

## Funkcjonalność komórek

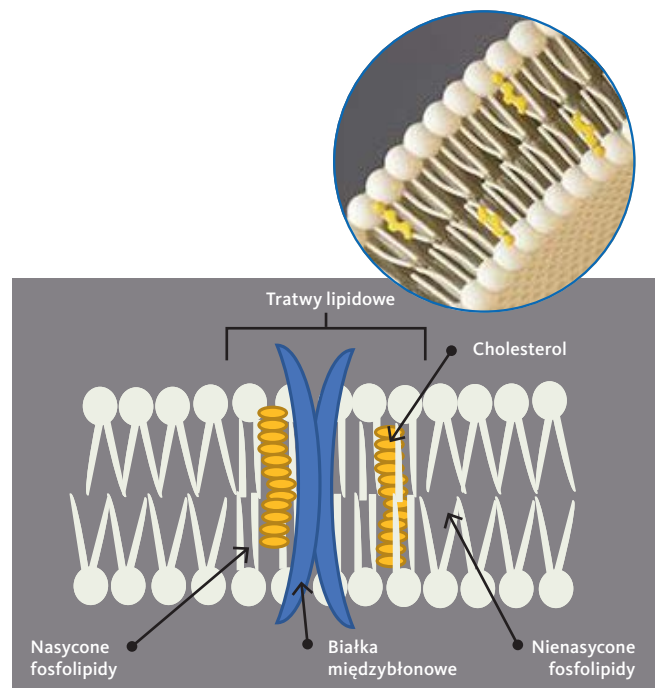
# Wykraczając poza widoczne: wiarygodne przedstawienie funkcjonalności WBC

### Wewnątrz błony komórkowej

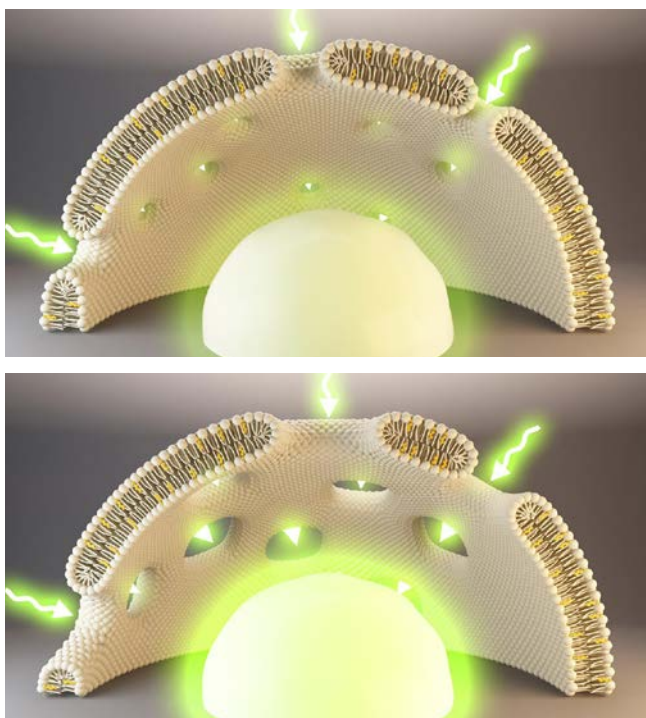
Badania nad budową błony komórkowej sięgają lat 80. XIX wieku, gdy w 1889 Overton odkrył obecność granicznej warstwy lipidowej. Dalsze badania potwierdziły jego odkrycie, pozwalając uzyskać obraz budowy błony komórkowej jaki znamy dzisiaj.

