

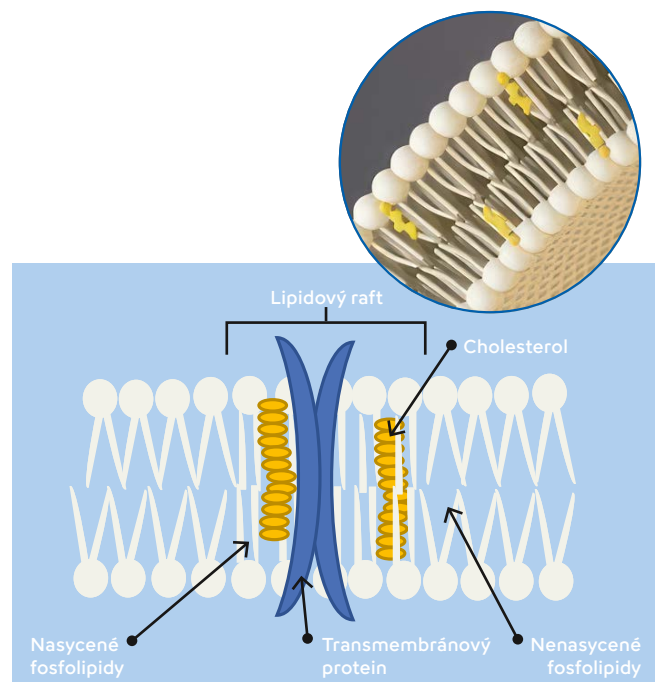
Funkční stav buněk

Za hranice mikroskopie: Spolehlivá charakterizace funkčního stavu leukocytů

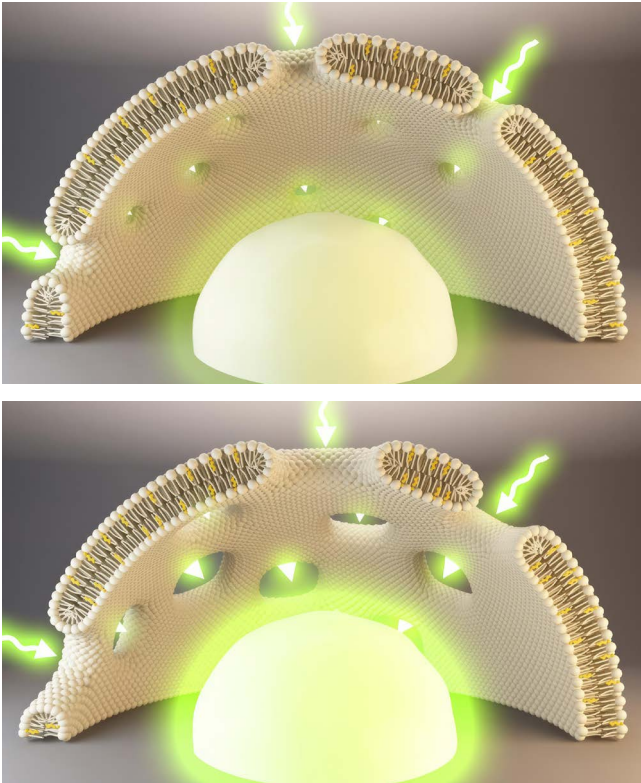
Uvnitř buněčné membrány

Počátky výzkumu složení buněčné membrány sahají do 80. let 19. století, kdy Overton v roce 1889 objevil přítomnost lipidové hraniční vrstvy. Následovaly další objevy, které pomohly vytvořit konkrétní obraz složek buněčné membrány, jak je známe dnes.

