

# Az embrionális őssejt technológia immunhisztokémiai hasznosítása

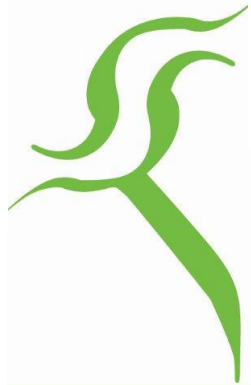
Meczker Ágnes, Keszthelyi Rita, Hajós Rebeka, Voigt Anikó,  
Kósi Liliána; Hisztopatológia Kft., Pécs

Sasitorn Rungarunlert, Dr. Purity Melinda, Dr. Dinnyés  
András; Biotalentum Kft., Gödöllő



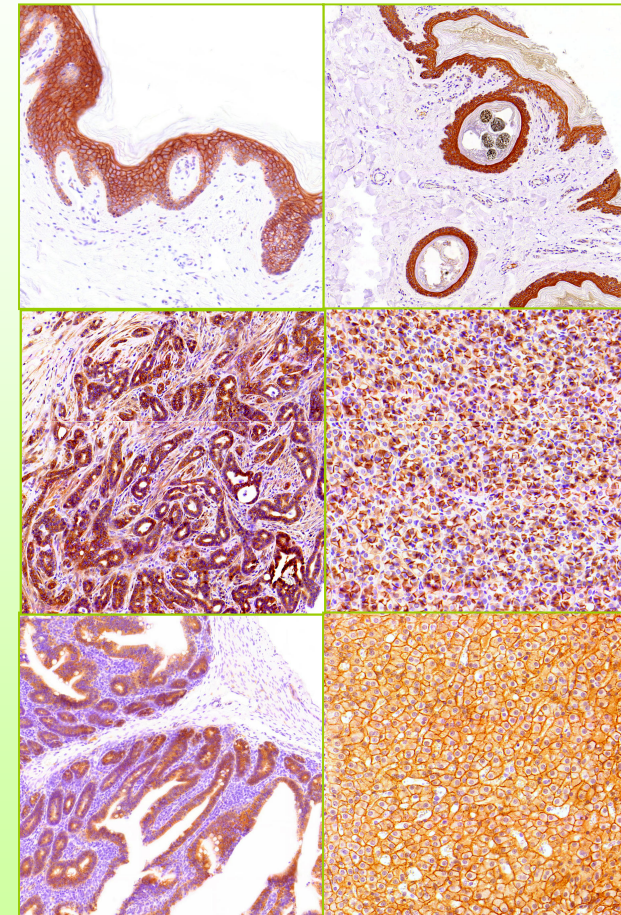
# Az immunhisztokémiai jel értékelése

- Immunhisztokémia módszere: diagnosztikus és kísérletes terület
- Diagnosztika:
  - kvantitatív értékelési és célzott terápiás módszerek fejlődése
  - növekvő mintaszám
  - igény a gyors vizsgálatokra
  - automatizáció
  - nagy reagens igény
- Fontos, hogy az eredmény kontrollálható, megbízható legyen



# Pozitív kontroll

- Humán eredetű szövet
  - patológiákon: saját ismert esetekből létrehozott szövetbank...egyszer elfogy, lehet-e ugyanolyat találni?...etikai kérdéseket vet fel
  - vagy: megvásárolható...drága...gyorsan elfogy...nem reprodukálható eredmény
  - kontroll blokk: egyszerre sok metszet → metszetek „öregedése”
- Állati eredetű szövet
  - konzervatívabb antigének esetében lehetséges, megbízható pozitív kontroll
  - kevesebb etikai kérdés
  - de: felhasználhatósága szintén véges

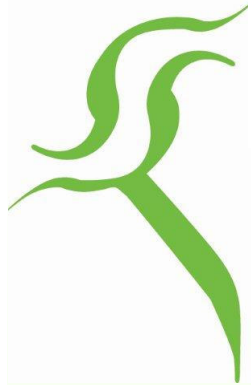


$\beta$ -Catenin



# Pozitív kontroll

- Kontroll típusa
  - külön kontroll metszet
    - a napi immunhisztokémiai vizsgálatok mellé ismerten pozitív esetből származó metszet használata
    - nem garantált, hogy a vizsgált szöveten ugyanaz a reakció
    - hibák előfordulhatnak...két metszet ➡ kétféle hibalehetőség
  - a vizsgált és a kontroll szövet egy tárgylemezen
    - megbízható eredmény
    - két metszet felhúzása egy tárgylemezre
    - egy blokkba öntött vizsgált és a kontroll szövet



