

## ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ, ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΝΕΚΡΟΤΟΜΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ

Η Γενική Παθολογική Ανατομική έχει σαν αντικείμενο τη μελέτη των λειτουργικών αλλαγών και των δομικών αλλοιώσεων που παρατηρούνται στα κύτταρα και στους ιστούς, οι οποίες οφείλονται σε ποικίλα αίτια και αποτελούν αντίδραση στα αίτια αυτά.

Στα γνωστικά της αντικείμενα περιλαμβάνονται οι μελέτες:

- Του αιτίου της νόσου (**αιτιολογία**).
- Των μηχανισμών με τους οποίους οι αιτιοπαθογενετικοί παράγοντες (αίτιο) προκαλούν αλλοιώσεις στα κύτταρα και στους ιστούς (**παθογένεση**).
- Των ίδιων των μορφολογικών αλλοιώσεων.

Η Παθολογοανατομική προσέγγιση της νόσου αποτελεί σύνθεση πολλών γνωστικών αντικειμένων του κλάδου όπως:

- Η Χειρουργική Παθολογική Ανατομική
- Η Κυτταροπαθολογία
- Η Νεκροτομική Παθολογική Ανατομική

και εφαρμόζονται διάφορες εργαστηριακές τεχνικές:

- Μικροσκόπηση (ο θεμέλιος λίθος όλης της διαγνωστικής ιστοπαθολογίας)
- Ιστοχημεία
- Ανοσοϊστοχημεία
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
- Μοριακές τεχνικές (Μοριακή Παθολογική Ανατομική).

## Χειρουργική παθολογική ανατομία

Το αντικείμενό της είναι η μελέτη των ιστών που λαμβάνονται από ζώντες ασθενείς με σκοπό τη διάγνωση. Η εξέταση των υλικών της βιοψίας ή της χειρουργικής αφαίρεσης παρέχει:

- Ιστολογική διάγνωση
- Πληροφορίες για την πρόγνωση
- Πληροφορίες για την αιτιολογία και την παθογένεση της νόσου.

### Τομές παραφίνης

Είναι ο ακρογωνιαίος λίθος των εργασιών ενός ιστοπαθολογικού εργαστηρίου. Η έγκλειση σε παραφίνη δίνει στους ιστούς μια σκληρότητα που επιτρέπει τη λήψη λεπτών (3-5 μm) τομών. Αυτές μπορούν να βαφούν και να εξετασθούν στο μικροσκόπιο.

Ο κύβος (block) παραφίνης και οι τομές που λαμβάνονται είναι σταθερές και μπορούν να διατηρηθούν επ' αόριστον. Οι τομές παραφίνης παρέχουν το καλύτερο υλικό για ιστολογική εξέταση. Η διαδικασία επεξεργασίας του ιστού για τομές παραφίνης διαρκεί 24-48 ώρες από τη λήψη του ιστού από τον ασθενή ως τη διατύπωση της γραπτής παθολογοανατομικής διάγνωσης. Απαιτούνται διάφορα βήματα.

**Μονιμοποίηση.** Μπορεί να επιτευχθεί με μια ποικιλία διαλυμάτων, εκ των οποίων το διάλυμα φορμόλης είναι ένα εκ των ευρέως διαδεδομένων. Ο χρόνος μονιμοποίησης εξαρτάται από το μέγεθος του υλικού και εν γένει διαρκεί 8-24 ώρες, με τις μικρότερες βιοψίες να διαρκούν τον λιγότερο χρόνο. Όταν υπάρχουν ολόκληρα όργανα μπορεί να απαιτηθεί η διάνοιξη (αν είναι κοίλα) ή η διατομή τους για να διευκολυνθεί η διάχυση της φορμόλης στους ιστούς (η διαπότιση τους στη φορμόλη). Η καθυστέρηση ή η ανεπαρκής μονιμοποίηση προκαλεί τις αυτολυτικές και εκφυλιστικές αλλοιώσεις των ιστών και ανεπαρκή ιστολογική εικόνα που σε ακραίες περιπτώσεις καθιστά το υλικό μη διαγνωστικό (ακατάλληλο για διάγνωση).

**Αφαλάτωση.** Τα υλικά που περιέχουν οστίτη ιστό πρέπει να γίνουν πιο μαλακά με αφαλάτωση. Ο χρόνος που χρειάζεται γι' αυτό εξαρτάται από το μέγεθος και τη σκληρότητα των υλικών όπως είσως και από το διάλυμα της απαασβέτωσης που χρησιμοποιείται.

