

ПОДСЧЕТ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК CD34+/CD45+ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОДУКТАХ

Настоящая общая фармакопейная статья описывает методологию определения количества клеток CD34+/CD45+, содержащихся в биологических продуктах, путем проведения иммунного мечения и анализа методом проточной цитометрии (2.7.24). Под биологическими продуктами в настоящей общей фармакопейной статье понимаются биологические лекарственные средства, а также исходные материалы и промежуточные продукты для их производства, содержащие гемопоэтические клетки. Определение выполняют на основе одноплатформенного метода с использованием калиброванных флуоросфер. При необходимости проводят предварительный лизис эритроцитов в образцах крови.

Этот метод применим ко всем типам биологических продуктов. Особенности этого метода делают его наиболее подходящим для продуктов с очень низким содержанием клеток CD34+/CD45+.

Оценка качества на основе подсчета клеток CD34+/CD45+

В различных исследованиях установлено, что 1–3 % клеток костного мозга, выделяющие поверхностный клеточный антиген CD34, способны к восстановлению долгосрочного, многостадийного гемопоэза после миелоаблативной высокодозной терапии. Клетки CD34+/CD45+ также обнаружены в незначительном количестве (от 0,01 % до 0,1 %) в периферической крови здоровых людей. Клетки CD34+/CD45+ в значительных количествах могут быть мобилизованы из костного мозга в периферическую кровь под действием гемопоэтических цитокинов, таких как гранулоцитарный колониестимулирующий фактор и (или) химиотерапия. Метод, используемый для подсчета клеток CD34+/CD45+, должен соответствовать следующим требованиям:

- высокая чувствительность, так как гемопоэтические стволовые клетки встречаются редко;
- точность, чтобы обеспечить клинически значимые результаты;
- воспроизводимость, чтобы обеспечить клинически надежные результаты;
- скорость, чтобы обеспечить анализ в реальном времени.

Выбор параметров

В проточной цитометрии используют коммерчески доступные моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромом, стандартные процедуры окрашивания и лизиса цельной крови, а также применяют стратегию гейтирования с использованием светорассеяния и иммунофлуоресцентного анализа с применением комбинации пан-CD45/CD34 моноклональных антител.

Жизнеспособность клеток CD34+/CD45+ можно определить с

помощью соответствующего окрашивания нуклеиновых кислот красителем, не проникающим через интактную клеточную мембрану (например, 7-аминоактиномицин D).

Выбор моноклональных антител

Антитела к CD34. Для обнаружения всех вариантов гликозилирования молекулы (например, клон 8G12 или 581) используют антитела к CD34 класса III. Для обнаружения редких эффектов используют антитела, конъюгированные с флуорохромами (например, фикоэритрином), имеющими максимальное свечение при использовании проточного цитометра с аргоновым лазером.

Антитела к CD45. Необходимо использовать пан-CD45 антитела, обнаруживающие все изоформы и все гликоформы этой структуры. Обычно используют антитела к CD45, конъюгированные с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) в качестве флуорохрома (например, J33, HLe1, 2D1).

Контроли изотипов и изоклонов. Для обнаружения неспецифичных сигналов в области флуоресценции фикоэритрина используют отрицательный контроль. При применении контроля изотипов (моноклональные антитела к нерелевантным антигенам того же изотипа, что и используемые антитела к CD34) фикоэритрин-конъюгированный изотип объединяют с CD45-ФИТЦ (или *PerCP*). При применении контроля изоклонов неконъюгированные (в избытке) и фикоэритрин-конъюгированные моноклональные антитела, идентичные антителам к CD34, объединяют с конъюгированными антителами к CD45. Могут быть использованы альтернативные комбинации.

Определение абсолютного количества клеток CD34+/CD45+

Калиброванные флуоросферы. В зависимости от применяемого оборудования, внутренний стандарт может представлять собой калиброванные сферы, находящиеся в суспензии, или может быть помещен непосредственно в прилагаемые производителем пробирки.

Абсолютное количество клеток CD34+/CD45+ в миллилитре рассчитывают по формуле:

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

где: A – количество подсчитанных клеток CD34+/CD45+;

B – количество подсчитанных флуоросфер;

C – известная концентрация флуоросфер.

