

6. Картелишвев А. В. Принципы диетотерапии и диетопрофилактики у детей, больных ожирением, и в группе риска по ожирению // Педиатрия. – 2008. – Т. 87. № 5. – С. 78–83.

7. Козлова Л. В., Бекезин В. В., Козлов С. Б., Козлова И. С., Пересекающая О. В., Коваленко О. М. Метаболический синдром у детей и подростков с ожирением: диагностика. Критерии рабочей классификации, особенности лечения // Педиатрия. – 2009. – Т. 88. № 6. – С. 142–150.

8. Лисс В. Л., Нагорная И. И., Николаева Л. В., Плотникова Е. В., Скородок Ю. Л., Пальчик А. Б., Шабалов Н. П. (ред.). Диагностика и лечение эндокринных заболеваний у детей и подростков. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 528 с.

9. Миняйлова Н. Н. Социально-генетические аспекты ожирения // Педиатрия. – 2001. – № 2. – С. 83–87.

10. Миняйлова Н. Н., Сундукова Е. Л., Ровда Ю. И. Гиперлипидемия и ее клиничко-метаболические ассоциации при синдроме инсулинорезистентности у детей и подростков // Педиатрия. – 2009. – Т. 88. № 6. – С. 6–13.

11. Рахимова Г. Н., Азимова Ш. Ш. Оценка частоты метаболического синдрома среди детей и подростков с ожирением

согласно новым критериям Международной диабетической ассоциации // Педиатрия. – 2009. – Т. 88. № 6. – С. 14–20.

12. Ройтберг Г. Е. (ред.). Метаболический синдром. – М.: МЕДпресс-информ, 2007. – 224 с.

13. Седлецкий Ю. В. Современные методы лечения ожирения. – СПб: ЭЛБИ-СПб, 2007. – 416 с.

14. Синицын П. А., Щербакова М. Ю., Ларионова В. И., Петряйкина Е. Е. Метаболический синдром у детей // Педиатрия. – 2008. – Т. 87. № 5. – С. 124–127.

15. Сорвачева Т. Н., Петеркова В. А., Тирова Л. Н., Пыррева Е. А., Витебская А. В. Ожирение у подростков // Лечащий врач. – 2006. – № 4. – С. 50–54.

16. Строев Ю. И., Чурилов Л. П., Чернова Л. А., Бельгов А. Ю. Ожирение у подростков. – СПб: ООО «ЭЛБИ-СПб», 2003. – 216 с.

17. WHO Model Formulary for Children. – 2010. – P. 380–381.

18. Zimmet P., Alberti G., Kaufman F. et al. The metabolic syndrome in children and adolescents // Diabetes Voice. – 2007. – Vol. 52. № 4. – P. 29–32.

Поступила 25.07.2010

А. В. МЕДВЕДЕВ¹, Л. А. МЕДВЕДЕВА²

СПОСОБ БЫСТРОГО ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ОКРАШИВАНИЯ КРИОСТАТНЫХ СРЕЗОВ ТКАНЕЙ В УСЛОВИЯХ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКИ

¹Кафедра хирургии № 1 ФПК и ППС Кубанского государственного медицинского университета,
Россия, 350086, г. Краснодар, ул. Седина, 4;

²лаборатория патоморфологии № 2 Краевой клинической больницы № 1,
Россия, 350086, г. Краснодар, ул. 1 Мая, 167

В результате проведенных исследований усовершенствован протокол быстрого способа иммуногистохимического окрашивания криостатных срезов тканей (P. Ruck, 2001) и повышена эффективность интраоперационной диагностики за счет максимального укорочения процедуры иммуногистохимического окрашивания криостатных срезов. Приведено подробное пошаговое описание способа, который позволяет сократить время выполнения иммуногистохимической реакции на криостатных срезах до 7–8 мин, что в условиях интраоперационной диагностики имеет существенное значение.

Ключевые слова: иммуногистохимия, интраоперационная диагностика, криостатные срезы.

