

Funkční stav buněk

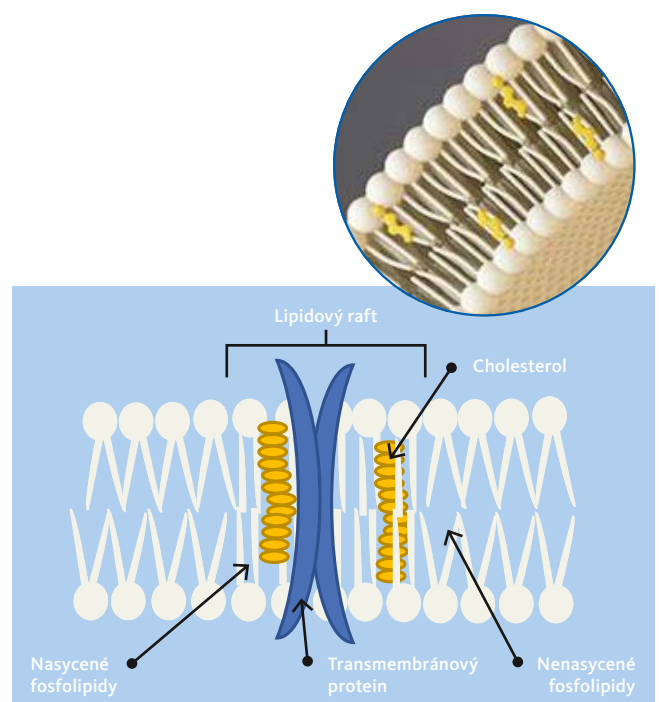
Za hranice mikroskopie: Spolehlivá charakterizace funkčního stavu leukocytů

Uvnitř buněčné membrány

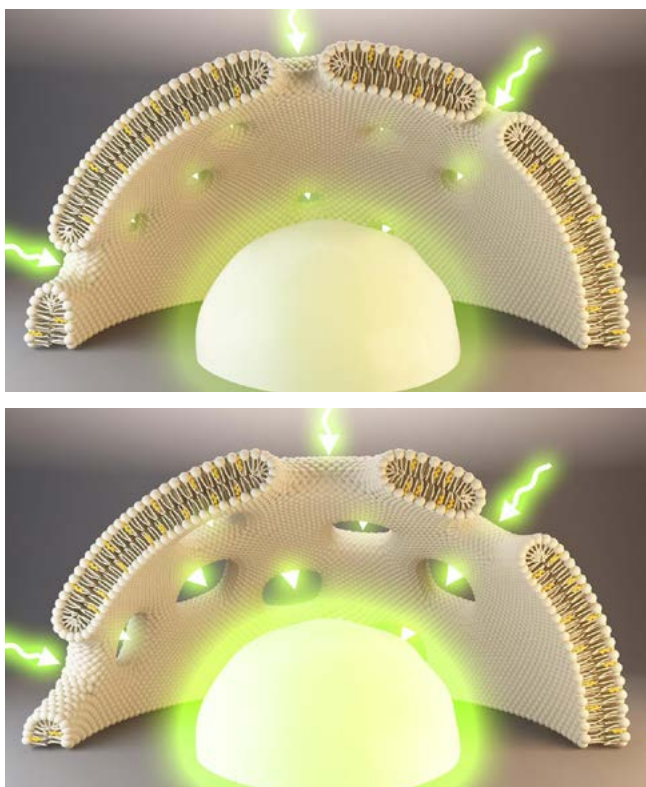
Počátky výzkumu složení buněčné membrány sahají do 80. let 19. století, kdy Overton v roce 1889 objevil přítomnost lipidové hraniční vrstvy. Následovaly další objevy, které pomohly vytvořit konkrétní obraz složek buněčné membrány, jak je známe dnes.

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 aktivaci a dozrávání buněk, nebo na malignitě buněk.

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].



Obr. 1 Složení buněčné membrány s obsahem lipidových raftů



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

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

Tohoto pozorování jsme využili ve vývoji reagenčních Sysmex obsahujících neiontové detergenty. Jejich požadovaným účinkem je, aby reagence 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 struktury buňky. Buněčná membrána je perforována odlišně v závislosti na použité lyzační reagenční, 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).

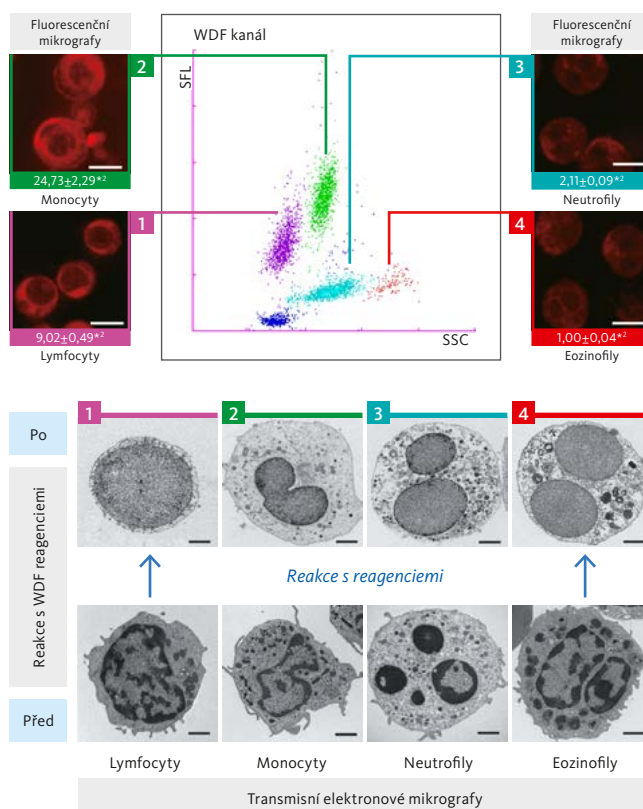
Fluorescence takto označené buňky závisí na:

1. stupni permeabilizace
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 reagence 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 reagenčními WDF kanálu. Studie sledovala zejména účinek těchto reagenčních na různé subpopulace leukocytů a výslednou intenzitu jejich fluorescence. Dále byla zkoumána vnitřní struktura těchto buněk pomocí transmisní elektronové mikroskopie (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.



