

2.7.23. ПІДРАХУНОК ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН CD34/CD45+

У цій статті наведено кількісне визначення за допомогою імунологічного мічення та подальшого аналізу методом проточної цитометрії (2.7.24) клітин CD34/CD45+, що містяться в гемопоетичних стовбурових клітинах. Визначення проводиться за одноплатформною технологією з використанням калібрувальних флуоросфер, за необхідності, після лізису еритроцитів проби.

Цей метод застосовується для всіх типів препаратів та цільної крові. Однак, ▽ характеристики цього ▽ методу роблять його широко застосовним для препаратів з дуже малим процентним вмістом клітин CD34/CD45+.

Оцінювання якості трансплантата підрахунком клітин CD34/CD45+

У різних дослідженнях було встановлено, що 1-3 % клітин у кістковому мозку, які експресують клітинний поверхневий антиген CD34, здатні відновлювати тривалий мультилінійний гемопоез після мієлобластної терапії. Клітини CD34/CD45+ також виявляли у периферичній крові у нормі, але вкрай рідко (0.01-0.1 %). Однак клітини CD34/CD45+ можна мобілізувати в периферійній кровообіг у великих кількостях з кісткового мозку за допомогою гематопоетичних цитокінів, наприклад таких як гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор, та/або хіміотерапії.

Метод, що використовується для підрахунку клітин CD34/CD45+, має задовольняти такі вимоги:

- висока чутливість, оскільки гемопоетичні стовбурові клітини є рідкісними;
- точність, що дозволяє забезпечувати клінічно істотні результати;
- відтворюваність, щоб забезпечити клінічно достовірні результати;
- швидкість — для забезпечення аналізу в реальному часі.

Вибір параметрів

У кількісному визначенні методом проточної цитометрії використовуються комерційно доступні безпосередньо кон'юговані з флуорохромною міткою моноклональні антитіла, рутинне фарбування та процедури лізису цільної крові, а також стратегія гейтування з використанням аналізу світлорозсіювання та імунофлуоресцентного аналізу з використанням комбінації рап-CD45/CD34 моноклональних антитіл.

Визначати життєздатність клітин CD34/CD45+ можна відповідним полінуклеотидним фарбуванням за допомогою барвника, який не проходить

через мембрану інтактної клітини (наприклад, 7-аміноактиноміцином D).

Вибір моноклональних антитіл

CD34-антитіла. Використовують клас III CD34-антитіл, які виявляють всі варіанти (типи) глікозилування молекули (наприклад, клон 8G12 або 581). Для виявлення рідкісних клітин використовують антитіло, кон'юговане з найяскравішим флуоресціюючим флуорохромом, наприклад фікоеритрином (PE), який збуджується під час використання проточного цитометра на основі аргонного лазера.

CD45-антитіла. Рап-CD45-антитіла, які виявляють всі ізоформи та всі глікоформи даної структури, не потрібні. Зазвичай, використовують CD45-антитіла, кон'юговані з флуорохромом флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC) (наприклад, J33, HLe1, 2 D1).

Ізотиповий або ізоклональний контроль. Негативний контроль аналізують для виявлення будь-якого неспецифічного сигналу в області флуоресценції PE. За умови використання ізотипового контролю (моноклональних антитіл до сторонніх антигенів того ж ізотипу, що й CD34-антитіло, яке використовується), використовують PE-кон'югований ізотип в поєднанні з CD45-FITC (або PerCP). Якщо використовують ізоклональний контроль, некон'юговані (в надлишку) та PE-кон'юговані CD34, ідентичні моноклональним антитілам, комбінують з кон'югованими CD45. Можуть використовуватися альтернативні комбінації.

Абсолютна кількість CD34/CD45+

Калібрувальні флуоросфери. Залежно від методу, який використовується, внутрішній стандарт складаються з каліброваних гранул у суспензії або безпосередньо введені у відповідні пробірки виробником.

Абсолютну концентрацію клітин CD34/CD45+ в мікролітрі обчислюють, використовуючи такий вираз:

$$\frac{A}{B} \times C,$$

де

- A — число підрахованих клітин CD34/CD45+;
- B — число підрахованих синглетів флуоросфер;
- C — відома концентрація флуоросфер.

