

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ (19) BY (11) 21593



(13) C1

(46) 2018.02.28

(51) МПК

G 01N 1/28 (2006.01)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ

(54)

## СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

(21) Номер заявки: а 20150129

(22) 2015.03.09

(43) 2016.10.30

(71) Заявитель: Кузнецов Олег Евгеньевич (BY)

(72) Автор: Кузнецов Олег Евгеньевич (BY)

(73) Патентообладатель: Кузнецов Олег Евгеньевич (BY)

(56) RU 2172138 С2, 2001,  
ПОЛЕТАЕВА О.А. и др. Справочник заведующего КДЛ. - 2014. - № 7. - С. 37-44.

КРЮКОВА В.А. Справочник заведующего КДЛ. - 2008. - № 9. - С. 11-16.

КРЮКОВА В.А. Справочник заведующего КДЛ. - 2009. - № 5. - С. 35-39.

(57)

Способ приготовления препарата для цитологического исследования, заключающийся в том, что исследуемый биологический материал перемешивают с физиологическим раствором или раствором Хэнкса, содержащим антикоагулянт, 1-2 раза отстаивают в течение 2-3 мин, образовавшийся надосадочный слой центрифицируют при 3000 об/мин в течение 5-7 мин, полученную клеточную взвесь разводят до концентрации ядроодержащих клеточных элементов 50-300 тыс/мл, наносят на предметное стекло и сушат на воздухе.

Изобретение относится к области медицины, а именно к клинической лабораторной диагностике, и может быть использовано для цитологической диагностики опухолевых и неопухолевых заболеваний человека.

При ряде заболеваний, особенно онкологических, цитологические исследования биологических жидкостей, пунктатов (лимфатических узлов, костного мозга, органов), исследование клеточного состава мочи, ликвора, транссудатов, экссудатов и др. жидкостей являются важными критериями для постановки диагноза и представляют единственную возможность получить морфологическую картину (клеточный состав) биологического образца при патологическом процессе. Морфологический субстрат для исследования - клетка.

Этапы приготовления цитологического препарата (световая микроскопия): подготовка предметного стекла, взятие исследуемого материала (образца), приготовление препарата (нанесение исследуемого материала), высушивание, фиксация и окрашивание.

Если качество подготовки предметных стекол легко проверить, а лучше всего, что является идеальным, использование одноразового предметного стекла, то второй этап - непосредственное приготовление препарата - зависит от способа нанесения исследуемого материала на стекло (мазок с помощью цитошетки, урогенитального зонда, шлифованного стекла или методом отпечатка). Недостатками данных этапов приготовления и соответст-

BY 21593 C1 2018.02.28

венно последующей погрешности при оценке свойств материала являются отсутствие какого-либо контроля приготовления препарата (нет возможности проконтролировать наличие клеточных элементов в исследуемом образце материала на этапе приготовления препарата) и качество образца на предметном стекле (зависит от цитоштеток, зондов, усилий специалиста при нанесении образца на стекло). Следствием данных манипуляций является высокий удельный вес неинформативных цитологических препаратов (17-35 %) и, как следствие, рост затрат на исследование, невыявление возможной патологии.

Наиболее близким к предлагаемому является способ приготовления цитологического препарата, включающий нанесение исследуемого материала на подготовленное предметное стекло [1]. На сухое подготовленное предметное стекло, находящееся в горизонтальном положении, капилляром наносят каплю исследуемого материала (крови, пунктата или осадка биологической жидкости, полученного центрифугированием) и размазывают ее по стеклу с помощью чистого шлифованного стеклышка, помещая его под углом 45° (подождав, пока вся капля растечется по короткому ребру стеклышка, быстро проводят им по поверхности предметного стекла) или цитоштеткой/ложечкой Фолькмана наносят на предметное стекло и размазывают до получения мазка. Полученные таким образом мазки высушивают на воздухе, маркируют, фиксируют и окрашивают унифицированными способами.

