



УКРАЇНА

(19) UA (11) 76372 (13) C2
(51) МПК (2006)
G01N 1/30

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ ЦИТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН

1

2

(21) а200500906

(22) 01.02.2005

(24) 17.07.2006

(46) 17.07.2006, Бюл. № 7, 2006 р.

(72) Алексєєнко Оксана Іванівна, Храновська Наталя Миколаївна, Болгова Лідія Севаст'янівна, Гріневич Юрій Якимович

(73) ІНСТИТУТ ОНКОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

(56) RU 2202776 C2, 20.04.2003

UA 53423 A, 15.01.2003

(57) Спосіб приготування цитологічних препаратів дендритних клітин, що включає висушування ци-

тологічних препаратів на повітрі з наступним фарбуванням за модифікованим методом Паппенгейма, який **відрізняється** тим, що на першому етапі до 0,2 мл суспензії дендритних клітин поступово краплями додають 0,5 мл 96° етилового спирту, на другому етапі готують мазок з цієї суспензії на обробленому полі-L-лізином або бичачим сироватковим альбуміном предметному склі і на останньому етапі здійснюють фарбування за модифікованим методом Паппенгейма, причому модифікація полягає у тому, що на мазок наносять робочий розчин готової фарби Романовського-Гімзи на 2 хвилини.

Винахід відноситься до медицини, зокрема до морфології і може бути використаний для візуалізації та ідентифікації дендритних клітин в процесі виготовлення специфічної протипухлинної вакцини на основі цих клітин.

Відомий спосіб цитологічних досліджень дендритних клітин методом фазово-контрастної мікроскопії [1, 2]. Однак при цій методиці морфологічні особливості дендритних клітин виявляються не в повному обсязі, а нативні цитологічні препарати збереженню не підлягають.

Одним із способів морфологічного дослідження дендритних клітин є імуногістохімічний метод [2], який дозволяє ідентифікувати дендритні клітини, однак їх морфологічні властивості при цьому не визначаються. Крім того, цей спосіб потребує використання дорогих реактивів.

Прототипом запропонованого винаходу є відомий спосіб приготування цитологічного препарату, пофарбованого за методом Паппенгейма [Петрова А.С., Полонская Н.Ю., Богатырев В.Н. Использование морфологических методов исследования в клинической цитологии // Клиническая лабораторная аналитика / Под ред. В.В.Меньшикова. - Т. П. - М.: "Лабинформ"-РАМЛД, 1999. - С. 108], який включає нанесення дослідженого матеріалу на чисте предметне скло, висушування отриманих мазків на повітрі та фарбування, яке здійснюється наступним чином: спочатку на мазок наливають фарбу-фіксатор Май-

Грюнвальда на 3 хвилини, потім додають таку ж кількість дистильованої води, через 1 хвилину фарбу зливають і наливають робочий розчин готової фарби Романовського-Гімзи (при рН 6,8) на термін від 5 до 25 хвилин в залежності від клітинного матеріалу.

Перевагою згаданого способу є простота і зручність приготування цитологічних препаратів, відсутність додаткової фіксації клітинного матеріалу.

Недоліком прототипу є ускладнена візуалізація дендритних клітин в зв'язку з тим, що ці клітинні елементи не характеризуються адгезивними властивостями і при класичній фіксації і фарбуванні за Паппенгеймом або не визначаються, або виявляються з вираженими дистрофічними змінами у вигляді ядер-тіней.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб приготування цитологічних препаратів дендритних клітин шляхом додаткової фіксації і підготовки предметного скла та використання оптимального методу і часу фарбування, що дає можливість візуалізувати дендритні клітини і вивчати їх морфофункціональні і цитологічні особливості.

Вирішення поставленої задачі приготування цитологічних препаратів дендритних клітин включає три етапи.

