
Laboratoř molekulární patologie

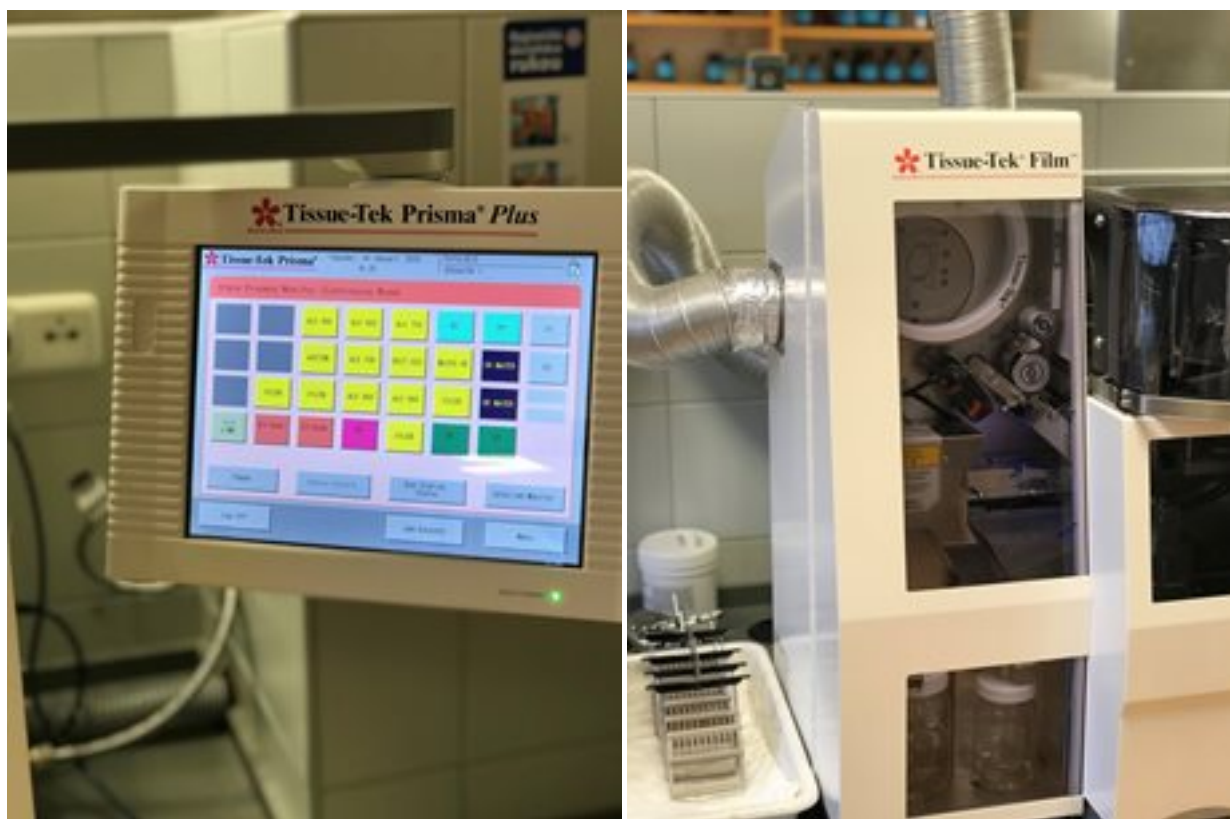
Rok pořízení	2019 - 2021
Financování	OP VVV <u>CORE FACILITIES</u> CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002515
Zodpovědná osoba	prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D.

Pokročilé metody v patologii (imunohistochemie a imunocytochemie, in situ hybridizace, molekulární metody) vždy navazují na základní morfologické metody (barvení hematoxylinem-eozinem) a vycházejí ze zhodnocení preparátu zhotoveného buď z parafrínového bloku, nebo ze zmraženého materiálu.