А. В. МЕДВЕДЕВ¹, Л. А. МЕДВЕДЕВА²

THE RAPID METHOD OF IMMUNOSTAINING IN INTRAOPERATIVE FROZEN SECTION DIAGNOSIS

¹Chair of surgery № 1 Kuban state medical university,
Russia, 350086, Krasnodar, st. Sedina, 4;

²laboratory of pathomorphology № 2 Marginal clinical hospital № 1,
Russia, 350086, Krasnodar, st. 1 May, 167

The results of this study was optimization of protocol of the rapid method of immunostaining in intraoperative frozen section diagnosis (P. Ruck, 2001) and the increasing to efficiency of intraoperative examination to account maximum reductions time of immunohistochemical staining. Detailed incremental description of the way is brought. Proposed way allows to shorten running time execution immunohistochemical staining on frozen section for 7–8 min that in condition of intraoperative diagnostics have a vital importance.

Key words: immunohistochemical, intraoperative diagnostics, frozen section.

Введение

Одной из главных задач морфологического метода исследования является прижизненная диагностика патологических процессов по биопсийному и операционному материалу, прежде всего диагности-

ка по криостатным срезам непосредственно в ходе оперативного вмешательства. Интраоперационная морфологическая диагностика является очень сложной задачей даже для опытных специалистов, поскольку она происходит в условиях дефицита времени

(15–20 минут) и опирается исключительно на форму тканевых структур, размеры клеток и т. д., что не исключает эвристических ошибок. При некоторых патологических состояниях, особенно опухолях, бывает трудно и даже невозможно с помощью гисто- или цитологических окрасок определить гистогенез опухолевой ткани. Утрата морфологических особенностей клеток в различных типах опухолей, особенно при метастазировании и недифференцированных новообразованиях мелкоклеточного и полиморфно-клеточного характера, далеко не всегда позволяет провести дифференциальную диагностику опухолей, используя только морфологические методы.

Вместе с тем от интраоперационного морфологического диагноза зависят тактика хирургического лечения, определение возможности органосохраняющей операции, определение уровня иссечения тканей и т. д.

В связи с этим целесообразно использовать различные дополнительные способы верификации патологического процесса. В настоящее время важнейшим методом диагностики является иммуногистохимический (ИГХ) – метод идентификации специфических антигенных характеристик тканей. Это одна из самых современных методик дифференциальной диагностики онкологических заболеваний, позволяющая определить гистогенез опухоли, ее иммунофенотип, молекулярные факторы прогноза [1, 2, 3, 4, 5].

В связи с этим высокоактуальным является внедрение в интраоперационную морфологическую диагностику методики ИГХ исследования тканей, позволяющей более точно определить гистогенез опухоли, её злокачественный потенциал, выявить микрометастазы, оценить состояние края резекции, наличие в краях резекции опухолевых клеток и т. д.

Известно, что ИГХ окрашивание парафиновых срезов тканей занимает в среднем 4–5 часов (в зависимости от характеристик применяемых реагентов). Окраска криостатных срезов исключает длительные этапы депарафинизации, дегидратации, демаскировки антигенов, регидратации, что значительно ускоряет процедуру. Тем не менее оставшиеся этапы обработки ткани занимают в среднем 75–80 минут, что не пригодно в условиях интраоперационной диагностики.

Peter Ruck (2001) предложил протокол ИГХ окрашивания криостатных срезов, позволяющий получить результат через 12–15 минут. Учитывая время, необ-

ходимое для приготовления криостатных срезов, для микроскопии и оценки полученных результатов суммарное время колеблется в пределах 20–22 минут.

Целью настоящей работы явились усовершенствование этого протокола и повышение эффективности интраоперационной диагностики за счет максимального укорочения процедуры ИГХ окрашивания криостатных срезов для дальнейшего микроскопического исследования.

Материалы и методы

Работа выполнена на операционном материале Краевой клинической больницы № 1 г. Краснодара. Исследовали удаленные ткани легких, бронхобиоптаты, биоптаты опухолей средостения, плевры, яичников, щитовидной железы, кишечника, ткани опухоли и краев резекции предстательной железы, полученные от 87 пациентов, находившихся на лечении с октября 2007 г. по февраль 2010 г. Изучали серийные криостатные срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, и производили иммуногистохимическое окрашивание пероксидазным методом, используя стандартную методику, а также модифицированную нами методику быстрого иммуногистохимического окрашивания, прототипом которой явился протокол Peter Ruck (2001) [1, 4, 6]. Выбор системы визуализации (EnVision™ DAKO) определен ее высокой чувствительностью и двухшаговой процедурой окраски, занимающей меньше времени, чем ABC или APAAP методы [1]. Нами были использованы моно- и поликлональные антитела: Cytokeratin (AE1/AE3), Cytokeratin 7 (OV-TL 12/30), Vimentin (V9), PLAP (8A9), LCA (2B11+PD7/26), S-100, Melanosom (HMB45), Synaptophysin (SY38), CD30 (Ber-H2), Ki-67 (MIB-1), p63 (4A4), Cytokeratin 34bE12 (34bE12), CA-125 (Ov185:1), PSA (ER-PR8), Galectin-3 (9C4), p504S (13H4), p53 (DO-7) фирмы «DAKO», Apolipoprotein D, clone 36C6 фирмы «NCL».