На першому етапі до 0,2мл суспензії дендритних клітин поступово додають краплями 0,5мл 96° етилового спирту. Для запобігання злипанню

(13) C2

(11) 76372

(19) UA

клітин суспензія постійно піпетується за допомогою піпетки об'ємом на 1,0мл. При цьому співвідношення клітинної суспензії і спирту дорівнює 1:2,5. Для отримання якісного цитологічного препарату клітинна суспензія повинна містити дендритні клітини у кількості $1-2 \times 10^6$ в 1мл. Підрахунок числа дендритних клітин здійснюється в камері Горяєва.

Другий етап приготування цитологічного препарату дендритних клітин включає нанесення шару дендритних клітин із суспензії з фіксуємим розчином на підготовлене предметне скло з наступним висушуванням на повітрі. Підготовка предметних скелець заключається в нанесенні на них шару полі-L-лізину або бичого сироваткового альбуміну. Зазначеного об'єму суспензії дендритних клітин достатньо для виготовлення одного цитологічного препарату.

На третьому етапі приготування цитологічного препарату зафіксовані таким чином дендритні клітини фарбують за методом Паппенгейма: спочатку мазок фарбують фарбою-фіксатором Май-Грюнвальда 3 хвилини, потім додають таку ж кількість дистильованої води, через 1 хвилину фарбу зливають і наливають робочий розчин готової фарби Романовського-Гімзи (при pH 6,8), при цьому експериментальним підбором визначено, що оптимальним часом фарбування останньою фарбою є 2 хвилини.

Таким чином, при використанні запропонованого винаходу забезпечується фіксація дендритних клітин до предметного скла, яка зберігає їх морфологічну структуру, а дотримання оптимальної методики і часу фарбування дозволяє візуалізувати дендритні клітини і вивчати їх цитоморфологічні властивості.

Переконалим доказом ефективності застосування запропонованого способу є два приклади цитологічних досліджень дендритних клітин:

I. Цитологічне дослідження дендритних клітин, одержаних з селезінки мишей.

Для виділення дендритних клітин з селезінки інтактних мишей ліній CBA та C57BL/6 подрібнюють препаровані селезінки мишей в середовищі RPMI 1640 (фірми "Sigma") та фільтрують крізь нейлоновий фільтр для отримання однорідної клітинної маси. Клітини в концентрації 5×10^6 на 1мл середовища RPMI 1640 інкубують при 37°C та 5% CO₂ терміном 24 години в повному середовищі RPMI 1640 з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки, 200ммоль/л глютаміну, 100од/мл пеніциліну, 100мкг/мл стрептоміцину та 25ммоль 5-меркаптоетанолу. Потім до отриманої суспензії культивованих клітин в кількості 5мл додають 2мл 14,5% метризаміду і центрифугують 15 хвилин при 1000об/хв, що дозволяє відсепарувати дендритні клітини на поверхні цієї речовини, а інші клітини осідають на дно пробірки. Отримані дендритні клітини відмивають розчином Рінгера шляхом центрифугування терміном 5 хвилин при 1000об/хв. Суспензію дендритних клітин розводять розчином Рінгера до концентрації $1-2 \times 10^6$ /мл і готують їх цитологічні препарати.

Для виготовлення одного мазка до 0,2мл суспензії дендритних клітин поступово додають краплями 0,5мл 96° етилового спирту. Для

запобігання злипанню клітин суспензія постійно піпетується за допомогою піпетки об'ємом на 1,0мл. Потім наносять шар дендритних клітин із суспензії з фіксуємим розчином на підготовлене за допомогою полі-L-лізину або бичого сироваткового альбуміну предметне скло з наступним висушуванням клітинного матеріалу на повітрі. Зафіксовані дендритні клітини фарбують за методом Паппенгейма: спочатку мазок фарбують фарбою-фіксатором Май-Грюнвальда 3 хвилини, потім додають таку ж кількість дистильованої води, через 1 хвилину фарбу зливають і наливають робочий розчин готової фарби Романовського-Гімзи (при pH 6,8) на 2 хвилини. За підготовленими таким чином цитологічними препаратами дендритних клітин проводять мікроскопічне дослідження при збільшенні x400 та в імерсійній системі при збільшенні x1000.