# Pozitív kontroll

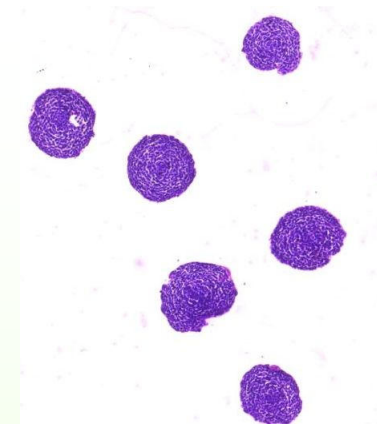
- Ismert technikák:
  - TMA (tissue microarray) technika:
    - megfelelő, sokrétű
    - de: szintén patológiai mintákból áll...hasznos problémák
  - sejtenyészetek blokkba vihető vagy citoprep formában
    - nem mutatják a jel szöveti eloszlását
  - proteinflagmentek tárgylemezre kötése:
    - fehérjérszletek, amelyek egy bizonyos protein antigenitással bíró töredékét tartalmazzák
    - a tárgylemezen fix ponthoz köthető
    - speciális kivitelezést igényel
    - szintén nem szöveti eloszlású jel





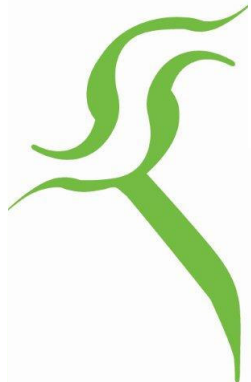
# Embryoid testek

- FP6-os támogatású bioreaktor fejlesztési projekt:
  - Biotalentum Kft.; Gödöllő
    - EB előállítás:
      - többféle módszer
      - többféle sejtvonal (egér embrionális őssejt, indukált pluripotens őssejt)
      - többféle differenciáció (kardiális, neurális)
    - Hisztopatológia Kft.; Pécs
      - EB vizsgálata immunmorfológiai módszerekkel
        - morfológia
        - differenciálódás
        - proliferáció
        - apoptózis



# Embryoid testek

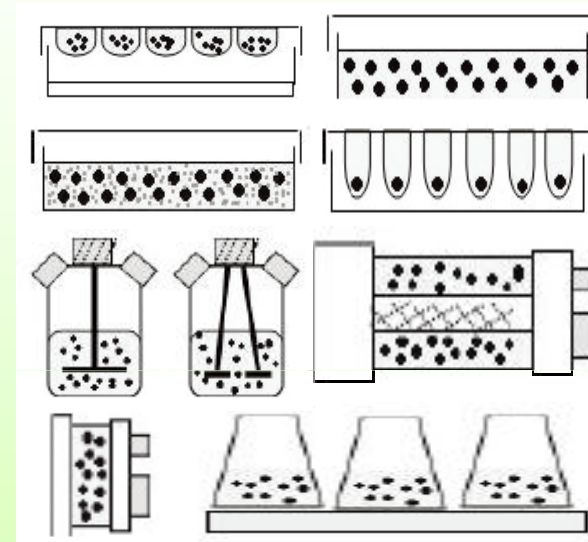
- EB (embryoid body):
  - nem embrió
  - embrionális őssejtekből álló sferoid sejtaggregátum
  - embrionális őssejtek:
    - korlátlan önmegújítás
    - tovább differenciáltatva *in vitro* mindhárom szomatikus csíravonal sejteinek képzése
  - különböző eredetű és sejtvonalú „szövet” készíthető
  - alternatív mód: szomatikus sejtek  $\Rightarrow$  transzkripciós faktorok kombinációja, retrovirális transzdukció  $\Rightarrow$  indukált pluripotens őssejt (iPSc)
  - előállítás: felülethez tapadás gátlása
  - hasznosításuk:
    - transzplantáció
    - tissue engineering
    - gyógyszer-hatóanyag kísérletekben



# Embryoid testek

- Előállítás módjai:

- Függő csepp módszer
- Statikus szuszpenzió
- Encapsulation/entrapment
- Multiwell



