

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vliv délky fixace a typu fixačního roztoku na  
imunohistochemickou analýzu při detekci  
kmenových buněk ve tkáni endometria**

**Bc. Dominika Macháčová**

**Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.**

**Konzultant: MUDr. Jiří Lenz, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2021**

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu práce prof. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, Ph.D za vedení této práce, věcné připomínky a vstřícnost. Dále bych ráda poděkovala celému týmu Patologicko-anatomického oddělení Nemocnice Znojmo za ochotu podílet se na vzniku této práce a praktickou pomoc. Především bych ráda poděkovala MUDr. Jiřímu Lenzovi, Ph.D za jeho odborné rady, věcné připomínky, spoustu inspirativních námětů a zejména za čas, který mi při řešení této práce věnoval.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 14.05.2021

PODPIS STUDENTA

<b>1. OBSAH</b>	
<b>2. ABSTRAKT</b> .....	<b>6</b>
<b>3. ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>4. ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE</b> .....	<b>11</b>
<b>6. FIXACE</b> .....	<b>12</b>
6.1    FIXAČNÍ ROZTOKY .....	12
6.1.1 <i>Formaldehyd</i> .....	13
6.1.2 <i>Glutaraldehyd</i> .....	14
6.1.3 <i>Methanol a ethanol</i> .....	14
6.1.4 <i>Carnoyův fixační roztok a Methacarn</i> .....	14
6.1.5 <i>Greenfix</i> .....	14
6.1.6 <i>Antigenfix</i> .....	15
6.1.7 <i>Kyselina pikrová</i> .....	15
6.1.8 <i>Bouinův fixační roztok</i> .....	15
6.1.9 <i>Chlorid zinečnatý a síran zinečnatý</i> .....	16
6.2    FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ FIXACI .....	16
6.2.1 <i>Teplota</i> .....	16
6.2.2 <i>Délka Fixace</i> .....	16
6.2.3 <i>Rychlost penetrace</i> .....	16
6.2.4 <i>Rozměry vzorku</i> .....	17
6.2.5 <i>Poměr objemu</i> .....	17
6.2.6 <i>pH a pufr</i> .....	17
6.2.7 <i>Koncentrace fixačního roztoku</i> .....	17
6.2.8 <i>Osmolalita</i> .....	18
<b>7. HISTOLOGIE DĚLOHY</b> .....	<b>19</b>
7.1    ENDOMETRIUM.....	20
7.2    OVULACE .....	21
<b>8. KMENOVÉ BUŇKY VE TKÁNI ENDOMETRIA</b> .....	<b>22</b>
8.1    EPITELOVÉ PROGENITOROVÉ BUŇKY .....	23
8.2    MEZENCHYMÁLNÍ BUŇKY VE TKÁNI ENDOMETRIA .....	24
8.3    BUŇKY VEDLEJŠÍ POPULACE .....	27
<b>9. IMUNOHISTOCHEMIE</b> .....	<b>28</b>
9.1    MONOKLONÁLNÍ A POLYKLONÁLNÍ PROTILÁTKY.....	28
9.2    PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKY .....	29
9.2.1 <i>Protilátka proti progesteronovým receptorům</i> .....	29
9.2.2 <i>Protilátka proti SOX2</i> .....	29
9.3    STRUKTURA ANTIGENŮ .....	30
9.4    DETEKČNÍ SYSTÉMY .....	30
9.4.1 <i>Přímá metoda</i> .....	31
9.4.2 <i>Nepřímé metody</i> .....	31

9.5	POSTUP PROVÁDĚNÍ IHC .....	34
9.5.1	<i>Demaskování antigenů</i> .....	36
9.5.2	<i>Blokování proteinů</i> .....	36
9.5.3	<i>Blokování endogenních enzymů</i> .....	36
9.5.4	<i>Ředění a inkubační čas primární protilátky</i> .....	37
9.6	MOŽNOSTI HODNOCENÍ IHC.....	37
<b>10.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>38</b>
10.1	PREANALYTICKÁ FÁZE .....	38
10.2	ANALYTICKÁ FÁZE .....	38
10.2.1	<i>Zhotovení parafínového bloku</i> .....	38
10.2.2	<i>Barvení HE</i> .....	39
10.2.3	<i>Imunohistochemické barvení</i> .....	39
10.3	POSTANALYTICKÁ FÁZE .....	41
10.3.1	<i>Hodnocení vlivu fixace na IHC</i> .....	41
10.3.2	<i>Hodnocení vlivu fixace na histomorfologickou analýzu buněčných a tkáňových struktur</i> .....	41
10.3.3	<i>Statistická analýza</i> .....	41
<b>11.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>42</b>
11.1	HODNOCENÍ IMUNOHISTOCHEMICKÉ EXPRESE PR V PRASEČÍM ENDOMETRIU .....	42
11.2	HODNOCENÍ IMUNOHISTOCHEMICKÉ EXPRESE SOX2 V KRAVSKÉM ENDOMETRIU.....	49
11.3	VLIV TYPU FIXAČNÍHO ROZTOKU NA MORFOLOGICKOU ANALÝZU BUNĚČNÝCH A TKÁŇOVÝCH STRUKTUR .....	55
<b>12.</b>	<b>DISKUSE.....</b>	<b>59</b>
12.1	VLIV DÉLKY FIXACE A TYPU FIXAČNÍHO ROZTOKU NA IHC.....	59
12.2	EXPRESSE SOX2 A PR V ENDOMETRIU .....	62
12.3	VLIV VOLBY FIXAČNÍHO ROZTOKU NA MORFOLOGICKOU ANALÝZU BUNĚČNÝCH A TKÁŇOVÝCH STRUKTUR .....	63
<b>13.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>65</b>
<b>14.</b>	<b>POUŽITÉ ZKRATKY.....</b>	<b>66</b>
<b>15.</b>	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>67</b>
<b>16.</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>67</b>
<b>17.</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>68</b>

## **2. ABSTRAKT**

**Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biologických a lékařských věd**

**Název diplomové práce: Vliv délky fixace a typu fixačního roztoku na imunohistochemickou analýzu při detekci kmenových buněk ve tkáni endometria**

**Autor: Bc. Dominika Macháčová**

**Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.**

Cíle: Cílem této práce je zjistit, jak typ fixačního roztoku a délka fixace ovlivňuje imunohistochemii.

Materiály a metody: Do této studie bylo zahrnuto celkem pět prasečích a pět kravských endometrií pocházejících z resekátů hysterektomie. Zjišťována byla imunohistochemická exprese progesteronových receptorů a SOX2 ve tkáních endometria fixovaných v pěti fixačních roztocích (Formol, Antigenfix, Greenfix, Bouin, Methacarn) po 1,5; 8,5; 15,5; 29,5; 64,5 a 189,5 dnech fixace. Imunohistochemické barvení bylo provedeno na barvicím automatu Ventana Benchmark ULTRA.

Výsledky: Imunohistochemická exprese progesteronových receptorů byla po 1,5 – 64,5 dnech fixace formolem prokázána u 92-87 % žlázových buněk a u 59 % buněk po 189,5 dnech fixace. Intenzita reakce byla hodnocena jako silná, po 189,5 dnech klesla na slabou. U tkání fixovaných Antigenfixem byla pozorována silná exprese progesteronových receptorů u 96,4 % žlázových buněk po 1,5 dni fixace, u 77 % buněk po 29,5 dnech fixace a u 72,6 % buněk byla po 64,5 dnech fixace exprese středně silná. Po 189,5 dnech byla zaznamenána negativita obou sledovaných parametrů. V případě Bouinova fixačního roztoku byla po 1,5 dni fixace zaznamenána slabá exprese progesteronových receptorů u 7,2 % žlázových buněk. V dalších časových obdobích exprese zcela vymizela. Ve tkáních fixovaných Greenfixem byla slabá exprese progesteronových receptorů zaznamenána u 39 % buněk pouze po 1,5 dni fixace.

U tkání fixovaných methacarnem nebyla zaznamenána exprese progesteronových receptorů v žádném ze sledovaných období.

Intenzita imunohistochemické exprese SOX2 po fixaci tkáně formolem byla hodnocena po 1,5 dni jako extra silná, v období 8,5; 15,5; 29,5 a 64,5 silná a po 189,5 dnech jako slabá. Ve sledovaném období 1,5-189,5 dnech bylo nabarveno průměrně 98,4-94,8 % žlázových buněk. Expese SOX2 ve tkáních fixovaných Antigenfixem byla v celém období podobná (pozitivita u více než 94 % žlázových buněk). Intenzita reakce byla v období 1,5 a 8,5 extra silná, po 15,5; 29,5; 64,5 a 189,5 dnech silná. Po fixaci Bouinem byla zaznamenána exprese SOX2 u 96 % žlázových buněk, intenzita reakce byla středně silná. U tkání fixovaných Greenfixem a methacarnem nebyla zaznamenána imunohistochemická exprese SOX2 v žádném ze sledovaných období.

Závěr: Bylo zjištěno, že nejlepším fixačním roztokem pro imunohistochemické barvení je formol, a to jak pro krátkodobou, tak dlouhodobou fixaci. Dalším velmi vhodným fixačním roztokem je Antigenfix, u kterého bylo dosaženo srovnatelných výsledků. Pro krátkodobou fixaci lze doporučit také Bouinův fixační roztok, pro účely dlouhodobé fixace je však nevhodný. Greenfix nelze příliš doporučit ani pro krátkodobou fixaci, pro dlouhodobou fixaci je nevhodný. Zcela nevhodný je pro účely imunohistochemie methacarn, u kterého byla prokázána negativita obou parametrů ve všech časových obdobích.

Klíčová slova: Imunohistochemie, endometrium, fixační roztok, progesteronové receptory, SOX2

### **3. ABSTRACT**

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biological and Medical Sciences**

**Title of Diploma Thesis: Influence of fixation time and type of fixative solution on immunohistochemical analysis in the detection of stem cells in endometrial tissue**

**Author: Bc. Dominika Macháčová**

**Supervisor of Diploma Thesis: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.**

Background: The aim of this diploma thesis was to investigate the effect of the type of fixative solution and the length of fixation on immunohistochemistry.

Materials and methods: A total of five porcine and five bovine endometria obtained from hysterectomy specimens were included in this study. Immunohistochemical staining with progesterone receptors and SOX2 in endometrium fixed in five fixative solutions (Formol, Antigenfix, Greenfix, Bouin, Methacarn) were performed after 1,5; 8,5; 15,5; 29,5; 64,5 and 189,5 days of fixation. An automated immunostainer Ventana Benchmark Ultra was used for all immunohistochemical analysis.

Results: Expression of progesterone receptors was demonstrated in 92-87 % of glandular cells after 1,5-64,5 days and in 59 % of cells after 189,5 days of formalin fixation. The intensity of staining was strong, but after 189,5 days it was evaluated as being weak. In Antigenfix-fixed tissues, strong progesterone receptors expression was observed in 96,4 % of glandular cells after 1,5 days, in 77 % of cells after 29,5 days and in 72,6 % of cells with only moderate staining after 64,5 days of fixation. After 189,5 days, the immunoreaction was completely negative. In Bouin-fixed tissues, weak progesterone receptors expression was observed in 7,2 % of glandular cells after 1,5 days of fixation. Other time periods were negative. After only 1,5 days of fixation with



Greenfix, 39 % of glandular cells showed weak progesterone receptors expression. Immunohistochemical staining with progesterone receptors in methacarn-fixed tissues was completely negative over all time periods.

The intensity of staining for SOX2 after formalin fixation was determined to be extra-strong after 1,5 days, strong after 8,5; 15,5; 29,5 and 64,5 days and weak after 189,5 days of fixation. In the period of 1,5 to 189,5 days, an average of 98,4-94,8 % of glandular cells showed positivity with SOX2. The expression of SOX2 in Antigenfix-fixed tissues was the same over almost all time periods (positivity in more than 94 % of glandular cells). The intensity of staining was extra-strong after 1,5 and 8,5 days and strong after 15,5; 29,5; 64,5 and 189,5 days of fixation. After Bouin's fixation, moderate expression of SOX2 was detected in 96 % of glandular cells. Immunohistochemical staining was completely negative in tissues fixed with Greenfix and methacarn over any of the periods evaluated.

Conclusion: In our study, formol was the best fixative solution for immunohistochemistry. It proved to be the most suitable fixative for long-term and short-term fixation. Another very suitable fixative solution is Antigenfix, for which comparable results have been obtained with formol. Bouin's fixative solution can also be recommended for short-term fixation, but it is unsuitable for long-term fixation. Greenfix cannot be recommended for short-term fixation, it is completely unsuitable for long-term fixation. By far the worst fixative in our study was methacarn, which is completely unsuitable for immunohistochemistry (regardless of the time of fixation).

