

**ЛЮМИНЕСЦЕНТНО-ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
БРОНХОЛЕГОЧНОГО РАКА**

Маматова Муборак Нурпулатовна, д.в.н.

Даминов Феруз Асадуллаевич, д.м.н.

Самаркандский ГМУ,

Амонова Гулмира Умаровна врач лаборант,

Арипова Дилноза Илхомовна врач лаборант

Аннотация. Путем изучения цитохимическим и биохимическим методами нуклеинового обмена в нормальных и злокачественных тканях и клетках установлено, что в последних количество НК значительно повышено. Содержание РНК и ДНК в клетках можно выявить методом люминесцентной микроскопии с применением флюорохромов.

Ключевые слова: Люминесценция, флюорохром, диссоциированное, злокачественный, экспозиция флюорохрома.

Введение. Концентрация ДНК, находящейся в ядре, при озлокачествлении увеличивается по сравнению с ее содержанием в нормальных тканях и клетках. РНК находится в цитоплазме и ядрышке; она более лабильна, содержание ее в разных тканях и клетках неодинаково и зависит от их функционального состояния. При всех физиологических процессах, сопровождающихся повышенным синтезом белка (рост, регенерация, секреция, малигнизация), обнаружено большое содержание РНК в клетках [7, 9].

Содержание РНК и ДНК в клетках можно выявить методом люминесцентной микроскопии с применением флюорохромов [2, 4, 8].

Путем изучения цитохимическим и биохимическим методами нуклеинового обмена в нормальных и злокачественных тканях и клетках установлено, что в последних количество НК значительно повышено. Содержание РНК и ДНК в клетках можно выявить методом люминесцентной микроскопии с применением флюорохромов [1, 10, 12].

Люминесценцией называется свечение объекта, возбуждаемое поглощенной им световой энергией. Люминесценция вызывается падающими на препарат коротковолновыми лучами: невидимыми ультрафиолетовыми (длина волны до 380 мкм) и видимыми фиолетовыми и синими (длина волны до 460 мкм). Люминесценция бывает первичная и вторичная. Первичная - это естественное свечение объекта в ультра - фиолетовых лучах. Она может или отсутствовать, или быть нечеткой [6, 11].

Поэтому в основном пользуются вторичной флюоресценцией в видимом синем свете, вызываемой добавлением флюорохромов к тканям и клеткам. Наиболее пригодным для выявления клеток рака в различных объектах признается акридиновый оранжевый (АО) [3, 5,].

При взаимодействии АО с НК (ДНК и РНК) возникает разное свечение: с ДНК - зеленое, с РНК - красное, что зависит от способности этих веществ связывать различное количество красителя.

Механизм соединения АО с НК зависит от различной полимеризации ее. ДНК - высокополимерное соединение, она быстро и прочно связывается с АО. РНК - низкополимерное соединение, связывается с большим количеством АО, но значительно медленнее и непрочно.

На люминесцентно-микроскопическом препарате ДНК соединяется с АО очень быстро. Свечение в местах ее накопления появляется значительно раньше, чем это необходимо для РНК. Поэтому для выявления РНК большое значение имеют концентрация флюорохрома и время экспозиции. При малом времени или недостаточной концентрации флюорохрома РНК может не выявиться. При большой концентрации флюорохрома оранжевое свечение может возникнуть в структурах, не содержащих РНК. Свойства флюорохрома зависят также от рН среды.

Цель научного исследования. Большинство публикаций о применении люминесцентного метода с целью выявления клеток рака относится к таким объектам, как выделения из влагалища и соскобы с шейки матки. Мокроту при обработке флюорохромами, особенно нефиксированные препараты, изучали мало.

Методика, описанная для флюорохромирования фиксированных препаратов, более трудоемка, чем разработанная для нефиксированных.

Таким образом, отсутствие точного описания методики и разноречивые данные авторов в научных литературах заставили нас уточнить оптимальные условия для получения у клеток рака характеризующей их люминесценции в препаратах из мокроты и смывов с бронхов. Использован люминесцентный микроскоп. Сначала флюорохромированию подвергали свежий препарат соскоба с ткани плоскоклеточного рака легкого, нанося на него 2 капли раствора АО 1:20 000 на физиологическом растворе (рН 6,8).

Материалы и методы. Флюорохромировать можно как фиксированные, так и нефиксированные препараты. Для флюорохромирования фиксированных препаратов рекомендуются более кислые буферные растворы рН 3,0-4,0; рН 3,0-5,0; рН 6,0. При флюорохромировании нефиксированных препаратов более четкая картина отмечена в слабощелочной среде при рН 7,2; 7,4; 8,0.

