 <p>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»</p>	<p>ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России</p>
--	---------------------------------------

**МЕТОДИКА**  
Фенотипическая характеристика гемопоэтических стволовых клеток

<p><b>РАЗРАБОТАЛ:</b> Старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии дата <i>17.11.18</i> подпись <i>[подпись]</i> Н.В. Исаева</p>	<p align="center"><b>М-КДЛ-25-015</b></p>		
<p><b>СОГЛАСОВАЛИ:</b> Заведующий лабораторией клеточной и молекулярной иммунологии дата <i>17.11.18</i> подпись <i>[подпись]</i> Е.Л. Назарова</p>	<p>Дата введения: <i>21.11.2018</i></p>		
<p>Заведующий отделением трансфузиологии и процессинга гемопоэтических стволовых клеток дата <i>17.11.18</i> подпись <i>[подпись]</i> Ф.С. Шеретнев</p>			
<p>Заместитель директора по научной работе дата <i>17.11.18</i> подпись <i>[подпись]</i> А.В. Рылов</p>	<p>Дата пересмотра: <i>21.11.2023</i></p>		
<p>Заместитель директора по лечебной работе дата <i>17.11.18</i> подпись <i>[подпись]</i> Н.В. Минаева</p>			
<p>Начальник отдела обеспечения качества дата <i>17.11.18</i> подпись <i>[подпись]</i> Е.Н. Калинина</p>	<table border="1"> <tr> <td>Версия 1</td> <td>С. 1/18</td> </tr> </table>	Версия 1	С. 1/18
Версия 1	С. 1/18		
<p><b>УТВЕРДИЛ:</b> Директор дата <i>21.11.18</i> подпись <i>[подпись]</i> И.В. Парамонов</p>	<p><b>ОРИГИНАЛ</b> <i>Экземпляр №1</i></p> <p align="right"><small>Место для штампа</small></p>		

**ВНИМАНИЕ!**

Этот документ разрешен к использованию до вступления в силу следующей версии.  
Использование отмененных или устаревших документов запрещается.  
Ответственность по проверке действительности данного документа  
перед каждым его использованием возлагается на пользователя.

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ**

Настоящий документ разработан и предназначен для пользования работниками  
ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.  
Пользователь документа не имеет права передавать документ лицам,  
не являющимся работниками ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-25-015	Версия 1
«Фенотипическая характеристика гемопоэтических стволовых клеток»		Стр. 2 из 18

## Предисловие

### Сведения о методике

1. Разработана Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России).

Директор – д. м. н. И.В. Парамонов.

Заместитель директора по научной работе – д. м. н. А.В. Рылов.

2. Исполнители:

старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии – к. б. н. Н.В. Исаева,

заведующий отделением трансфузиологии и процессинга гемопоэтических стволовых клеток – к. м. н. Ф.С. Шерстнев,

лаборант-исследователь лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии – Ю.С. Береснева.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-25-015	Версия 1
«Фенотипическая характеристика гемопоэтических стволовых клеток»		Стр. 3 из 18

## Содержание

1	Введение.....	4
2	Область применения.....	4
3	Общие положения.....	4
4	Термины.....	5
5	Обозначения.....	5
6	Персонал.....	5
7	Помещения.....	5
8	Оборудование и инвентарь .....	5
9	Материалы.....	6
10	Процедура.....	7
11	Требования безопасности.....	12
12	Контроль качества лабораторного исследования.....	12
13	Эффективность.....	12
14	Нормативные ссылки.....	13
15	История документа.....	13
	Приложение А. Графики протокола фенотипической характеристики ГСК.....	14
	Приложение Б. Нормативы экспрессии фенотипических маркеров на ГСК.....	15
	Приложение В. Абсолютное число видов ГСК в суммарной трансплантационной дозе.....	16
	Лист ознакомления.....	17
	Лист рассылки.....	18

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-25-015	Версия 1
«Фенотипическая характеристика гемопоэтических стволовых клеток»		Стр. 4 из 18

## **1 ВВЕДЕНИЕ**

1.1 Настоящий документ устанавливает порядок фенотипической характеристики гемопоэтических стволовых клеток (далее – ГСК).

1.2 Настоящая методика подготовлена в соответствии с современными требованиями к идентификации и подсчету гемопоэтических стволовых клеток; методика разработана для расширения методической базы при проведении научных исследований в области гематологии и трансфузиологии; методика может быть использована как основа для обоснования критериев прогнозирования восстановления гемопоэза после трансплантаций ГСК.