Základem zpracování tkáně v dnešní době je metoda FFPE (formalin fixed paraffin embeded). Při tomto způsobu zpracování je hodnocená tkáň fixována formalínem a následně odvodněna a prosycena parafrínem. Tato tkáň je zalita do parafrínových bloků a z nich jsou zhotovovány tkáňové řezy, které jsou opětovně zavodněny a vždy nejprve obarveny základním barvením. Vzniklé parafrínové bloky je možné uchovávat (s minimálním ovlivněním kvality obsažené tkáně) po mnoho let a lze na ně aplikovat případné další potřebné testy i dodatečně, s velkým časovým odstupem. Jde o metodu zpracování, která je používána celosvětově, po mnoho desetiletí a je dostupná vybavením i finančně.

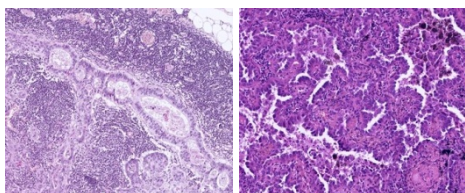
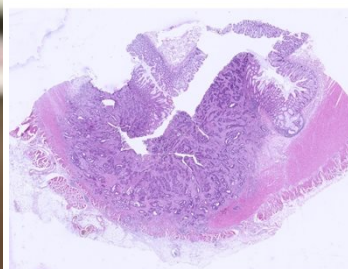
Základním barvením histologických řezů je barvení hematoxylin-eozin (HE) a jeho modifikace. Při tomto barvení se bazické oblasti tkáně (typicky jádra) barví hematoxylinem (modrá až modrofialová barva) a eozinofilní oblasti (typicky cytoplazma a obecně oblasti bohaté na bílkoviny) barví v odstínech růžové.





Výhodami barvicí a montovací linky je Tissue-Tek Prisma Plus jsou vysoká kapacita, plynulé zpracování barvených skl, možnost nastavení celé řady barvicích programů (optimální obarvení různých typů tkáně) a montování preparátů pod speciální fólii (místo krycího skla).

Preparáty obarvené základním barvením (HE) jsou předkládány lékaři a ten, teprve po jejich zhodnocení a identifikaci hlavních oblastí zájmu zadává požadavky na pokročilé metody.



Výhodou „doublehead“ mikroskopu (mikroskopu se zařízením pro simultánní pozorování školitelem) je, že mikroskopický preparát mohou pozorovat dva lidé současně. Školenc se tak může od školitele učit zcela prakticky způsob a metody pozorování mikroskopického preparátu. Badatelské mikroskopy se zařízením pro simultánní pozorování kladou obecně vysoké nároky na kvalitu mikroskopu, a to především vysokou světelnost (s převodem světla ke spolupozorovateli) a možnosti individuálního přizpůsobení mikroskopu vyššímu počtu školených osob (střídání se u mikroskopu).