В цитограмах дендритних клітин, одержаних з селезінки мишей, виявляється велика кількість дрібних округлих клітин, розташованих порізно, в групах та пластах (Фіг.1). Вони мають тонку, без чітких контурів слабобазофільну цитоплазму з відростками, які радіально відходять від ядерної оболонки, конденсуються в перинуклеарній зоні і розріджуються в напрямку до краю цитоплазми. В цитоплазмі виявляється невелика кількість дрібних і середніх вакуолей. Кожна клітина містить по одному гіперхромному округлому ядру з нерівним контуром оболонки, з рівномірною компактною структурою хроматину, ядерця не виявляються. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення становить приблизно 1:1,5.

II. Цитологічне дослідження дендритних клітин, одержаних з периферичної крові хворих на рак яєчників і меланому.

Для виділення дендритних клітин з периферичної крові хворих на рак яєчників і меланому у хворих при задовільних клініко-лабораторних показниках забирається 50мл периферичної крові у стерильний флакон ємністю 250мл з додаванням 25Од/мл гепарину ("Біохемі"). Потім кров відстоюють терміном 40 хвилин при 20-22°C для відсепарування лейкоцитарної маси з плазмою від еритроцитарної маси. Для виділення лейкоцитарної маси від плазми отриману рідину центрифугують 10 хвилин при 1500об/хв. Потім до 5мл лейкоцитарної маси додають 2мл фікола і знову центрифугують, при цьому від лейкоцитарної маси відсепаровуються мононуклеари. Ці клітини поміщають в середовище культивування (середовище RPMI 1640, фірми "Sigma" з 2мМ L-Gly, 100мкг/мл стрептоміцину та 100од/мл пеніциліну) та інкубують в пластиковому флаконі T25 при 37°C та 5% CO₂ терміном 2-3 години і таким чином отримують генерацію моноцитів і лімфоцитів. Лімфоцити змивають попередньо прогрітим середовищем культивування, а моноцити завдяки адгезивним властивостям залишаються на чашці Петрі. Потім до моноцитів додають середовище культивування та 1% аутологічної (відсепарованої раніше) плазми і 100 пг на 1мл цього середовища ростового фактору ГМ-КСФ ("Leucomax" "Novartis" / "Schering-Plough"). Моноцити культивують при 37°C та 5% CO₂ терміном 6 днів і отримують дендритні клітини. Ці клітини

відмивають розчином Рінгера шляхом центрифугування терміном 5 хвилин при 1000об/хв. Суспензію дендритних клітин розводять розчином Рінгера до концентрації $1-2 \times 10^6$ /мл і готують їх цитологічні препарати.

Для виготовлення одного мазка до 0,2мл суспензії дендритних клітин поступово додають краплями 0,5мл 96° етилового спирту. Для запобігання злипання клітин суспензія постійно піпетується за допомогою піпетки об'ємом на 1,0 мл. Потім наносять шар дендритних клітин із суспензії з фіксуємим розчином на підготовлене за допомогою полі-L-лізину або бичого сироваткового альбуміну предметне скло з наступним висушуванням клітинного матеріалу на повітрі. Зафіксовані дендритні клітини фарбують за методом Паппенгейма: спочатку мазок фарбують фарбою-фіксатором Май-Грюнвальда 3 хвилини, потім додають таку ж кількість дистильованої води, через 1 хвилину фарбу зливають і наливають робочий розчин готової фарби Романовського-Гімзи (при pH 6,8) на 2 хвилини. За підготовленими таким чином цитологічними препаратами дендритних клітин проводять мікроскопічне дослідження при збільшенні $\times 400$ та в імерсійній системі при збільшенні $\times 1000$.

В цитограмах дендритних клітин, одержаних з периферичної крові хворих на рак яєчників і меланому, виявляються дрібні округлі клітини різного ступеня зрілості, розташовані порізно, в групах, скупченнях і пластах (Фіг.2). Вони мають різну цитоплазму, в залежності від ступеня зрілості дендритних клітин, - від вузького її обручка з невели-

кою кількістю коротких тонких радіальних інтенсивнобазофільних відростків і окремими довгими відростками, до розвинутої слабобазофільної цитоплазми з чисельними довгими тонкими радіальними відростками та поодинокі округлі гіперхромні ядра з рівномірною компактною структурою хроматину, ядерця не виявляються. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення складає приблизно від 1:1,5 до 1:6.