Стратегії гейтування

Метою секвенційного (послідовного) гейтування є вибір випробовуваної популяції та одночасне зведення до мінімуму заважаючого (фоновий) впливу дебрісу та зрілих клітин, з якими антитіла зв'язані неспецифічно. Якщо для аналізу використовується комерційно доступний набір, застосовують гейтування, рекомендоване виробником. Якщо вико-

ристовують внутрішній метод аналізу, то кращим варіантом буде застосування рекомендованої зараз стратегії. Стратегія гейтування, яка припускає використання параметрів світлорозсіювання та флуоресценції CD34/CD45, сприятиме забезпеченню точності ідентифікації та підрахунку клітин CD34/CD45+.

Кількість аналізованих подій

Необхідно проводити аналіз достатньої кількості подій, щоб підтримувати прийнятний рівень точності \blacktriangledown та достовірності \blacktriangleleft , наприклад не менше 100 подій CD34+ та не менше 60 000 подій CD45+; загальна кількість підрахованих клітин може бути більше, якщо відсотковий вміст клітин CD34 становить 0.1 % або менше.

Забір зразків

Цитрат декстрази А (ACD, цитрат декстрази (формула А), Асд-А) – антикоагулянт, який використовують в процедурах аферезу. Цей антикоагулянт дозволяє виконувати, як автоматичний підрахунок лейкоцитів, так і проточну цитометрію для того самого зразка. Етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) – антикоагулянт, якому необхідно надавати перевагу під час відбору проб периферичної крові.

Транспортування зразків

Умови транспортування мають гарантувати фізичну та термічну безпеку зразків.

Цілісність та зберігання зразків

В аналізі можуть використовуватися продукти аферезу (якщо період зберігання менше 24 год з моменту відбору), зразки цільної крові, препарати пуповинної крові або кісткового мозку. Старі зразки (якщо період зберігання більше 24 год) та зразки після заморожування та розморожування фарбують барвником для визначення життєздатності клітин. В момент надходження (після отримання) контролюють температуру всередині упаковки.

МЕТОД

Підготовка зразка

Переконуються в тому, що концентрація лейкоцитів придатна для фарбування моноклональних антитіл. За необхідності розбавляють пробу (зразок) середовищем, сумісним із випробовуваним продуктом та системою для лізису. Записують кратність (коефіцієнт) розведення. Рекомендується виконувати випробування з негативним контролем.

Проточна цитометрія

Автостандартизація (Внутрішня стандартизація приладу)

Для аналізу мічених клітин за допомогою комерційно доступного набору фірми-виробники розробили деякі інструменти якості для початкових установок (інсталяцій) проточного цитометра. Ці установки автоматично переносяться до протокола аналізу зразків. Використовують специфічні флуоросфери для встановлення цільових значень посилення фотоелектронного помножувача (РМТ), задають параметри компенсації та перевіряють систему, використовуючи контрольний препарат.

Налаштування системи

- Дискримінатор / порогове значення: порогове значення кута розсіювання світла встановлюють таким чином, щоб виключити дебрис (низький діапазон переднього світлорозсіювання), але не малі лімфоцити на діаграмі розсіювання.
- Налаштування високої напруги РМТ: налаштування мають відповідати умовам проведення аналізу з маркером клітинної поверхні та мають встановлюватися в кожній лабораторії таким чином, щоб можна було розрізняти негативні та позитивні клітинні популяції з середньою (помірною) концентрацією (щільністю) антигену; напругу РМТ періодично контролюють та регулюють відповідно до стандартних лабораторних методик.
- Компенсація: компенсація має бути прийнятною для взаємного накладення кольорових спектрів (наприклад, FITC/PE), що є в аналізі з маркером клітинної поверхні; кольорову компенсацію аналізують відповідно до стандартних лабораторних методик.
- Швидкість потоку: швидкість потоку має відповідати вимогам рутинного аналізу з маркером клітинної поверхні.
- Області гейтуванням: області гейтування, встановлені для CD34/CD45-зразків, підтримуються в незмінному вигляді для аналізу негативної області.

Обчислення абсолютної кількості клітин CD34/CD45+

Абсолютну кількість клітин CD34/CD45+ обчислюють, використовуючи такий вираз:

$$n \times D \times V,$$

де

n — загальна кількість клітин CD34/CD45+ в одному мікролітрі;

D — кратність (коефіцієнт) розведення;

V — об'єм аналізованого продукту; в мікролітрах.

Результати підрахунку наводяться у вигляді відсотка клітин CD34/CD45+ та абсолютного числа на мікролітр. Де це можливо, вони також можуть бути

представлені як абсолютне число на кілограм маси
тіла реципієнта.

ПРОЕКТ