## **2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ**

2.1 Настоящий документ применяется для иммунофенотипической характеристики ГСК, содержащихся в лейкоконцентратах, получаемых методом лейкоцитафереза из мобилизованной крови и применяемых для трансплантации онкогематологическим больным.

## **3 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ**

3.1 Анализу подлежат образцы лейкоконцентратов, заготовленные методом аппаратного лейкоцитафереза от доноров для аллогенной трансплантации или от больных для аутологичной трансплантации.

3.2 Методика основывается на иммунологическом связывании клеток ГСК-содержащего образца с конъюгатами моноклональных антител (далее – МКА), оценке результатов иммунологической реакции в лазерной проточной цитофлуориметрии с применением специализированного протокола учета.

3.3 Протокол иммунофенотипической характеристики ГСК представляет собой шаблон эксперимента, содержащий определенный порядок гейтирования оцениваемых клеток. Протокол учитывает требования Международного сообщества по гематотерапии и тканевой инженерии (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering – ISHAGE), предъявляемые к стволовой клетке. Иммунофенотипическая характеристика ГСК выполняется в четырехцветной проточной цитометрии с применением панелей конъюгатов МКА с различными флуорохромами.

3.4 Целью настоящей методики является идентификация и подсчет числа мультипотентных и линейно-коммитированных (унипотентных) клеток-предшественниц среди ГСК.

3.5 В результате выполнения данной методики возможно получить следующие результаты:

- процентную долю ГСК, которые позитивны по линейно-неограниченным маркерам (HLA-DR, CD117) и линейно-ассоциированным маркерам (CD13, CD15, CD2, CD19, CD56, CD41, CD61, CD235a);

- суммарные дозы мультипотентных клеток-предшественниц, экспрессирующих определенные линейно-неограниченные маркеры, и линейно-коммитированных клеток-предшественниц, экспрессирующих линейно-ассоциированные маркеры, в заготовленных лейкоконцентратах.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-25-015	Версия 1
«Фенотипическая характеристика гемопоэтических стволовых клеток»		Стр. 5 из 18

## 4 ТЕРМИНЫ

4.1 В методике применяются следующие термины с соответствующими определениями:

- гистограмма – график, показывающий распределение событий (в проточной цитометрии – клеток) по показателям светорассеяния и флуоресценции;
- лейкоцитаферез – гравитационная технология, при которой из периферической крови избирательно изымаются лейкоциты;
- мобилизация ГСК – выход ГСК из костного мозга и резкое возрастание их количества в периферической крови под воздействием ростовых факторов;
- флуоресценция – испускание света определенной длины волны, возбужденное светом с другой длиной волны;
- CD-маркеры (антигены) – маркеры мембраны клеток, соответствующие кластерам дифференцировки и определяемые при помощи моноклональных антител.

## 5 ОБОЗНАЧЕНИЯ

- 7-ААД – витальный краситель 7-аминоактиномицин D (7-aminoactinomycin D);
- CD – кластер дифференцировки (cluster of differentiation);
- FITC – флуорохром флуоресцеинизотиоционат;
- FSC – прямое (малоугловое) светорассеяние (forward scatter channel);
- ISHAGE – Международное сообщество по гематотерапии и тканевой инженерии (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering);
- PE – флуорохром фикоэритрин (phycoerythrin);
- PE-Cy7 – флуорохром фикоэритрин-цианин 7 (fluorochrome phycoerythrin-cyanine 7);
- PerCP – перидин-хлорофилл протеин (peridine-chlorophyll protein);
- SSC – боковое светорассеяние (side scatter channel);
- БСА – бычий сывороточный альбумин;
- ГОСТ – государственный стандарт;
- ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка;
- МКА – моноклональные антитела;
- ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

## 6 ПЕРСОНАЛ

6.1 Действие настоящего документа распространяется на персонал группы проточной цитометрии лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии:

- препаратора;
- лаборанта;
- лаборанта-исследователя;
- младшего научного сотрудника;
- старшего научного сотрудника.

## 7 ПОМЕЩЕНИЯ

7.1 Методика реализуется в помещении лаборатории иммунологического анализа, отвечающей требованиям безопасности работ с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней.

## 8 ОБОРУДОВАНИЕ И ИНВЕНТАРЬ

### 8.1 Анализаторы, программное обеспечение

ФГБУН КНИИГ и ПК ФМБА России	М-КЛД-25-015	Версия 1
«Фенотипическая характеристика гемопоэтических стволовых клеток»		Стр. 6 из 18

8.1.1 Настоящая методика осуществляется с применением следующих анализаторов:

- анализатор гематологический «Sysmex KX» или аналогичный;
- двухлазерный проточный цитофлуориметр «BD FACS Canto II» с принадлежностями, рассчитанный на эмиссию света с длиной волны 519 нм, 578 нм, 678 нм и 785 нм.