Błony komórkowe zbudowane są z dwuwarstwy lipidowej. W obrębie tych warstw wiele rodzajów lipidów oddziałując z białkami reguluje dynamiczną bioaktywność błony. Tratwy lipidowe są wyspecjalizowanymi submikroskopijnymi regionami błony komórkowej, zbudowanymi z unikalnych komponentów. Są bogate w cholesterol i nasycone kwasy tłuszczowe (ryc. 1), które przyczyniają się do sztywnej, ciasno upakowanej struktury oraz wysokiej dynamiki tratw lipidowych. Co więcej, tratwy lipidowe były początkowo określane jako „detergento-odporne frakcje błony”. Interesującym jest, że zespoły te cechuje wysoka dynamiczność. Mogą one różnicować swoje klastry w zależności od stanu dojrzałości i aktywacji komórki, jak ma to miejsce w przypadku zmian rozrostowych.

Podwyższony poziom tratw lipidowych jest obserwowany w komórkach z aktywną komunikacją pozakomórkową, takich jak limfocyty T [1] i w komórkach rakowych [2].



**Ryc. 1** Skład budowy błony komórkowej ukazujący zawartość tratw lipidowych



**Ryc. 2** Błona komórkowa po działaniu odczynnika lizującego Sysmex i fluorochromu. Błona jest perforowana różnie, w zależności od jej składu lipidowego, wzbudzając łagodny (górny obraz) lub silny (dolny obraz) sygnał fluorescencyjny

Ponadto badania wykazały, że cholesterol odgrywa główną rolę w odporności błony komórkowej na niejonizowane związki takie jak Triton X-100 [3], w wyniku czego ilość cholesterolu sugeruje stopień odporności.

Właściwość ta została wykorzystana przy tworzeniu odczynników Sysmex zawierających niejonizowane detergenty. Oczekiwany efekt jest perforacja błony komórkowej przez odczynnik w bardzo specyficzny sposób, zależny od budowy i stanu aktywacji komórki.

Wyróżniająca cecha fluorescencyjnych kanałów Sysmex serii XN pochodzi od ich zdolności do przekazania informacji o strukturze błony komórkowej i wewnętrznej budowie komórki. Sposób perforacji błony komórkowej zależy od użytego odczynnika lizującego, jednak tratwy lipidowe pozostają niemal nienaruszone. Dzięki powstałej perforacji odczynniki fluorescencyjne mogą przedostać się do wnętrza komórki i wyznakować odpowiednie struktury. Pozwala to na stworzenie unikatowej, specyficznej dla kanału informacji (ryc. 2).

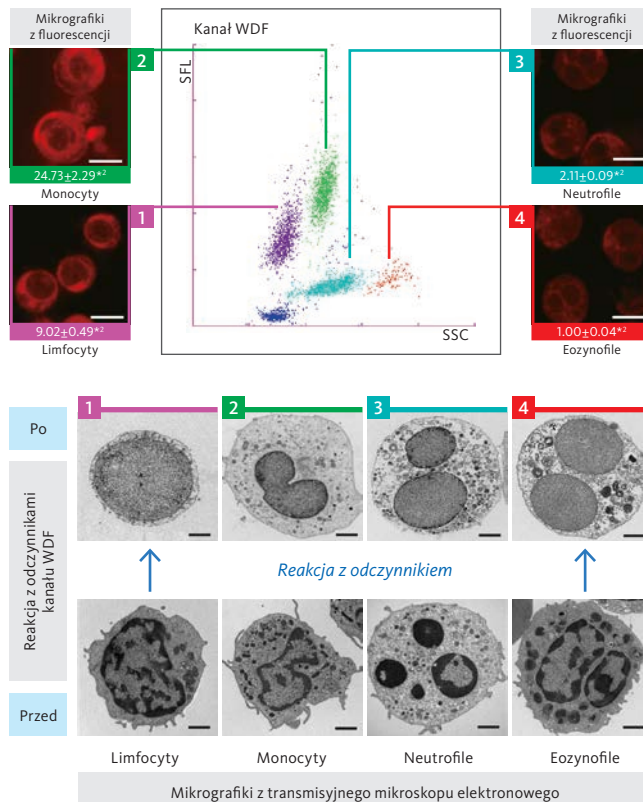
Fluorescencja komórek zależy od:

1. stopnia przepuszczalności błony,
2. zawartości DNA, i/lub
3. zawartości RNA.