- Bioreaktorok:

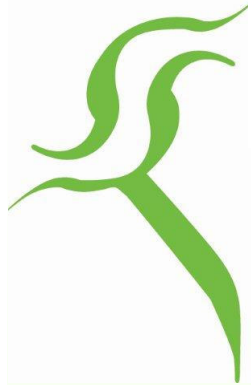
- (keverő- vagy rázóüvegek, slow turning lateral vessel = STLV, high aspect rotating vessel = HARV, orbital shaker)
- előnyeik: optimalizált tenyésztési körülmények (körkörös mozgás → alacsony stressz, automatikus gáz és tápoldat csere)
- gyors, megbízható, kevés munkával járó és nagy mennyiségű EB-t eredményező módszerek





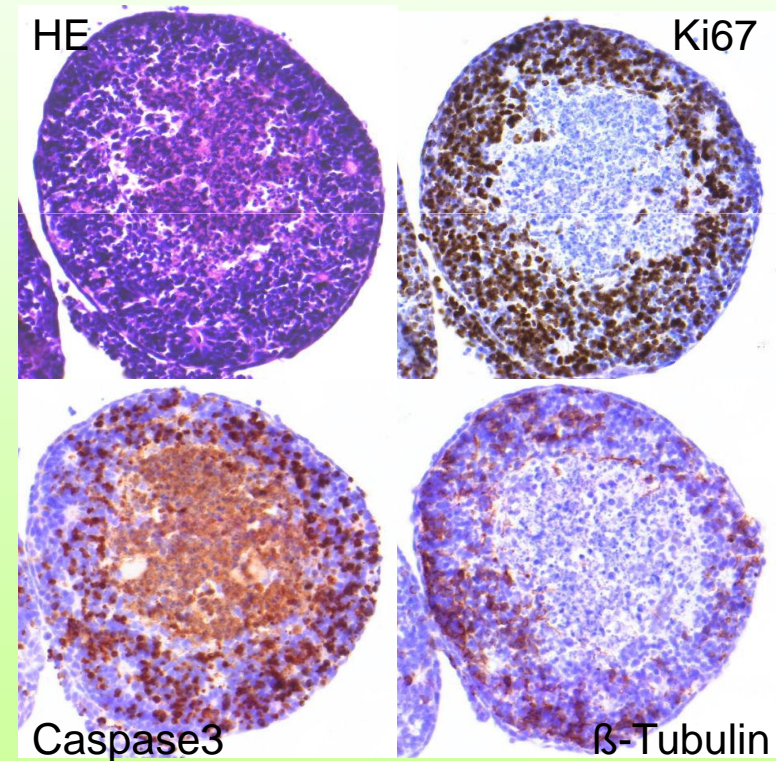
# Embryoid testek

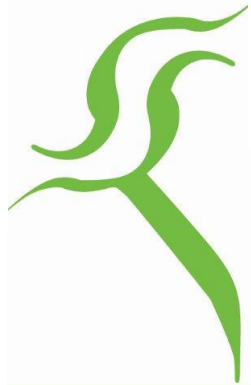
- Feldolgozás:
  - különböző technikák ➡ más-más méret és forma
  - méret: 1 mm alatt
  - nem helyezhető direkt kazettába
    - EB centrifugálás ➡
    - tápfolyadék eltávolítása ➡
    - 4%-os formalinnal felszuszpendálás és fixálás ➡
    - centrifugálás ➡
    - a fixálószer eltávolítása ➡
    - pufferes mosás ➡
    - első beágyazás histogelbe ➡
    - szilárdulás ➡
    - újra elindítás ➡
    - víztelenítés ➡
    - beágyazás...