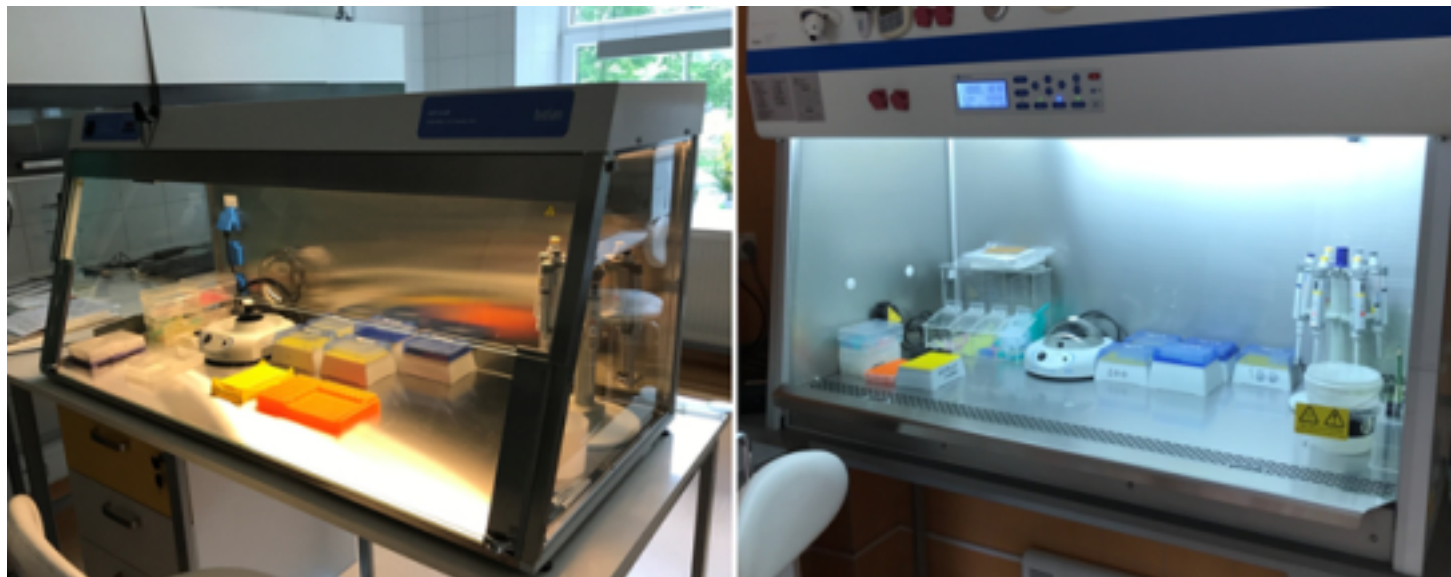
Získání dostatečného množství nukleové kyseliny je jednou z základních podmínek každé molekulárně-biologické analýzy. Nukleové kyseliny (DNA/RNA) se nacházejí v buňce v buněčném jádře, mitochondriích, cytosolu, ribozomech. Při procesu izolace je nutné nukleové kyseliny uvolnit z těchto struktur a purifikovat od proteinů a iontů, které by mohly interferovat při molekulárně biologických vyšetřeních.

Způsob izolace nukleových kyselin se liší především podle druhu zdrojového biologického materiálu (FFPE tkáňový blok, cytologický nátěr, cytospin, nativní tkáň, suspenze buněk v transportním médiu, krev, atd.). Společnou součástí všech izolačních postupů je lýza buněk, uchycení nukleové kyseliny na membráně izolační kolonky nebo magnetických kuličkách, vymytí kontaminujících složek a závěrečná eluce čisté nukleové kyseliny. Izolovaná DNA je ve formě roztoku uchovávána při -20°C.



Automatický izolátor nukleových kyselin MagCore. K purifikaci nukleových kyselin využívá jejich kotvení na magnetické kuličky. Každá izolace probíhá na samostatné jednorázové izolační patroně. Výhodou je minimalizace cross-kontaminace vzorků a snížení hands- on- time.

Základní metodou molekulární biologie, od které jsou odvozeny všechny další genové analýzy, je PCR- polymerázová řetězová reakce). Jedná se o metodu, která souží k amplifikaci vybraného úseku DNA- z jedné molekuly DNA vznikne během dvou hodin cca milión kopií. Principem PCR je opakovaná replikace nukleových kyselin. Proces je velmi citlivý na kontaminaci, proto je nutné všechny kroky provádět v čistých prostorách, umožňujících pravidelnou sterilizaci pracovních ploch a předmětů pomocí ultrafialového záření.



PCR dekontaminační box, uzavřený prostor pro přípravu PCR mastermixů (vlevo) a laminární box, prostor pro práci s nukleovými kyselinami (vpravo).

Autor textu: MUDr. Petra Kašparová, Ph.D a RNDr. Hana Vošmiková