**Επιλογή ιστού – λήψη τομών.** Διενεργείται από τον παθολογοανατόμο που εξετάζει τη μακροσκοπική εμφάνιση υλικού και επιλέγει τα τμήματα που χρειάζεται να μικροσκοπηθούν.

**Επεξεργασία του ιστού.** Διενεργείται αυτοματοποιημένα από ένα

μηχάνημα που εμβαπτίζει τους ιστούς σε μια ποικιλία διαδοχικών χημικών διαλυμάτων. Σε πολλά εργαστήρια η διαδικασία αυτή γίνεται κατά τη διάρκεια της νύχτας.

**Εγκλεισμός σε παραφίνη.** Οι ιστοί τοποθετούνται (εγκλείονται) σε έναν κύβο (block) παραφίνης.

**Μικροτόμηση.** Λεπτές τομές κόβονται σε μικροτόμους από εξειδικευμένους τεχνικούς, περνώντας τον κύβο παραφίνης πάνω από μια αιχμηρή λεπίδα. Οι τομές στη συνέχεια τοποθετούνται σε γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες.

**Χρώση τομών.** Οι τομές που βρίσκονται πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες περνούν από μια σειρά χημικών διαλυμάτων και χρωστικών για να χρωματισθούν. Γενικά η χρώση ρουτίνας που χρησιμοποιείται για τις ιστολογικές τομές διενεργείται με ένα μείγμα αιματοξυλίνης και ηωσίνης. Η αιματοξυλίνη βάφει τους πυρήνες μπλε και η ηωσίνη βάφει το κυτταρόπλασμα και άλλα συστατικά σε απόχρωση του ροζ.

### **Τομές ψυκτικού μικροτόμου (ταχεία βιοψία)**

Τομές ιστών για μικροσκόπηση μπορούν να κοπούν γρήγορα από ιστούς που έχουν ψυχθεί. Η τεχνική διαρκεί 15-20 λεπτά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ιστολογική επεξεργασία του ιστού, ενώ ο ασθενής παραμένει στο χειρουργείο ευρισκόμενος υπό αναισθησία.

Η μορφολογική απεικόνιση των τομών ψυκτικού μικροτόμου είναι γενικά κατώτερη από τις τομές παραφίνης και η ποσότητα του υλικού που εξετάζεται είναι περιορισμένη. Μολονότι κάποια κέντρα διενεργούν εξετάσεις τομών ψυκτικού μικροτόμου όλων των χειρουργικών παρασκευασμάτων, οι ενδείξεις για τομές ψυκτικού μικροτόμου (ταχεία βιοψία) περιορίζονται σε καταστάσεις όπου ο καθορισμός της βλάβης μπορεί να τροποποιήσει την άμεση χειρουργική αντιμετώπιση του ασθενούς, π.χ.

- Η Διάγνωση ενός όγκου
- Ο Καθορισμός της εξάπλωσης του όγκου (περιλαμβάνοντας την διαπίστωση διήθησης των λεμφαδένων και τις μεταστάσεις)
- Ο Καθορισμός της επάρκειας της εκτομής ενός όγκου (όρια εκτομής).

### **Ιστοχημεία**

Διάφορα ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά στοιχεία βάφονται διαφορετικά με συγκεκριμένες χρώσεις. Παραδείγματος χάριν, μπορεί να

χρησιμοποιηθούν χρώσεις που να προσδιορίζουν γλυκογόνο, βλέννη, μελανίνη, σίδηρο/αιμοσιδηρίνη, ασβέστιο, δικτυωτές ίνες, κόκκοι αργενταφίνης, αμυλοειδές και στοιχεία του συνδετικού ιστού. Είναι σχετικά φθηνές και εύκολες στη χρήση.

### **Ανοσοϊστοχημεία**

Βασίζεται στην ιδιότητα σεσημασμένων αντισωμάτων να προσδένονται σε ειδικά αντιγόνα των ιστών. Η σήμανση μπορεί να αναγνωρισθεί χρησιμοποιώντας ένα χρωμογόνο και το υπόβαθρο (background) του ιστού χρωματίζεται απλά, έτσι ώστε τα σεσημασμένα κύτταρα να αναγνωρίζονται μέσα στον ιστό που βρίσκονται.

Πολλά είδη κυττάρων εκφράζουν ειδικά αντιγόνα, επιτρέποντας έτσι την ταυτοποίησή τους.