Buněčné membrány jsou složeny z dvouvrstvy fosfolipidů, obrácených k sobě hydrofobními konci. Mezi těmito konci interaguje řada druhů lipidů s proteiny a vytváří lipidové rafty regulující dynamickou membránovou bioaktivitu. Přesněji řečeno, lipidové rafty jsou submikroskopické specializované oblasti buněčné membrány tvořené jedinečnými složkami, bohatými na cholesterol a nasycené mastné kyseliny (obr. 1). Tyto dvě složky významně přispívají k tuhosti, těsné kompaktní struktuře a vysoké dynamice lipidových raftů. Lipidové rafty byly zpočátku označovány jako *membránové frakce odolné vůči detergentům*, protože mají pevně sbalené složky odolávající detergentům. Tyto sestavy jsou velmi dynamické a mohou měnit své klastrování v závislosti na aktivitě a dozrávání buněk, nebo na malignitě buněk.



Obr. 1 Složení buněčné membrány s obsahem lipidových raftů



Obr. 2 Buněčná membrána po reakci s lyzačními a fluorescenčními reagensy Sysmex. V závislosti na složení lipidů je membrána perforována odlišně, což umožňuje fluorescenční značce střední (nahore) nebo vysokou prostupnost (dole).

Uvádí se, že lipidové rafty jsou ve zvýšených hladinách přítomny v buňkách s aktivní extracelulární komunikací, jako jsou aktivní T-lymfocyty [1], a v rakovinových buňkách [2].

Další studie ukázaly, že cholesterol hraje hlavní roli v rezistenci buněčné membrány vůči neiontovým reagensům, jako je Triton X-100 [3], přičemž množství cholesterolu úměrně naznačuje stupeň rezistence.

Tohoto pozorování jsme využili ve vývoji reagensů Sysmex obsahujících neiontové detergenty. Jejich požadovaným účinkem je, aby reagensie perforovaly buněčnou membránu specifickým způsobem v závislosti na jejím složení a stavu aktivity buňky.

Rozlišovací možnosti fluorescenčních kanálů analyzátorů Sysmex řady XN vychází z jejich schopnosti poskytovat informace o složení buněčné membrány a vnitřní struktuře buňky. Buněčná membrána je perforována odlišně v závislosti na použité lyzační reagensii, zatímco její lipidové rafty zůstávají téměř neporušené. Po perforaci může fluorescenční značka vstoupit do buňky a specificky označit dané struktury, a tím vytvořit jedinečnou informaci o buňce, která je specifická pro zvolený měřicí kanál (obr. 2).

Fluorescence takto označené buňky závisí na:

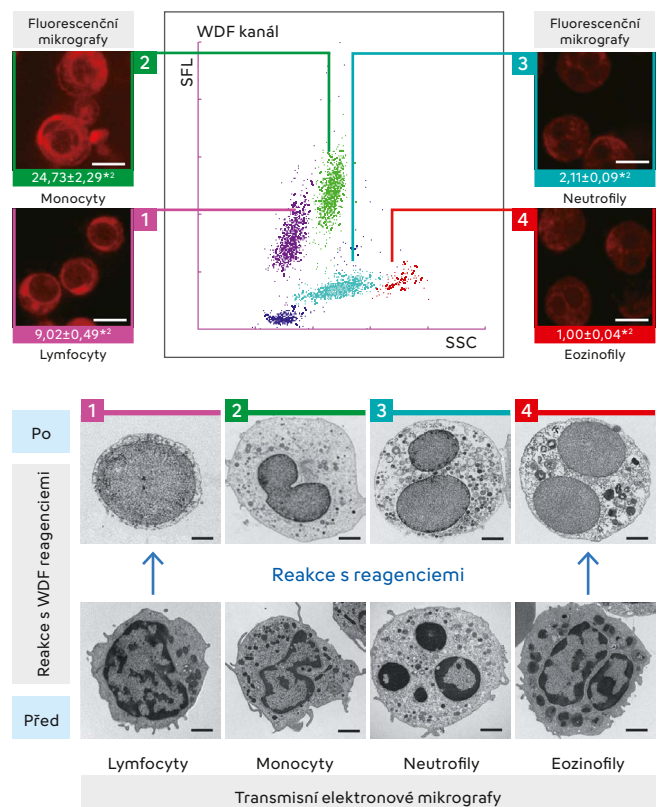
1. stupni permeabilizace membrány
2. obsahu DNA
3. obsahu RNA

