

2.7.29. ПІДРАХУНОК ЯДЕРНИХ КЛІТИН ТА ЇХ ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ

▼ 1. ЗАГАЛЬНІ МІРКУВАННЯ

Визначення кількості клітин і якості клітинних суспензій вимагає точних вимірювань як концентрації клітин, так і відсотка життєздатних клітин. Ці дані мають важливе значення для ухвалення рішень відносно способу отримати клітинні лікарські препарати та для підтримки оптимальних умов культивування. Кількість клітин може бути виражена як кількість клітин на об'єм клітинної суспензії, а життєздатність клітин — як відсоток життєздатних клітин від загальної кількості клітин. Для визначення як загальної кількості, так і життєздатності клітин можна використовувати ручні (гемоцитометр) або автоматизовані методи (наприклад, цитометр із зображенням, лічильник частинок, проточний цитометр). Можуть бути використані інші методи, ніж ті, що наведені нижче.

2. ТЕХНІЧНІ МІРКУВАННЯ

2.1. ПРОБОПІДГОТОВКА Й УМОВИ ВИПРОБУВАНЬ

Випробовувані зразки мають бути репрезентативні для випробовуваного матеріалу, придатного об'єму та зберігатися в задалегідь визначених умовах, для запобігання змінам у випробуваннях. Час обробки між відбором зразків і підрахунком клітин має бути якомога коротший, а обробка має бути обмежена лише основними та стандартизованими етапами. Розведення зразка може знадобитися, якщо кількість клітин перевищує робочий діапазон лічильника клітин. Зразки необхідно ретельно перемішати, щоб забезпечити однорідний розподіл клітин перед піпетуванням або автоматизованим забором. Процедура підготовки проб має бути стандартизована, наскільки це можливо. Реактиви, які використовують, мають бути характеризовані, перевірені та задокументовані, щоб задовольняти відповідні критерії якості.

2.2. МЕТОДИ ВИКЛЮЧЕННЯ (ЕКСКЛЮЗІЇ) БАРВНИКІВ

Методи виключення барвника зазвичай базуються на виключенні (ексклюзії) барвника непошкодженою мембраною життєздатних клітин, тоді як проникність мертвої або пошкодженої клітинної мембрани дозволяє поглинати барвник, що призводить до появи забарвлених або флуоресцентних клітин. Ці методи надають інформацію про цілісність клітинної мембрани, але результати не обов'язково відображають функціональність клітини. Нещодавно оброблені трипсином або розморожені життєздатні клітини можуть мати негерметичні мембрани, через що вони поглинають барвник.

У Табл. 2.7.29.-1 наведено деякі приклади барвників, які широко використовують, способи їх дії та способи їх використання.

3. ПІДРАХУНОК КЛІТИН ВРУЧНУ І ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ

3.1. ПІДРАХУНОК КЛІТИН

Опис обладнання та принцип випробувань. Гемоцитометр — спеціалізована лічильна камера для мікроскопа, що може бути представлена в різних моделях. Вона складається з товстого предметного скла та покривного скельця, що встановлюється для розділення камери з об'ємом, специфічним для кожної моделі. Товсте предметне скло різних гемоцитометрів складається з лічильної камери, що розділена глибокими канавками, щоб уникнути перехресного заповнення. Лічильна камера ^Nзакарбована в склі^N та містить сітку, яка специфічна для кожної моделі. Також можна використовувати одноразові пристрої.

Гемоцитометр використовують для кількісного визначення числа клітин у цьому розчині за допомогою світлового мікроскопа за умови збільшення від 10 до 40 разів обчисленням концентрації (C) клітин на мілілітр, використовуючи формулу:

$$a \times 10^n \times d,$$

де a = кількість підрахованих клітин;
 d = коефіцієнт розведення (де застосовують);
 n = фактор, що змінюється залежно від об'єму камери гемоцитометра.

Допустимо проводити розрізнення в змішаних клітинних популяціях, якщо вони відрізняються за розміром або пігментацією (наприклад, лейкоцити й еритроцити).

Підготовка лічильної камери та проведення аналізу. Встановлюють покривне скельце (злегка змочене по краях) на предметне скло. Переміщують покривне скельце назад і вперед по предметному склі, злегка натискаючи з боків. Готують придатне розведення суспензії клітин в ізотонічному буферному розчині або в гемолізному буфері.

Додають придатний об'єм розведення в лічильну камеру. Рідину додають до межі покривного скла, де вона капілярно надходить всередину камери. Акуратно поміщують гемоцитометр під мікроскоп та фокусують зображення, коли клітини осядуть. Підраховують клітини в зоні сітки. Обчислюють концентрацію клітин у розведених та у вихідних зразках.

Для підвищення точності вимірювань важливо дотримуватися таких основних правил безпеки:

- використовують тільки придатні за товщиною покривні скельця;
- де можливо, підраховують не менше 100 клітин (у разі потреби підраховують більшу кількість полів);