

2.7.29. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Определение качества суспензий эукариотических клеток требует точного измерения как концентрации, так и процентного содержания жизнеспособных клеток. Эти данные необходимы для процесса принятия решений при производстве клеточных продуктов и поддержания оптимальных условий культивирования. Количество клеток может быть выражено как число клеток на объем клеточной суспензии, а жизнеспособность клеток – как число живых клеток на объем клеточной суспензии. Процедура подсчета клеток может быть выполнена вручную (гемоцитометр) или с использованием автоматических устройств (например, счетчик частиц, проточный цитометр). Также могут быть использованы и другие методы.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК

РУЧНОЙ МЕТОД ПОДСЧЕТА

Описание прибора и принцип испытания. Требуются следующие материалы:

- гемоцитометр: специальная камера в различных модификациях для микроскопического исследования. Камера состоит из толстого предметного стекла и покровного шлифованного стекла, предназначенного для разграничения камеры с определенным объемом для каждой модификации. На предметном стекле выгравированы глубокие бороздки, для предупреждения перекрестного заполнения и нанесена сетка, специфичная для каждой модели;
- световой микроскоп от 10× до 40× кратного увеличения;
- пипетки подходящего объема.

Гемоцитометр используют для определения количества клеток в растворе, рассчитывая концентрацию клеток в миллилитре (C), по формуле:

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

где a – число подсчитанных клеток;

d – коэффициент разведения (при необходимости);

n – коэффициент, меняющийся в зависимости от объема камеры гемоцитометра.

Распознавание в смешанной популяции клеток проводится по их различиям в размерах или окраски (например, лейкоциты и эритроциты).

Подготовка камеры для подсчета и анализ. Покровное стекло, слегка увлажненное по краям, устанавливают на предметное стекло. Притирают покровное стекло нажимая на его края, избегая наличия пузырьков воздуха в камере. Готовят подходящее разведение клеточной суспензии в изотоническом растворе или буферном растворе с добавками для предотвращения гемолиза.

Подходящий объем разведенной клеточной суспензии вносят в камеру подсчета. Суспензия помещается в щель, образующуюся между покровным стеклом и счетной камерой, и заполняет камеру подсчета благодаря капиллярности. Подсчет клеток в гемоцитометре проводят под микроскопом, настраиваемый так, чтобы отчетливо различать нанесенную на камеру сетку и клетки, равномерно распределенные на ней. Подсчитывают количество клеток на сетке и рассчитывают их концентрацию в разведенных и неразведенных образцах.

Для увеличения точности измерения необходимо соблюдать следующие меры предосторожности:

- используют покровное стекло подходящей толщины;
- по возможности, подсчитывают более 100 клеток (в случае необходимости, считают большее количество квадратов);
- при обнаружении различных типов клеток (клеточная суспензия не является однотипной) суспензию ресуспендируют, отбирают образец и снова подсчитывают;
- следует избегать неполного заполнения или переполнения счетной камеры, для надлежащего подсчета клеток.

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ ПОДСЧЕТА

Счетчики частиц, основанные на изменении проводимости. Электронные счетные устройства измеряют размер и число частиц в растворе.

Перед использованием счетчики частиц калибруют раствором с известной концентрацией и размером частиц. Для подсчета частиц большего размера, применяют пробирки, оснащенные другими калибровочными насадками. Подобные приборы не позволяют различать мертвые и живые клетки. Поскольку осколки клеток могут производить импульсы, которые

вызывают ошибки, счетные устройства также оснащают пороговым контролем, позволяющим подсчитывать только большие частицы.

Прибор должен быть пригоден для подсчета клеточных продуктов (с точки зрения линейности, точности, и т.д.).

Счетчики частиц, основанные на проточной цитометрии (2.7.24). Проточный цитометр калибруют по стандартным частицам известной концентрации и размера для подсчета абсолютного количества клеток в объеме. Для приборов с двумя электродами, погруженными в счетную камеру с постоянным размером и возможностью проведения измерений в фиксированном объеме, повторную калибровку проводят только при необходимости.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК

Приведенные методы определения процента жизнеспособных клеток основаны на окрашивании клеток красителями и анализе суспензии клеток с помощью ручного или автоматизированного методов подсчета.

В зависимости от типа клеток и используемых методов подсчета результаты могут отличаться.

РУЧНОЙ МЕТОД

Принцип испытания. Испытание основано на проницаемости цитоплазматических мембран: мертвые или поврежденные клетки абсорбируют краситель и окрашиваются, жизнеспособные клетки не окрашиваются. Испытание дает информацию о целостности мембраны, но его результаты не обязательно отражают функциональную активность клетки. Мембраны недавно трипсинизированных или размороженных живых клеток способны абсорбировать краситель.

Краситель. Наиболее часто используемым красителем для дифференциации живых и мертвых клеток, является трипановый синий, но также могут использоваться и другие подходящие красители, такие как эритрозин В или нигрозин.

Трипановый синий – кислотный краситель (M_r 961), анион с 4 сульфонатными группами, которые могут легко связаться с белками, поэтому концентрация белка в испытуемом образце должна быть настолько низкой, насколько возможно.

Условия проведения испытания. Фиксация окраски клеток сильно зависит от значения pH, поэтому необходимо использование pH в пределах от 6,6 до 7,6. Оптимальная фиксация осуществляется при значении pH 7,5.

Другие условия, такие как концентрация красителя и время окраски, должны быть валидированы.