8.1.2 Работы выполняются на цитофлуориметре, на котором установлено программное обеспечение «BD FACS Diva» версии 6,0 и выше.

## 8.2. Общелабораторное оборудование и оснащение

8.2.1 При выполнении методики применяется следующее общелабораторное оборудование:

- микроскоп биологический для клинических исследований;
- калиброванная микропипетка для дозирования 20 мкл;
- калиброванная микропипетка для дозирования 100 мкл;
- калиброванная микропипетка для дозирования от 100 до 1000 мкл;
- штатив для цитометрических пробирок;
- штатив для наконечников к микропипеткам объемом от 0,5 до 250 мкл;
- штатив для наконечников к микропипеткам объемом от 200 до 1000 мкл;
- смеситель медицинский типа «вортекс»;
- таймер лабораторный.

8.2.2 Лаборатория оснащается следующим оборудованием:

- источником бесперебойного электропитания;
- холодильным оборудованием медицинским для хранения крови, компонентов крови, лекарственных средств и вакцин;
- кондиционером воздуха для поддержания температуры в помещении не более 25 °С.

## 9 МАТЕРИАЛЫ

### 9.1 Реактивы

9.1.1 Для расширенной оценки фенотипа ГСК используются панели конъюгатов моноклональных антител МКА к клеточным мембранным маркерам HLA-DR, CD117, CD13, CD15, CD2, CD19, CD56, CD41, CD61, CD235a с различными флуорохромами.

9.1.2 Для подсчета числа ГСК и оценки клеточности образцов лейкоконцентратов применяется набор реагентов для цитометрических исследований маркированный «For In Vitro Diagnostic Use» - «BD Stem Cell Enumeration Kit» или аналогичный в отдельных упаковках, включающий следующие компоненты:

- «BD Stem Cell Reagent» – двухпараметрические МКА к маркерам CD45/CD34, меченные FITC/PE в физиологическом растворе с фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащий бычий сывороточный альбумин (БСА) и 0,1 % раствор азида натрия.

- раствор для лизирования эритроцитов на основе десятикратного раствора хлорида аммония, не содержащий фиксаторов.

9.1.3 Применяются следующие реактивы:

- вода для инъекций, растворитель для приготовления лекарственных форм для инъекций;

- ФСБ таблетированный;

- БСА сухой;

- BD Cytometer Setup & Tracking Beads Kit – набор частиц для настройки базовой линии цитофлуориметра и мониторинга состояния прибора;

- BD CompBeads – набор частиц для настройки компенсации флуоресцентных сигналов.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-25-015	Версия 1
«Фенотипическая характеристика гемопоэтических стволовых клеток»		Стр. 7 из 18

## 9.2 Расходные материалы, реактивы, расходные жидкости

9.2.1 Применяются следующие одноразовые расходные материалы:

- пробирки для однократного применения размером 12 × 75 мм «BD Falcon™ Polystyrene Tube»;
- пробирки «BD TruCount Tube»;
- наконечники нестерильные без фильтров для дозаторов пипеточных объемом от 0,5 до 200 мкл и от 100 до 1000 мкл.

9.2.2 При работе лазерного проточного цитофлуориметра необходимы следующие расходные жидкости:

- BD FACS Flow – проточная жидкость;
- BD FACS Clean – чистящий раствор;
- BD FACS Shutdown Solution – раствор для выключения.

## 10 ПРОЦЕДУРА

### 10.1 Подготовка протокола

Старшему научному сотруднику:

10.1.1 Пользуясь программным обеспечением лазерного проточного цитофлуориметра подготовить протокол, включающий 5 графиков (Приложение А к настоящей методике).

10.1.2 Задействовать детекторы прямого (FSC) и бокового светорассеяния (SSC).

10.1.3 Учесть, что максимумы длин волн эмиссии света от флуоресцеинизотиоционата (FITC), фикоэритрина (PE), перидин-хлорофилл протеина (Per-CP), фикоэритрин цианина-7 (PE-Cy7) составляют 525 нм, 575 нм, 675 нм и 785 нм соответственно.

10.1.4 Установить порог на канале детекции Per-CP на уровне 200.

