

Pathologiai Diagnosztika

Molekuláris pathologia



A pathologia módszertana II.

Prof. Dr. Kiss András

Ph.D., D.Sc.

II. Sz. Patológiai Intézet

*Oktatás, kutatás,
gyógyítás: 250 éve az
egészség szolgálatában*

Őszi szemeszter November 2021

XX. századi technológiák

⇒ Makroszkópia (indítás)

⇒ Citologia

⇒ Szövettan

⇒ Citokémia

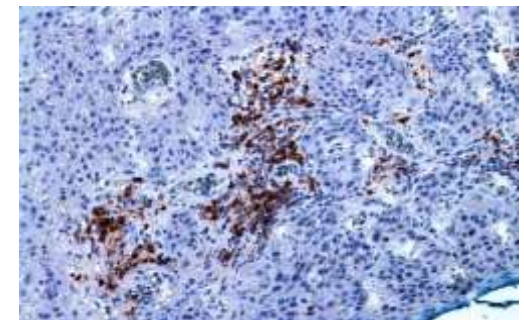
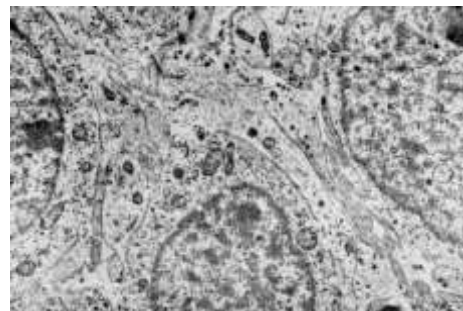
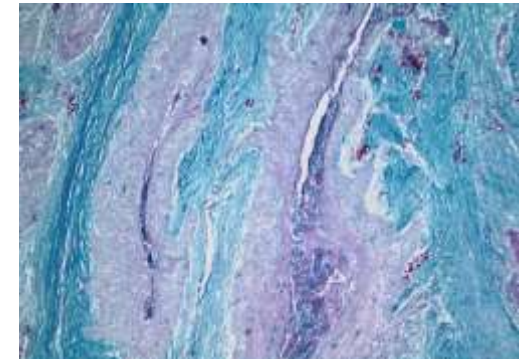
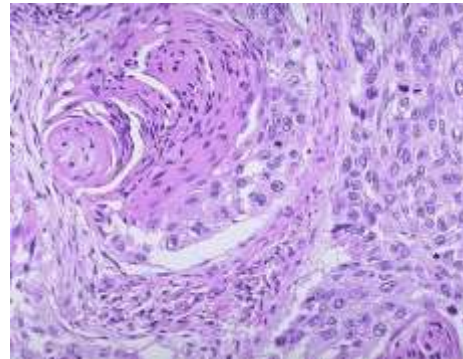
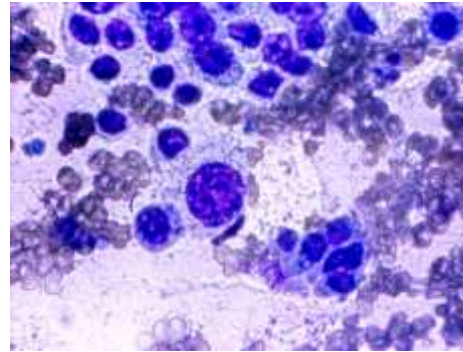
⇒ Immunhisztó/citokémia

⇒ Electronmikroszkópia

⇒ Molekuláris biológia

⇒ Molekuláris genetika

⇒ XXI. század.



Pathologiai diagnosis

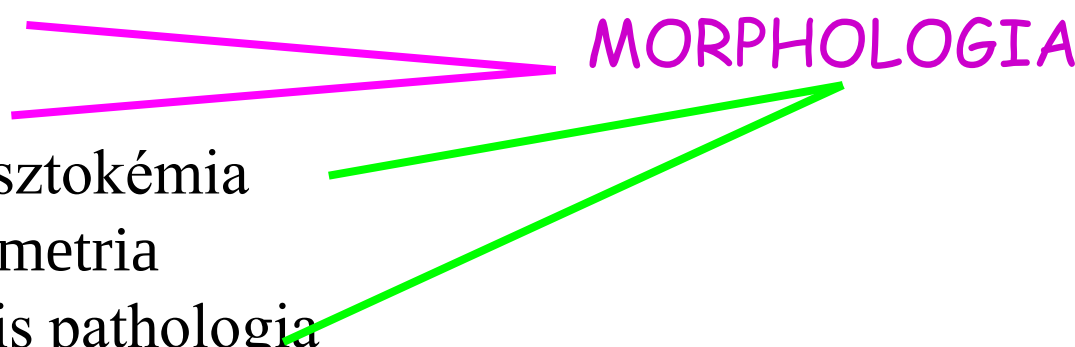
Klinikai Laboratórium

Orvosi Mikrobiológia

Pathologia - Anatomical pathology (+ clinical pathology)
- Molekuláris pathologia

Cytologia
Histologia
Immunohisztokémia
Flow Cytometria
Molekuláris pathologia

MORPHOLOGIA



Vizsgálati anyagok

- ↪ Műtéti preparátum
- ↪ Biopszia – szövethenger/darab
- ↪ Sejtek – CYTOLÓGIA
- ↪ Folyadékok
- ↪ Emberi test



A pathológus munkája

- Szövettani minták elemzése, diagnosis, vélemény
- Cytológiai vizsgálat – sejtek morphológiája
- Speciális vizsgálatok végzése: dg. pontosítása
- Kórboncolás elvégzése, értékelése
- Oktatás
- Tanácsadás (**szóban is!!!**)



AAA: Amicability
Availability
Affinity

P4

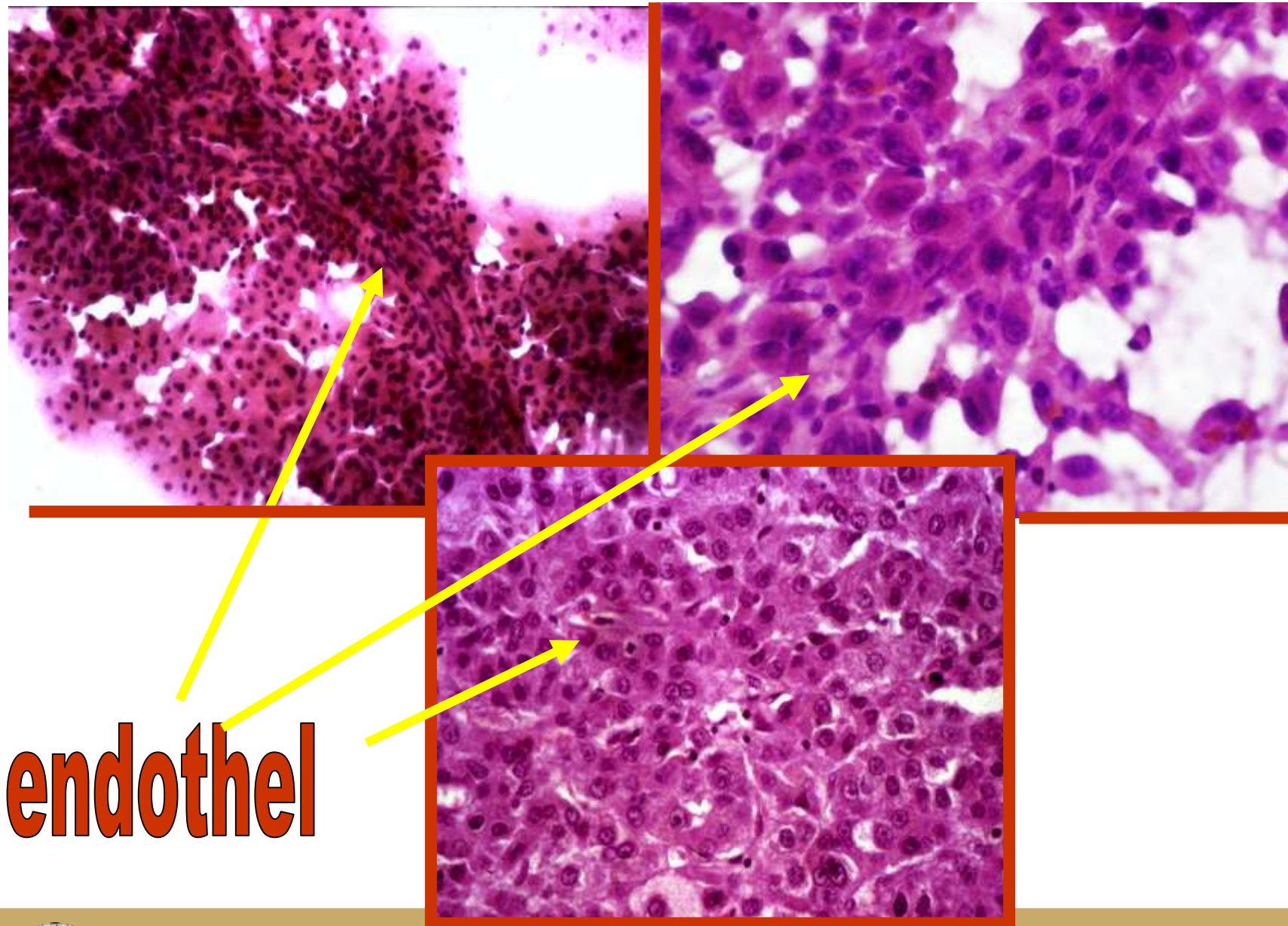
Predictive

Preventive

Personalized

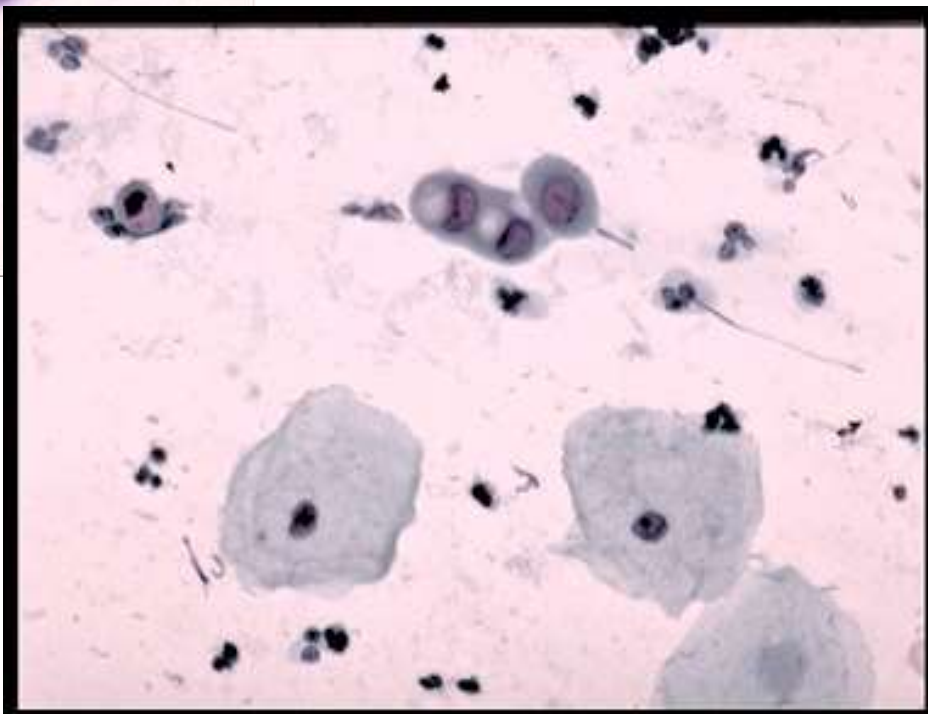
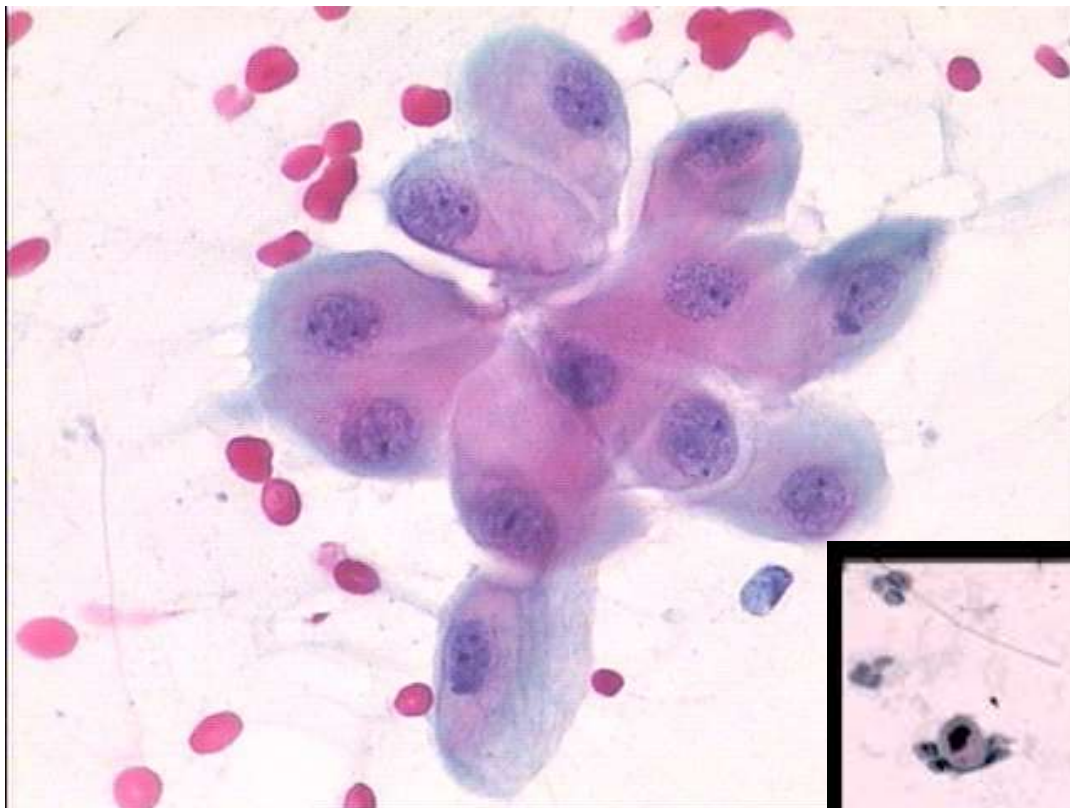
Participatory

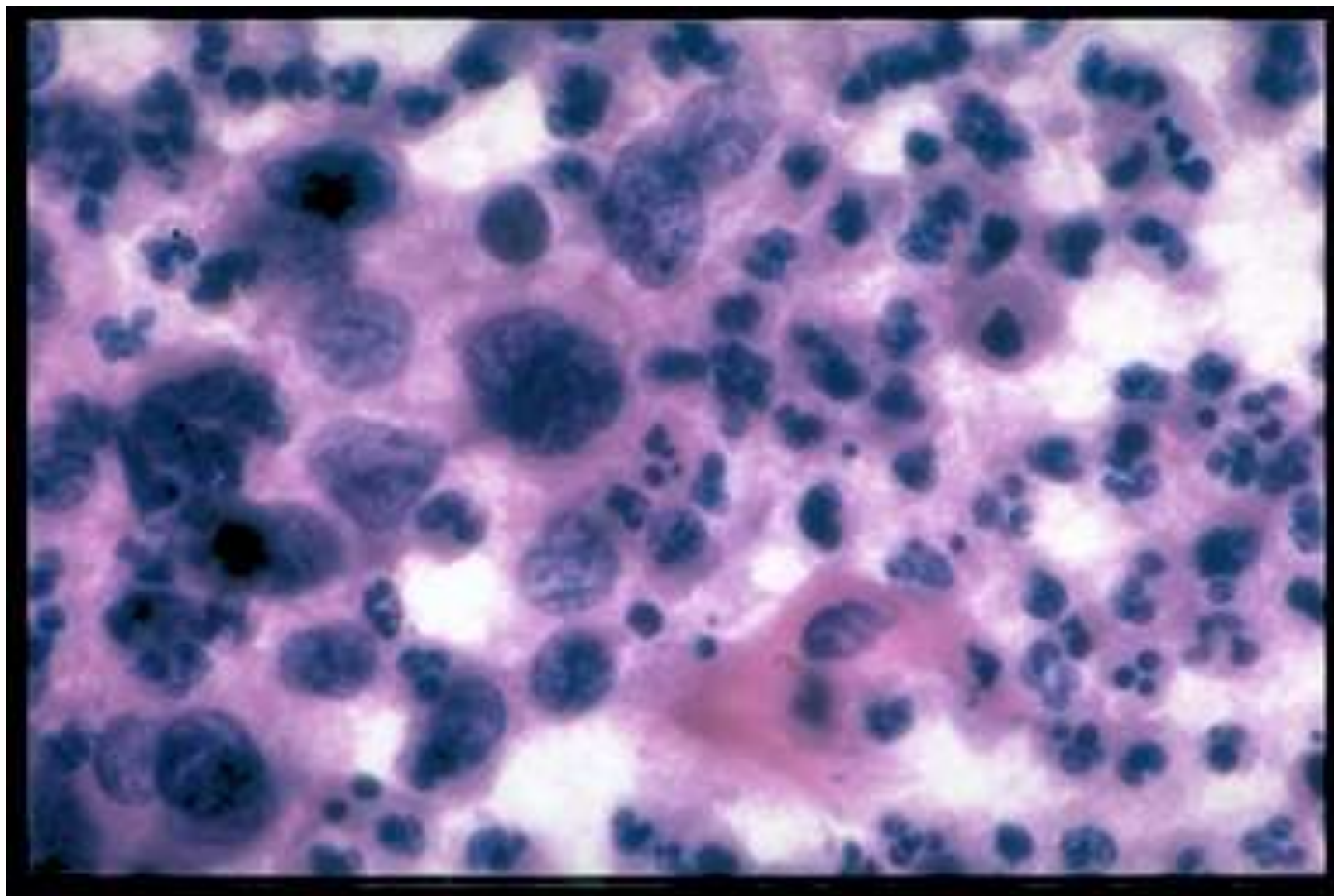


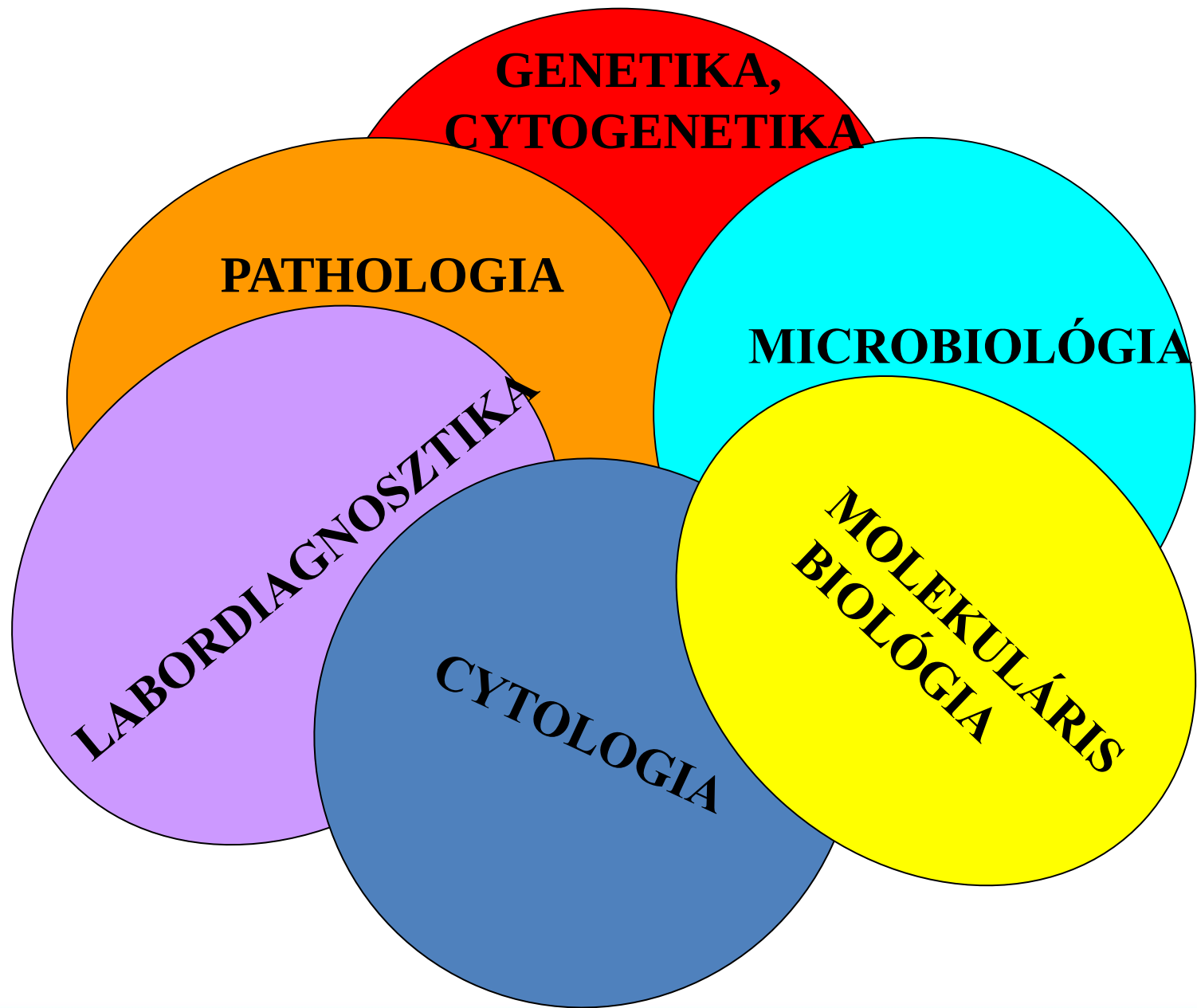


endothel









Biopszia indikációk

Diffus/multifocalis eltérések

- Folyamat etiológiájának tisztázása
- Szisztémás kezeléshez szükséges paraméterek meghatározása

Solitaer eltérések

- Etiológia, dignitás tisztázása
- Műtéti kezeléshez szükséges paraméterek meghatározása



Biopszia típusok

↪ Citológia

- ↪ Kefe

- ↪ Folyadék

- ↪ Vékonytű aspirációs

↪ Szöveti mintavétel

- ↪ Excisios (direkt, nyílt műtéti, video asszisztált)

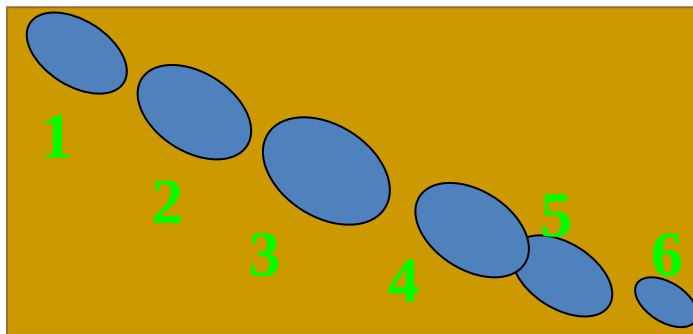
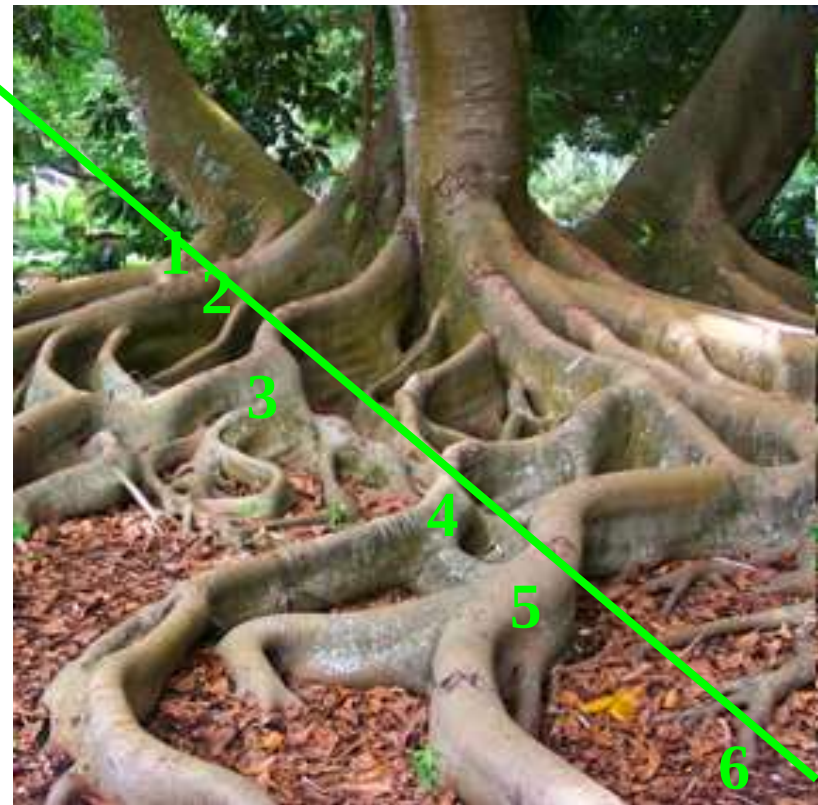
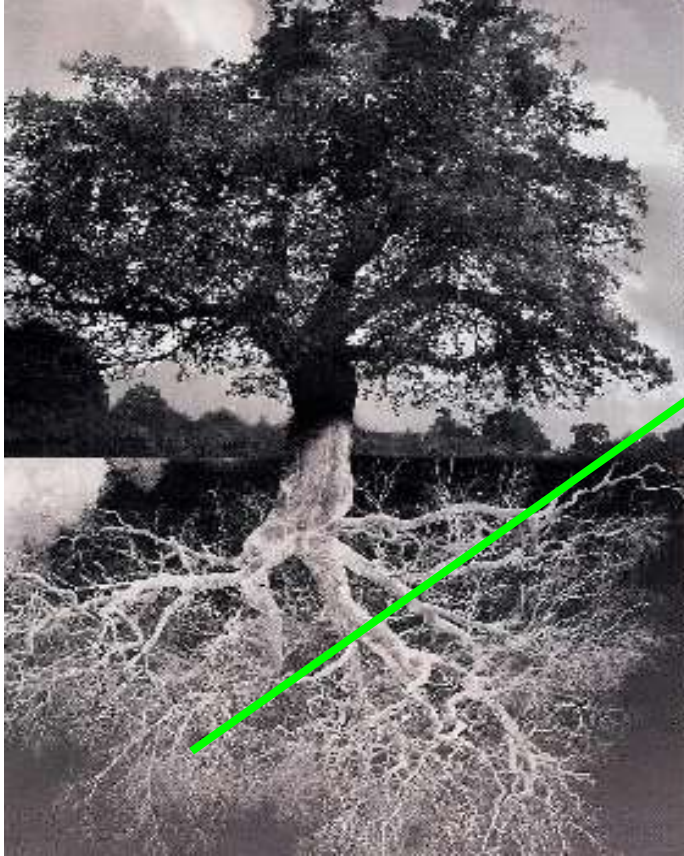
- ↪ Vastagtű (core)

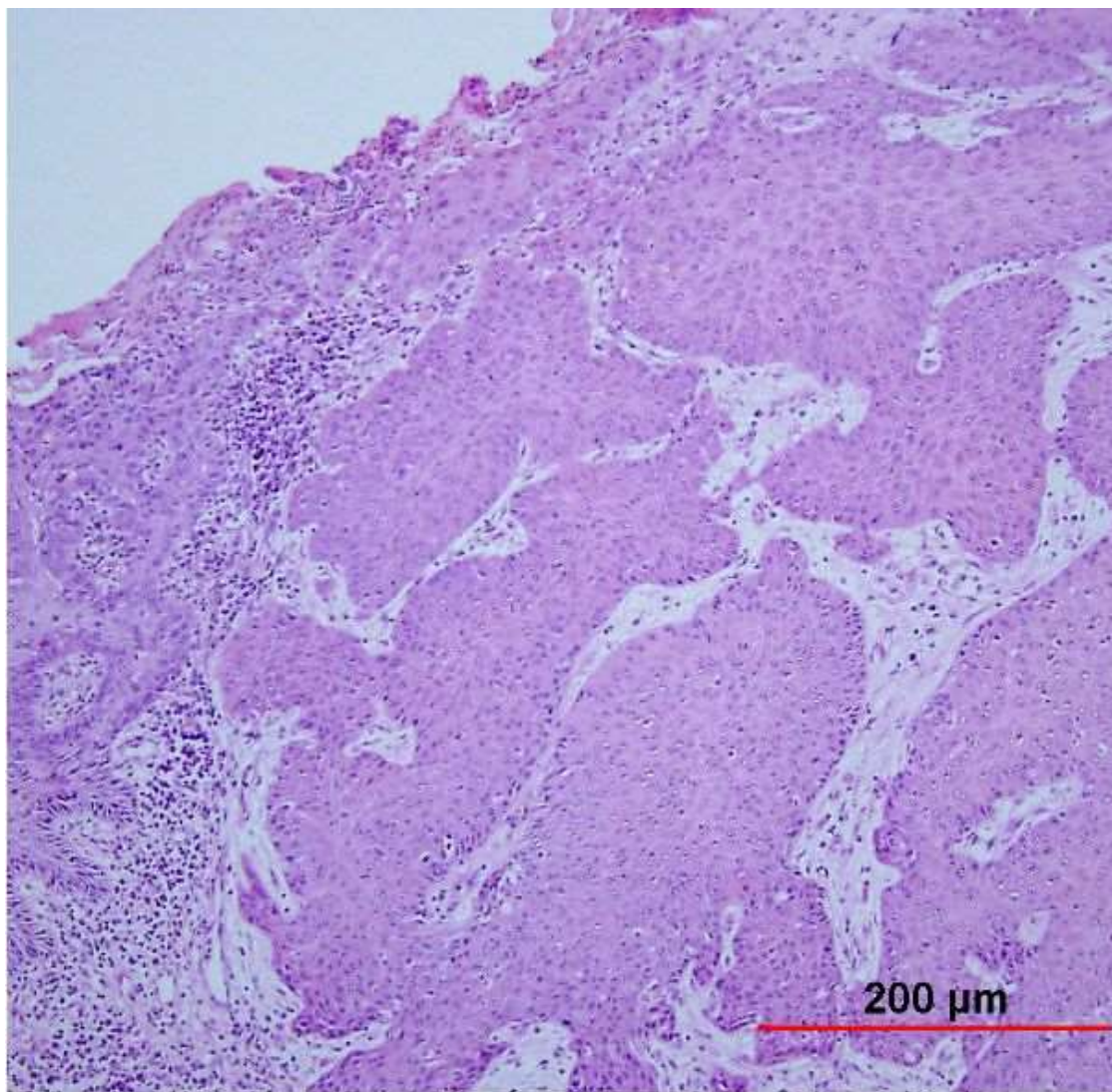
- ↪ Endoszkópos



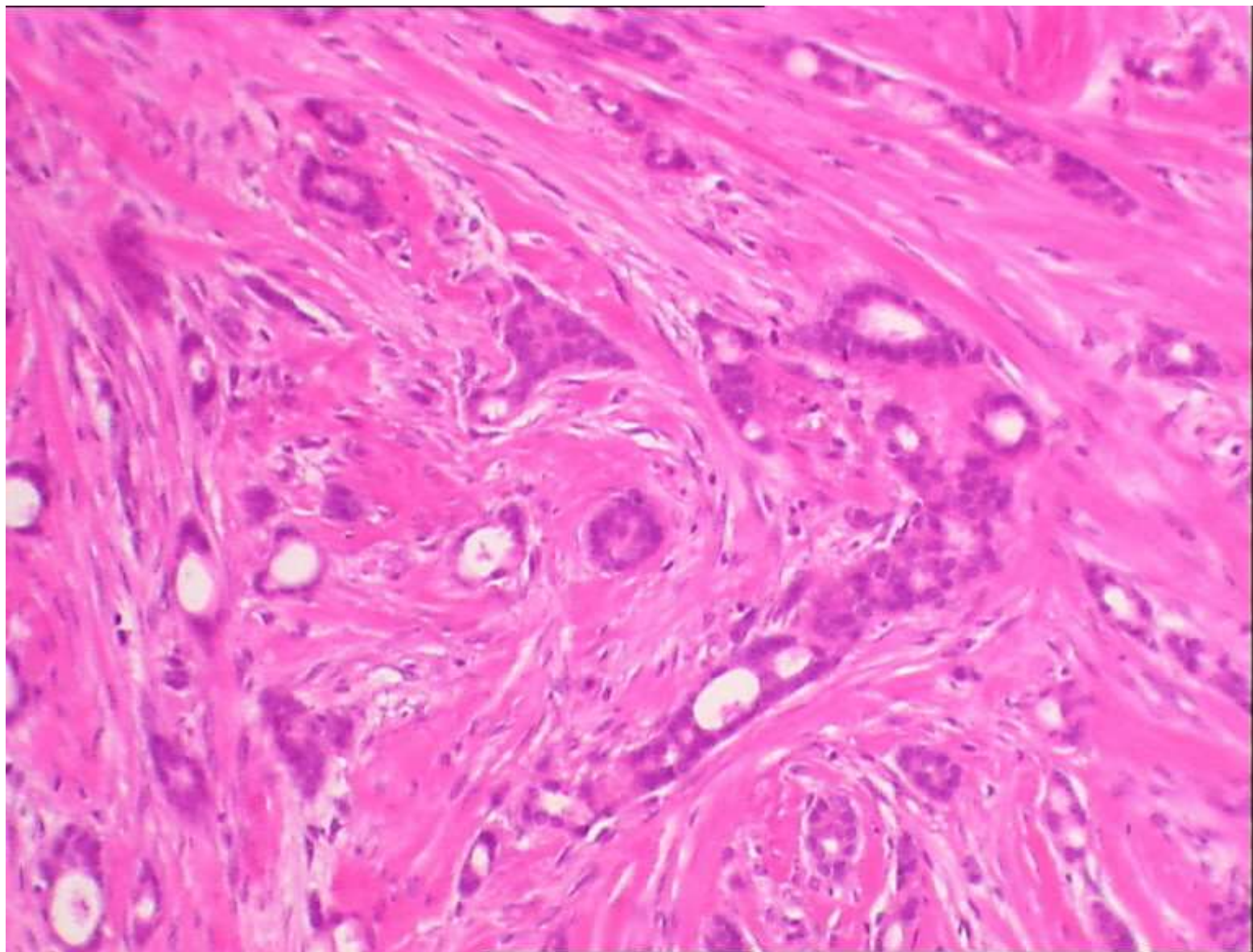
Metszetek: 2 Dimenzióban !!

Biológiai struktúrák: 3 Dimenzióban !!

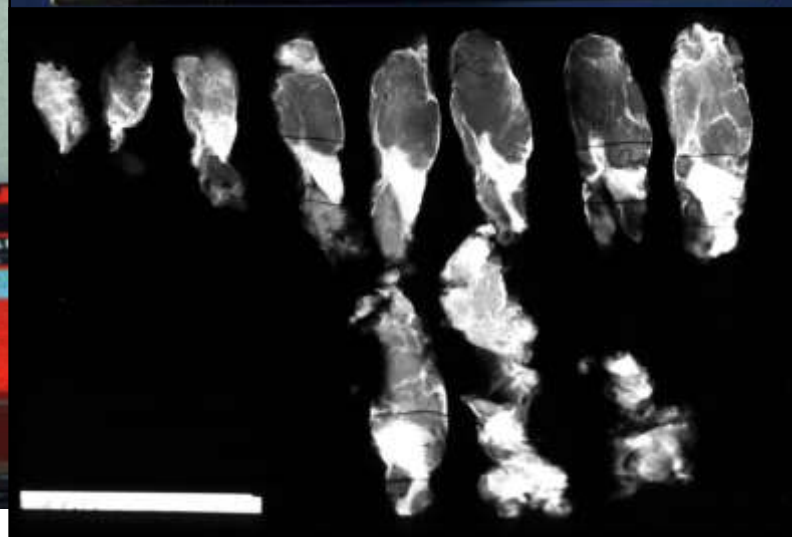
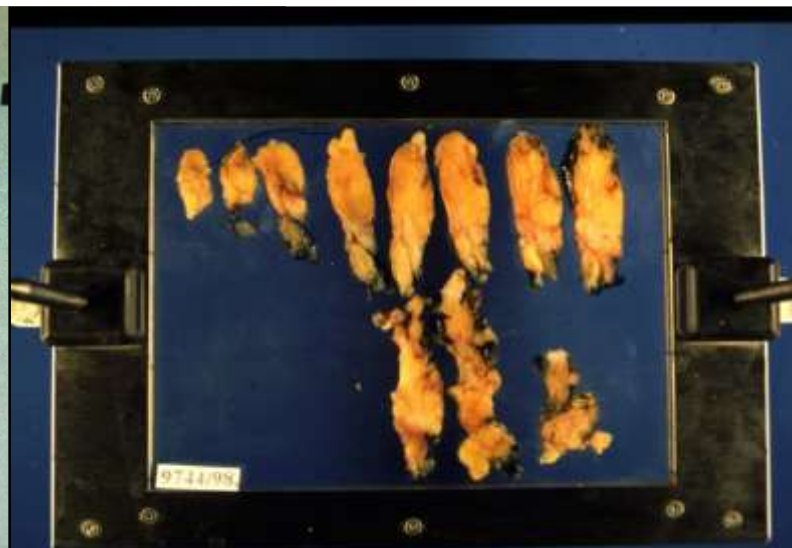


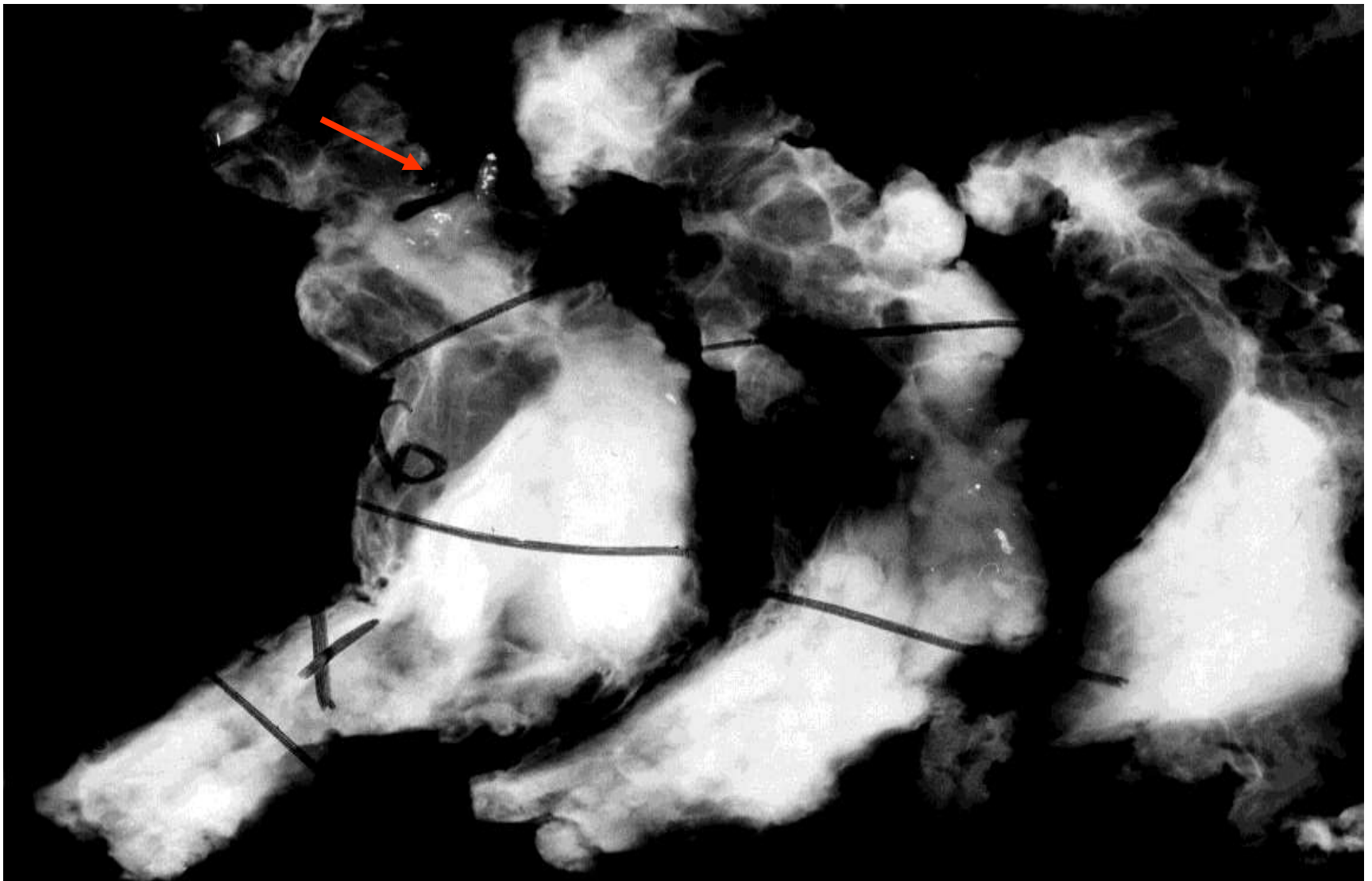


Invazív carcinoma -cervix









Specimen-mammográfia - mikrokalcifikáció

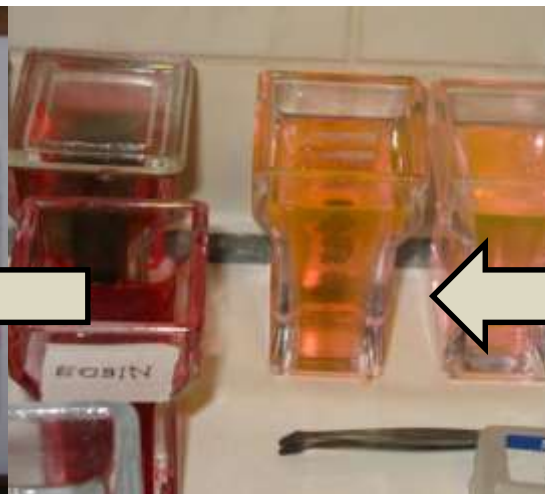
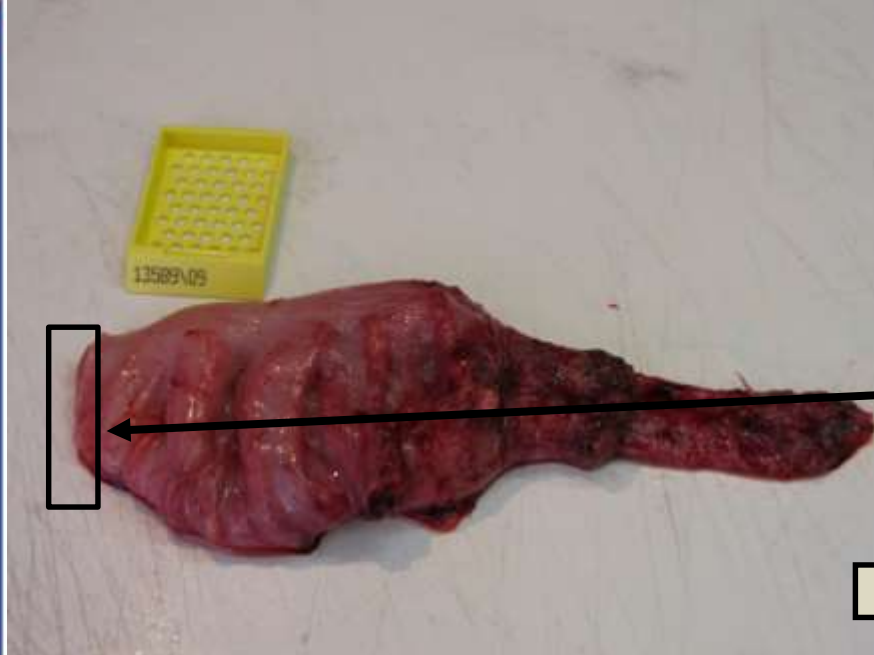


Rutin eljárás szövettani vizsgálat során

1. Makroszkópos vizsgálat –
„indítás”
2. Kivágott szövetdarabok fixálása
3. Lemetszés
4. Festés
5. Vizsgálat

Szövettani asszisztens





Szövettani mintavétel

- ↳ Eredménye: METSZET
- ↳ Technika ua. mint rutin szövettan esetében, tehát nincs azonnal diagnózis (min. 24 óra, de inkább 2 nap)
- ↳ Azonnali fixálás (formalin)
 - ↳ KIVÉVE, friss minta, azonnal patológiára küldve!!: vese vagy bőr biopszia (immunfluoreszcens vizsgálat), lymphoma (molekuláris vizsgálatokhoz ideálisabb a fagyasztott minta..)