## Zasada działania kanału WDF

Kanał różnicujący białe krwinki (WDF) wykorzystuje markery fluorescencyjne, które wyodrębniają poszczególne frakcje białych krwinek na podstawie budowy ich błony komórkowej i składu cytoplazmy. Jak wspomniano wcześniej, odczynnik lizujący kanału WDF perforuje błonę komórkową, pozostawiając w nienaruszonym stanie większość komórki. Następnie, wewnątrzkomórkowe RNA jest znakowane przez marker fluorescencyjny.

W badaniach prowadzonych przez Kawauchi i wsp. [4], morfologia WBC była oceniana przed i po zastosowaniu odczynnika WDF. Skupiono się na efekcie oddziaływań odczynników na różne podtypy WBC i wynikającej z tego intensywności fluorescencji. Ponadto, oceniono wewnętrzną strukturę tych komórek z użyciem mikroskopu elektronowego (ryc. 3). Limfocyty w porównaniu z innymi WBC mają najmniej skomplikowaną strukturę wewnętrzną. Wyjaśnia to, dlaczego posiadają niski sygnał światła rozproszonego bocznie (SSC – Side Scattered Light), a co za tym idzie – ich wyraźne oddzielenie od pozostałych WBC. Interesującym jest, że limfocyty o charakterze reaktywnym mogą być różnicowane z prawidłowymi limfocytami przez ich podwyższoną aktywność cytoplazmatyczną (zawartość RNA). Monocyty posiadają większy rozmiar i wyższą zawartość RNA, co przekłada się na silniejszy sygnał fluorescencji.



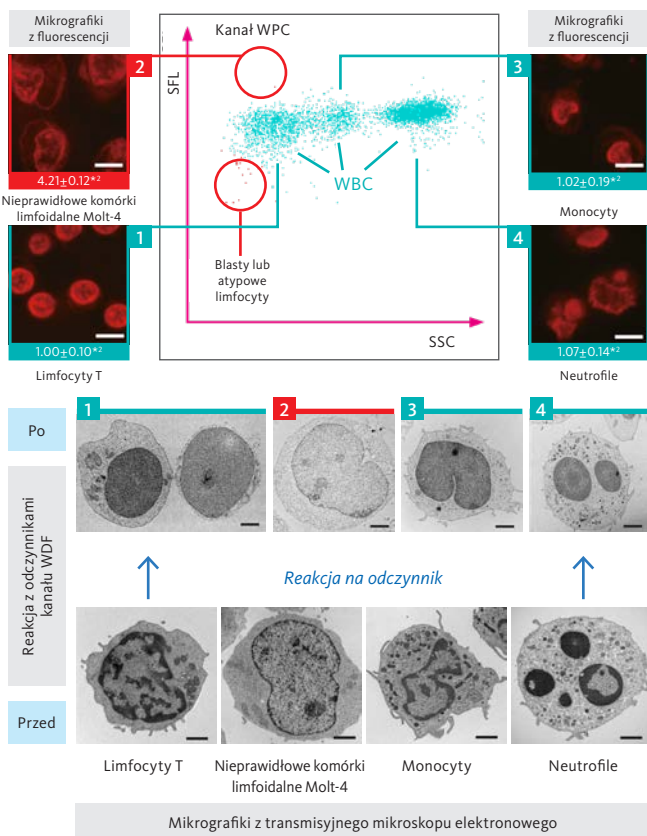
<sup>\*2</sup> Analiza obrazu pozwoliła na liczbowe przedstawienie intensywności fluorescencji (średnia ± SD) każdej populacji WBC. Jako odnośnik przyjęto średnią fluorescencję eozynofili.