Key words: Immunohistochemistry, endometrium, fixative solution, progesterone receptors, SOX2

## 4. ÚVOD

Imunohistochemie je metoda založená na interakci antigenu s protilátkou. Tato reakce je následně vizualizována barvením (Brandtzaeg, 1998; Haines et al., 2005). Imunohistochemie se uplatňuje zejména v histopatologických laboratořích, kde tvoří nedílnou součást diferenciální diagnostiky a stanovení prognosticko – prediktivních markerů (Kim et al., 2016). Přestože se jedná o poměrně jednoduchou techniku, její výsledek je značně závislý na několika faktorech. Při zpracování prochází tkáň procesy, které ovlivňují strukturu antigenů. Nejvýznamnější z těchto procesů je fixace tkáně. Fixační prostředky by měly zabraňovat poškození tkáně během jejího následného zpracování a z hlediska imunohistochemie především zachovávat vazebná místa pro protilátky a jejich dostupnost (Battifora, Kopinski, 1986). Některé fixační roztoky mohou maskovat epitopy a tím zapříčinit ztrátu antigenicity. Z tohoto důvodu má volba fixačního roztoku zásadní vliv na výsledek imunohistochemického barvení. Významná je nejen volba konkrétního fixačního roztoku, ale také délka trvání fixace. Pokud je tkáň fixována příliš krátkou dobu, dochází k nedostatečné penetraci fixačního roztoku do tkáně a tím k neúplnému zesítní polypeptidových řetězců či koagulaci proteinů, v závislosti na typu používaného fixačního roztoku. Naopak nadměrné prodloužení doby fixace může vést k signifikantnímu poškození antigenních míst tkáně (Doyle, Oleary, 1992).

Endometrium je v současnosti považováno za atraktivní zdroj kmenových buněk, které lze z této tkáně snadno získat biopsií, což je méně bolestivý a invazivní zákrok ve srovnání s aspirací kostní dřeně či liposukcí. Pro účely regenerativní medicíny tak mohou být tyto buňky využity k léčbě některých onemocnění, jako například diabetes mellitus 1. typu, či srdečních a neurodegenerativních chorob a svalové degenerace (Verdi et al., 2014).

## **5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE**

Prvním z cílů této práce bylo nastudovat řešenou problematiku a vytvořit literární rešerši. Dalším cílem bylo prokázat, jak délka fixace a typ fixačního roztoku ovlivňuje imunohistochemickou analýzu.

## 6. FIXACE

Fixace je klíčovým krokem ve zpracování bioptického materiálu, jelikož umožňuje jeho další zpracování a archivaci (Fox et al., 1985). Účelem fixace je zabránění autolýze a hnilobě tkání, dále zachování buněčné architektury a složení buněk ve tkáni, čímž je zajištěna její odolnost při dalším zpracování. Fixace tkáně může být dosaženo fyzikálními či chemickými metodami, případně jejich kombinací (Bancroft and Gamble, 2002; Freida, Carson, 2009). Fyzikální metody zahrnující tepelnou, mikrovlnou fixaci či fixaci mrazem nejsou v rutinní praxi příliš využívány. Mnohem rozšířenější je chemická fixace. Chemické fixace je nejčastěji dosaženo procesem zvaným imerze, při které je vzorek tkáně ponořen do fixačního roztoku o přibližně 20x větším objemu, než je fixovaná tkáň. Aby došlo k fixaci, musí fixační roztok zcela proniknout skrz tkáň. Tento proces je silně ovlivněn velikostí vzorku a typem fixačního roztoku (Helwitt et al., 2008). Existuje mnoho postupů fixace lišících se jak ve složkách či podílu jednotlivých složek, tak způsobem, jakým jsou použity v závislosti na vzorku a účelu použití. Spolu s fixačními sloučeninami obsahují fixační roztoky i další složky upravující některé vlastnosti jako je osmolarita nebo pH. Většina fixačních roztoků je rozpuštěna v pufovaných roztocích s neutrálním pH, které zamezuje ovlivnění tkáňových struktur (Eltoum et al., 2001).

Neexistuje ideální fixační roztok, který by dokonale zachovával buněčnou morfologii a zároveň neovlivňoval antigenicitu tkáně. Z tohoto důvodu je důsledný výběr konkrétního fixačního roztoku velmi zásadní (Fox et al., 1985; Helwitt et al., 2008).

### 6.1 Fixační roztoky

S ohledem na důležitost fixace v analytickém procesu jsou na jednotlivé fixační roztoky kladeny nemalé nároky. Nejdůležitější funkcí fixačních roztoků je zabránění autolýze a hnilobě tkání. Fixační roztoky stabilizují buněčné složky tak, že je činí nerozpustnými, čímž dochází k redukci změn vzniklých dalším zpracováním tkáně a zabránění osmotickému poškození tkáně, které může způsobit její smršťování či otok. Dále fixační roztoky usnadňují propustnost tkáně pro následně použitá činidla a hrají

roli při zdůrazňování odlišnosti indexu lomu, a tím zvýšení viditelnosti jednotlivých struktur tkáně.

Na základě mechanismu fixace lze fixační prostředky rozdělit do několika skupin. Fixační roztoky na bázi alkoholu fixují tkáň prostřednictvím denaturace proteinů, k čemuž dochází odstraněním vody z volných karboxylových, hydroxylových, amino, amido a imino skupin proteinů. To vede k destabilizaci hydrofobních a hydrofilních vazeb v proteinech a následně ke změnám jejich sekundární a terciární struktury. (Baker et al., 1958). Alkoholy denaturují proteiny rozdílně na základě typu a koncentraci alkoholu, přítomnosti organických a anorganických skupin, pH a teplotě fixace. Aldehydy způsobují zesítnění proteinů, fixační roztoky s kovovou skupinou vytváří nerozpustné kovové sraženiny (Bancroft, Stevens, 1996). Výběr fixačního roztoku závisí na typu vyšetřované tkáně a dále používaných testech (Grizzle et al., 2008).

### **6.1.1 Formaldehyd**

Formaldehyd je nejpoužívanějším fixačním roztokem jak pro histomorfologickou analýzu tkání, tak pro imunohistochemii (Eltoum et al., 2001). Jedná se o malou plynnou molekulu, která se obvykle vyskytuje ve formě 37% roztoku formaldehydu vytvořeného probubláváním plynu formaldehydu přes vodu do bodu saturace. V histologických laboratořích se nejčastěji používá jako 10% roztok, tedy 4% formaldehyd zředěný ve vodě zvaný formol (Fox et al., 1985). Aktivní složkou v roztoku formaldehydu je methylen glykol, hydratovaná forma formaldehydu (Kiernan, 2000). Základní mechanismus fixace formaldehydem je tvorba adičních produktů mezi formalínem a nenabitými reaktivními aminoskupinami (-NH, -NH<sub>2</sub>) vytvářející zesítnění. Po zformování adičního produktu dochází v přítomnosti druhého reaktivního vodíku k vytvoření methylenového můstku. Výsledkem formaldehydové fixace je změna konformace makromolekul, která znesnadňuje či dokonce znemožňuje rozpoznání antigenů protilátkou (Montero, 2003). Prostřednictvím těchto změn dochází k modifikaci terciární a kvartérní struktury proteinů. Primární a sekundární struktura zůstává téměř nezměněna (Mason, O'Leary, 1991; Hayat, 2002).

### **6.1.2 Glutaraldehyd**

Glutaraldehyd je dalším zástupcem ze skupiny zesíťujících fixačních roztoků. Jeho vodný roztok je směsí skládající se z 4% volného aldehydu, 16% monohydrátu, 9% dihydrátu a 70% hemiacetalu. Glutaraldehyd prostřednictvím svých aldehydových funkčních skupin reaguje zejména s e-aminoskupinami aminokyselin a nukleových kyselin (Sabatini et al., 1963; Hopwood, 1967; Eltoun et al., 2001). Širšímu využití glutaraldehydu v praxi brání zejména jeho pomalá penetrace do tkáně a nutnost pravidelného čištění pro udržení funkční hladiny aldehydu. Uplatňuje se především jako fixační roztok pro elektronovou mikroskopii (Freida, Carson, 2009).

### **6.1.3 Methanol a ethanol**

Ethanol a methanol fixují tkáň prostřednictvím dehydratace a koagulace proteinů, především cytosolických (Eltoun et al., 2001). Obecně je pro fixaci tkáně upřednostňován methanol před ethanolem, jelikož lépe konzervuje tkáň a nezpůsobuje její ztvrdnutí. Oba tyto alkoholy jsou vhodné především pro fixaci vzorků malé velikosti a pro uchování proteinů jako jsou enzymy, glykogen a některé pigmenty. Využívány jsou zejména pro fixaci krevních nátěrů a kryořezů z nefixovaných vzorků (Leong, 1994; Lillie, Fullmer, 1976).

### **6.1.4 Carnoyův fixační roztok a Methacarn**

Carnoyův fixační roztok se skládá z ethanolu, chloroformu a kyseliny octové. Je vhodný pro fixaci fibrózních proteinů a glykogenu. Velmi dobře fixuje také nukleové kyseliny, přestože mírně modifikuje jadernou morfologii (Baker, 1958). Fixace tímto fixačním roztokem probíhá velmi rychle, čímž dochází k nadměrnému ztvrdnutí a retrakci tkáně. Nahrazením ethanolu methanolem vzniká methacarn, jehož hlavní výhodou v porovnání s Carnoyovým fixačním roztokem je menší retrakce fixované tkáně, a především schopnost chránit antigenní místa tkáně (Puchtler et al., 1968).

### **6.1.5 Greenfix**

Greenfix je fixační roztok na bázi glyoxalu. Glyoxal je dialdehyd, který má díky přítomnosti dvou aldehydických funkčních skupin podobné fixační vlastnosti jako

formaldehyd. Přítomnost ethyl alkoholu zajišťuje lepší penetraci glyoxalu do tkáně a zvyšuje jeho fixační kapacitu. Greenfix může být použit pro různé způsoby zpracování tkáně a barvicí techniky. Je vhodným fixačním roztokem pro imunohistochemické a molekulárně biologické metody. Lze jej použít jako primární či sekundární fixační roztok i v kombinaci s ostatními fixačními roztoky (Gatta et al., 2012).

### **6.1.6 Antigenfix**

Antigenfix je fixační roztok na bázi paraformaldehydu. Kromě paraformaldehydu se ve složení tohoto fixačního roztoku nachází také dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát a dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát. Paraformaldehyd je polymerní formaldehyd, který po zahřátí depolymerizuje zpět na formaldehyd. Tento fixační roztok je vhodný pro zachování antigenů a je doporučován jako nejlepší fixační roztok pro imunohistochemii (Khazipov et al., 2015).

### **6.1.7 Kyselina pikrová**

Kyselina pikrová fixuje tkáň prostřednictvím koagulace proteinů tvorbou málo rozpustných solí, tzv. pikrátů. Běžně se používá 2-15% nasycený roztok kyseliny pikrové v kombinaci s jinými fixačními roztoky. Při správně zvolené době fixace je kyselina pikrová vhodným fixačním roztokem pro zachování buněčné struktury, glykogenu a lipidů (Carleton et al, 1980; Freida, Carson, 2009). Před vložením vzorku do parafínu je třeba kyselinu pikrovou odstranit důkladným promytím, jelikož kyselina pikrová znesnadňuje prosycení tkáně parafínem. Nejrozšířenějším fixačním roztokem obsahujícím kyselinu pikrovou je Bouinův fixační roztok (Luna 1992).

### **6.1.8 Bouinův fixační roztok**

Bouinův fixační roztok se skládá z kyseliny pikrové, kyseliny octové a formaldehydu. Tento fixační roztok má tedy jak koagulační, tak zesíťující účinek na proteiny. Ke koagulaci proteinů dochází prostřednictvím pomalé penetrace kyseliny pikrové do tkáně, zatímco kyselina octová proniká poměrně rychle a zabraňuje smršťování tkáně vyvolané kyselinou pikrovou. V přítomnosti formaldehydu

v koncentraci přibližně 10 % způsobuje v průběhu času vznik zesítujících vazeb ve tkáni, což může být potlačeno nízkým pH v rozmezí 1,3-1,6 (Baker, 1958).

### **6.1.9 Chlorid zinečnatý a síran zinečnatý**

Zinečnaté soli jsou již dlouhou dobu používány jako fixační prostředky a jsou součástí několika fixačních roztoků. V současnosti se nejčastěji kombinují s paraformaldehydem, kde slouží k usnadnění fixace a zachování tkáňových antigenů pro imunohistochemické techniky, jelikož minimalizují maskování antigenů způsobené paraformaldehydem. Zinek musí být po ukončení fixace ze vzorku odstraněn důkladným promytím destilovanou vodou (Hopwood 1973; Eltoum et al, 2001).

