

Laserová mikrodisekce a její praktické aplikace

Pavla Lužná, Jiří Ehrmann Jr.

Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

SOUHRN

Laserová záchytná mikrodisekce je poměrně mladá metoda využívaná jak v biomedicínských vědách, tak při studiu ostatních živočišných a rostlinných tkání a buněk. V kontextu nových experimentálních i diagnostických přístupů z oblasti molekulární biologie je žádoucí, aby studovaná tkáň byla homogenním a reprezentativním souborem buněk. Pro tyto účely byla proto již koncem osmdesátých let vyvíjena metoda laserové záchytné mikrodisekce (LCM), avšak první publikace o této metodě pojednává až roce 1996. V současných literárních databázích nacházíme stovky prací zaměřených na samotnou LCM či jako součást metodiky experimentů, jejichž závěry mají vést k lepšímu poznání genetické a proteomické podstaty nejrůznějších onemocnění. Toto poznání je příslibem úspěšné cílené terapie mnoha chorob v budoucnu.

Klíčová slova: laserová mikrodisekce – tkáň – molekulárně-biologické aplikace

Laser capture microdissection and its practical applications

SUMMARY

Laser capture microdissection is a relatively young method used both in biomedical sciences as in other studies of animal and vegetable tissues and cells. Current human medicine and its methods of investigation are based on both current established processes, and simultaneously there are new experimental approaches from molecular biology tested. In this context it is highly desirable that the studied tissue is homogenous and representative population of cells. For this purposes at the late 80's the method of laser capture microdissection (LCM) has been developed, the first publication dealing with this method was released even in 1996. In current databases of literature we are able to find hundreds of papers focused on LCM such a method or as a part of methodic approach of experiments whose results led to the improved knowledge of genetic and proteomic nature of various diseases. This knowledge is of great promise for successful targeted therapy in the future.

Keywords: laser capture microdissection – tissue – molecular biology applications

Cesk Patol 2013; 49(4): 123–125

PRINCIPY LASEROVÉ ZÁCHYTNÉ MIKRODISEKCE (LCM)

Laserová záchytná mikrodisekce (LCM, obvykle pouze **laserová mikrodisekce**) je stále využívanějším předstupněm molekulárně biologického studia tkání a buněk (1,2). Principem metody je „oddělení“ konkrétní buněčné populace (nádorové, geneticky transformované, stromální a jiné buňky) z tkáňových řezů, buněčných kultur, stěrů či cytospinů od tkáně nebo buněčné kultury podle přesného mikroskopického výběru. „Oddělení“ buněk probíhá pomocí cíleného laserového paprsku, který však s jejich obsahem nereaguje. Z buněk jsou následně izolovány nukleové kyseliny nebo proteiny, které jsou předmětem dalších analýz. Výběr buněk určených k mikrodisekci probíhá na základě přehledového či imunohistochemického barvení a jejich označením na monitoru počítače, který ukazuje reálný obraz tkáňového řezu nebo buněčné kultury pomocí digitální kamery.

Existují dva obecné způsoby mikrodisekce. Prvním možným způsobem získání žádaných buněk je **adheze selektovaných buněk na termoplastickou membránu** speciálního víčka (obr. 1) (3). Termoplastická membrána je v místě vybraných buněk aktivována nízkovýkonostním infračerveným laserovým pulsem, a tím je k cílové buňce navázána. Membrána současně absorbuje téměř všechnu tepelnou ener-

gii laseru, proto buňky zůstávají nepoškozeny. Buňky jsou pak z víčka uvolněny do mikrozkušavky pomocí lyzačního pufru. Další způsob funguje na principu „**vyřezání**“ **označených buněk laserovým paprskem** a jejich mechanickému přichycení na speciálně upravené víčko mikrozkušavky (obr. 2) nebo zachycení do mikrozkušavky vlivem vlastní gravitace (<http://www.leica-microsystems.com>). Oba způsoby mikrodisekce jsou zcela bezkontaktní, což eliminuje možnost kontaminace.

Koupě laserového mikrodisektoru je investičně náročná záležitost. Práce s LCM systémem vyžaduje vysokou přesnost, je nezbytné minimalizovat riziko kontaminace minimální frekvencí pohybu vzduchu i osob; vzorky určené pro LCM musí být zpracovávány s důrazem na další molekulárně-biologické aplikace. Neméně důležitým aspektem je zajištění nákladů na spotřební materiál a součinnost lékaře - obvykle patologa s pracovníkem, který samotnou LCM provádí.

Na LF UP v Olomouci pracujeme s laserovým mikrodisektorem společnosti MMI (typ mmi CellCut), který disponuje optikou Olympus. Tento typ mikrodisektoru je v podstatě invertovaný světelný mikroskop (s možností využití fluorescenčních filtrů) s elektronicky ovládaným polohovacím stolem. Další součástí přístroje je zdroj vysoce pulzního nízkenergetického UV laserového záření (lze ovládat rychlost a intenzitu laseru, zaostřit rovinu řezu), počítač s dotykovou obrazovkou ovladatelnou jak polohovacím zařízením, tak speciálním perem a ovládacím software. K příslušenství patří speciální hliníkové rámečky (velikosti standardního podložního skla) potažené zcela inertní PET membránou, která nese histologický preparát a mikrozkušavky s adhezivním víčkem.

✉ Adresa pro korespondenci:

prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Jr., Ph.D.
Ústav histologie a embryologie, LF UP v Olomouci,
Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc
e-mail: jiri.ehrmann@hotmail.com