



Protokol 02a/2025: Izolácia a in vitro kultivácia epitelových buniek vajíčkovo­du (UTEC) a CD34+/CD117+ stromálnych buniek zo steny vajíčkovo­dov

Enzymatická izolácia a kultivácia UTEC in vitro

- spracovať ideálne do 2 hod po odobratí tkaniva

1. Peroperačné odobratie vzorky najlepšie z oblasti fibríí (najviac epitelových buniek); premytie vzorky v PBS (odstránenie krvi a tubárnej tekutiny) + rýchle premytie v 70% etanole na dezinfekciu; transfer na Petriho mysku 100mm
2. Odstránenie prebytočného tkaniva (väzivo a svalovina) sklapelom; rozkrájanie tuby na menšie časti; umiestenie menších častí tkaniva do 50 ml centrifugačnej skúmavky s obsahom 45 ml studeného **disociačného media**; umiestenie skúmavky na laboratórny “rocker” pri teplote 2-8 C na 36-48 hod - disociácia epitelových buniek
3. Prevrátiť skúmavku 1-2x na resuspendovanie buniek, potom držať vzpriamene – väčšie kusy tkaniva sa usadia na dne. Hneď zliať (dekantovať) supernatant (obsahujúci disociované bunky) do 50 ml centrifugačnej skúmavky – centrifugovať pri 200g/ 5 min. Odstrániť supernatant.
4. Na zvýšenie počtu disociovaných buniek pridať 45 ml PBS do prvej skúmavky, ktorá obsahuje kusy tkaniva. Pokračovať podľa kroku 3 – prevrátiť skúmavku na resuspendáciu častí tkaniva. Zliať supernatant do 50 ml skúmavky obsahujúcej peletované bunky, čím sa združia (spooluju) všetky disociované epitelové bunky. Odstránenie rozkrájaného tkaniva. Zpeletujeme spoolované bunky centrifugáciou 200g/5 min pri 20-25 C.



Disociačné medium (DM): rozpustiť 350 mg pronázy a 25 mg DNAzy v 250 ml MEM (+FBS) media. Miešať, kým sa všetok solídny materiál nerozpustí. Prefiltrovať a sterilizovať roztok cez 0,22 μ m fľašu (250 ml) s vacuovým filtrom na vrchu. Skladovať pri 2-8 C 4 týždne.

Alternatíva DM: Collagenáza typ I (1-2 mg/ml) + Dipsáza II (1 mg/ml) + DNAza I (0,1 mg/ml) – inkubovať fragmenty tkaniva v 5-10 ml DM 45-60 min pri 37 C vo orbitalnom shakery alebo vodnom kúpeli.

5. Resuspendovať pellet v 1-2 ml media **FTM**. Jemne pipetovať hore a dole 10x s 1 ml pipetou.

FTM medium - 485 ml DMEM-F12 + 10 ml USG (Ultroser G) a 5 ml penicillin/streptomycin. Skladovať pri 2-8 C do 4 týždňov. Ohriať na 37 C pred použitím.

Ultroser G – Pridať 20 ml sterilnej vody do jednej 20 ml fľaše s USG a počkať, kým sa prášok USG úplne rozpustí. Čas asi 20 min. Skladovať nepoužité USG pri – 20 C do 6 týždňov. **Nezmrazovať a rozmrazovať viac ako 1x!!!**

6. Hemocytometrom spočítať iba počet sekréčných buniek. V suspenzii budú 3 typy buniek: riasinkové bunky; sekréčne bunky a erytrocyty.

7. Zriediť bunkovú suspenziu na 10^5 sekréčných buniek na 1 ml vo FTM médiu a vysiať po 1ml na 24 jamkovú platňu potiahnutú kolagéom. Inkubovať cez noc.

8. Ideálne by mala byť bunková konfluencia na druhý deň minimálne 30%. Riasinkové bunky väčšinou neadherujú. Možnosť transdiferenciácie riasinkových na sekréčne?

9. Aspirácia media na odstránenie krvných buniek a debrisu. Jemne opláchnuť adherované bunky v 500 μ l PBS pomocou pipety. Nahradiť PBS s 500 μ l čerstvého FTC media.

10. Pokračovať v kultivácii do 50% konfluencie (1-2 dni). Meniť médium každých 24hod.



Alternatíva: lumen tuby ošetrovaný s PBS s obsahom 0,1% kolagenázy, inkubácia pri 37 °C, 95% air/5% CO₂/ 60 min. Po inkubácii boli tuby premyté PBS. Premyté bunkové agregáty centrifugovať 2x/2000 rpm po 5 min. Suspendovanie buniek a bunkových agregátov v rastovom médiu (DMEM:F12= 1:1 mix) + 10% FBS (FCS). Inkubácia 37 °C, výmena media každé 3 dni (Abe a Hoshi, 1997).