## **6.2 Faktory ovlivňující fixaci**

### **6.2.1 Teplota**

Zvýšením teploty dochází ke zrychlení difúze fixačního roztoku do tkáně a je urychlena chemická reakce mezi fixačním roztokem a tkáňovými komponenty. Při vyšší teplotě se však urychluje také degradace tkáně v nefixovaných oblastech vzorku (Hornickel et al., 2011).

### **6.2.2 Délka Fixace**

Optimální délka fixace je pro jednotlivé fixační roztoky rozdílná. Obecně je pro dostatečnou fixaci nezbytné, aby fixační roztok difúzně pronikl do středu vzorku a následně byl ponechán dostatek času pro proběhnutí reakce. Délka fixace má zásadní vliv na kvalitu výsledného preparátu, neboť nedostatečně či naopak nadměrně fixovaná tkáň se hůře zpracovává (Freuda, Carson, 2009).

### **6.2.3 Rychlost penetrace**

Rychlost penetrace fixačního roztoku závisící na jeho difúzních vlastnostech může být vyjádřena vztahem dle Medawara jako  $d = \sqrt{Kt}$  kde  $d$ , je hloubka penetrace a  $K$  je difúzní koeficient.  $T$  je čas. Difúzní koeficient tedy představuje vzdálenost



v milimetrech, kterou fixační roztok pronikl do tkáně za jednu hodinu (Medawar, 1941).

#### **6.2.4 Rozměry vzorku**

Velikost vzorku je důležitým faktorem ovlivňující kvalitu fixace, neboť příliš velký vzorek neumožňuje úplnou penetraci fixačního roztoku do hlubší části tkáně, což vede k její autolýze. Pro úplnou penetraci je nejvhodnější tloušťka vzorku 4-6 mm (Freuda, Carson, 2009).

#### **6.2.5 Poměr objemu**

Pro správnou fixaci je důležité zachovat nadbytečný objem fixačního roztoku k celkovému objemu tkáně, přičemž doporučený poměr fixačního roztoku ku fixované tkáni je 20:1. Objem fixačního roztoku ovlivňuje kvalitu fixace zejména v případě použití adičních fixačních roztoků, jelikož během procesu fixace dochází k vyčerpání účinné koncentrace roztoku (Fox et al., 1985).

#### **6.2.6 pH a pufry**

Kvalita fixace není vlivem pH fixačního roztoku na úrovni světelné mikroskopie příliš změněna, jelikož řada fixačních roztoků má nízké pH, jako například fixační roztoky obsahující kyselinu octovou či pikrovou. Při fixaci formaldehydem má však pH zásadní význam, jelikož při rozkladu formaldehydu na kyselinu mravenčí vzniká kyselý roztok, který reaguje s hemoglobinem za vzniku artefaktového pigmentu. Z tohoto důvodu je formaldehyd pufrován na pH 6.8-7.2 (Carson, 1997).

#### **6.2.7 Koncentrace fixačního roztoku**

Snížená koncentrace fixačního roztoku prodlužuje dobu fixace. Naopak pokud je koncentrace fixačního roztoku příliš vysoká, může dojít k poškození buněčných struktur a enzymatické aktivity. Ideální koncentrace pro jednotlivé fixační roztoky je stanovena experimentálně (Thornthwaite et al., 1978).

### **6.2.8 Osmolalita**

Osmotické účinky fixačního roztoku ovlivňují ultrastrukturu tkáně, zejména pak fosfolipidové membrány, které mohou být snadno poškozeny kontaktem s příliš hypotonickým či naopak hypertonickým roztokem. Nejvýznamnější je osmolalita pufry, která obvykle bývá upravena tak, aby připomínala tkáňovou tekutinu (Freuda, Carson, 2009).

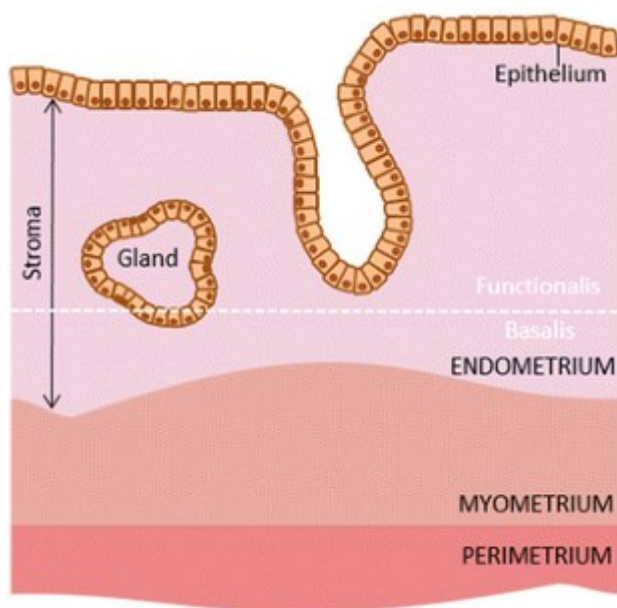
## 7. HISTOLOGIE DĚLOHY

Děloha (uterus) je dutý tlustostěnný orgán, který je u zvířat tvořen dvěma děložními rohy (cornua uteri), tělem děložním (corpus uteri) a děložním krčkem (cervix uteri) (Eurell, Frappier, 2006).

Stěna dělohy je tvořena následujícími vrstvami: děložní sliznicí (endometrium), svalovou vrstvou (myometrium) a povrchovou vrstvou (perimetrium) (Obr.1).

Perimetrium je seróza, která pokrývá celou dělohu. Myometrium je nejmohutnější vrstvou děložní stěny. Sestává se ze snopců buněk hladké svaloviny s velmi komplikovaným uspořádáním (Eurell, Frappier, 2006). Endometrium bude v následující kapitole blíže popsáno.

**Obrázek 1. Schématické znázornění stěny děložní**



Děložní stěna tvořená serózou (perimetrium), svalovou vrstvou (myometrium) a děložní sliznicí (endometrium). Endometrium je tvořeno vrstvou vaziva (stroma) s děložními žlázkami (gland) a epitelem (epithelium). Funkční rozdělení endometria na zona basalis a functionalis je používáno pouze u vyšších homoidních primátů a u lidí.

Zdroj: Campo et al., 2017 (převzato).

## **7.1 Endometrium**

Endometrium se skládá z epitelu a z vrstvy slizničního vaziva. Sliznice prochází během pohlavního cyklu změnami, které jsou velmi rozsáhlé zejména u šelem a některých hlodavců. K méně výrazným změnám dochází u ostatních domácích savců. U samic primátů a žen probíhají v děložní sliznici specifické cyklické změny.

Epitel děložní sliznice u člověka je jednovrstevný cylindrický, u přežvýkavců a prasnic víceřadý s řasinkovými a sekrečními buňkami, které jsou zde dominantně zastoupeny. Mikroskopický vzhled epitelu prochází změnami během jednotlivých období pohlavního cyklu. U přežvýkavců v období proestru dochází k hromadění glykogenu v apikální i perinukleární cytoplazmě buněk. Buněčné hranice jsou zastřené a bazální membrána méně zřetelná. Na konci proestru se apikální části epitelových buněk rozpadají. Před ovulací dochází k intenzivní činnosti sekrečních buněk epitelu, přetrvávající celé období estru s přesahem do období menestru. Sekret je tvořen velkým množstvím glykogenu a hlenem. V období říje epitelem prostupují erythrocyty a dochází k mísení krve se sekretem žláz a následnému vytékání ze zevních rodidel. V menestru je epitel vysoký a bazální membránou zřetelně ohraničený od lamina propria mucosae (slizniční vazivo). V bazální třetině buněk jsou uložena jádra oválného tvaru, v apikálních částech dochází ke shromažďování glykogenu. Na povrchu epitelových buněk se nachází řasinky, které kmitají směrem k pochvě. Povrch epitelu je krytý tenkou vrstvou sekretu. V období diestru se zaokrouhlují jádra epitelových buněk a epitel se stává víceřadým. Slizniční vazivo je tvořeno hojným obsahem buněk. Početně jsou zde zastoupeny polyedrické či hvězdicové fibroblasty a bloudivé elementy, jako jsou lymfocyty či makrofágy. Vlákňitou složku tvoří řídká síť retikulárních vláken s jemnými kolagenními fibrily. Amorfní substance je zde zastoupena minoritně a elastická vlákna zcela chybí. Ve vrstvě slizničního vaziva jsou uloženy tubulózní děložní žlázy vystlané jednovrstevným cylindrickým epitelem, u přežvýkavců a prasnic epitelem víceřadým. Epitel je identický s epitelem na povrchu děložní sliznice a prochází během pohlavního cyklu podobnými změnami. Sekreční části děložních žláz jsou u přežvýkavců a prasnic užší, spirálovitě stočené. Směrem k povrchu sliznice se spojují v rozšířený krček žlázy. Tubuly děložních žláz u většiny druhů domácích zvířat zasahují až ke svalové vrstvě (Eurell, Frappier, 2006).

## 7.2 Ovulace

Ovulace začíná vyklenutím povrchu ovaria Graafovým folikulem. V místě největšího vyklenutí se stěna ovaria ztenčuje a bělavě prosvítá jako tzv. stigma. Zde dochází k prasknutí stěny vaječníku i folikulu a proud folikulární tekutiny strhává sekundární oocyt, který se spolu se svými obaly dostává na povrch ovaria. V tomto místě jej zachycují fimbrie vejcovodu a následně vstupuje do ampulárního úseku vejcovodu, kde v případě oplození dokončuje druhé zrcí dělení. Pokud k oplození nedojde, oocyt se během krátké doby stává neživotaschopným a za 24 hodin nastává jeho regrese (Eurell, Frappier, 2006). U zvířat probíhá ovulace v období zvaném říje, která se cyklicky opakuje a je doprovázena změnami na pohlavních orgánech. Dle frekvence ovulace se zvířata rozlišují na monoestrická, diestrická a polyestrická. Hospodářská zvířata jsou polyestrická, říje se u nich opakuje v pravidelných intervalech vícekrát za rok. U krav, ovcí, koz a prasnic dochází k říji po 3 týdnech (Eurell, Frappier, 2006).

Na základě morfologických změn na pohlavních orgánech můžeme pohlavní cyklus rozdělit na následující období (Tab.1)

**Tabulka 1. Fáze cyklu a jeho charakteristiky**

Název období	Den cyklu	Charakteristika období
<b>Proestrus</b>	17.-21.	Období těsně po říji, dozrávání ovariálních folikulů, počátek zvýšené sekrece děložní sliznice
<b>Estrus</b>	1.-2.	Vlastní období říje, překrvení a zvýšená sekrece děložní sliznice, u jalovice se může objevit krvavý výtok ze zevních rodidel
<b>Metestrus</b>	3.-8.	Období těsně po říji, tvorba žlutého tělíska na vaječníku, děložní sliznice je připravena přijmout oplozené vajíčko
<b>Diestrus</b>	9.-17.	Nastává, pokud nedojde k oplození. Zmenšování žlutého tělíska a regrese děložní sliznice

Eurell, Frappier, 2006 (přepřacováno z textu do tabulky).

## 8. KMENOVÉ BUŇKY VE TKÁNI ENDOMETRIA

Kmenové buňky jsou nediferencované buňky se schopností sebeobnovy a produkce diferencovanějších dceřiných buněk (Gargett, 2007). Rozlišujeme dva typy kmenových buněk, embryonální a adultní. Pro oba typy těchto buněk je charakteristická schopnost diferencovat se na buňky různých buněčných linií (Shostak, 2006). Embryonální kmenové buňky se nachází ve vnitřní buněčné hmotě blastocysty (Bach et al., 2000). Adultní kmenové buňky odvozené z postembryonálních buněčných linií osídlují různé orgánové systémy. Představují vzácnou populaci buněk bez výrazných morfologických charakteristik. Z tohoto důvodu je jejich identifikace založena především na studiu funkčních vlastností (Eckfeldt et al., 2005). Adultní kmenové buňky se nachází v mikroprostředí okolních podpůrných buněk zvané niche. Niche napomáhá udržet kmenové buňky v nediferencovaném stavu a poskytuje jim ochranu před diferenciací, proliferací, ale i apoptózou. Dále jsou tyto podpůrné buňky schopny rozpoznat potřebu náhrady tkáně a dát podnět k proliferaci a diferenciaci rezidentním kmenovým buňkám (Li, Xie, 2005; Moore, Lemischka, 2006). Kmenové buňky ve tkáni endometria (eSC, endometrial stem cells) patří mezi adultní kmenové buňky. ESC získané z endometriální biopsie jsou klonogenní, schopny dlouhodobé kultivace a mají schopnost se diferencovat do mezodermálních a ektodermálních linií jako jsou hepatocyty, nervové buňky, osteoblasty, hladká svalovina, adipocyty, megakaryocyty a další. Jejich schopnost účastnit se regenerace a reparace tkání je podstatou obrovské regenerační kapacity endometria, které v průběhu života podstoupí více než 400 cyklů (Gargett et al., 2007). Zdrojem ESC mohou být fetální kmenové buňky či kmenové buňky pocházející z kostní dřeně (bmSC, bone marrow stem cells) (Kobayashi, Behringer, 2003; Körbling, Estrov, 2003). Embryonální reprodukční systém ženy se vyvíjí z mezodermy. Během proliferace této embryonální tkáně se některé z mezenchymálních buněk přemění na epiteliální, čímž dochází ke vzniku cylindrického epitelu. Ten později vytváří paramesonefrické nebo mülleriánské kanálky. Tyto kanálky jsou tvořeny povrchovým epitelem a podkladovým urogenitálním mezenchymem. Během fetálního vývoje dochází k invaginaci nediferencovaného povrchového epitelu dělohy do přilehlého mezenchymu. Tento proces dává vznik myometriu. Několik těchto epiteliálních a mezenchymálních buněk nejspíš zůstává

v adultním endometriu, kde osídlují především bazální stroma a mají schopnost nahradit všechny endometriální a myometriální buňky (Jacob et al., 1999; Kobayashi, Behringer, 2003). ESC pocházející z kostní dřeně cirkulují v malém množství v těle a osídlují různé orgány (Gargett et al., 2007). Přestože kostní dřeň může být zdrojem kmenových buněk ve tkáni endometria, není jisté, že se tyto buňky podílí na regeneraci endometria v průběhu menstruačního cyklu (Gargett et al., 2016).