# Embryoid testek

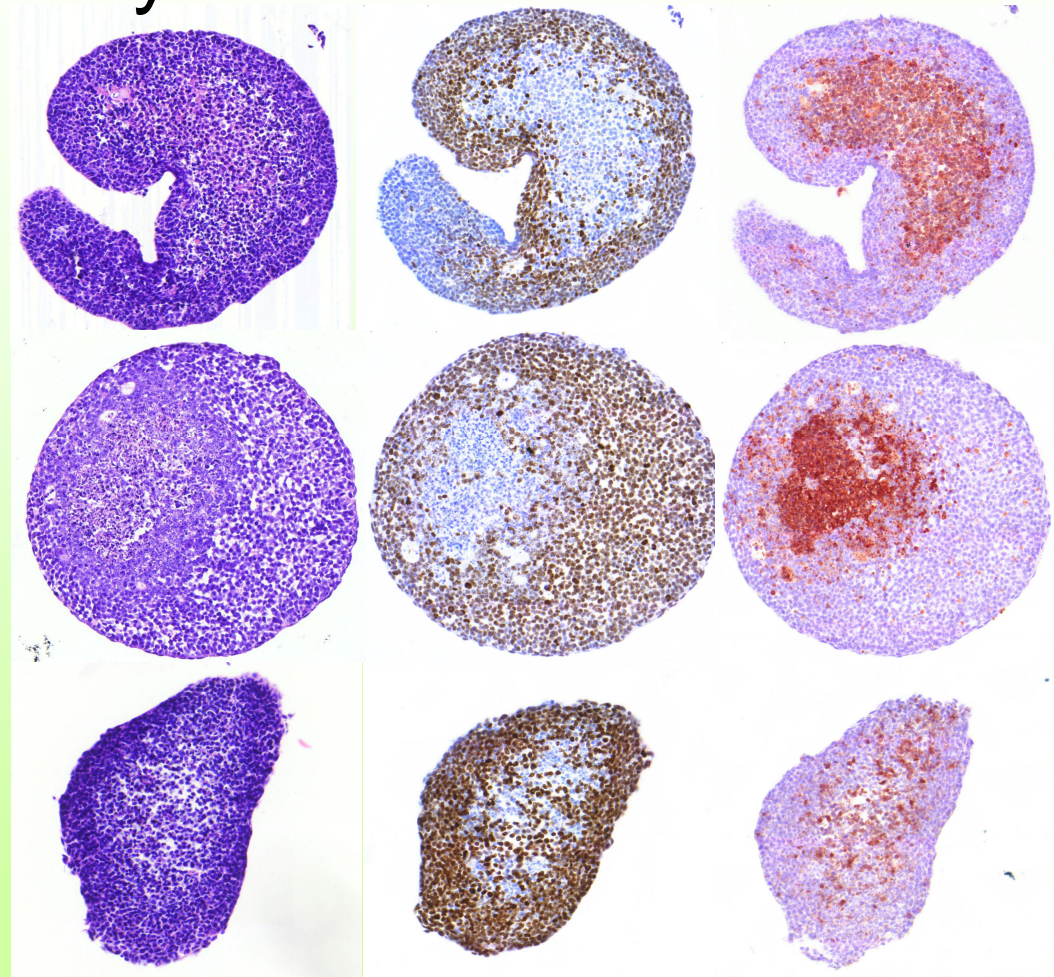
- Egér neurális sejt vonal
  - Ki67: proliferáció
  - Caspase3: apoptózis
  - Class III  $\beta$ -Tubulin: neurális marker





# Embryoid testek

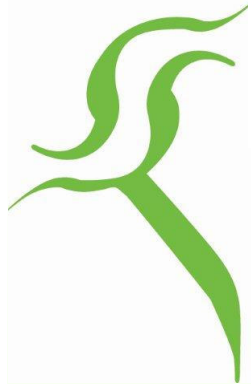
- Egér kardiális sejtvonala
  - STLV
  - HD
  - Statikus szuszpenzió