**Ryc. 3** Różnicowanie WBC w kanale WDF. Populacje limfocytów, monocytów, neutrofilii i eozynofili są wyodrębniane ze względu na różnice w wyznakowaniu RNA, a także wewnętrznej złożoności. Obraz pochodzi z pracy Kawauchi i wsp. [4].

## Zasada działania kanału WPC

Kanał komórek prekursorowych i patologicznych (WPC) używa także odczynników umożliwiających różnicowanie poszczególnych podtypów WBC. Jednakże odczynnik lizujący kanału WPC ma silniejszy wpływ na lipidy błonowe niż odczynnik używany w kanale WDF. Jest to spowodowane innym surfaktantem i dłuższym okresem inkubacji. Konsekwencją tego jest wyższy stopień przepuszczalności błony komórki. Ponadto odczynnik fluorescencyjny kanału WPC jest bardziej stężony niż ten z kanału WDF, co pozwala na wyznakowanie DNA wewnątrz jądra, a nie tylko cytoplazmatycznego RNA.

Jednakże im wyższy stopień perforacji błony przez odczynnik kanału WPC, tym więcej zawartości cytoplazmy przedostaje się przez pory. Skutkuje to zmniejszeniem rozmiaru komórki, większym wnikiem markera fluorescencyjnego do komórki i wiązaniem go z DNA, a w konsekwencji silniejszym sygnałem fluorescencyjnym. Dla przykładu: niereaktywne limfocyty mają najmniej skomplikowaną strukturę i są mniejsze niż inne podtypy WBC, dlatego też mogą być łatwo odróżnione od innych dojrzałych normalnych WBC na skatergramie. Niedojrzałe komórki (komórki macierzyste, blasty itp.) mogą być odróżnione od komórek dojrzałych poprzez uboższy skład lipidowy ich błony, który skutkuje ich większą odpornością na permeabilizację, co ostatecznie powoduje niższy sygnał fluorescencji w tych komórkach.

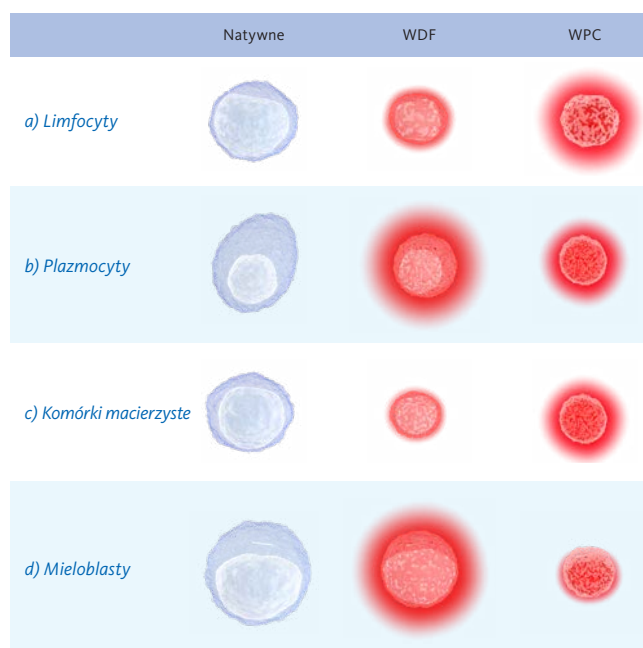


\*2 Analiza obrazu pozwoliła na liczbowe przedstawienie intensywności fluorescencji (średnia±SD) każdej populacji WBC. Jako odnośnik przyjęto średnią fluorescencję eozynofili.

Zaawansowana technologia kanału WPC pozwala także na rozróżnienie komórek rozrostowych od komórek prawidłowych. Dotyczy to nieprawidłowych limfocytów, posiadających łatwo przepuszczalną błonę, które będą emitowały wyraźnie silniejszy sygnał fluorescencji (ryc. 4).

