

## РОЗРОБКА НОВОГО МЕТОДУ ТЕРМІНОВОГО ІНТРАОПЕРАЦІЙНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОКАРЦИНОМ ТА ОЦІНКА ЙОГО ЕФЕКТИВНОСТІ

Караченцев Ю. І., Гойденко Н. І., Дубовик В. М., Хазієв В. В., Лях І. О., Гопкалова І. В.

*ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків  
admin@iper.com.ua*

Вузлові проліферативні процеси з кожним роком збільшують свій внесок у захворювання щитоподібної залози (ЩЗ). Злоякісні новоутворення серед вузлів ЩЗ, за даними різних авторів, складають від 5 до 15% [1–3]. Сучасні стандарти ендокринної хірургії вимагають встановлення конкретного патоморфологічного діагнозу для кожного з вузлів ЩЗ [4, 5]. Особливо це стосується злоякісних тиреоїдних новоутворень ЩЗ, коли необхідним є проведення розширеного обсягу хірургічного втручання. На жаль, увесь арсенал сучасних інструментальних методів дослідження (радіоізотопного, ультразвукового, тонкоіголкової біопсії) на доопераційному етапі не дають точної характеристики усього осередкового патологічного процесу [7]. Тому роль морфологічного інтраопераційного експрес-дослідження вузлових новоутворень ЩЗ неухильно зростає. Це забезпечує вибір оптимальної хірургічної тактики, дає можливість виконувати органозберігаючі операції на ЩЗ і запобігає проведенню повторних операцій в разі виявлення

онкопроцесу під час заключного патоморфологічного діагнозу [8–10].

Морфологічна верифікація пухлин ЩЗ є одним з найбільш важких розділів онкоморфології. Гістологічна діагностика термінових інтраопераційних біопсій складна, кожна ситуація неповторювана і вимагає окремого розгляду. Труднощі існують у патоморфологів і при диференціальній діагностиці пухлин по парафінових зрізах. Крім того, враховуючи можливість спотворення зображення під час кріообробки фрагментів при проведенні інтраопераційної експрес-біопсії, мінімальну кількість зрізів (як правило для дослідження обирається одна ділянка вузла) та обмеженість часу на роздуми, труднощі діагностики зростають в декілька разів [11–13].

Метою нашої роботи було розробити методику проведення інтраопераційного експрес-гістологічного дослідження папілярних мікрокарцином та оцінити її ефективність.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Впродовж 2006–2011 рр. нами було проведено 3240 термінових інтраопераційних досліджень заморожених зрізів (ТІДЗЗ) вузлової патології ЩЗ. Аналізуючи отриманий досвід, необхідно вказати на певні труднощі

трактування зображень деяких видів аденом ЩЗ, можливість помилкових висновків та шляхи зменшення кількості псевдонегативних діагнозів.

Діагностика характеру патологічного

процесу в тиреоїдному вузлі починається з макроскопічного дослідження, при якому оцінюється колір, консистенція вузла, наявність або відсутність у нього капсули. Наступним етапом дослідження є вибір ділянки вузла, який є, з погляду морфолога, найбільш доцільним для експрес-біопсії. Вибір, безумовно, ґрунтується на особистому досвіді кожного дослідника.

У випадках виявлення на заморожених зрізах папілярних, псевдопапілярних або фолікулоподібних структур необхідно оцінювати ступінь поліморфізму. Як правило, папілярний рак на заморожених зрізах мало змінює свою структуру у порівнянні із парафіновими зрізами. Сосочки можуть бути великими і деревовидно розгалуженими або утворювати химерні залозоподібні фігури. Ядра клітин великі, гіпохромні, у вигляді «годинникового скла». Строма на заморожених гістологічних препаратах, як правило, виглядає набряклою, але для папілярного раку ЩЗ (ПРЩЗ) характерна її відсутність. Перелічені ознаки дозволяють точно поставити діагноз ПРЩЗ.

