

Винахід стосується медицини, а саме цитологічної діагностики. Значного прогресу в сучасній цитологічній діагностиці пухлин у людини було досягнуто завдяки запровадженню в практику Імуноцитохімічних методів дослідження матеріалу пункційних біопсій. За допомогою різних антитіл вдається ідентифікувати ракові клітини в лімфовузлах та ексудатах, з'ясувати походження первинної пухлини з того чи іншого органу, відрізнити різні типи злоякісних новоутворень в складних для морфології випадках.

Відомі способи приготування препаратів для імуноцитохімічного дослідження полягають у фіксації біопсійного матеріалу на предметному скельці та обробці його певними детергентами перед нанесенням моноклональних антитіл [1, 2].

Однак практичне використання цих імуноцитохімічних методів у цитологічній діагностиці нашоємується на певні труднощі, пов'язані з тим, що морфологічні та імуноцитохімічні дослідження можливо проводити лише на різних, окремо виготовлених препаратах. По-перше, це зумовлює потребу в додатковому пункційному матеріалі, що часом означає додаткові, неприємні для пацієнта і не завжди можливі пункції. По-друге, це значно ускладнює співставлення результатів, отриманих морфологічними та імуноцитохімічними методами, а часом робить неможливою морфологічну ідентифікацію реагуючих з антитілами клітин. Тому існує загальна потреба у розробці способу поєднання обох зазначених методів на одному цитологічному препараті.

Відомий спосіб приготування морфологічних препаратів для імуноцитохімічного дослідження, при якому автори пропонують забарвлені за методом Паппаніколау препарати обробляти розчином HCl. Однак, як вказує сам автор, цей метод не завжди дає відтворювані результати [3].

В основу цього винаходу поставлене завдання створити спосіб приготування препаратів, який би дозволив розширити можливості імуноцитохімічного методу за рахунок використання препаратів, попередньо забарвлених для морфологічних досліджень. Це дозволить уникнути повторного взяття біопсійного матеріалу (пункцій), що травматично для пацієнта, а також максимально підвищить точність діагностики злоякісних новоутворень та окремих метастазів в складних для морфології випадках.

Спосіб полягає в тому, що автори пропонують використовувати для імуноцитохімічних досліджень морфологічні препарати, забарвлені за методом Май Грюнвальда-Гімза, котрі, для відновлення реакційної здатності антигенних детермінант, обробляють 0,01-0,1% розчином трипсину насольовому фосфатному (PBS) або трис-HCl буфері протягом 1-60 сек, промивають водою і занурюють в 5% розчин оцтової кислоти на 7-10 хв з наступною промивкою в воді, а потім в PBS перед безпосереднім нанесенням на них моноклональних антитіл.

Оскільки фіксація препаратів в метанолі та забарвлення їх за методом Май і Грюнвальда-Гімза призводить до маскування антигенних детермінант, які виявляються недосяжними для моноклональних антитіл, автори винаходу підібрали такі умови, при яких можливе відновлення реакційної здатності антигенних детермінант. Для цього необхідно провести два етапи обробки препаратів: 1) попередньо забарвлені за Май Грюнвальдом-Гімза та використані для морфологічних досліджень препарати, короткочасно обробляють розчином трипсину. 2) після цього позбуваються барвників за допомогою екстракції розчином оцтової кислоти та PBS. Для того, щоб покращити доступ моноклональних антитіл до антигенних детермінант, концентрація трипсину в розчині повинна бути не вищою 0,1% (з метою запобігання переварювання клітин ферментом), але не нижчою 0,01% (для запобігання надмірного збільшення часу обробки препаратів). Концентрація трипсину та час обробки препаратів ферментом підібрані експериментально є оптимальними.

В модельних експериментах було встановлено, що складові компоненти барвників Май Грюнвальда та Романовського-Гімза азур I, азур II і еозин H в різній мірі блокують імуноцитохімічну реакцію. Оскільки азур I та азур II - лужні барвники, їх легко вилучити із забарвлених препаратів кислотною екстракцією. Найбільш придатною для цього виявилась оцтова кислота, яка до того ж максимально сприяє збереженню антигенної здатності білків. Обробка забарвлених за методом Май Грюнвальда-Гімза препаратів 5% розчином оцтової кислоти (загальноприйнята концентрація оцтової кислоти в складі фіксуючих сумішей) протягом 7-10 хв призводила до максимального позбавлення клітин лужних барвників. Після цього кислий барвник еозин H можна було вилучити з препаратів багаторазовою промивкою їх в PBS з pH 7,6.