## **8.1 Epitelové progenitorové buňky**

Existence epitelových progenitorových buněk ve tkáni endometria byla poprvé prokázána jejich identifikací v premenopauzálním a v atrofickém neaktivním postmenopauzálním endometriu žen (Chan et al., 2004, Schwab et al., 2005, Gargett et al., 2009). S ohledem na periodickou tkáňovou remodelaci zona functionalis se předpokládá, že tyto buňky sídlí v zona basalis, proto se výzkum hysterektomické tkáně zaměřuje především na tuto oblast (Padykula 1991; Gargett, 2007). Od objevu těchto buněk byl výzkum orientován zejména na identifikaci specifických markerů, přičemž jako první specifický marker endometriálního bazálního epitelu byl objeven stádiově specifický embryonální antigen 1 (SSEA-1, Stage specific embryonal antigen-1), známý též jako CD15 (Valentijn et al., 2013). SSEA-1 je exprimován na povrchu diferencovaných lidských embryonálních kmenových buněk, lidských neutrofilů a řadě myších buněk. V lidském endometriu je exprese SSEA-1 omezena na epitel a některé leukocyty (Knowles et al., 1978; Fox et al., 1983). Nejsilnější exprese tohoto markeru byla zaznamenána v zona basalis endometria. Při kultivaci byla u SSEA-1 pozitivních buněk zaznamenána vyšší aktivita telomerázy, nižší míra proliferace a delší telomery než u SSEA-1 negativních epitelálních buněk. Tyto vlastnosti jsou typické pro progenitorové buňky (Taylor, 2004, Garry et al., 2009, Huang et al., 2012). U SSEA-1 pozitivních buněk byla ve srovnání s SSEA-1 negativními buňkami zaznamenána nižší exprese progesterových receptorů (PR) a estrogenových receptorů  $\alpha$  (ESR1), což je známkou méně diferencovaného buněčného fenotypu. Naopak exprese ESR1 byla zaznamenána ve žlázovém epitelu zona basalis, a to v průběhu celého menstruačního cyklu, zatímco exprese v zona functionalis byla zjištěna pouze v proliferační fázi (Tempest et al., 2018). Lidské endometriální epitelové progenitorové buňky budou

tedy pravděpodobně subpopulací SSEA-1 pozitivních buněk, které se nacházejí ve spodní části zona functionalis sousedící se zona basalis (Capela, Temple, 2002). Přesná funkce SSEA-1 v endometriu zatím není známá, předpokládá se však, že je spjata s buněčnou diferenciací, adhezí a migrací (Valentijn et al., 2013).

Dalším nedávno objeveným markerem epitelových progenitorových buněk je N-cadherin, označovaný také jako CD235. N-cadherin je transmembránový protein, jehož funkcí je zprostředkování buněčné adheze. Pomocí *in vitro* testů bylo prokázáno, že N-cadherin pozitivní buňky mají při sériovém klonování výrazně větší schopnost sebeobnovy než epitelie, které tento marker neexprimují. V organoidních kulturách se N-cadherin pozitivní buňky diferencovaly na velké struktury podobné endometriálním žlázám s lumen lemovaným cytokeratin pozitivními epiteliálními buňkami. Na buněčné úrovni byla exprese N-cadherinu lokalizována na laterálním mezibuněčném spoji a apikálním povrchu epitelových buněk žláz nacházejících se v zona basalis endometria. Byla zaznamenána koexprese cytokeratinu a E-cadherinu a ESR1 u N-cadherin pozitivních buněk, pouze malá část z nich exprimovala také proliferační marker Ki-67 (Nguyen et al., 2017).

Zkoumána byla také spojitost mezi expresí SSEA-1 a N-cadherinu. Bylo zjištěno, že SSEA-1 pozitivní buňky byly umístěny více distálně od myometria, tedy blíže k zona functionalis než N-cadherin pozitivní buňky. Tento vztah naznačuje, že v pseudostratifikovaném kolumnárním epitelu endometriálních žláz existuje hierarchie, přičemž buňky exprimující N-cadherin se jeví jako nejprimitivnější, následované SSEA-1 pozitivními buňkami a zralými buňkami, které neexprimují ani jeden z těchto markerů (Nguyen et al., 2017).

## **8.2 Mezenchymální buňky ve tkáni endometria**

Mezenchymální kmenové buňky (MSC, mesenchymal stem cells) byly identifikovány v mnoha různých tkáních obsahujících stroma včetně endometria (Minguell et al., 2001). Původně byly nalezeny v kostní dřeni jako podpůrné hematopoetické buňky, v současnosti jsou však považovány za samostatnou populaci kmenových buněk (Bianco et al., 2001; La Russa et al., 2002). Mezenchymální kmenové buňky jsou definovány vlastnostmi jako je schopnost adherence k plastickému povrchu



a vytváření kolonií za standardních kultivačních podmínek, dále schopností diferenciací na osteoblasty, adipocyty a chondroblasty *in vitro*. Posledním charakteristickým znakem je exprese CD105, CD73 a CD90 a zároveň chybějící exprese povrchových molekul CD45, CD34, CD14 nebo CD11b, CD79a nebo CD19 a HLA-DR (Dominici et al., 2006).

Bylo prokázáno, že lidské a prasečí klonogenní endometriální buňky spolu s lidskými CD146/ receptor  $\beta$  růstového faktoru odvozený z krevních destiček (PDGFR $\beta$ , platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ ) pozitivními buňkami, SUSD2 pozitivními buňkami a stromálními buňkami ve tkáni endometria disponují *in vitro* vlastnostmi charakteristickými pro bmMSC (Gargett et al., 2009; Cervelló et al., 2010; Miernik, Karasinski, 2012). Tyto vlastnosti mají kultivované endometriální fibroblasty, buňky kostní dřeně a mnoha dalších orgánů. Bylo zjištěno, že klonální purifikované SUSD2 pozitivní buňky jsou schopny produkovat endometriální stroma a po transplantaci pod vazivové pouzdro parenchymu ledviny imunodeficientních myší se inkorporovaly do renálních cév (Masuda et al., 2012). Endometriální stromální buňky ze skupiny buněk vedlejší populace (SP, side populations) také vykazují *in vitro* některé vlastnosti typické pro bmMSC a jsou rovněž schopny (za podmínek zmíněných výše) produkovat endometriální stroma (Masuda et al., 2010; Cervelló et al., 2011). Naproti tomu kultivované lidské endometriální stromální buňky se *in vitro* vyznačují omezenější diferenciací kapacitou a mají schopnost diferencovat se do buněk kostní tkáně, kostní dřeně a buněk ektodermální či entodermální linie (Wolff et al., 2007; Dimitrov et al., 2008).

Pro endometriální MSC (eMSC) byly identifikovány specifické markery, které umožňují třídění těchto buněk průtokovou cytometrií za účelem jejich charakterizace. Jedná se o markery CD146, PDGFR $\beta$ , SUSD2 a MSCA-1 (Gargett, Masuda, 2010). Jako první byly pro populaci eMSC objeveny markery CD146 a PDGFR $\beta$ , jejichž koexprese byla zaznamenána u buněk s vyšší klonogenní kapacitou *in vitro* (Asmani et al., 2013). Přítomnost těchto buněk byla zaznamenána v perivaskulární oblasti zona basalis i zona functionalis. U CD146 a PDGFR $\beta$  pozitivních buněk byla zjištěna exprese markerů typických pro mezenchymální kmenové buňky, jako jsou CD29, CD44, CD73, CD90 a CD105. Při kultivaci ve vhodném indukčním médiu prošly tyto buňky multilineární

mezenchymální diferenciací v adipogenní, myogenní, chondrogenní a osteoblastické linii (Schwab, Gargett, 2007). Předpokládá se, že tato subpopulace se svým diferenciacním potenciálem podobá mezenchymálním kmenovým buňkám pocházejících z kostní dřene a tukové tkáně (Crisan et al., 2008).

Dalším markerem umožňujícím detekci eMSC byl SUSD2, známý též jako W5C5. Přítomnost SUSD2 pozitivních buněk byla zjištěna v zóně basalis i functionalis endometria. U SUSD2 pozitivních buněk byla prokázána schopnost diferenciace v adipocyty, osteocyty, chondrocyty, myocyty, endoteliální buňky a produkce endometriální stromální tkáně *in vivo* (Masuda et al., 2012). Za pomoci průtokové cytometrie byla zkoumána koexprese SUSD2, CD146 a PDGFR $\beta$ . Bylo zjištěno, že většina SUSD2 pozitivních buněk a všechny SUSD2/CD146 pozitivní buňky exprimovaly PDGFR $\beta$  (Gargett et al., 2016). Dále bylo prokázáno, že SUSD2/CD146 pozitivní buňky produkovaly více jednotek tvořících kolonie (CFU, colony forming unit) ve srovnání s CD146/PDGFR $\beta$  pozitivními buňkami. Vyšší množství SUSD2/CD146 pozitivních buněk bylo zaznamenáno v proliferačním endometriu, což poukazuje na jejich roli v růstu endometriálního stromatu zóny functionalis (Schwab et al., 2008; Ulrich et al., 2014). Dalším zkoumáním bylo zjištěno, že markery CD146 a PDGFR $\beta$  jsou exprimovány spíše na pericytech, zatímco SUSD2 je exprimován stromálními buňkami v perivaskulární oblasti (Gargett et al., 2016).

Dalším markerem lidských eMSC je antigen mezenchymálních kmenových buněk 1 (MSCA-1, mesenchymal Stem Cell Antigen 1). Bylo zjištěno, že tento marker je zcela identický s tkáňově nespecifickou alkalickou fosfatázou (TNAP, Tissue nonspecific alkaline phosphatase) (Bitensky, Cohen, 1965; Hoshi et al., 1997; Sobiesiak et al., 2010). Tento marker je exprimován lidskými embryonálními kmenovými buňkami a endometriálními CD146 pozitivními buňkami (Tempest et al., 2018). Dále je exprimován také na apikálním povrchu endometriálních žlázových epitelů, což snižuje jeho využitelnost pro účely izolace eMSC (Shoae-Hassani, 2013).