Одним з найважливіших факторів, що впливають на результат ПДЗЗ та дозволяють уникнути діагностичної помилки, є якість гістологічних зрізів. При їх виготовленні деформація тканини під час фіксації має бути мінімальною, а товщина зрізів повинна складати не більше 10 мкм. Дуже важливим параметром при виконанні експрес-діагностики є час, за який виготовляється гістологічний препарат.

На сьогодні відомо декілька способів виготовлення гістологічних зрізів. Так, А. Ф. Кисельовою із співавт. [14] запропонована методика, яка дає мінімальну деформацію тканин залози та дозволяє отримати високоякісне зображення. Недолік методу полягає у його тривалості, бо на виготовлення експрес-препарату витрачається 15–20 хв., що змушує хірурга чекати результатів дослідження та збільшує тривалість операції.

Найбільш поширеним є спосіб виготовлення гістологічних препаратів при експрес-біопсії, запропонований Г. А. Меркуловим [15]. Цей метод займає мінімальний час — від 7 до 10 хв. Проте кип'ятіння викликає різку деформацію тканин, особливо

тканини ЩЗ, що призводить до спотворення зображення та помилок у діагнозі.

Раніше нами був розроблений метод виготовлення гістологічних зрізів для проведення інтраопераційної експрес-діагностики, який давав можливість отримати гістологічні препарати високої якості за короткий термін. Запропонована методика, за якою для виготовлення гістологічних зрізів при експрес-біопсії тканину спочатку заморожують та виготовляють зрізи, потім зріз на склі піддають фіксації у розчині формаліну кілька секунд з наступним фарбуванням гематоксиліном і еозином [16].

Нами було змінено послідовність етапів виготовлення гістологічних препаратів. На першому етапі готуються свіжозаморожені зрізи, а фіксація цих зрізів проводиться на другому етапі. При цьому час фіксації свіжозамороженого зрізу у розчині формаліну займає 2–3 секунди і не призводить до деформації зображення.

Запропонований спосіб виготовлення гістологічних зрізів при проведенні експрес-біопсії апробовано у клініці ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України». Він здійснюється наступним чином:

а) зразок, обраний для дослідження, розміщують на заморожувальному мікромомі або кріостаті. Виготовляють зрізи з нефіксованої тканини за методикою Н. В. Владлеєвої [17] та розміщують їх на предметному склі. Зріз переносити на скло необхідно обережно. Для запобігання зісковзування зрізу зі скла під час фіксації та фарбування, його щільно притискають до скла фільтрувальним папером;

б) фіксують зріз на склі у розчині формаліну протягом 2–3 секунд;

в) фарбують зріз за стандартною методикою гематоксиліном і еозином;

г) накривають зріз покривним склом.

Такий порядок дослідження є можливим, якщо розміри вузлів більше ніж 1 см. Тканини такого вузла достатньо для виготовлення гістологічних зрізів при субопераційній експрес-біопсії та для звичайної методики виготовлення гістологічних зрізів.

Новоутворення, розміри яких 0,3–0,9 см, вимагають економного ставлення до них: не-

обхідно одну частину вузла відправити на субоперційну експрес-біопсію, а другу зберегти для звичайної методики виготовлення гістологічних зрізів. Якщо розміри вузла 0,3–0,5 см, увесь вузол направляється на експрес-діагностику. У таких випадках виникає необхідність зберегти частину замороженого фрагменту, що залишилась після проведення експрес-біопсії, та виготовити з неї гістологічні зрізи для подальшої діагностики. Ця частина замороженого фрагменту дуже тонка, її товщина не перевершує 1,0–1,5 мм і звичайна методика виготовле-

ння гістологічних зрізів в цьому випадку не забезпечує зображення високої якості. Тому відомі методики, які застосовуються при виготовленні препаратів для експрес-гістологічного дослідження, у випадках мікросередків ПРЩЗ не можуть бути використані.