Есть мнение, что и без добавления буфера также наблюдается довольно яркое свечение. Применение физиологического раствора для разведения АО 1:30 000 при прижизненном флюорохромировании молекулы щелочных флюорохромов, к которым относится и АО, в слабокислой среде (рН 6,3-6,5) находятся в диссоциированном состоянии и позволяют получить наиболее интенсивную флюоресценцию.

Время экспозиции составляло 30 секунд после наложения на препарат покровного стекла. Установлено кирпично-красное и оранжевое свечение цитоплазмы раковых клеток и желтовато-зеленое свечение их ядер.

Ядра представлялись гомогенными или в них различали неправильно распределенный хроматин. Утолщение ядерной оболочки имелось у части клеток.

Так как в вязкой среде, какой является мокрота, время проникновения к клеткам флюорохрома может быть иным, его устанавливали на препаратах мокроты больного астмой, предварительно смешанной с материалом соскоба той же опухоли. Оказалось, что через 30 секунд у клеток рака не появлялось красного свечения цитоплазмы. В то же время цитоплазма части нормальных клеток плоского эпителия приобретала кирпично-красное свечение и часть клеток цилиндрического эпителия люминесцировала красным и оранжевым, а ядра - желтовато-зеленым светом. Спустя 1 минут у цитоплазмы клеток рака начинало появляться красное и оранжевое свечение.

Этот тип свечения все они приобрели только через 2 мин. Ядра становились белесо-желтыми или оставались зелеными. К этому сроку оранжевое или красное свечение цитоплазмы также отмечали почти у всех клеток цилиндрического эпителия.

Следовательно, для свежих препаратов мокроты типа капли необходим более длительный срок экспозиции флюорохрома (не менее 2 минуты), чем это указано для препаратов соскобов при той же методике. Затем были испытаны различные разведения АО (1:30 000, 1:20 000; 1:10 000) на фосфатной буферной смеси с рН 6,3, 6,5, 7,2, 7,4 и 8,0 при 20°, а также на физиологическом растворе с рН 6,8 и на дистиллированной воде без буфера. В опыт были взяты слизистая, слизисто-гнойная, гнойная, полувязкая и вязкая мокрота от больных раком с большим содержанием в ней раковых клеток, а также смывы с бронха.

Кроме того, каждому испытанию мокроты соответствовало исследование соскоба с раковой опухоли. Из каждого объекта готовили тонкий мазок и препарат в виде капли. После нанесения раствора АО накладывали покровные стекла. Микроскопию начинали через 20-30 секунд и продолжали до 40-50 минут. В таких случаях во избежание подсыхания АО прибавляли по каплям через 15-20 минут под покровное стекло.

Отмечено, что при разведении 1:30000 сдвиг свечения в красную часть спектра у клеток рака, как правило, наступал спустя 20-30 минут вне зависимости от характера разводящей жидкости. Исключение составляли препараты из жидкой мокроты и смывов с бронхов, приготовленные и в виде тонких мазков, и в виде капель. Здесь четкое красное свечение клеток рака появлялось уже через 5-10 минут. В препаратах в виде капель при вязкой, а иногда и полувязкой мокроте типичного свечения у клеток рака не наступало и через несколько часов. При буферном растворе рН 7,2 и 7,4 в некоторых наблюдениях отмечали более яркую красную люминесценцию клеток рака, чем при других разводящих жидкостях. Иногда же свечение было отчетливей и наступало ранее 20 минут при разведении на буфере рН 6,3 и на дистиллированной воде.

При разведении АО 1:20 000 на всех разводящих жидкостях при исследовании всего перечисленного материала, приготовленного в виде тонких мазков, четкое свечение наступало через 5-10 минут, в жидкой мокроте - уже через 30 секунд, в препаратах, приготовленных в виде капель, - через 1-2 мин. В последних вязкой и иногда из полувязкой мокроты раковые клетки имели серовато-зеленую цитоплазму и зеленое ядро в течение 24 часов.

Результаты. При разведении АО 1:10000 на всех разводящих жидкостях при исследовании перечисленного выше материала, приготовленного в виде тонких мазков, четкое свечение наступало в период от 3 до 10 минут. В жидкой мокроте, приготовленной в виде капель и тонких мазков, в смывах с бронхов и соскобах четкое свечение наступало через 30 секунд. Однако иногда уже через 1 минут отмечали перекрашивание отдельных клеток (цитоплазма светилась диффузно-красным цветом, ядро - желтовато-красным). В препаратах вязкой и иногда из полувязкой мокроты в виде капель типичного свечения раковых клеток за этот срок не наступало. Иногда имелось оранжевое свечение только ядрышек.