Princip analýzy ve WDF kanálu

Měřicí kanál pro diferenciaci leukocytů (WDF) využívá fluorescenční značku, která dovoluje diferencovat jednotlivé subpopulace na základě složení jejich buněčné membrány a obsahu cytoplazmy. Jak už bylo popsáno, lyzační reagensie nejprve perforuje buněčnou membránu a ponechává buňky do značné míry neporušené. Intracelulární RNA je poté označena fluorescenční značkou.

Ve studii, kterou publikoval Kawauchi *et al.* [4], byla sledována morfologie leukocytů před a po reakci s reagensy WDF kanálu. Studie sledovala zejména účinek těchto reagensů na různé subpopulace leukocytů a výslednou intenzitu jejich fluorescence.

Obr. 3 Subpopulace leukocytů diferencované kanálem WDF. Populace lymfocytů, monocytů, neutrofilů a eozinofilů jsou odděleny po značení jejich RNA na základě jejich fluorescence, intracelulární komplexnosti a velikosti buňky. Převzato od Kawauchi *et al.* [4].



*2 Obrazovou analýzou byla určena intenzita fluorescence (průměr ±SD) každého podtypu leukocytů, kdy byla průměrná intenzita fluorescence eozinofilů stanovena jako 1,0.

Dále byla zkoumána vnitřní struktura těchto buněk transmisí elektronovou mikroskopií (obr. 3). Ve srovnání s jinými leukocyty mají lymfocyty nejméně komplexní vnitřní strukturu. To vysvětluje, proč mají signál s nízkým bočním rozptylem (SSC) a jsou jasně odděleny od ostatních normálních podtypů leukocytů. Reaktivní lymfocyt tak může být odlišen od normálního díky jeho zvýšené cytoplazmatické aktivitě (obsahu RNA). Monocyty se odlišují větší velikostí a vyšším obsahem RNA a vykazují velmi vysokou intenzitu fluorescence.