### **8.3 Buňky vedlejší populace**

Buňky vedlejší populace (SP) jsou charakterizovány schopností effluxu (odstraňování) fluorescenčního barviva Hoechst 33342 prostřednictvím ABC (ATP vázající kazety, ATP Binding Cassette) transportérů ABCG2 a ABCC1. Přítomnost těchto transportérů je univerzálním markerem adultních kmenových buněk (Tsuji et al., 2008; Cervelló, Simon, 2009; Masuda et al., 2010). V lidském endometriu se nachází až 5 % těchto buněk, přičemž vyšší množství bylo zaznamenáno v proliferační a menstruační fázi cyklu. Pomocí průtokové cytometrie bylo zjištěno, že SP představují smíšenou populaci zahrnující 51 % CD31 pozitivních endometriálních buněk, 27 % CD326/EpCAM pozitivních epiteliálních buněk a přibližně 10-14 % CD10 či PDGFR $\beta$  pozitivních stromálních buněk (Kato et al., 2007; Masuda et al., 2010). Buňky, které postrádají schopnost odstraňovat barvivo Hoechst 33342 bývají v cizojazyčné literatuře označovány jako tzv. buňky hlavní populace (MP, main population). MP se oproti SP vyznačuje signifikantně nižším počtem CD31 pozitivních endoteliálních buněk, zatímco množství stromálních a epiteliálních buněk je srovnatelné. Dále jsou MP navíc obohaceny o CD146/ PDGFR $\beta$  pozitivní perivaskulární mezenchymální stromální buňky. SUSD2 pozitivní buňky jsou rovnoměrně rozděleny mezi MP (14 %) a SP (11 %) (Miyazaki et al., 2012). Epiteliální i stromální SP se *in vitro* vyznačují vlastnostmi typickými pro MSC. Dále tyto buňky neexprimují ESR1 nebo PR, podobně jako je tomu u SUSD2 pozitivních eMSC. V souladu s jejich endoteliálním fenotypem u nich byla prokázána exprese CD31 a estrogenových receptorů  $\beta$  (ESR2). Většina čerstvě izolovaných lidských endometriálních SP se nacházela v G0 fázi buněčného cyklu a vykazovala nízký klonogenní růst v buněčných kulturách. Naproti tomu kultivované SP byly v G1, M a S fázích a měly vyšší klonogenní kapacitu (Masuda et al., 2010). V *in vivo* experimentálních podmínkách byla prokázána schopnost SP vytvářet endometriální tkáň. Tyto výsledky byly získány u imunodeficientních myší, kterým byly SP transplantovány pod vazivové pouzdro do parenchymu ledviny (Cervello, Simon, 2009; Masuda et al., 2010).

## 9. IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemie (IHC) je metoda používaná pro identifikaci buněčných nebo tkáňových složek prostřednictvím reakce antigenu s protilátkou, kterou lze vizualizovat barvením (Brandtzaeg, 1998; Haines et al., 2005). Tato metoda je nedílnou součástí rutinní diagnostiky v histopatologických laboratořích a uplatnění našla také ve vědeckém výzkumu (Kim et al., 2016). V histopatologických laboratořích je IHC využívána zejména pro stanovení přesné diagnózy a také prognózy u pacientů s nádorovým onemocněním. Mezi důležité mezníky, které napomohly začlenění této metody do rutinní praxe, patří použití enzymů jako značek, což umožňuje pozorovat tyto reakce pod světelným mikroskopem. Dalším významným milníkem bylo objevení techniky demaskování antigenů a systémů jejich sekundární detekce (Avrameas, Uriel, 1966; Nakane, 1968; Huang et al., 1976). Přestože se jedná o poměrně jednoduchou metodu, existuje řada faktorů, které zásadně ovlivňují její výsledek (Bodey, 2002). Faktory ovlivňující výsledek IHC můžeme rozdělit do dvou kategorií. Do první kategorie řadíme faktory uplatňující se během analytického procesu (fixace vzorku, zpracování tkáně, demaskování antigenů). Do druhé kategorie spadají faktory ovlivňující interpretaci, jako je nevhodný výběr panelu protilátek či jejího typu a klonu (Yaziji et al., 2006). Existuje celá řada protokolů pro standardizaci této techniky, jejichž účelem je minimalizování těchto odchylek (Matos et al., 2010).

### 9.1 Monoklonální a polyklonální protilátky

Protilátky neboli imunoglobuliny mají tvar písmene Y a skládají se ze 2 identických těžkých a 2 lehkých řetězců. Těžké řetězce určují třídu protilátky. Lehké řetězce mají dvě různé formy, kappa a lambda, a skládají se ze dvou odlišných oblastí. C-koncová polovina řetězce je konstantní, zatímco N-koncová polovina řetězce je variabilní. Koncová část imunoglobulinu se nazývá Fc. Fab oblast váže antigen a skládá se z variabilních a konstantních částí lehkých a těžkých řetězců. Fc část je zodpovědná za barvení pozadí, které je způsobeno neimunní adhezí protilátek ke tkáňovým řezům. Tomuto jevu lze předcházet použitím pouze Fab části molekuly imunoglobulinu. (Ramos-Vara, 2005).

Monoklonální protilátky jsou homogenní populací protilátek produkovaných individuálním klonem plazmatických buněk, které jsou namířeny proti jednomu epitopu. Polyklonální protilátky představují směs různých molekul s odlišnou afinitou a specifitou v rozsahu antigenů. Jsou produkovány různými buňkami a jsou imunochemicky odlišné. Protilátky reagují se specifickými oblastmi (epitopy) cílové molekuly. Každá molekula má různý počet epitopů. Polyklonální protilátky jsou schopny reagovat s různými typy epitopů, zatímco protilátky monoklonální reagují pouze s jedním typem epitopu. Monoklonální protilátky se vyznačují vyšší specifitou, a proto jsou v praxi více využívány (Key, 2009).

Mimo výše uvedeného rozdělení protilátek na monoklonální a polyklonální, lze pro účely IHC protilátky také dělit na primární a sekundární.

## **9.2 Primární a sekundární protilátky**

Jako primární označujeme tu protilátku, která se přímo navazuje na vyšetřovaný antigen. Sekundární protilátka je pak taková, která se váže na Fc fragment primární protilátky. Sekundární protilátka bývá značena, nejčastěji enzymaticky (Dvořák et al., 2008). V následující podkapitole blíže popíšeme primární protilátky použité v této práci.

### **9.2.1 Protilátka proti progesteronovým receptorům**

Progesteronový receptor (PR) zprostředkovává účinky progesteronu v cílových tkáních. Progesteron je klíčovým regulátorem funkce reprodukčního systému ženy, nezanedbatelné účinky má však také na kardiovaskulární a nervový systém. Kromě těchto fyziologických funkcí navíc progesteron stimuluje růst nádorových buněk. PR je exprimován v jádře buněk ve dvou izoformách, PR $\alpha$  a PR $\beta$ . Stanovení exprese PR se v praxi využívá zejména ke stanovení prognózy a predikci odpovědi na hormonální léčbu u karcinomů prsu (Scarpin et al., 2009).

### **9.2.2 Protilátka proti SOX2**

SOX2 je členem rodiny transkripčních faktorů HMG boxů souvisejících se SRY, které se podílejí na regulaci embryonálního vývoje a na určování buněčného osudu.

Protein může působit jako transkripční aktivátor po vytvoření proteinového komplexu s jinými proteiny. Mutace v tomto genu jsou asociovány s bilaterální anoftalmií. Tento bezintronový gen kóduje členy rodiny transkripčních faktorů SOX zapojených do regulace embryonálního vývoje a do určování buněčného osudu. Produkt tohoto genu je nezbytný pro udržení kmenových buněk v centrálním nervovém systému a také reguluje genovou expresi v žaludku. Exprese SOX2 je obvykle lokalizována v buněčném jádře. (Schaefer, Lengerke, 2020).

### **9.3 Struktura antigenů**

Antigeny jsou látky rozličné chemické struktury, nejčastěji se jedná o proteiny, polysacharidy či lipidy (Hořejší, Bartůňková, 2009). Antigeny mohou mít různé izoformy (Ramos-Vara, 2005). Jeden gen může generovat několik různých izoform prostřednictvím alternativního sestřihu transkriptu primárního genu, který může produkovat několik různých zralých transkriptů, z nichž každý kóduje odlišný protein (Sharp, 1994). Mnoho proteinů podstupuje posttranslační modifikace jako je glykosilace či forforylace, které zvyšují složitost odvozených proteinů (Ramos-Vara, 2005).

### **9.4 Detekční systémy**

Jelikož reakce antigenu a protilátky nejsou pozorovatelné pod světelným mikroskopem, používáme k jejich zviditelnění detekční systémy, jejichž podstatou je značení primární či sekundární protilátky. Jako značky se nejčastěji využívají enzymy nebo fluorescenční sloučeniny (Lucocq, Roth, 1985; Taylor et al., 2002). Z enzymových značek se v praxi nejčastěji používají peroxidáza, alkalická fosfatáza nebo glukooxidáza (Dabbs, 2010). Pro každý enzym existuje specifický substrát a chromogen poskytující barevnou reakci. Většina dostupných chromogenů poskytuje hnědou, červenou nebo modrou barevnou reakci. Nejpoužívanějším chromogenem pro křenovou peroxidázu je 3,3'-diaminobezidin tetrachlorid (DAB). Na základě toho, zda je značena primární či sekundární protilátka dělíme tyto metody na přímé a nepřímé (Van Hecke, 2002).

### 9.4.1 Přímá metoda

Přímá metoda je nejjednodušší z imonohistochemických metod. Je založena na jednostupňovém procesu s primární protilátkou konjugovanou s enzymovou značkou (Obr.2) (Coons et al., 1955). Jedná se o rychlou, velmi jednoduchou techniku. Pro detekci většiny antigenů ve tkáních je ale nedostatečně citlivá, proto se v rutinní praxi příliš nevyužívá. (Polak, Van Noorden, 2003).

**Obrázek 2. Schéma přímé metody**



Ag-antigen, P – peroxidáza

Zdroj: Dvořák et al., 2008 (převzato).

### 9.4.2 Nepřímé metody

Rostoucí nároky na citlivost systémů detekujících antigeny vedly k vývoji nepřímých vícestupňových metod (Coons et al., 1955). Citlivost reakce se zvyšuje s počtem značek na molekulu primární protilátky. Díky tomu lze detekovat i malé množství antigenu nebo použít zředěnější primární protilátku, protože se nejméně 2 značené imunoglobuliny váží ke každé molekule primární protilátky (Polak, Van Noorden, 2003).

#### 9.4.2.1 Nepřímá dvojestupňová metoda

Nepřímá dvojestupňová metoda je modifikací přímé metody. U této techniky je značena sekundární protilátka, která se následně váže na protilátku primární (Obr.3). Ke zvýšení citlivosti metody dochází prostřednictvím vazby více molekul značené

sekundární protilátka na primární protilátku, což vede k zintenzivnění reakce (Dabbs, 2010). U této metody lze použít stejnou sekundární protilátku k detekci různých primárních protilátek, ale pouze za předpokladu, že pocházejí ze stejného druhu (Polak, Van Noorden, 2003).

**Obrázek 3. Schéma nepřímé dvojestupňové metody**



Na antigen (Ag) se váže primární protilátka (na obr. modře), na kterou je následně navázána sekundární protilátka (zeleně) značená peroxidázou (P).

Zdroj: Dvořák et al., 2008 (převzato).

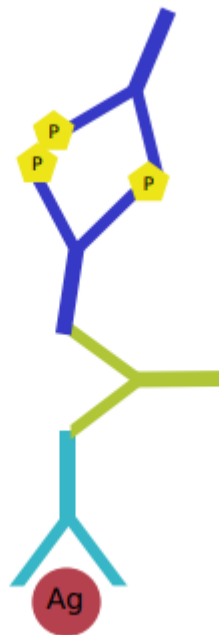
### **9.4.2.2 Nepřímé trojstupňové metody**

#### **9.4.2.2.1 Peroxidáza-antiperoxidázový komplex**

Metoda peroxidáza-antiperoxidázový komplex (PAP) využívá PAP činidlo skládající se z protilátky proti křenové peroxidáze a antigenu křenové peroxidázy ve formě stabilního imunokomplexu. Ten je tvořen dvěma molekulami protilátky a třemi molekulami křenové peroxidázy (Obr.4). Činidlo PAP musí pocházet ze stejného druhu jako primární protilátka, naopak spojovací protilátka (tzv. můstek) musí pocházet z odlišného druhu se specifitou proti protilátce primární, která bývá obvykle králičí. Sekundární protilátka je poté prasečí, zaměřená proti králičí. Pro vysokou specifitu byl tento systém značně rozšířený v praxi, později byl však nahrazen avidin-biotinovými metodami (Dabbs, 2010).



**Obrázek 4. Schéma nepřímé trojstupňové metody peroxidáza-antiperoxidáza**



Ag – antigen, P – peroxidáza.

Zdroj: Dvořák et al., 2008 (převzato).

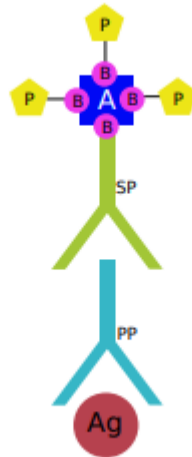
#### **9.4.2.2 Avidin-biotinové metody**

Avidin je glykoprotein získaný z vaječného bílku, který má čtyři vazebná místa na molekulu a vysokou afinitu k biotinu. Biotin má jedno vazebné místo pro avidin a může být prostřednictvím jiných vazeb připojen k protilátce (biotinylovaná protilátka) nebo k jakékoliv makromolekule jako je fluorochrom či enzym (Polak, Van Noorden, 2003). Vysoká citlivost této metody je zajištěna vyšším počtem biotinylovaných molekul, které lze připojit k primární protilátce (Guesdon et al., 1979, Hsu et al., 1981).