HE

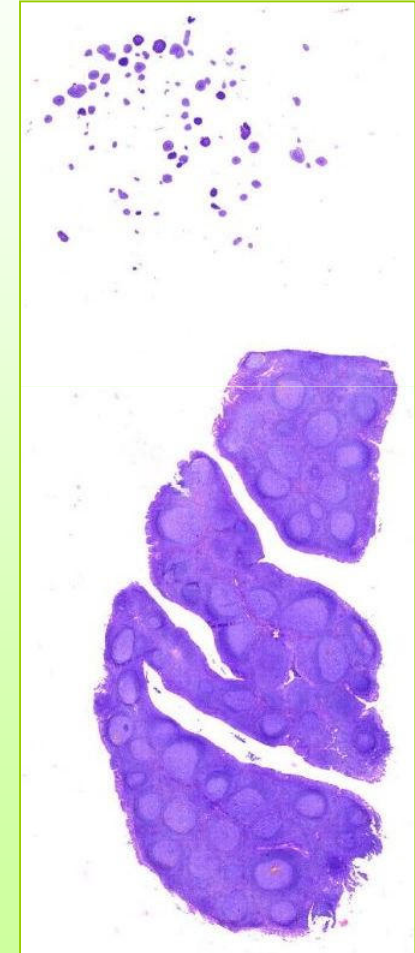
Ki67

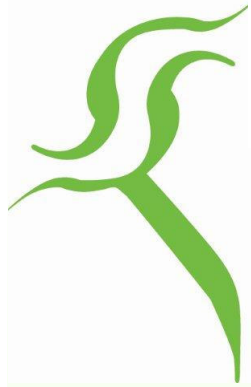
Caspase3



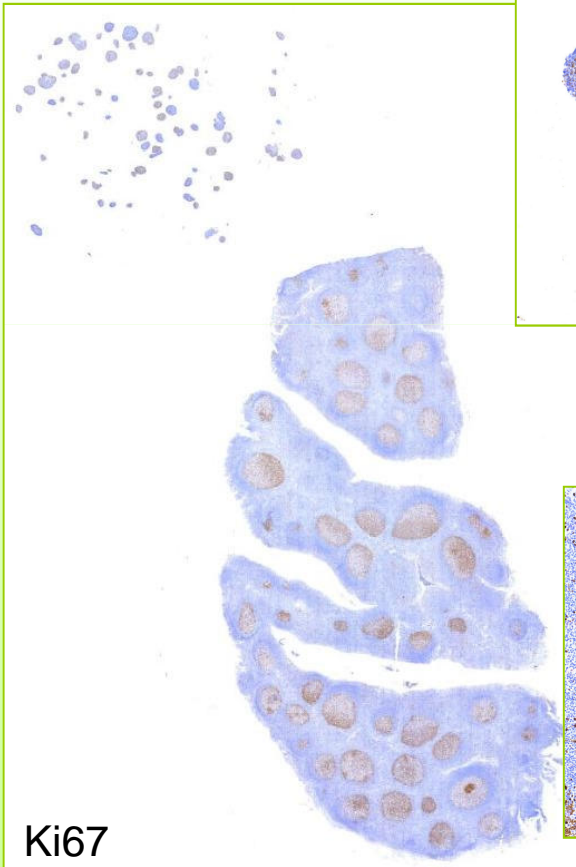
## Embryoid testek mint pozitív kontroll

- A tökéletes pozitív kontroll, mert:
  - önmegújító képesség → ugyanaz a sejtvonal → standardizálható és reprodukálható
  - nagy mennyiségű, de kis méretű anyag → jól variálható, beilleszthető a blokkba
  - differenciációja befolyásolható → sokrétű
  - transzfektálható → a számunkra érdekes antigén/antigének termeltethetők
  - szövetként kezelhető, háromdimenziós
  - gyorsan elkészíthető
  - hűtőben eltárolható histogelben → később paraffin blokkba ágyazható
- Nehézségek: kis méret, specifikus beágyazás

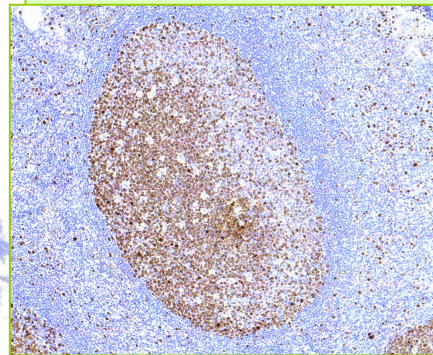
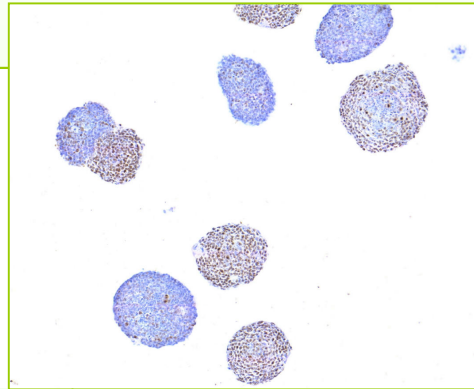




# Embryoid testek mint pozitív kontroll



Ki67



Caspase3