Результаты

Первая серия исследований была посвящена интраоперационному изучению тканей с применением протокола Peter Ruck (2001), а также усовершенствованной нами методики быстрого иммуногистохимического окрашивания. Подробное описание способа и детали протокола усовершенствованной методики

Пошаговое описание методики иммуногистохимического окрашивания криостатных срезов тканей в условиях интраоперационной диагностики

Этапы иммуногистохимического окрашивания	Время инкубации	Температура градусы С
1. Фиксация криостатных срезов в ацетоне	50 сек.	Комнатная 25° С
2. Высушивание срезов	10 сек.	37° С
3. Инкубация со смесью первичных и вторичных антител (EnVision™ complex)	4 мин	37° С
4. Промывка буфером (Трис-буфер pH 7,4)	10 сек.	37° С
5. Инкубация с субстрат-хромогеном (DAB)	1 мин	37° С
6. Промывка дистиллированной водой	10 сек.	37° С
7. Контрастирование гематоксилином Майера	15 сек.	25° С
8. Промывка водопроводной водой	15 сек.	42° С
9. Закрепление в бальзам	15 сек.	25° С

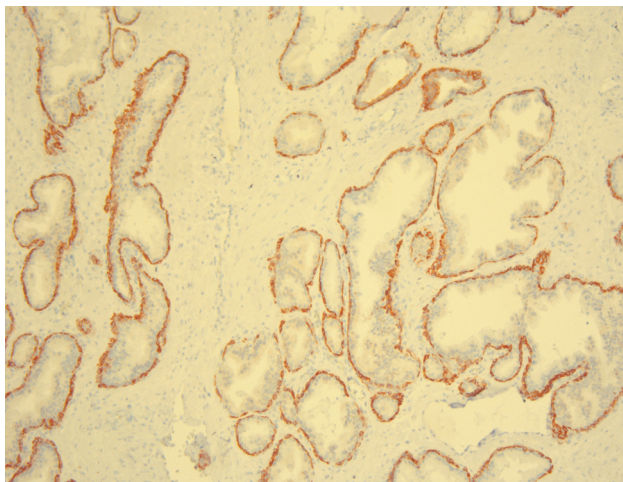


Рис. 1. Иммуногистохимическое окрашивание криостатного среза ткани предстательной железы с антителами к высокомолекулярным цитокератинам, clone 34 β E12, увеличение x 100

На рисунке видна положительная мембранная окраска базальных клеток неопуховых желез с антителами к высокомолекулярным цитокератинам, clone 34 β E12. Участков аденокарциномы в исследованном материале нет. Время исследования – 7 минут 4 сек.

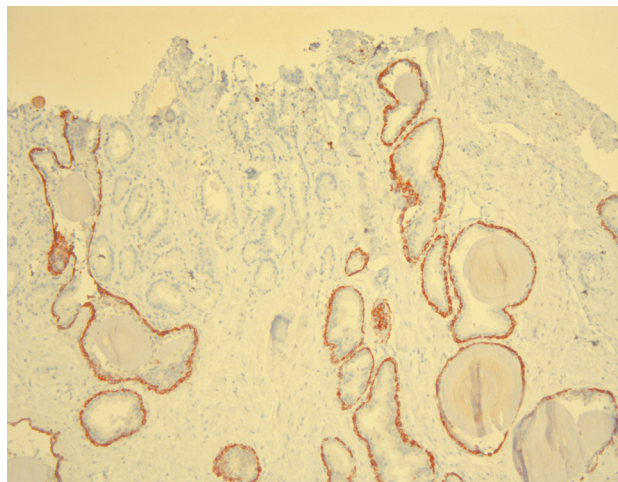


Рис. 2. Иммуногистохимическое окрашивание криостатного среза ткани карциномы предстательной железы с антителами к высокомолекулярным цитокератинам, clone 34 β E12, увеличение x100

На рисунке видна положительная мембранная окраска базальных клеток неопуховых желез с антителами к высокомолекулярным цитокератинам, clone 34 β E12, и отрицательная окраска с этим же антителом в участке опухолевых желез, что является иммуноморфологическим диагностическим признаком аденокарциномы предстательной железы. Время исследования 7 минут.