### **Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο**

Επιτρέπει τη λεπτομερή μελέτη ενδο- και εξωκυττάρων συστατικών των κυττάρων και των ιστών. Διαφορετικά είδη κυττάρων έχουν διαφορετική δομή ως προς την κυτταρική μεμβράνη και τα κυτταρικά συστατικά.

Χρησιμεύει στη διαφορική διάγνωση ορισμένων τύπων όγκων και χρησιμοποιείται στη ρουτίνα για την εξέταση των δομών των νεφρικών σωματίων στη βιοψία του νεφρού.

### **Μοριακή παθολογική ανατομική**

**In situ υβριδισμός.** Βασίζεται στην ικανότητα μιας σεσημασμένης μονής έλικος νουκλεονικού οξέος να προσδένεται στη συμπληρωματική της. Εφαρμόζεται σε DNA ή RNA επιτρέποντας την ταυτοποίηση συγκεκριμένων DNA ή RNA αλληλουχιών οι οποίες είναι δυνατόν να ανήκουν στον ίδιο τον οργανισμό, σε βακτηρίδια ή σε ιούς J. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε τομές ιστών όπου διατηρείται η μορφολογία των κυττάρων και έχουμε μορφολογικό εντοπισμό του σήματος. Χρησιμοποιούνται ραδιενεργά ή μη ραδιενεργά συστήματα σήμανσης.

**Τεχνικές Blot υβριδισμού.** Χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, RNA ή DNA αφού έχει προηγηθεί εκχύλιση από τους ιστούς:

- DNA – Southern blot
- RNA – Northern blot
- Πρωτεΐνες - Western blot.

Ο Southern blot υβριδισμός επιτρέπει την ανίχνευση συγκεκριμένων DNA αλληλουχιών με μελέτη κλασμάτων (τμημάτων) DNA τα οποία προκύπτουν μετά την πέψη με ενδονουκλεάσες (που κόβουν το DNA σε θέσεις που περιέχουν συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες). Στα ανωτέρω προϊόντα γίνεται ηλεκτροφόρηση σε γέλη (gel) και διαχωρισμός κατά μέγεθος. Στη συνέχεια τα προϊόντα μεταβαίνουν από την εύθραυστη γέλη σε μια πιο σταθερή μεμβράνη και μπορεί να υβριδισθούν με σεσημασμένους DNA δείκτες.

**Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).** Επιτρέπει την ταυτοποίηση μικρής ποσότητας DNA. Τμήματα DNA ενισχύονται σε μεγάλες ποσότητες χρησιμοποιώντας μία DNA πολυμεράση και δύο DNA εκκινήτες που οριοθετούν την περιοχή του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Καθώς μόνο το τμήμα του DNA ανάμεσα στους εκκινήτες ενισχύεται σταθερά σε κάθε κύκλο, το προϊόν μπορεί να ηλεκτροφορηθεί και η ζώνη ηλεκτροφόρησης που προκύπτει να μελετηθεί οπτικά με την εφαρμογή χρώσης βρωμιούχου ιωδίου. Η αντίδραση περιλαμβάνει διάφορους κύκλους στους οποίους το μείγμα θερμαίνεται περιοδικά σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

- Αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA σε μονές αλυσίδες (94° για 30-90 δευτερόλεπτα)
- Υβριδισμός των εκκινήτων σε κάθε μονή αλυσίδα (55° για 30-120 δευτερόλεπτα)
- Επιμήκυνση των εκκινήτων χρησιμοποιώντας τη θερμοάντοχη τα πολυμεράση (72° για 60-18 δευτερόλεπτα).

Σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η ποσότητα της DNA αλληλουχίας του δείγματος που είναι παρούσα. Συνήθως εφαρμόζονται περίπου 30 κύκλοι οι οποίοι ενισχύουν το DNA δείγμα περίπου κατά 1 δισεκατομμύριο φορές.

## Κυτταροπαθολογία

Το αντικείμενό της είναι η μορφολογική εξέταση του συνόλου των μεμονωμένων κυττάρων που περιέχονται στα υγρά του σώματος και τα επιχρίσματα ή τα ξέσματα αποφολιδούμενων κυττάρων ή στο υλικό που αναρροφάται από στερεό ιστό. Το υπό εξέταση υλικό διακρίνεται σε δύο κύριες κατηγορίες υλικών:

- Γυναικολογικό – υλικό τραχηλικών επιχρισμάτων τα περισσότερα