10.1.5 Построить точечный график 1 по параметрам «Per-CP против SSC», который необходим для идентификации региона CD45-позитивных клеток, отобразить на графике 1 все события, которые проходящие через проточную ячейку, построить на графике 1 прямоугольный регион таким образом, чтобы левый край гейта включал все клетки, слабо окрашенные по CD45; присвоить прямоугольному региону имя «CD45».

10.1.6 Построить точечный график 2 по параметрам «PE против SSC», который используется для ограничения CD34-позитивных событий, отобразить на графике 2 все события региона «CD45», создать полигональный регион в правом нижнем углу графика 2, присвоить полигональному региону имя «CD34 high».

10.1.7 По параметрам «Per-CP против SSC» построить точечный график 3, отразить на графике 3 только CD34-позитивные события, создать прямоугольный регион, включающий события с низкой и средней экспрессией антигена CD45, присвоить региону имя «CD45 low».

10.1.8 Построить график-гистограмму 4 по «FITC против SSC», создать полигональный регион, включающий только события, позитивные по FITC, ограничить регион только событиями «CD45 low» с графика 3, присвоить региону имя «FITC».

10.1.9 Построить график-гистограмму 5 по «PE-Cy7 против COUNT», создать полигональный регион, включающий только события, позитивные по PE-Cy7, ограничить регион только событиями «CD45 low» с графика 3; присвоить региону имя «PECy7».

ФГБУН КНИИГ и ПК ФМБА России	М-КЛД-25-015	Версия 1
«Фенотипическая характеристика гемопоэтических стволовых клеток»		Стр. 8 из 18

10.1.10 Для идентификации и подсчета ГСК подготовить протоколы экспериментов согласно СОП-КЛД-23-008 «Определение числа CD34-позитивных гемопоэтических стволовых клеток в образце».

10.1.11 Для подсчета содержания в образце лейкоконцентрата клеток, являющихся одновременно позитивными по антигену CD45 и негативными по 7-AAD, подготовить протоколы экспериментов согласно СОП-КЛД-23-010 «Определение числа CD45-позитивных 7-AAD-негативных клеток в образце».

## **10.2 Настройка лазерного проточного цитофлуориметра**

Старшему научному сотруднику:

10.2.1 Произвести настройку прибора в соответствии с СОП-КЛД-23-015 «Порядок работы на лазерном проточном цитофлуориметре FACS Canto II».

## **10.3 Входной контроль образца**

Лаборанту:

10.3.1 Проверить наличие заполненных направлений на исследования.

10.3.2 Внести в «Журнал учета исследований» данные об образце:

- дата взятия образца на исследование,

- ФИО пациента

- идентификационный номер образца в лабораторной информационной системе/

10.3.3 Зафиксировать время поступления образца лабораторию.

10.3.4 Провести визуальную оценку качества доставленного образца, обратить внимание на свернувшиеся и гемолизированные образцы, фиксировать в журнале приема образцов возможные недостатки.

## **10.4 Подсчет числа ядросодержащих клеток и разбавление образца**

Лаборанту-исследователю:

10.4.1 Провести подсчет ядросодержащих клеток в образце автоматическим методом согласно инструкции по работе на гематологическом анализаторе «Sysmex KX».

10.4.2 Использовать результат подсчета ядросодержащих клеток в процедуре разбавления образца. Разбавлять образцы, в которых количество ядросодержащих клеток превышает  $5 \times 10^3$  клеток на мкл. Применить для разбавления образца ФСБ с 0,5 % БСА.

10.4.3 Рассчитать необходимые объемы образца и раствора для разбавления таким образом, чтобы концентрация ядросодержащих клеток достигла  $5,0 \times 10^3$  клеток на мкл.

10.4.4 Произвести разбавление образца, используя метод обратного пипетирования согласно инструкции по использованию одноканальных дозаторов); сделать соответствующие записи в «Журнале учета пробоподготовки для проточной цитофлуориметрии»:

- дата поступления образца на исследование,

- ФИО пациента,

- идентификационный номер образца в лабораторной информационной системе,

- концентрация ядросодержащих клеток в образце до разбавления;



- рассчитанную кратность разбавления (фактор дилуции),
- концентрация ядросодержащих клеток в образце после разбавления.

### 10.5 Постановка иммунологических реакций

#### Лаборанту-исследователю:

10.5.1 Установить наконечники в штативы, подготовить микродозаторы и штатив для пробирок, наполнить контейнер для сбора отходов дезинфицирующим раствором.