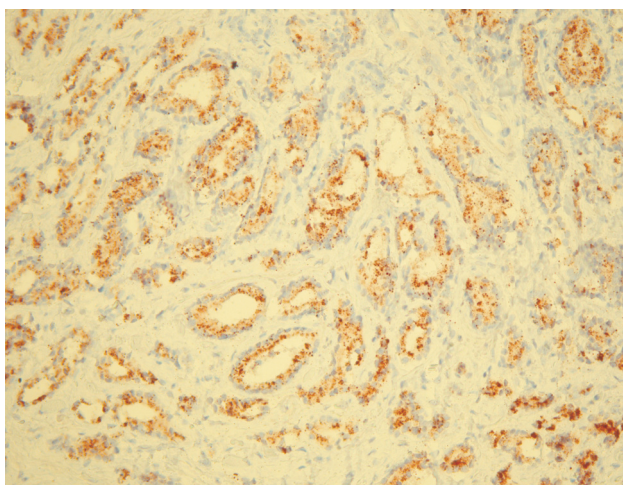


Рис. 3. Иммуногистохимическое окрашивание криостатного среза ткани карциномы предстательной железы с антителами к p504S (clone 13H4), увеличение x100

На рисунке видна положительная цитоплазматическая окраска опухолевых клеток с антителами к p504S (clone 13H4). Время исследования 7 минут 6 секунд.

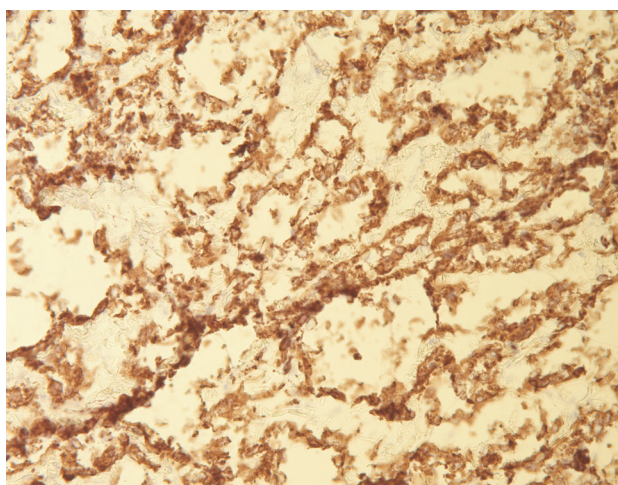


Рис. 4. Иммуногистохимическое окрашивание криостатного среза ткани опухоли легкого с антителами к цитокератину 7 (clone OV-TL 12/30), увеличение x200

На рисунке видна положительная мембранная окраска опухолевых клеток с антителами к цитокератину 7 (clone OV-TL 12/30). Время исследования 7 минут

иммунофенотипирования на криостатных тканевых срезах представлены в таблице.

Суммарное время реакции: 7 мин 05 сек., при этом осуществляются все необходимые этапы окрашивания. На криостатный тканевый срез, фиксированный в ацетоне в течение 50 сек., первоначально наносится смесь первичных, а через 15 сек. инкубации (не промыва

вая буфером) вторичных антител и инкубируется 4 мин при температуре 37° С с последующим окрашиванием субстрат-хромогеном и контрастированием гематоксилином. Для инкубации с субстрат-хромогеном используется только свежеприготовленный раствор. Промывка осуществляется раствором трис-буфера (рН 7,4–7,6) и дистиллированной водой, нагретыми до температуры

37° С и 42° С соответственно. Все этапы окрашивания проводятся на нагревательном столике при температуре 37°. Рабочие концентрации антител соответствуют рекомендациям прилагаемых инструкций или превышают их в 4–10 раз. Для разведения первичных антител используется растворитель, редуцирующий фоновое окрашивание (DAKO). Все вышеперечисленные приемы позволяют существенно сократить время ИГХ реакции.

