

ОСОБЛИВОСТІ ТА КЛЮЧОВІ ПАРАМЕТРИ ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДИК ФЕНОТИПУВАННЯ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ

Гузенко В. В., к.т.н., доцент, e-mail: hnaghv@gmail.com

Державний біотехнологічний університет

Неліна І. М., к.м.н., старший науковий співробітник, e-mail: nelina_iv89@ukr.net

ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України»

Актуальність дослідження. Аналізи, які проводяться методом проточної цитофлуориметрії, використовуються на всіх стадіях процесу розробки препаратів на основі життєздатних клітин людини: біомедичних клітинних продуктів (БМКП) та високотехнологічних лікарських препаратів (ВТЛП), а також при оцінці їх якості. Ця технологія дозволяє проводити ідентифікацію клітинних маркерів на поверхні клітин, а також специфічні виміри у її внутрішніх структурах. Метод проточної цитофлуориметрії також підходить для кількісного визначення розчинних аналітів (цитокінів, фармацевтичних субстанцій, антитіл у зразках плазми або сироватки) [1,2].

Таким чином, в даний час відсутня детальна інформація щодо особливостей та переліку необхідних параметрів для належної валідації специфічних методик, що виконуються за допомогою проточної цитофлуориметрії стосовно препаратів клітинної терапії

Мета досліджень. Аналіз особливостей, притаманних валідації методик проточної цитофлуориметрії з метою оцінки ідентичності (справжності) препаратів на основі життєздатних клітин людини за допомогою імунофенотипування.

Основні матеріали досліджень. Досліджуваний в роботі проточний цитофлуориметр (цитометр) – це пристрій, що використовується в молекулярній та клітинній біології для аналізу та підрахунку клітин, частинок, розчинних білків та інших біологічних об'єктів на основі їх оптичних властивостей. Він складається з рідинної (флюїдної), оптичної та електронної систем [3]. Рідинна система фокусує зразок у проточному осередку шляхом обтискання його з усіх боків буферним розчином. Наявність такої системи необхідне для формування потоку окремих клітин. Далі потік протікає перпендикулярно лазерному променю та флуорохроми на поверхні частинок і клітин випромінюють світлові сигнали з довжиною хвилі, більшою, ніж довжина хвилі джерела випромінювання. У той же час сама по собі частка заломлює і розсіює світло, що потрапляє на неї, на тій же довжині хвилі, що і випромінювач. Це заломлене та розсіяне світло проходить через оптичну систему і потрапляє на детектори. Потім електронна система світлочутливих елементів детектує та перетворює сигнал, реєструючи значення основних параметрів, які вимірюються проточним цитофлуориметром, таких як флуоресценція (від флуорохрому та автофлуоресценція), пряме (FSC) та бічне (SSC) розсіювання.

Система детектування проточного цитофлуориметра складається з фотодетекторів та спектральних фільтрів, які дозволяють вимірювати інтенсивність світла за різних довжин хвиль. Ця інформація повинна використовуватися для створення багатовимірного профілю кожної клітини, що дозволяє дослідникам аналізувати її характеристики та класифікувати відповідно із певними критеріями.

В науковій роботі доведено, що ступінь та характер розсіювання світла від клітини залежить від багатьох факторів, таких як розмір, форма, внутрішня структура клітини, її індекс рефракції, середа і навіть кути, під якими розташовуються детектори.

Проведений дослід показав обов'язковість налаштування параметрів цитометра для конкретних типів аналізу, що воно є ключовим етапом у багатопараметричному аналізі фенотипу клітин і включає налаштування дискримінатора для розрізнення окремих клітин і частинок, параметрів світлорозсіювання для вимірювання їх розміру та структури, чутливості детекторів флуоресценції при визначенні типу та кількості флуорохрому та введення

коефіцієнтів компенсації для коригування результатів вимірів флуоресценції та обліку перекриття спектрів випромінювання різних флуорохромів.

Не всі підходи до валідації традиційних імуноаналітичних методик аналізу можна легко адаптувати до препаратів клітинної терапії. Зразки, що містять клітини з різними рівнями експресії аналізованого фактора (аналіту), при змішуванні будуть показувати не усереднений показник сигналу, а дві відмінні популяції з різними рівнями експресії. Це ускладнює підхід до вивчення лінійності методу. Крім цього, такі параметри зразка з життєздатними клітинами людини, як експресія антигенів, клітинна композиція та життєздатність, мають тенденцію змінюватися з часом навіть у пробірці з антикоагулянтом. У такому разі альтернативою буде ручний підрахунок у камері гемоцитометра або цитометричній пробірці із заздалегідь розфасованими частинками. Який би метод підрахунку концентрації клітин та їх життєздатності у продуктах, що містять клітини людини, не був обраний, він також має бути валідований.

Необхідні значення були отримані на основі розподілу Пуассона, який при достатньо великому очікуваному числі подій прагне нормального розподілу. Для отримання інших значень. Необхідно спочатку визначити кількість подій “ λ ”, яке потрібно отримати на цитометрі, виходячи з коефіцієнта варіації “ CV ”, необхідного у цьому дослідженні:

$$\lambda = \left(\frac{100}{CV} \right)^2 \quad (1)$$

Потім обчислюємо мінімальну необхідну кількість клітин N за формулою:

$$N = \lambda * \left(\frac{100}{P} \right) \quad (2)$$

У деяких випадках, коли шукані події дуже рідкісні або варіабельність результатів “ P ” висока, можуть знадобитися додаткова оцінка та статистичний аналіз. Введення коефіцієнтів компенсації - це прийом, використовується в проточній цитометрії для коригування та мінімізації спотворення даних, одержуваних, коли флуорохром має діапазон випромінювання, що перетинається з каналами, не призначеними на його детекції. Такі канали називаються вторинними, а єдиний канал, в якому повинен реєструватися сигнал флуорохрому, називається первинним. Це важливий етап проведення аналізу, тому він має бути врахований у процесі проведення валідації. Процес ручного налаштування флуоресцентної компенсації на детекторах цитофлуориметра заснований на візуальній оцінці представлення отриманих даних, у зв'язку з чим схильний до помилок, пов'язаних із суб'єктивним сприйняттям оператора, який проводить налаштування. Для сучасних приладів існують вбудовані алгоритми автоматичного налаштування компенсації напруг, використання яких краще, оскільки призводить до більш повторюваних результатам.

Висновок. Фенотипування клітинних ліній (клітин), на сьогодні, є одним із ключових досліджень в оцінці якості та підтвердження справжності препаратів на основі життєздатних клітин людини. У цьому дослідженні виходячи з аналізу документів та наукової літератури, все ж таки, вдалося виділити ключові параметри валідації методики фенотипування клітинних ліній, які включають: правильність, прецизійність, специфічність, межа виявлення, межа кількісного визначення, лінійність; аналітична область; та доповнюючі: чутливість, граничне значення та фактор перенесення.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І. Біохімія людини: підручник. Тернопіль, 2013.- 744с.
2. Основи імунології: функції та розлади імунної системи: 6-е видання / Абул К. Аббас, Ендрю Г. Ліхтман, Шив Піллай Київ «Медицина» 2020р. – 336
3. Казмірчук В. Є. Клінічна імунологія і алергологія / В.Є. Казмірчук, Л.В. Ковальчук. - Вінниця: Нова книга, 2006. - 504 с.