

Metoda: Průtoková cytometrie v elektrickém poli

Markéta Šafandová, Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, 2. ročník

Školitelé: Ing. Tomáš Vlas

Princip:

Měření na průtokovém cytometru probíhá ve třech fázích. Podmínkou je, aby měřený materiál byl v suspenzi. Jako první je fluidní systém. Zde dochází k vstřikování tekutiny vzorku, využitím principu hydrodynamické fokusace. Tím se zajistí usměrnění toku buněk, tak aby danou sekci procházela vždy jen jedna. Následuje optická část přístroje. Technicky se dělí na část excitační a detekční. Excitační část obsahuje laser, soustavu čoček a hranolů. Ty slouží k usměrnění a správnému namíření světelného toku. Detekční optika obsahuje filtry, zrcadla a příslušné detektory. Slouží k zachycení světelných kvant o specifických vlnových délkách. Poslední fází je elektronická, zde probíhá přeměna optických signálů na elektrické. Zároveň dochází k digitalizaci a zpracování dat počítačově. Každá buňka, která projde průtokovým cytometrem je tedy ozářena sadou laserů. Při tomto průchodu zaznamenáváme lom a rozptyl světla. Příímý rozptyl (FSC) je úměrný velikosti buňky. Boční rozptyl (SSC) zase indikátorem vnitřní struktury buňky. U SSC může být intenzita signálu nízká, proto je zde ještě navíc fotonásobič. V případě měření FSC a SSC se jedná o detekci fyzikálních vlastností. Zároveň může ke specifitější detekci buněk použít monoklonální protilátky s navázanými fluorescenčními barvivy. Jedná se o detekci chemických vlastností. Většina buněk přirozeně fluorescenční záření nevydává. Pokud se na buňku naváže značená monoklonální protilátka, která je přímo nastavena na určitou strukturu buňky, lze při průchodu analyzátozem zaznamenat emisi specifického záření. Výsledkem měření je graf, kde je zaznamenána intenzita každého signálu.

Uplatnění metody:

Metoda se nejčastěji používá v hematologii, hematonekologii a imunologii k detekci jednotlivých populací buněk. Také upřesňuje stav imunity pacienta při monitoraci některých autoimunitních chorob. Lze ji také používat k funkčním testům (př. testu oxidačního vzplanutí.) V hematonekologii se využívá pomocí fenotypizace k rozlišení leukemií. Dalším využitím může být také detekce protilátek. Úskalí metody: Jednou z nevýhod použití této metody je finanční náročnost při pořízení průtokového cytometru. Dalším problémem může být to, že výsledky smí vyhodnocovat pouze zaškolená a zkušená osoba. Také nelze analyzovat jiný materiál, než ten, který jsme bez poškození buněk schopni převést do suspenze. Náročné je také manuální zpracování vzorku před vlastním měřením. Přístrojové vybavení: Nejdůležitějším přístrojem je samozřejmě průtokový cytometr např. Immulite 2000 XPI, Siemens, vyráběný v USA. Dalším nezbytným přístrojem je centrifuga. Některé části zpracování vzorku se provádí v laminárním boxe. Můžeme sem zařadit také počítačovou techniku, která obsahuje program pro vizualizaci výsledků.

Odběr a transport:

Pomocí této metody se dají stanovovat vzorky krve, kostní dřeně. Různých tekutin jako je likvor, ascites, bronchoalveolární laváže. Kostní dřeň se odebírá do transportního média. Krev je nutno odebrat do speciálního protisrážlivého činidla, což může být např. EDTA pro periferní krev jsou nutné alespoň 2 ml vzorku. Vzorky kostní dřeně a periferní krve se musí zpracovat do 24 hodin. Zpracování likvoru je nutné do 2 hodin po odběru. Při odběru i transportu je nutné zabránit poškození buněk, které může vzniknout

např. chladem, nešetrnou manipulací se vzorkem, nepoměrem činidla a odebrané tekutiny či sterilitou odběrové soupravy.