Нами була поставлена мета — розробити спосіб виготовлення гістологічних зрізів із тонких фрагментів тканини, що залишилась після експрес-діагностики, що дозволяє отримати гістологічні препарати високої якості.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Поставлена задача була вирішена тим, що для виготовлення гістологічних зрізів з тонких фрагментів тканини, що залишилась після проведення експрес-біопсії, об'єкт фіксують у розчині формаліну протягом 3–5 годин, з наступним зневодненням у спиртах висхідної концентрації протягом 1 години, а підготовка до заливки у парафін полягає у зануренні об'єкту на 15 хвилин у суміш 96 % спирту та ксилолу у співвідношенні 1:1, а потім ще на 15 хвилин у чистий ксилол.

Запропонований спосіб виготовлення гістологічних зрізів здійснюється наступним чином.

1. Фіксація: фрагмент вузла, що залишився після експрес-біопсії, занурюють у 10 % розчин формаліну, не допускаючи його відтаювання. Фіксація проходить повільно, протягом 3–5 годин, що дає можливість уникнути грубого коагулювання білків.

2. Зневоднення: зневоднення тонкого фрагменту проводять у спиртах висхідної концентрації короткий час, що попереджує структурні зміни. Спочатку об'єкт занурюють у 70 % спирт на 30 хвилин, потім у 96 % спирт ще на 30 хвилин.

3. Підготовка до заливки у парафін: пе-

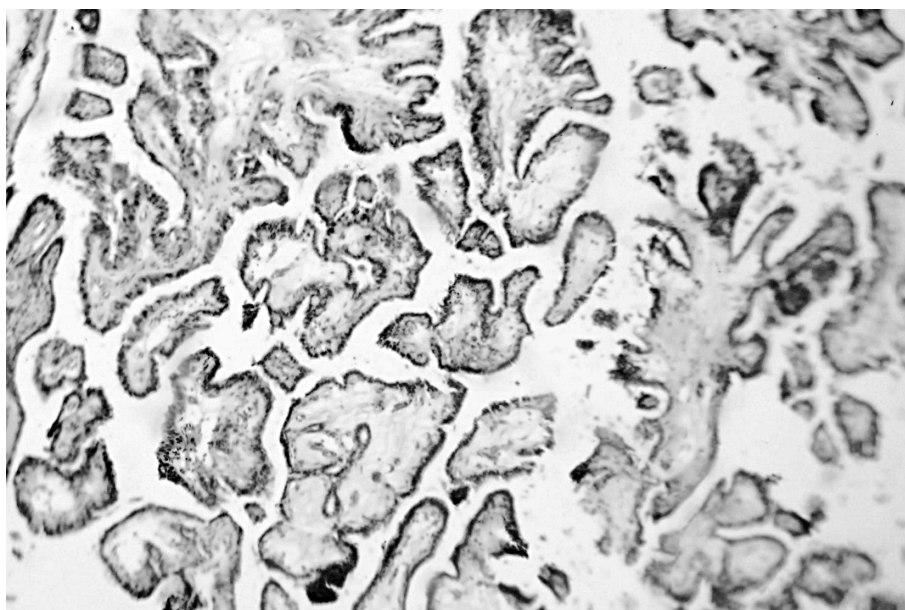


Рис. 1. Гістологічний препарат з папілярними структурами (ПРЩЗ), виготовлений за розробленою методикою. Забарвлення гематоксилін — еозин,  $\times 200$ .

ред заливкою у парафін об'єкт занурюють у суміш 96% спирту з ксиолом (1:1) на 15 хвилин, потім у чистий ксиол ще на 15 хвилин. Перетримка тонких фрагментів у ксиолі неприпустима, оскільки це робить шматочки тканини крихкими.

4. Заливку у парафін та фарбування здійснюють за стандартною методикою.

Результатом стало підвищення точності діагностики патологічних процесів у тканинах за рахунок високої якості гістологічних препаратів.

На рисунках представлені зображення гістологічних препаратів з папілярними структурами, що виготовлені за розробленою (рис. 1) та стандартною методикою (рис. 2).

На рис. 1 зображені папілярні структури зі збереженим фолікулярним епітелієм

і строמוю. На рис. 2 можна бачити папілярні структури зі стромою, що набрякла, фолікулярний епітелій збережений лише осередками, поверхнева частина клітинної мембрани пошкоджена. Такі пошкодження виникають при тривалій фіксації в формаліні. Тривале перебування тонкого фрагмента тканини в ксиолі призвело до таких структурних змін, як розволокнення строми.

