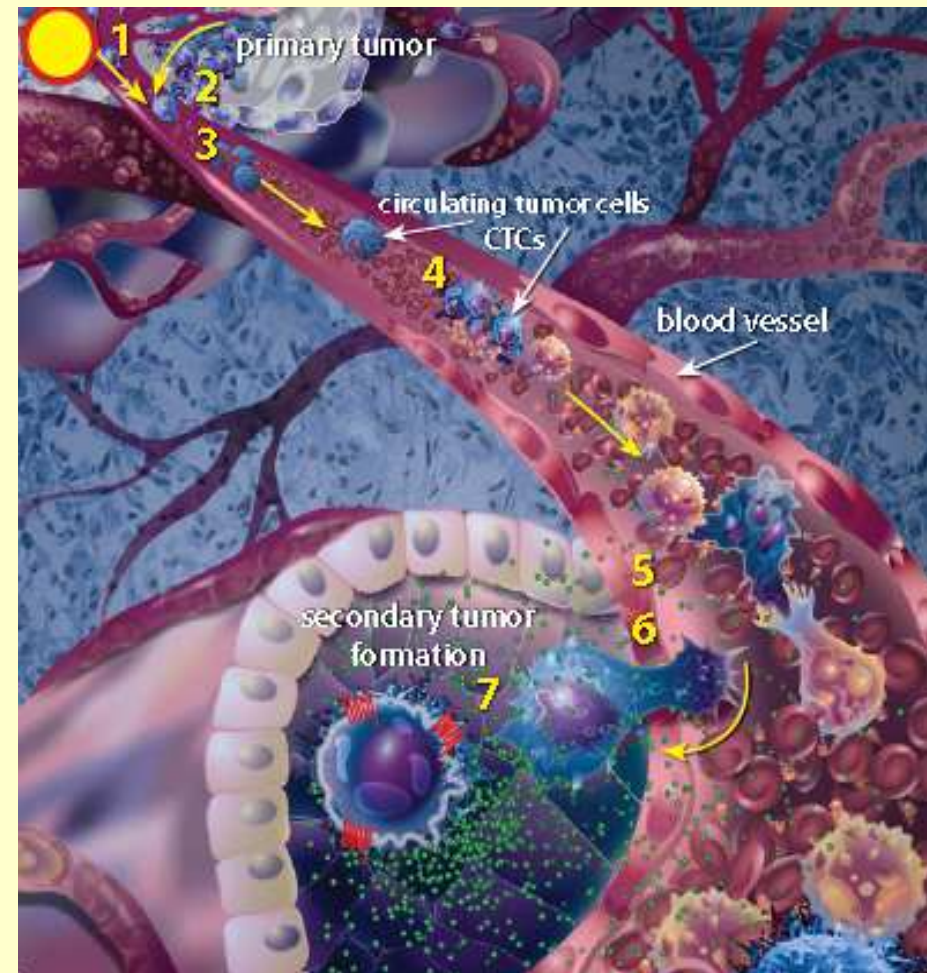
Ако микросредата е подходяща туморните клетки могат да пролиферират и евентуално да формират метастази.



Циркулиращи туморни клетки

Метастатична каскада:

1. Клетките растат като ин ситу лезия
2. Клетките разрушават базалната мембрана
3. Инвазия
4. Попадане в кръвния ток
5. Прилепване за капилярната стена
6. Излизане от кръвоносния съд (Екстравазация)
7. Пролифериране и формиране на метастази

