

Преаналитические технологии в современных цитологических исследованиях

В.А. Крюкова

*ведущий эксперт Отдела преаналитики
и клинической биохимии ООО “ОМБ”*

В настоящее время произошло существенное расширение значения цитологических исследований в клинической практике, в большой степени обусловленное использованием новых технологий. Современные методы взятия и подготовки проб позволили расширить спектр биоматериалов для выполнения исследований. Наряду с традиционными цитологическими исследованиями на базе оптической микроскопии в настоящее время активно применяются автоматизированные цитологические системы, использующие новые методы детекции изображения. Эффективность цитологического исследования, заключение которого является основанием для разработки тактики лечения, находится в большой зависимости от качества приготовления цитологического препарата.

Развитие современной цитологии определило создание новых технологий на преаналитическом этапе:

- ~ методы “жидкостной цитологии” (Liquid based cytology) (ЖЦ) для клеточных суспензий, полученных из соскобов, отпечатков, традиционных пунктатов, препаратов тонкоигольной биопсии, жидких биоматериалов, субпопуляций клеток крови, концентратов из разного типа жидкостей, получаемых при диагностике и лечении пациента;
- ~ методы быстрой фиксации клеток на разных типах слайд*-препаратов (прямая фиксация на стекле) и клеток в суспензии жидкого цитологического препарата (предварительная фиксация “в объеме” – Liquid suspension fixation);
- ~ методы очищения и разделения жидких клеточных проб при использовании градиентного и фильтрационного центрифугирования;
- ~ методы обработки суспензии до нанесения клеток на слайд (дифференциальный лизис отдельных типов клеток, депротенинизация и очищение раствора от фрагментов клеток, отмывка клеток, коррекция концентрации клеток в конечном препарате, выделение отдельных популяций клеток методом цитофлуориметрии, окраска цитоплазмы и ядер клеток, введение флуоресцентных или люминесцентных меток и зондов);
- ~ методы нанесения клеточного материала на слайд с получением высококачественного тонкослойного препарата для микроскопии и смежных областей (автоматические фильтрационные закрытые технологии и цитоцентрифугирование);
- ~ методы автоматической поэтапной окраски и обработки нанесенных на слайд клеточных препаратов;
- ~ специальные технологии (гибридизация, отмывка и введение флуоресцентной метки при FISH-диагностике (флуоресцентной гибридации для диаг-

* Предметное стекло (микроскопа), *англ.*

ностики фрагментарных мутаций генома), инициация митоза для цитогенетических исследований, предварительное культивирование выделенных клеток в препарате на специальном оборудовании).

Современные технологии на преаналитическом этапе также позволяют проводить дополнительные исследования:

- ~ цитогенетические исследования хромосом при стимуляции митозов клеток непосредственно в цитологическом препарате;
- ~ прямое иммунохимическое определение вирусов в клетках;
- ~ функциональное морфологическое исследование клеток иммунной системы с введением флуоресцентных и люминесцентных зондов, в т. ч. при искусственной активации иммунокомпетентных клеток;
- ~ лекарственный мониторинг с использованием мембранных и внутриклеточных зондов;
- ~ диагностические исследования патологических изменений отдельных типов клеток, выполняемые при помощи микроскопического анализа *in situ* в сочетании с предварительным выделением нужной популяции методом проточной цитофлуоретрии или культивированием клеток на специальных системах и слайдах;
- ~ молекулярно-генетические исследования на основе FISH-технологий.

Проба, подготовленная методом ЖЦ, также может быть использована в комплексных клинико-диагностических исследованиях. Аликвотирование пробы для других тестов (биохимия, иммунохимия, молекулярно-генетические исследования, бактериология и др.) может быть проведено закрытым способом в пробирке при помощи современных вакуумных технологий.

Жидкостная цитология (Liquid based cytology)

Основным путем повышения достоверности цитологического метода исследования является использование метода “жидкостной цитологии” (ЖЦ). Для получения высококачественных цитологических препаратов используется жидкостная цитологическая система. Клеточную популяцию из биоматериалов разного типа вносят в специальный контейнер с транспортным раствором, который “консервирует” собранный клеточный материал, препятствует повреждению клеток, позволяет избежать бактериального загрязнения и позволяет в оптимальных условиях доставить собранные клетки в лабораторию. Помимо этого материал, полученный методом ЖЦ, устойчив к колебаниям температуры, его можно хранить в течение нескольких месяцев и использовать для проведения дополнительных или контрольных исследований.

Современные технологии ЖЦ позволяют получать тонкослойные клеточные препараты высокого качества из широкого спектра биоматериалов. После взятия биоматериала проводят его обработку, выполняя несколько операций: смывание клеток с инструмента и получение суспензии клеток в специальной среде со стабилизацией морфофункционального состояния клеток, консервацией пробы, денатурацией белка, удалением слизистых субстанций, частичным разрушением межклеточных связей, лизисом эритроцитов и фиксацией “в объеме”. Далее следуют операции для оптимизации расположения клеток на стекле (концентрирование или разведение).