Пояснення до графічних матеріалів винаходу:

Фіг.1. Дендритні клітини, одержані з селезінки тварин. Цитологічний препарат. Фарбування за методом Паппенгейма, $\times 1000$.

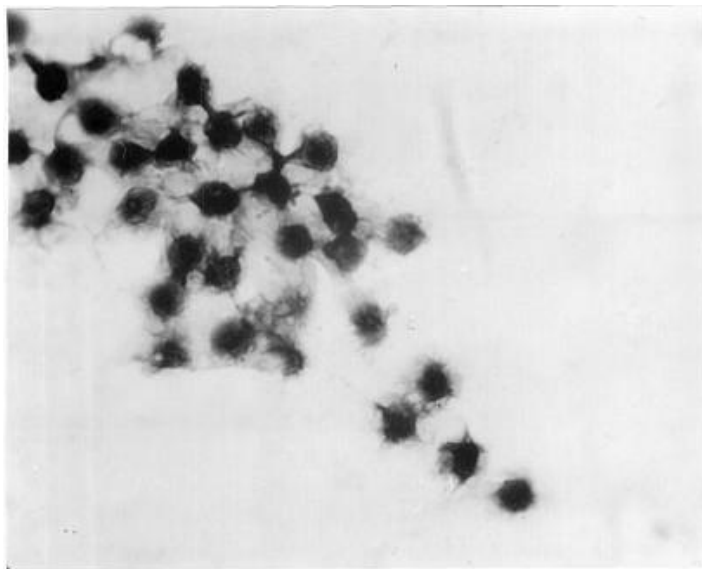
Фіг.2. Дендритні клітини, одержані з периферичної крові хворих на рак яєчників. Цитологічний препарат. Фарбування за методом Паппенгейма, $\times 1000$.

Джерела інформації:

1. Гантиевская Ю.А., Селявко В. В. Дендритные клетки: роль в системе иммунитета // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2001. - №4. - С.5-23.

2. Макаренкова В.П., Кост Н.В., Щурин М.Р. Система дендритных клеток: роль в индукции иммунитета и в патогенезе инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний // Иммунология. - 2002. - №2. - С.68-76.

3. Петрова А.С., Полонская Н.Ю., Богатырев В.Н. Использование морфологических методов исследования в клинической цитологии // Клиническая лабораторная аналитика / Под ред. В.В.Меньшикова. - Т. П. -М.: "Лабинформ"-РАМЛД, 1999. - С. 108 (прототип).



Фіг. 1

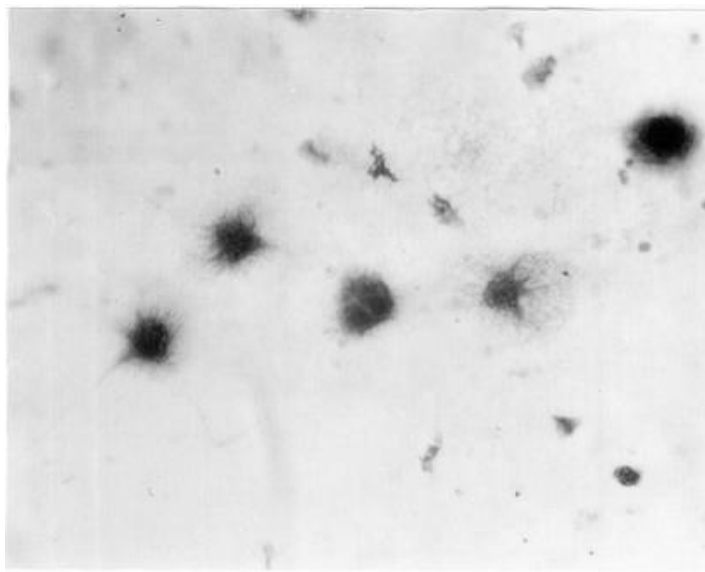


Fig. 2