Данный способ приготовления цитологического препарата очень часто не удовлетворяет требованиям качества, а именно: при световой микроскопии возникают трудности в морфологической интерпретации клеточных элементов из-за их деформации клеточных элементов в толстых участках препарата, где клетки плохо идентифицировать, частичного разрушения, особенно после центрифугирования, нестойких клеточных форм и в связи с меняющимися тинкториальными свойствами самих клеток в зависимости от плотности их микроокружения pH поверхности предметного стекла и pH среды, в которой клетки находились в естественных условиях, клеточные элементы оказываются наслойные друг на друга, перекрещенными. В зависимости от исследуемого материала от 10 до 25 % препаратов содержат только лишь разрушенные клетки, и еще в 7-15 % приготовленных образцов обнаруживают примесь крови и разрозненные клетки, по которым трудно судить о характере патологического процесса. В мазках, приготовленных из биологических жидкостей с малым количеством клеточных элементов (например, ликвор), изучение клеточного состава с дифференцированным подсчетом клеток оказывается практически невозможным (в препарате обнаруживаются только единичные клетки, большое количество разрушенных клеток). Стоит учесть, что в разных биологических жидкостях клетки несут различные физико-химические, в частности тинкториальные, характеристики, которые следует учитывать при приготовлении препарата и последующей окраске структуры. При данном способе приготовления цитологических препаратов до 40-50 % вынесенных в результате анализа заключений несут противоречивые суждения, не содержат необходимой информации и требуют повторного анализа.

Задача изобретения - разработка эффективного и информативного способа приготовления цитологического препарата с сохранением себестоимости анализа.

Поставленная задача решается путем перемешивания исследуемого биологического материала с физиологическим раствором или раствором Хэнкса, содержащим антикоагулянт, отстаивания 1-2 раза в течение 2-3 мин, после чего образовавшийся надосадочный слой центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5-7 мин, полученную клеточную взвесь разводят до концентрации ядроодержащих клеточных элементов 50-300 тыс/мл, наносят на предметное стекло и сушат на воздухе.

Способ осуществляют следующим образом. Взятый для исследования материал помещают в пробирку (мерную) с 5 мл жидкой среды (физиологический раствор, раствор Хэнкса), в которую добавлен антикоагулянт в соотношении 9 объемов среды на 1 объем антикоагулянта (3,8 %-ный цитрат натрия). Предварительной подготовке по данному спо-

собу подвергаются любые образцы, полученные путем пункции (лимфатический узел, молочная железа, костный мозг и др.), а также биологические жидкости, биоптаты, смывы и соскобы с поверхностей ран, со слизистых внутренних органов (бронхов, желудка, влагалища), секреты. Если при взятии образца получено малое (скучное) количество материала, то мандрен, которым производилась манипуляция, промывают в среде, возвращая смыв. Содержимое пробирки перемешивают (переворачивание 2-3 раза), в течение 3 мин отстаивают и переливают в другую мерную пробирку таким образом, чтобы более или менее крупные частицы остались на стенках первой пробирки. Крупные фрагменты образца (биоптаты, содержимое кист/полостей) после помещения в пробирку со средой энергично встряхивают, крупные комочки раздавливают с помощью стеклянной палочки, также в течение 2-3 мин отстаивают и переливают в другую мерную пробирку, оставляя крупные частицы ткани в первой пробирке. Выпоты и другие биологические жидкости, полученные в большом количестве, разливают в пробирку в объеме 5 мл со средой и антикоагулянтом. Если доставленный материал содержит много примесей (кристаллы, хлопья, некротические массы, тканевые комочки), проводят 2-кратное 2-3-минутное отстаивание с переносом надосадочного слоя в свежие порции жидкой среды. По завершению процедуры отмывания каждую пробу доводят до объема 7 мл добавлением свежей порции жидкой среды, тщательно перемешивают и центрифицируют в течение 5-7 мин при 3000 об/мин для удаления крупных частиц с последующими разведениями отобранный клеточной взвеси в свежих порциях жидкой среды до 50-300 тыс/мл ядроодержащих клеточных элементов.

На данном этапе в камере Горяева производят контрольный подсчет содержания клеток в полученной клеточной взвеси (до 5 % образцов от всего объема исследуемых) методом подсчета клеточных элементов в камере Горяева [2] с тем, чтобы определить степень клеточного разведения для приготовления качественных препаратов. Оптимальной концентрацией ядроодержащих клеток для приготовления 1 препарата является 50-300 тыс. в 1 мл. При меньшей концентрации получится малоклеточный цитологический препарат. Данная процедура осуществляет проверку качества выполнения преаналитического и аналитического этапов лабораторного исследования и является внутрилабораторной системой контроля качества. Чего на сегодняшний день лишены цитологические исследования на данных этапах: контроль качества данных этапов на сегодняшний день не выполняется и не контролируется.