метки и зонды могут быть внесены как в фиксированные, так и в нефиксированные препараты в зависимости от цели исследования. Могут быть также применены специальные методы обработки слайдов (методы цитогенетики, стимуляции изменения функционального состояния клеток, FISH-анализа, культуральные методы).

Преимущества жидкостной цитологии:

- ~ повышение эффективности цитологических исследований;
- ~ доступность для исследования большей части клеток популяции взятого биоматериала;
- ~ получение достаточной плотности клеток на слайде даже при их низкой исходной концентрации;
- ~ все виды исследований для любых жидких и концентрированных (пунктаты, мазки, клеточные колонии клеток) биоматериалов;
- ~ высокое качество изготовления препаратов за счет дополнительной пробоподготовки (гемолиз эритроцитов, денатурация белка, разрушение слизи и т. д.);
- ~ автоматизация на преаналитическом и аналитическом этапах;
- ~ регулировка плотности клеток в препарате путем коррекции их концентрации в суспензии и выбора режима изготовления препарата;
- ~ фиксация клеток непосредственно в суспензии и длительное хранение таких проб для контрольных и повторных исследований;
- ~ расположение клеточного материала на определенном месте слайда (в т. ч. многоканальное), что улучшает возможности маркировки препарата, повышает скорость и качество аналитической стадии цитологического исследования;
- ~ использование проб ЖЦ и других видов лабораторных исследований (комплексное исследование биоматериала) или проведение специальных видов исследований для более точной диагностики.

**Технологии нанесения клеток на слайд-препарат
в жидкостной цитологии**

В настоящее время разработаны три типа технологий изготовления цитологических тонкослойных слайд-препаратов. Каждая технология имеет свои модификации, отличающиеся используемыми реактивами, уровнем автоматизации и назначением для ручного или автоматического анализа.

1. Технология ThinPrep (Cytoc Corporation) – закрытая автоматическая система для гинекологического PAP-скрининга, исследования некоторых типов биожидкостей, препаратов, полученных при помощи тонкоигольной аспирационной биопсии (ТИАБ), и молекулярно-генетических исследований.

Этапы технологии ThinPrep: 1. Получение пробы в жидкой форме (биожидкости) или при смыве со специальной щетки или шпателя с использованием специального контейнера, который содержит фиксирующий клетки транспортный раствор. 2. Автоматическое перемешивание, вакуумная фильтрация, концентрация клеток на фильтре, аппликация клеток в определенную зону специального слайда и окраска по Папаниколау (все операции проводятся внутри специального устройства по закрытой технологии). 3. Автоматический или ручной анализ препарата.

Особенности технологии ThinPrep: а) обязательная фиксация клеток в растворе PreservCyt; б) специальная патентованная фильтрационная технология изго-

товления слайда с последующей окраской непосредственно в специальном приборе; в) возможность использования только контейнеров, слайдов, растворов и реагентов этого производителя.

2. Технология SurePath™ (Bekton Dickinson) – полуавтоматизированная закрытая система для гинекологического PAP-скрининга и исследования некоторых других биожидкостей.

Этапы технологии SurePath: 1. Получение пробы в жидкой форме (биожидкости) или при смыве со специальной щетки или шпателя с использованием специального контейнера, который содержит фиксирующий клетки транспортный раствор. 2. Перемешивание. 3. Автоматическое дозирование жидкой пробы в пробирки со специальным раствором для градиентного центрифугирования. 4. Очищение и концентрирование исследуемых клеток центрифугированием в градиентном растворе. 5. Аликвотирование клеточного осадка, его разведение, перемешивание. 6. Дозирование клеточной суспензии в цитокамеру, которая закреплена вертикально на специальном слайде. 7. Инкубация для проведения пассивной седиментации (осаждение) в ограниченную просветом цитокамеры зону слайда. 8. Окраска по Папаниколау. 9. Автоматический или ручной анализ препарата.

Особенности технологии SurePath™: а) обязательная фиксация клеток в транспортном растворе SurePath™; б) необходимость специального прибора-дозатора на стадии подготовки к градиентному центрифугированию; в) градиентное центрифугирование для отделения исследуемых клеток от мешающих анализу примесей; г) необходимость специального прибора для дозирования, пассивной седиментации клеток на слайд и окраски препарата; д) возможность использования расходных материалов (растворы, контейнеры, слайды) только этого производителя.

