

Techniki analizy różnicowania się komórek hematopoetycznych

Warunki wstępne

1. Znajomość podstawowych informacji z zakresu hematopoezy u ssaków - hematopoetyczne komórki macierzyste, linie hematopoetyczne, etapy hematopoezy, regulacja hematopoezy.
2. Wiedza dotycząca przebiegu cyklu komórkowego.

Wstęp:

Różnicowanie komórek to proces, w wyniku którego mniej wyspecjalizowana komórka ulega stopniowej specjalizacji strukturalnej i czynnościowej. U podstaw tego procesu leżą mechanizmy ustalające wzór ekspresji genów charakterystyczny dla danego typu komórek. Zdolność danej komórki do różnicowania jest określana przez jej potencję. Hematopoetyczna komórka macierzysta – HSC (ang. hematopoietic stem cell) to komórka multipotentna, która może różnicować się w wyspecjalizowane komórki krwi. Ponadto HSC posiada zdolność do proliferacji i samoodnowy. Proces hematopoezy rozpoczyna się od asymetrycznego podziału HSC, w wyniku którego jedna z komórek potomnych pozostaje komórką macierzystą, zapewniając samoodnowę populacji HSCs, natomiast druga komórka ulega dalszemu różnicowaniu. Komórki progenitorowe, powstające z HSCs, mogą różnicować się do komórek progenitorowych linii mieloidalnej i limfoidalnej. Wybór i kontrola dalszej drogi różnicowania podlegają ścisłej kontroli przez skoordynowane działanie cytokin, czynników wzrostu, aktywowanych czynników transkrypcyjnych oraz czynników epigenetycznych.

Proces różnicowania się komórek hematopoetycznych można analizować na modelach *in vivo*, jak również w warunkach *in vitro* z zastosowaniem hodowli pierwotnych lub linii komórkowych, np. linii komórek białaczkowych. Wybór typu i stopnia dojrzałości komórek zależy od celu prowadzonych badań. Dogodnym modelem do badań różnicowania się komórek hematopoetycznych *in vitro* jest linia komórkowa ludzkiej białaczki promielocytarnej HL-60. W zależności od zastosowanego czynnika indukującego, komórki HL-60 mogą różnicować się w kierunku monocytów lub granulocytów. Innymi modelami są ludzkie komórki białaczki promonocytarnej U937, które mogą różnicować się do monocytów oraz ludzkie komórki erytroleukemiczne K562 zdolne do różnicowania w kierunku

erytrocytów i megakariocytów. Prowadzenie badań nad różnicowaniem się komórek hematopoetycznych *in vitro* wymaga zastosowania ścisłych warunków hodowli, w tym określonej gęstości komórek.

Różnicowaniu i dojrzewaniu komórek linii hematopoetycznych towarzyszą swoiste zmiany na poziomie molekularnym, biochemicznym i morfologicznym, które warunkują pełnienie przez te komórki określonych funkcji biologicznych. W celu analizy procesu różnicowania komórek hematopoetycznych można zastosować szereg technik, między innymi:

- określenie zmian w cyklu komórkowym i proliferacji komórek. W przebiegu hematopoezy wyróżnia się stadia obejmujące podziały komórek oraz stadia dojrzewania. W komórkach zróżnicowanych, dojrzewających obserwuje się zahamowanie cyklu komórkowego i proliferacji (komórki pozostają w fazie G0/G1 cyklu komórkowego).
- morfologiczną ocenę komórek hematopoetycznych. Analiza morfologiczna jest możliwa w przypadku komórek o cechach morfotycznych pozwalających na ich rozpoznanie w rozmazach barwionych rutynowo (np. barwienie May-Grunwald/Giemsa; Wright/Giemsa);
- oznaczenie aktywności enzymów, czy innych substancji wewnątrzkomórkowych, specyficznych dla jednej linii komórkowej lub też etapu różnicowania komórki. Przykładem jest analiza aktywności mieloperoksydazy (MPO) metodą cytochemiczną. MPO jest enzymem, należącym do peroksydaz, który katalizuje reakcje powstawania kwasu podchlorawego, związku chemicznego o silnych właściwościach bakteriobójczych. MPO występuje wyłącznie w komórkach należących do szeregu rozwojowego granulocytów i monocytów, natomiast brak go w komórkach należących do szeregu rozwojowego limfocytów i erytrocytów. Synteza MPO w komórkach linii granulocytarnej rozpoczyna się w stadium promielocytu a kończy w stadium mielocytu. Komórki dojrzałe nie syntetyzują MPO, natomiast enzym ten jest jednym ze składników ziarnistości pierwotnych tych komórek. Innym przykładem jest oznaczanie aktywności niespecyficznej esterazy (NSE), enzymu charakterystycznego dla komórek linii monocytarnej.
- określenie ekspresji markerów różnicowania. HSCs mają charakterystyczną strukturę powierzchniowych antygenów, co wykazać można przy użyciu technik immunocytochemicznych, z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciw tym antygenom. W miarę różnicowania się komórek hematopoetycznych i ich dojrzewania zmienia się struktura antygenowa na powierzchni komórek. Jedne antygeny zanikają, a pojawiają się nowe, charakterystyczne dla danej linii rozwojowej w szpiku kostnym, czy

typu komórek. Identyfikowanie markerów powierzchniowych ma duże znaczenie w praktyce klinicznej dla różnicowania chłoniaków oraz typów białaczek.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z podstawowymi technikami analizy różnicowania się komórek hematopoetycznych.