Стратегии гейтирования

Целью стратегии гейтирования является последовательный выбор интересующей популяции, и одновременная минимизация интерференции, вызываемой дебрисом (фрагментами клеток) и зрелыми

клетками, с которыми антитела могут неспецифически связываться. При использовании коммерческих наборов применяют стратегию гейтирования, рекомендованную производителем набора. При использовании собственной методики желательно применять существующие рекомендуемые стратегии. Стратегия гейтирования, учитывающая параметры светорассеяния и CD34/CD45 флуоресценцию, будет способствовать правильной идентификации и подсчету клеток CD34+/CD45+.

Количество обрабатываемых событий

Для достижения приемлемых правильности и прецизионности анализируют достаточное количество событий, например, не менее 100 событий CD34+ и не менее 60 000 событий CD45+; общее количество клеток может быть выше при условии, если процентное содержание CD34 составляет 0,1 % или менее.

Отбор проб

Антикоагулянтом при процедуре афереза является цитрат декстроза (состав А). Данный антикоагулянт позволяет проводить на одном и том же испытуемом образце как автоматизированный подсчет лейкоцитов, так и испытание с помощью проточной цитометрии. При отборе проб периферической крови в качестве антикоагулянта принято использовать этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА).

Транспортирование проб

Условия транспортирования проб должны гарантировать постоянство температуры и физическую сохранность проб.

Хранение проб

Испытанию могут быть подвергнуты свежие (хранившиеся не более 24 ч) пробы продуктов афереза, цельной крови, пуповинной крови или костного мозга. Пробы, хранившиеся более 24 ч и пробы, которые претерпели заморозку и размораживание, должны окрашиваться красителями, позволяющими оценить количество жизнеспособных клеток. При приеме проб проверяют температуру внутри упаковки.

МЕТОДИКА

Пробоподготовка испытуемого образца

Перед окрашиванием с помощью моноклональных антител необходимо убедиться, что концентрация лейкоцитов является подходящей. При необходимости испытуемый образец разводят средой, совместимой с испытуемым образцом и системой для лизиса. Отмечают коэффициент разведения. Рекомендуется проводить испытание с использованием отрицательного контроля.

Анализ с помощью проточной цитометрии

Автоматическая стандартизация

Для анализа клеток, меченных с применением коммерчески доступных наборов, производители разрабатывают критерии для настройки проточного цитометра. Данные настройки затем автоматически переносятся в протокол анализа испытуемых образцов. Для настройки фотоумножительной трубки на заданные значения используют специальные флуоросферы, устанавливают поправку и проверяют систему с помощью контрольных образцов.

Настройки системы

– *Пороговое значение*: во избежание учета дебриса (низкий уровень прямого светорассеяния) вместо мелких форм лимфоцитов, на графике светорассеяния устанавливают порог прямого угла рассеяния.

– *Высоковольтные настройки фотоумножительной трубки*: они должны быть совместимы с анализом поверхностных клеточных маркеров и должны быть установлены в каждой лаборатории таким образом, чтобы была возможность различить отрицательные и положительные популяции клеток с умеренной плотностью антигенов; напряжение фотоэлектронных умножителей необходимо периодически проверять и настраивать в соответствии со стандартными процедурами, принятыми в лаборатории.

– *Поправка*: она должна быть применима в случае интерференции в видимом диапазоне спектра (например, ФИТЦ/фикоэритрин), обнаруженной при анализе поверхностных клеточных маркеров; поправку на цвет анализируют и настраивают в соответствии со стандартными процедурами, принятыми в лаборатории.

– *Скорость потока*: должна подходить для рутинного анализа поверхностных клеточных маркеров.

– *Диапазоны гейтирования*: области, установленные для образцов CD34/CD45, оставляют неизменными для анализа отрицательной области.

Расчет абсолютного количества клеток CD34+/CD45+

Абсолютное количество клеток CD34+/CD45+ рассчитывают по формуле:

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

где: n – общее количество клеток CD34+/CD45+ в микролитре;

D – фактор разведения;

V – объем испытуемого образца, в микролитрах.

Результаты испытания выражают как в процентном содержании клеток CD34+/CD45+, так и в абсолютном количестве клеток на микролитр. Где это возможно, результаты могут быть выражены в абсолютном количестве на килограмм массы тела реципиента.