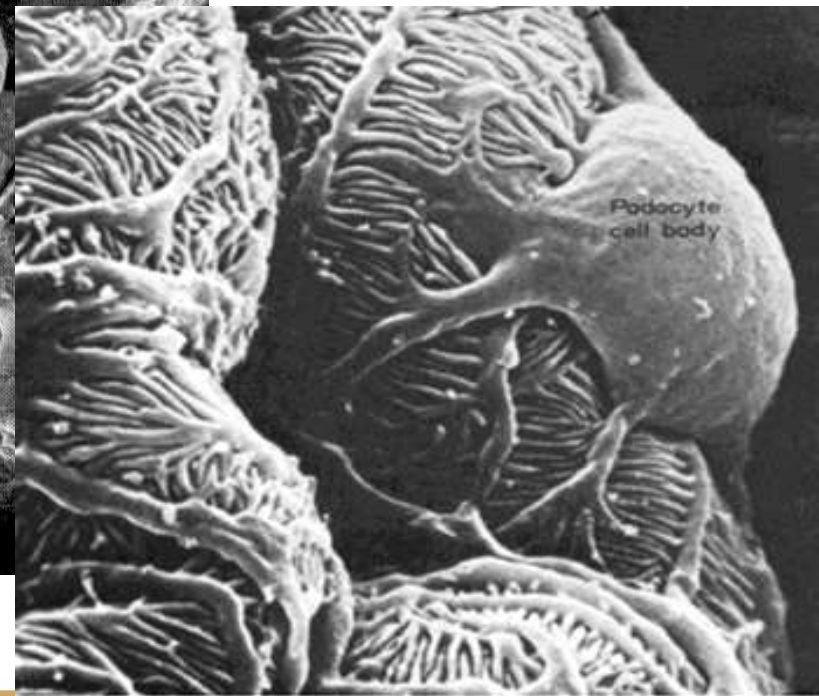
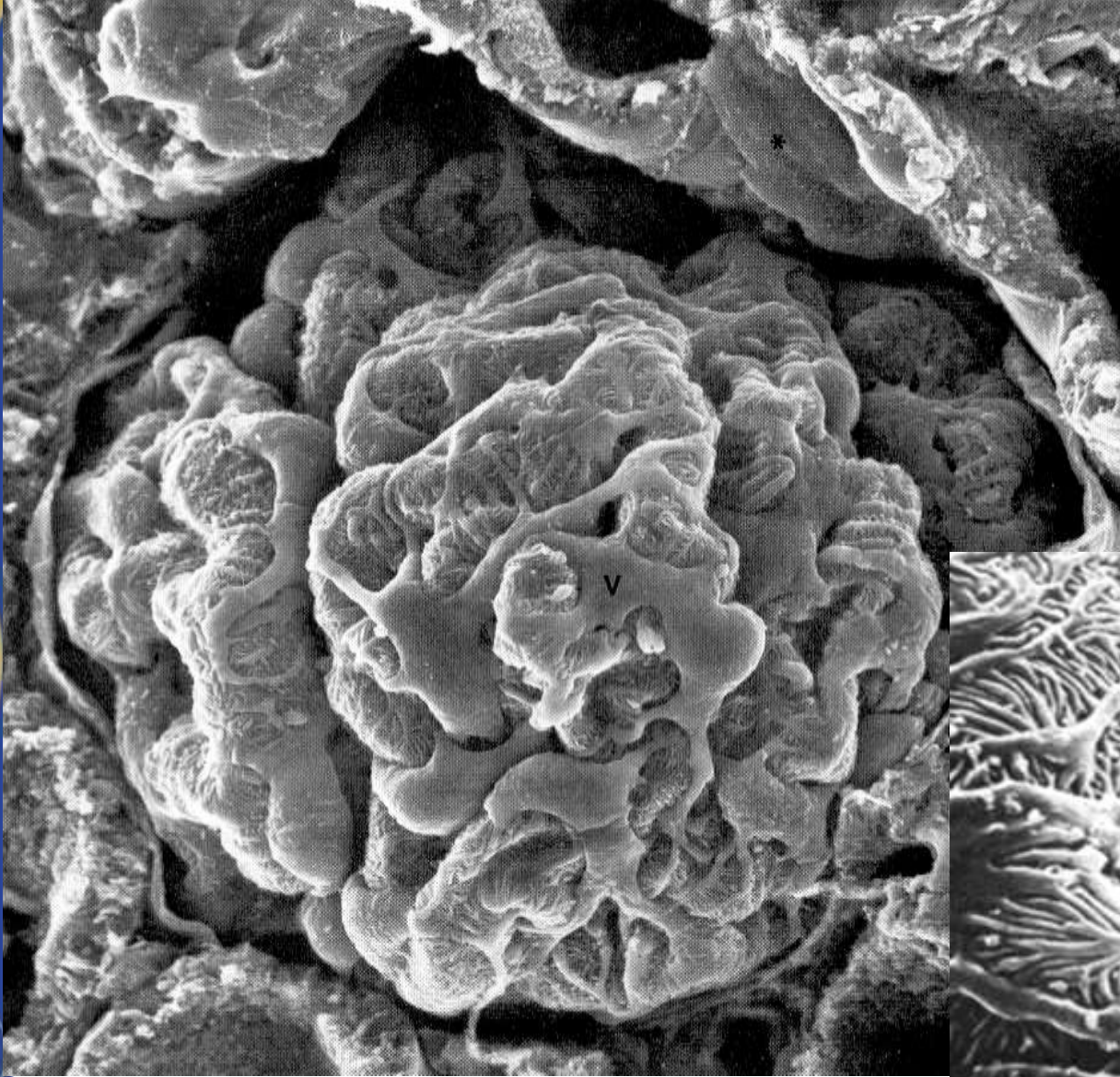
Szöveti mintavétel típusok

Vastagtű (core) biopszia

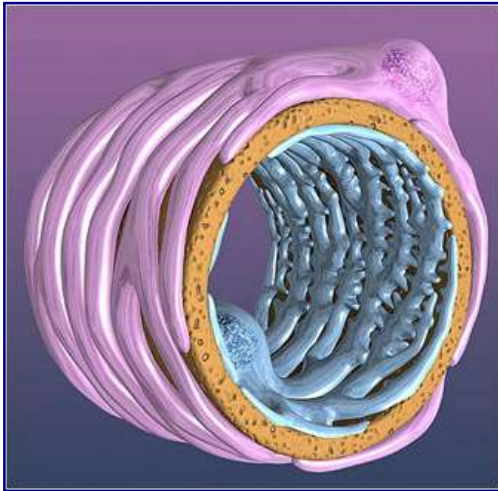
- ↪ Focalis lézió (solitaer vagy multifocalis), szolid szövetekben – citológia kiegészítője lehet
- ↪ Diffus lézió szolid szövetekben, melyek strukturális szöveti eltérésekkel járnak (glomerularis betegségek, diffus májbetegségek) – csak a szövettan informatív!
- ↪ Célzás: lásd FNAB



Glomerulus



Scanning EM glomeruláris kapilláris, az endothel sejteken prominens fenestratiókkal

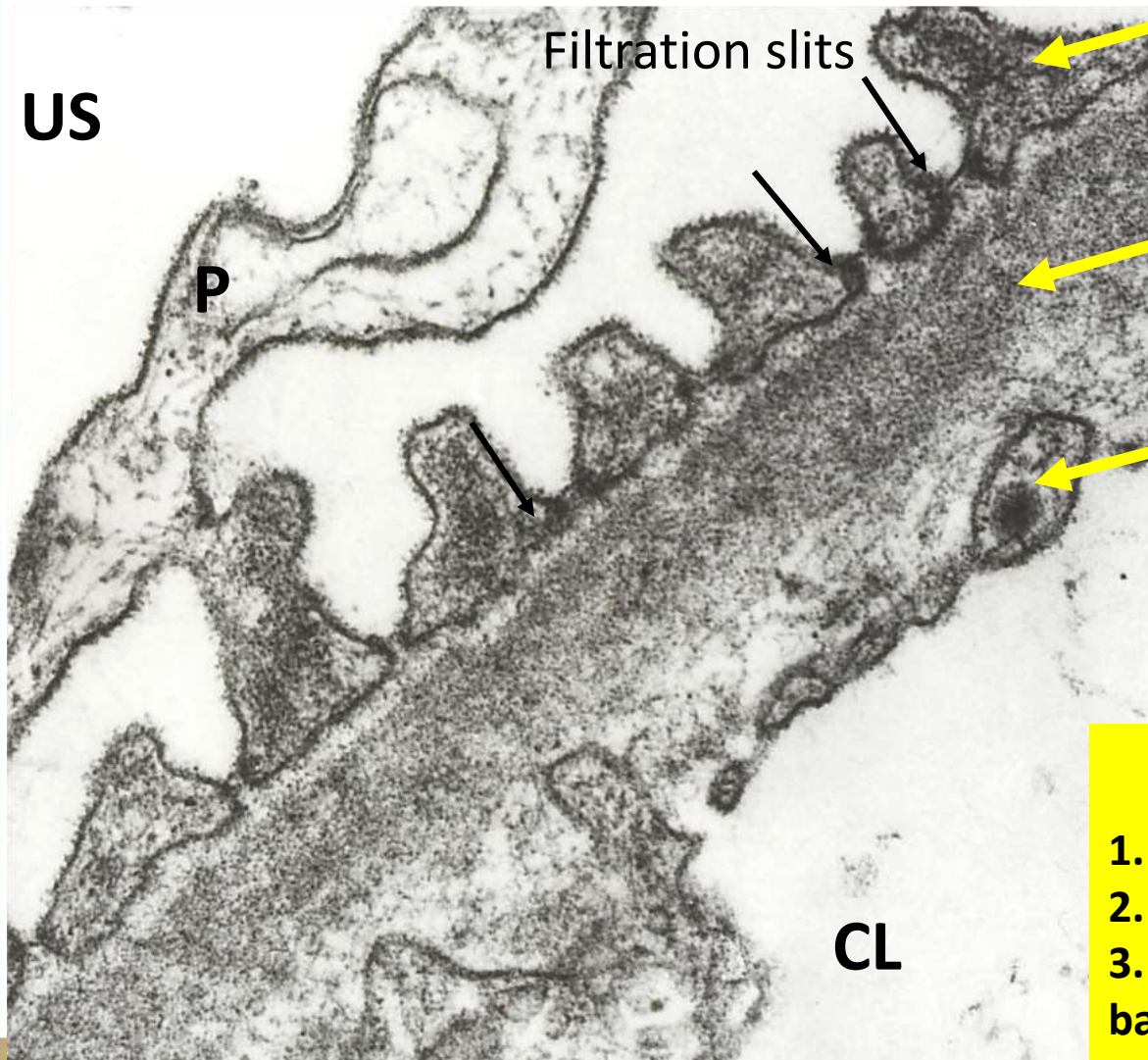


40 nm vastag
60-100 nm pórusok
(fenestratio)

Filtráció



Glomerulus Filtrációs Barrier



**Glomerulus viszerális
Epithel sejtek**

**Glomerular Basal-
membran (3 rétegű)**

**Glomerulus
Endothel sejtek**

Funkció:

1. Nagyság szelekciós barrier
2. Töltés szelekciós barrier
3. Forma/alakzat szelekciós barrier



Szöveti mintavétel típusok

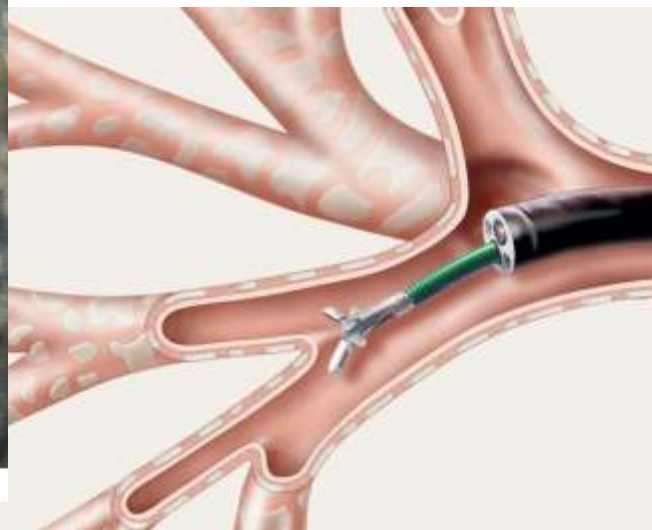
Endoszkópos biopszia

- Gastroszkopia (nyelőcső-duodenum)
- Colonoszkopia (terminalis ileum-anus)
- Laryngoszkopia (garat-gége)
- Bronchoszkopia (trachea-nagyobb bronchus)
- Cystoszkopia
- Focalis lézió (tumor): 2-3 minta, lehetőleg széli, vagy tumor felszíni terület, legyen elég mély, de ne a necrosisból
- Diffus lézió (gastritis, IBD): térképbiopszia
 - Ideális biopszia: reprezentatív=muscularis mucosae is, papírlapon fixálás=jobb orientálás...





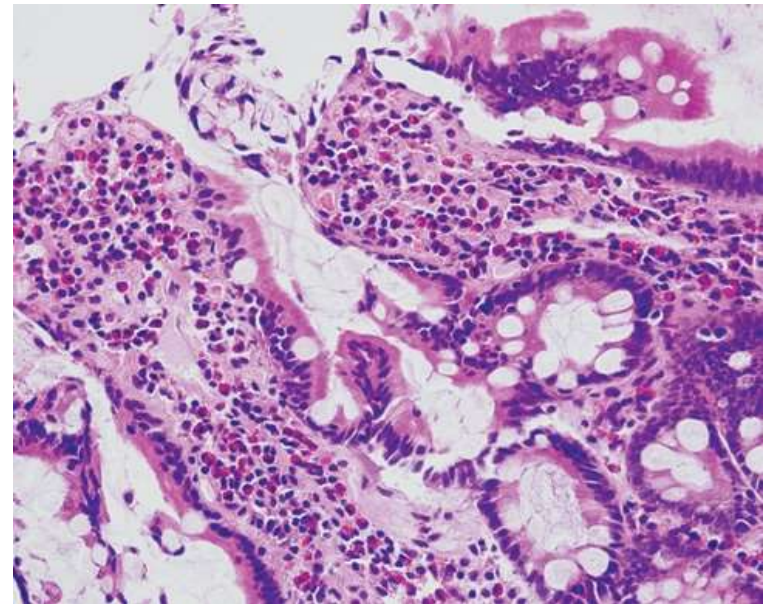
20th Century Fox



Ideális...



Korlátozottan értékelhető...



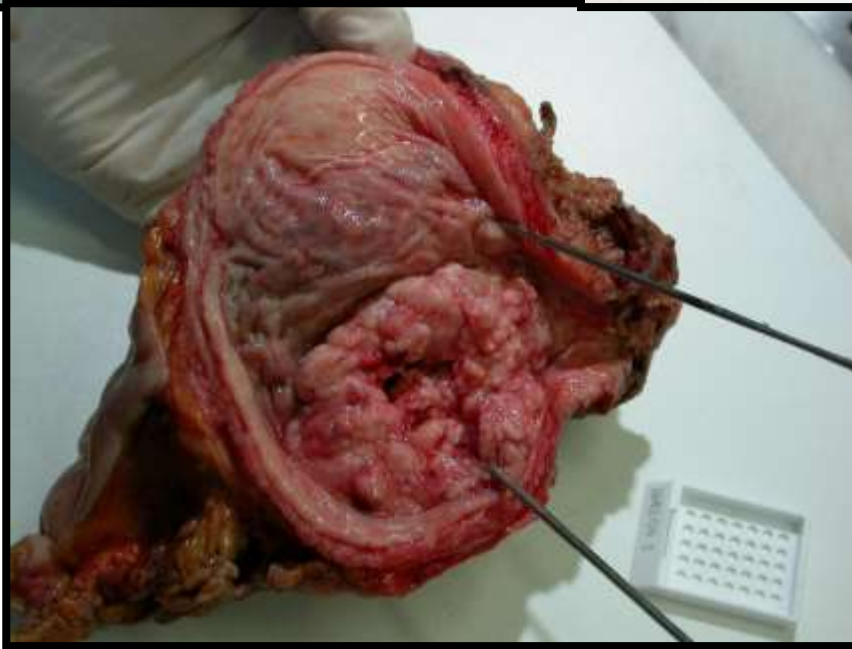




Semmelweis Egyetem
<http://semmelweis.hu>

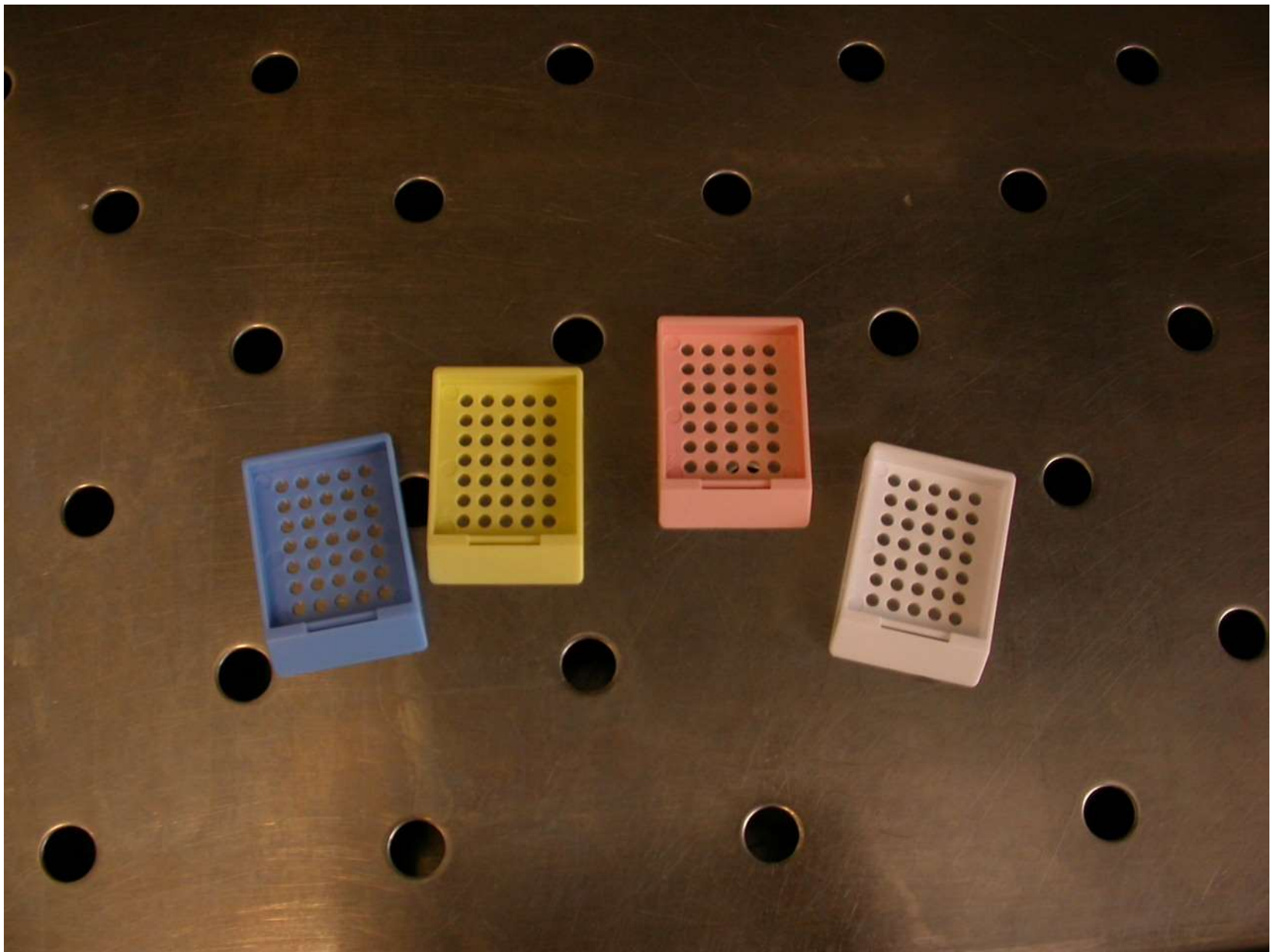
Pathológiai Diagnosztika
Molekuláris pathológia

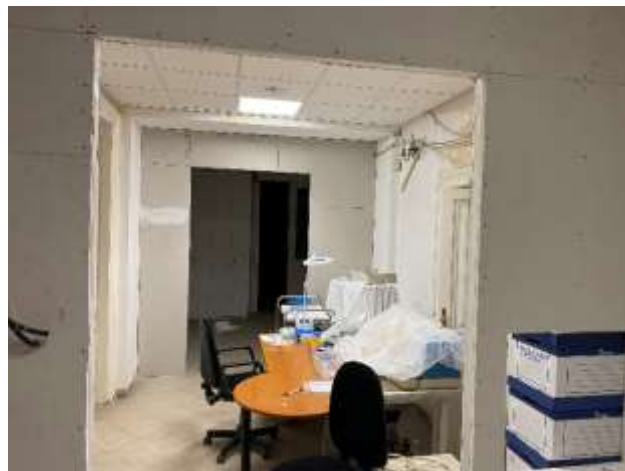
Prof. Dr. Kiss András
Ph.D., D.Sc.

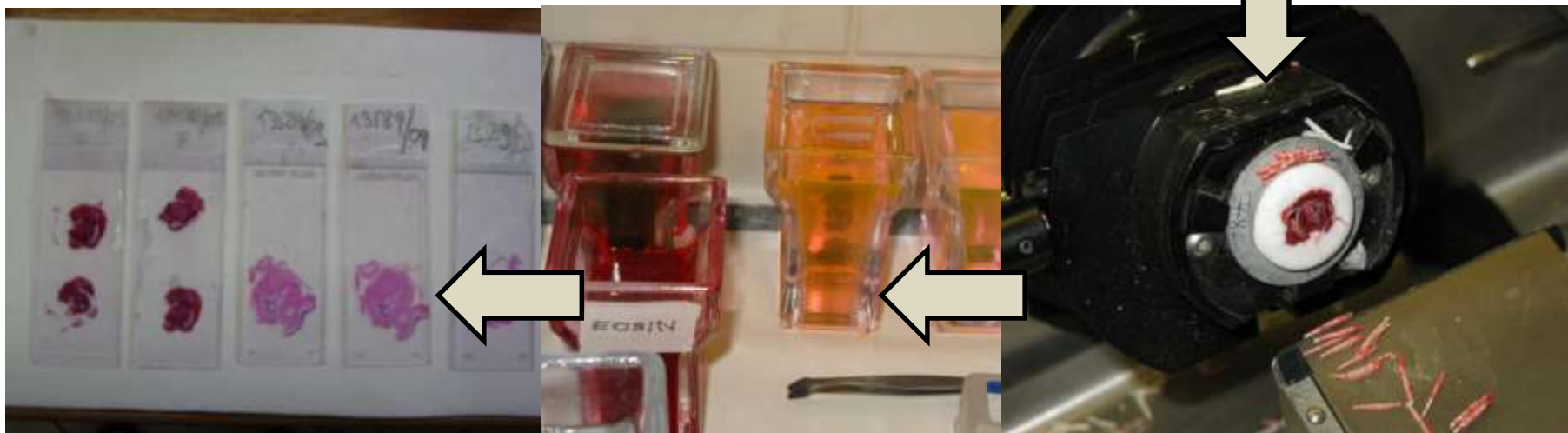
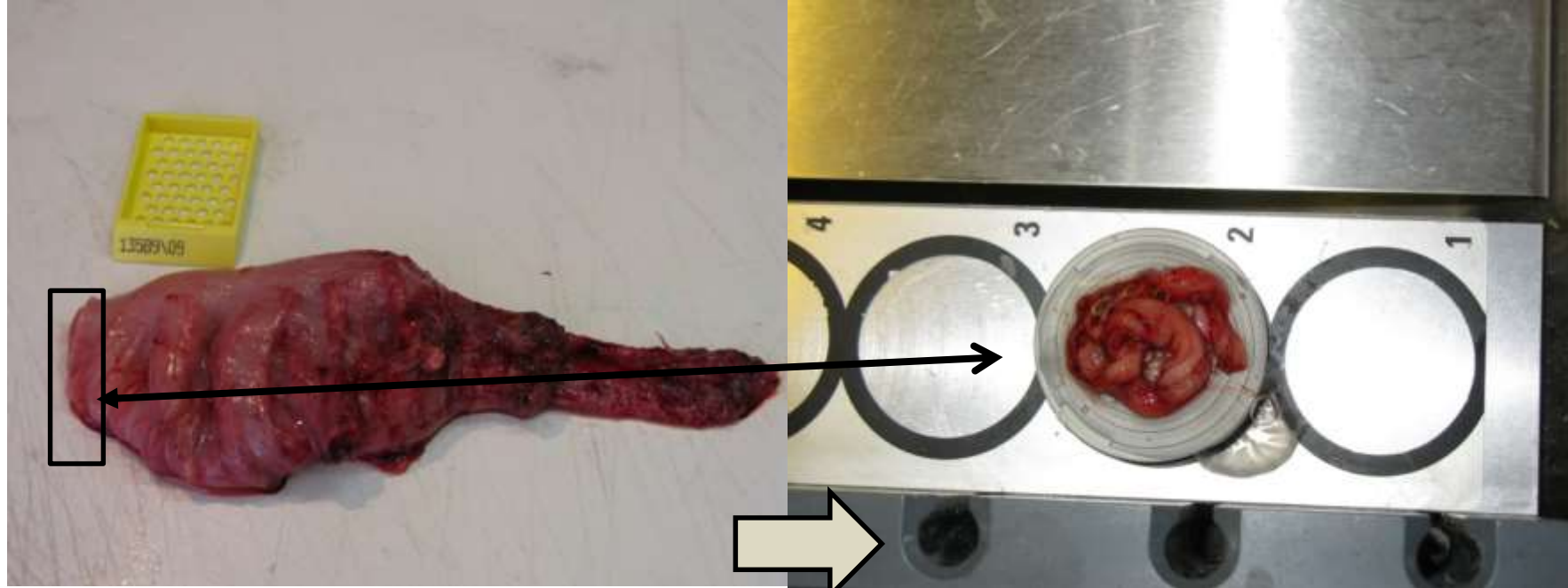


Mit indítunk?









Intraoperatív vizsgálat

Indikáció

- Nem történt preoperatív biopszia (pl. pancreas, ovarium): az elváltozás természetének meghatározása (benignus vagy malignus)
- Ismert malignitás esetén:
 - Rezekciós szélek (pozitív vagy negatív)
 - Sentinel nyirokcsomó státusz (pozitív vagy negatív)
 - Preoperatív képalkotással fel nem ismert kísérő lézió (pl. kis májmetasztázis, vagy carcinosis)



Intraoperatív vizsgálat

Technika

- Intraoperatív citológia (FNA): sebész veszi tapintással, vagy UH célzással
- Intraoperatív szövettani minta: gyorsfagyasztás, metszés (cryostat), H&E festés (kb. 10-20 perc) – fagyás miatt károsodott morfológia, de a struktúra nagyrészt megítélhető (invázió van-e?, rezekciós szélben van-e tumorsejt?)
- Lenyomati kenet: jól kiegészíti a fagyasztásos szövettant, mivel a citomorfológia megőrzött (pl. tumorsejtek magi eltérései jobban vizsgálhatók)

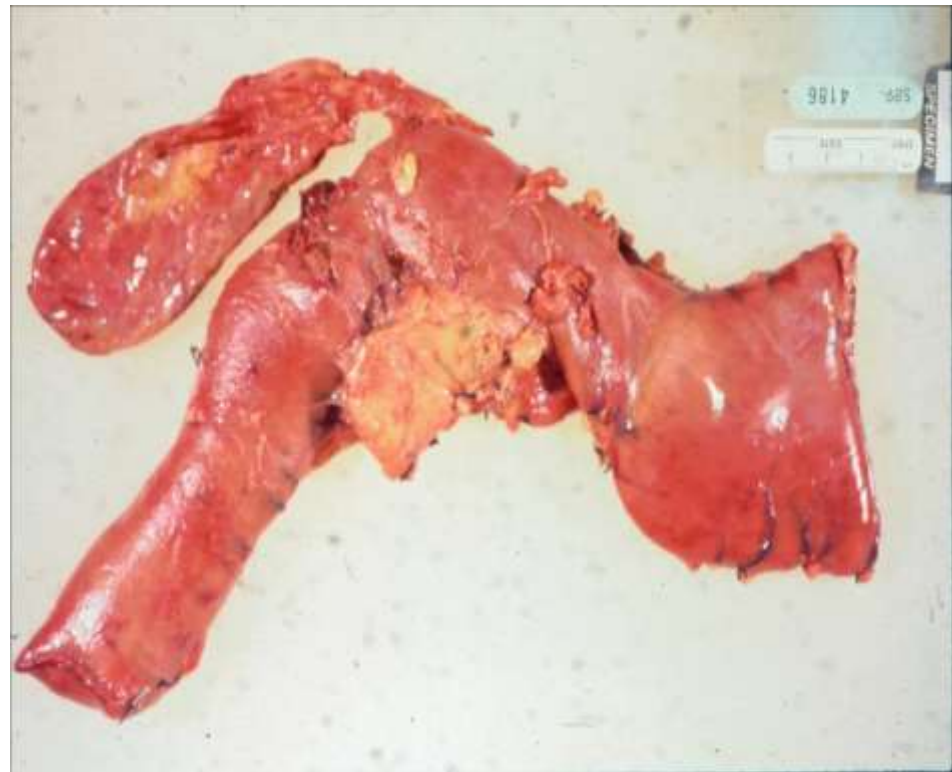


WHIPPLE MŰTÉT

Periampulláris Tumorok

- **Pancreas cc**
- **Ampulláris cc**
- **Duodenális cc**
- **Distalis epeút cc**

Chronic pancreatitis



WHIPPLE SPECIMEN PANCREAS CC

Tumor leírás

- Méret
- Szín
- Konzisztencia
- Cystták
- Helyzete az anatómiai struktúrákhoz.
- DTávolság a rezekciós szélektől
- Vezeték elzáródása
- Maradék pancreas állomány



Festési eljárások

↪ RUTIN:

↪ haematoxylin-eosin

↪ PAS (perjódsvav-Schiff)

↪ Alciánkék + PAS

↪ Giemsa

↪ Papanicolau

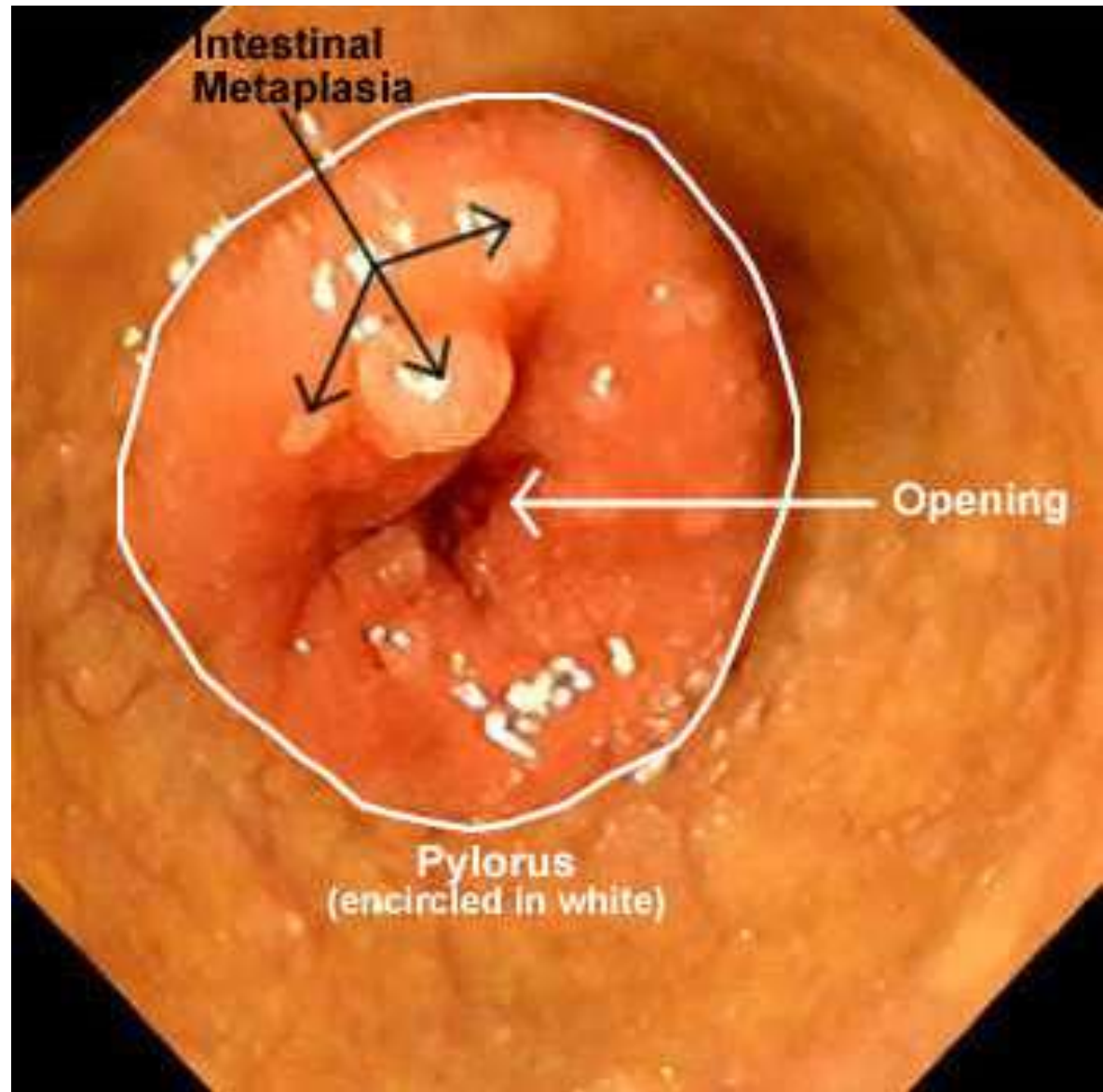


Speciális festések

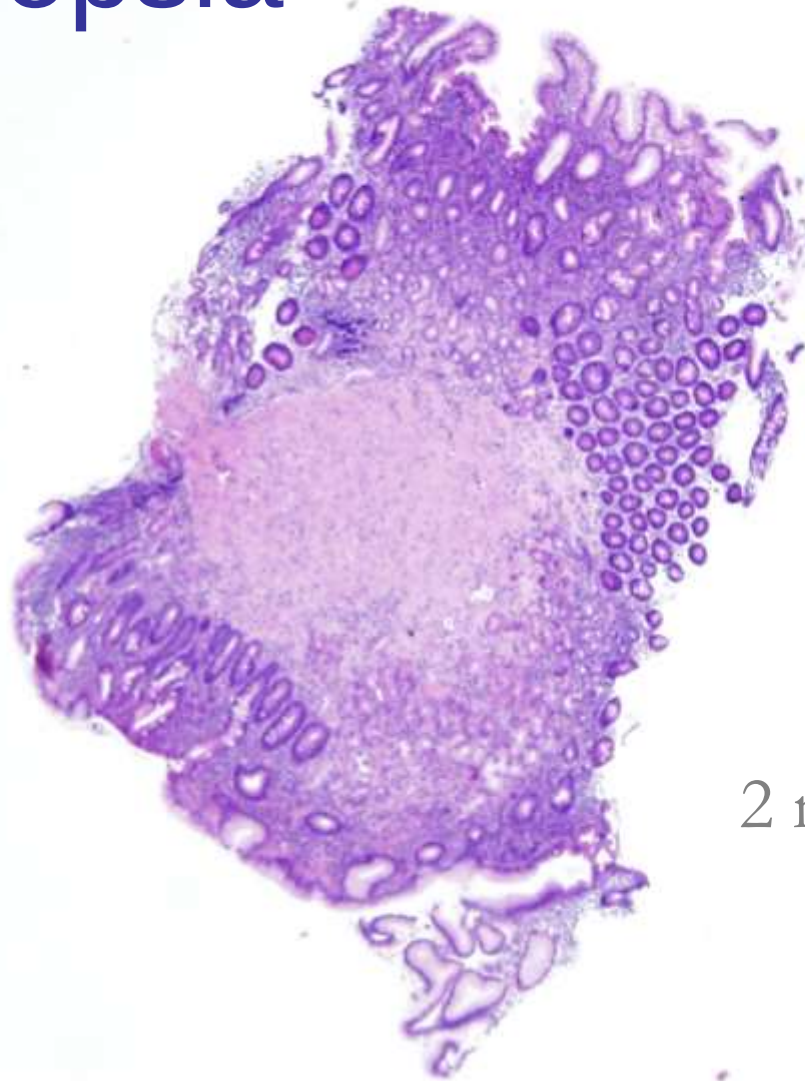
Nissl
Masson
Kristályibolya
Best
Grimelius
Gomori
Schmorl
Gram
Ziehl-Neelsen
Gallyas
Romeis
Orcein
Van Gieson
Grocott
Mallory
Tri-króm
Resorcin-fuchsin
Congo
Kossa
Ezüstözés