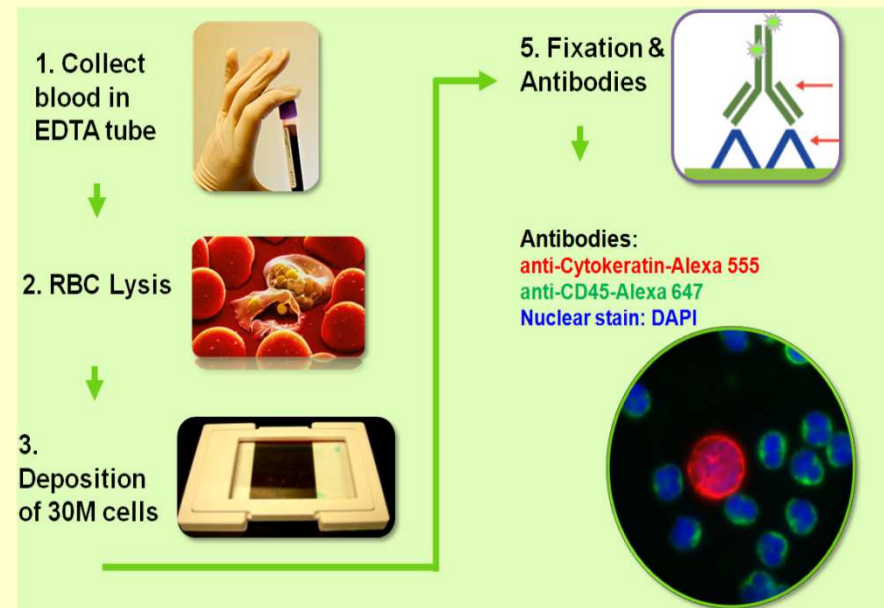


Циркулиращи туморни клетки

Откриването на циркулиращи туморни клетки може да има важно прогностично и терапевтично значение, макар че техния брой може да е много малък и да не се открият лесно.

Подходът, който се използва за откриването на окултни метастази е измерване на циркулиращи туморни клетки в периферна кръв.

Надеждното измерване на циркулиращи туморни клетки зависи от подготовката на пробата и метода за откриване и от там изследванията в тази област трябва да бъдат насочени, за да се разработи надежден и клинично приложим метод.



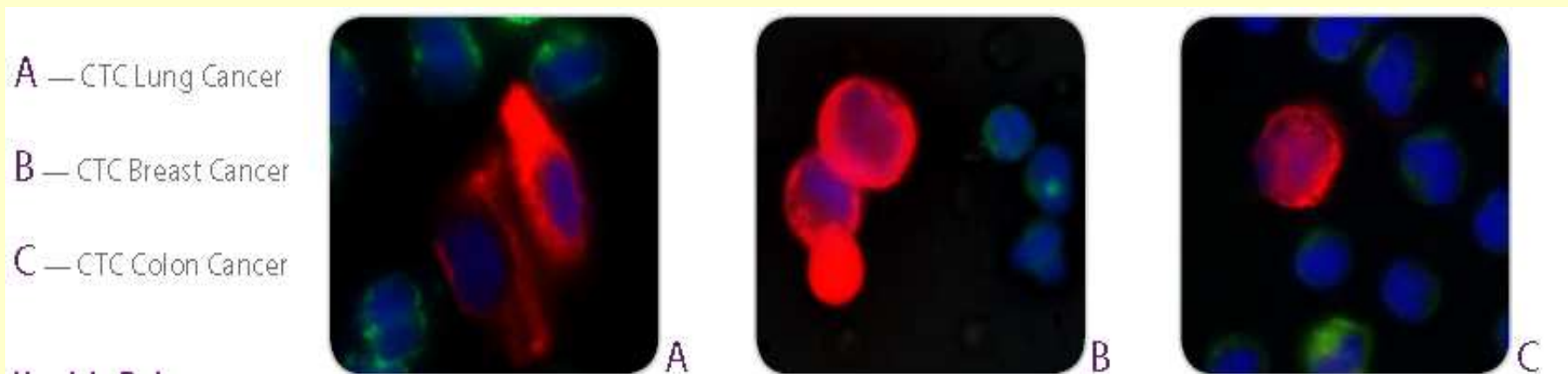
Циркулиращи туморни клетки

Плеоморфизъм на циркулиращите туморни клетки – Цитологично първичните и метастатичните тумори показват плеоморфизъм всред индивидуалните клетки на туморната тъкан. Циркулиращите клетки от същите тези пациенти запазват тази цитоморфология, показваща цялостен плеоморфизъм с вариации в размера, формата както и отношението ядро/цитоплазма. Оказва се, че циркулиращите туморни клетки запазват цитологичните характеристики на първичния тумор и че те представляват случайни проби от много фенотипни клетъчни типове, присъстващи в първичните и метастатичните туморни депозити.



Циркулиращи туморни клетки

Хетерогенност на циркулиращите туморни клетки



Циркулиращи туморни клетки

Потенциалното приложение на откриването на циркулиращи туморни клетки от периферната кръв е ранната диагноза на туморите.