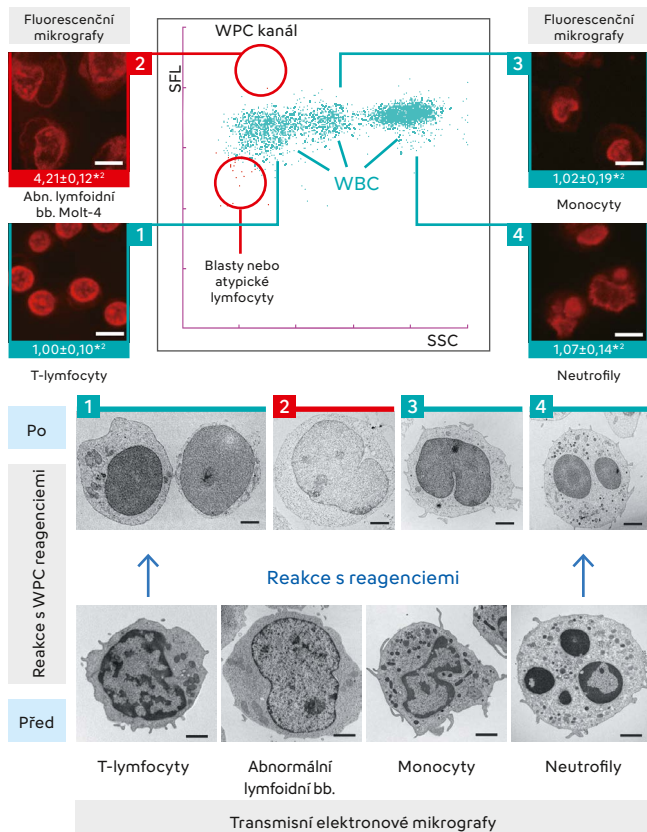
... a princip analýzy ve WPC kanálu

Kanál prekurzorů bílé řady a patologických buněk (WPC) také využívá svých reagensí k rozlišení mezi různými subpopulacemi leukocytů. Lyzační reagentie WPC kanálu ovlivňuje mnohem silněji membránové lipidy než ta, která se používá v kanálu WDF. To je způsobeno odlišnou povrchově aktivní látkou a delší inkubací. Výsledkem této reakce je vyšší míra permeability buněčné membrány. Navíc má fluorescenční značka WPC kanálu vyšší koncentraci polymethinu než ve WDF kanálu, což umožňuje značení nejen cytoplazmatické RNA, ale také DNA uvnitř jádra.

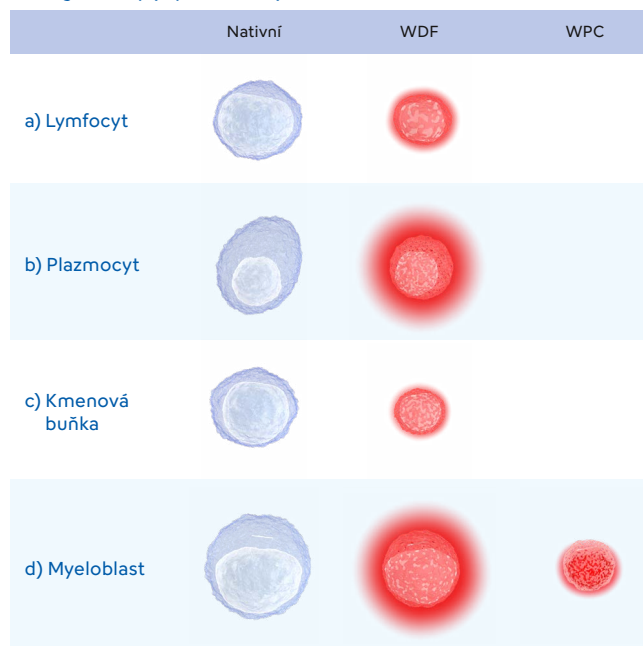
Čím vyšší je stupeň perforace membrány lyzační reagentií WPC kanálu, tím více buněčného obsahu uniká póry. To má za následek menší velikost buňky, do které vstupuje větší množství fluorescenční značky a označuje i jadernou DNA. Výsledkem reakce je vyšší intenzita fluorescence. Například struktura nereaktivních lymfocytů je nejméně komplexní a zároveň jsou menší než ostatní subtypy leukocytů; proto mohou být ve scattergramu snadno odděleny od ostatních normálních zralých leukocytů. Nezralé buňky mohou být odděleny od zralých buněk díky rozdílnému obsahu lipidů v buněčné membráně. Nízký obsah lipidů v membránách těchto buněk (kmenové buňky, blasty atd.) je činí odolnějšími vůči permeabilizaci, a proto jsou jejich fluorescenční signály nižší.

Pokročilá technologie WPC kanálu umožňuje také rozlišení podezřelých maligních buněk od zdravých buněk. To platí pro neoplastické lymfocyty, charakterizované snadno permeabilními membránami, díky kterým tyto buňky vykazují výrazně vyšší fluorescenční signály (obr. 4).

Obr. 4 Subpopulace leukocytů diferencované WPC kanálem. Populace T-lymfocytů, abnormální lymfoidní buňky, monocyty a neutrofilů jsou rozlišeny po značení jejich DNA na základě fluorescence, intracelulární komplexity a velikosti buněk. Převzato od Kawauchi et al. [4].



Obr. 5 Rozdíly v působení reagensí WDF a WPC kanálů umožňují navzájem odlišit zralé normální buňky (lymfocyty; a), aktivované buňky (plazmatické buňky; b), prekurzorové buňky (kmenové buňky; c) a maligní buňky (myeloblast; d).