Opis procedury:

UWAGA! Wszystkie czynności wykonujemy w rękawiczkach!

I. Cytometryczna analiza cyklu komórkowego.

Metoda: barwienie jodkiem propidyny (umożliwia oznaczenie zawartości DNA w komórkach; wymaga utrwalenia komórek i zastosowania RNA-zy).

Material: komórki HL-60 kontrolne i traktowane związkiem indukującym różnicowanie.

1. Komórki odwirować i zawiesić w 0.5 mL zimnego PBS.
2. Do zawiesiny komórek dodać 4.5 mL zimnego 70% etanolu (utrwalanie).
3. Komórki umieścić w lodówce na 30 minut. Po tym czasie przenieść do zamrażarki -20°C. W -20°C komórki mogą być przechowywane kilka tygodni.
4. Przed wykonaniem barwienia komórki odwirować i dwukrotnie przepłukać PBS.
5. Dodać 300 µL roztworu jodek propidyny/RNA-za.
6. Inkubować 30 minut w ciemności.
7. Przeprowadzić analizę w cytometrze przepływowym.
8. Omówić otrzymane wyniki (porównanie cyklu komórkowego komórek kontrolnych i traktowanych związkiem indukującym różnicowanie).

II. Morfologiczna ocena komórek HL-60 wybarwionych Wright/Giemsa

1. Ustawić obraz komórek kontrolnych HL-60 w mikroskopie świetlnym pod imersją (powiększenie x100). W trakcie obserwacji zwrócić uwagę na wielkość komórek oraz kształt jądra.
2. Ustawić obraz komórek HL-60 traktowanych związkiem indukującym różnicowanie. W trakcie obserwacji zwrócić uwagę na zmiany morfologiczne. Porównać z morfologią komórek kontrolnych.

III. Barwienie na wykrywanie aktywności mieloperoksydazy w rozmazach krwi oraz w komórkach ostrej białaczki promielocytarnej HL-60

Materialy:

- roztwór do barwienia: 5 mg diaminobenzyny (DAB) w 10 ml buforu Tris-HCl (0.05M, pH 7,6) z dodatkiem 0.1 ml 1% H₂O₂;
- preparaty cytospinowe z komórek białaczkowych HL-60
- rozmazy krwi

1. Preparat cytospinowy i rozmaz krwi utrwalić w roztworze 10% formaliny przez 30 s;
2. Preparaty przepłukać w wodzie bieżącej;
3. Inkubować przez 3 min. w roztworze DAB (roztwór DAB nakropić bezpośrednio na szkiełko tak, aby zakrył cały preparat).
4. Preparaty przepłukać trzy razy w buforze Tris-HCl;
5. Zanurzyć na 5 min. w 0.5% roztworze siarczanu miedzi (roztwór przygotowany w buforze Tris-HCl);
6. Preparaty przepłukać w soli fizjologicznej;
7. Ewentualnie podbarwić jądra komórkowe hematoksyliną lub barwnikiem Giemsy. W tym celu bezpośrednio na preparat nakropić barwnik, inkubować 5 minut (z hematoksyliną) lub 15 minut (z barwnikiem Giemsy), a następnie preparat opłukać pod bieżącą wodą;
8. Preparaty wysuszyć i oglądać pod imersją.

W miejscu aktywnego enzymu MPO, DAB ulega utlenieniu i wytrąca się w postaci nierozpuszczalnego polimeru o brązowym zabarwieniu.

Wymagania:

- student potrafi wymienić metody stosowane w analizie różnicowania komórek hematopoetycznych;
- student zna zasady cytometrycznej analizy cyklu komórkowego;
- student potrafi prawidłowo zinterpretować wyniki analiz cytochemicznych i morfologicznych w odniesieniu do procesu różnicowania się komórek

Literatura:

1. Dąbrowski Z (red.) Fizjologia krwi. Wybrane zagadnienia, Wydawnictwo Naukowe PWN.
2. Hoffbrand AV, Pettit JE. Atlas hematologii klinicznej. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2003.
3. Studziński GP. Cell differentiation in vitro: model systems. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group 2001.