По неизвестни причини по време на растежа на първичния тумор, инвазивни субпопулации клетки от първичния тумор получават достъп до кръвообращението. Повечето туморни клетки, отделящи се от първичния тумор се унищожават в циркулацията и не формират метастази. Откриването на такива клетки може предостави ранна информация за наличие на злокачествено заболяване. С допълнителна употреба на подходящи тъканни и/или органо специфични маркери, скрининга на циркулиращи туморни клетки може да бъде ранен индикатор на възможността за метастизиране на злокачественото заболяване.

Циркулиращи туморни клетки като течна биопсия в реално време:

Дава възможност за Откриване, Прогноза и Индивидуална терапия при пациентите с рак:

- Открива неефикасно лечение, дори преди туморните маркери да покажат някакъв отговор.
- Открива ранен тумор при “здрави” хора.

Next Generation Секвениране

ДНК секвениране

ДНК секвениране = определяне на нуклеотидната последователност (A, T, G, and C) на ДНК на гена.

Next generation sequencing (NGS) се определя като множествоно паралелно секвениране, което означава че милиони малки фрагменти от ДНК могат да се секвенират по едно и също време, създавайки огромна база данни, достигаща гигабайти информация.

Това е невероятно мощна разработка, която има потенциала да определи точно къде е генната алтерация , както и възможността за идентифициране на някои неочаквани находки.

Определяйки на молекулярния профил на туморната проба чрез NGS ,се идентифицират алтерации, позволяващи избор най-подходящата лекарствена терапия за пациента и клинични тестове, в които пациента да участва в разработването на ново и ефективно лечение на туморите.

Телепатология

Телепатологията представлява приложение на диагностичната патология, при което отдалечен патолог разглежда снимки на тъкани за изследване, получени по телекомуникационната мрежа.

Основните компоненти на телепатологичната система са:

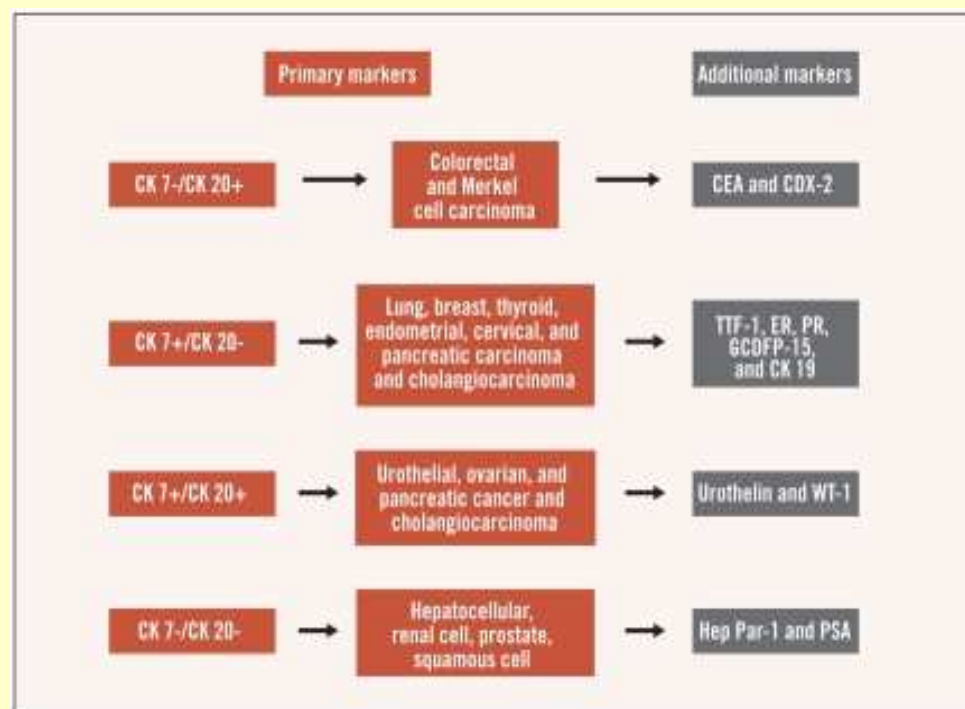
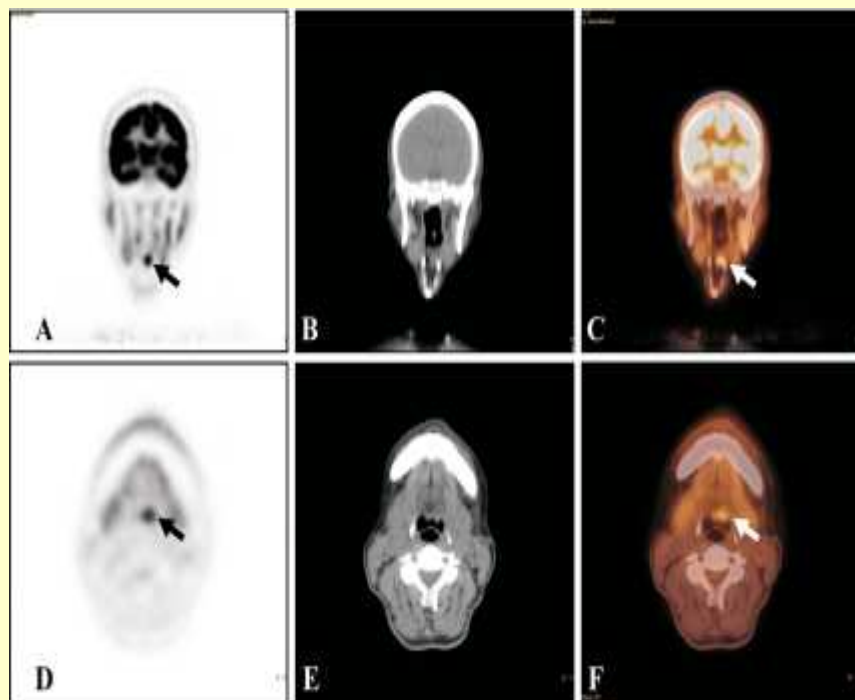
- Конвенционален светлинен микроскоп.
- Метод за дигитализиране на снимките.
- Телекомуникационна връзка между изпращащата и получаващата страна.
- Висококачествен монитор при получаващата страна.