10.5.2 Подготовить необходимое количество цитометрических пробирок размером 12 × 75 мм «BD Falcon™ Polystyrene Tube». Убедиться, что пробирки не имеют трещин и сколов. Если обнаружены изъяны, утилизировать пробирку и заменить ее на новую.

10.5.3 Промаркировать пробирки (указывать идентификационный номер образца лейкоконцентрата и используемые фенотипические маркеры), используя подготовленную панель МКА согласно Таблице 1.

Таблица 1 – Рекомендуемая панель конъюгатов МКА с флуорохромами

Номер пробирки	Флуорохромы			
	FITC	PE	PerCP -	PE-Cy -
	Специфичности			
1	HLA-DR	CD34	CD45	CD117
2	CD41	CD34	CD45	CD56
3	CD61	CD34	CD45	CD15
4	CD235a	CD34	CD45	CD13
5	CD2	CD34	CD45	CD19

10.5.4 Встряхнуть на вортексе испытуемый образец лейкоконцентрата.

10.5.5 Внести 100 мкл образца на внутреннюю стенку пробирки. Утилизировать пробирку и заменить ее на новую, если произошло размазывание образца.

10.5.6 Перенести с помощью микропипетки в цитометрические пробирки по 20 мкл моноклональных антител на дно пробирки.

10.5.7 Поместить пробирки на вортекс, произвести встряхивание на среднем режиме интенсивности в течение 3 секунд.

10.5.8 Поместить пробирки в темный шкаф, засечь время при помощи лабораторного таймера.

10.5.9 Приготовить достаточное количество однократного лизирующего раствора на основе хлорида аммония, учитывая потребность в реактиве на один день. Разбавить одну часть коммерческого реактива десятикратного раствора хлорида аммония девятью частями воды для инъекций.

10.5.10 После 20-минутной инкубации добавить в цитометрические пробирки по 2000 мкл однократного лизирующего раствора на основе хлорида аммония, поместить их на смеситель и аккуратно встряхнуть на среднем режиме интенсивности в течение 3 секунд.

10.5.11 Поместить пробирки в темный шкаф, засечь время при помощи лабораторного таймера, по истечении 10 минут приступить к анализу.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-25-015	Версия 1
«Фенотипическая характеристика гемопоэтических стволовых клеток»		Стр. 10 из 18

10.5.12 Выполнить постановку реакции для подсчета относительного числа ГСК в образце в соответствии с СОП-КЛД-23-008 «Определение числа CD34-позитивных гемопоэтических стволовых клеток в образце».

10.5.13 Выполнить постановку реакции для подсчета «CD45-позитивных 7-AAD-негативных» клеток образца лейкоконцентрата согласно СОП-КЛД-23-010 «Определение числа CD45-позитивных 7-AAD-негативных клеток в образце».

## **10.6 Подготовка лазерного проточного цитофлуориметра**

### Лаборанту-исследователю:

10.6.1 Включить лазерный проточный цитофлуориметр согласно СОП-КЛД-23-015 «Порядок работы на лазерном проточном цитофлуориметре FACS Canto II».

10.6.2 Начать работать в программе BD FACSDiva.

10.6.3 Вставить новые эксперименты из архива, если образец принадлежит пациенту, который обследуется впервые. Раскрыть эксперименты, присвоить экспериментам новые имена, присвоить новое имя каждой пробирке.

10.6.4 Добавить новые пробирки в имеющиеся эксперименты, если исследуемый образец принадлежит пациенту или донору, который уже обследовался ранее; присвоить новое имя каждой пробирке.

10.6.5 Убедиться в том, что лазеры цитометра разогревались в течение 30 минут.

10.6.6 Задать следующие значения: параметр печати и экспорта, время обратного отчета, параметр игнорирования загрузчика.

## **10.7 Анализ образцов на лазерном проточном цитофлуориметре**

### Лаборанту-исследователю:

10.7.1 Извлечь пробирку или пробирки из места для инкубации или из холодильника и выполнять последовательно шаги по анализу образца согласно СОП-КЛД-23-015 «Порядок работы на лазерном проточном цитофлуориметре FACS Canto II».

10.7.2 Убедиться в том, что собрано не менее 100000 событий и проследить, чтобы произошла успешная запись событий в файл.

10.7.3 Выполнить анализ для подсчета относительного числа ГСК в образце в соответствии с СОП-КЛД-23-008 «Определение числа CD34-позитивных гемопоэтических стволовых клеток в образце».

10.7.4 Выполнить анализ для подсчета «CD45+7-AAD-»-клеток в образце согласно СОП-КЛД-23-010 «Определение числа CD45-позитивных 7-AAD-негативных клеток в образце».