Таким образом, предлагаемый нами отход от стандартной методики вызван необходимостью максимально сократить время исследования опухолевой ткани в момент операции, когда хирурги вынуждены прервать операцию и ждать у операционного стола результатов иммуноморфологического исследования, во многом определяющих дальнейшую тактику оперативного лечения.

Новыми приемами в отличие от методики Р. Рук, являются: проведение одновременной инкубации тканевых срезов со смесью первичных и вторичных антител, в результате чего сокращается время инкубации с первичными и вторичными антителами, устраняется этап промывки буфером после инкубации с первичными антителами. Суммарное время инкубации на этом этапе укорачивается на 2 мин 30 сек. и длится 4 мин. Используется свежеприготовленный раствор субстрат-хромогена непосредственно перед его нанесением, за счет чего сокращается время инкубации с субстрат-хромогеном с 3 мин до 1 мин. Используются раствор трис-буфера и дистиллированная вода повышенной температуры (до 37° и 42° С), за счет чего сокращается время промывки тканевых срезов.

Сравнительный анализ с прототипом показал полное совпадение результатов иммуногистохимического окрашивания. Вместе с тем предлагаемый способ позволяет сократить время выполнения иммуногистохимической реакции на замороженных срезах на 5 мин, что в условиях интраоперационной диагностики имеет существенное значение.

Примеры работы с различными тканями представлены на рисунках 1–4.

Во второй серии исследований было проведено послеоперационное иммуногистохимическое изучение соответствующих тканей на парафиновых срезах по стандартной методике с теми же маркерами и реагентами визуализации [1, 2, 4]. Сравнительный анализ результатов окрашивания также показал полное совпадение иммунофенотипических признаков опухолевых клеток, обнаруженных как на криостатных, так и на парафиновых срезах. Результаты и качество иммуногистохимической окраски криостатных и парафиновых срезов тканей были идентичны во всех случаях. Вариативной в отдельных случаях была лишь интенсивность окраски.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами усовершенствован быстрый метод иммуногистохимической окраски на криостатных срезах, позволяющий сократить процедуру окрашивания в среднем до 7–8 минут, что делает возможным его широкое использование при интраоперационной диагностике.

Регистрационный номер заявки на изобретение 2009138362.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Под ред. С. В. Петрова, Н. Т. Райхлина. – Казань: «Титул», 2004. – 451 с.
2. Diagnostic Immunohistochemistry / Ed. by D. Dabbs. – Churchill Livingstone, 2010. – 828 p.
3. Dodson A., Campbell F. Biotin inclusions: a Potential Pitfall in immunohistochemistry // *Histopathology*. – 1999. – № 34, – P. 178–179.
4. Immunocytochemistry. A Practical Approach. Ed. by J. E. Beesley. Department of Pharmacology, Wellcome Research Laboratories, Beckenham, Kent. – Oxford University Press, 1993. – 248 p.
5. Immunocytochemistry News. UK NEOAS // *J. Cell. Pathol.* – 2001. – № 5. – 189 p.
6. Peter Ruck. EnVision™ for rapid immunostaining in intraoperative frozen section diagnosis. Institute of Pathology, University of Tübingen. – Germany, 2001. – P. 36–39.

Поступила 17.09.2010

А. Э. МОРГОЕВ¹, С. Г. ПАВЛЕНКО², Г. Б. КАИРОВ³

ПРЕЦИЗИОННЫЕ ХИРУРГИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ФОРМИРОВАНИЯ ТОЛСТОКИШЕЧНОГО АНАСТОМОЗА ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

¹Северо-Осетинская государственная медицинская академия,

Россия, РСО – Алания, 362019, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 40;

²кафедра факультетской хирургии с курсом анестезиологии и реаниматологии

Кубанского государственного медицинского университета,

Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4;

³Республиканская клиническая больница,

Россия, КБР, 360000, г. Нальчик, ул. Затишье, 1. E-mail: drpaulson@mail.ru

В хирургическом лечении больных колоректальным раком использовались прецизионные технологии построения однорядного толстокишечного анастомоза. Результатом явилось снижение числа несостоятельств анастомоза и летальности в группе больных пожилого возраста.

Ключевые слова: колоректальный рак, одnorядный толстокишечный анастомоз, прецизионная технология.