Точність результатів розробленого методу перевірялася за допомогою стандартної п'ятиденної гістологічної проводки. Перевірка проведена для 28 випадків мікроскопічного ПРЦЗ. Розбіжностей між результатами експрес-методики та стандартного гістологічного дослідження не спостерігалось, діагностичних помилок не було, точність методу склала 100% за рахунок підвищення якості гістологічних препаратів.

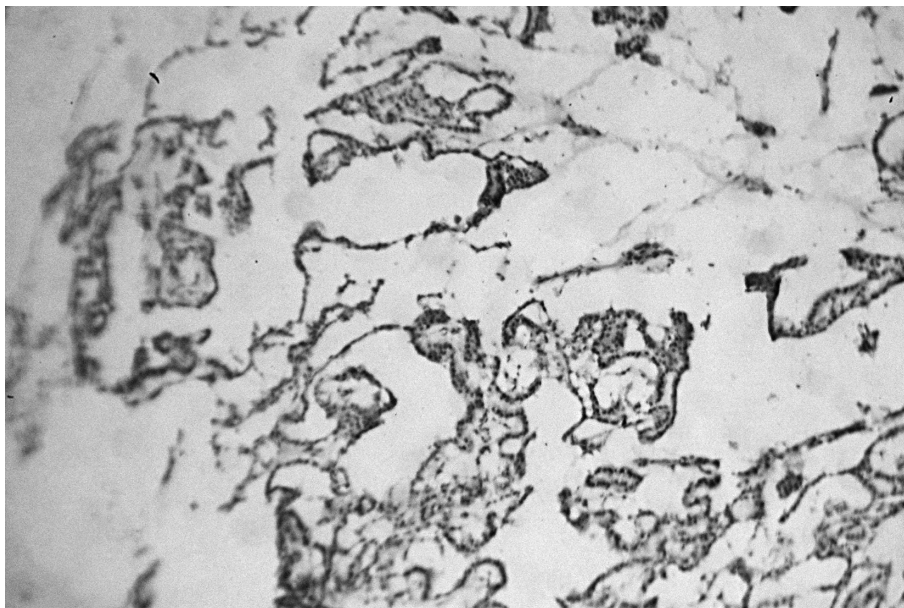


Рис. 2. Гістологічний препарат з папілярними структурами з осередково збереженим фолікулярним епітелієм і стромою, виготовлений за стандартною методикою. Забарвлення гематоксилін — еозин,  $\times 200$ .

## ВИСНОВКИ

1. Розроблений спосіб виготовлення гістологічних препаратів із тонких фрагментів тканини, що залишилась після проведення експрес-біопсії (замороження), дозволяє отримати зображення високої якості і дає змогу проводити експрес-гістологічне дослідження пухлин малого розміру, уникаючи діагностичних помилок та визначати оптимальну тактику оперативного втручання.
2. Метод є високоточним, незамінним і рекомендується для рутинної практики установ, де проводиться хірургічне лікування захворювань щитоподібної залози.

