

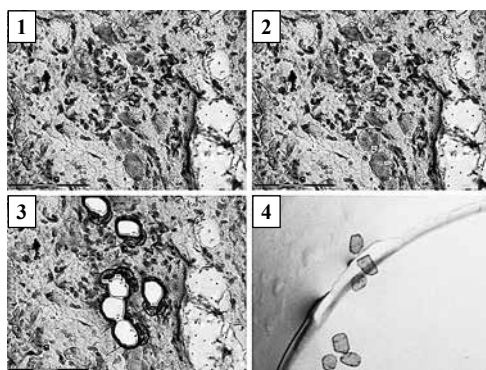
LASEROVÁ MIKRODISEKCE – HISTORIE A SOUČASNOST

M. Chottová-Dvořáková^{1,2}, E. Mistrová^{1,2}

¹ Ústav fyziologie a ² Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze

Mikrodisekce za pomoci laseru byla vyvinuta v polovině devadesátých let minulého století skupinou amerických vědců v čele s dr. Emmert-Buckem (1). Tento systém byl původně sestaven za účelem dokonalejší analýzy pevných nádorů. Následně toto zařízení začala vyrábět firma Arcturus. Přibližně ve stejné době bylo podobné zařízení vyvíjeno i v Evropě, a to malou německou firmou na mikroskopu značky Zeiss. Později firma Zeiss toto zařízení uvedla na trh. V současnosti působí na trhu také firma Olympus a Leica. Přístroje od jednotlivých dodavatelů se od sebe odlišují technologií vlastní disekce vzorku i jeho následného transportu do sběrací zkumavky.

Princip získání vzorku je u všech těchto zařízení v podstatě stejný. Histologický řez o tloušťce 5–10 μm se nanese na speciální sklíčko či membránu. Pokud pracujeme se zařízením vybaveným infračerveným laserem (IR), můžeme použít běžné mikroskopické sklo. Systémy založené na disekci pomocí ultrafialového laseru (UV) jsou schopné pracovat pouze v případě, že použijeme mikroskopické sklo potažené speciální membránou

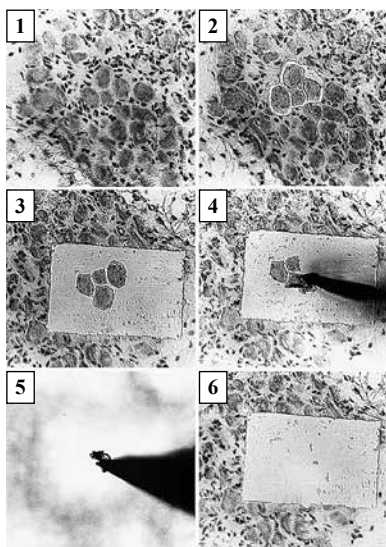


Obr. 1 Postup při mikrodisekci srdečních gangliových buněk za použití moderního zařízení od firmy Zeiss. (1) Řez srdečními síněmi laboratorního potkana obsahující gangliové buňky. (2) Výběr jednotlivých gangliových buněk a jejich obkreslení pomocí počítačové myši. (3) Vyříznutí buněk a jejich katapultace do sběrného víčka za pomoci laseru. (4) Kontrola katapultovaných buněk ve sběrném víčku.

nebo kovový rámeček, v němž je tato membrána napnutá. Takto připravený vzorek se obarví a následně může být použit pro mikrodisekci. Ta probíhá následným postupem (obr. 1): (1) nejdříve si na řezu vybereme buňky či útvary zájmu (2) a přesně je obtáhneme perem na dotykovém monitoru. Následně spustíme laser, který (3) vybrané útvary dle nakreslené čáry vyřízne. V posledním kroku je (4) vyříznutý útvar přenesen do sběrné mikroskopické kumavky.

Pro přesnou identifikaci cílových buněk se obvykle používá modifikace některého z klasických histologických barvení. Asi nejrozšířenější je použití barvení Mayerovým hematoxylinem. Výhoda tohoto barvení spočívá především v tom, že lze vynechat barvení eozinem, čímž se redukuje degradace biomolekul, přičemž výsledné zbarvení řezu se velmi přibližuje klasickému hematoxylin-eozinovému barvení. Kromě toho se někdy používá barvení toluidinovou modří nebo Nisslovo barvení (2). Další možností, jak si vybrat cílové buňky na základě jejich vlastností, je fluorescenční označení konkrétního peptidu či proteinu pomocí nepřímé imunofluorescence.

