



Protokol 01/2025: Identifikácia CD34⁺/CD117⁺ stromálnych buniek a epitelových buniek vajíčovodov pomocou imunohistochemie, imunofluorescencie, transmisnej, rastrovacej elektrónovej mikroskopie a korelatívnej mikroskopie.

1. Odber tkanív

Vzorky z oblasti ampuly a istmu vajíčovodov budú odoberané od netehotných žien vo fertilnom veku po chirurgickom zákroku z rôznych indikácií (totálna abdominálna hysterektómia s bilaterálnou salpingo-ooforektómiou). Odbery boli realizované po informovanom súhlase a schválení protokolu miestnou bioetickou komisiou v súlade s medzinárodne akceptovanou praxou.

Vzorky budú rozdelené na prípravu rôznymi metodikami:

- bunková kultivácia
- svetelná mikroskopia
- transmisná elektrónová mikroskopia (TEM)
- rastrovacia elektrónová mikroskopia (SEM)
- imunohistochemická analýza (IHC)
- imunofluorescencia (IF)
- korelatívna mikroskopia

2. Bunková kultivácia

- Čerstvo odobraté bioptické vzorky vajíčovodov umiestnime do sterilného DMEM média doplneného o 100 U/ml penicilínu, 0.1 mg/ml streptomycínu a 0.25 µg/ml amfotericínu, uchovávané budú na ľade a následne transportované do laboratória,
- Do 30 minút od odberu vzorky premyjeme DMEM, excidujeme a oddelíme sliznicu,

- Svalovinu a väzivové súčasti narežeme na $\sim 1 \text{ mm}^3$ fragmenty a inkubujeme na orbitálnej trepačke 4 h pri 37°C v roztoku PBS (bez Ca^{2+} a Mg^{2+}) obsahujúcom 10 mg/ml kolagenázy Ia a 2000 U/ml DNázy I,
 - Po filtrácii cez $40 \text{ }\mu\text{m}$ sitko bunky centrifugujeme (300g), resuspendujeme v DMEM:Ham's F12 (1:1) s 10% FBS, HEPES, antibiotikami a antimykotikami,
 - Bunky budeme kultivovať pri 37°C , 5% CO_2 v plastových fľašiach alebo na sklíčkach v 24-jamkových platniach,
 - Cytogenetickú analýzu (karyotypizáciu) realizujeme pri 70–80% konfluencii po 3 h inkubácii s kolchicínom ($2 \text{ }\mu\text{g/ml}$). Po fixácii (metanol:kyselina octová 3:1) sa vyhodnotíme 50 metafáz a zistíme, či majú všetky normálny ženský karyotyp 46,XX.
-

3. Konvenčná svetelná mikroskopia

- Vzorky fixujeme v 10% formalíne a ďalej spracujeme štandardizovanou technikou FFPE. $4 \text{ }\mu\text{m}$ rezy zafarbíme hematoxylínom-eozínom (HE).
-

4. Transmisná elektrónová mikroskopia (TEM)

- Fixácia: 4% glutaraldehyd v 0.1 M kakodylátovom pufri (pH 7.3), 4 h pri 4°C ,
 - Postfixácia: 1% oxid osmičelý v tom istom pufri, následná dehydratácia v stúpajúcej rade etanolov,
 - Impregnácia propylénoxidom, vloženie do zmesi propylénoxidu a Eponu cez noc, zapustenie do Eponu 812,
 - Ultratenké rezy (50 nm) pripravené na ultramikrotóme MT-7000, nanesené na Formvarom potiahnuté Cu mriežky,
 - Farbenie: uranylacetát a citrát olovnatý,
 - Pozorovanie: Philips CM 12 TEM, 60 kV,
 - Kvantifikácia ultraštruktúrnych znakov buniek (napr. objem jadra, mitochondrií) podľa Weibelovej metódy.
-