*2 Obrazovou analýzou byla určena intenzita fluorescence (průměr ±SD) každého podtypu leukocytů, kdy byla průměrná intenzita fluorescence T-lymfocytů stanovena jako 1,0.

Kanály WDF a WPC společně utvářejí celkový obraz

Rozdíl v reagentech a jejich působení ve WDF a WPC kanálu generují řadu informací, které se vzájemně doplňují. I když lyzační reagentie ve WDF kanálu působí jemněji a zachovává intracelulární strukturu leukocytů, fluorescenční značka WPC kanálu cílí na jiné intracelulární organely. To vysvětluje, proč nativní lymfocyt vypadá po reakci s reagenty WDF kanálu menší, než když je vystaven reagentům WPC kanálu (obr. 5a). Aktivovaný lymfocyt má vyšší cytoplazmatickou reaktivitu, a proto se zdá, že je po reakci ve WDF kanálu větší než ve WPC kanálu (obr. 5b). Kmenová buňka se reakcí v obou kanálech zmenšuje, ale její jádro se barví odlišně (obr. 5c). Maligní buňky díky svému abnormálnímu složení membrány umožňují fluorescenční značce v kanálu WPC lepší přístup ke své DNA (obr. 5d).

Kombinace informací z obou kanálů umožňuje na analyzátoch XN použít pracovní postup, který optimalizuje detekci reaktivních případů při vyloučení maligních případů [5]. To pomáhá:

a) určit stav imunitní odpovědi

Případy infekce a zánětu lze zjistit snadněji pomocí *rozšířených parametrů zánětu, EIP*. Tyto parametry kvantifikují aktivované lymfocyty, nezralé granulocyty a stav aktivace neutrofilů. Více informací naleznete ve [White Paper Nové hematologické parametry pro rychlé monitorování odpovědi imunitního systému](#).

b) odlišit zralé buňky od nezralých

Nezralé buňky, jako jsou kmenové buňky, mohou být odlišeny na základě jejich střední velikosti (střední FSC), nízké granularity (nízké SSC) a relativně nízké intenzity fluorescence (nízké až střední SFL). Protože se jejich membránové složení liší od jiných buněk se srovnatelnou velikostí a komplexitou (jako jsou NRBC), je možné je přesně odlišit. Více informací naleznete ve [White Paper Efektivní kontrola procesu aferézy kmenových buněk](#).

Závěr

Pokročilá technologie fluorescenční průtokové cytometrie společnosti Sysmex se speciálním složením reagentů jde nad rámec morfologického hodnocení. Vyhodnocuje mnohem více informací o buňce, včetně ověření jejího funkčního stavu. Kombinovaná měření z WDF a WPC kanálů poskytují hlubší vhled na odpověď imunitního systému pacienta a určení stadia případné infekce, nebo ověření přítomnosti nezralých či maligních buněk, jako součást běžného screeningového vyšetření krve.

Reference

- [1] **Tuosto L et al. (2001):** Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. [Eur J Immunol. 31\(2\): 345–9.](#)
- [2] **Li YC et al. (2006):** Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. [Am J Pathol. 168\(4\): 1107–18.](#)
- [3] **El Kirat K et al. (2007):** Cholesterol modulation of membrane resistance to Triton X-100 explored by atomic force microscopy. [Biochim Biophys Acta. 1768\(9\): 2300–9.](#)
- [4] **Kawauchi S et al. (2014):** Comparison of the Leukocyte differentiation Scattergrams Between the XN-Series and the XE-Series of Hematology Analyzers. [Sysmex Journal International. Vol. 24 No. 1.](#)
- [5] **Schuff-Werner P et al. (2016):** Performance of the XN-2000 WPC channel flagging to differentiate reactive and neoplastic leukocytosis. [Clin Chem Lab Med. 54\(9\): 1503–10.](#)

Stáhněte si White Papers s dalšími tématy z našich stránek:
www.sysmex.cz/whitepapers