Nejpoužívanější z avidin-biotinových metod je avidin – biotin komplex. Sekundární protilátka je biotinylovaná a třetí reagent je komplex avidinu a biotinu s připojenou značkou (Obr.5). Avidin se značeným biotinem se spolu nechají reagovat po dobu cca 30 minut za vzniku rozsáhlého komplexu s mnoha molekulami značek. Poměr mezi avidinem a značeným biotinem musí být takový, aby některé vazby avidinu zůstaly volné a mohly se navázat na sekundární biotinylovanou protilátku. Nevýhodou těchto metod je tvorba pozadí. Avidin způsobuje zabarvení pozadí vazbou lektinů

ve tkáních přes sacharidové skupiny. Tomuto jevu lze zamezit výměnou avidinu za streptavidin (Polak, Van Noorden, 2003).

**Obrázek 5. Schéma nepřímé trojstupňové metody avidin-biotin komplex**



A – avidin, Ag – antigen, B – biotin, P – peroxidáza, PP – primární protilátka, SP – sekundární protilátka

Zdroj: Dvořák et al., 2008 (převzato).

## 9.5 Postup provádění IHC

S příchodem automatizace došlo ke zlepšení reprodukovatelnosti a spolehlivosti IHC, což je nespornou výhodou zejména pro klinické použití této techniky (Gustavson et al., 2009). Naopak manuální provedení IHC díky své flexibilitě dává prostor pro optimalizaci reakce konkrétního antigenu a protilátky, čehož je využíváno zejména v oblasti výzkumu. Ačkoliv obě metody mají své přednosti i nedostatky, jejich princip a základní postupy zůstávají stejné (Kim, et al, 2016). Běžně užívaný IHC protokol je popsán v tabulce (Tab. 2). Stěžejní kroky protokolu budou popsány podrobněji.

**Tabulka 2. Standardní IHC protokol**

Krok	Protokol
Fixace	10% formalín, 24 h při pokojové teplotě
Zalítí a krájení	Zalítí do parafínu, řezy 4 µm
Deparafinizace a hydratace	Varná deska 60 °C
Demaskování antigenů	Nejčastěji teplem indukované
Blokování	Sérum stejného druhu jako je sekundární protilátka, doba 30 minut – přes noc při 4 °C – pokojové teplotě
Přidání primární protilátky	Ředění protilátky roztokem blokujícím proteiny nebo diluentem, vhodný výběr protilátky a jejího titru
Inkubace	30-60 min, pokojová teplota
Promytí	3 x 5 minut
Přidání sekundární protilátky	-
Inkubace	30-60 min, pokojová teplota
Promytí	3x5 minut TBS-T
Přidání substrátu	250 µl 1% DAB, 250 µl 0.3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> k 5 ml PBS, 1–3 min, pokojová teplota
Promytí	3x5 minut, DW
Kontrastní barvení	Hematoxylin, 1 min

Zdroj: Kim et al., 2016 (převzato).

TBS-T – Tris pufr a Tween 20, DAB- 3,3'diaminobenzidin, PBS – fosfátový pufr, DW- 5% dextróza v destilované vodě

### **9.5.1 Demaskování antigenů**

Epitopy vázající protilátky mohou být v důsledku fixace formaldehydem maskovány. Z tohoto důvodu je nutné provést demaskování antigenů (Fox et al., 1985). V praxi je nejvíce rozšířeno tepelně indukované demaskování epitopů (HIER, heat induced epitope retrieval), kterého může být dosaženo použitím mikrovlnné trouby, varné desky, vodní lázně či autoklávu. Při použití autoklávu a mikrovlnné trouby je teplota nastavena na 120 °C při plném tlaku a 800 W po dobu 10 minut. U tepelné destičky inkubujeme sklíčka 30 minut při 100°C. Optimální podmínky pro každý komplex antigenu a protilátky je třeba stanovit empiricky, srovnáním výsledků barvení, kterých bylo dosaženo různými postupy demaskování epitopů. Ve specifických případech, zejména pro imunoglobuliny a některé cytokeratiny, lze pro demaskování dosáhnout využitím enzymů. Tkáňové řezy se inkubují s trypsinem či proteázou po dobu 10-20 minut při 37°C. Následně se reakce ukončí přidáním fosfátového pufru (Kim et al., 2016).

### **9.5.2 Blokování proteinů**

Prostřednictvím blokování proteinů je zamezeno nežádoucímu barvení pozadí, které je nejčastěji způsobeno nespecifickou vazbou Fc části protilátky. K blokování proteinů se používá 5-10% sérum pocházející ze stejného druhu, jako sekundární protilátka. Využívá se také 0,1-0,5% hovězí sérový albumin, želatina či komerčně dodávané syntetické peptidy. Inkubační doba může být 30 minut až 24 h, také teplota kolísá od 4 °C po pokojovou teplotu (Kim et al., 2016).

### **9.5.3 Blokování endogenních enzymů**

Při použití detekčního systému peroxidáza-antiperoxidáza je nezbytným krokem blokování peroxidázové aktivity. K tomu se nejčastěji používá 3% peroxid vodíku (Radulescu, Boenisch, 2007). Dalším blokováným enzymem je biotin. I když bylo prokázáno, že hladiny endogenního biotinu se po fixaci formolem snižují, zbytková aktivita je stále detekovatelná, zejména ve tkáních bohatých na biotin jako jsou játra či ledviny. Endogenní biotin je zablokován inkubací tkáňových řezů v roztoku avidinu (Kim, et al, 2016).

#### **9.5.4 Ředění a inkubační čas primární protilátky**

K dosažení optimálního výsledku IHC barvení je nutný důsledný výběr protilátky a empirické stanovení jejího titru. K ředění protilátek se používají dostupné diluenty jako jsou TrisHCL, hovězí sérový albumin, fyziologický roztok nebo Tween 20. Mezi inkubačním časem protilátky a jejím titrem existuje inverzní vztah. Platí, že čím vyšší je titer protilátky, tím kratší je inkubační čas. Protilátky se obvykle inkubují ve vlhké komoře při pokojové teplotě. Doba je u každé protilátky individuální, inkubace může probíhat od 30 minut až přes noc. (Kim et al., 2003).

#### **9.6 Možnosti hodnocení IHC**

Při hodnocení IHC je běžně uváděno procento marker pozitivních buněk ve vztahu k celkovému počtu cílových buněk. Jednotlivé hodnoty jsou obvykle zaznamenány jako skóre v kategoriích 1 (0-9 %), 2 (10-19 %), 3 (20-29 %), 4 (30-39 %), 5 (40-49 %), 6 (50-59 %), 7 (60-69 %), 8 (70-79 %), 9 (90-100 %). Nevýhodou tohoto systému hodnocení je, že nezahrnuje hodnocení intenzity reakce, což vede k nedostatku informací o drobných rozdílech v expresi proteinů. Touto metodou hodnocení jsou naopak eliminovány chyby v interpretaci vzniklé na základě rozdílné intenzity barvení, které jsou důsledkem rozdílného stavu tkáně a použití různých šarží reagensů, zejména při manuálním barvení (Kim et al., 2003).

Kombinované semikvantitativní hodnocení je nejběžnější metoda používaná ke stanovení prognostických markerů. Výsledné imunoscóre zahrnuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení. Kvantitativním údajem je procento marker pozitivních buněk, kvalitativním intenzita barvení. Intenzita barvení je obvykle hodnocena v kategoriích od 0 do 3+, kde jako 0 je hodnocena negativní reakce, 1+ reakce slabá, 2+ středně intenzivní a 3+ intenzivní reakce. Konečné imunoscóre je vypočítáno sečtením nebo vynásobením každého jednotlivého skóre. Pro dosažení co možná nejlepší reprodukovatelnosti se doporučuje pro tento skórovací systém používat nejvýše 4-5 kategorií. Vytváření různých variant kombinací vede k dezinterpretaci mezi jednotlivými hodnotiteli (Shackelford et al., 2002).

## 10. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 10.1 Preamalytická fáze

Resekáty děložních rohů od pěti prasnic a pěti krav pocházející z jatečního provozu byly rozděleny na pět stejných dílů. Získané tkáňové vzorky byly vloženy do vhodných nádob s jednotlivými fixačními roztoky. Použity byly formol, Bouinův fixační roztok, Greenfix, Antigenfix a methacarn (Tab. 3). Výběr zvířat nepodléhal žádným specifickým kritériím.

**Tabulka 3. Použité fixační roztoky**

Fixační roztok	Složení
Formol	Formaldehyd, methanol, dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát, dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, deionizovaná voda
Bouinův fixační roztok	Formaldehyd, kyselina pikrová, kyselina octová
Greenfix	Ethyl, Glyoxal, netoxické konzervační látky
Antigenfix	Paraformaldehyd, dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát, dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát
Methacarn	Methanol, chloroform, ledová kyselina octová

### 10.2 Analytická fáze

#### 10.2.1 Zhotovení parafínového bloku

První fáze zpracování bioptického materiálu je jeho přikrojení, které probíhá ve speciálních odvětrávaných boxech, aby se zamezilo vdechování toxických par z fixačních roztoků. V našem případě přikrajování probíhalo v pěti časových intervalech – po 1,5; 8,5; 15,5; 29,5; 64,5 a 189,5 dnech fixace. Po přikrojení je materiál vložen do předem označených kazet a následně do tkáňového odvodňovacího automatu (autotechnikonu). V autotechnikonu vzorky prochází procesem odvodnění, kdy se vzestupnou alkoholovou řadou ze vzorku odstraňuje voda. Vzorky se postupně vloží do 50%, 70%, 80% a 96% alkoholu. Následuje projasnění tkáně xylenem. Tím je

nahrazen alkohol ve vzorku a umožněn průnik zalévacího média, které je s alkoholem nemísitelné. Po projasnění tkáně se vzorky prosytí parafínem o teplotě 56 °C. Po vyjmutí kazet se vzorky na zalévací lince zalijí do parafínu o teplotě 56-58 °C. Odstraní se víčko z kazet, vzorek odvodněné tkáně se vloží do kovové formičky s nalitým parafínem. Přiloží se označená kazeta, doplní parafín a vzorky se nechají ztuhnout na chladicí desce. Poté se bločky umístí na led. Následně se parafínové bločky krájí na sáňkovém mikrotomu. Zhotoveny jsou řezy o tloušťce 4 µm. Dále je připravena teplá vodní lázeň a řezy jsou umístěny na vodní hladinu, kde dochází k jejich vypnutí. V dalším kroku se řezy uchytí na podložní skla potřená glycerinbílkem a suší hodinu v termostatu. Poté jsou preparáty připraveny k barvení hematoxylinem-eozinem (HE). Pro IHC barvení se řezy uchycují na speciální skla potažená silanem.

### **10.2.2 Barvení HE**

Stojánky z termostatu se umístí do barvicího automatu. Zde projdou odparafínováním prostřednictvím dvou lázní xylenu po 5 minutách a dvou lázní alkoholu po 5 minutách. Následně se vzorky oplachují ve vodě a barví 7 minut hematoxylinem. Následuje oplach a modránka ve vodě po dobu 10 minut. Po uplynulé době se vzorky vloží na 5 minut do eozinu. Poté se obarvení preparáty odvodní v alkoholu a projasní v xylenu. V xylenu jsou preparáty ponechány až do zamontování, aby se předešlo jejich vyschnutí. Po vyjmutí z xylenu se preparáty na sklech osuší pomocí filtračního papíru, navrství se na ně solakryl, který slouží jako montovací médium a přiloží se krycí sklo. Takto připravené preparáty slouží pro histomorfologickou analýzu tkáni.

### **10.2.3 Imunohistochemické barvení**

Pro imunohistochemické barvení byl využit barvicí automat Ventana Benchmark ULTRA firmy Roche. Systém je založen na detekci specifických primárních protilátek vázaných na antigen v tkáňových řezech zalitých v parafínu. Primární protilátka je lokalizována směsí sekundárních protilátek, které jsou značeny enzymem. Celý komplex je následně vizualizován pomocí substrátu z peroxidu vodíku a 3,3' diamidobenzidintetrahydrochlorid (DAB) chromogenu. Dojde k vytvoření hnědé

sraženiny, kterou lze pozorovat pod světelným mikroskopem. Použité protilátky jsou uvedeny v tabulce (Tab.4).

**Tabulka 4. Použité protilátky**

Protilátka	Klon	Ředění	Celulární lokalizace	Výrobce
PR	SP2	1:200	Jádro	DCS
SOX2	Polyklonální	1:75	Cytoplazma <sup>1</sup>	Antibodies-online GmbH

<sup>1</sup>Expresí SOX2 je obvykle jaderná, v případě této konkrétní protilátky se jedná o expresi cytoplazmatickou. (Perry et al., 2013).