Количество препаратов, которое можно приготовить из исходной клеточной взвеси, определяется концентрацией клеточных элементов. Среднее количество препаратов варьирует от 2 до 5. Если доставленный материал содержит значительную примесь крови, то конечную концентрацию пробы, отобранный для приготовления препарата, рассчитывают, исходя из содержания в ней эритроцитов (так называемый "истинный цитоз"). Концентрация эритроцитов от 1 до 2 млн/мл в препарате не способствует сдавлению, деформации ядроодержащих клеточных элементов и исключает неадекватную интерпретацию.

Каждую рабочую пробу клеточной взвеси с содержащимися клеточными элементами помещают на предметное стекло (диаметром 1,0-1,5 см<sup>2</sup>), предназначенное для спонтанного осаждения клеток до полного высыхания препарата на воздухе, затем маркируют, фиксируют и окрашивают в соответствии с унифицированной технологией.

Окрашенные препараты просматривают сначала под малым увеличением микроскопа, оценивают качество, отмечают характер клеток в препарате, фиксируют клеточные скопления и конгломераты, которые затем анализируют под увеличением с иммерсионной системой. Производят дифференцированный подсчет и анализ минимум 100-500 клеток, учитывая изолированные расположенные клетки и клеточные скопления. Ответ выдается в форме цитограммы - дифференцированного распределения клеток в процентном отношении, описательной характеристики особенностей клеточных элементов (с точки зрения диагностического значения), цитологического заключения о патологическом процессе.

## BY 21593 С1 2018.02.28

Для доказательства возможности осуществления способа были проведены цитологические исследования у 103 пациентов. Получены цитологические препараты, приготовленные предлагаемым способом и удовлетворяющие требованиям качества: подсчитана цитограмма, выполнено описательное заключение цитологической картины. Сравнение производилось с цитологическими заключениями, выполненными традиционно.

При анализе результатов обследования у 55,3 % (57 пациентов) из всех обследованных пациентов был выставлен диагноз. Это были пациенты со злокачественным характером новообразований различной локализации и метастазами (раки, adenокарциномы и др.) - пациенты с цитологически и гистологически доказанным опухолевым процессом. В остальных случаях (46 пациентов, 44,7 %) из всех вынесено лишь ориентировочное цитологическое заключение, поскольку факт наличия опухолевых клеток (без признаков полиморфизма, скучный материал, неинформативных препарат) не позволил дать заключение о патологическом процессе (традиционно используемый метод). При выполнении гистологического исследования у данной категории пациентов были получены заключения об опухолевой природе заболевания (ведущая роль всегда принадлежит гистологическому исследованию). При выполнении у данной категории пациентов цитологического метода исследования по предложенной методике 18 пациентам из 46 было дано заключение о патологическом процессе опухолевой природы. В общей сложности у 75 пациентов (72,8 %) было выполнено описание опухолевой природы клеточных элементов уже на этапе цитологического анализа, что в последующем подтверждено гистологическим заключением микроперепарата ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, предлагаемый способ приготовления препарата для цитологического исследования дает возможность получить качественные цитологические препараты (максимальное однослоиное распределение клеток, отсутствует слизь, клеточный детрит и другие примеси, мешающие анализу); достигнуть оптимальной для микроскопии концентрации клеток на ограниченной площади (10-15 мм) с повышением достоверности идентификации клеточных элементов; использовать стандартные (унифицированные) методы цитологической окраски препаратов, независимо от источника получения материала; обеспечить проведение оценки клеток в малоклеточных биологических жидкостях и обеспечить приготовление препаратов из плотной ткани (преимущество перед методом отпечатков); обеспечить возможность контроля этапа приготовления цитологического препарата, что позволяет уже на этапе пробоподготовки вынести вердикт об информативности доставленного биологического образца с целью экономии средств на проведение последующей окраски препарата и работы врача; обеспечить возможность изучать клетки при незначительном примеси крови; освободить от процедуры приготовления мазков врача-клинициста, производящего манипуляция (требует специальных навыков); получить необходимое количество препаратов, предназначенных для цитологического анализа и дополнительных методов цитохимического исследования.

### Источники информации:

1. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. проф. В.В.Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. - С. 99, 101, 111.
2. Методы клинических лабораторных исследований / Под ред. проф. В.С.Камышникова. - М., 2009. - С. 79-81.

Национальный центр интеллектуальной собственности.  
220034, г. Минск, ул. Козлова, 20.

Репозиторий ГГМУ