

Metoda: Průtoková cytometrie se zaměřením na povrchové značení

Studentka: Veronika Vrbková, 2. ročník ZL

Školitelé: Ing. Tomáš Vlas

Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Princip:

Průtoková cytometrie (flow cyto-metry) je metoda analýzy exprese buněčného povrchu a intracelulárních molekul, charakterizuje a definuje různé typy buněk v heterogenní buněčné populaci, hodnotí čistotu izolovaných subpopulací a analyzuje velikost a objemy buněk a v neposlední řadě umožňuje simultánní multi-parametrovou analýzu jednotlivých buněk.

Principem je unášení jednotlivých částic nebo buněk proudem nosné kapaliny a jejich průchod laserovým paprskem. Po interakci buňky s laserovým paprskem dochází k lomu a rozptylu světla, a tím se buňky třídí dle rozdílů v jejich velikosti a granularitě, přičemž přímý rozptyl (Forward Scatter, FS) udává velikost buněk a boční rozptyl (Side Scatter, SS) udává granularitu.

Dále se využívá i barevná fluorescence, kterou emituje fluorochromem značená buňka při průchodu laserovým paprskem při určité vlnové délce. Mezi nejčastější fluorochromy patří fluoresceinizothiokyanát (FITC), phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Cy5, Texas red a další. Ty jsou konjugovány s monoklonálními protilátkami. Přesně této skutečnosti využívá povrchové značení. Tedy využívá znaky, které buňky exprimují na svém povrchu, a díky kterým lze buňky uspořádat do skupin charakterizujících buněčnou linii, stav a diferenciaci jednotlivých buněk. Jedná se o CD znak (Cluster of Differentiation) definované struktury rozpoznatelný monoklonální protilátkou, který se na ně naváže spolu s konjugovaným fluorochromem. Například T-lymfocyty lze definovat jako CD3 pozitivní populaci, která je součástí TCR receptoru, tudíž je specifická pouze pro T-lymfocyty. Specifickým znakem pro B-lymfocyty je CD19.

Úskalí metody:

Fluorochromy využívané v mnohobarevné průtokové cytometrii mají široká emisní spektra, čímž může docházet k jejich překrývání během analýzy. V důsledku těchto spektrálních překryvů mohou vznikat komplikace v rozlišení skutečných populací.

Dále je to práce se správnou populací buněk, které jsou žádány, nikoliv jakékoliv jiné. V neposlední řadě je také nezbytně důležité dokázat správně interpretovat výsledek.

Uplatnění metody:

Jedná se o velmi všestrannou metodu analýzy buněk, proto se využívá v mnoha oborech. Ovšem největší uplatnění nachází medicíně, konkrétně v klinické imunologii a transplantologii, kde detekuje například zastoupení hematopoetických kmenových buněk, dále se využívá v hematonekologii, nádorové biologii a molekulární biologii, kde detekuje apoptózu či buněčný cyklus.

Významné je také monitorování pacientů s onemocněním AIDS.

Přístrojové vybavení:

Průtokový cytometr se skládá ze tří systémů - fluidního, optického a elektronického.

Fluidní systém zahrnuje pohyb buněk cytometrem, slouží ke směřování vzorku do laserového paprsku a usměřování jeho toku, a to pomocí hydrodynamické fokusace.

Optický systém zahrnuje laser, patřící do excitační části a soustavu čoček, zrcadel a optických filtrů patřících do části sběrné, která umožňuje sbírání a usměřování emitovaného záření.

Elektronický systém převádí optický signál na elektrický a digitalizuje jej pro počítačovou analýzu. Naměřené parametry každé buňky získané analýzou se uchovávají v tzv. List mode file. Výsledek má vždy číselnou a grafickou podobu, nejčastěji to pak je dvourozměrný graf tzv. dot plot, na němž jedna tečka představuje jednu analyzovanou buňku.

Odběr a transport:

Vyšetření se nejčastěji provádí z nesrážlivé krve, kdy na základní vyšetření stačí 2 ml krve, dále to pak může být likvor, kostní dřeň i DNA či RNA. Vyšetření je nutné provést do 30 hodin po odběru, aby nedošlo ke zkreslení výsledků. Výjimku pak tvoří například vyšetření mozkomíšního moku, které je nutno provést během 4 hodin po odběru.