Sklička se opatří štítkem s čárovým kódem, který odpovídá prováděnému protokolu. Do barvicího automatu založíme reagenty a potřebná přídavná činidla příslušné detekční soupravy. Zkontrolujeme nádoby na reagenty a odpad. Následně vložíme sklička do barvicího automatu a spustíme barvicí cyklus. Vzorky prochází procesem zahřátí skel a jejich inkubací, odparafínování, blokování endogenní peroxidázy a demaskování antigenů. Poté manuálně pipetujeme 50 µl primární protilátky. Inkubace trvá v případě protilátky SOX2 16 minut, u protilátky PR 32 minut. Po dokončení barvicího cyklu vyjmeme sklička z barvicího automatu a promyjeme je v roztoku saponátu na nádobí. Tím odstraníme krycí roztok. Následuje opláchnutí skliček v destilované vodě, čímž dojde k odstranění detergentu. Poté sklička vložíme na 3 minuty do hematoxylinu a následně na 3 minuty do vody. Dále se preparáty odvodní ve 2 lázních alkoholu po 3 minutách a projasní ve 2 lázních xylenu po 3 minutách. Nakonec sklička pokryjeme montovacím médiem a přiložíme krycí sklo.



## **10.3 Postanalytická fáze**

### **10.3.1 Hodnocení vlivu fixace na IHC**

Pro hodnocení IHC bylo využito kombinované semikvantitativní hodnocení, stanoveno tedy bylo procento marker pozitivních buněk a intenzita imunoreakce. Procento marker pozitivních buněk bylo stanoveno pomocí světelného mikroskopu při zvětšení 200x. Analyzováno bylo alespoň 5 ložisek eutopického endometria a procento marker pozitivních buněk bylo stanoveno ve sledované oblasti. Intenzita reakce byla kategorizována jako extra silná (es), silná (s), středně silná (m), slabá (w) a žádná reakce (0). Preparáty byly pozorovány pod světelným mikroskopem při zvětšení 400x.

### **10.3.2 Hodnocení vlivu fixace na histomorfologickou analýzu buněčných a tkáňových struktur**

Hodnoceny byly žlázové a povrchové epitelie ve tkáni endometria prasnic po 1,5 dni fixace. Všechny řezy byly barveny stejnou šarží HE, na stejném barvicím automatu a ve stejný čas. Preparáty byly pozorovány pod světelným mikroskopem při zvětšení 400x a 600x.

### **10.3.3 Statistická analýza**

Porovnání bylo provedeno pomocí t-testu, jelikož na základě Shapiro-Wilksova testu nebylo možné zamítnout normalitu dat. Pro porovnání mezi různými časovými intervaly byl využit párový t-test, kdežto pro porovnání mezi jednotlivými fixačními roztoky bylo využito dvouvýběrového t-testu. Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty  $p < 0.01$ .

## 11. VÝSLEDKY

### 11.1 Hodnocení imunohistochemické exprese PR v prasečím endometriu

Prostřednictvím dvou parametrů, intenzity imunohistochemického barvení a procenta marker pozitivních buněk, byl hodnocen vliv délky fixace a typu fixačního roztoku na imunohistochemickou expresi progesteronových receptorů v prasečím endometriu. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty % marker pozitivních buněk vypočtené z pěti vzorků (Tab.5 a 6).

Po fixaci tkáně formolem byla v časovém období 1,5 – 15,5 (Obr.6 A-C) dne prokázána silná reakce bez patrných rozdílů obou parametrů. Postřehnutelný pokles intenzity byl zaznamenán v období 29,5 – 64,5 dne (Obr.6 D-E). Pokles intenzity IHC reakce byl ale minimální, tudíž byla míra intenzity zařazena stále do kategorie silná a neměla na hodnocení IHC žádný vliv. V období 1,5-64,5 dne bylo nabarveno průměrně 92–87 % buněk. K signifikantnímu poklesu obou parametrů došlo po 189,5 dnech fixace (Obr.6 E), kdy intenzita IHC reakce byla vyhodnocena jako slabá a procento pozitivních buněk kleslo z původních 92 % na 59 % ( $p < 001$ ). Z těchto výsledků vyplývá, že formol je vhodný fixační roztok pro IHC (z námi vyšetřovaných fixativ se pro účely IHC jeví jako nejvhodnější pro krátkodobou i dlouhodobou fixaci).

Dle získaných výsledků je dalším vhodným fixačním roztokem Antigenfix. Z hlediska krátkodobé fixace je zcela srovnatelný s formolem (Obr.7 A). Po 8,5 dnech (Obr.7 B). došlo k nepatrnému poklesu intenzity, která byla stále hodnocena jako silná a došlo k mírnému poklesu % pozitivních buněk (z 96,4 na 82,4 %). V období 15,5 -29,5 (Obr.7 C-D) dne fixace došlo k signifikantnímu poklesu % pozitivních buněk (z původních 96,4 na 77 %) ( $p < 001$ ). Intenzita reakce byla stále hodnocena jako silná, nicméně po 64,5 dnech (Obr.7 E) došlo k dalšímu poklesu % pozitivních buněk na 72,6 % a intenzita reakce byla středně silná. Po 189,5 dnech (Obr.7 F) byla zaznamenána úplná negativita obou sledovaných parametrů. Po dlouhodobé fixaci byl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi formolem a Antigenfixem ( $p < 001$ ). Antigenfix se tudíž pro účely dlouhodobé fixace nejeví jako vhodný.

V případě Bouinova fixačního roztoku bylo nabarveno po 1,5 dni fixace (Obr.8 A) 7,2 % buněk a intenzita reakce byla hodnocena jako slabá. V dalších časových obdobích byly oba sledované parametry negativní (Obr.8 B). Ve srovnání s formolem a Antigenfixem byly po 1,5 dnech fixace zaznamenány signifikantní rozdíly ( $p < 001$ ). Tento fixační roztok tedy nelze na základě získaných výsledků doporučit.

Co se týče Greenfixu, tak po 1,5denní fixaci tkáně bylo nabarveno 39 % buněk (Obr.9 A), intenzita reakce byla stejně jako v případě Bouinu slabá, v dalších časových období reakce zcela vymizela (Obr.9 B). Greenfix je v porovnání s Bouinem signifikantně lepším fixačním roztokem, ve srovnání s formolem naopak signifikantně horším ( $p < 001$ ).

Jako zcela nevhodný se pro účely imunohistochemického barvení jeví methacarn (Obr.10), u kterého byla prokázána negativita obou parametrů ve všech časových intervalech.

**Tabulka 5. IHC exprese PR v prasečím endometriu fixovaném ve formolu, Bouinu a Antigenfixu**

Časový interval (dny)	Formol		Bouin		Antigenfix	
	% pozitivních buněk	Intenzita IHC	% pozitivních buněk	Intenzita IHC	% pozitivních buněk	Intenzita IHC
1,5	<b>92</b> (90, 95, 90, 100, 85)	s	<b>7,2</b> (2, 5, 10, 7, 12)	w	<b>96,4</b> (90, 97, 95, 100, 100)	s
8,5	<b>89,8</b> (82, 97, 90 95, 85)	s	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>82,4</b> (75, 80, 85, 82, 90)	s
15,5	<b>90,6</b> (95, 95, 90, 85, 88)	s	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>77</b> (68, 77, 75, 80, 85)	s
29,5	<b>89,4</b> (85, 85, 90, 92, 95)	s	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>75,4</b> (65, 75, 75, 80, 82)	s
64,5	<b>87</b> (80, 85, 90, 88, 92)	s	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>72,6</b> (60, 70, 75, 78, 80)	m
189,5	<b>59</b> (55, 57, 60, 60, 65)	w	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0

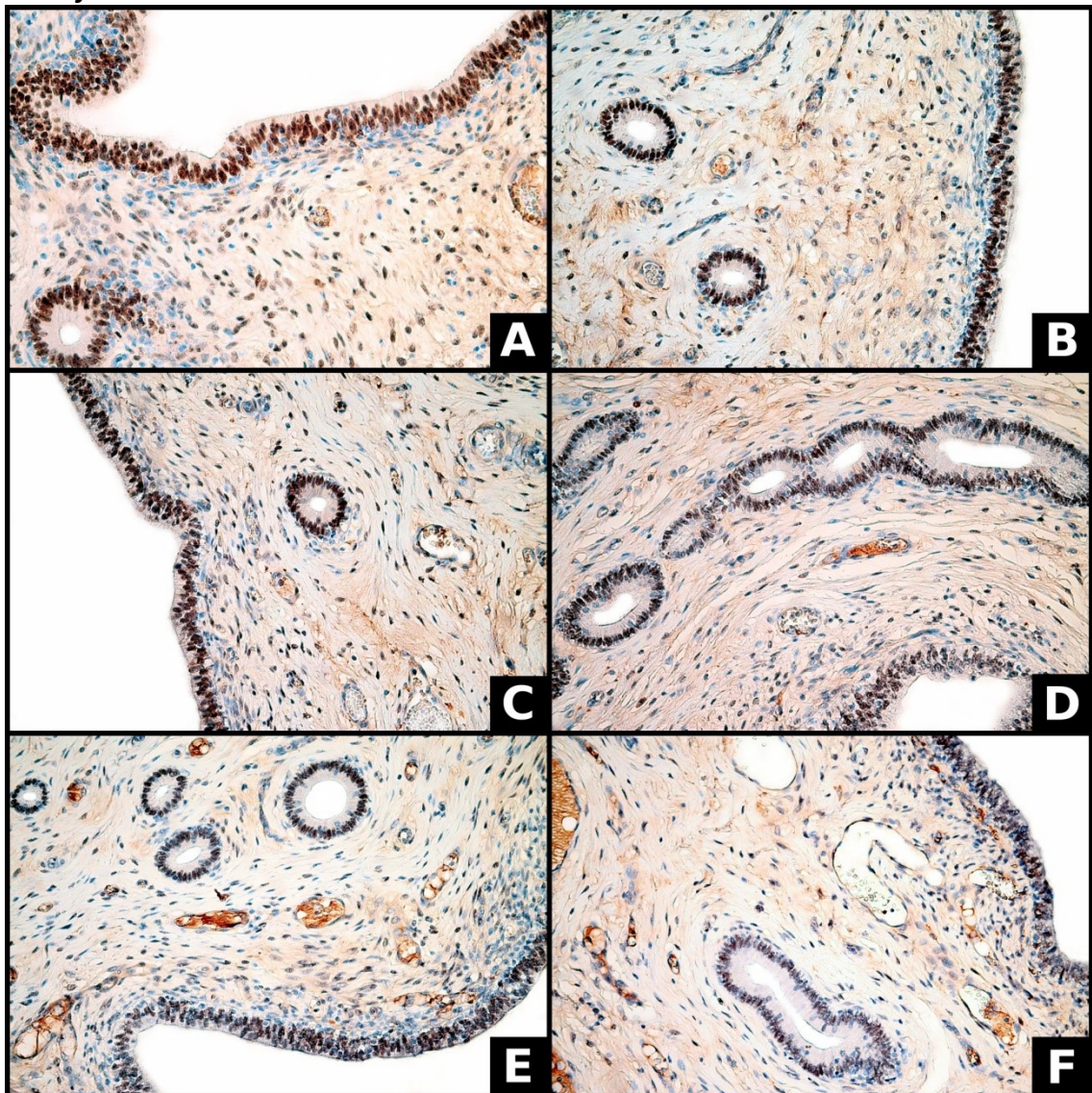
extra silná (es), silná (s), středně silná (m) slabá (w) a žádná reakce (0)

**Tabulka 6. IHC exprese PR v prasečím endometriu fixovaném v methacarnu a Greenfixu**

Časový interval (dny)	Methacarn		Greenfix	
	% pozitivních buněk	Intenzita IHC	% pozitivních buněk	Intenzita IHC
1,5	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>39</b> (45, 35, 40, 45, 30)	w
8,5	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0
15,5	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0
29,5	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0
64,5	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0
189,5	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0