3. Технологии цитоцентрифугирования – Cyto System (Andreas Hettich GmbH) и CytoSpin (Thermo Shandon Inc) – открытые технологии, основой которых является нанесение тонкослойного клеточного препарата на слайд из пробы, полученной при использовании ЖЦ во время горизонтального центрифугирования в системах специальной конструкции, где цитокамеры герметично соединены с поверхностью слайдов. Процесс осаждения клеток на слайд под действием центробежной силы происходит аналогично процессу в центрифужной пробирке. Технология CytoSpin реализуется при использовании специальной цитоцентрифуги, которая имеет ограниченный ряд моделей цитокамер сложной конструкции. Технология Cyto System осуществляется на универсальных лабораторных центрифугах разной производительности при помощи многофункциональных или специализированных роторов. Обе системы включают в себя варианты цитокамер, предназначенных для различных объемов и концентрации проб, и могут иметь несколько рабочих каналов для создания от 2 до 8 рабочих зон на одном препарате.

Этапы технологии цитоцентрифугирования (ЦЦ) (рис. 2): 1. Получение пробы. 2. Перемешивание пробы. 3. Проведение дополнительных операций по улучшению качества цитологического препарата непосредственно в цитокамере (отмывка и осветление клеточных суспензий, лизис эритроцитов, разделительное центрифугирование в градиентном растворе, коррекция концентрации клеток). 4. Дозирование пробы в герметичную систему из цитокамеры и слайда. 5. Горизонтальное цен-

трифугирование с осаждением клеточных элементов на слайд и получением препаратов для фиксации и окраски (возможна фиксация и окраска слайдов непосредственно в цитокамере). 6. Высушивание препарата в специальной подвеске центрифуги за счет эффективной системы вентиляции, возникающей при вращении ротора. 7. Автоматический или ручной анализ.

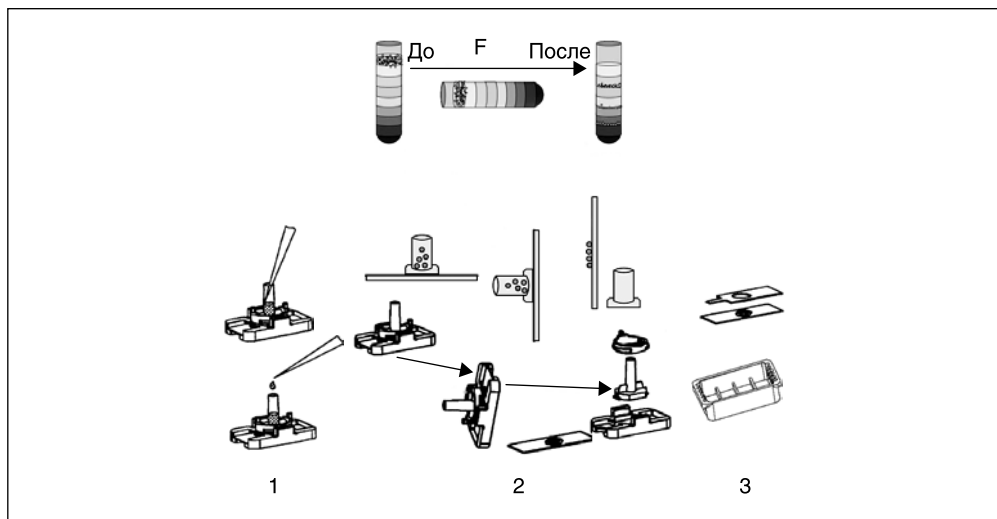


Рис. 2. Горизонтальное центрифугирование

1. Операции с клеточными суспензиями (отмывка, концентрирование, разведение)
2. Получение слайд-препарата при центрифугировании в горизонтальном роторе
3. Высушивание при помощи фильтр-вставки и в специальной подвеске центрифуги

Особенности технологии ЦЦ. В системах ЦЦ реализованы все преимущества ЖЦ. Применение этой технологии на преаналитическом этапе возможно в любых областях современной цитологии и комплексных диагностических схемах. Технология ЦЦ может в перспективе стать альтернативой использования закрытых систем на основе жидкостной цитологии с предварительной фиксацией суспензии клеток, так как обеспечивает более гибкий режим, адаптируемый к конкретным методам цитологического исследования на общей методической и технической базе. ЦЦ – открытая технология, обеспечивающая сохранность клеток для исследования и получение высококачественных тонкослойных препаратов на слайдах любого типа и покрытия.

Технология ЦЦ позволяет:

- ~ работать с живыми клетками или осуществлять любые способы их фиксации;
- ~ использовать любые объемы проб и концентрации клеток;
- ~ применять различные методы регулировки плотности клеток на слайде;
- ~ удалять мешающие микроскопии факторы;
- ~ создавать от 1 до 8 зон для исследования на одном слайде;
- ~ регулировать влажность препарата при помощи специальных фильтр-вставок;
- ~ применять любые способы окраски или внесения зондов и иммунохимических маркеров.

(Продолжение следует)