Таким чином, сукупністю таких операцій було досягнуто вилучення з морфологічних препаратів барвників, а антигенні детермінанти клітин знову набули втраченої при забарвленні за Май Грюнвальдом-Гімза, реакційної здатності, яка необхідна для проведення імуноцитохімічної реакції.

Відмінні ознаки заявленого винаходу в своїй сукупності раніше не використовувались у відомих технічних рішеннях і для фахівця явно не випливають з рівня техніки, тому можна зробити висновок про те, що винахід відповідає критеріям "охороноздатності", "новизни" та "винахідницького рівня".

Спосіб здійснюється таким чином.

1. Препарати, забарвлені за методом Май Грюнвальда-Гімза, обробляють 0,1% розчином трипсину на PBS чи 0,05 М сольовому трис-HCl буфері pH 7,6 з 0,1% CaCl<sub>2</sub> - протягом 1-10 сек або ж 0,01% розчином трипсину, приготованого аналогічно - протягом 60 сек при кімнатній температурі. Концентрація протеолітичного ферменту та час інкубації можуть дещо варіювати в залежності від антигенів, які виявляють. Цей етап необхідний тільки для певного ряду антигенів.

2. Після інкубації в трипсині препарати багаторазово промивають в PBS з pH 7,6.

3. Потім видаляють один із складових компонентів барвників (азур) 5% оцтовою кислотою протягом 7-10 хв. Перед та після інкубації в кислоті препарати промивають дистильованою водою.

4. Видалення залишків барвників (в основному еозина H) досягають багаторазовою промивкою препаратів в PBS, pH 7,6.

В результаті такої обробки препарати з відновленими антигенними детермінантами та знебарвлені готові для нанесення моно-клональних антитіл і проведення імуноцитохімічної реакції по будь-якому із варіантів Імунопероксидазного методу.

Такий спосіб приготування препаратів, попередньо забарвлених для морфологічних досліджень, дозволяє Імуноцитохімічно виявляти цілий ряд антигенів: цитокератини 8 та 17, епітеліальні глікопротеїни, тиреоглобулін, кальцитонін, групи антигенів лейкоцитарного (CD5, CD14, CD15, CD45RA, IPO-47, LT45RA, ІКО-

25, ІКО-52) і макрофагального ряду, а також антигени гістосумісності (HLA-DR) та поліморфний епітеліальний муцин.

Приклад 1. В пунктатах вузла щитовидної залози хворої Н. 34 років знайдено атипові клітини, частина з яких має витягнуту форму, чим нагадує клітини медулярної карциноми, але, на відміну від типового випадку, мають ядерця. Морфологічними методами встановити точний діагноз неможливо. Проведення імуноцитохімічної реакції з антитілами проти кальцитоніну на тих же препаратах за нашим методом продемонструвало наявність в пухлині справжніх С-клітин. Встановлено точний діагноз медулярної карциноми, підтверджений гістологічно після проведення хірургічної операції.

Приклад 2. В пунктатах лімфатичного вузла на шиї у хворої А. 10 років знайдені злоякісні епітеліальні клітини. З'ясувати їх походження за морфологічними ознаками неможливо. Проведення імуноцитохімічної реакції з антитілами проти тиреоглобуліну на тих же препаратах за нашим методом дало змогу з'ясувати тиреоїдне походження метастазу. Під час операції в щитовидній залозі хворої дійсно знайдено первинну злоякісну пухлину невеликих розмірів.

Приклад 3. В пунктатах вузла, розташованого на поверхні лівої долі щитовидної залози хворої Н. 30 років, знайдені злоякісні клітини, за своєю морфологією схожі як на клітини анапластичного раку, так і на характерні для лімфогранулометозу клітини Березовського. Морфологічними методами встановити природу клітин неможливо. Проведення імуноцитохімічних реакцій з антитілами проти епітеліальних та загальнолейкоцитарного антигенів на тих же препаратах за нашим методом дозволило встановити діагноз лімфогранулометозу.

Запропонований спосіб з успіхом використовується в лабораторії функціональної діагностики Українського НДІ ендокринології та обміну речовин і може бути запроваджений в практику діагностичних лабораторій інших клінік.