Телепатологичните системи са два вида:

- *Статични*- избраните снимки са дигитализирани, скенирани след това изпратени по интернет ,чрез e-mail или други методи за обмен на информация.
- *Динамични* – снимките се изпращат в реално време.

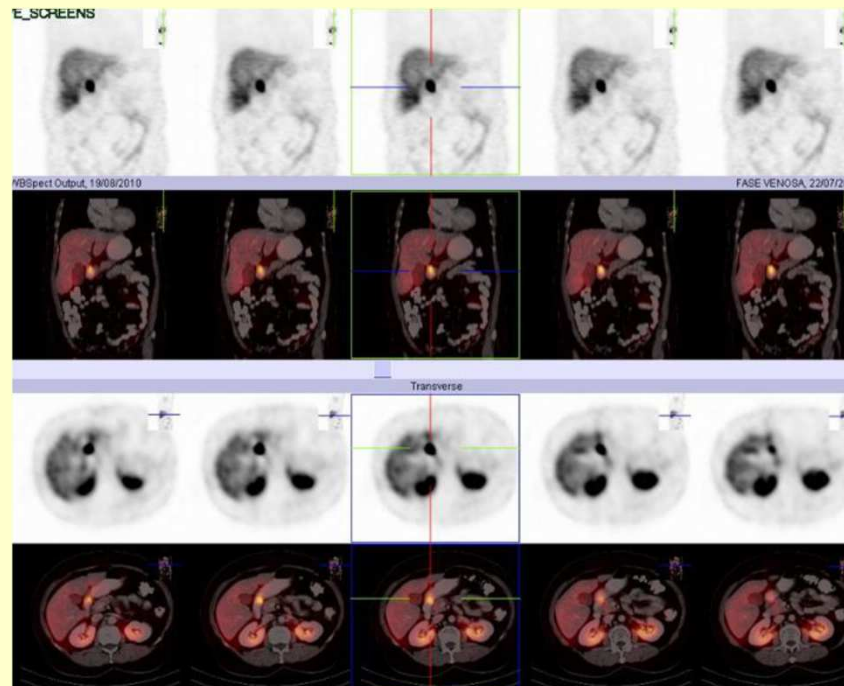


Окултен карцином-биопсично доказан малигном с неясна първична локализация

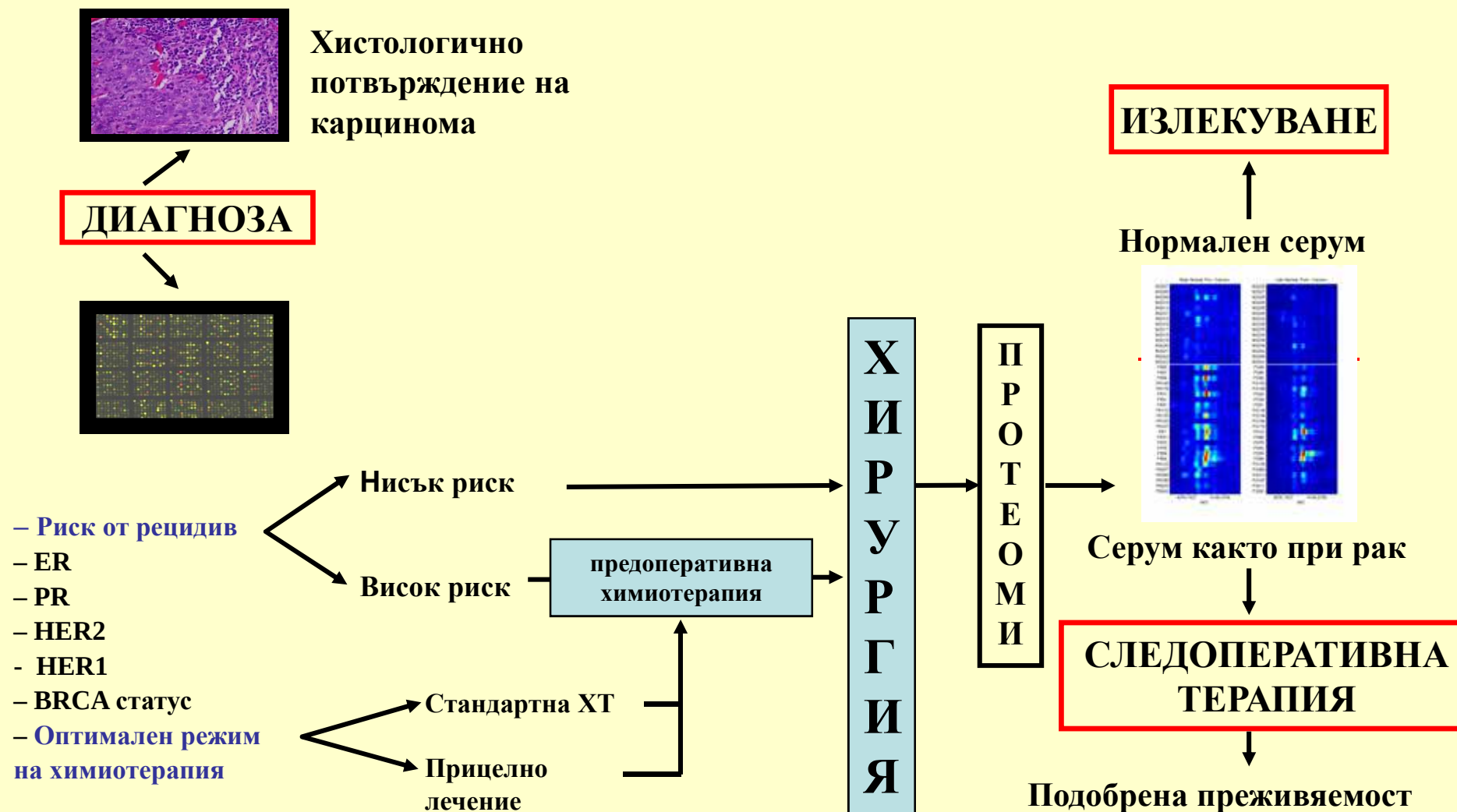


NEUROENDOCRINE TUMORS Somatostatin Receptor Scintigraphy

- Локализация на първичен тумор
- стадиране
- Ефект от лечение
- Селектира пациенти за радионуклеотидно лечение



Близкото бъдещето на диагностиката и терапията в онкологията



“Стабилността и успехите на дадена група от хора в голяма степен зависят от сътрудничеството на отделните членове помежду им и с членове на други групи”

„Произход на видовете” (1871) Чарлз Дарвин

Ravenna, Chiesa di Santa Maria Maggiore
La Madonna dei Tumori