**ЛІТЕРАТУРА  
(REFERENCES)**

1. Hay ID, Grant CS, van Heerden YA, et al. *Surgery* 1992; 10:1112-1139.
2. Hubert YP, Kierman PD, Beahrs OH, et al. *Arch Surg* 1990; 2:115-394.
3. Bel'fiore A. *Thyroid Intern* 2002; 2:16.
4. Kumar A, Ahuja MM, Chatto-padhyay TK, et al. *J Assoc Physicians India* 1992; 40:302-306.
5. Loy TJ, Sundram FX. *Ann Acad Med Singapore* 1989; 6:658-664.
6. Christensen SB. *Acta Chir Scand* 1984; 150:433-439.
7. Vol'peb R. *Bolezni Chitovidnoy Zhelezy, Moskva*, 2000:172 p.
8. Xu X, Quiros R, Gattuso P, et al. *Cancer Res* 2003; 63:4561-4567.
9. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. *Nature (Lond.)* 2002; 417:949-954.
10. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, et al. *Cancer Res* 2003; 63:1454-1457.
11. Pollock PM, Meltzer PS. *Cancer Cell* 2002; 2:5-7.
12. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, et al. *J Clin Endocrinol Metabol* 2004; 89(5):2414-2420.
13. Kiseleva FA, Zhitnikov AY, Keysevich LV, et al. *Osnovy gistologii, Kiev*, 1983:7.
14. Merkulov GA. *Kurs Gistologicheskoy Tekhniki, Moskva*, 1969:129.
15. Semikov V. *Vrach* 2002; 7:7-12.
16. Gojdenko NI, Bozhko DY, Kovalenko OM. *Patent 28387, Ukraina*.
17. Vladleeva NV. *Arkhiv Anatomii, Gistologii i Embriologii, Kharkiv*, 1962: 4-93.

**РОЗРОБКА НОВОГО МЕТОДУ ТЕРМІНОВОГО ІНТРАОПЕРАЦІЙНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОКАРЦИНОМ ТА ОЦІНКА ЙОГО ЕФЕКТИВНОСТІ**

**Караченцев Ю. І., Гойденко Н. І., Дубовик В. М., Хазієв В. В., Лях І. О., Гопкалова І. В.**

*ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків  
admin@iper.com.ua*

Розроблено спосіб виготовлення гістологічних препаратів із тонких фрагментів тканини, що залишилась після проведення експрес-біопсії (замороження) під час операцій з приводу папілярного раку щитоподібної залози. Метод дозволяє отримати зображення високої якості і дає змогу проводити експрес-гістологічне дослідження пухлин малого розміру (мікрокарцином), уникати діагностичних помилок та визначати оптимальну тактику оперативного втручання. Метод є високоточним, незамінним і рекомендується для рутинної практики установ, де проводиться хірургічне лікування захворювань щитоподібної залози.

**К л ю ч о в і с л о в а:** щитоподібна залоза, папілярний рак, експрес-гістологічне дослідження.

**РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА СРОЧНОГО ИНТРАОПЕРАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОКАРЦИНОМ И ОЦЕНКА ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТИ**

**Караченцев Ю. И., Гойденко Н. И., Дубовик В. Н., Хазиев В. В., Лях И. А., Гопкалова И. В.**

*ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины»,  
г. Харьков  
admin@iper.com.ua*

Разработан способ изготовления гистологических препаратов из тонких фрагментов ткани, оставшейся после проведения экспресс-биопсии (замораживания) во время операций по поводу папиллярного рака щитовидной железы. Метод позволяет получить изображение высокого качества и проводить экспресс-гистологическое исследование опухолей малого размера (микрокарцином), избегать диагностических ошибок и определять оптимальную тактику оперативного вмешательства. Метод является высокоточным, незаменимым и рекомендуется для рутинной практики учреждений, где проводится хирургическое лечение заболеваний щитовидной железы.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** щитовидная железа, папиллярный рак, экспресс-гистологическое исследование.

**ELABORATION OF A NEW METHOD FOR IMMEDIATE INTRASURGICAL  
MICROCANCER RESEARCH AND EVALUATION OF ITS EFFECTIVENESS**

**Yu. I. Karachentsev, N. I. Goydenko, V. N. Dubovik, V. V. Khaziyev, I. A. Lyakh,  
I. V. Gopkalova**

*SI «V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine», Kharkiv  
admin@ipep.com.ua*

There is a method of making histological preparations with thin slices of tissue that remained after the rapid biopsy (freezing) during surgery for papillary thyroid cancer. The method allows to obtain high quality images and provides the rapid histological examination of tumors of small size (microcancer) avoid diagnostic errors and to determine the optimal tactics surgery. The method is highly accurate, indispensable and is recommended for routine practice facilities, where the surgical treatment of thyroid cancer.

**Key words:** thyroid gland, papillary cancer, rapid histological examination.