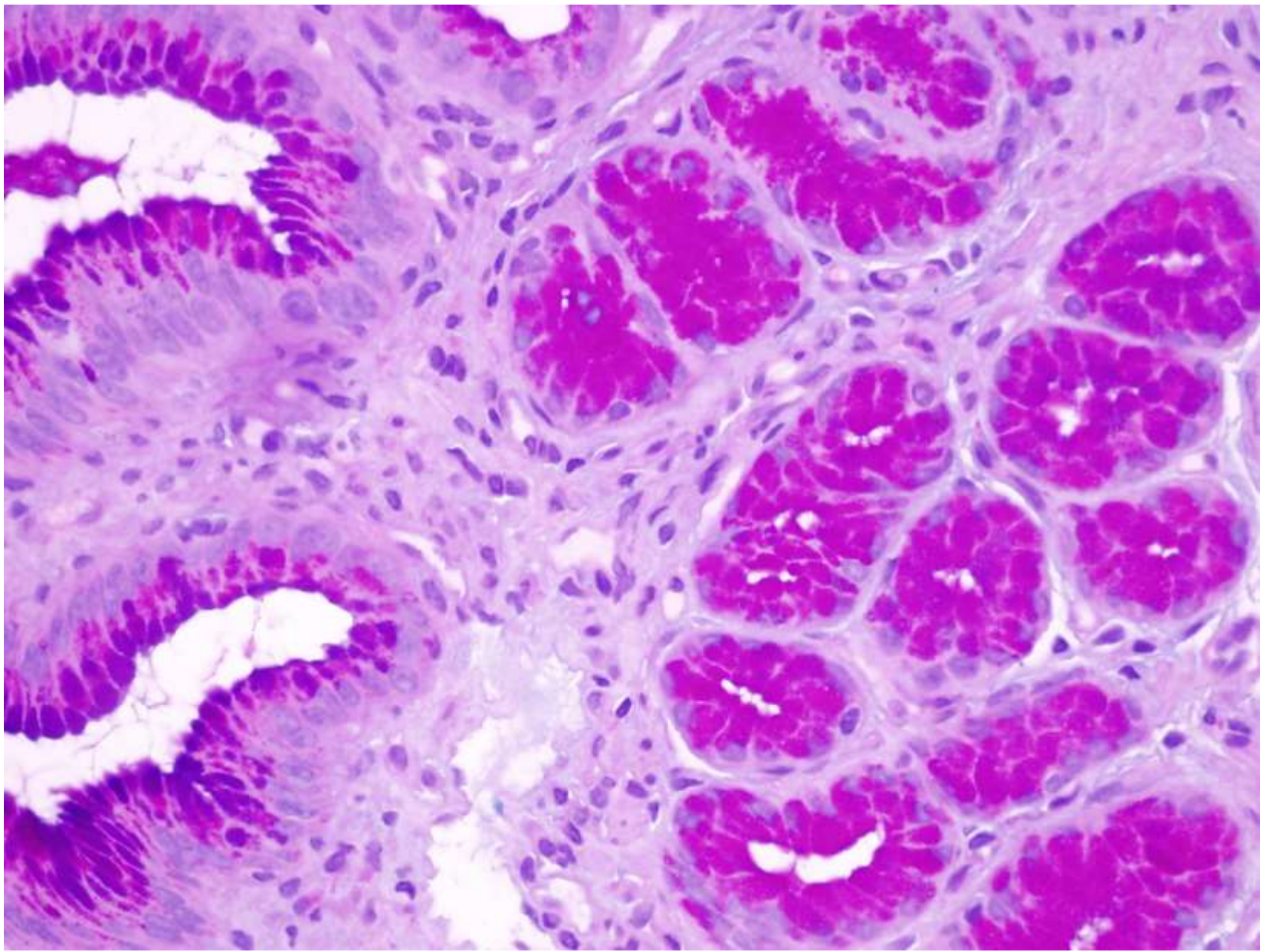
Endoscopia

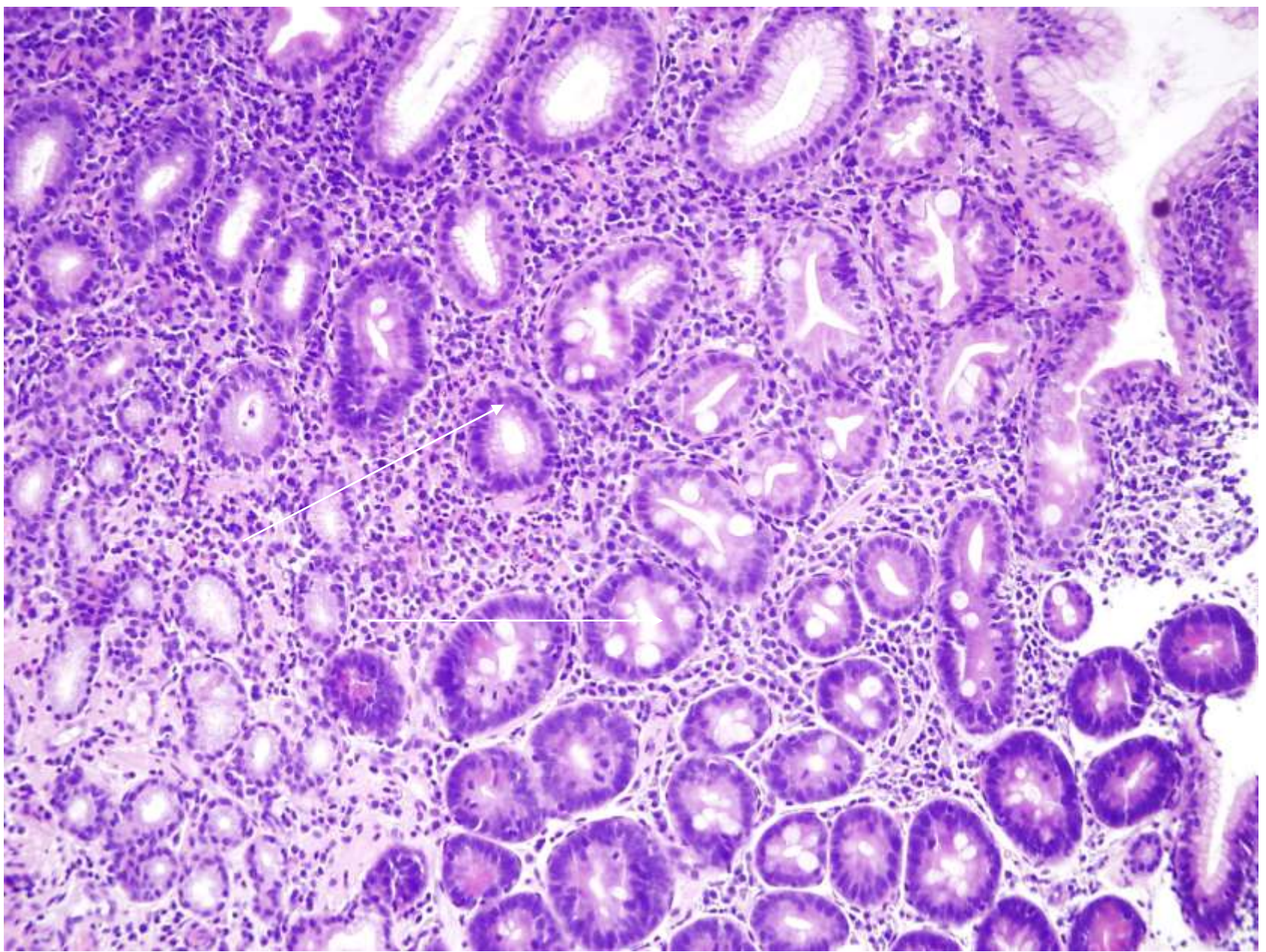


Gyomorbiopsia

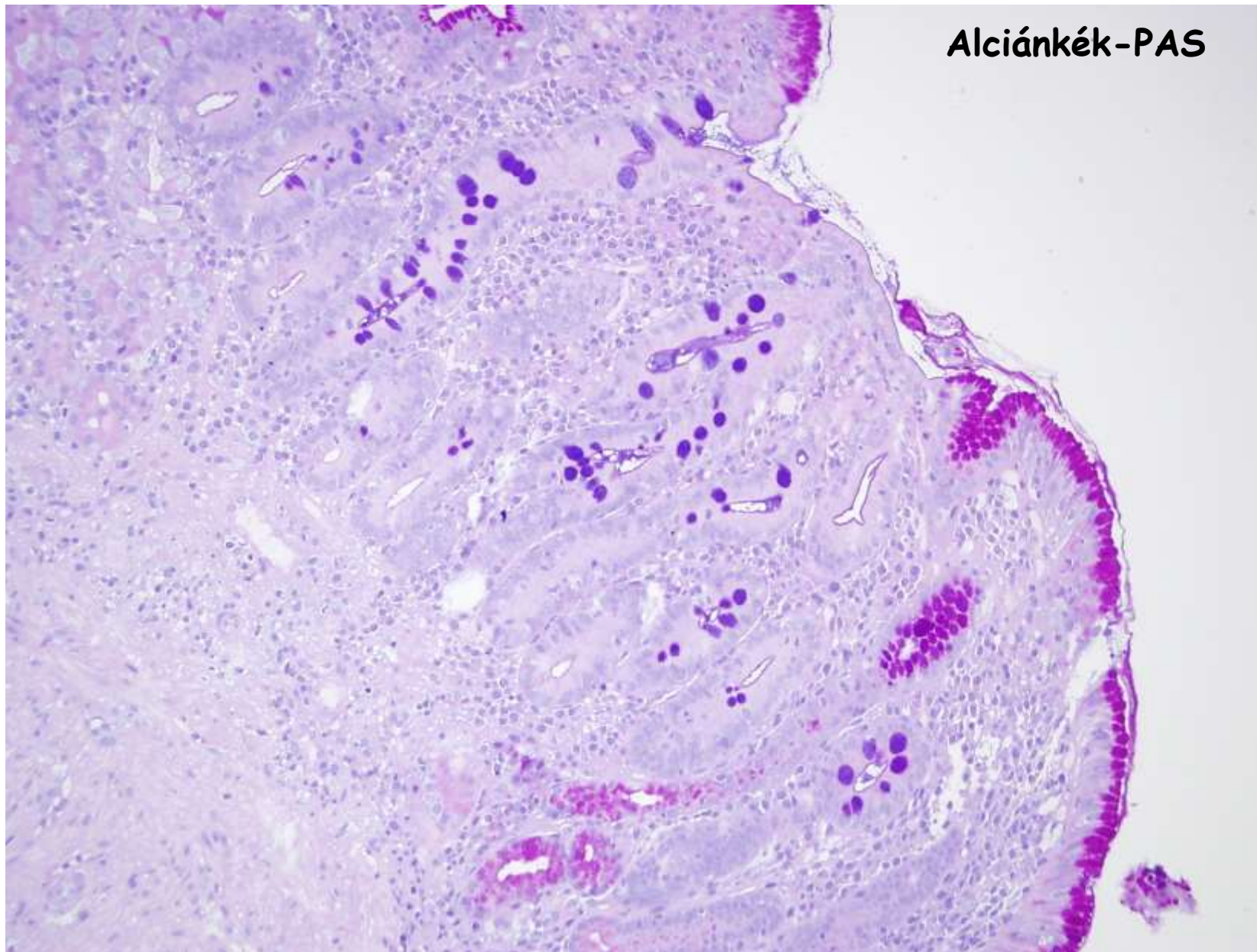


2 mm

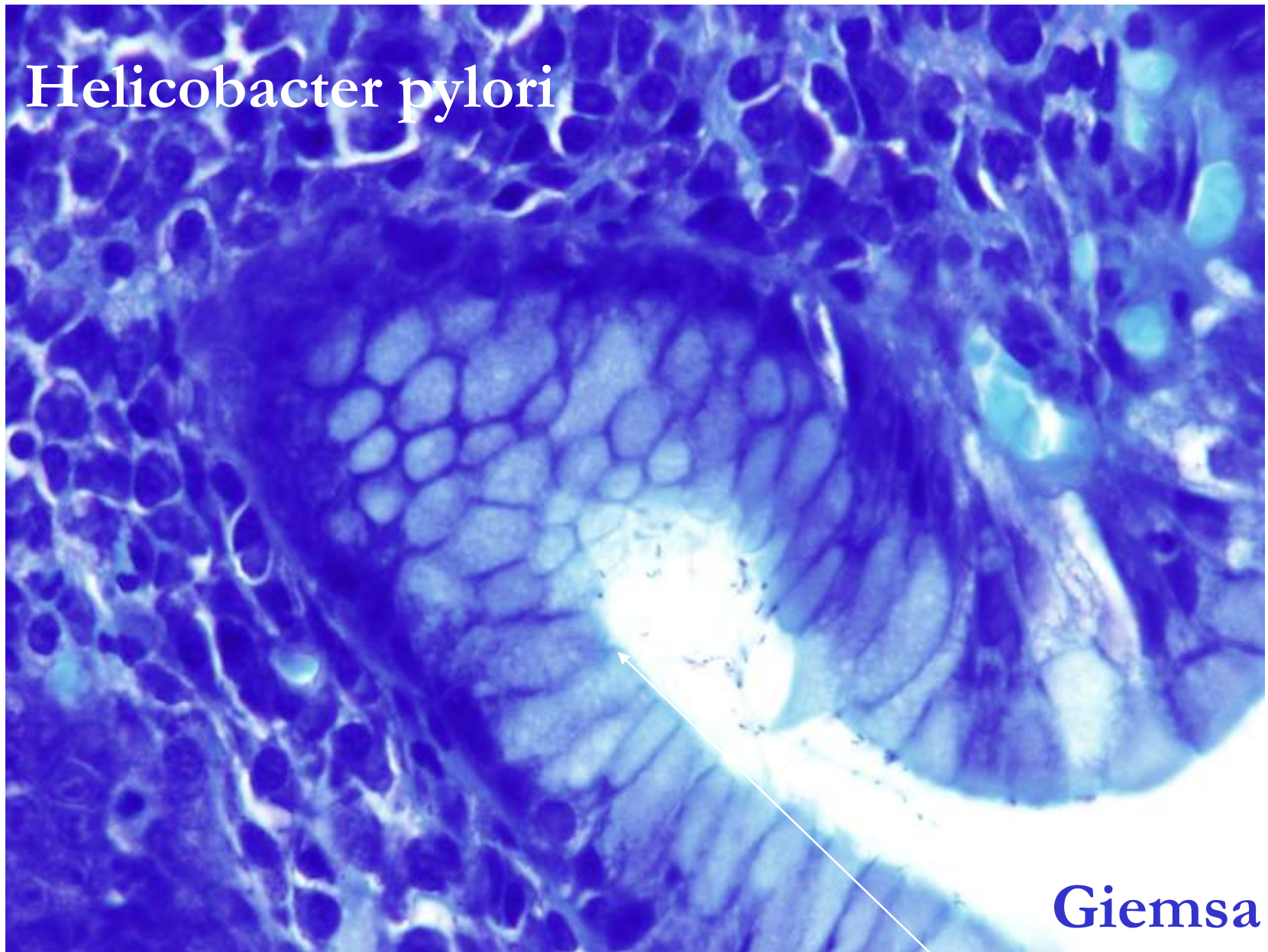




Alciánkék-PAS



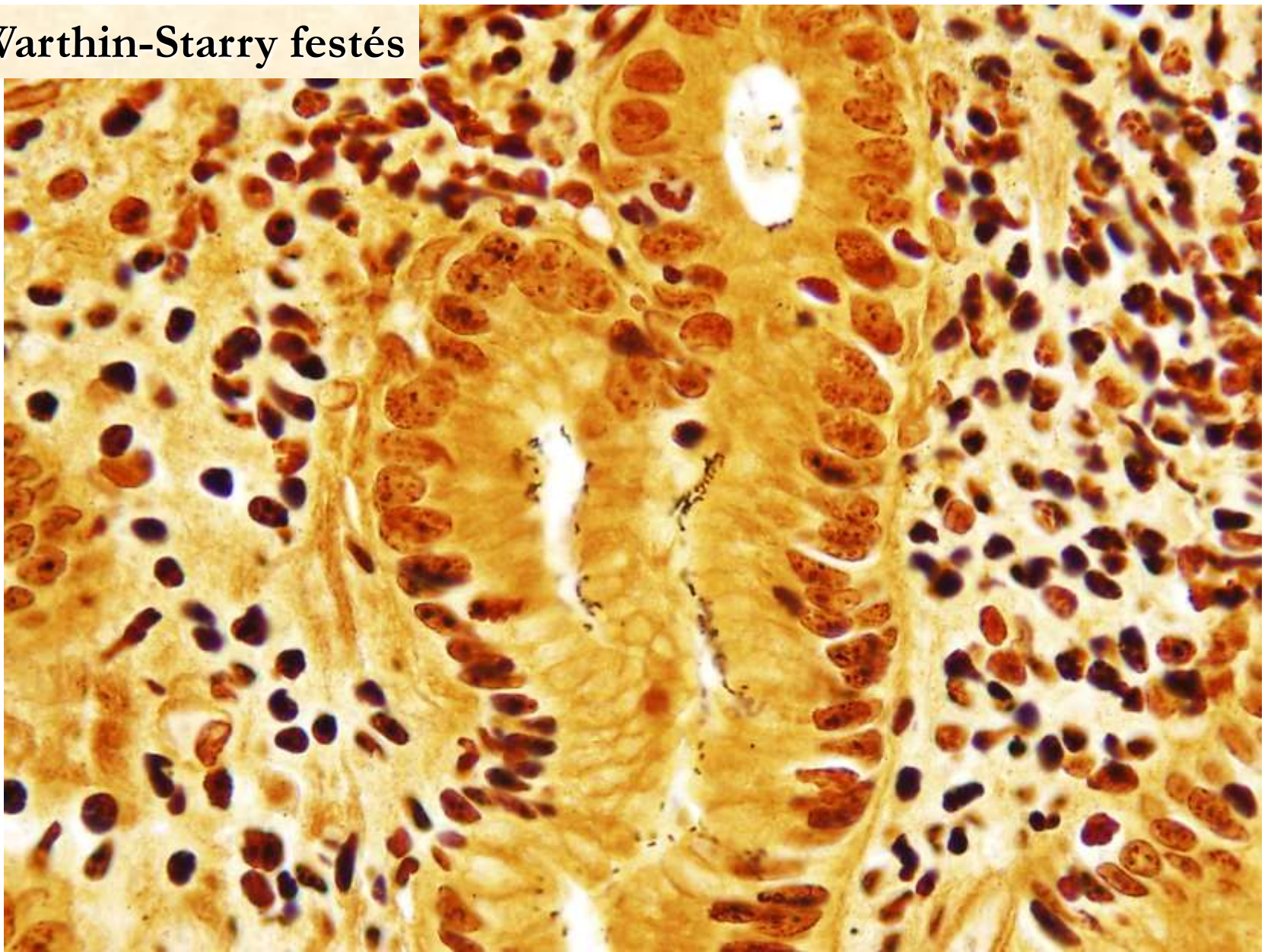
Helicobacter pylori

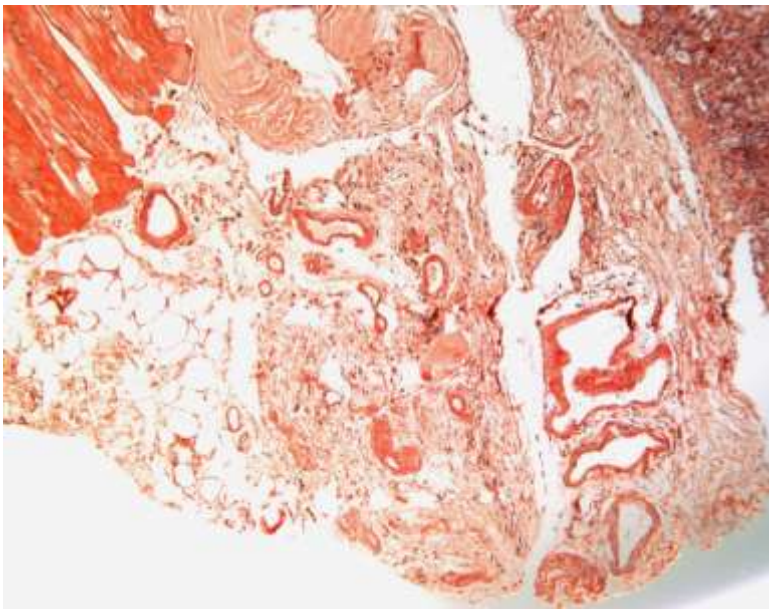


Giemsa



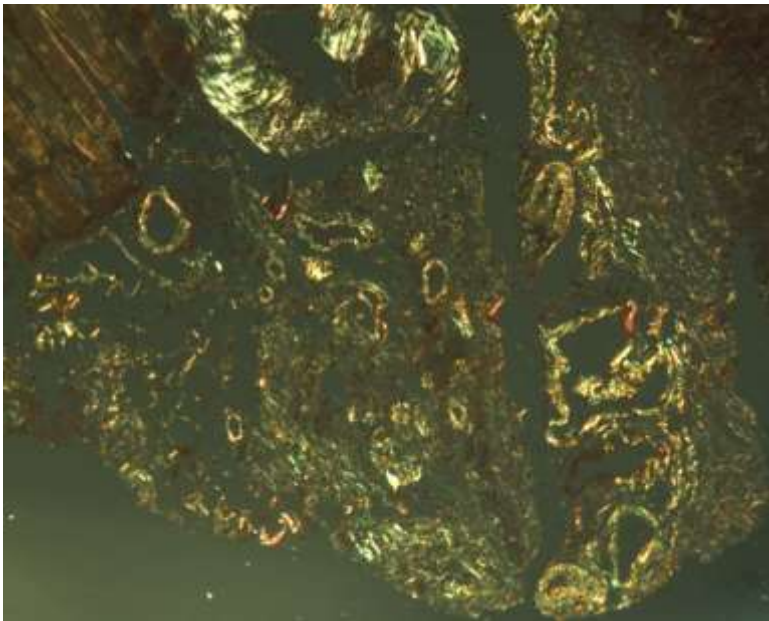
Warthin-Starry festés





Amyloidosis

Congo



Congo: POLARIZÁLT
fényben

- Mintavétel
- Hibalehetőségek

Minta: - aspirációs cytologia
(fine needle aspiration biopsy (FNAB))

- cytologiai kenet - PAP kenet
- core biopszia
- sebészi rezekátum

HIBALEHETŐSÉG: - Jelölés
(anyag / név / szám csere)

- Az anyag reprezentatív ?

Pl. túl kicsi, nem jól orientált, felszínes, kifaragódott ?

Elég az anyag a diagnózisra ? Mintavétel száma, mélysége.

Makroszkópia, Protokollok ?



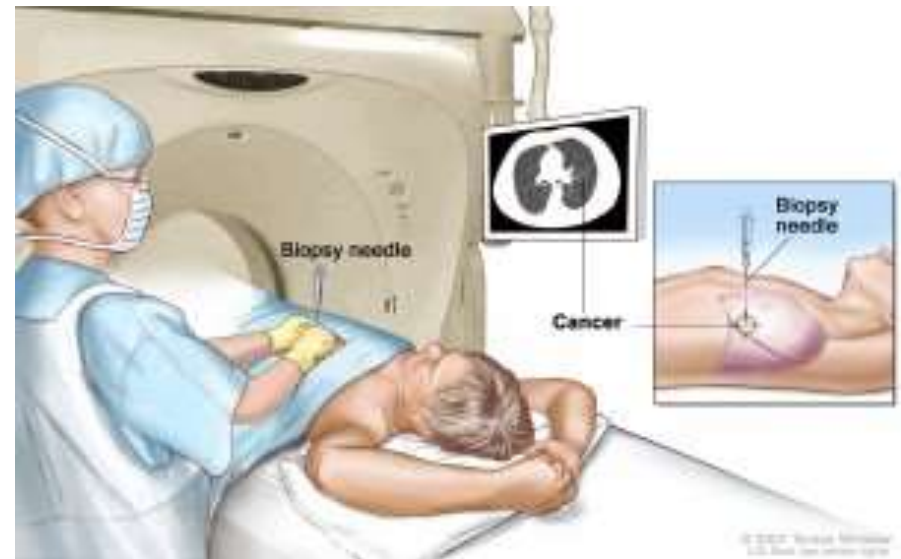
Biopszia vezérlése

↪ Vizuális

↪ Felszínes lokalizáció, testüreg, lumenes szervek

↪ Képkalkotó (UH, CT, MR)

↪ Mély lokalizáció



Citológia versus szövettani mintavétel

	Citológia	Szövettan
Előnyök	•Gyors •Kis eszközigény •Kevésbé invazív, alacsony szövődmenyrata	•Nagyszámú minta készíthető (metszet) •Ideálisabb, ha nagyszámú IHC szükséges
Hátrányok	•Korlátozott számú minta (kenet nem sokszorozható) •Kisszámú egyéb vizsgálatra használható	•Lassabb dg •Eszközigény, drágább •Invazívabb, magasabb szövődmenyrata
Diagnosztikus információ (tumorok esetén)	•Dignitás •Típus – fő kategória •Low grade/high grade •Invázió – korlátozottan	•Dignitás •Típus – pontosabb tipizálás •Grade-egyes értékek pontosabban meghatározhatók (pl. proliferáció) •Invázió
Alkalmazás	•Műtéti indikáció •Tumor szöveti eredetének meghatározása (pl. áttétből)	•Műtéti indikáció •Kemoterápia tervezése •Speciális tumorok (pl. limfóma)

Mindkét technikánál igen fontos szempont a mintavevő gyakorlottsága! Rossz mintának nincs diagnosztikus értéke = felesleges invazív beavatkozás!!

Citológiai mintavétel

Eredménye: KENET= tárgylemezre szélesztett sejtminta

- Sejtes elemek: az elváltozásból és az alapszövetből (arányuk függ a mintavétel technikától, lézió típusától)
- „Háttér”: vér, gyulladás, extracellularis anyag (nyák, kolloid stb.)

Gyors diagnózis (akár rögtön)

Egyszerű kezelés:

- Nedves fixálás (alkohol)+festés (HE, Papanicolaou): leginkább megőrzött morfológia
- Szárítás+festés (Giemsa, Diff-Quik): még gyorsabb és egyszerűbb, de megváltozik a sejtek morfológiája

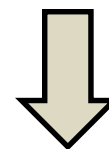
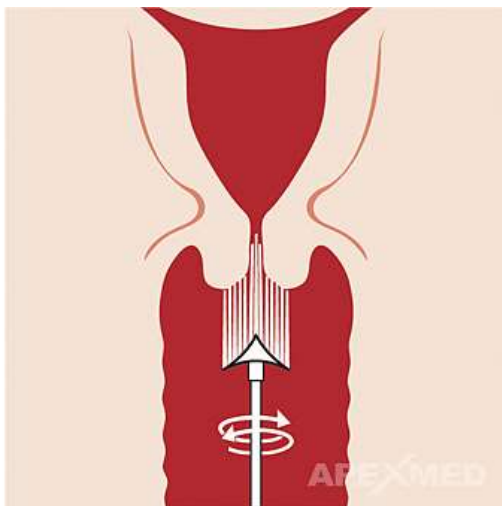
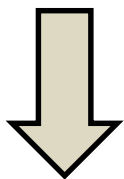


Citológiai mintavétel típusai

Exfoliatív citológia (kefe)

- ↪ Szűk üreges struktúrák felszínes eltérései
=intraepiteliális vagy invazív tumorok (cervix, kis bronchus, epeút)
- ↪ Kenet jellemzők: sok normál/reaktív hámsejt
- ↪ Hibalehetőség
 - ↪ Reaktív vs. malignus
 - ↪ Dysplasia vs. invasív tumor





Citológiai mintavétel típusai

Folyadékcytológia

- Tumoros/gyulladásos eredetű testüregi folyadék, cystabennék vagy „természetes” folyadék – nem vér!! (peritoneum/pleura/pericardium, vizelet)
- Kenet jellemzők
 - sok normál/reaktív mesothel vagy hámsejt, amelyek a folyadékban „ázva” duzzadnak-roncsolódnak
 - sokszor nagyszámú gyulladásos sejt (neutrophil, histiocyta)
- Hibalehetőség
 - Reaktív vs. malignus



Citológiai mintavétel típusai

Vékonytű aspirációs citológia (FNA)

- Solitaer/multifocalis solid képletek
- Kenet jellemzők
 - Tumoros lézió esetében ideális esetben csak tumorsejtek
 - Változó mértékben az alapszövet sejtjei (pl. nyirokcsomó esetén sok lymphoid sejt)
 - Kontamináció a szűrési csatornából (pl. hasüregi lézió szűrése esetén esetén bélhámsejtek, mesothel stb.)
- Hibalehetőség
 - Nem reprezentatív kenet (téves célzás, necrosis stb.)

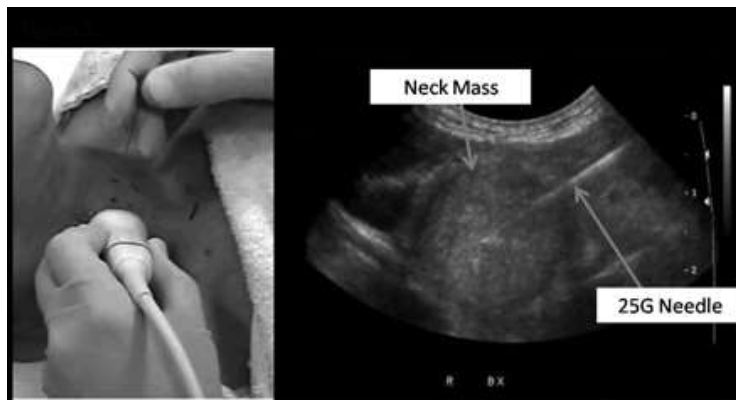


Vékonytű aspirációs citológia (FNAB)

Egyszerű eszközök (tű, fecskendő)

Vezérlés

- UH (elsőként választandó, egyszerű, gyors, „valós idejű” célzás)
- EUH (lumenes szervhez közeli képlet, pl. pancreas, hilusi nyirokcsomó)
- CT (UH-val nem lokalizálható lézió, mellkasi képletek; hosszabb procedúra, rögzített kép alapján történő célzás)



ÁLTALÁNOS MEGJEGYZÉSEK

malignus tumorok:

Kérdések ?

Primer vagy secunder (metastasis) ?

Ha metastatis: hol a primer tu. ?

Terápia ? Parameters a terápiához: grade és stage

Ezek meghatározzák a terápiát:

Rezekció $\pm$ Radiotherapia $\pm$ Chemotherapia

(preoperatív vagy postoperatív)

KOMMUNIKÁCIÓ a KLINIKUSSAL !

Biztos malignus, biztos benignus: O.K.

Pathologus nem tudja: MIÉRT ?

Sebészi rezekció: R0 ?

Rezekciós szélek ?



ÁLTALÁNOS MEGJEGYZÉSEK

malignus tumorok:

Kérdések ?

Pathologus nem tudja: MIÉRT ?

Nincs elég tapasztalat / tudás - elméletileg lehetséges - konzultáció !
(pl. két szakorvos aláírása kell egy malignus diagnózis kiadásához !)

Klinikai minta nem alkalmas definitív diagnózisra !

Malignus tumor ? Válasz : **talán = NEM SEGÍTSÉG A DÖNTÉSHEZ**

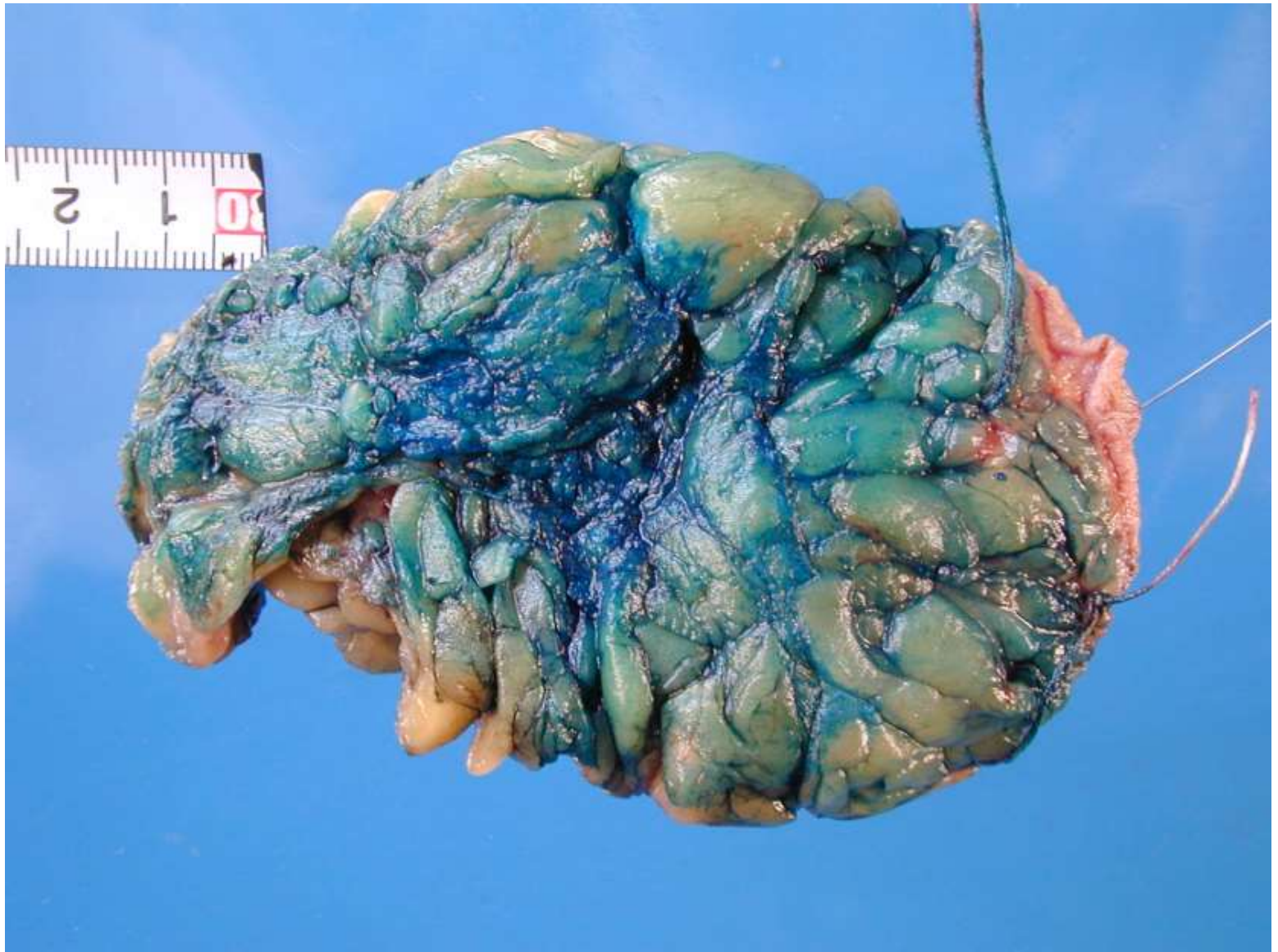
Mennyire megbízható a lelet: Új biopszia ? Control ? Más technikák ?

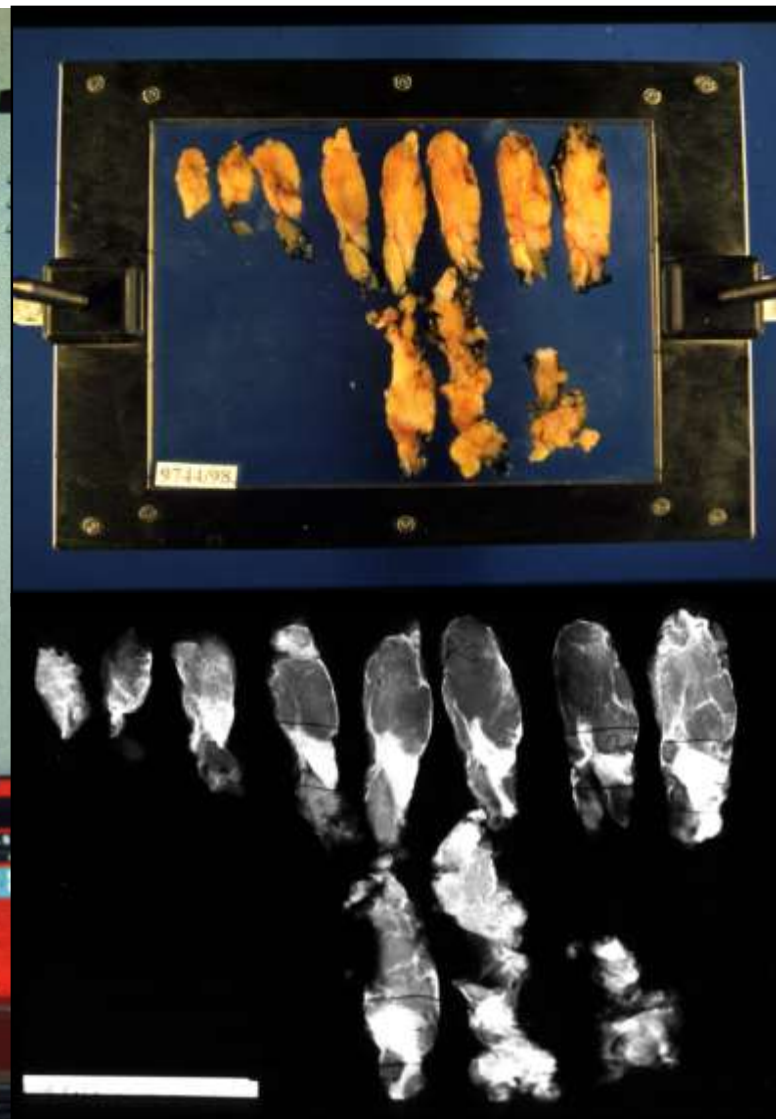
KOMMUNIKÁCIÓ a KLINIKUSSAL !