Jak již bylo zmíněno v úvodu, způsob transportu získaného vzorku do mikroskopické kumavky se u jednotlivých zařízení liší. Původní zařízení vyvíjené v Německu bylo založené na výběru buněk zájmu a následném odstranění nežádoucí tkáně v okolí těchto buněk pomocí



Obr. 2 Postup při mikrodisekci srdečních gangliových buněk za použití původního prototypu postaveného na mikroskopu od firmy Zeis. (1) Řez srdečními síněmi laboratorního potkana obsahující gangliové buňky. (2) Výběr skupiny gangliových buněk a jejich vyříznutí za pomoci laseru. (3) Odstranění okolní tkáně za pomoci laseru. (4) Seškrábnutí vybraných buněk injekční jehlou připevněnou k mikromanipulátoru. (5) Kontrola, zda se vybrané buňky nacházejí na špičce jehly. (6) Tkáňový řez po dokončení mikrodisekce.

laseru. Poté byly vybrané buňky ze sklíčka seškrábnuty jehlou připevněnou na mikromanipulátor (obr. 2).

V současnosti jsou na trhu čtyři typy systémů mikrodisekcí. U zařízení PALM Micro-laser Technologies od firmy Carl Zeiss jsou vzorky katapultovány, zatímco mikrodisekce firmy Leica Microsystems je charakteristická tím, že vyříznuté vzorky padají do sběrné zkumavky pomocí gravitace. Mikrosystémy od firmy Molecular Devices se vyznačují kombinací IR a UV laserů a vzorky jsou pomocí IR nachytávány na polymerovou membránu. Firma Olympus ve spolupráci s Molecular Machines and Industries (MMI) dodává zařízení označované CellCut, u kterého se vzorek získá automatickým přiložením víčka sběrné mikrozkušavky, které je opatřeno adhezivní vrstvou, na níž se vyříznutá část polymerové membrány s vybranými buňkami nalepí.

Význam mikrodisekce pro výzkum je značný, protože umožňuje zkoumat konkrétní buňku, a to nejen její morfologii, ale využít při jejím studiu i molekulárně biologické metody, např. reverzní transkripci následovanou polymerázovou řetězovou reakcí sledovanou v reálném čase (RT-qPCR), díky níž lze stanovit úroveň exprese konkrétních genů. Kromě mRNA můžeme z takto získaných vzorků analyzovat i DNA či proteiny. Dokonce je možné z vybrané buňky získat pouze její část, buněčnou organelu či chromozom. Buňky či jejich části můžeme pomocí laserové mikrodisekce získávat jak z tkáňových řezů, tak i z buněčných kultur.

Před vyvinutím této metody se analýzy prováděly z homogenátů tkáně, zatímco dnes je možné zacílit pozornost na konkrétní populaci buněk. Jedním z klasických příkladů praktického využití laserové mikrodisekce je vyříznutí a následná analýza nádorových buněk. Kromě toho tato zařízení umožňují manipulaci s živými buňkami z buněčných kultur. Díky tomu je možné získat homogenní kulturu z kultury původně obsahující více typů buněk.

Cílená analýza konkrétních buněk vybraných z tkáňového řezu například na základě morfologických odlišností umožňuje lepší pochopení dějů probíhajících v těchto buňkách, což může následně umožnit vývoj cílené terapie.

Vznik této publikace byl možný díky finanční podpoře z Programu rozvoje vědních oborů Karlovy Univerzity (projekt P36) a projektem CZ.1.05/2.1.00/03.0076 Evropského fondu pro regionální rozvoj.

SOUHRN

Laserová mikrodisekce byla vyvinuta v polovině devadesátých let minulého století. Původní zařízení byla od té doby inovována, takže dnes jsou uživatelsky příjemná a umožňují rychlé získání požadovaného vzorku. Díky tomuto zařízení můžeme získat z tkáňového řezu či buněčné kultury konkrétní buňky a ty následně analyzovat pomocí molekulárně biologických metod. Využití této metody je široké, od základního výzkumu až po analýzu patologických buněk.

Laser assisted microdissection – the past and the future

SUMMARY

Method of laser assisted microdissection was developed in the middle nineties. The equipment undergoes several innovations, so, they are user friendly today and they allow quick earnings of required sample. Due to this equipment we can get specific cells from tissue section or cell culture. Obtained cells can be evaluated by means of molecular biologic methods. Application of laser assisted microdissection is very wide from basic research to analyses of pathological cells.

LITERATURA:

1. Emmert-Buck M. R., Bonner R. F., Smith P. D. et al.: Laser capture microdissection. *Science*. 274, 1996: 998–1001. – 2. Liu H., McDowell T., Hanson N. E. et al.: Laser capture microdissection for the investigative pathologist. *Vet. Pathol. United States* 51, 2014: 257–269.

Adresa autorů: M. Ch. D., Alej Svobody 1655/76, 323 00 Plzeň