## Wspólny obraz z kanału WDF i WPC

Różnice w odczynnikach i trybach pracy pomiędzy kanałami WDF i WPC powodują otrzymywanie różnych informacji, które wzajemnie się uzupełniają. Odczynnik lizujący kanału WDF oddziałuje łagodniej i zachowuje strukturę wewnętrzną WBC, podczas gdy odczynnik kanału WPC skupia się na innych strukturach wewnętrznych. Wyjaśnia to, dlaczego natywne limfocyty wyglądają na mniejsze po kontakcie z odczynnikami z kanału WDF w stosunku do tych z kanału WPC (ryc. 5a). Jednakże, gdy limfocyty stają się aktywne posiadają większą aktywność cytoplazmatyczną, dlatego po działaniu odczynników z kanału WDF wydają się większe niż w przypadku odczynników z kanału WPC (ryc. 5b). Komórki macierzyste obkurczają się przy użyciu każdego z wyżej wymienionych odczynników, ale ich jądro wybarwia się różnie (ryc. 5c). Natomiast komórki rozrostowe posiadają nietypowy skład błony, który powoduje lepszy dostęp do ich DNA w kanale WPC (ryc. 5d).



**Ryc. 5** Różnice w mechanizmie wybarwienia pomiędzy kanałem WDF a WPC pozwalają na rozróżnienie między prawidłowymi dojrzałymi komórkami (limfocyty; a), komórkami aktywowanymi (plazmocyty; b), komórkami prekursorowymi (komórka macierzysta; c) i komórkami rozrostowymi (mieloblast; d).

**Ryc. 4** Różnicowanie WBC w kanale WPC. Populacje limfocytów T, nieprawidłowych komórek limfoidalnych, monocytów i neutrofilów są wyodrębniane ze względu na różnice w wyznakowaniu DNA oraz wewnętrznej złożoności. Obraz pochodzi z pracy Kawauchi i wsp. [4]

Połączenie informacji z obydwu kanałów na analizatorach serii XN pozwala na zoptymalizowanie wykrywania próbek pozytywnych i wykluczenie w nich zmian rozrostowych [5]. Pomaga to:

#### a) poznać status odpowiedzi immunologicznej

Stany zapalne i infekcje mogą być o wiele łatwiej wykryte dzięki „Zaawansowanym Parametrom Stanu Zapalnego”. Parametry te określają ilościowo aktywowane limfocyty, niedojrzałe granulocyty i status aktywacji neutrofilii. Więcej informacji możesz znaleźć w White Paper „Szybkie monitorowanie odpowiedzi układu odpornościowego za pomocą nowych parametrów hematologicznych”.

#### b) różnicować komórki dojrzałe od niedojrzałych

Komórki niedojrzałe np. komórki macierzyste mogą być różnicowane poprzez ich rozmiar (średnią intensywność światła rozproszonego czołowo – FSC), niską granulację (niską intensywność światła rozproszonego bocznie - SSC) i relatywnie niską fluorescencję (niska-średnia intensywność światła bocznej fluorescencji – SFL). Co więcej, ponieważ skład ich błony komórkowej różni się od innych komórek o podobnym rozmiarze i wewnętrznej złożoności (np. erytroblastów), możliwe jest ich dokładne różnicowanie. Więcej informacji odnajdziesz w White Paper „Przeprowadzenie efektywnej aferezy komórek macierzystych”.

## Wnioski

Zaawansowana technologia fluorescencyjnej cytometrii przepływowej Sysmex z wyspecjalizowanymi odczynnikami wykracza poza zakres morfologicznego wymiaru. Pozwala to uzyskać o wiele więcej informacji z komórek, wliczając w to ich funkcjonalność. Połączenie pomiarów z kanału WDF i WPC umożliwia bardziej dogłębną ocenę układu odpornościowego pacjenta, stopnia zaawansowania infekcji jak i obecności komórek niedojrzałych i/lub rozrostowych.

## Źródła

- [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.