

## **Metoda: Separace na hustotním gradientu**

Ivana Ženíšková, Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, 2. ročník

Školitelé: Ing. Bc. Tomáš Vlas

**Princip:** Periferní krev je hlavním zdrojem lymfocytů T i B. Nejpoužívanější, cenově dostupnou a poměrně rychlou metodou izolace buněk je separace na hustotním gradientu pomocí centrifugy. Celý proces separace zajišťuje oddělení buněk na základě jejich odlišné hustoty. Krev, odebraná do zkumavky s heparinem, je smísená se separačním médiem. Po centrifugaci se buňky oddělí tak, že monocyty společně s lymfocyty vytvoří tzv. „obláček“, neboli prstenec mononukleárních buněk, nacházející se nad separačním médiem, jelikož má nižší hustotu. Ještě nižší hustotu má plazma společně s trombocyty, která sedí na mononukleárních buňkách. Na nejnižší úrovni ve zkumavce, tedy s nejvyšší hustotou, se vyskytují erytrocyty a granulocyty. Pokud chceme oddělit lymfocyty od monocytů, musíme do metody zařadit odmytí buněk. Po odmytí monocyty přilnou na promývací roztok a samotné lymfocyty zůstanou v supernatanu, který můžeme použít k jednotlivým vyšetřením.

**Uplatnění metody:** Metoda separace na hustotním gradientu pomocí centrifugy se využívá zejména při funkčních testech, mezi které se řadí testy proliferace antigenu, testy sekrece cytokinů a funkční testy sekrece monocytů, lymfocytů nebo neutrofilů. Separované buňky se mohou dále využít při průtokové cytometrii nebo při ELISPOTU.

**Úskalí metody:** Mezi úskalí metody se řadí obtížné sbírání prstenců lymfocytů a monocytů. Též je důležitá správná teplota při vykonávání separace, ideálně 18-20°C. Při nesprávné teplotě, tj. vyšší, může docházet ke shlukování erytrocytů a rychlému rozpadu T-lymfocytů. Pokud by došlo ke zmíněné agregaci erytrocytů, agregace by mohla mít vliv na množství oddělených lymfocytů, jelikož se lymfocyty mohou zachytávat ve shlucích a tím se sníží jejich množství. Z důvodu přítomnosti prekurzorů erytrocytů, které se nacházejí v krvi novorozenců, batolat, případně v pupečnickové krvi, může dojít při centrifugaci této krve ke kontaminaci směsi mononukleárních buněk erytrocyty. V případě, že chceme separované lymfocyty využít i k jinému vyšetření, je velice důležité dodržovat sterilitu okolí.

**Přístrojové vybavení:** Na provedení této metody budeme potřebovat: laminární box, rukavice, zkumavky s potřebným materiálem (tj. s nesrážlivou krví), plastové pipety, kónické zkumavky – falkonky, separační médium, kultivační médium, hovězí sérum (FBS), zkumavky a centrifugu.

**Odběr a transport:** : K vyšetření se odebírá periferní krev, nejčastěji z loketní jamky. Krev se odebírá do zkumavky, ve které se nachází předem připravený heparin, jenž zabraňuje srážení krve. Co se týče transportu, krev by měla být dopravována a zpracována v laboratoři v co nejkratším čase. Pokud by transport trval příliš dlouho, nebo by se vzorek ihned nezpracoval, mohlo by dojít k degradaci buněk či k vytvoření shluků buněk.