10.7.5 Завершить работу на приборе согласно СОП-КЛД-23-015 «Порядок работы на лазерном проточном цитофлуориметре FACS Canto II».

## **10.8 Анализ данных, расчеты и выдача результата**

### Старшему научному сотруднику:

10.8.1 Включить компьютер, открыть сохраненные данные по образцу, изучить графики, согласно современным представлениям об иммунофенотипических свойствах ГСК.

10.8.2 При необходимости откорректировать гейты.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-25-015	Версия 1
«Фенотипическая характеристика гемопоэтических стволовых клеток»		Стр. 11 из 18

10.8.3 Ввести новые коэффициенты компенсации для сигналов флуоресценции.

10.8.4 Выполнить процедуры поиска и устранения неисправностей, руководствуясь инструкцией к прибору.

10.8.5 Зафиксировать относительное количество ГСК в лейкоконцентрате согласно СОП-КЛД-23-010 «Определение числа CD45-позитивных 7-AAD-негативных клеток в образце».

**Пример:**

$$ГСК_{отн} = 0,8 \%$$

10.8.6 Зафиксировать абсолютное число CD45-позитивных 7-AAD-негативных клеток в лейкоконцентрате с определенным объемом согласно СОП-КЛД-23-010 «Определение числа CD45-позитивных 7-AAD-негативных клеток в образце».

**Пример:**

$$CD45+7-AAD-абс = 40252 \times 10^6$$

10.8.7 Зафиксировать относительное число ГСК, экспрессирующих определенный фенотипический маркер ( $CD45lowCD34+Маркер+_{относ}$ ), при этом пользоваться графиками 4 и 5.

**Пример.**

$$CD45lowCD34+HLA-DR+_{относ} = 81,0 \%; CD45lowCD34+CD117+_{относ} = 56,0 \%$$

10.8.8 Рассчитать абсолютное число ГСК, экспрессирующих определенный фенотипический маркер в лейкоконцентрате по формуле 1:

$$CD45lowCD34+Маркер+_{абс} = \frac{CD45+7-AAD-абс \times ГСК_{отн} \times CD45lowCD34+Маркер+_{отн}}{10000} \quad (1)$$

где:

$CD45lowCD34+Маркер+_{абс}$  – абсолютное число клеток ГСК, экспрессирующих определенный фенотипический маркер (клеток в мкл),

$CD45+7-AAD-абс$  – абсолютное число CD45-позитивных 7-AAD-негативных клеток в лейкоконцентрате (клеток в мкл),

$ГСК_{отн}$  – относительное количество ГСК в лейкоконцентрате (%),

$CD45lowCD34+Маркер+_{отн}$  – относительное число клеток ГСК, экспрессирующих определенный фенотипический маркер (%).

**Пример.**

$$CD45lowCD34+HLA-DR+_{абс} = \frac{40252 \times 10^6 \times 0,8 \times 81,0}{10000} = 260 \times 10^6$$

10.8.9 Суммировать абсолютные числа клеток ГСК, экспрессирующих определенный фенотипический маркер, в лейкоконцентратах, составляющих трансплантационную дозу.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-25-015	Версия 1
«Фенотипическая характеристика гемопоэтических стволовых клеток»		Стр. 12 из 18

## 11 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

### Препаратору:

11.1 Утилизировать отходы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитрано-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

## 12 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

### 12.1 Внутренний контроль

#### Старшему научному сотруднику:

12.1.1 Организовать оценку параметров качества лабораторного исследования согласно ГОСТ Р 53133.1-2008.

### 12.2 Внешний контроль

#### Старшему научному сотруднику:

12.2.1 Подтверждать качество цитометрического исследования при выполнении заданий в рамках Федеральной системе внешней оценки качества лабораторных исследований по разделу «Проточная цитофлуориметрия».

12.2.2 Оперативно отслеживать результаты и принимать корректирующие меры в тех случаях, когда контрольные критерии не достигаются.

## 13 ЭФФЕКТИВНОСТЬ

### Старшему научному сотруднику:

13.1 В тестируемом образце в пределах ГСК определить относительные значения экспрессии:

- ранних линейно-неограниченных маркеров – HLA-DR, CD117,
- маркеров с миелоидной линией дифференцировки – CD13, CD15,
- маркера Т-линейной лимфоидной линии – CD2,
- маркера В-линейной лимфоидной линии – CD19,
- маркера NK-клеточной линии – CD56,
- маркеров мегакариоцитарной линии дифференцировки – CD41 и CD61,
- маркера эритроидной линии дифференцировки – CD235a.