Так как у нас для всех видов мокроты, смывов с бронхов, приготовленных в виде тонких мазков, а также соскобов четкое и быстрое (в срок не более 10 минут) свечение наступало при АО на физиологическом растворе (рН 6,8) 1:10000, то, учитывая возможность нечастого перекрашивания отдельных клеток в случаях с жидкой мокротой и соскобов, удобнее пользоваться этой методикой. В препаратах в виде капель из вязкой мокроты типичного свечения раковых клеток не наступало.

Гнойная мокрота, особенно жидкая, иногда давала тускло-зеленое свечение всех элементов независимо от концентрации флюорохрома, времени окрашивания и приготовления препаратов.

В параллельном опыте мы испробовали флюорохромирование тонких мазков мокроты, фиксированных подсушиванием и нефиксированных.

Разницы в свечении атипичных клеток и других элементов в мазках, нефиксированных и фиксированных подсушиванием на воздухе, почти не было. При флюорохромировании подсушенных мазков мокроты, соскобов и опечатков с опухоли легкого АО в разведении 1:10 000 и 1:20 000 на физиологическом растворе переокрашивание отдельных клеток отмечено гораздо чаще, чем во влажных мазках.

Выводы. Таким образом, результаты флюорохромирования препаратов мокроты, примененного с целью люминесцентно-цитологической диагностики бронхолегочного рака, показывают, что для получения красного и оранжевого свечения цитоплазмы клеток рака лучше пользоваться тонкими влажными мазками, употребляя АО в разведении 1:10 000 на физиологическом растворе (рН 6,8). Флюорохромирование свежих препаратов в виде капли приводит к худшим результатам и может применяться только при жидкой мокроте. Необходимо соблюдать сроки чтения результатов люминесцентного анализа.

Использованная литература:

1. Бердиярова Ш.Ш., Нажмиддинова Н.К. Важность лабораторного анализа в ПЦР // Журнал. Tadqiqotlar. UZ. – 2024. Т. 48 (1), С-68-75.
2. Кадыров Ж.Ф., Маматова М.Н. К морфологическому изучению базофильных гранулоцитов крови // Журнал. Tadqiqotlar. UZ. - 11.2024. Т. 5(49) С. 25-31.
3. Маматова М.Н. (2024). Study of the biological properties of rabies by the method of diagnosis of the "Gold standard". *Scientific Journal, Colden Brain*, 2(4), 129-144.
4. Маматова М.Н. Гистологическая диагностика неэффективного эритропоэза // Ж. Бухоро Т.И. Тиббиётда янги кун. 2024, 7 (69).
5. Усачев В.С., Смоленов Е.И., Рагулин Ю.А. Морфологическая и молекулярно-генетическая диагностика рака легкого: методики и проблемы // *Research'n Practical Medicine Journal*. 2020;7(3):51-62.
6. Усачев В.С., Рагулин Ю.А., Силантьева Н.К. Сравнительная оценка методик трансторакальных биопсий в диагностике опухолей легких и средостения // *Онкология. Журнал им. П.А.Герцена*. 2016;5(5):11–14.
7. Родионов Е.О., Тузиков С.А., Миллер С.В., Кульбакин Д.Е. Методы ранней диагностики рака легкого (обзор литературы). *Сибирский онкологический журнал*. 2020;19(4):112-122.
8. Жибурт Е.Б., Караваев А.В., Мадзаев С.Р., Губанова М.Н. Особенности национального определения антител к эритроцитам // *Вестник Росздравнадзора*, 2012. № 4. С. 61-63.
9. Machida H., Blake E.A., Eckhardt S.E. et al., Trends in single women with malignancy of the uterine cervix in United States. // *J Gynecol Oncol*. 2018 Mar; 29(2): 221-230.

10. Daw Z., Padmore R., Neurath D., Cober N., Tokessy M., Desjardins D., Olberg B., Tinmouth A., Giulivi A. Hemolytic transfusion reactions after administration of intravenous immune (gamma) globulin: a case series analysis // *Transfusion*, 2008, Vol. 48, pp. 1598-1601.
11. Huang T., Li J., Zhang C., Hong Q., Jiang D., Ye M., Duan S. Distinguishing Lung Adenocarcinoma from Lung Squamous Cell Carcinoma by Two Hypomethylated and Three Hypermethylated Genes: A Meta-Analysis // *PLoS One*. 2016 Feb 10; 11(2): 79-88.
12. Liu F., Zhang H., Lu S., Wu Z., Zhou L., Cheng Z., Bai Y., Zhao J., Zhang Q., Mao H. Quantitative assessment of gene promoter methylation in non-small cell lung cancer using methylation-sensitive high-resolution melting // *Oncol Lett*. 2018 May; 15(5): 7639–7648.