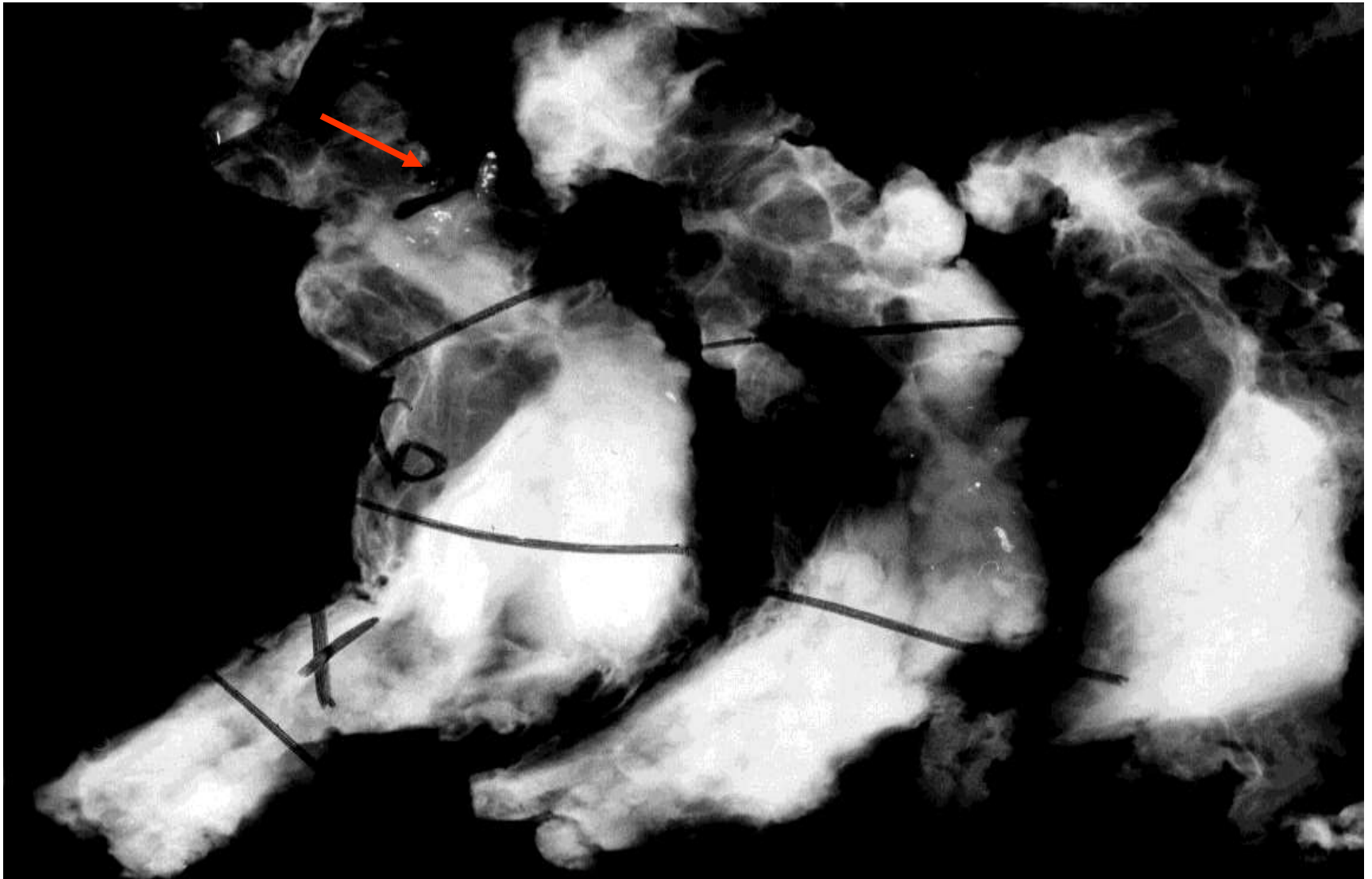
**A legjobb lelet sem ér semmit, ha a klinikus nem érti meg a lényegét !
SEBESSÉG és INFORMÁCIÓ ÁTADÁS a siker titka !**



SEBÉSZETI REZEKÁTUM - Orientáció







Specimen-mammography - microcalcification



Formalinban fixált, paraffinba ágyazott: FFP (E)

▶ MIÉRT CSINÁLJUK ?

▶ NAGY SZÖVETI MINTAKÉSZLET
+ ADATBÁZIS

▶ MIT SZERETNÉNK ELÉRNI ?

▶ MINDENT, DE

▶ - DNS

SZEKVENÁLÁS
KLÓNOZÁS
MUTÁCIÓ ANALÍZIS

- RNS

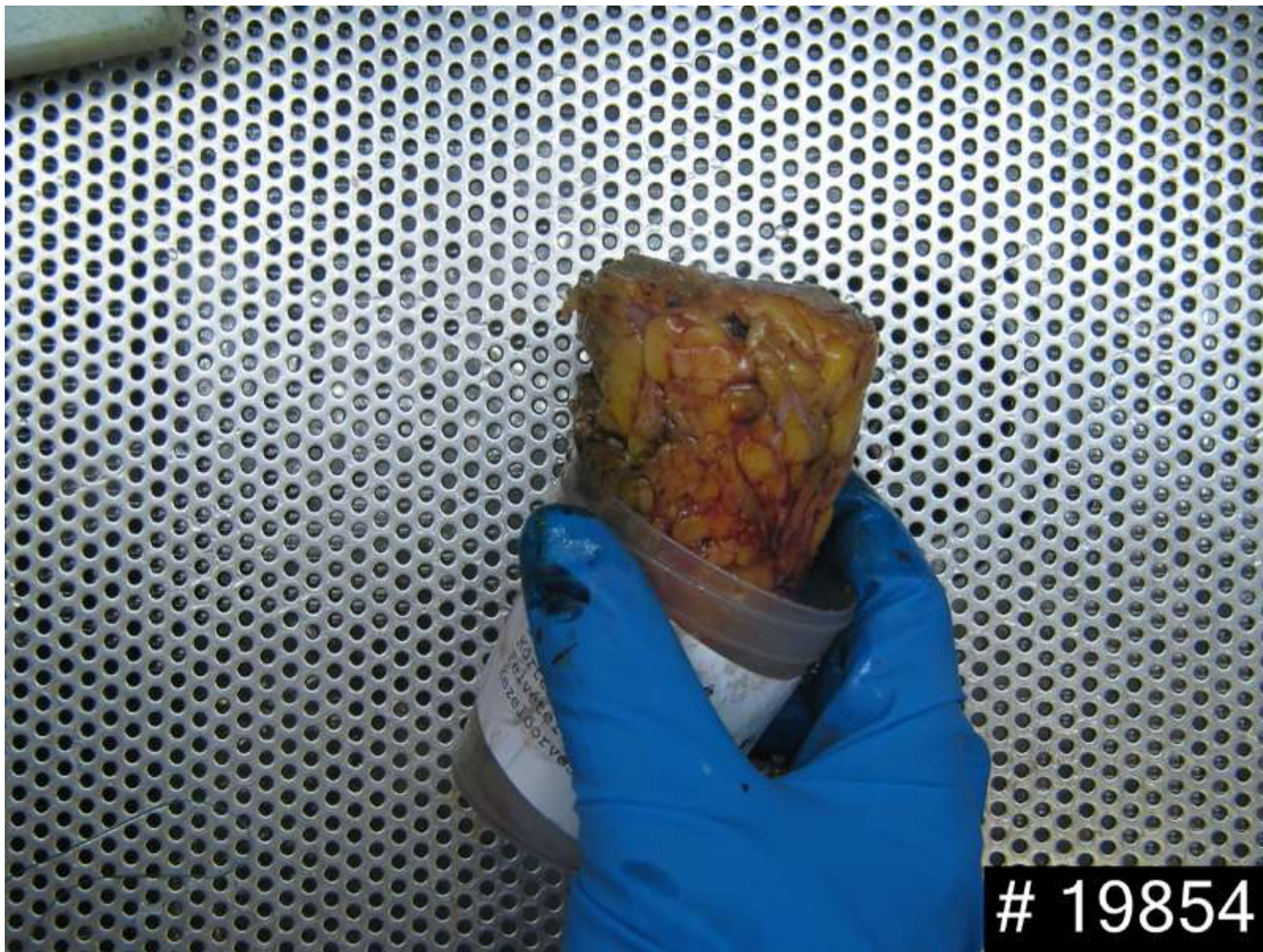
mRNS EXPRESSZIÓ (real time RT-PCR,
DNS CHIP)

- FEHÉRJE

mikroRNS-ek

IMMUNHISZTOKÉMIA
WESTERN BLOT ANALÍZIS
PROTEOMIKA







Semmelweis Egyetem
<http://semmelweis.hu>

Pathológiai Diagnosztika
Molekuláris pathológia

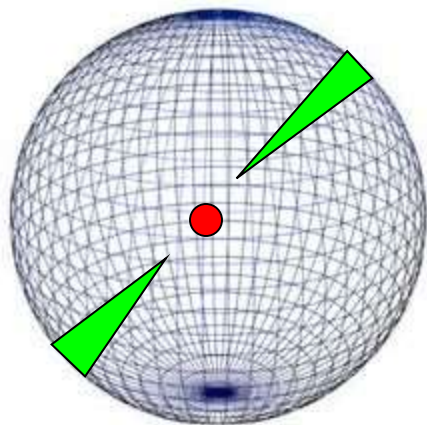
Prof. Dr. Kiss András
Ph.D., D.Sc.



Semmelweis Egyetem
<http://semmelweis.hu>

Pathológiai Diagnosztika
Molekuláris pathológia

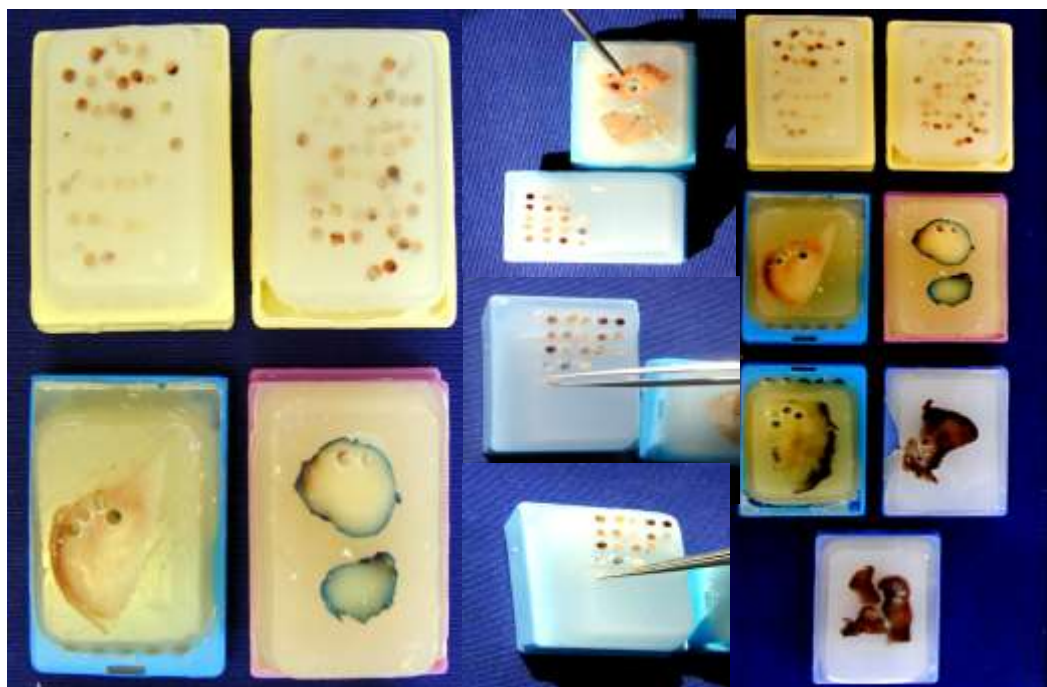
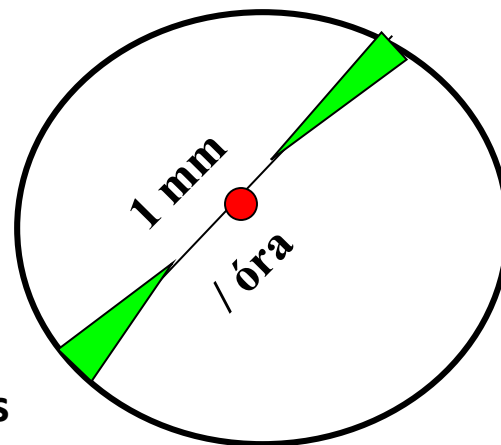
Prof. Dr. Kiss András
Ph.D., D.Sc.



Optimális fixálandó
anyagméret ?

5 mm vastag

alternatív archiválás:
RNAlater, foly. nitr. fagyasztás



Példa: 8 cm-es tumor
rezekátum

Ha a rezekátum közepéből
származik a pathológiai
mintavétel: kb. 3-4 óráig
fixálatlan → degradáció

+ műtéti relatív ischemia

↓
degradáció







000_I3_2012_PROF

Liver specimen. Immersed in Formalin. 24 h.

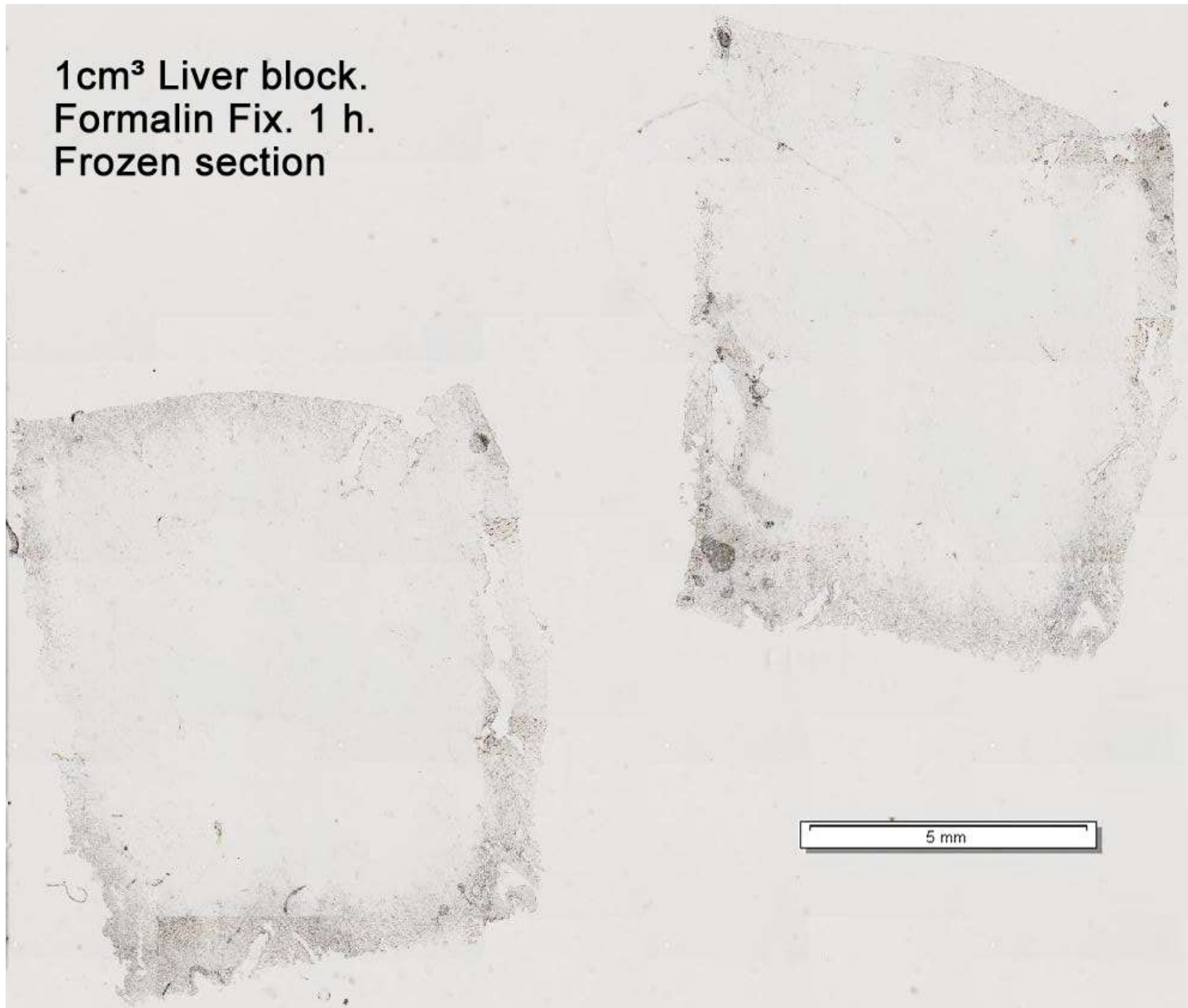


Semmelweis Egyetem
<http://semmelweis.hu>

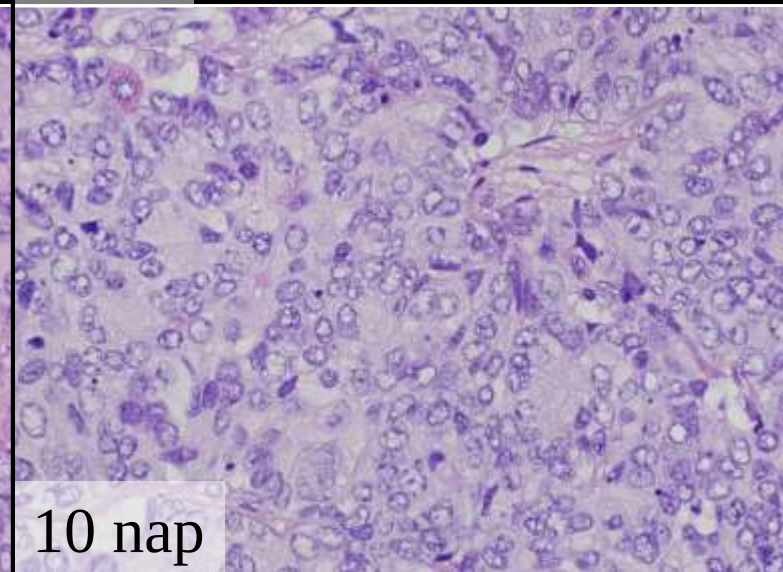
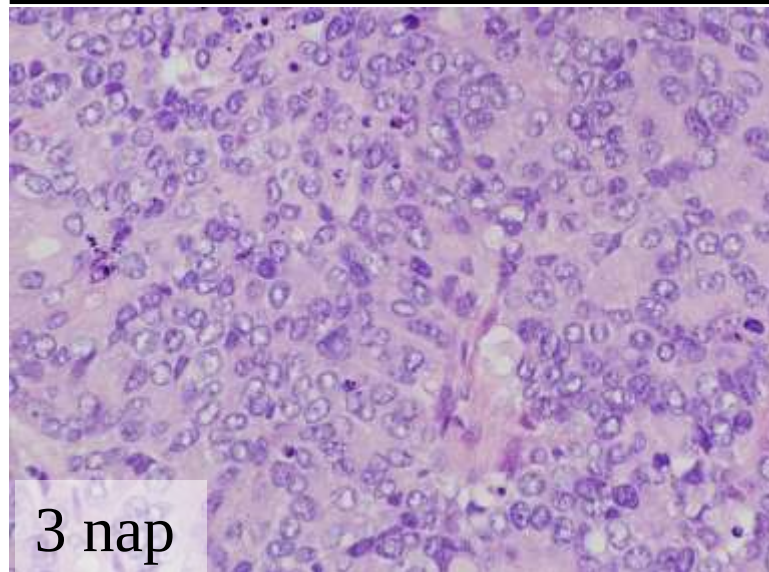
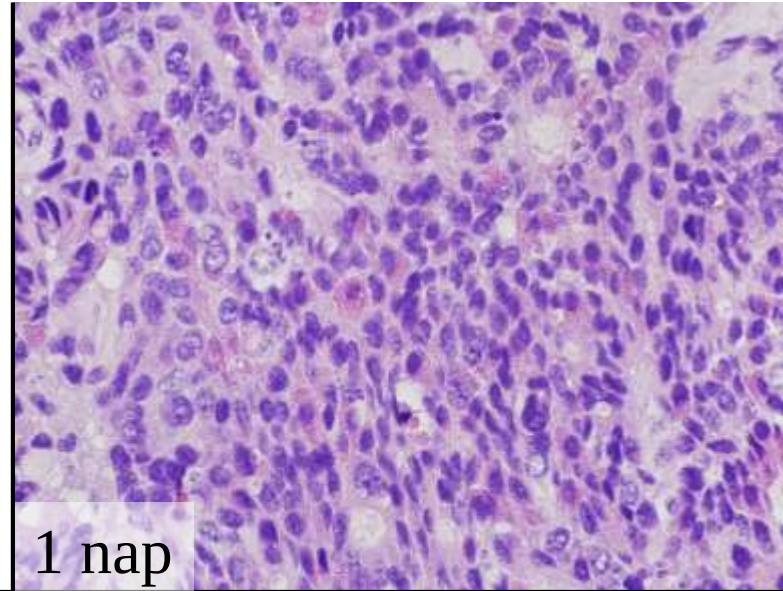
Pathológiai Diagnosztika
Molekuláris pathológia

Prof. Dr. Kiss András
Ph.D., D.Sc.

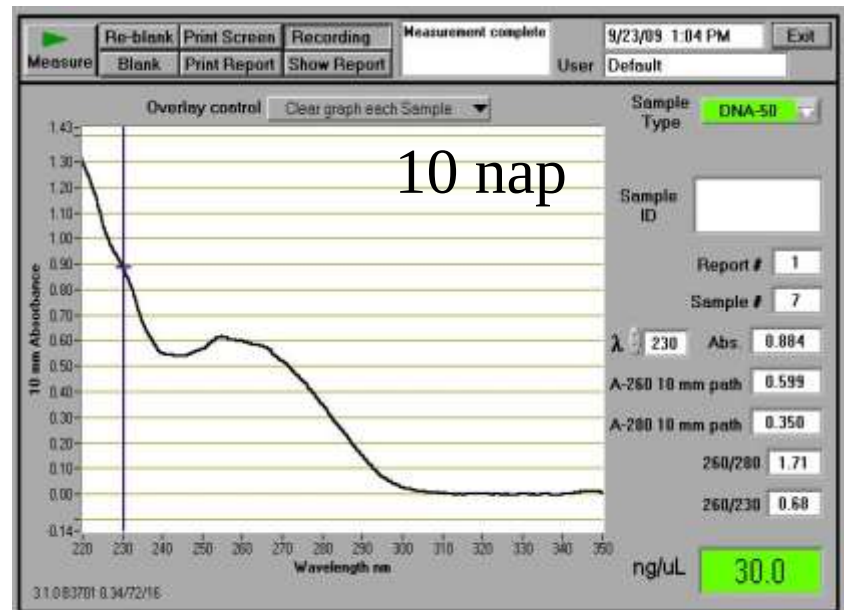
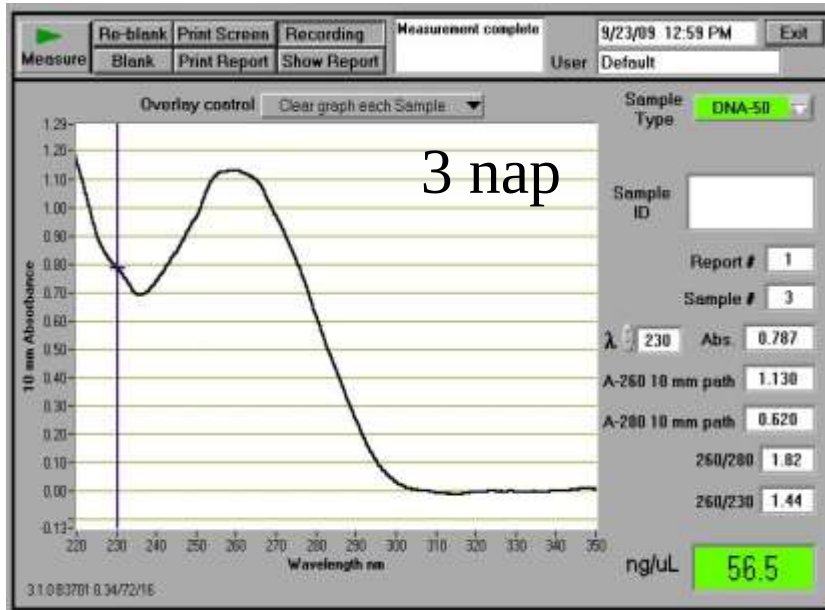
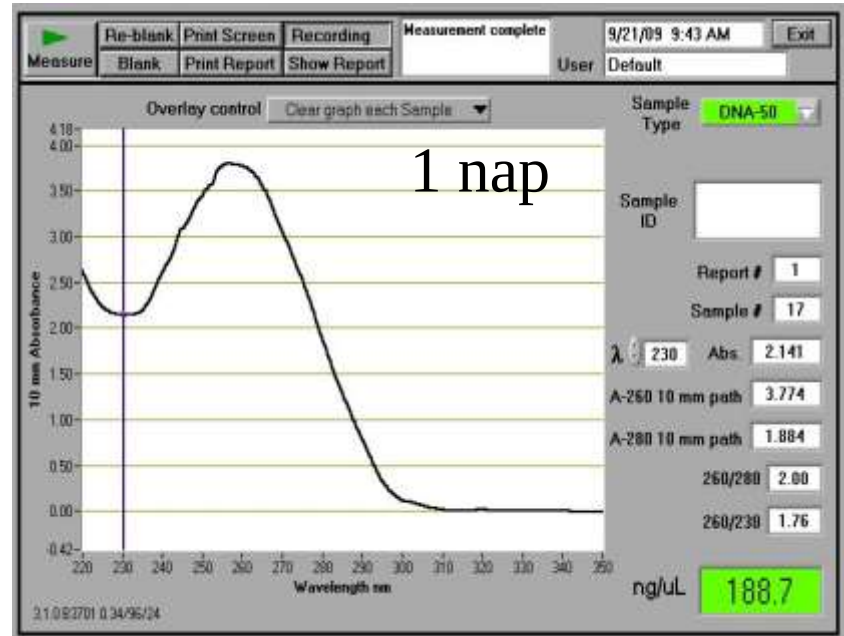
1cm³ Liver block.
Formalin Fix. 1 h.
Frozen section



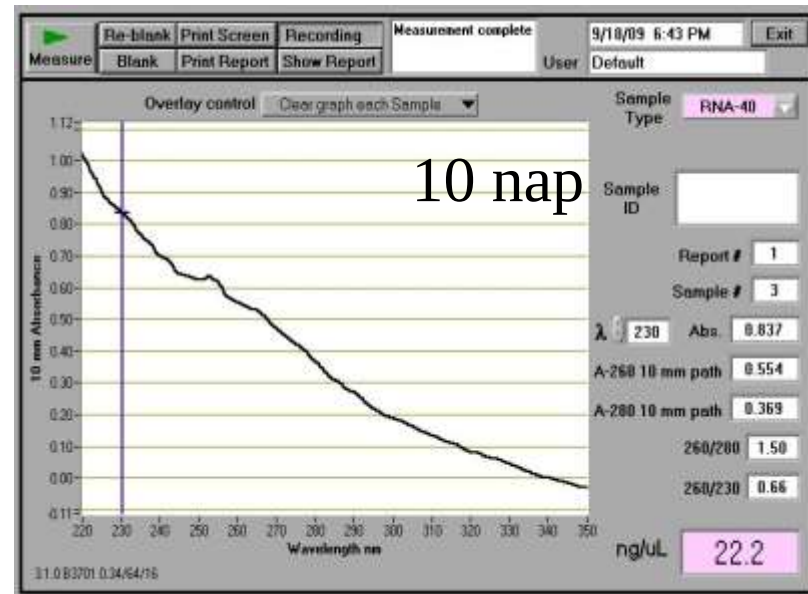
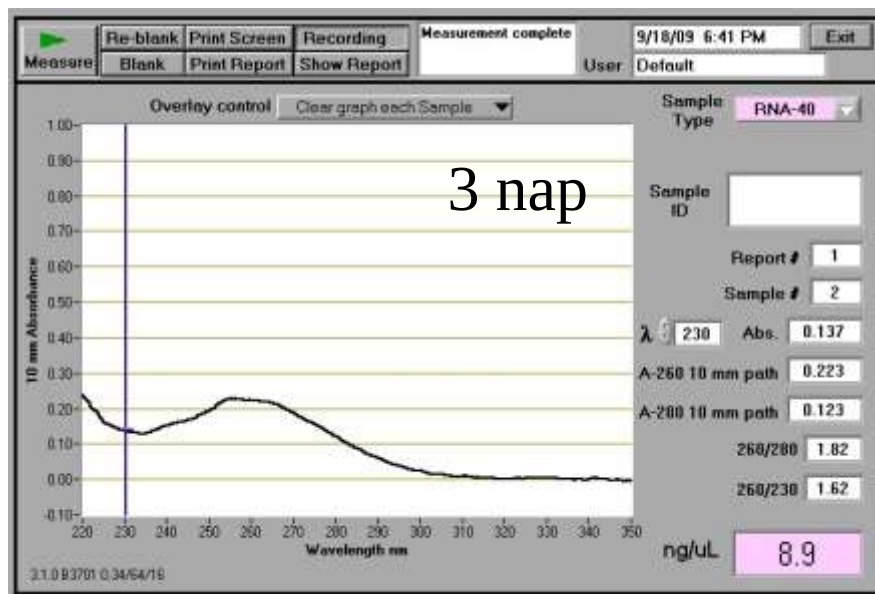
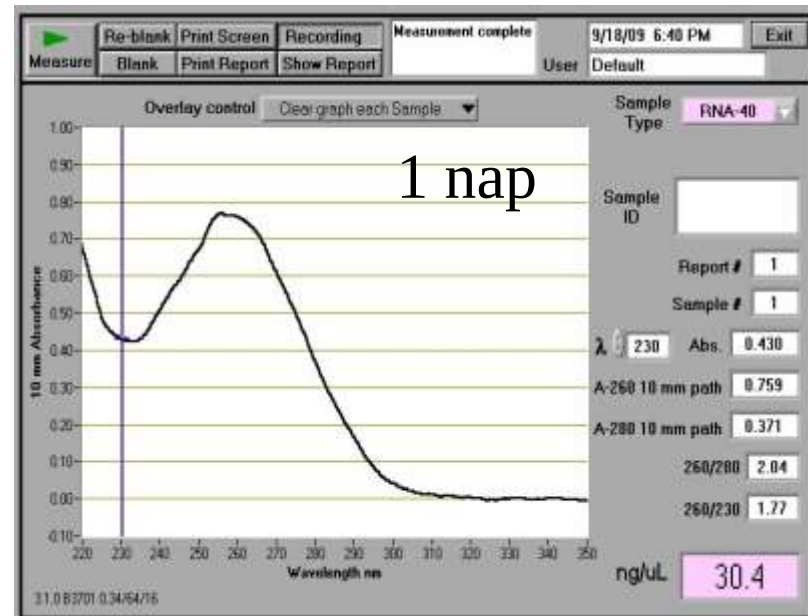
A fixálási idő hatása a szöveti struktúrára

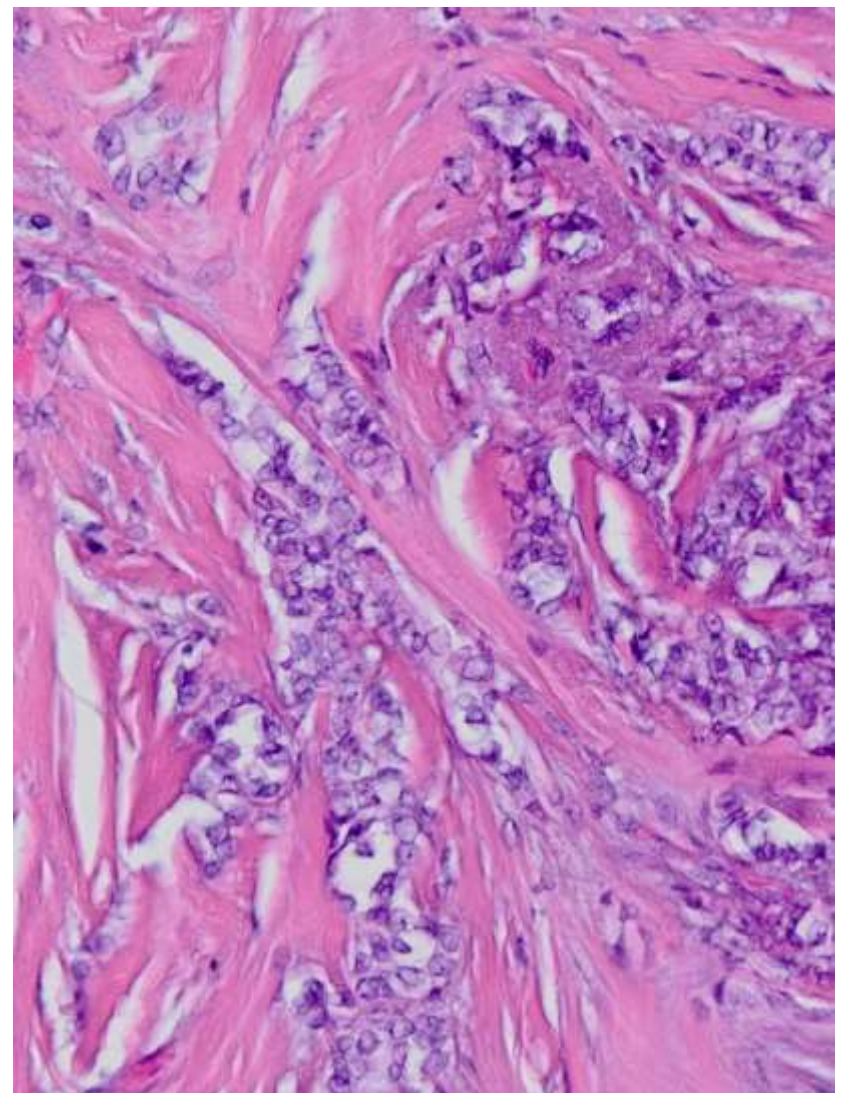
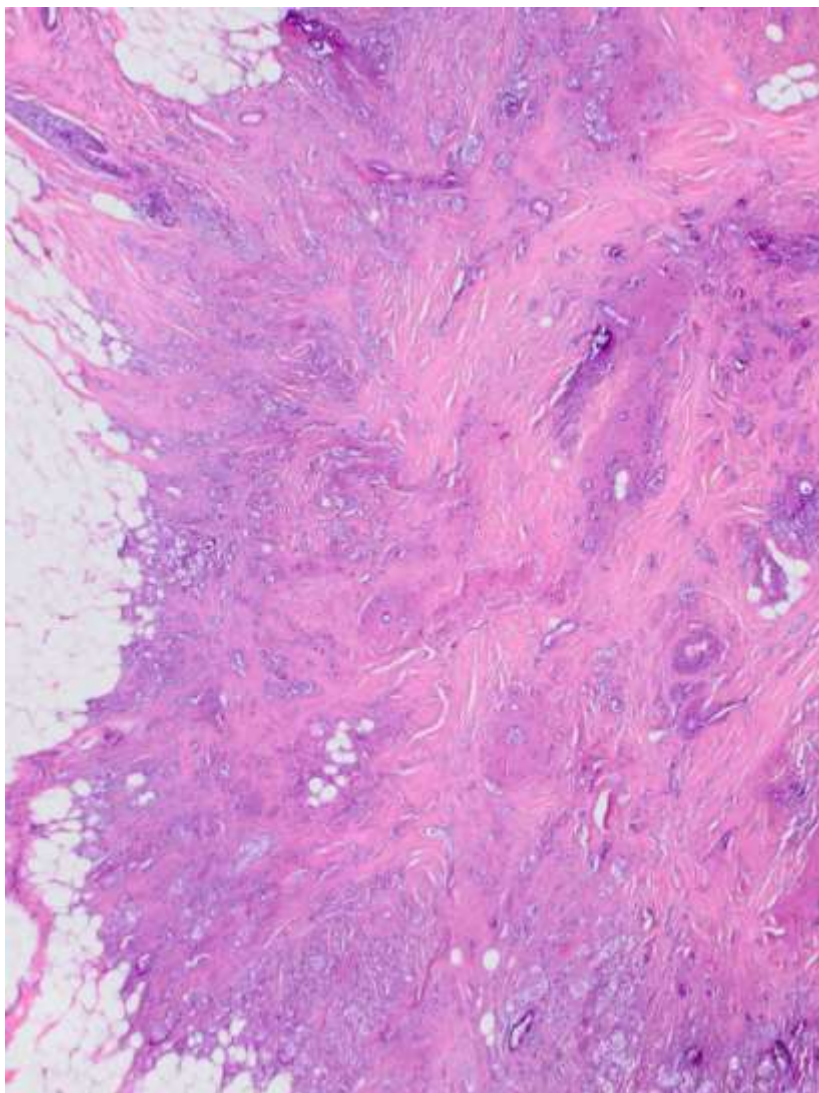


A fixálási idő hatása az izolált DNS minőségére



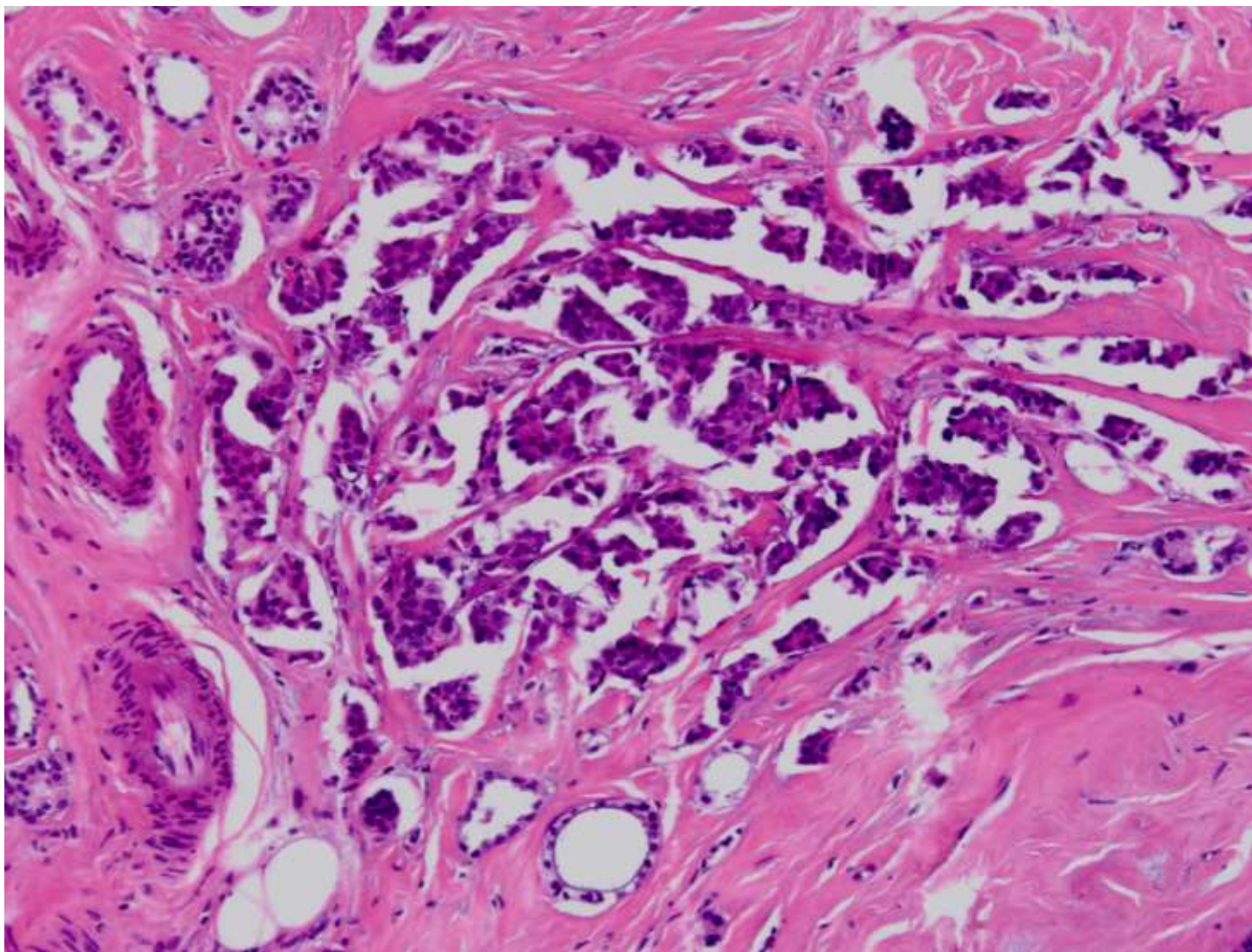
A fixálási idő hatása az izolált RNS minőségére





Breast Cancer. Operated on Friday; Immersed in Formalin; Arrived on Monday.
Jan. 2006

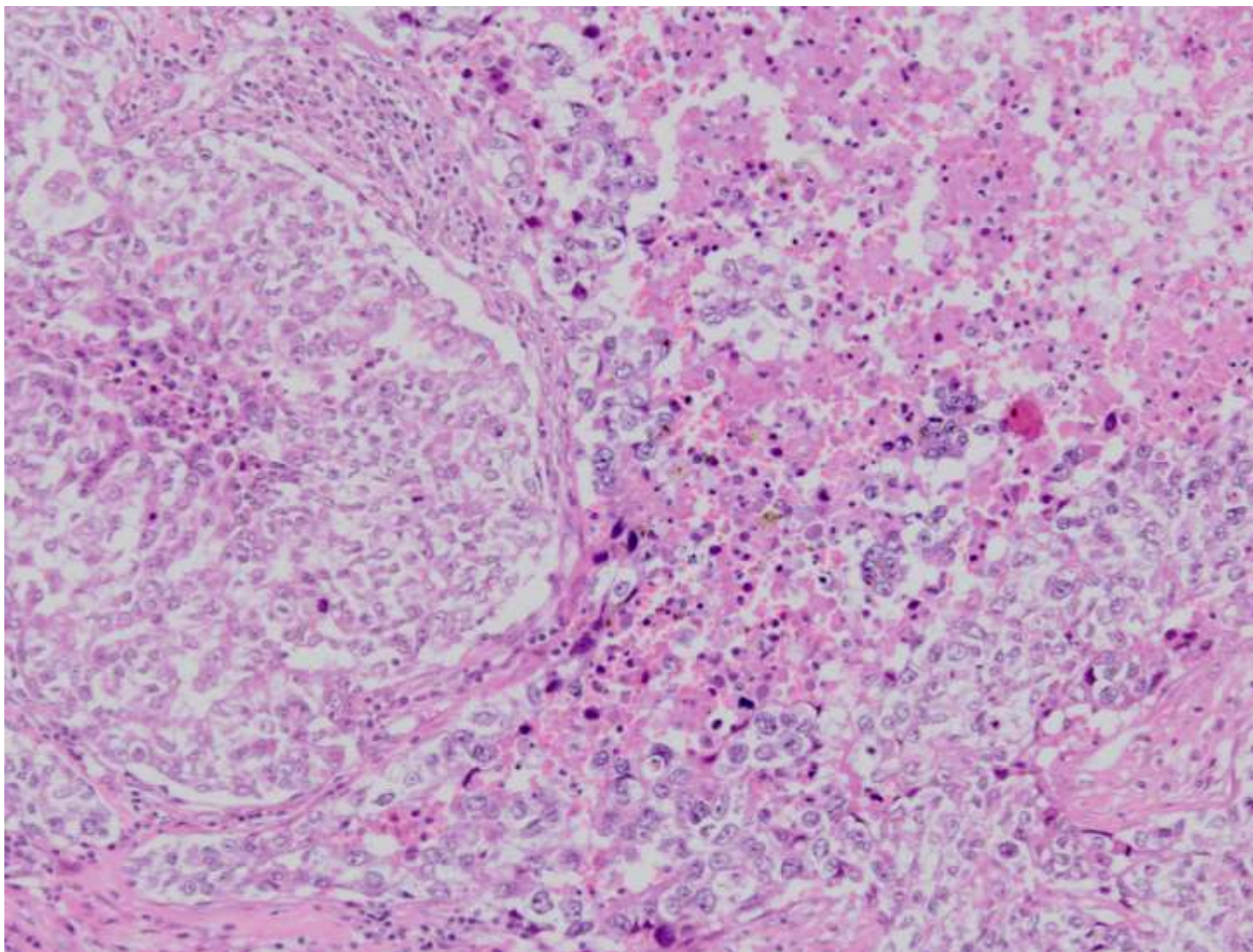




Breast Cancer. Operated on Friday; Immersed in Formalin; Arrived on Monday.

