

Изобретение относится к медицине, а именно к патоморфологии и пульмонологии, и предназначено для диагностики злокачественных опухолей легкого.

Наиболее близким по своей сущности и технологии выполнения к заявляемому изобретению является способ цитоморфологической диагностики опухолей легких [1], заключающийся в том, что фрагменты тканей легких, взятые при биопсии, фиксируют в 4 % растворе глутаральдегида при pH=7,2-7,4 в течение 1 час, затем промывают в фосфатном буфере - 5 час, после чего дополнительно фиксируют в 2 % растворе четырехокси осмия в течение 2 час, обезвоживают в 30 % и 50 % растворах этилового спирта по 15 мин в каждом, обезвоживают в 70 % растворе этилового спирта в течение 2 час, после чего контрастируют (окрашивают) препараты в 2% спиртовом растворе уранилацетата - 1 час, обезвоживают в 80% спирте в течение 30 мин и в двух сменах 96% спирта в каждой по одному часу, обезвоживают в двух порциях абсолютного спирта - 30 мин, обезвоживают в ацетоне - 1 час, пропитывают в эпоксидной смоле (эпон -812) и изготавливают блоки тканей - 4 час, полимеризуют блоки из эпоксидной смолы - 48 час, после этого из них изготавливают ультратонкие срезы, просматривают в электронном микроскопе и устанавливают диагноз опухоли по ультраструктурным признакам, характеризующимся полиморфизмом, каждый из которых не является строго специфичным для злокачественной опухоли, а только многочисленная совокупность их позволяет заподозрить опухоль. Недостатки способа:

1. Недостаточная точность диагностики злокачественных опухолей связана с неспецифичностью учитываемых цитоморфологических признаков опухолей, так как они могут встречаться при других патологических состояниях (воспалительные процессы, дистрофия, нарушения кровоснабжения тканей).

2. Сложность оценки результатов в связи с многочисленностью признаков, подлежащих учету.

3. Длительность проведения исследования от фиксации фрагментов тканей легких до изготовления эпоксидных блоков составляет 19,5 час.

В основу изобретения поставлена задача создания способа диагностики злокачественных опухолей легкого, в котором промывку фрагментов тканей легкого проводят в веронал-ацетатном буфере, затем фрагменты тканей погружают в стандартную сыворотку крови, после чего обрабатывают раствором проявителя металлопротеиновых комплексов, в результате чего достигается повышение точности диагностики и сокращение времени осуществления способа.

Поставленная задача решается тем, что в способе диагностики злокачественных опухолей легкого, включающем фиксацию фрагментов тканей легкого глутаральдегидом, дополнительную фиксацию в растворе четырехокси осмия, обезвоживание в этиловом спирте, пропитку тканей в эпоксидной смоле, изготовление ультратонких срезов, анализ их в электронном микроскопе, согласно изобретению, промывку тканей легкого проводят в веронал-ацетатном буфере при pH 8,0 в течение 6 мин, затем 45 фрагменты тканей легкого погружают в стандартную сыворотку крови на 2 час, после чего обрабатывают 1 % раствором проявителя металлопротеиновых комплексов (1 % р-р азотнокислого свинца) в течение 15 мин и при появлении в ядрах клеток тканей легкого электроноплотного материала диагностируют злокачественную опухоль.

Способ осуществляют следующим образом.

Фрагменты тканей легкого, взятые при биопсии, фиксируют в 4% растворе глутаральдегида при pH=7,2-7,4 в течение 1 час, затем промывают в веронал-ацетатном буфере при pH=8,0 в течение 6 мин, затем фрагменты тканей погружают в стандартную сыворотку крови на 2 час, после чего обрабатывают 1% раствором проявителя металлопротеиновых комплексов (1% р-р азотнокислого свинца) в течение 15 мин, после чего дополнительно фиксируют в 2% растворе четырехокси осмия в течение 2 час, обезвоживают в 30% и 50% растворах этилового спирта по 15 мин в каждом, обезвоживают в 70% растворе этилового спирта в течение 2 час, после чего контрастируют (окрашивают) препараты в 2% спиртовом растворе уранилацетата -1 час, обезвоживают в 80% растворе спирта в течение 30 мин и в двух сменах 96% спирта в каждой по 1 час, обезвоживают в двух порциях абсолютного спирта - 30 мин и обезвоживают в ацетоне -1 час, пропитывают в эпоксидной смоле (эпон-812) и изготавливают блоки тканей - 4 час, полимеризуют блоки из эпоксидной смолы - 48 час, после этого из них изготавливают ультратонкие срезы, просматривают в электронном микроскопе и при появлении в ядрах клеток тканей легкого электроноплотного материала диагностируют злокачественную опухоль.

В результате проведенных исследований установлено, что при уменьшении pH веронал-ацетатного буфера ниже 8,0, а времени обработки фрагментов тканей легкого этим реактивом менее 6 мин значительно снижается интенсивность отложений электроноплотного материала в ядрах клеток опухолей; при увеличении pH веронал-ацетатного буфера более 8,0 нарушается структура клеток, а при увеличении времени воздействия этим реактивом более 6 мин появляется неспецифическое отложение материала, кроме того при уменьшении времени обработки сывороткой крови менее 2 час значительно снижается интенсивность отложения электроноплотного материала в ядрах опухолевых клеток, воздействие данной сывороткой более 2 час приводит к нарушению структуры клеток; уменьшение концентрации раствора вышеназванного проявителя ниже 1 % и времени воздействия менее 15 мин значительно снижает интенсивность окраски электроноплотного материала в ядрах опухолевых клеток, повышение этого показателя более 1% сопровождается перекашиванием данного материала, что не позволяет достоверно установить диагноз.

