

Metoda: Průtoková cytometrie

Václav Pašek, 2. ročník

Školitelé: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Princip: Tato metoda vznikla v 60. letech minulého století. Jedná se o velice náročnou, avšak v poslední době velice rychle se rozvíjející metodu. Volně lze tuto metodu chápat jako měření buněk v pohybu. Nejvyužívanějším typem je FACS (Fluorescent activated cell sorting). FACS je metoda, která umožňuje identifikovat a kvantifikovat různé znaky v buňce a podle toho rozdělit zkoumané buňky do jednotlivých populací na základě specifického rozptylu světla a fluorescenčních vlastností každé buňky. Přestože byla původně tato metoda sestrojena pouze k analýze buněk, dnes ji lze použít i k analýze menších částic, například virů nebo chromozomů.

Uplatnění metody: Tato metoda se uplatňuje například v alergologii. Jedná se o tzv. bazotest. Funguje na principu detekce aktivovaných bazofilních granulocytů. K patientskému vzorku se přidá testovaný alergen, a pokud se naváže na IgE protilátku na povrchu bazofilu, dojde k jeho degranulaci a na jeho povrchu se objeví CD63. Značením a následnou detekcí a kvantifikací CD63 pozitivní populace bazofilů lze prokázat senzitivitu pacienta na daný alergen. Tato metoda se také uplatňuje v hematologii. Zde slouží k rozdělení různých typů myeloidní a lymfoidní leukémie. Během hematopoézy se krevní buňky dělí do příslušných linií, kdy každá má na svém povrchu specifické CD molekuly, které se pak pomocí průtokové cytometrie detekují.

Úskalí metody: Tato metoda je relativně náročná, proto je při jejím užívání potřeba zkušeného personálu. Důležitý je zde počet částic. Ten by se měl pohybovat v rozmezí $10^5 - 10^6$ v jednom mililitru suspenze. Optimální průměr částic by měl být 1-30 μm .

Přístrojové vybavení: Při této metodě se využívá jeden komplexní přístroj, průtokový cytometr. Ten se skládá z několika částí. První z nich je fluidika. Zde jsou buňky ve formě suspenze nasávány ze zkumavky do tenké kapiláry proudem pláštěvé tekutiny. Buňky se tímto způsobem dostanou do měřícího bodu. Důležitým faktorem je zde rozdíl tlaku, kdy při menším rozdílu je zajištěno lepší rozlišení. Proudění musí probíhat laminárně, a to se stanovuje pomocí Reynoldsova čísla. Dále zde probíhá značení specifických látek fluorochromy (např. FITC, APC, PE, PerCP...). Další částí je optika. Zde dochází k ozařování buněk. K tomu je využíváno monochromatického záření, nejčastěji chlazený argonový laser (488 nm), helium-neonový laser (633 nm)... Dále se zde nacházejí soustavy filtrů, zrcadel a čoček k rozdělení fotonů podle vlnové délky. Fotony jsou nakonec snímány pomocí detektorů. Existují 3 typy – FSC, SSC a SFL. Poslední součástí je elektronika, kde dochází k analýze a interpretaci dat. Výsledek bývá převeden do podoby histogramu nebo dot plotu.

Odběr a transport: Vzhledem k velice různorodým druhům vyšetření, které lze touto metodou provádět, je obtížné stanovit obecné podmínky odběru a transportu materiálu. Ale například v hematologických vyšetřeních se odebírá krev do zkumavky s EDTA.