Jan. 2006





Breast Cancer. Operated on Friday; Immersed in Formalin; Arrived on Monday.

Jan. 2006



Semmelweis Egyetem
<http://semmelweis.hu>

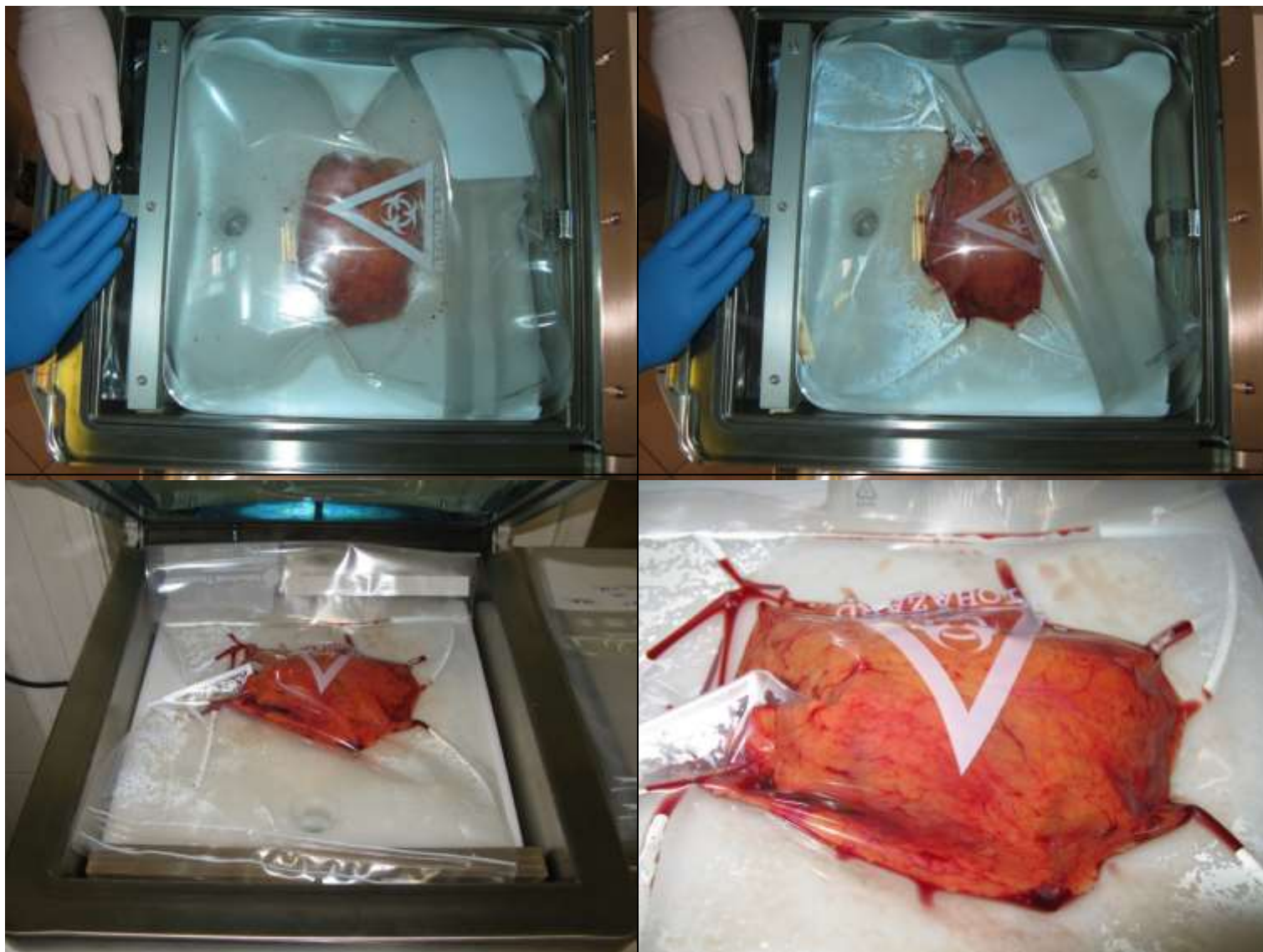
Pathológiai Diagnosztika
Molekuláris pathológia

Prof. Dr. Kiss András
Ph.D., D.Sc.



MILESTONE TissueSAFE High Vacuum Biospecimens Transfer System TM





4 C° !!!

~~34 C° !!!~~

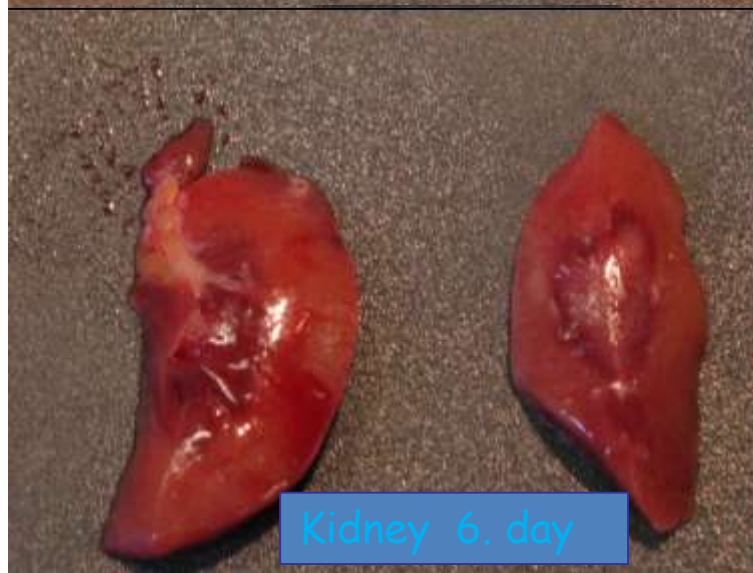




Kidney at arrival (0. day)



Kidney 3. day



Kidney 6. day



Kidney 10. day

Vese, 0. nap,
HE, 400x

Vese, 3. nap,
HE, 400x

VACUUM FÓLIÁZOTT,
majd formalin fixált PARAFFINBA
ÁGYAZOTT VESE (FFPE)

Vese, 6. nap,
HE, 400x

Vese, 10. nap,
HE, 400x



Vese, 0. nap,
PAS, 400x

Vese, 3. nap,
PAS, 400x

VACUUM FÓLIÁZOTT,
majd formalin fixált PARAFFINBA
ÁGYAZOTT VESE (FFPE)

Vese, 6. nap,
PAS, 400x

Vese, 10. nap,
PAS, 400x



Vese, 0. nap,
CD10, 400x

Vese, 3. nap,
CD10, 400x

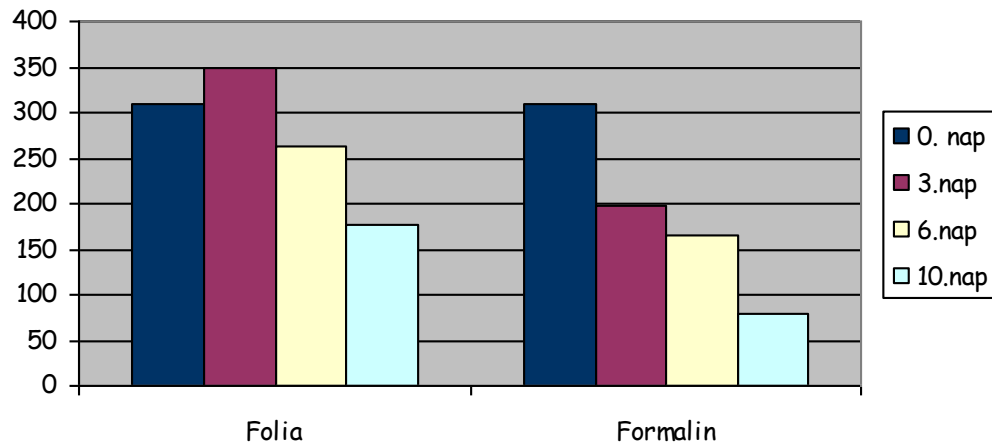
VACUUM FÓLIÁZOTT,
majd formalin fixált PARAFFINBA
ÁGYAZOTT VESE (FFPE)

Vese, 6. nap,
CD10, 400x

Vese, 10. nap,
CD10, 400x

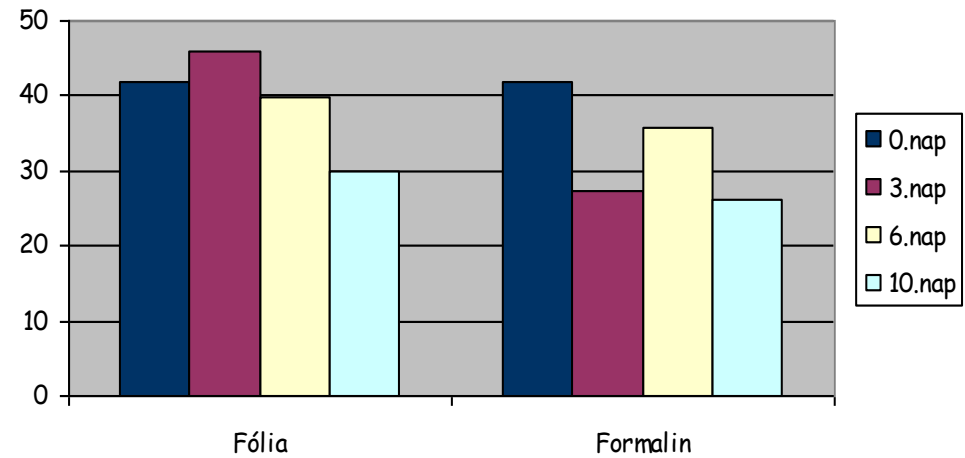


Effect of vacuum foiling on concentration of isolated RNA and DNA



RNA (ng/μl)

DNA ng/ μl)



A fóliázott mintákból izolált DNS fragmentációja

Fóliázás:

-80C°

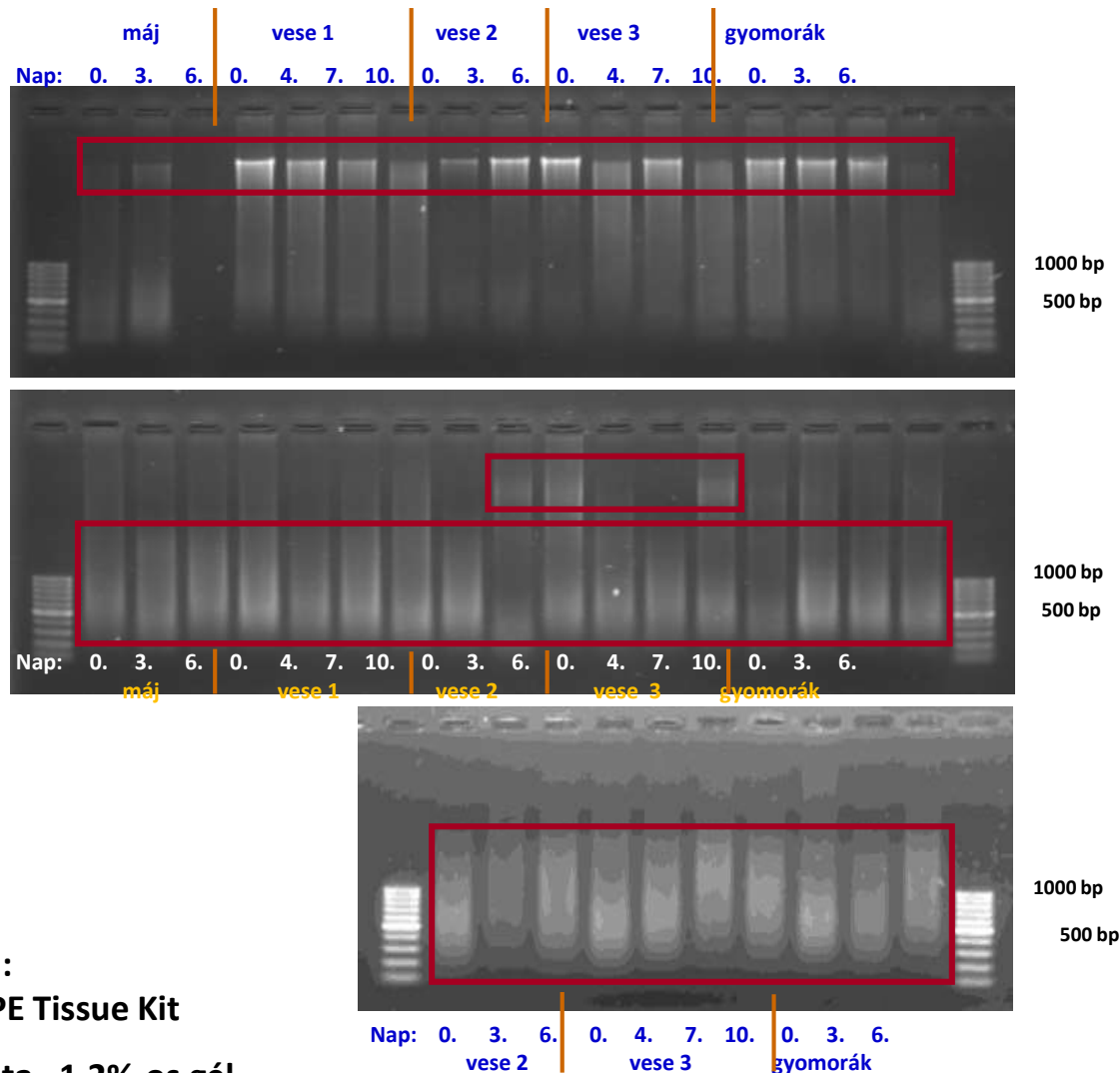
FFP

FFP

Izolálás (Qiagen) :

QiAamp DNA FFPE Tissue Kit

~0,5 µg DNS/minta, 1.2%-os gél

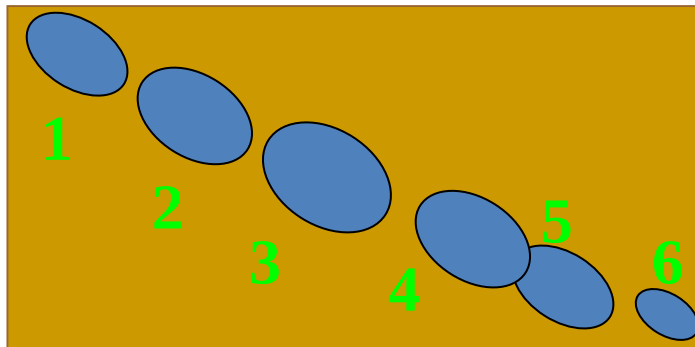
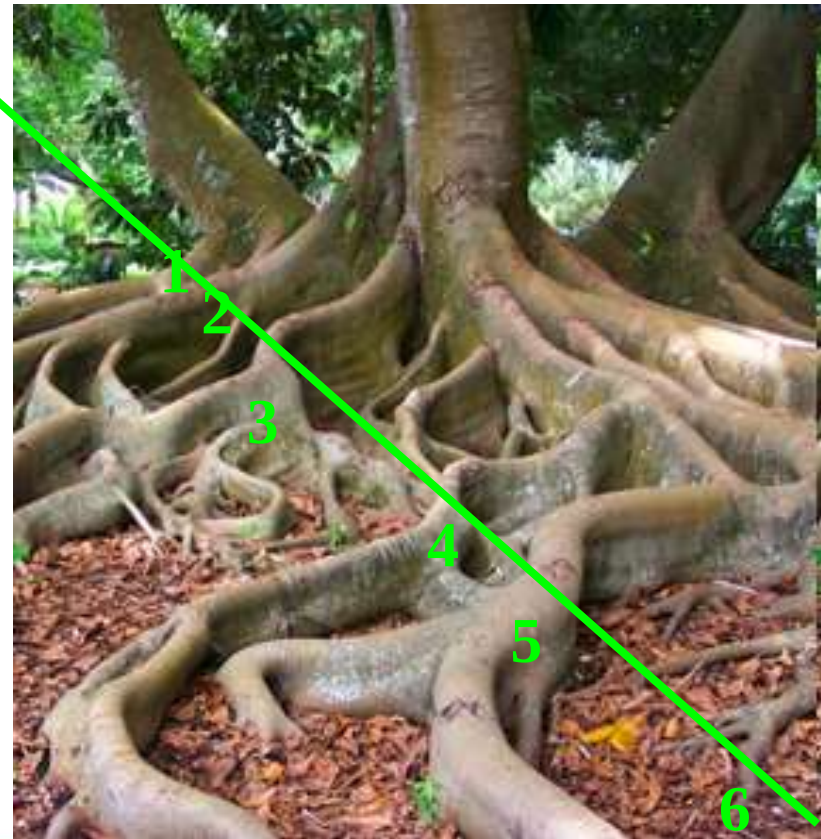