5. Rastrovacia elektrónová mikroskopia (SEM)

- Tkanivové vzorky vajíčovodov po odobratí okamžite umiestnime do 2,5% glutaraldehydu v 0,1 M cacodylátovom pufri (pH 7,3) na 4 °C počas 2 hodín. Po počiatkovej fixácii vzorky trikrát premyjeme v 0,1 M cacodylátovom pufri a následne post-fixujeme v 1% roztoku oxidu osmičelého v rovnakom pufri počas 1 hodiny pri 4 °C. Vzorky opätovne premyjeme a postupne dehydratujeme v sérii stúpajúcich koncentrácií etanolu (30 %, 50 %, 70 %, 90 % a dvakrát 100 %, každé po 10 min).
 - Po úplnej dehydratácii vzorky prenesieme do hexametyldisilazánu (HMDS), ktorý nahradí tradičné sušenie kritickým bodom a následne budú vzorky odparené ponechaním na vzduchu pri izbovej teplote. Po úplnom vysušení budú vzorky pripevnené na hliníkové nosiče pomocou uhlíkového lepidla,
 - Vzorky budú následne pokryté vodivou vrstvou zlata pomocou pokovovačky v tenkej vrstve (~10 nm). Takto pripravené vzorky boli analyzované pomocou rastrovacieho elektrónového mikroskopu ZEISS EVO LS 15 pracujúceho pri akceleračnom napätí 10–20 kV,
 - Oblasť záujmu budeme pozorovať pri vysokom zväčšení (až 10 000×), pričom získame digitálne snímky vo vysokom rozlíšení. Pre kvantitatívne hodnotenie budú použité metrické štandardy vstavané do softvéru mikroskopu,
 - Ako negatívne kontroly použijeme vzorky bez fixácie alebo po nesprávnom sušení, aby sa overila významnosť pozorovaných morfológických detailov.
-

5. Imunohistochemia (IHC)

- Tkanivové rezy (3 µm) fixujeme vo formalíne a ďalej spracujeme štandardizovanou technikou FFPE,
- Antigénnu obnovu zrealizujeme v mikrovlnnej rúre (citránový pufor, pH 6.0),
- Použité primárne protilátky (výber): **CD117 (c-kit)** – polyklonálna, 1:100 (DAKO, Dánsko) a **CD34** – monoklonálna 1:100, klon QBEND10 (Biogenex, San Ramon, CA, USA),
- Dvojité farbenie (CD117 + CD34): CD117 (hnedý, DAB), CD34 (červený, Fast Red).
- Kontroly: negatívna – vynechanie primárnej alebo sekundárnej protilátky; pozitívna – známy pozitívny tkanivový štandard.

- Mikroskopia: LEICA DM3000LED.
-

6. Imunofluorescencia (IF)

- Primokultivované bunky fixujeme 2% paraformaldehydrom (10 min) a permeabilizujeme s PBSSA (PBS + BSA + saponín),
- Inkubujeme s primárnymi protilátkami (4 h, RT, orbitálna trepačka), následne aplikujeme sekundárne protilátky: biotinylované a streptavidín-Alexa Fluor 546, resp. FITC-konjugované.
- Jadrá kontrastujeme pomocou fluorescenčného farbiva Hoechst 33342.
- Aplikujeme protilátky CD117 a CD34,
- Pripravíme negatívne kontroly bez primárnych protilátok,
- Mikroskopia: Leica DM4B 6B.

7. Korelatívna mikroskopia

- Odobraté tkanivo vajíčkovođu prenesieme do PBS.
- Vzorku narezat' na fragmenty približne 1–2 mm³.
- Fixovat' v roztoku:
 - 4 % PFA,
 - 2 % glutaraldehyd,
 počas 2–4 hodín pri 4 °C.
- Premyt' 3× v fosfátovom pufri.
- Permeabilizovat' vzorky podľa použitého markera.
- Blokovat' nešpecifickú väzbu.
- Inkubovat' s primárnou protilátkou cez noc pri 4 °C.
- Premyt' PBS.
- Inkubovat' so sekundárnou fluorescenčne značenou protilátkou.
- Premyt' PBS.
- Voliteľne dofarbiť jadrá pomocou DAPI.
- Umiestniť vzorku na referenčný nosič vhodný pre CLEM.
- Získať:
 - prehľadové snímky,

- fluorescenčné snímky oblastí záujmu (ROI).
- Zaznamenať súradnice a orientáciu vzorky.
- Uložiť všetky obrazové dáta pre následnú koreláciu.
- Inkubovať vzorky v 1 % OsO₄ počas 1 hodiny.
- Premýť destilovanou vodou.
- Dehydratovať v rastúcej etanolovej sérii: 30, 50, 70, 90, 96, 100
- Infiltrácia vzoriek epoxidovou živicom.
- Polymerizácia pri 60 °C počas 24–48 hodín.
- Označiť orientáciu bloku podľa fluorescenčných dát.
- Pomocou ultramikrotómu pripraviť rezy:
 - 70–100 nm pre TEM,
 - alebo poloténkové rezy pre lokalizáciu oblasti záujmu.
- Preniesť rezy na medené mriežky.
- Kontrastovať rezy:
 - uranyl acetát,
 - citrát olovnatý.
- Pozorovať v TEM pri vhodnom urýchľovacom napätí.
- Získať snímky oblastí identifikovaných počas fluorescenčného zobrazovania.
- Importovať fluorescenčné a EM snímky do softvéru pre CLEM analýzu.
- Zarovnať obrazy pomocou:
 - morfológických orientačných bodov,
 - referenčných značiek,
 - súradnicového systému nosiča.
- Vyhodnotiť ultraštruktúru fluorescenčne označených oblastí.