Условия хранения красителя. Обычно используют 0,4 % или 0,5 % раствор трипанового синего в стерильном фосфатном забуференном физиологическом растворе. Хранят в защищенном от воздействия света и воздуха месте.

Подготовка к испытанию и анализ. Суспензию клеток в требуемом разведении (обычно в фосфатном забуференном изотоническом растворе) окрашивают, например, с использованием раствора трипанового синего с конечной концентрацией от 0,1 % до 0,2 %. Аккуратно перемешивают. Инкубируют не более 2–4 мин при комнатной температуре. Аккуратно перемешивают и помещают подходящий объем в счетную камеру и без промедления проводят подсчет клеток.

Определяют процент жизнеспособных клеток как отношение числа неокрашенных клеток к общему количеству клеток, подсчитанному с использованием оптического микроскопа, считая все окрашенные клетки нежизнеспособными.

Жизнеспособность клеток (V) в процентах рассчитывают по формуле:

$$\frac{n}{N} \cdot 100$$

где n – число неокрашенных (жизнеспособных) клеток;

N – общее количество клеток (окрашенных и неокрашенных).

Время инкубации не должно превышать 4 мин, так как впоследствии число окрашенных клеток может значительно увеличиться. В связи с этим для повторного определения необходимо подготовить новый образец.

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ

Проточная цитометрия

Принцип испытания. Испытание основано на способности определенных красителей проникать через поврежденные мембраны и связываться с ДНК путем интеркалирования между основаниями, чтобы нежизнеспособные клетки могли флуоресцировать и регистрироваться с помощью проточной цитометрии (2.7.24). Нежизнеспособные клетки оценивают по различиям, выявляемым при окрашивании клеток, тогда как жизнеспособные клетки остаются неокрашенными. Анализ обычно выполняют с использованием 7-аминоактиномицина D (7-ААД) или

пропидий-йодида и допускается использование других подходящих красителей.

Красители. 7-ААД и пропидий-йодид приведены как примеры мембранопроникающих веществ, которые могут быть использованы в качестве красителей для определения жизнеспособности клеток.

7-ААД является аналогом актиномицина D, у которого в положении 7 хромофора заменена аминокислотная группа. 7-ААД интеркалирует между цитозиновыми и гуаниновыми основаниями ДНК. Спектральные свойства 7-ААД делают эту молекулу наиболее подходящей для анализа методом проточной цитометрии. Максимум поглощения комплекса 7-ААД/ДНК расположен в зеленом диапазоне спектра и, подходит для определения количества клеток с помощью цитометра, оснащенного аргоновым лазером (длина волны возбуждения 488 нм). Насыщенная красная флуоресцентная эмиссия 7-ААД (от 635 нм до 675 нм) способствует его применению в комбинации с антителами, конъюгированными с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) и фикоэритрином (ФЭ), поскольку, в отличие от пропидий-йодида, комплекс 7-ААД/ДНК имеет минимальное спектральное наложение с ФИТЦ и ФЭ.

Пропидий-йодид связывается с двухнитевой ДНК путем интеркалирования между пар оснований с небольшими предпочтениями или без них и со стехиометрией одна молекула красителя на 4–5 пар оснований ДНК. Флуоресценция образовавшегося комплекса красителя с нуклеиновыми кислотами увеличивается в 20–30 раз, при этом максимум возбуждения флуоресценции смещается приблизительно на 30–40 нм в красную область, а максимум эмиссии флуоресценции (615 нм) - приблизительно на 15 нм в синюю область. Хотя способность пропидий-йодида к оптическому поглощению довольно низка, он проявляет достаточно большой Стоксовский сдвиг (разница длин волн максимумов спектров поглощения и флуоресценции), что позволяет одновременно обнаруживать нуклеиновые кислоты и антитела, меченные флуоресцеином при условии использования подходящих оптических фильтров.

Условия хранения растворов красителей нуклеиновой кислоты. При температуре от 2 °С до 8 °С.

Подготовка к испытанию и анализ. В случае гемопоэтических клеток краситель может быть добавлен после маркирования CD45+ на клетках для лучшего разделения клеток от клеточных осколков и тромбоцитов на основе установления области соответствия объектов по боковому светорассеиванию (SS) и мечения CD45+. Условия инкубации клеточной популяции с красителем должны быть валидированы.

Инкубацию выполняют при температуре от 15 °С до 25 °С, в защищенном от света условиях. При необходимости лизиса эритроцитов его выполняют, используя, например, аммония хлорид. Если в проведении лизиса нет необходимости, прибавляют только буферный раствор.

Процентное содержание жизнеспособных клеток определяется непосредственно с помощью проточного цитометра и анализа положительных клеток (мертвые клетки) на SS/7-ААД или SS/пропидий-йодид цитограммах графиках.

Положительные контроли могут состоять из стабилизированных клеток (нежизнеспособные клетки), смешанных со свежими жизнеспособными клетками в необходимом соотношении.

Цифровое изображение окрашенных клеток.

Цифровое изображение позволяет автоматизировать методы с использованием световой микроскопии. Суспензия клеток и раствор красителя смешиваются непосредственно прибором. Система, которая позволяет проводить аспирацию образца, работу с реактивами и последующую очистку инструмента, полностью автоматизирована. Как только клеточная суспензия была отобрана и смешана с раствором красителя, она закачивается в проточную ячейку для анализа. Окрашенная клеточная суспензия прокачивается через камеру, где стробоскопический свет позволяет фотокамере фотографировать протекающие через счетную камеру клетки. Изображение оцифровывается и число мертвых или живых клеток подсчитывается с использованием программного обеспечения