13.2 Провести сопоставление полученных фенотипических характеристик ГСК (позитивности линейно-неограниченных маркеров и линейно-ассоциированных маркеров) с данными Приложения Б к настоящей методике:

- Учитывать, что нормативные значения фенотипических характеристик ГСК получены на достаточном объеме биологического материала согласно основным положениям данной методики, исследовано 36 образцов ГСК-содержащих лейкоконцентратов, которые были заготовлены от здоровых доноров с целью дальнейшего использования для аллогенной трансплантации больным онкогематологического профиля, у всех доноров после предварительного введения им ростовых гранулоцитарных колониестимулирующих факторов выполнено 2 лейкоцитафереза крови.

- Принимать во внимание, что значения позитивности представлены в виде диапазона варьирования в пределах 1,5 стандартных отклонений от среднего значения.

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	М-КЛД-25-015	Версия 1
«Фенотипическая характеристика гемопоэтических стволовых клеток»		Стр. 13 из 18

13.3 Определить суммарное количество ГСК в суммарной дозе, полученной для одной трансплантации.

13.4 Сопоставить полученные значения количества ГСК с разным фенотипическим профилем с таковыми, представленными в Приложении В к настоящей методике:

- Учитывать, что средняя клеточность (по параметру «CD45+7-AAD-») суммарной трансплантационной дозы, которую можно заготовить от здорового донора, составляет  $79800 [59100; 96000] \times 10^6$ , при этом среднее число ГСК (по содержанию CD34-положительных клеток) в суммарной трансплантационной дозе соответствует  $510,5 [425,2; 867,1] \times 10^6$  (данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха).

- Принимать во внимание, что суммарные количества ГСК представлены в виде диапазона варьирования в пределах 1,5 стандартных отклонений от среднего значения.

13.5 Фиксировать случаи отклонения фенотипического профиля ГСК, недостаточности или избыточного присутствия в трансплантационной дозе определенного вида ГСК.

13.6 Анализировать полученные данные по их влиянию на ряд клинико-лабораторных показателей, характеризующих параметры восстановления различных ростков гемопоэза, его скорости и стабильности.

## 14 НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

14.1 Настоящий Документ разработан на основании следующих нормативных актов и документов:

- Руководство пользователя программного обеспечения «BD FACSDiva версия 6,0»;  
 - Руководство пользователя программного обеспечения «BD FACSDiva версия 7,0»;  
 - Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» / С. В. Хайдуков, Л.В. Байдун, А.В. Зурочка, А.А. Тотолян // Сборник «Стандартизация аналитических технологий лабораторной медицины. Выпуск 2. Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 2013.– 90 с.

- ГОСТ Р 53133.1-2008 Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях.

- Инструкция по использованию набора реагентов для подсчета числа стволовых клеток – «BD Stem Cell Enumeration Kit», каталожный номер 344563;

- Dauber K., et al. Enumeration of viable CD34+ cells by flow cytometry in blood, bone marrow and cord blood: results of a study of the novel BD™ stem cell enumeration kit. // Cytotherapy (2011) 13: 449-458;