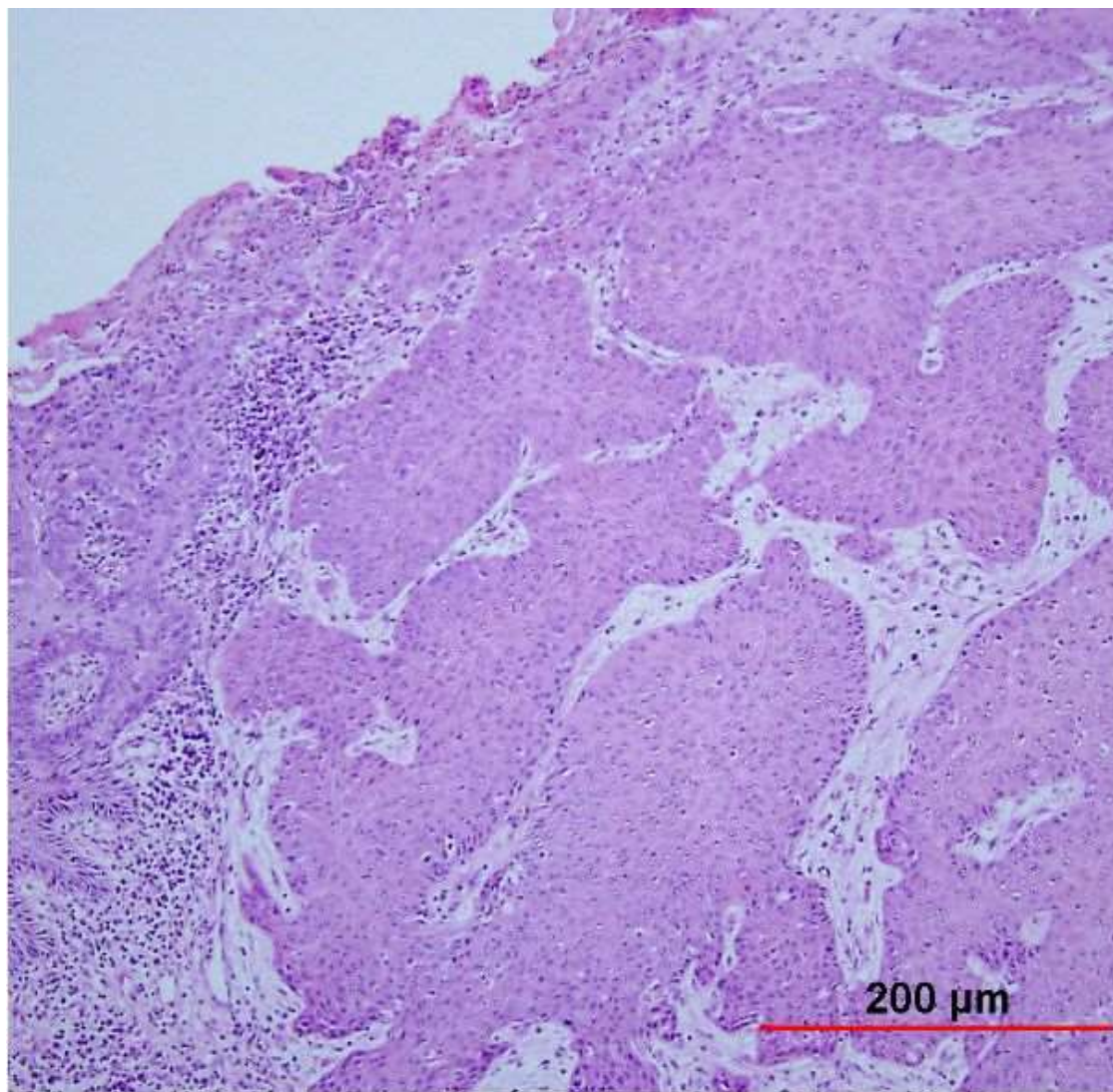
Metastasis



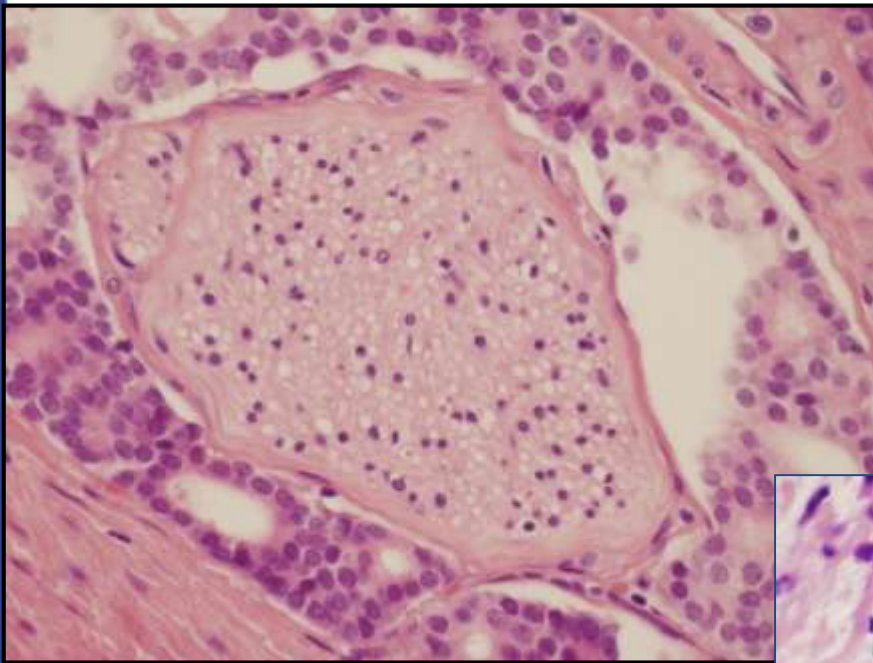


3 D 2 dimenzióban

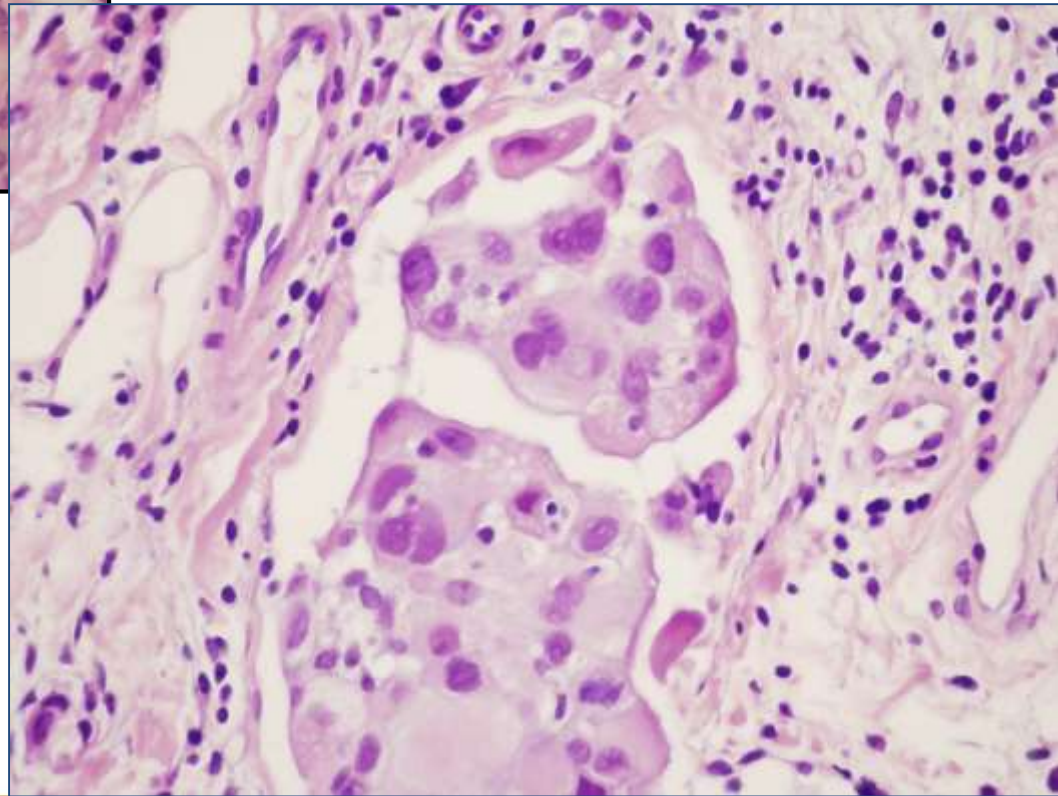




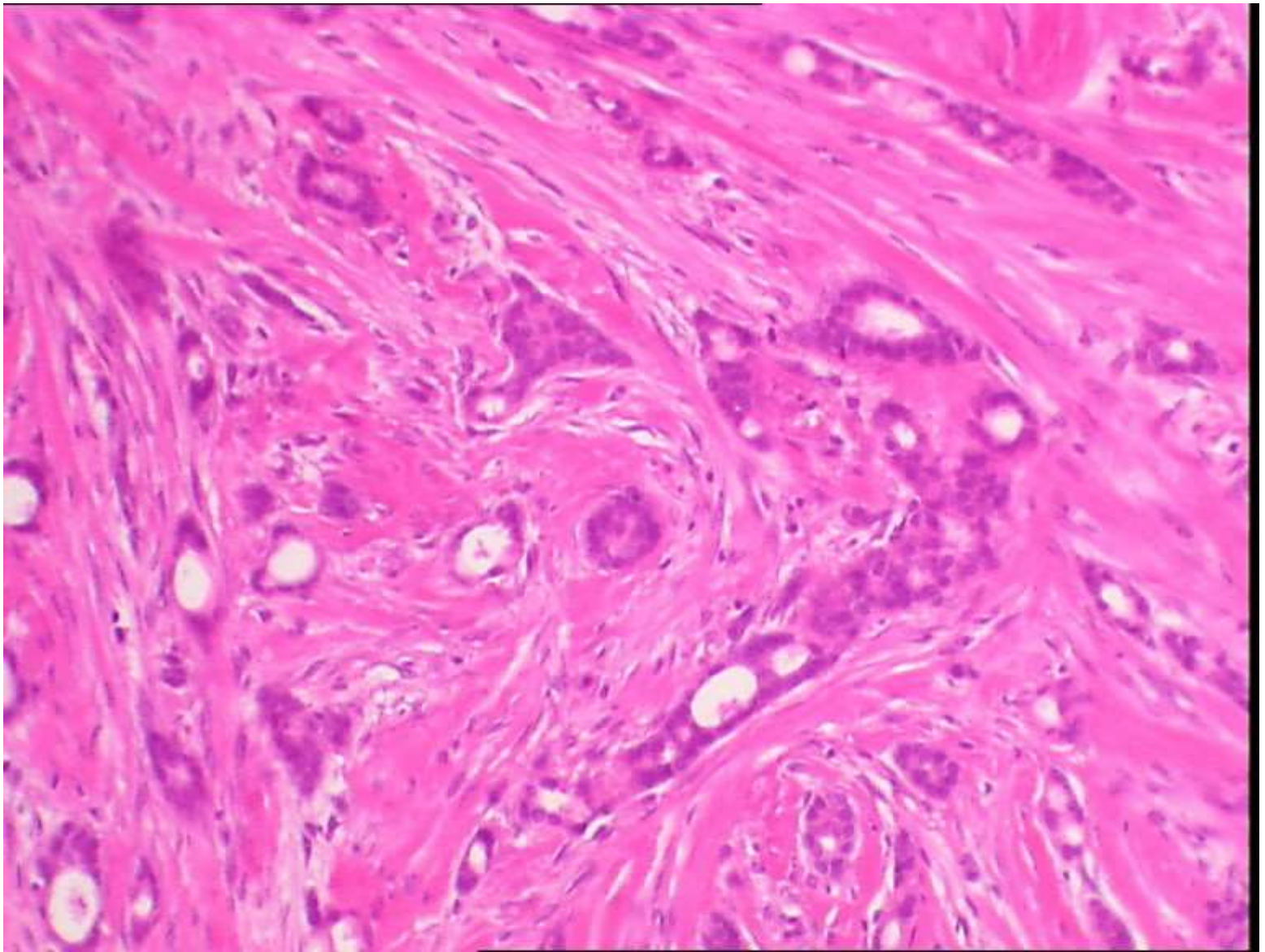
invasive carcinoma -cervix



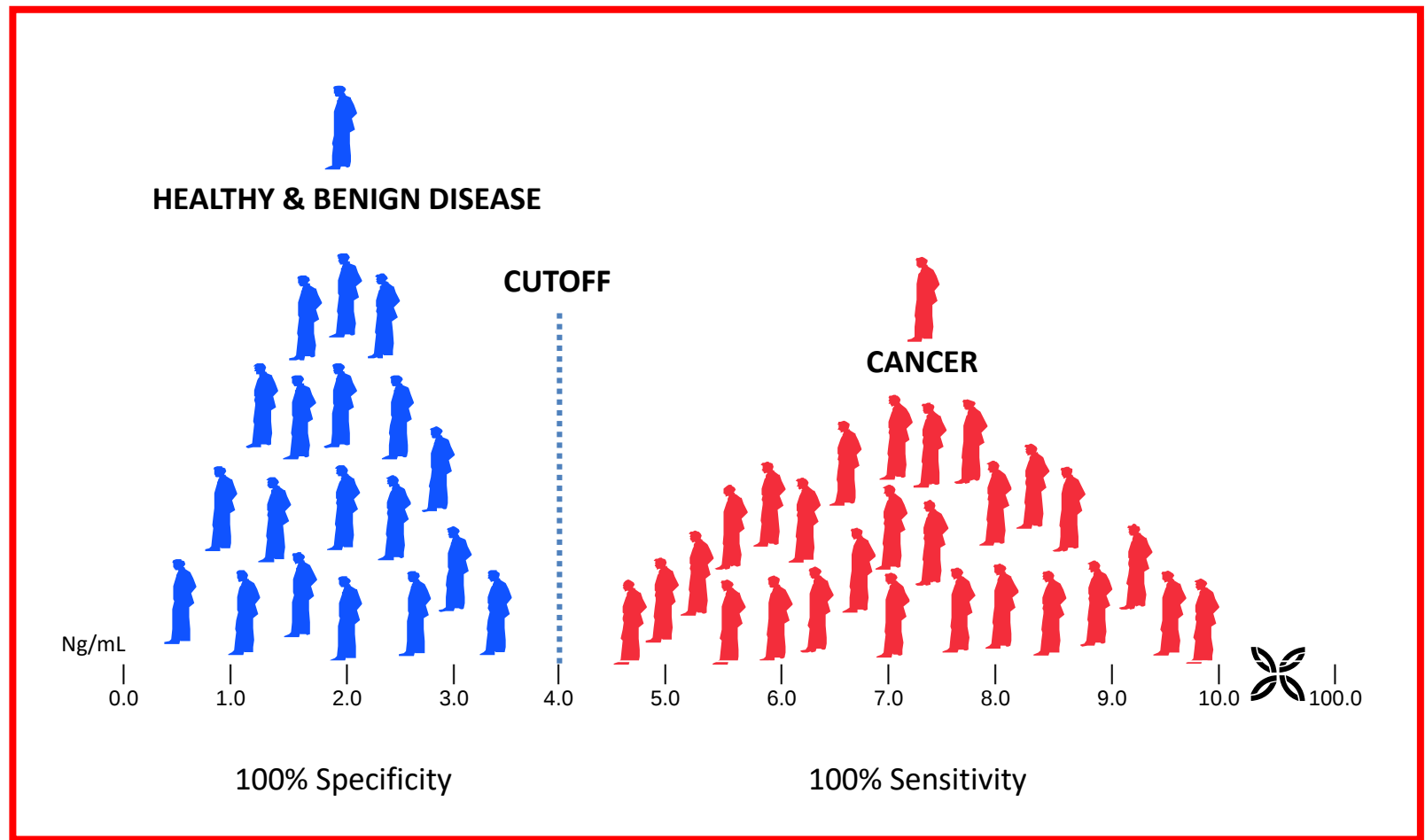
Perineural
invasion



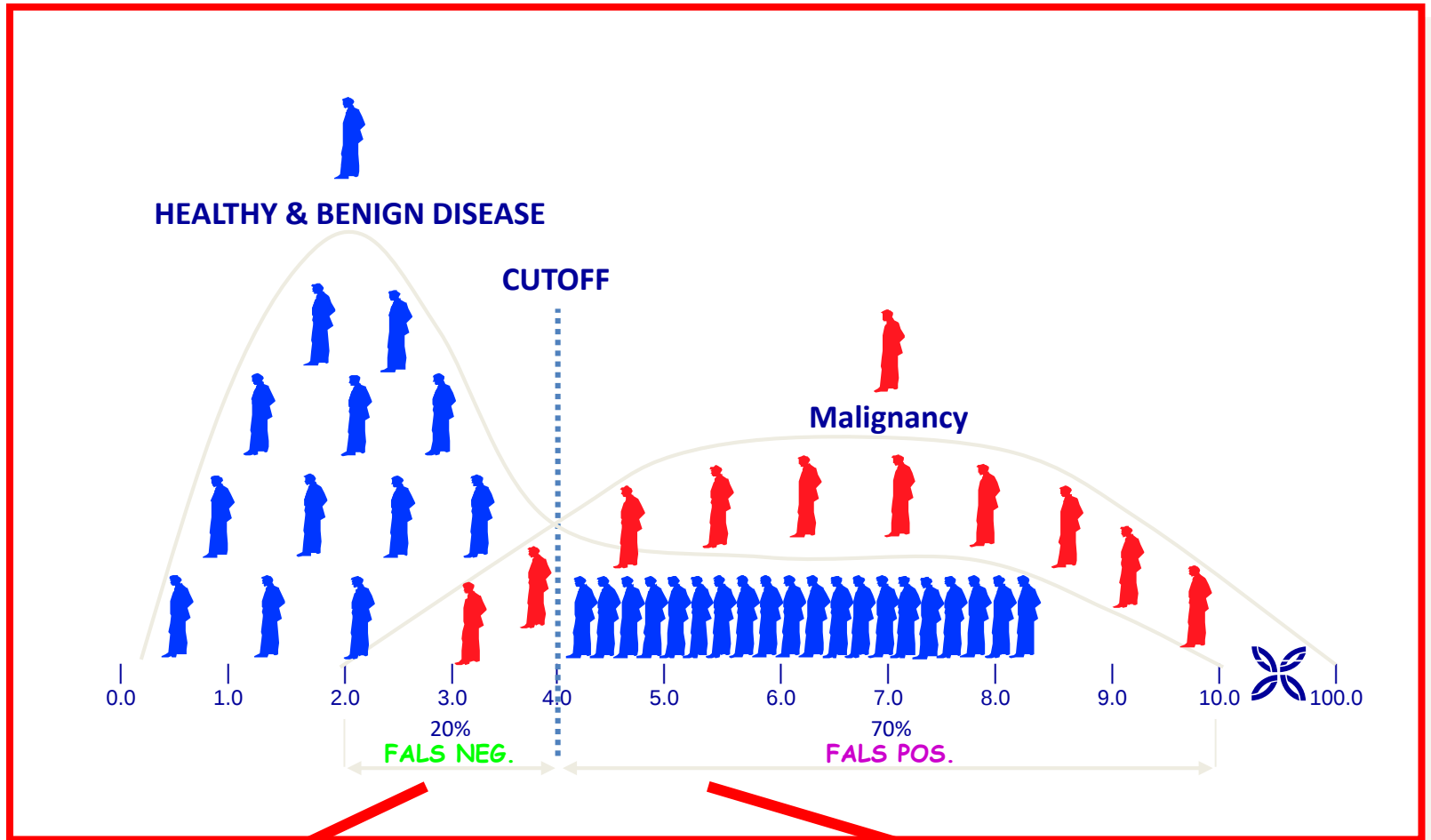
Vascular
invasion



Ideális DIAGNOSZTIKA



A realitás



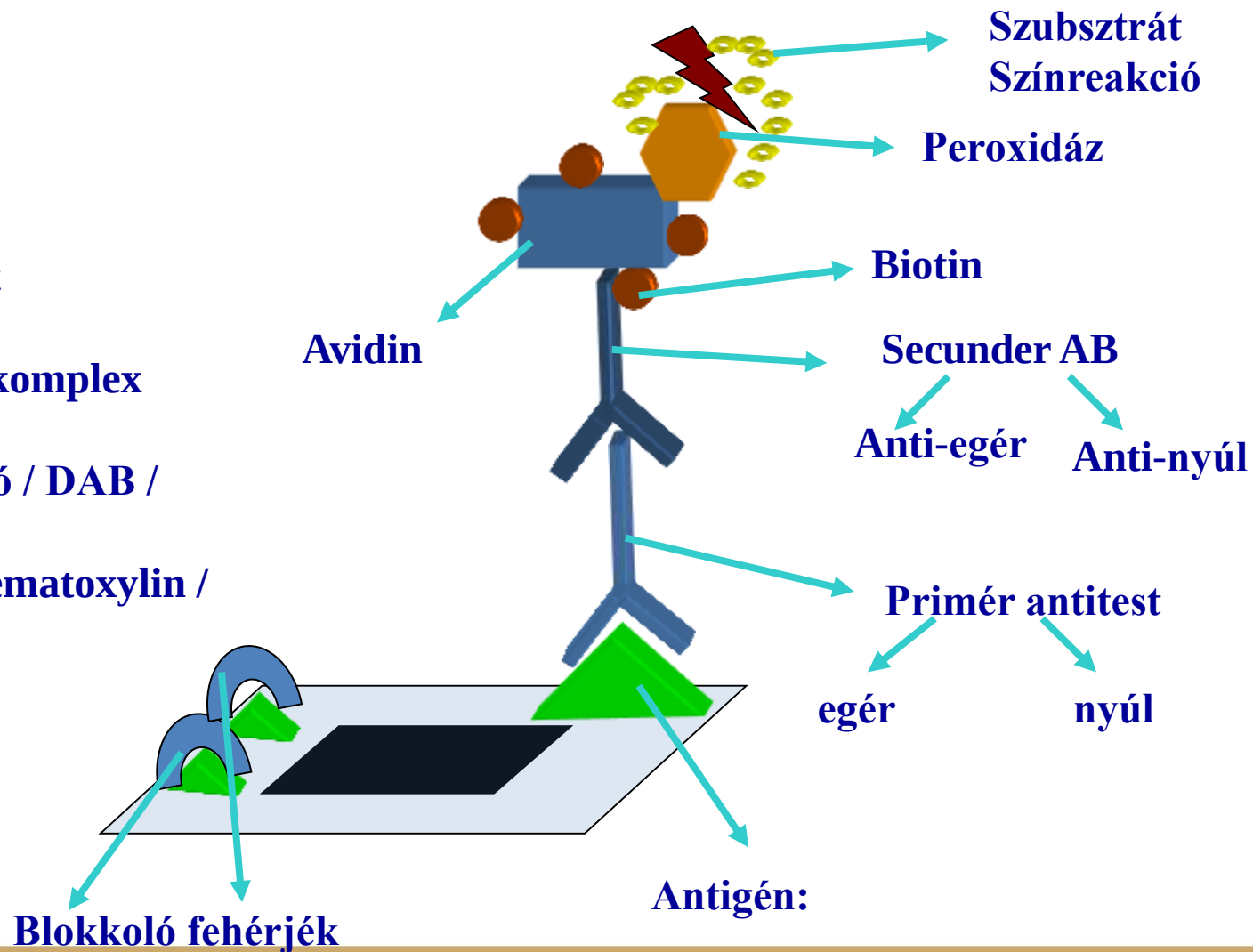
ELENGEDTÜK
Tumor tovább progrediál

TOVÁBB VIZSGÁLJUK
VÉGÜL KIZÁRJUK



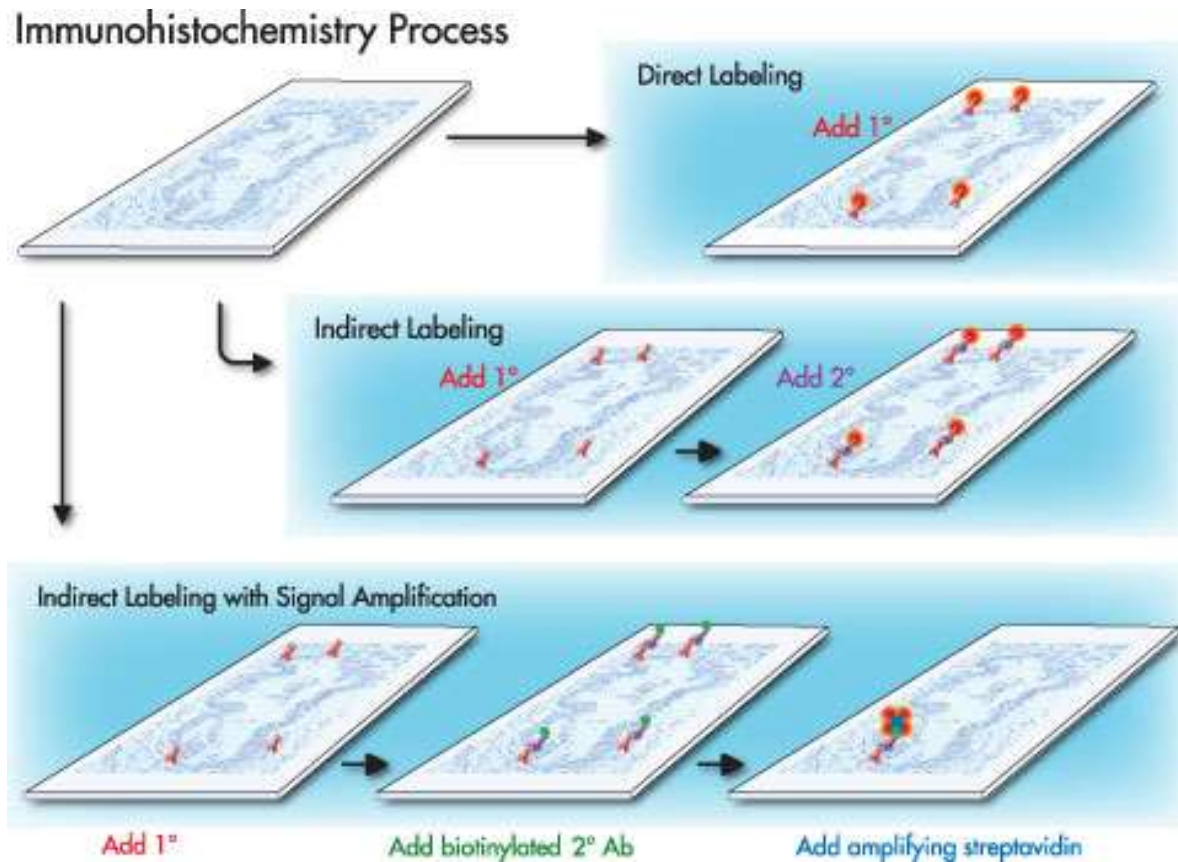
Módszerek - *Immunhisztokémia*

- Deparaffinálás
- Antigén feltárás / mikrohullám előkezelés
- Blokkoló szérum
- Primér antitest
- Secunder antitest
- Avidin - Biotin - komplex
- Peroxidáz reakció / DAB /
- Háttérfestés / haematoxylin /



IH reakció módszere

- Primer antitest (antigén specifikus)
- Szekunder antitest+chromogen (vizuális detektálás)





The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984

Niels K. Jerne, Georges J.F. Köhler, César Milstein

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984



Niels K. Jerne



Georges J.F. Köhler



César Milstein

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984 was awarded jointly to Niels K. Jerne, Georges J.F. Köhler and César Milstein *"for theories concerning the specificity in development and control of the immune system and the discovery of the principle for production of monoclonal antibodies"*.

Speciális vizsgálatok

- ↳ Protein alapú vizsgálatok:
Immunhisztokémia, immuncitokémia
- ↳ Molekuláris patológia: DNS/RNS alapú vizsgálatok
 - ↳ FISH (leginkább morfológiai alapú..)
 - ↳ Bázissorend meghatározás, stb (lásd előadás..)



Immunhisztokémiai reakció

Definíció

Immunológiai reakción (antigén-antitest kötődés) alapuló fehérjekimutatás.

↳ Leggyakrabban a tumorpatológiában használjuk

↳ Normál proteinek kimutatására, melyek a tumor eredetére utalnak

↳ Kóros proteinek kimutatására, melyek egyes tumorokra specifikusak



Diagnosztikus markerek

Tumor típus	Marker
Epithelialis tumorok (carcinoma)	Cytokeratin típusok, Szövet-specifikus markerek (PSA, TTF-1, stb.)
Mesenchymalis tumorok	Szövet specifikus markerek (actin, s-100, factor VIII, stb.)
Hematológiai tumorok	CD fehérjék (T/B sejt markerek, stb.)
Differenciálatlan tumorok (fő tumorcsoport meghatározása)	CK, vimentin, Melan-A, CD45 = LCA



Prognosztikus/prediktív markerek

Prognosis	Proliferatio: Ki-67 Oncoprotein mutatio, accumulatio: p-53
Predictiv markerek (célzott tumorelleses terápia)	Hormon receptorok: ER Növekedési faktor receptorok: EGFR, HER2, c- KIT



Gyakran használt IH reakciók

- Normál fehérjék
 - Cytoskeleton (cytoplasma reactio): cytokeratin (**epithelium**), vimentin (**mesenchymalis sejt**), S-100 (**neuron**), actin (**izom**) stb..
 - Receptor (membran vagy sejtmag reactio): oestrogen receptor, progesteron receptor (emlő), CD proteinek (hemato-lymphogen sejtek)
 - Sejtciklus regulatorok (sejtmag reaction): MIB-1/Ki-67
 - Egyéb (sejt adhesios fehérjék, cytoplasmic enzyme stb..)
- Kóros fehérjék
 - Oncoproteinek (p-53, növekedési factor receptorok: EGFR, HER2)
 - Kórokozók (virus compartment)
 - Egyéb (tau fehérjék neurodegenerativ betegségekben)

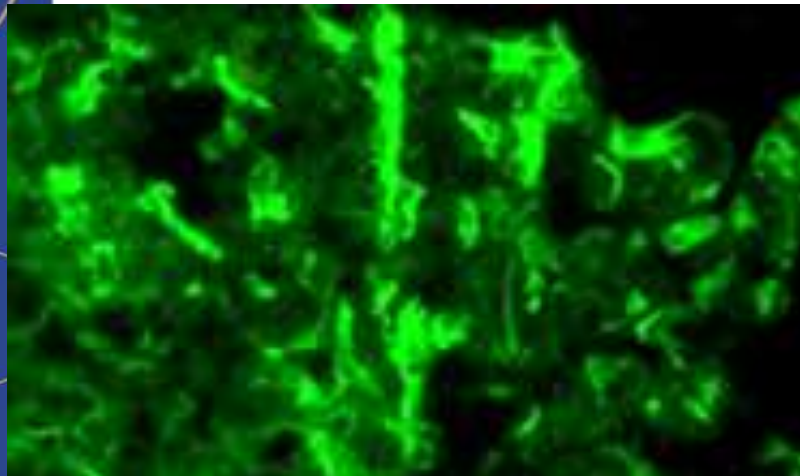


Goodpasture szindróma

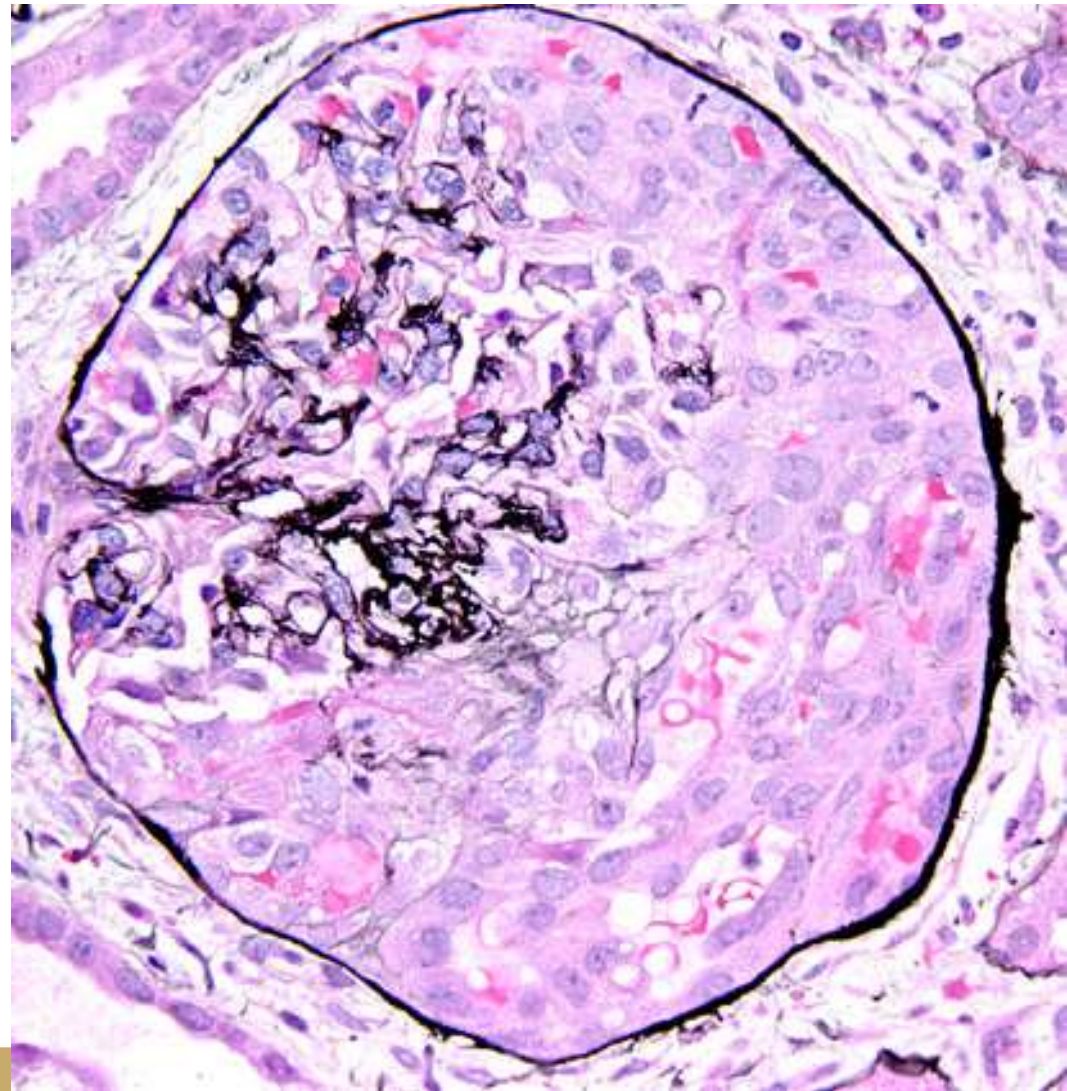
kidney



**Lineáris
IgG depositumok**



Anti-IgG Antitest IHC



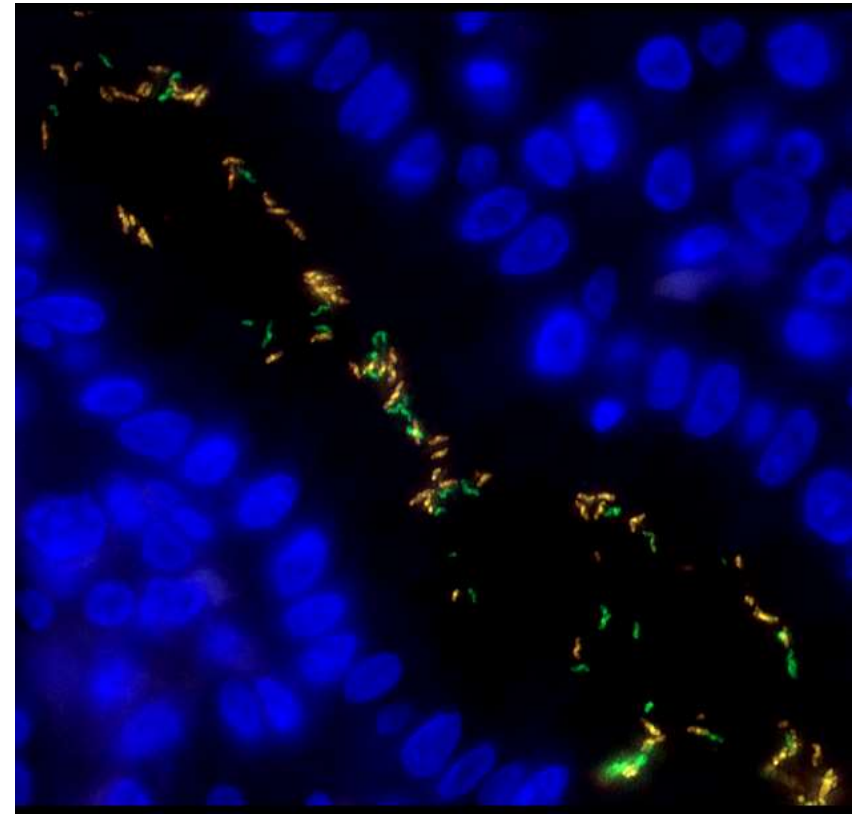
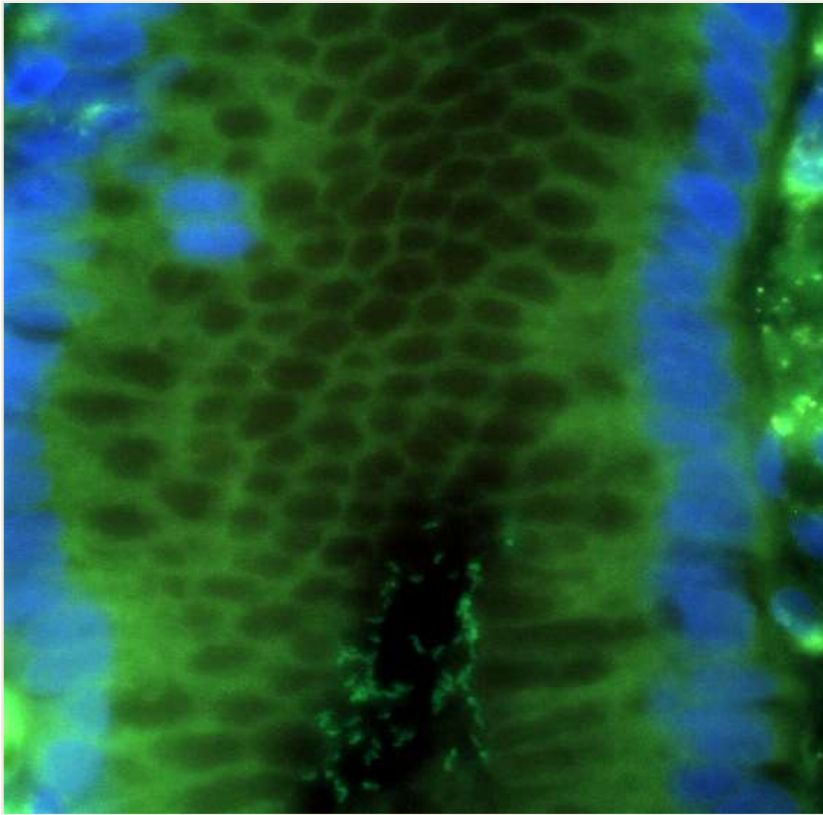
THOLOGIE der NIERE II.

dr. Andras Kiss med.
habil. Ph.D., D.Sc.

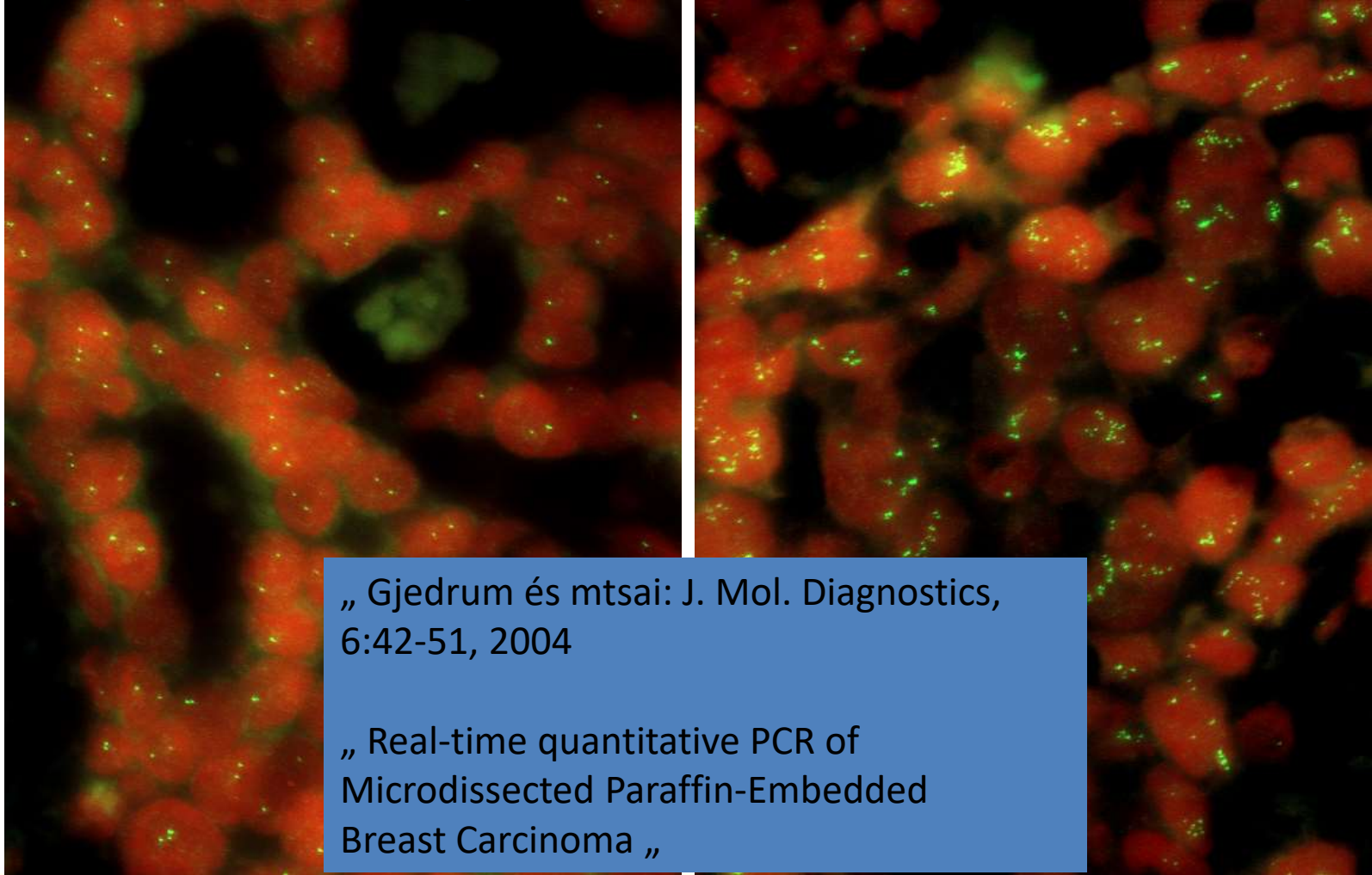
A fixálás jelentősége – Helico FISH

túlfixált

megfelelően fixált



Az előkezelés jelentősége – hőkezelés (HER2 FISH)



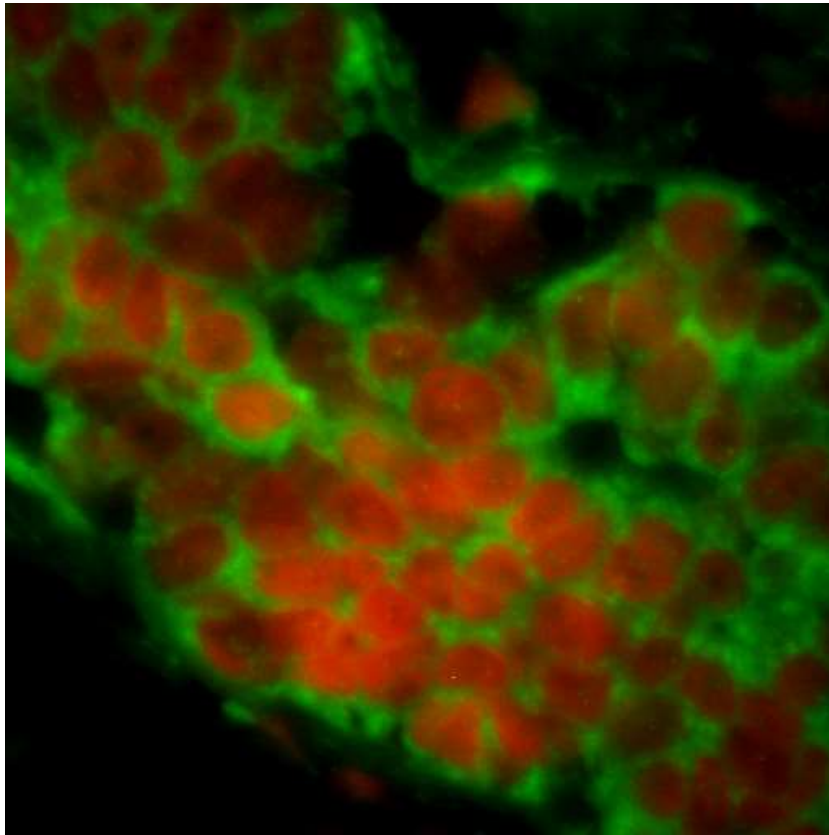
„ Gjedrum és mtsai: J. Mol. Diagnostics,
6:42-51, 2004

„ Real-time quantitative PCR of
Microdissected Paraffin-Embedded
Breast Carcinoma „

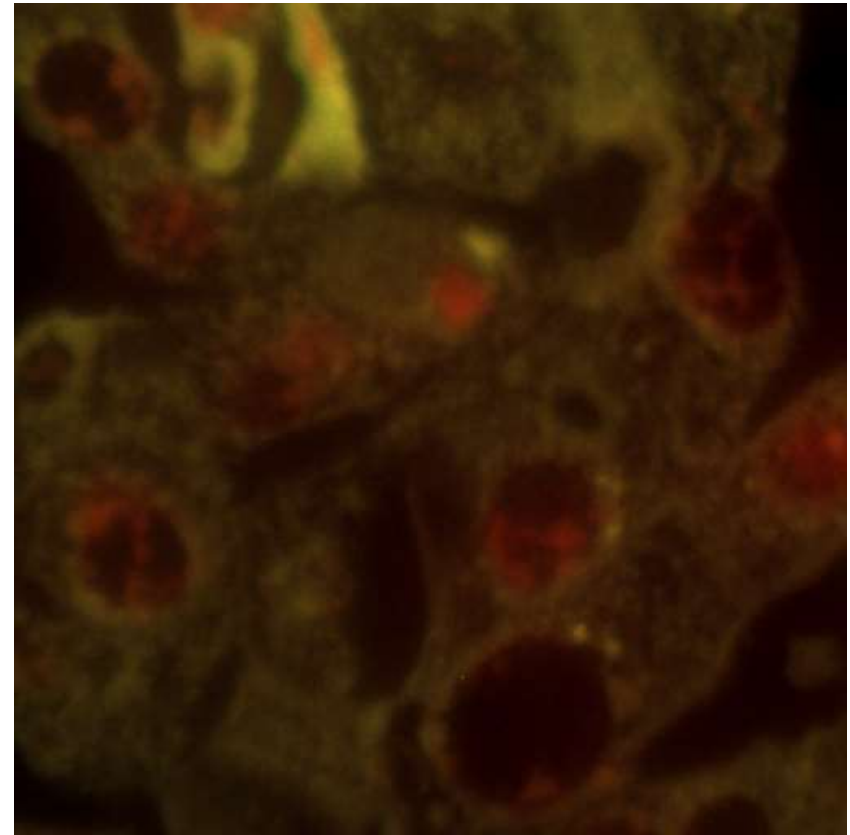


Az előkezelés jelentősége –enzimes emésztés (HER2 FISH)

alulemésztett



túlemésztett



Anamnézis:

Strumektomia, Diabetes Mellitus II. típus

Parkinson bet. Katarakta (opus)

Stroke

Agyi atrophia, Demencia

Ösophagusfekély

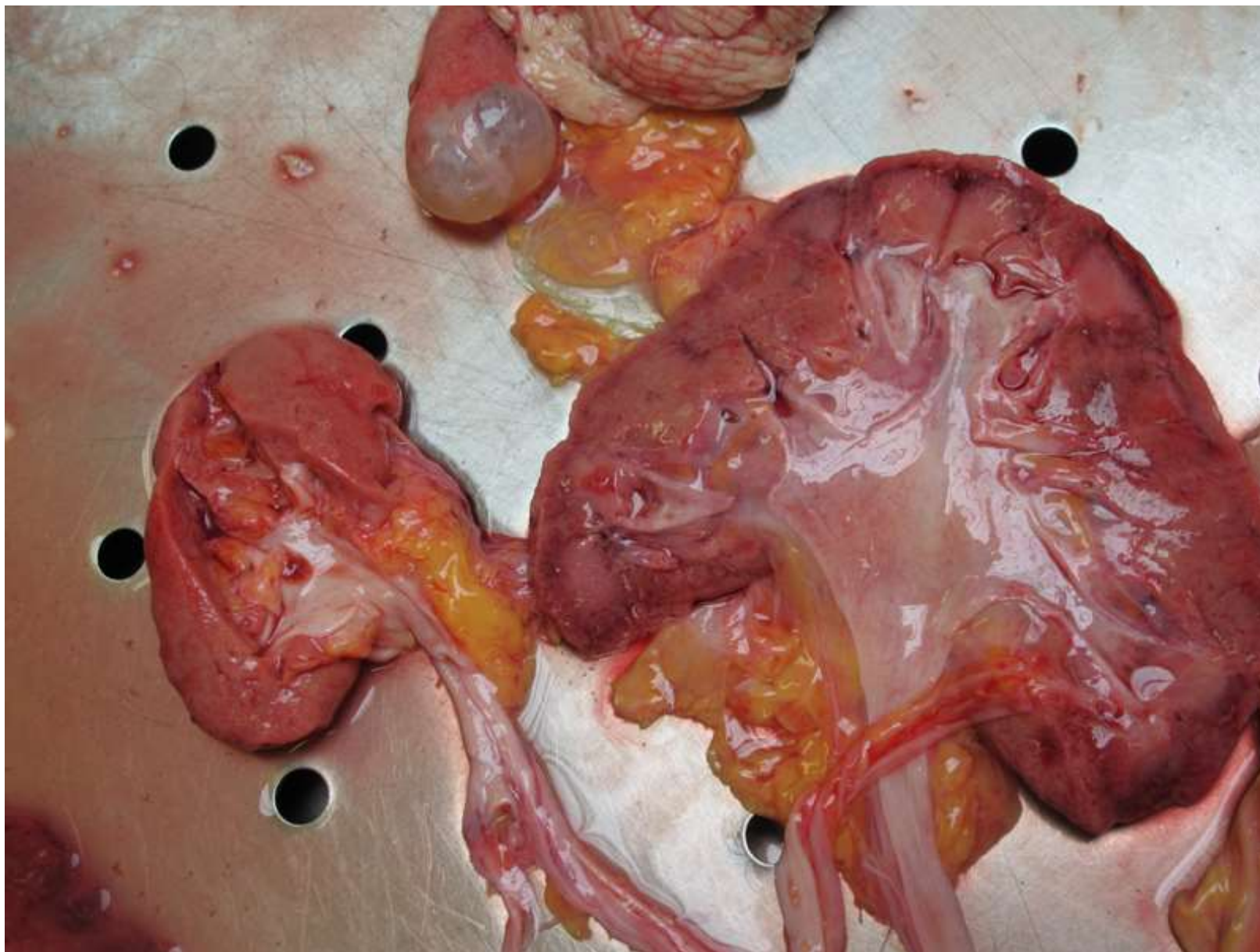
Hospitalizáció bronchitis miatt

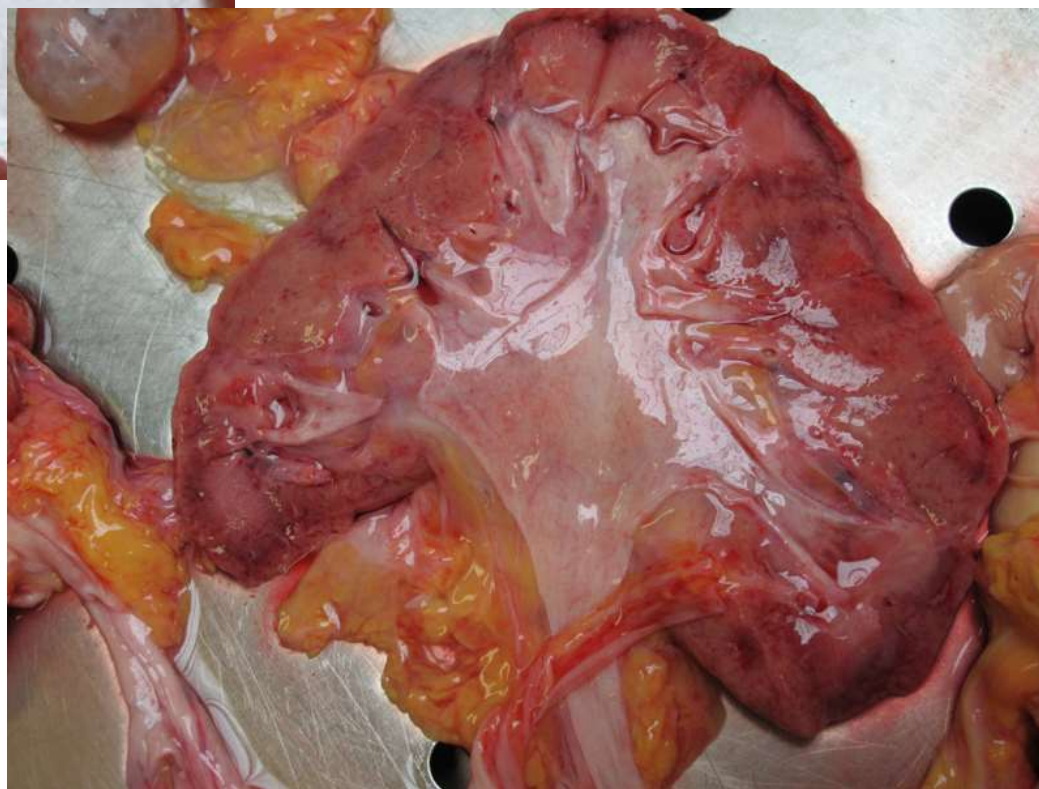
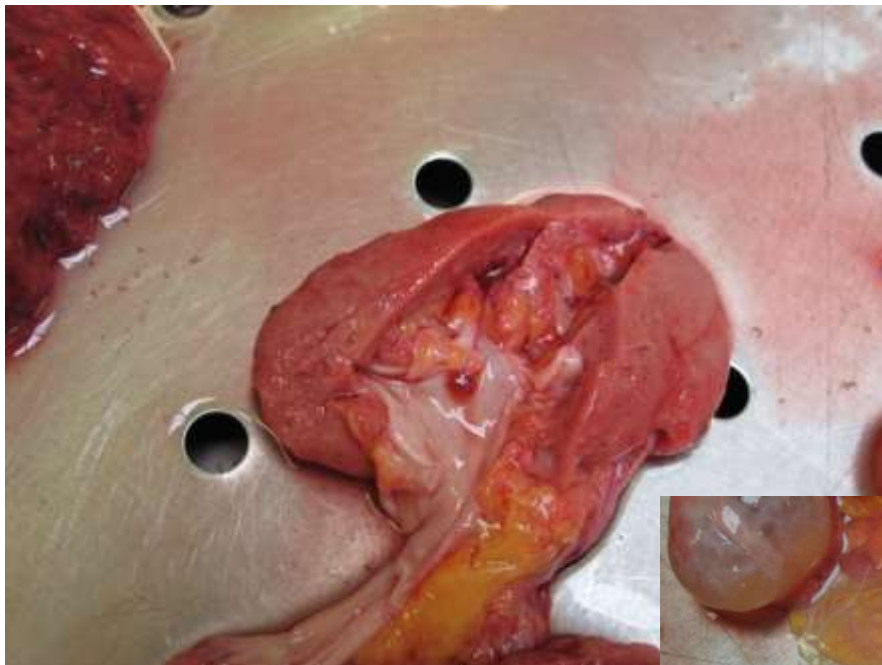
Felvételkor: Hypoglikémia, Exsiccatio