*2 Byla provedena obrazová analýza a byla vyjádřena intenzita fluorescence (průměr ±SD) každého podtypu bílých krvinek, kdy byla průměrná intenzita fluorescence eozinofilů stanovena jako 1,0.

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].

... a princip analýzy ve WPC kanálu

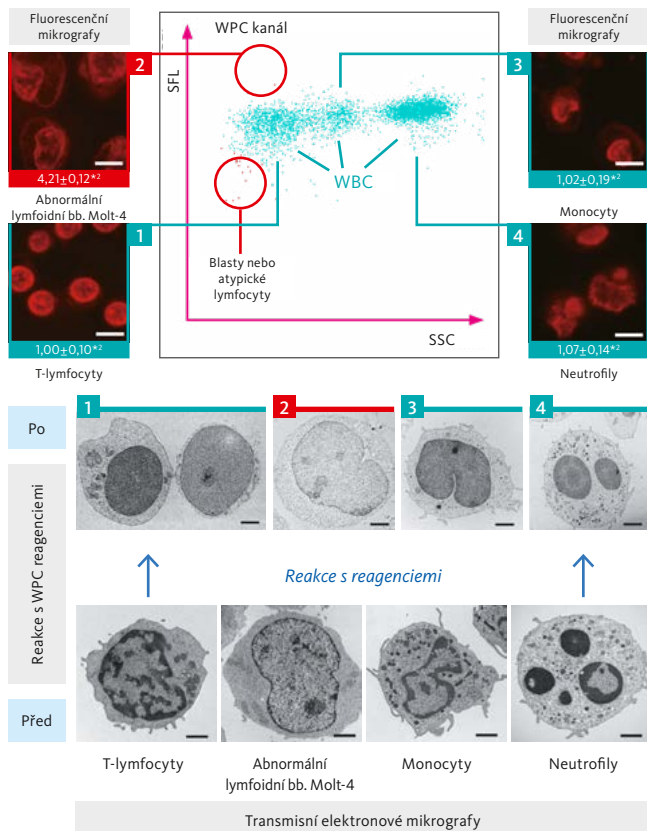
Kanál prekurzorů bílé řady a patologických buněk (WPC) také využívá svých reagentů k rozlišení mezi různými subpopulacemi leukocytů. Lyzační reagentie WPC kanálu ovlivňuje mnohem silněji membránové lipidy než ta, která se používá v kanálu WDF. To je způsobeno odlišnou povrchově aktivní látkou a delší 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.

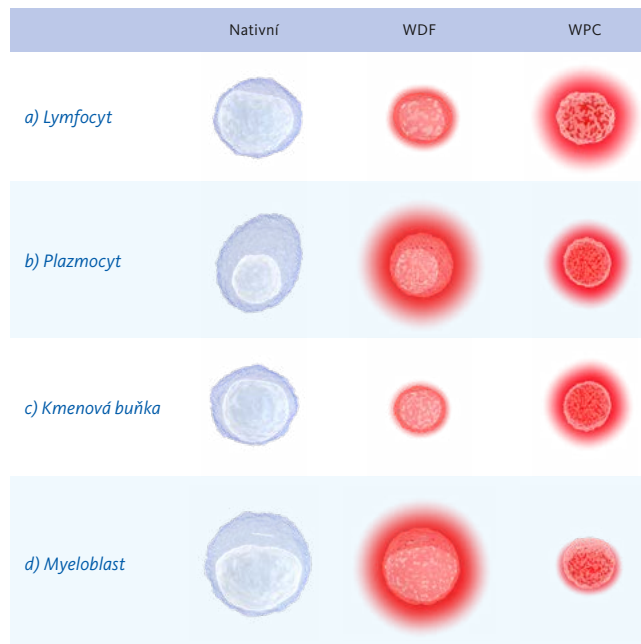
Pokročilá technologie WPC kanálu umožňuje také rozlišení podezřelých maligních buněk od zdravých buněk. To platí pro neoplastické lymfocyty, charakterizované snadno permeabilními membránami, díky kterým tyto buňky vykazují výrazně vyšší fluorescenční signály (obr. 4).

Kanály WDF a WPC společně utvářejí celkový obraz

Rozdíly v reagentiích 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 orgány. To vysvětluje, proč nativní lymfocyt vypadá po reakci s reagentiemi WDF kanálu menší, než když je vystaven reagentiím 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).



*2 Byla provedena obrazová analýza a byla vyjádřena intenzita fluorescence (průměr ±SD) každého podtypu bílých krvinek, kdy byla průměrná intenzita fluorescence T-lymfocytů stanovena jako 1,0.



Obr. 5 Rozdíly v působení reagentií 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).

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

Kombinace informací z obou kanálů umožňuje na analyzátorech 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.

Literatura

- [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.

Volně přístupné Sysmex White Papers s dalšími tématy naleznete na:

www.sysmex.cz/whitepapers