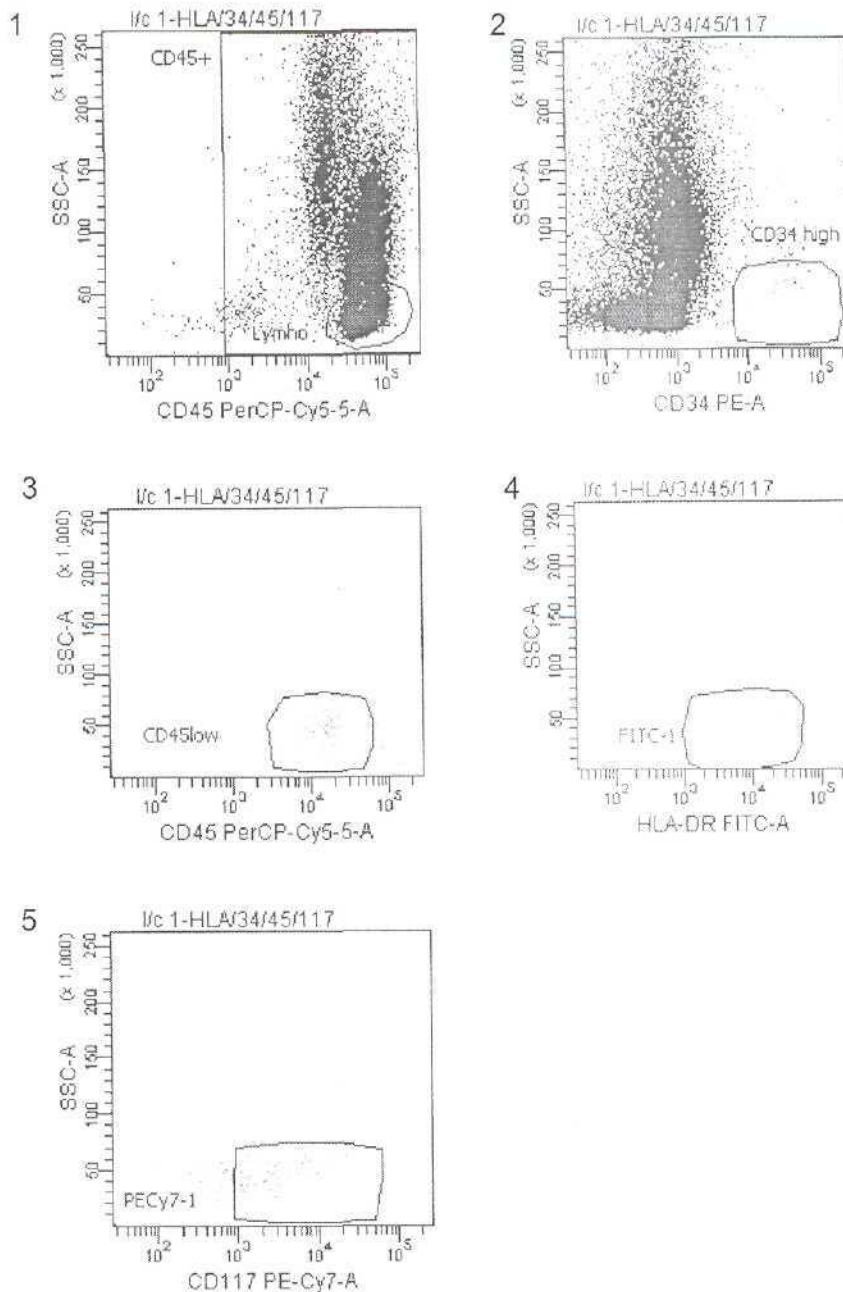
- Lemarie C., et al. A new single-platform method for the enumeration of CD34+ cells // Cytotherapy (2009) 11(6): 804–80.

## 15 ИСТОРИЯ ДОКУМЕНТА

Дата введения в действие	Версия	Описание обновления	Фамилия, инициалы разработчика
	1	Введен впервые	Н.В. Исаева

### Приложение А

#### Графики протокола фенотипической характеристики ГСК



### Приложение Б

#### Нормативы экспрессии фенотипических маркеров на ГСК

Фенотипический маркер гемопоэза	Позитивность ГСК по маркерам гемопоэза $M \pm 1,5 \times \sigma, \%$
HLA-DR	77,7 – 85,1
CD117	52,2 – 61,5
CD13	80,0 – 87,2
CD15	78,1 – 87,1
CD2	6,2 -9,6
CD19	3,7 – 8,1
CD56	5,0 – 8,9
CD41	6,0 – 7,5
CD61	10,1 – 17,9
CD235a	8,9 – 11,5

### Приложение В

#### Абсолютное число видов ГСК в суммарной трансплантационной дозе

Вид ГСК	Фенотипическая характеристика	Абсолютное число в суммарной трансплантационной дозе $M \pm 1,5 \times \sigma, \times 10^6$
Плюрипотентные	CD45lowCD34+HLA-DR+	157 – 877
Плюрипотентные	CD45lowCD34+CD117+	37 – 317
Миелоидно-коммитированные	CD45lowCD34+CD13+	160 – 885
Миелоидно-коммитированные	CD45lowCD34+CD15+	152 – 871
Лимфоидно-коммитированные Т-клеточные	CD45lowCD34+CD2+	15 – 83
Лимфоидно-коммитированные В-клеточные	CD45lowCD34+CD19+	12 – 63
Коммитированные в сторону NK-клеток	CD45lowCD34+CD56+	14 – 75
Мегакариоцитарно- коммитированные	CD45lowCD34+CD41+	13 – 74
Мегакариоцитарно- коммитированные	CD45lowCD34+CD61+	27 – 150
Эритроидно-коммитированные	CD45lowCD34+CD235a+	19 – 107