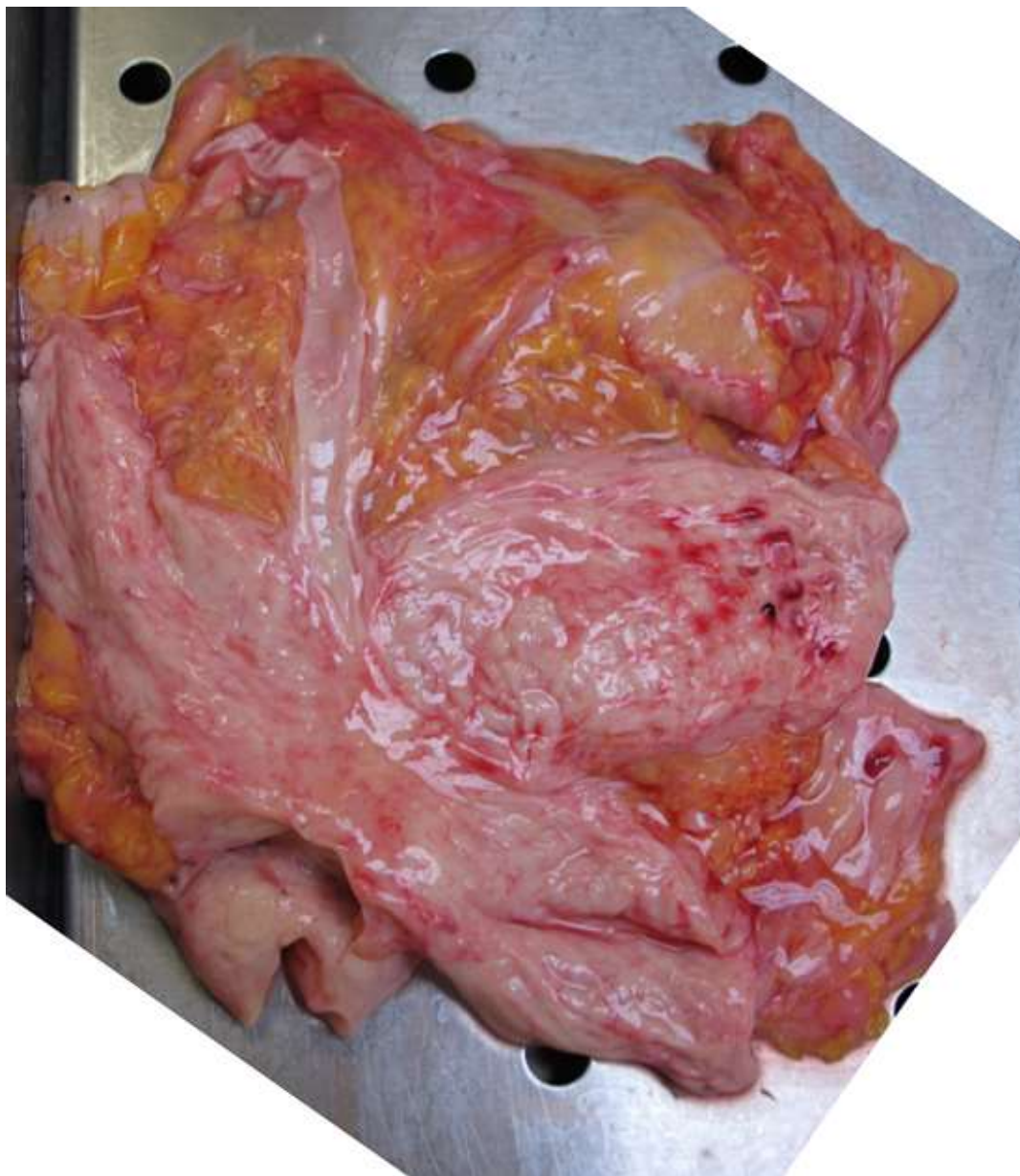
Gastroszkopia: szövettan: **gyomorrák**

UH: májmet. asp. Citologia, **FNAB : kolorektalis cc. Met. ??? Primer Tumor ???**

Gravis Anémia - Transfúsiók - ext: tumoros kachexia



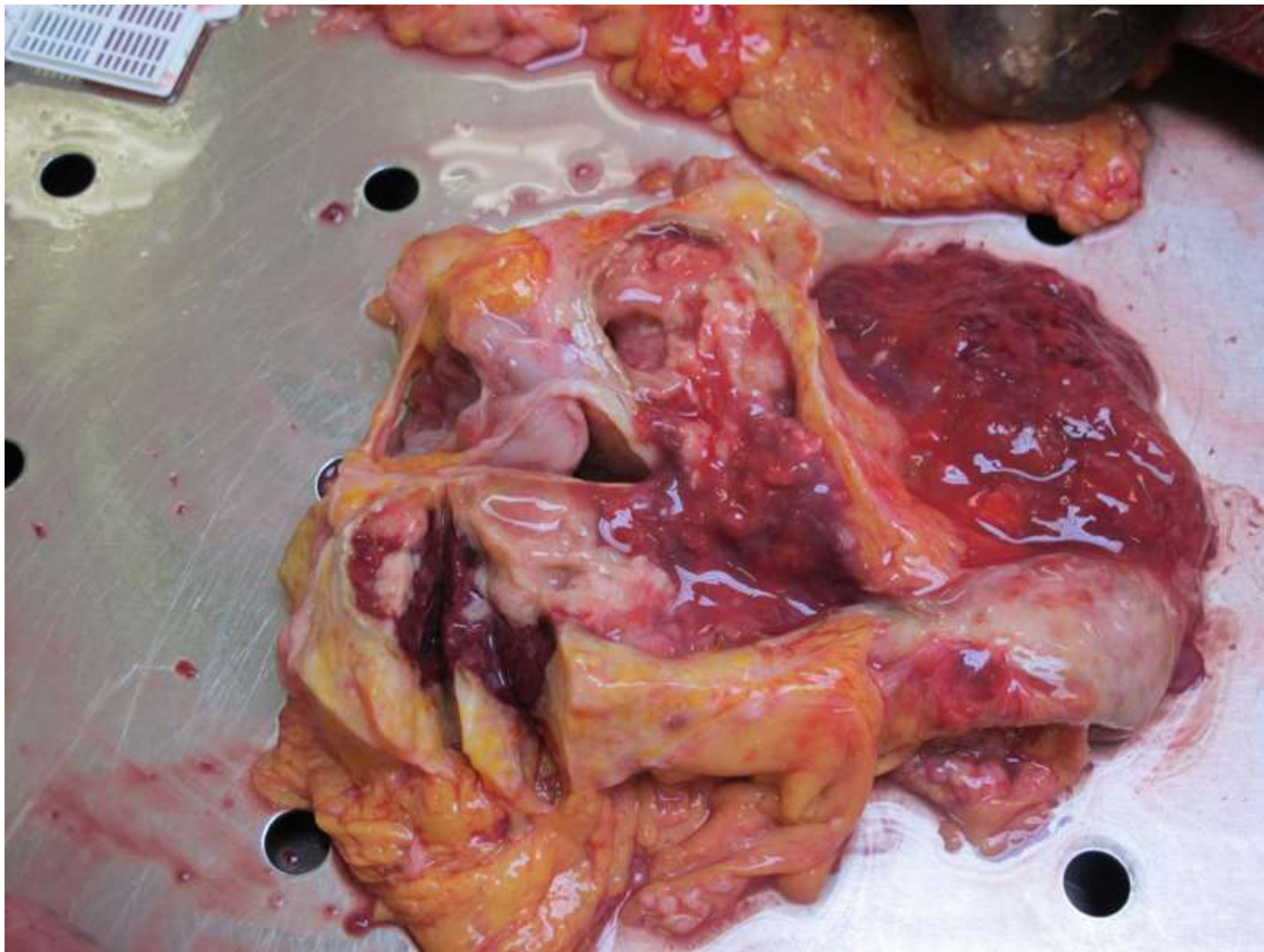








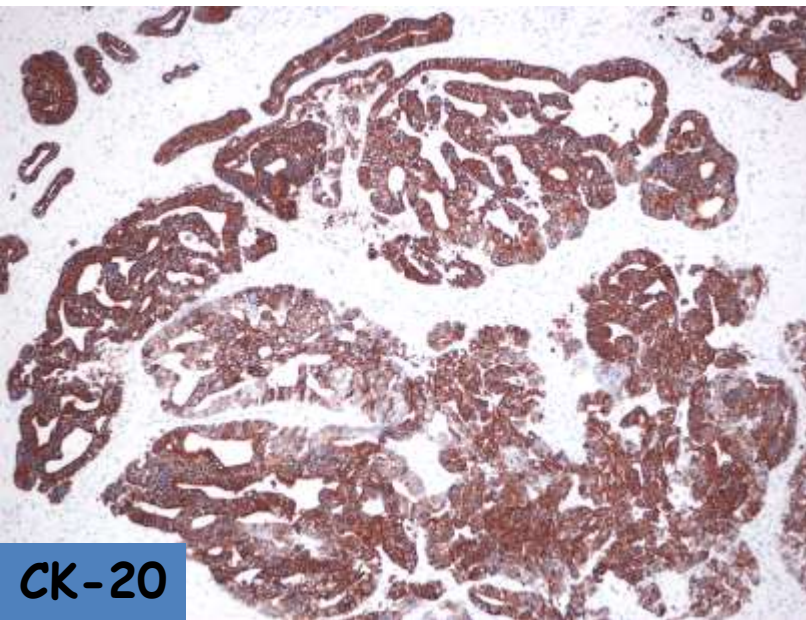
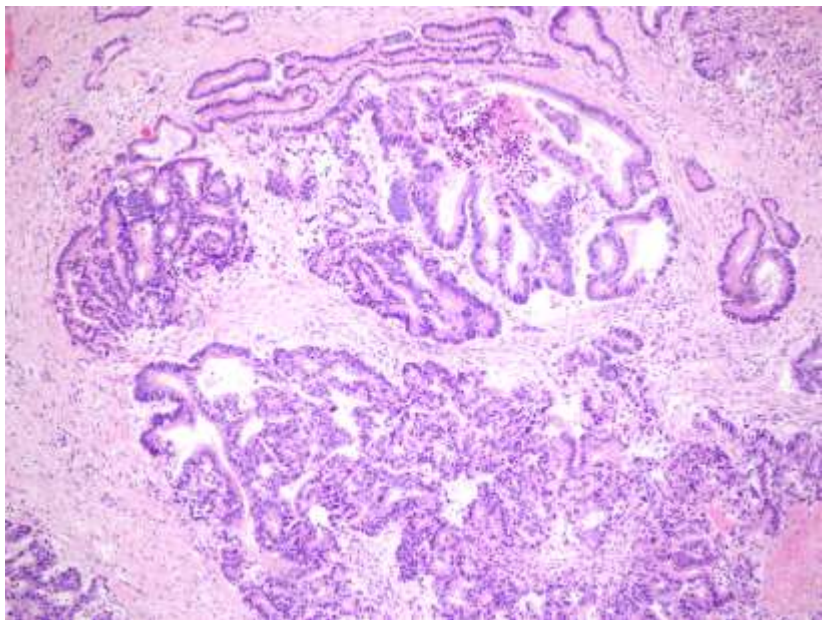




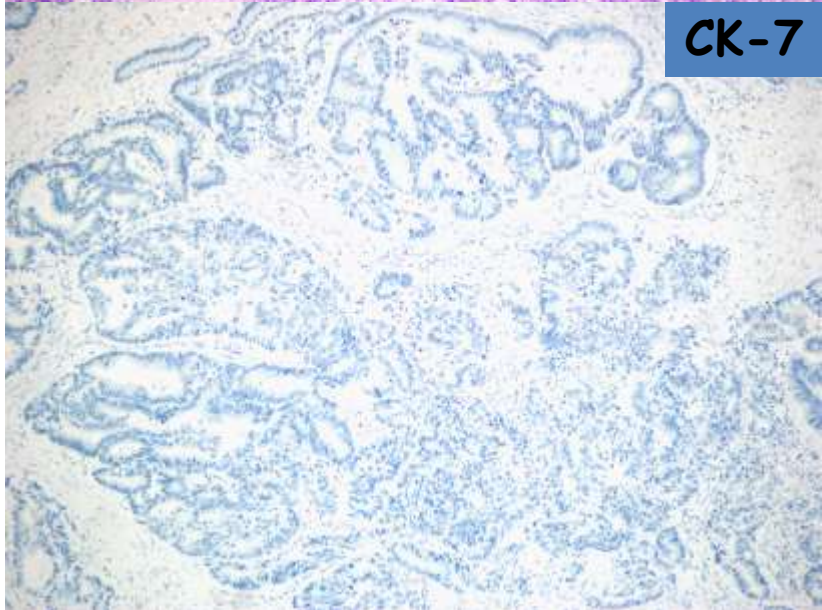






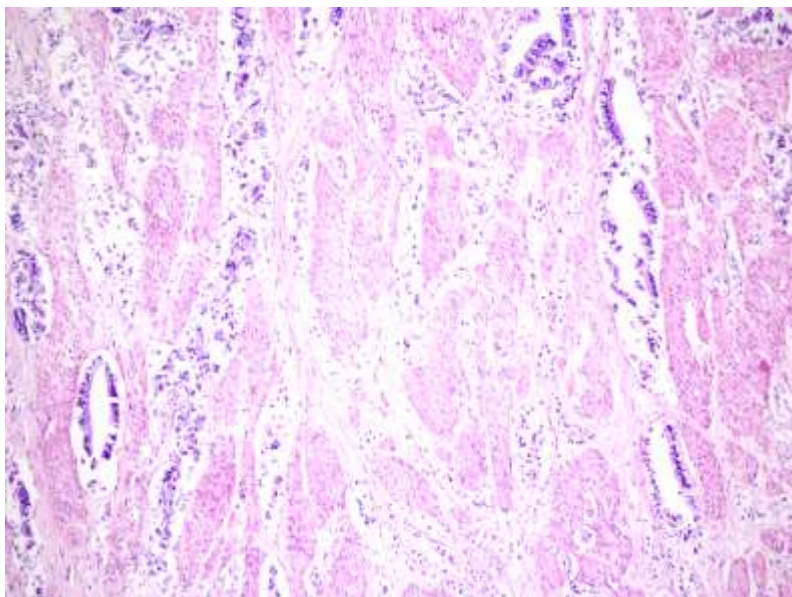


CK-20

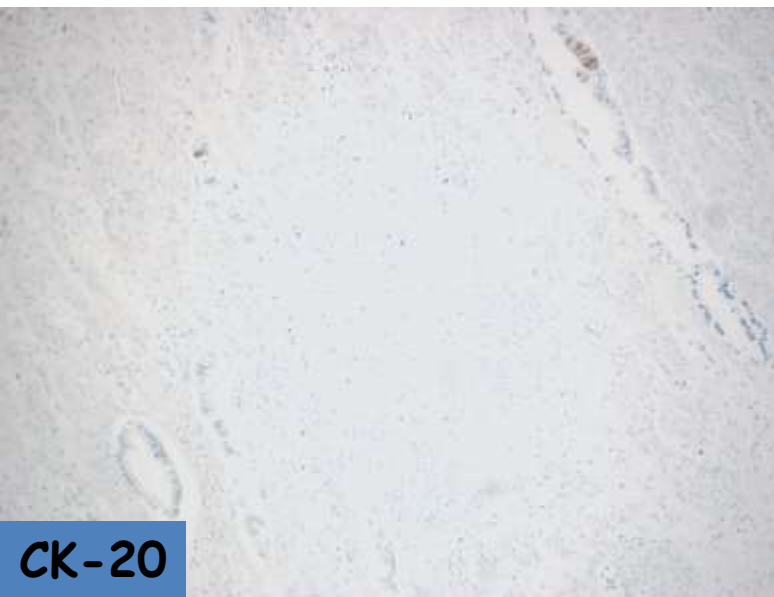


CK-7

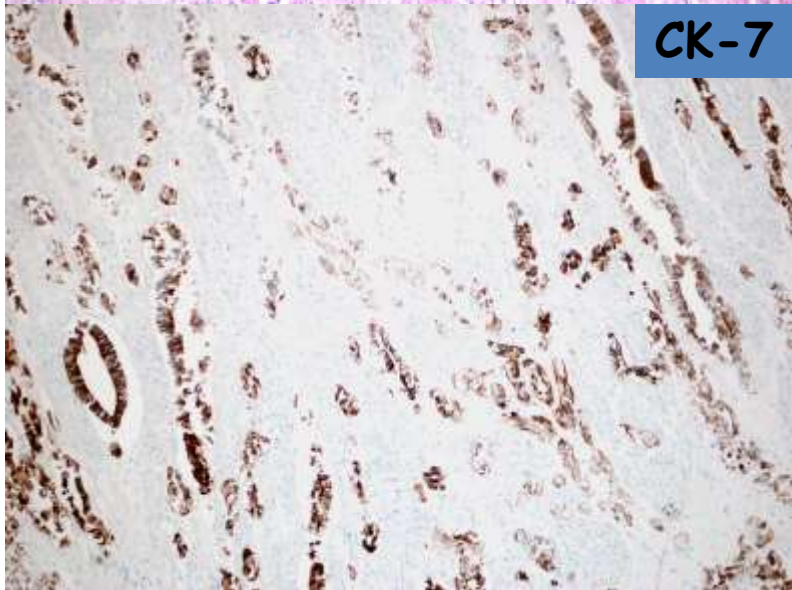
Sigma cc.



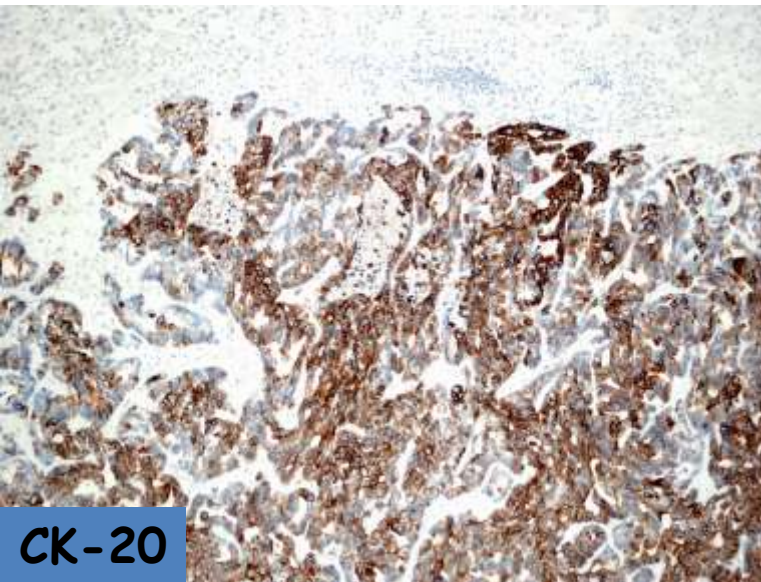
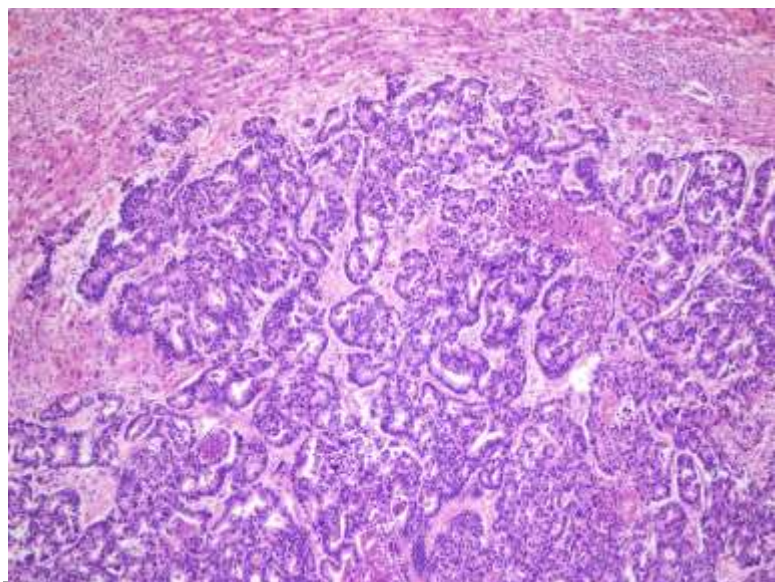
CK-20



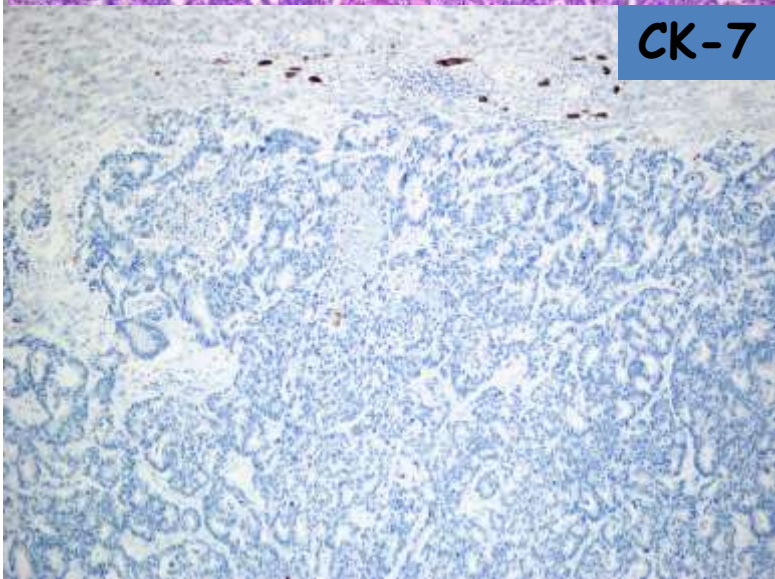
CK-7



gyomor cc.



CK-20



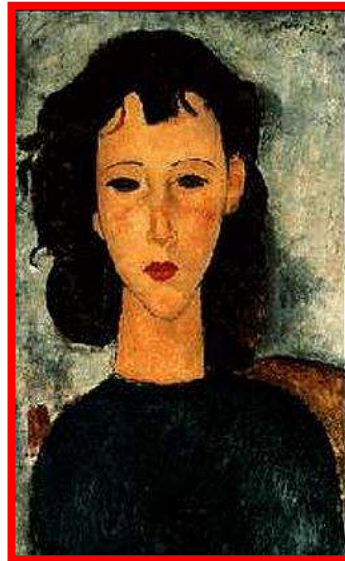
CK-7

MÁJ MET.

IHC vizsgálatból következik:
A májmetastasiszt a vastagbélrák adta.

MOLEKULÁRIS PATOLÓGIA

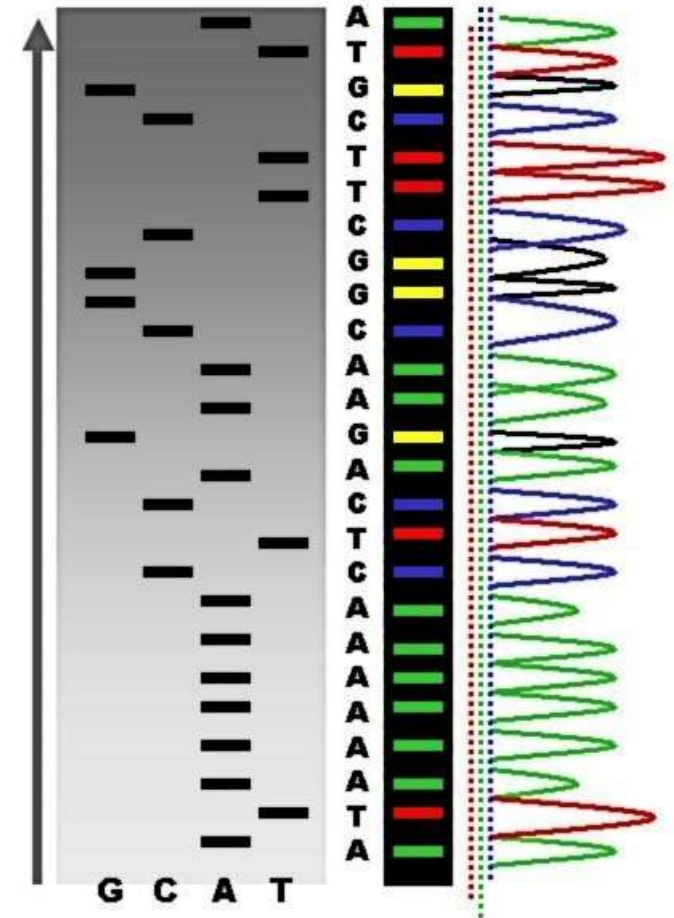
- **Tumor Diagnosztika**
- **Fertőző betegségek diagnosztikája**
- **Genetikai betegségek diagnosztikája**



Next Generation Sequencing. Precision medicine



Myseq: 1000-USD genome



Célzott Terápia – solid tumorok

Lung cc.

KRAS WT

erlotinib
(TARCEVA
-Roche)

EGFR tik
1 %
immunh.
EGFRpoz.

gefitinib
(IRESSA-
Astra)

EGFR tik
EGFR WT
poz.
prediktor

crizotinib
(XALKORI
-Pfizer)

ALK-EML4
FISH
Tik, ha
KRAS,
EGFR WT
(MET
inhib. as
well)

Colon cc.

Panitumumab
(VECTIBIX-
Amgen)

EGFR MAB
Kras és nRAS
(2., 3., 4. Exon
WT)

Bevacizumab
(AVASTIN-
Roche)
MAB, VEGF-A

MELANOMA:

vemurafenib (ZELBORAF-Pfizer)

bRAF tik (V-600E mutation neg. predict.)

Head&Neck, Squamous cell cc.

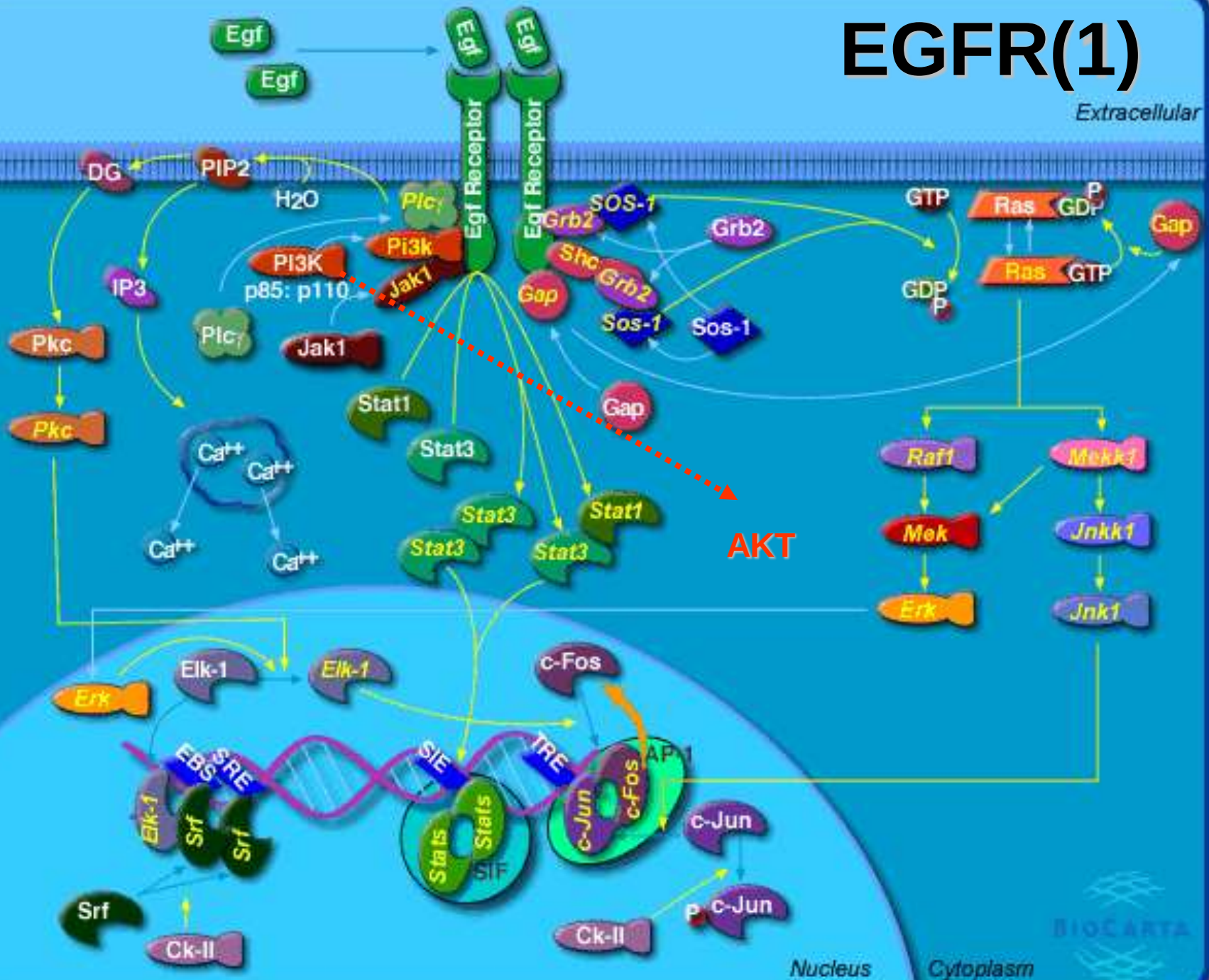
cetuximab (ERBITUX-Roche)

EGFR MAB

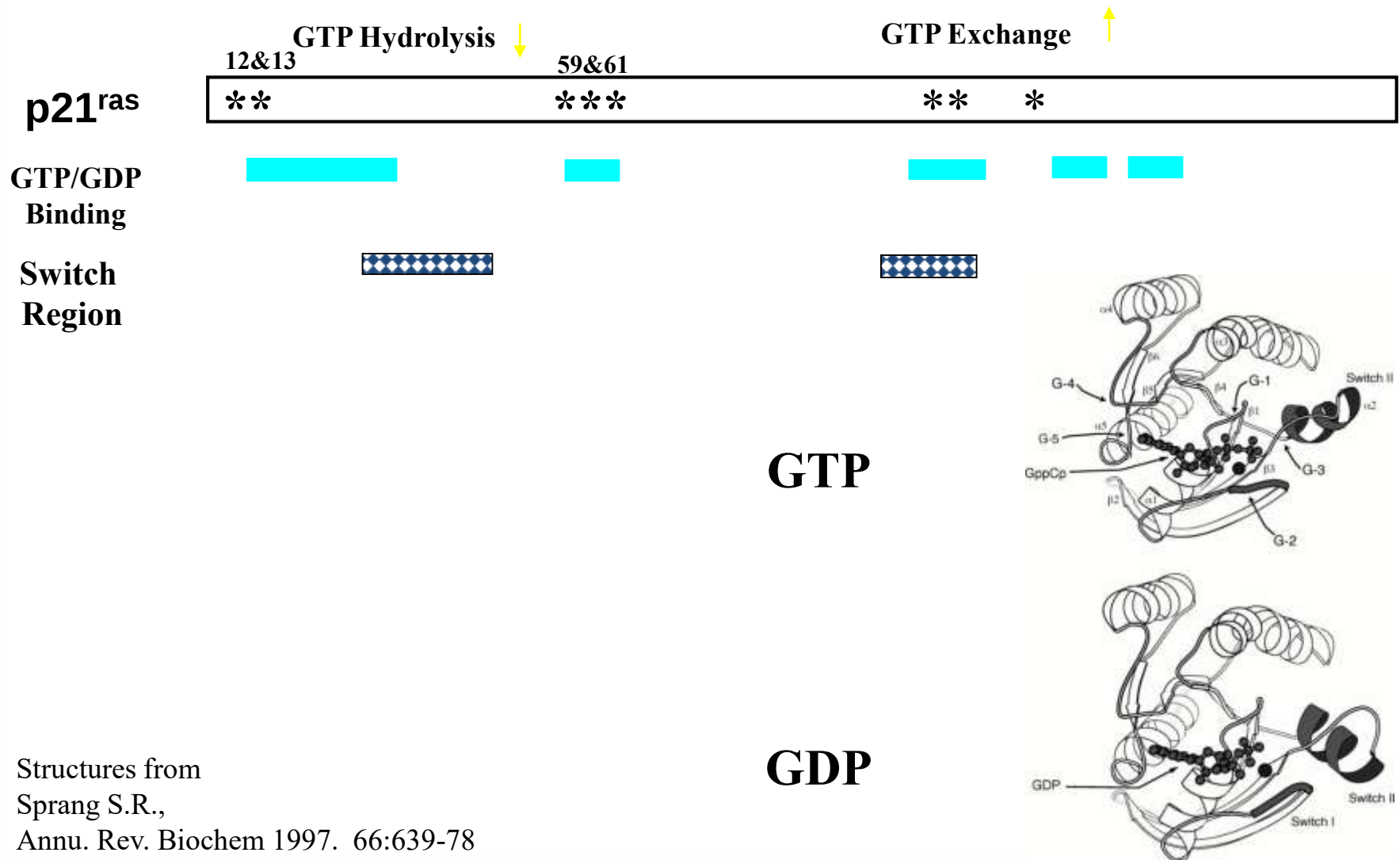


EGFR(1)

Extracellular



Activating Ras Mutations



K-ras mutation analysis exon 2 codon 12. PCR-RFLP

K-ras

Codon 10 11 12 13 14 15
.....GGA **G**CT GGT GGC GTA

PCR „mismatch” primer

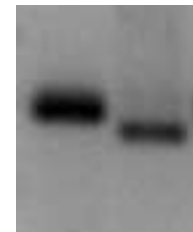
.....GGA **C**CT



Normal

*Bst*NI site
.....GGA CCT GG....

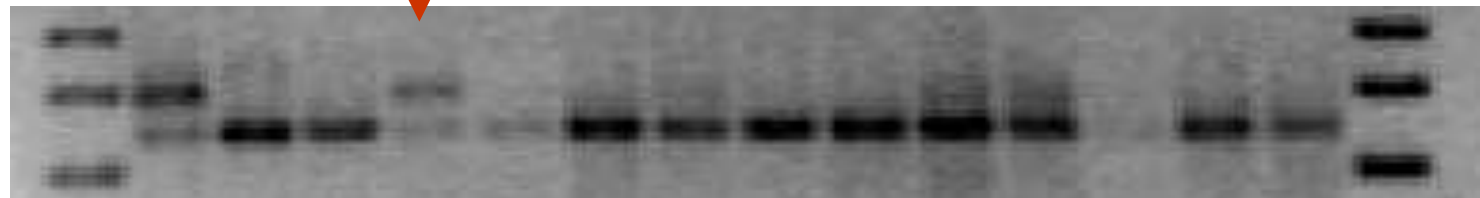
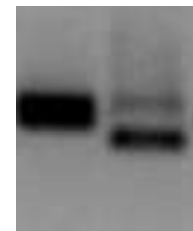
***Bst*NI splicing**



Mutant

No *Bst*NI site
.....GGA CCT NG....
or
.....GGA CCT GN....
(N ≠ G)

NO *Bst*NI splicing



M + -

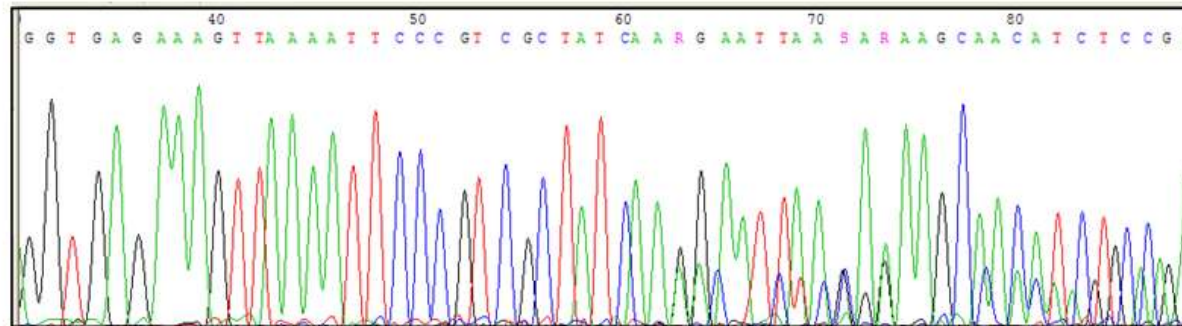
M

EGFR-HRM exon 18, 19, 20, 21 sequencing

EGFR mutáció kimutatása

A beteg 5% tumorsejtet tartalmazó citológiai mintájából, DNS-t izoláltunk és a PCR reakcióval történő szekvencia-specifikus felsokszorozást követően elvégeztük az EGFR 18, 19, 20 és 21-es exonjainak és azokat határoló intronszakaszoknak a bidirekcionális szekvenálását. A vizsgálati módszer érzékenysége 20%, specificitása 100%. A 19-es exont határoló intronszakaszban heterozigóta deléciót (del 4831886 - 4831892; refNT_033968.6) mutattunk ki.

Vélemény: A 19. és 20. exon közötti intronszakasz heterozigóta deléciós mutációját hordozó adenocarcinoma. A talált elváltozás nem tartozik a bizonyított, EGFR tirozinkináz domént kódoló szakaszt érintő mutációk körébe.



Budapest, 2010.05.05.