Konfirmácia UTECs – Imunocytochémia/ prietokový cytometer

- Cytokeratin 18 – marker epitelových buniek
- EpCAM – marker epitelových buniek
- FOXL2 – marker vývinu folikulov, často exprimovaný v tubálnom epiteli
- TUBB4 – marker riasinkových buniek/ LhS28
- PAX8 – marker sekréčne bunky

Izolácia a kultivácia CD34+/CD117+ stromálnych buniek vajíčkovo

1. Peroperačný odber vzorky za sterilných podmienok. Po odbere prepláchnuť fosfátovým pušom (PBS) (Sigma Aldrich, USA) s cieľom odstrániť krv a tekutinu z vajíčkovo, následne rýchlo opláchnuť 70 % etanolom na dezinfekciu a preniesť do 100 mm Petriho misky na ďalšie spracovanie.
2. V laminárnom boxe skalpelom odstrániť prebytočné tkanivo (epitel, svalové tkanivo) a zostávajúce spojivé tkanivo vajíčkovo nakrájať na menšie kúsky a umiestniť do 50 ml centrifugačných skúmaviek obsahujúcich 45 ml PBS. Centrifugačné skúmavky obsahujúce vzorky tkaniva potom krátko centrifugovať pri 250 × g počas 1 minúty pri izbovej teplote, potom resuspendovať v PBS. Následne sa pridať disociačné médium a vzorky tkaniva inkubovať pri 37 °C na trepačke pri 180 ot/min počas 40 minút. Enzymatické disociačné médium bolo zmesou 1,5 mg/ml kolagenázy typu 2 (Invitrogen, USA) a 1 % penicilínu-streptomycínu (PS) (Sigma Aldrich, USA). Roztok následne prefiltrovať cez 41 µm nylonové sito (Merck, Darmstadt, Nemecko). Suspenzia potom odstrediť pri 300 g počas 10 minút.



3. Získané bunky preniesť do sterilných Petriho misiek a kultivovať v 10 ml DMEM/F12 (Merck, Darmstadt, Nemecko) doplnené 10 % fetálnym bovinným sérom (FBS) (Sigma Aldrich, USA) a 1 % PS.
4. Bunky kultivovať v inkubátore s obsahom 5 % CO₂ pri teplote 37 °C počas jednej hodiny, čím sa umožní adherencia fibroblastov a zachovanie ostatných neadherentných buniek, vrátane telocytov. Následne bunky preniesť do nových sterilných Petriho misiek s rovnakým médiom. Kultivačné médium vymeniť každé dva dni.
5. Bunky následne prezrieť pod invertovaným mikroskopom po 24, 72 a 96 hodinách. Po dosiahnutí 80 % konfluencie bunky enzymaticky oddeliť pomocou predhriateho 0,05 % trypsínu (Invitrogen, USA). Po oddelení bunky opätovne preniesť do novej T75 fľaše v pomere 1:2 za rovnakých podmienok.
6. Na izoláciu buniek CD34/CD117+ použiť systém MACS (Miltenyi Biotec, USA). Najskôr vykonať postupnú negatívnu depleciu. Použiť anti-CD45 MicroBeads, prejsť cez MACS kolónu a uchovať tie bunky, ktoré prejdú. Ten následne označiť anti-CD31 MicroBeads, prejsť cez kolónu a zachytiť bunky ktoré prejdú - CD45-/CD31-. Negatívna selekcia oddelí CD34+ stromálne bunky od CD45+ leukocytov a CD31+ endoteliálnych buniek. Na vykonanie pozitívnej selekcie frakciu CD45-/CD31- najskôr označiť pomocou MicroBeads CD34 podľa týchto krokov: bunky resuspendovať v 300 µl pufri MACS, potom pridať 100 µl blokovacieho činidla FcR a následne 100 µl MicroBeads CD34. Potom frakcia inkubovať 30 minút pri 5 °C. Následne bunky centrifugovať pri 300 g počas 10 minút. Neskôr použiť MS kolónu a zozbierať zachytenú frakciu CD34+. S cieľom zvýšiť čistotu tieto kroky zopakovať na novej kolóne. Následne frakciu CD34+ označiť MicroBeads CD117. Opäť resuspendovať v 300 µl pufri MACS; potom sa pridať 100 µl blokovacieho činidla FcR, nasledovaných



100 μ l MicroBeads CD117. Frakciu inkubovať 15 minút pri 5 °C. MS kolónu prepláchnuť 500 μ l pufrom, vložiť označené bunky a kolónu potom ešte trikrát prepláchnuť 500 μ l pufrom. Bunky potom odstrániť z magnetu. Zopakovať ešte raz s cieľom zvýšiť čistotu. Cieľovú frakciu stromálnych buniek CD45⁻/CD31⁻/CD34⁺/CD117⁺ následne kultivovaná tak, ako je opísané vyššie. Po 24 hodinách neadherentné bunky jemne prepláchnuť. Bunky následne prezrieť pod invertovaným mikroskopom.