Пример 1. При пункционной биопсии взяты фрагменты тканей легкого пациента В. В. (ист. б-ни № 1412), в пунктате определяются единичные деформированные клетки, оценить структуру которых известными методами не представляется возможным и тем самым затруднена постановка диагноза.

Для исключения опухолевого процесса фрагменты тканей легких после известных этапов окраски согласно прототипу, были обработаны по заявляемому способу путем промывки исследуемого материала в веронал-ацетатном буфере pH=8,0 в течение 6 мин, затем фрагменты тканей легкого были погружены в стандартную сыворотку крови на 2 час, после этого они обработаны 1 % раствором проявителя металлопротеиновых комплексов в течение 15 мин, в изготовленных ультратонких срезах обнаружен интенсивный захват* ядрами клеток электроноплотного материала и таким образом установлен диагноз

злокачественной опухоли легкого, который был подтвержден, после оперативного вмешательства и гистологического исследования фрагментов тканей легкого - установлен диагноз плоскоклеточного рака легкого.

Пример 2. При рентгенологическом обследовании пациента О. К. (ист. б-ни № 928) заподозрена опухоль легкого, сделана пункционная биопсия, однако материал был весьма скуден и установить диагноз известными способами было сложно. В связи с этим фрагменты тканей легкого обработаны по заявляемому способу и при анализе ультратонких срезов захвата ядрами клеток электроноплотного материала не обнаружено. Диагноз опухолевого процесса был снят, дальнейшее клиническое наблюдение и лабораторные анализы позволили установить диагноз туберкулемы легкого.

Пример 3. Пациент З. М. (ист. б-ни № 1910) длительно находился на лечении в клинике по поводу хронического воспалительного заболевания легкого, однако применяемая терапия успехов в лечении не имела. Произведена диагностическая пункционная биопсия, но из-за скудности биопсийного материала обычными известными способами установить диагноз не удалось. Биопсийный материал фрагментов тканей легкого был обработан по заявляемому способу. В ультратонких срезах обнаружен интенсивный захват электроноплотного материала ядрами клеток. В результате установлен диагноз злокачественной опухоли легкого. После операции при гистологическом исследовании фрагментов тканей легкого поставлен диагноз аденокарцинома.

Эффективность заявляемого способа исследована путем определения диагностической специфичности (ДС) и диагностической чувствительности (ДЧ), а также прогностичности положительного результата (ППР) (см. табл.). Изучены результаты заявляемого способа при применении его в здоровых тканях легкого 120 пациентов, оперированных по поводу врожденных пороков легких и воспалительных заболеваний, ткани взяты за пределами патологического процесса, кроме того заявляемый способ применялся на тканях злокачественных опухолей легкого с установленным гистологическим диагнозом у 118 пациентов.

По полученным данным ДС при исследовании здоровых тканей легкого по способу-прототипу составила:

$ДС = \frac{ИО}{ИО + ЛП} \cdot 100\% = 80,2 \pm 0,1\%$ при исследовании тех же тканей заявляемым способом ДС = $90,3 \pm 0,2\%$; различия между результатами исследования ДС двумя способами достоверны, так как $p < 0,05$. По результатам этих измерений ДЧ по способу-прототипу в тканях злокачественной опухоли составила:

$ДЧ = \frac{ИП}{ИП + ЛО} \cdot 100\% = 55,1 \pm 0,3\%$; ДЧ определенная в этих же тканях по заявляемому способу составила $89,1 \pm 0,2\%$. Различия между результатами исследований двумя способами достоверны, так как $p < 0,05$. По результатам применения способа-прототипа прогностичность положительного результата (ППР) составила:

$ППР = \frac{ИП}{ИП + ЛП} \cdot 100\% = 50,5 \pm 0,2\%$.

Этот же показатель оцененный заявляемым способом составил $90,1 \pm 0,1\%$, $p < 0,01$.

Таким образом, по сравнению с прототипом заявляемый способ позволяет повысить точность диагностики: диагностическая специфичность повышается с 82,2% до 90,3%, диагностическая чувствительность - с 55,1% до 89,1%, а прогностичность с 50,5% до 90,1% и кроме того сократить время исследования на 3 часа.

Заявляемый способ может найти широкое применение в диагностических центрах, научно-исследовательских учреждениях онкопульмонологического профиля, лабораториях патоморфологии.

Оценка эффективности диагностики заявляемого способа в сравнении

Исследованные ткани легких	Способ. исслед.	Число наблюдений		Число ИО		Число ЛП	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
здоровые	прототип	120	100	98	81,7	32	18,3
здоровые	заявляемый	120	100	111	92,5	9	7,5
опухоль	прототип	118	100	-	-	-	-
опухоль	заявляемый	118	100	-	-	-	-

Примечание: ИО – истинно отрицательный результат.

ЛП – ложно отрицательный результат.

ИП – истинно положительный результат.

ЛО – ложно отрицательный результат.