1. Lung cancer target therapy sensitivity

EGFR exon 19-21 mutation analysis

K-RAS exon 2, codon 12/13 mutation analysis

EML4-ALK fusion gene analysis

EGFR, MET copy number analysis (FISH)

2. Colon cancer target therapy sensitivity

K-RAS and B-RAF mutation analysis

EGFR exon-2-7 mutation analysis

EGFR copy number analysis (FISH)

MSI status determination: MLH1 and MSH2 inactivity (IHC)

EGFR, MET copy number (FISH)

3. Breast target therapy sensitivity

HER-2 copy number (FISH)

HER-2 ec-domain deletion test p95

4. Malignant melanoma target therapy sensitivity

B-RAF mutation analysis

N-RAS mutation analysis (codon 61)

C-KIT mutation analysis (exons)

EGFR, MET copy number (FISH)

5. Neuroblastoma - n-myc copy number

6. Genetic background of kidney developmental disorders - Wilms tumor dg.
WT1 mutation analysis

8. Infectious diseases: detection and analysis

HP antibiotics resistency analysis FISH

HPV detectionn – typing (PCR)

. CMV, EBV, TBC detection

9. Hematopathology diagnostics:

e.g. Philadelphia chr. 9-22 transloc. BCL-ABL fusion gene

Polycythemia vera: JAK2 point mutations

Primary myelofibrosis: JAK2 or MPL mutations

anaplastic large B cell lymphoma: ALK rearrangement

mantle cell lymphoma: Cyclin D1-IgH fusion gene

10. Soft tissue tumor diagnostics:

Ewing sarcoma: FL1-EWS fusion gene

Liposarcoma: CHOP/TLS fusion gene

Clear cell sarcoma: EWS-ATF1 fusion gene

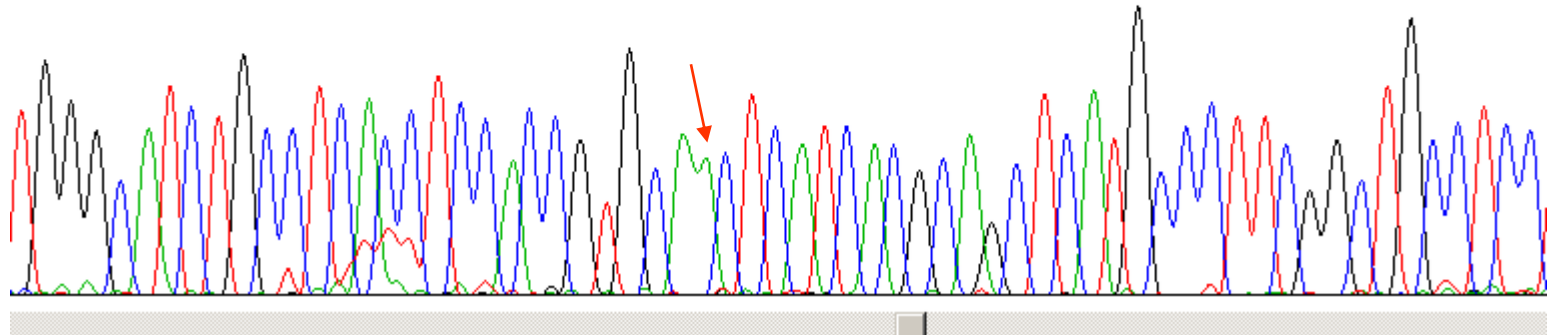


Genetika 2 dimenzióban

K21-1-E1F 5-10-05-8- Sequence Name: GDS345 K21-1-E1F Run ended: May 10, 2005

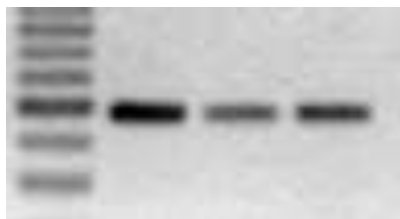
40 250 260 270 280 290 300

T G G G C A T C T G C C T C A C C T C C A C C G T G C A A C T C A T C A C G C A G C T C A T G C C C T T C G G C T G C C T C C



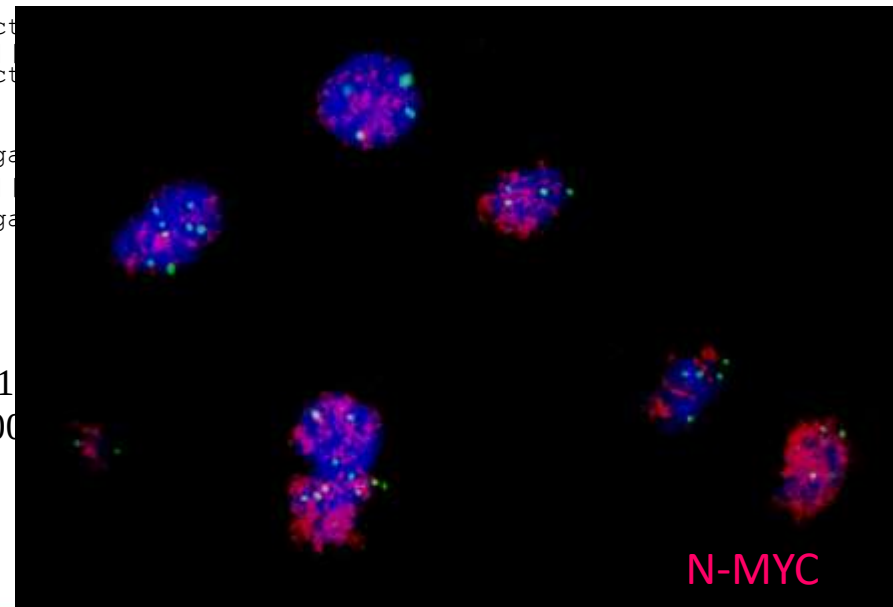
Query: 266 tgcactcatcacgcagctcatgcccttcggctgcctcctggact
 Sbjct: 2603 tgcactcatcacgcagctcatgcccttcggctgcctcctggact

Query: 326 aagacaatattggctcccagtagctcaactgggtgtgtgcaga
 Sbjct: 2663 aagacaatattggctcccagtagctcaactgggtgtgtgcaga



← 481bp

Exon 1
 NM_00

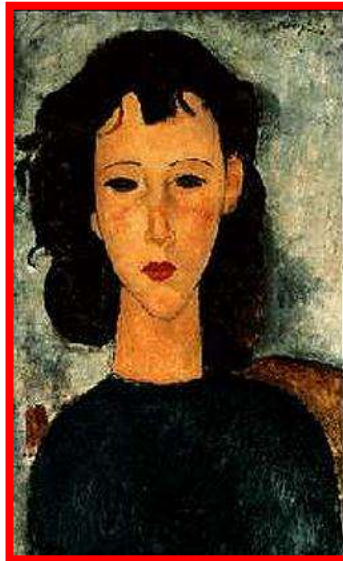


N-MYC



MOLEKULÁRIS PATOLÓGIA

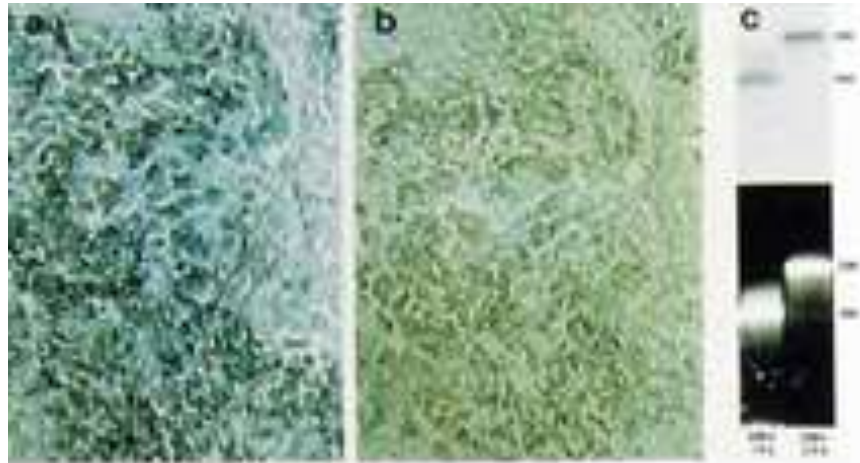
- Tumor Diagnosztika
- Fertőző betegségek diagnosztikája
- Genetikai betegségek diagnosztikája



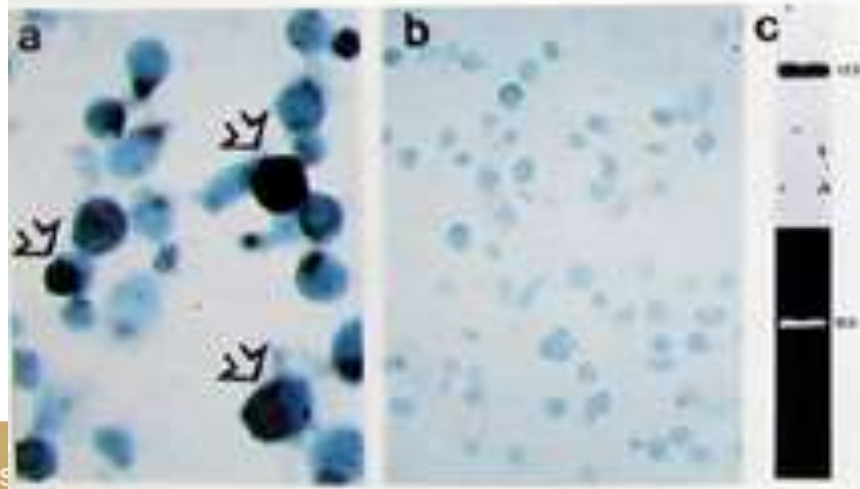
MOLECULAR PATHOLOGY

in situ PCR

**HBV in situ
PCR**



**HIV detection
RT-in situ PCR**



**Hybridization
PCR**



FDA approved clinical methods

Target	Módszer
Cytomegalovírus (CMV)	NASBA, Hybrid capture
Hepatitis C vírus (HCV) (kvalitatív)	TMA, PCR
Hepatitis C vírus (HCV) (kvantitatív)	bDNA
Human immunodeficiency vírus (kvantitatív)	bDNA, NASBA, RTPCR
HIV rezisztencia teszt	Szekvenálás
HBV/HCV/HIV szűrés véradoónál	TMA, PCR, RTPCR
Humán papilloma vírus (HPV)	Hybrid capture
<i>Chlamydia trachomatis</i> (CT)	Hybrid capture, TMA, HPA, PCR
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (NG)	Hybrid capture, TMA, HPA, PCR
<i>Gardnerella, Trichomonas vaginalis, Candida</i>	Hibridizáció
<i>Streptococcus A</i>	HPA
<i>Streptococcus B</i>	HPA, real-time PCR
<i>Legionella pneumophila</i>	SDA
Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	real-time PCR
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	TMA, PCR

HPA Hybridization Protection Assay **TMA** transcription-mediated amplification

NASBA nucleic acid sequence-based amplification

3 years old female

Heart TX : dilatative cardiomyopathy

Clinical diagnosis: Pneumonia

Lung fibrosis

CMV infection – sepsis

Arrhythmia

Respiratory insufficiency

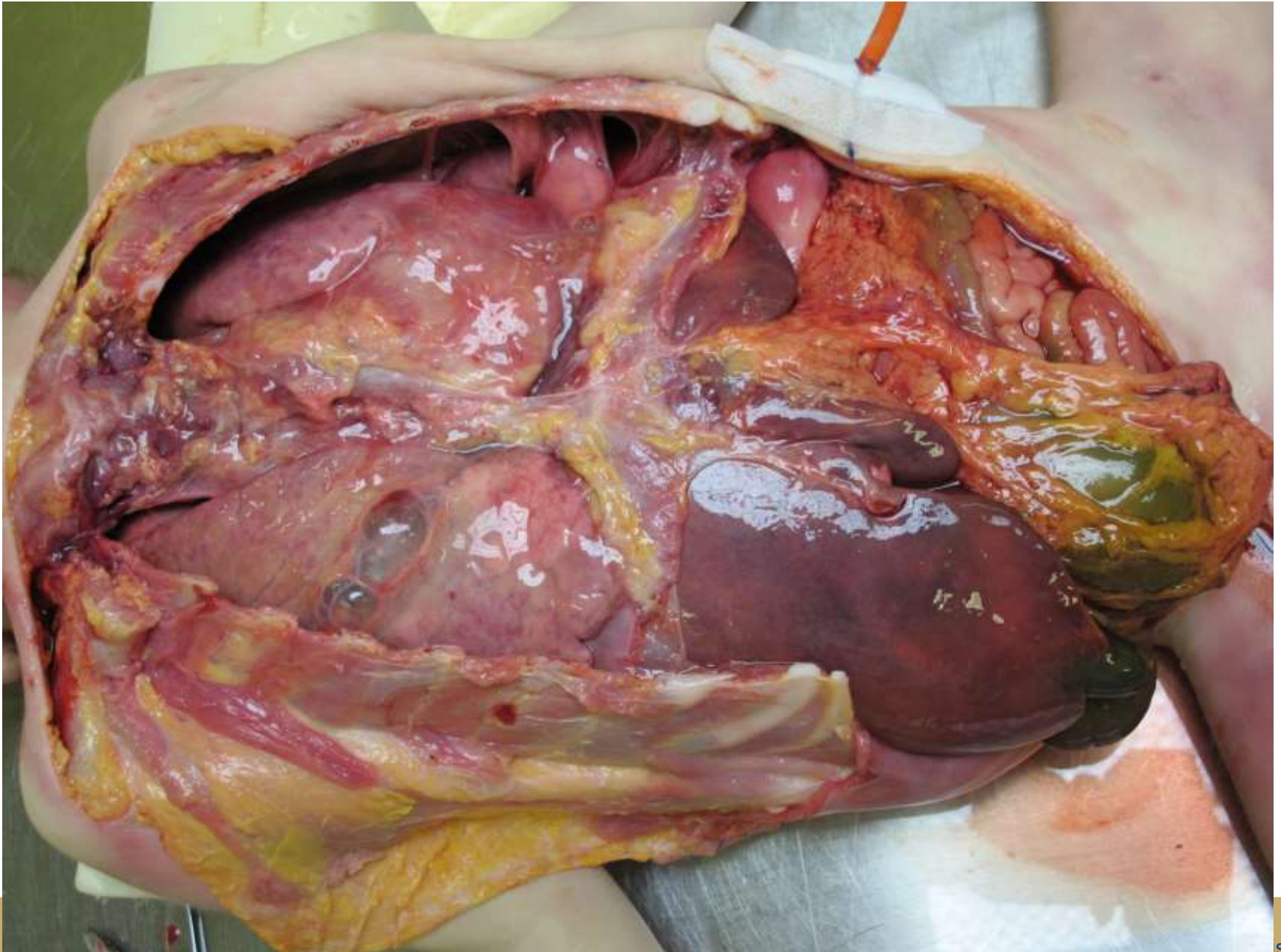
Pathology: Heart TX status post

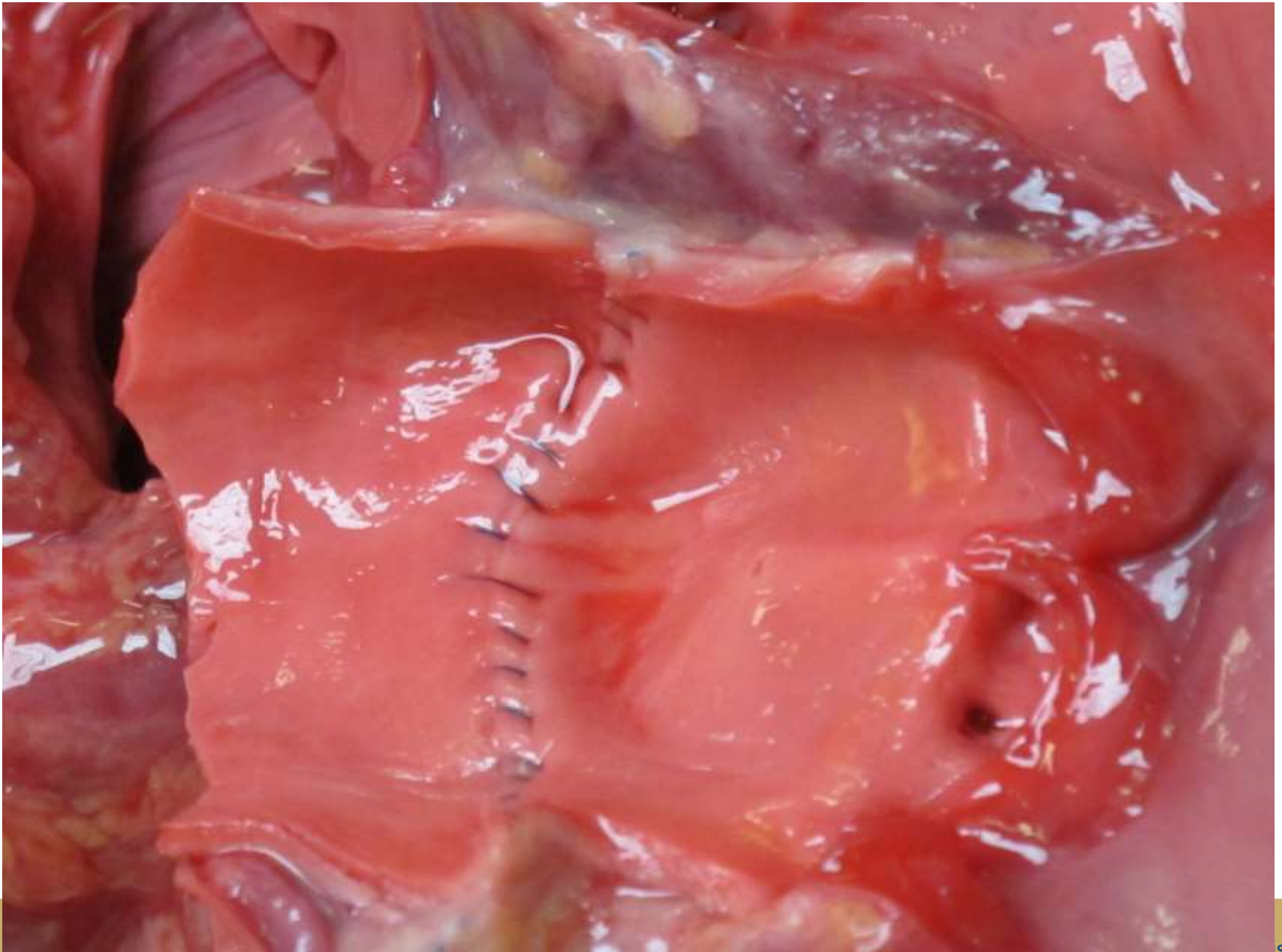
Lung fibrosis

Pneumonia

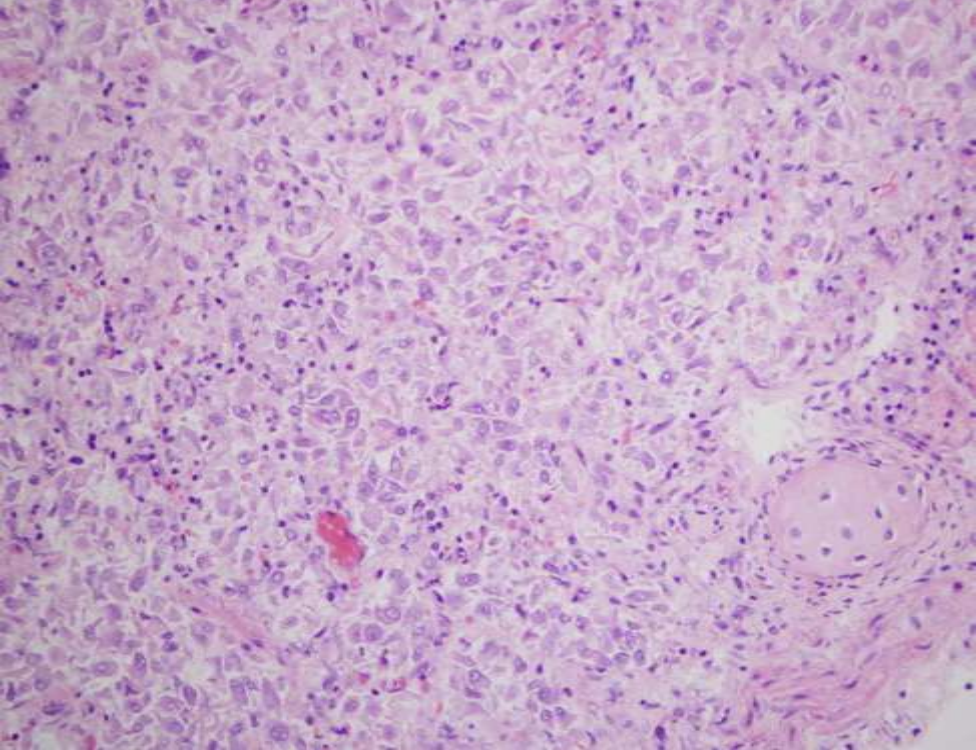
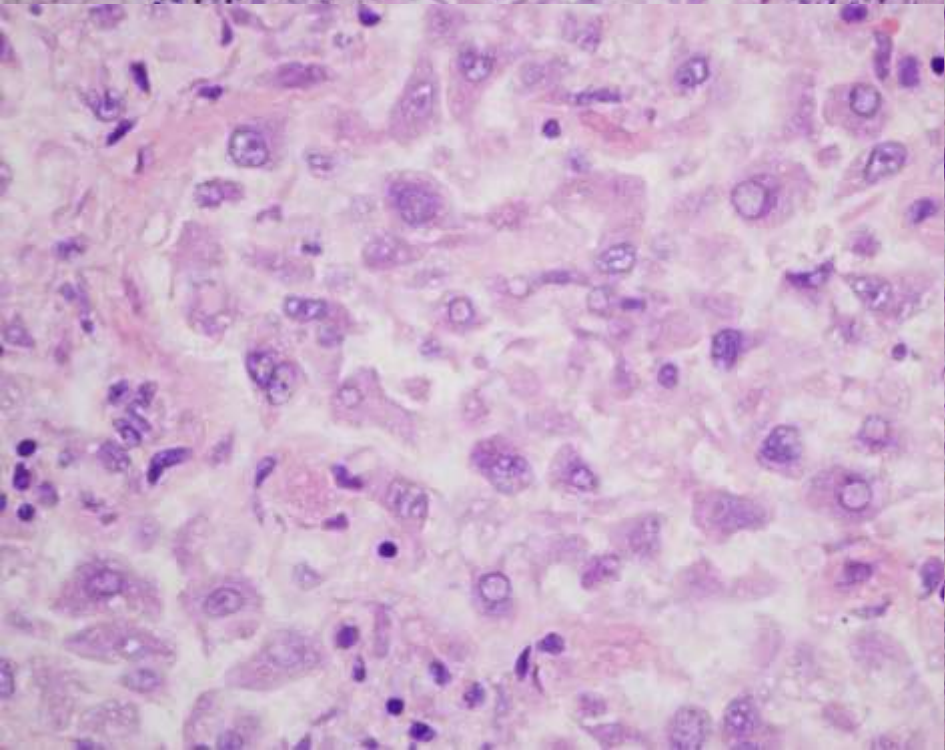
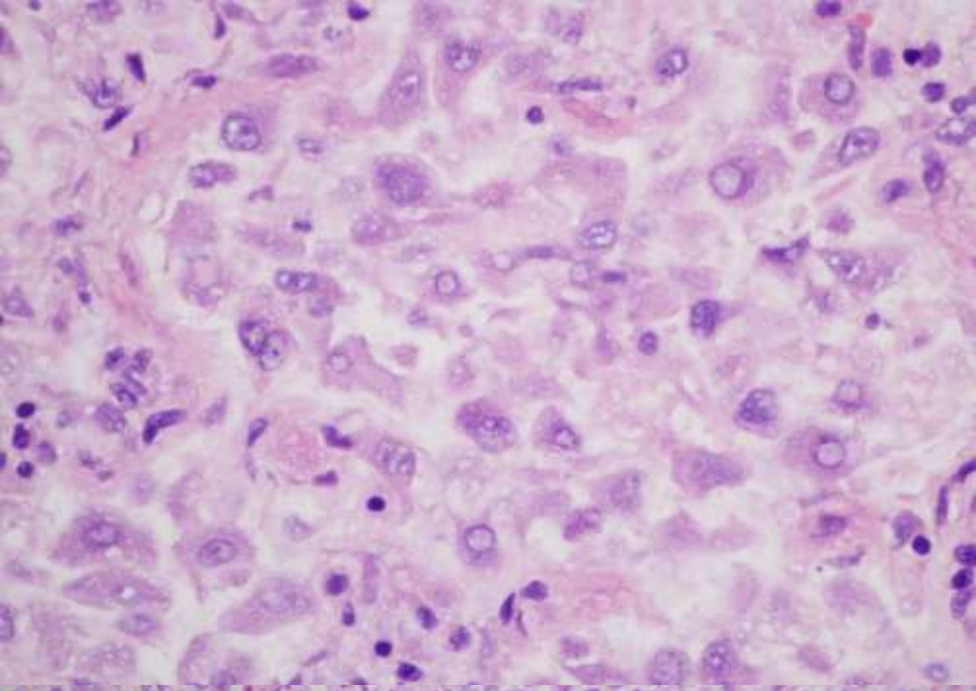
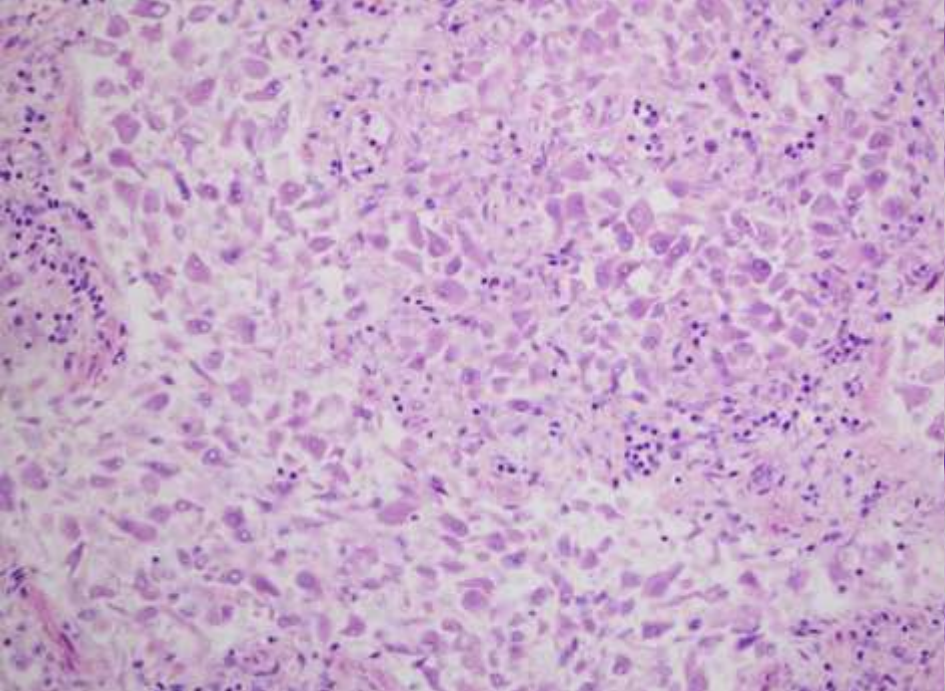
ARDS











49508/10 bjk. LUNG TX
„Semi-sterile” samples :

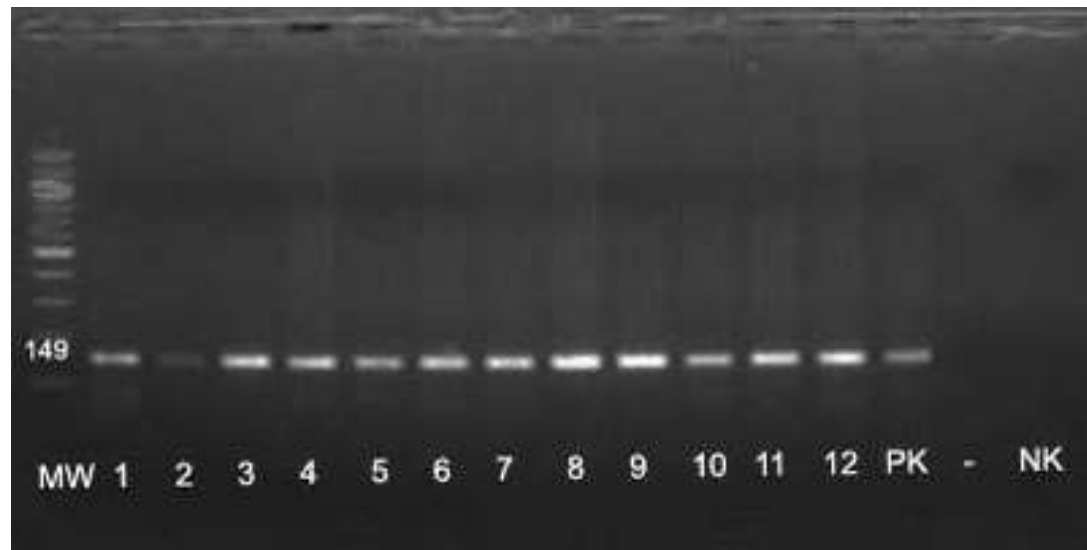
1. Heart
2. Lung
3. Brain
4. Spleen
5. Liver
6. Adrenal gland
7. Kidney

„ Non sterile” samples

8. Lung
9. Liver
10. Adrenal gland
11. Spleen
12. Kidney

PK- positive control (sequenced verified CMV DNA)

NK- negative control



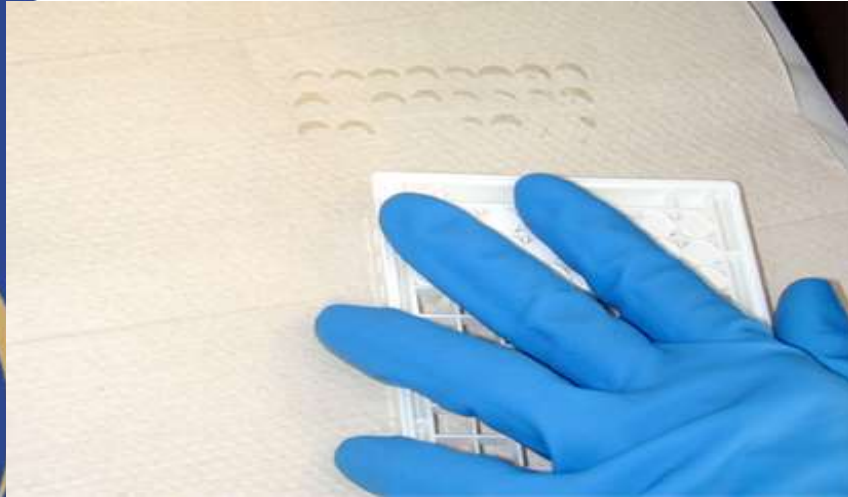
MOLECULAR PATHOLOGY

HPV genotyping

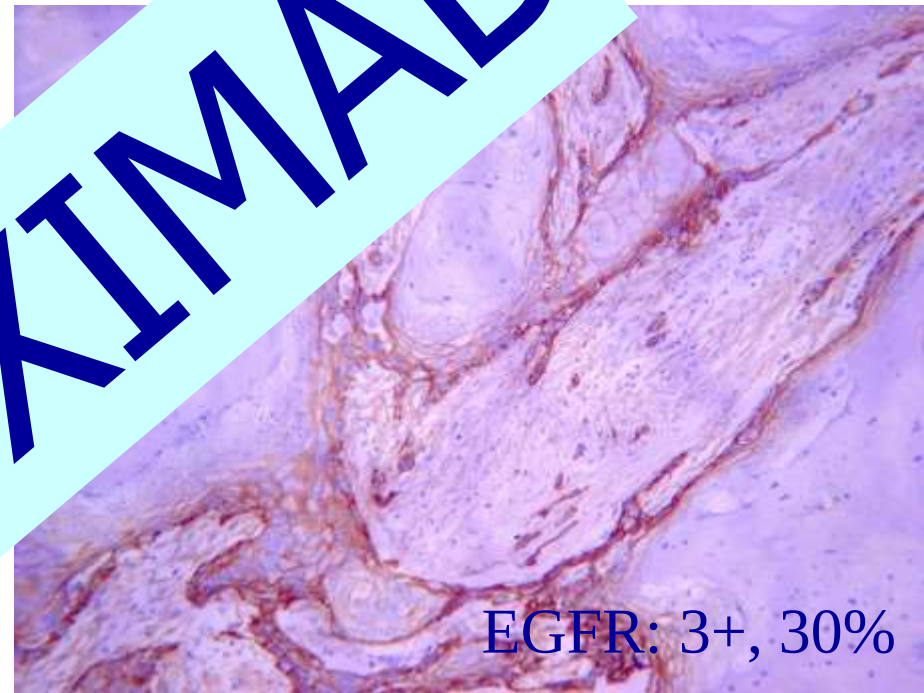
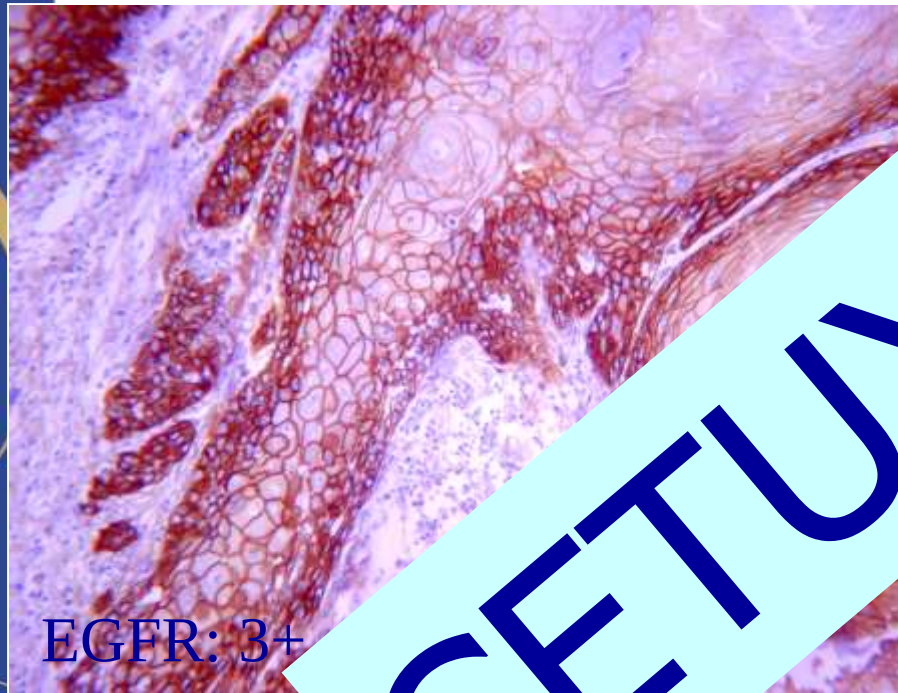


MOLECULAR PATHOLOGY

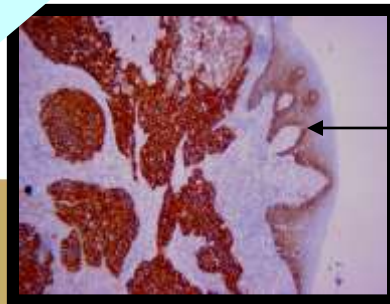
HPV genotyping



EGFR expression in head and neck squamous cell carcinoma (CONFIRM)



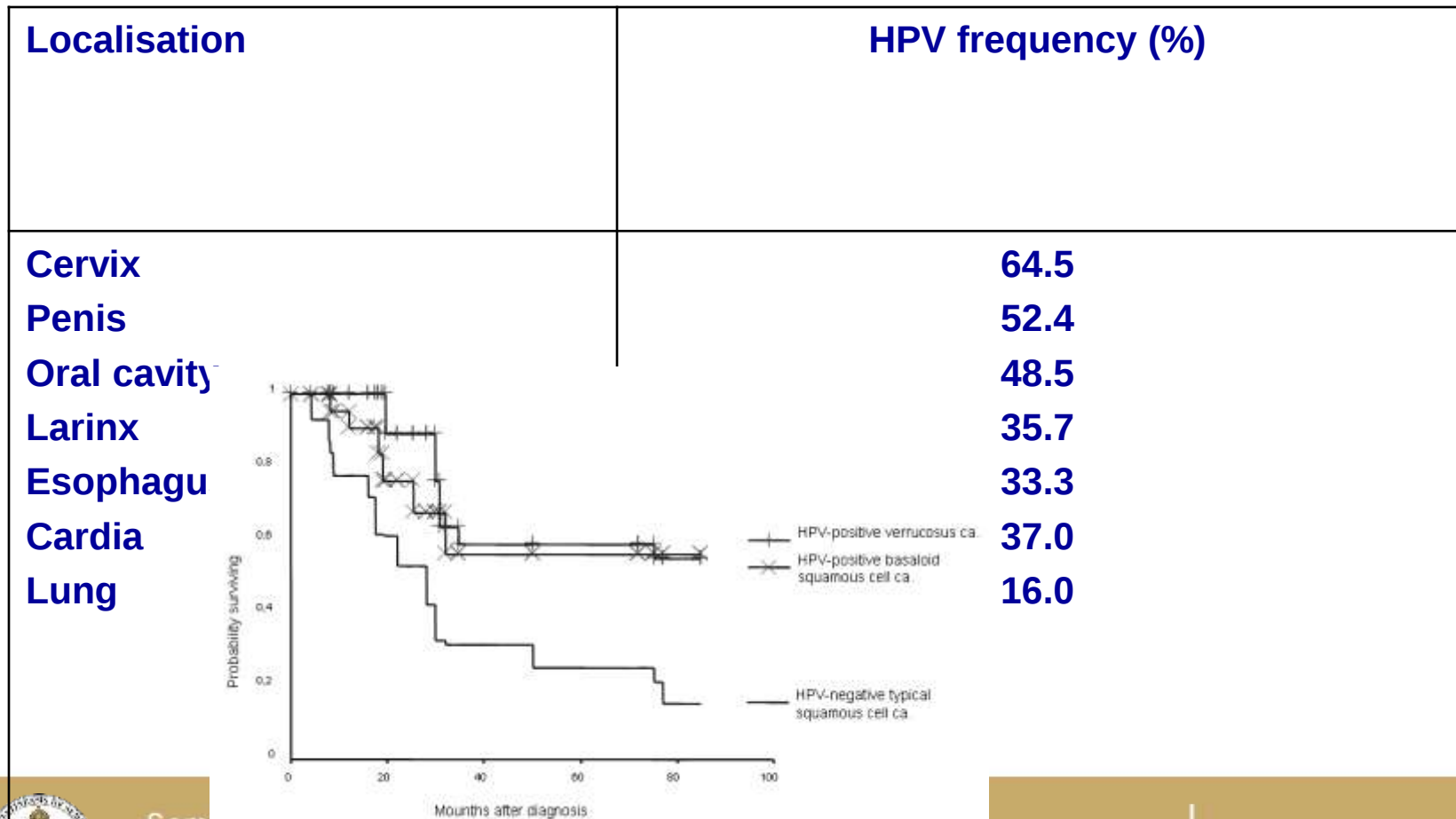
CETUXIMAB



Positive control

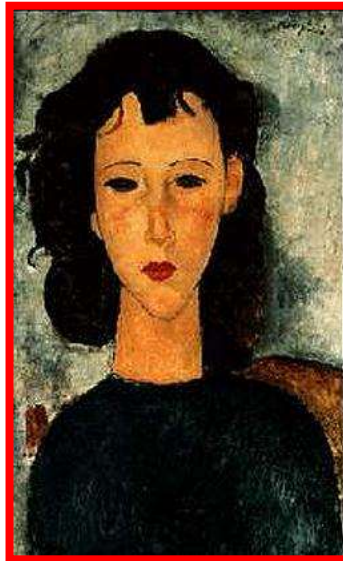


HPV and H&N SQCC



MOLEKULÁRIS PATOLÓGIA

- Tumor Diagnosztika
- Fertőző betegségek diagnosztikája
- Genetikai betegségek diagnosztikája





Hereditér Betegségek diagnosztikája Molekuláris Biológiai módszerekkel



„Monogenic” diseases and detection by molecular biology methods

Fehérje típusa	Eltérés típusa	Példa	Gén (lokalizáció)	Mutáció típusa	Kimutatás módszere
Struktúr	Hemoglobinopátia	Sarlósejtes anémia	β -hemoglobin (11p15.5)	missense	Seq, PCR-RFLP
	Kötőszövet rendell.	Marfan szindróma	Fibrillin (15q21.1)	missense	Seq, LA
	Sejtmembrán-assz. feh. diszfunkció	Izomdisztrófia	Dystrophin, DMD (Xp12.2)	deléció	RFLP, MPCR, LA, SB
Sejtfelszíni receptor	Hiperkoleszterinémia	Familiáris hiperkoleszterinémia	LDL-receptor (19p13.2)	deléció, pontmutáció	Seq, Probe amplifikáció
	Anyagcsere	D-vitamin rezisztens angolkór	D-vitamin receptor (12q12-q14)	pontmutáció	SB, RFLP, Seq
Regulátor	Fibróma	Neurofibromatosis 1 (von Recklinghausen)	Neurofibromin 1 (NF-1) (17q11.2)	missense, frameshift, SS	Seq, LA
	Fibróma	Neurofibromatosis 2 (von Recklinghausen)	Merlin TS (NF-2) 22q12	nonsense, frameshift, SS	LA
	Daganathajlam	Li-Fraumeni	p53 (TP53) 17p13	missense	Seq, SSCP, DGGE
Enzim	Anyagcsere rendellenesség	Alkaptonuria	Homogentizinsav oxidáz (3q21-q23)	missense, frameshift, SS	Seq, SSCP
		Fenilketonúria	PAH (PKU1)	missense, deléció, SS	Seq, ligase chain reaction
	Immunodeficiencia	Severe combined immunodeficiency	Adenosin deamináz (20q13.11)	pontmutáció	Seq

SB = Southern blot, MPCR= multiplex PCR

LA = linkage analysis, Seq = szekvenálás



Mitochondrial gene mutations and related clinical syndroms

Mitokondriális gének mutációja következtében létrejövő elváltozások

Rendellenesség	Érintett gén	Kimutatás
Kearnes-Sayre szindróma	Del (2-7 kb)	PCR, PCR-RFLP, SB
Pearson szindróma	Del (?)	PCR-RFLP, SB
Pigmentált retinopátia	tRNS (tyr) deléció	PCR-RFLP, SB
Mitokondriális encefalo-miopátia, laktát acidózissal és sztrókszerű epizódokkal (MELAS)	tRNS (leu) pontmutáció	PCR-RFLP, Seq
Leber-féle opticus neuropátia (LHON)	Cyt6 és URF pontmutáció	PCR-RFLP
Neuropátia, ataxia, retinitis pigmentosa (NARP)	ATPáz VI pontmutáció	PCR-RFLP
MERFF szindróma	tRNS (lys) pontmutáció	PCR-RFLP
Leigh szindróma NARP-pal	ATPáz VI, NADH: ubiquinone oxido-reduktáz alegység mutáció	PCR-RFLP
Mitokondriális DNS depléció szindróma	Timidin kináz gén mutációja	PCR, Seq







?



Köszönöm a figyelmet !