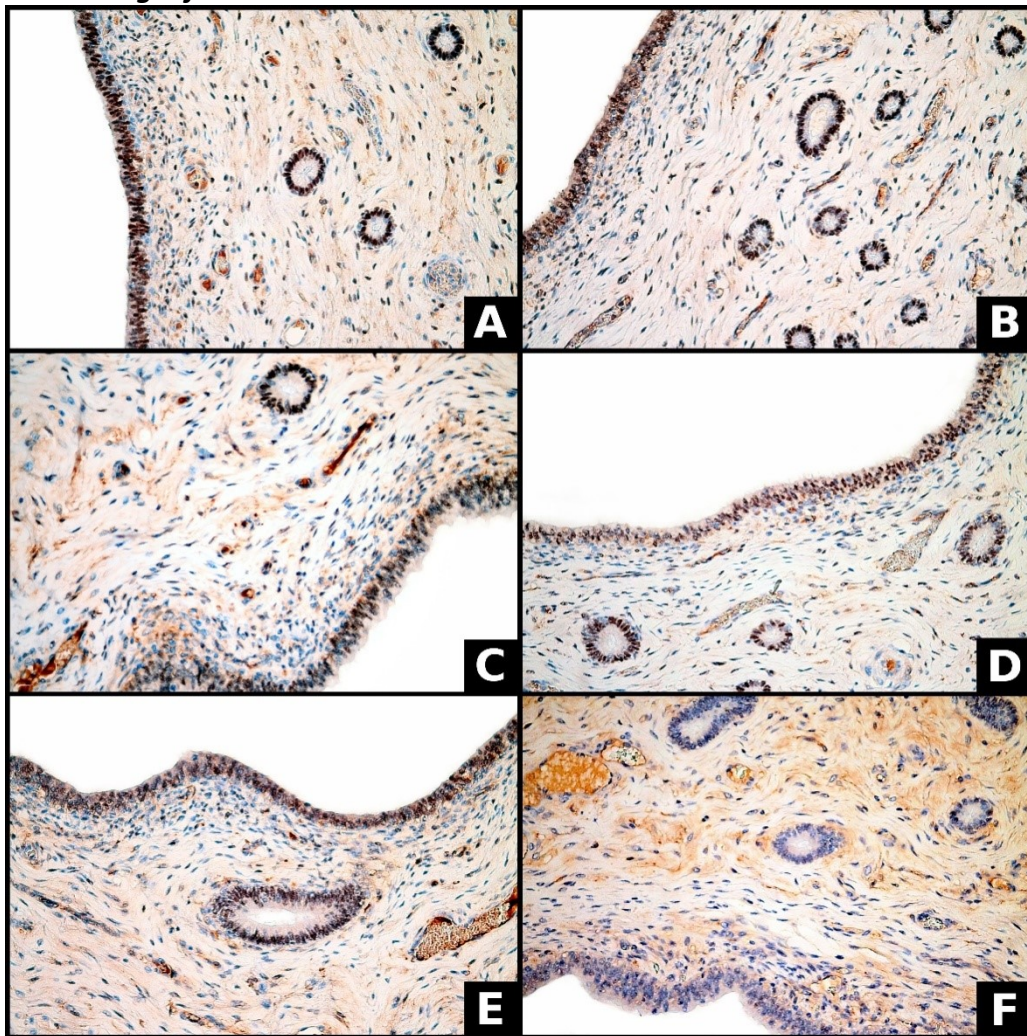
extra silná (es), silná (s), středně silná (m) slabá (w) a žádná reakce (0)

**Obrázek 6. Imunohistochemická exprese PR ve tkáni endometria prasnice fixované formolem**



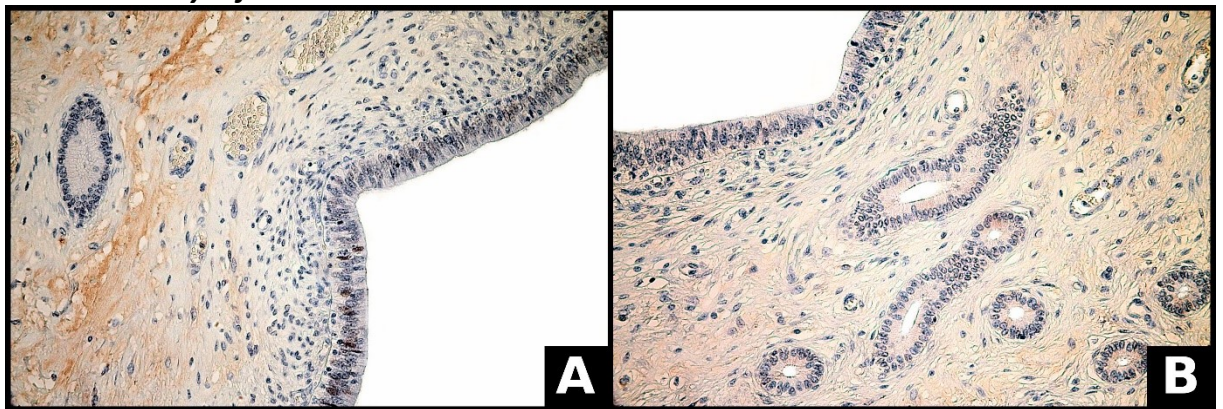
Silné barvení u 90 % buněk povrchového a žlázoového epitelu po 1,5d (A), 8,5d (B), 15,5d (C), 29,5d (D), 64,5d (E), a slabé barvení u 60 % buněk po 189,5d fixace (F). ( zvětšeno 400x)

**Obrázek 7. Imunohistochemická exprese PR ve tkáni endometria prasnice fixované Antigenfixem**



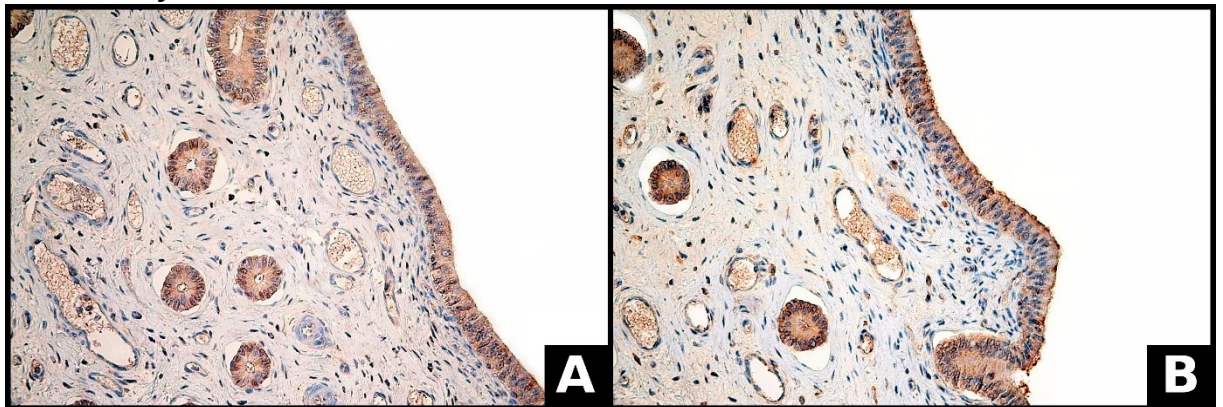
Silné barvení u 95 % povrchového a žlázového epitelu po 1,5d (A), u 85 % buněk po 8,5d (B), u 75 % buněk po 15,5d (C) a 29,5d (D), středně silná reakce u 75 % buněk po 64,5d (E) a negativní barvení po 189,5d fixace (F). (zvětšeno 400x)

**Obrázek 8. Imunohistochemická exprese PR ve tkáni endometria prasnice fixované Bouinovým fixačním roztokem**



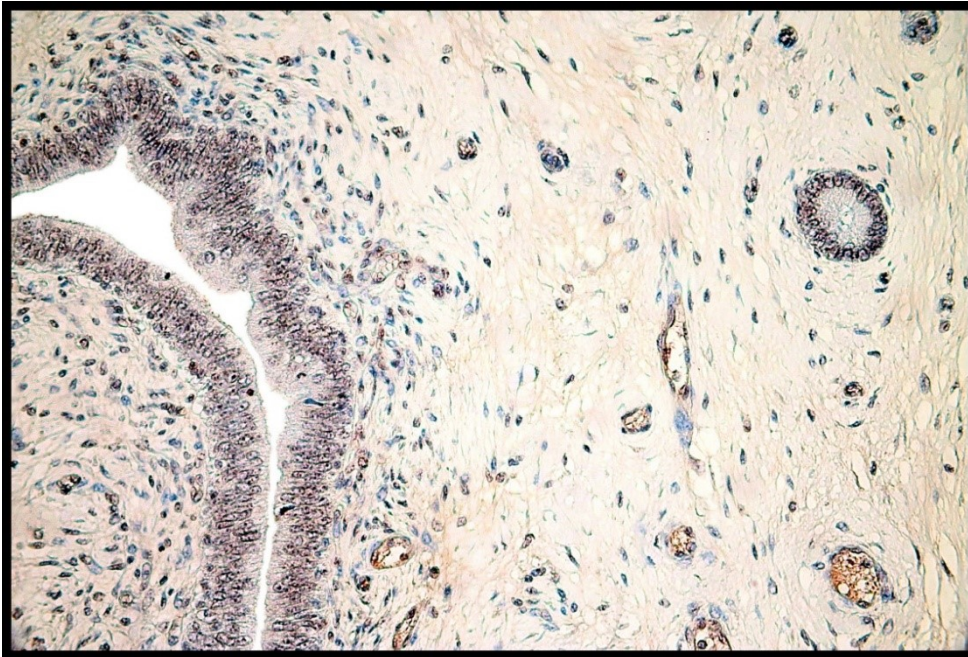
Slabá reakce u 10 % buněk povrchového a žlázového epitelu po 1,5d (A) a negativní reakce po 8,5d fixace (B). (zvětšeno 400x)

**Obrázek 9. Imunohistochemická exprese PR ve tkáni endometria prasnice fixované Greenfixem**



Slabá reakce u 40 % buněk povrchového a žlázového epitelu po 1,5d (A) a negativní reakce po 8,5d fixace (B). (zvětšeno 400x)

**Obrázek 10. Imunohistochemická exprese PR ve tkáni endometria prasnice fixované methacarnem**



Negativní reakce u buněk žlázového epitelu po 1,5d fixace. (zvětšeno 400x)



## **11.2 Hodnocení imunohistochemické exprese SOX2 v kravském endometriu**

U protilátky SOX2 byly hodnoceny stejné parametry jako u PR, v tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty % pozitivních buněk a intenzita reakce (tab. 7 a 8).

I zde se formol ukázal jako ideální fixační roztok, a to v celém časovém intervalu. V celém období 1,5 – 189,5 dne nebyl zaznamenán signifikantní pokles % pozitivních buněk (98,4 – 94,8 %). Rozdíly byly patrné pouze v intenzitě reakce, která byla po 1,5 dni fixace extra silná (Obr.11 A), v období 8,5-64,5 silná (Obr.11 B-E) a po 189,5 dnech klesla na středně silnou (Obr.11 F).

Ještě lepších výsledků v tomto případě dosáhl Antigenfix, kdy v celém období fixace taktéž nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly v % pozitivních buněk (98 – 94,6 % buněk). Intenzita IHC reakce byla po 1,5-8,5 dnech velmi silná (Obr.12 A-B). Po 15,5 dnech fixace mírně poklesla na silnou, stejných výsledků bylo dosaženo také po 29,5 - 189,5 dnech fixace (Obr.12 C-F). Výsledky Antigenfixu a formolu jsou tedy zcela srovnatelné, a oba fixační roztoky jsou vhodné. Drobný rozdíl byl zaznamenán pouze po 189,5 dnech fixace, kdy reakce u formolu byla středně silná, kdežto u Antigenfixu stále silná. Pro dlouhodobou fixaci se tedy Antigenfix jeví jako mírně vhodnější.

Dalším hodnoceným byl Bouinův fixační roztok, kdy po 1,5 dnech fixace bylo nabarveno 96 % buněk a reakce dosáhla středně silné intenzity (Obr.13 A). I Bouinův fixační roztok tedy lze pro krátkodobou fixaci doporučit. V dalších časových obdobích však byla zaznamenána negativita obou parametrů (Obr.13 B). Pro delší než 1,5denní fixaci je Bouin signifikantně horší než formol a Antigenfix ( $p < 001$ ) (Obr.14 A-C), čili pro dlouhodobou fixaci je Bouinův fixační roztok nevhodný.

Jako zcela nevhodné se ukázaly fixační roztoky methacarn a Greenfix (Obr.15 A–B), kdy ve sledovaném období 1,5-189,5 dne nebyla zaznamenána pozitivita ani jednoho ze sledovaných parametrů.

Ze získaných výsledků lze také vyvodit, že cytoplazmatická exprese je v porovnání s jadernou expresí méně citlivá ke studovaným faktorům ovlivňujících fixaci, kterými byly typ fixačního roztoku a doba fixace.

**Tabulka 7. IHC exprese SOX2 v kravském endometriu fixovaném ve formolu, Bouinu a Antigenfixu**

Časový interval (dny)	Formol		Bouin		Antigenfix	
	% pozitivních buněk	Intenzita IHC	% pozitivních buněk	Intenzita IHC	% pozitivních buněk	Intenzita IHC
1,5	<b>98,4</b> (95, 100, 100, 97, 100)	es	<b>96</b> (96,100, 100, 94, 90)	m	<b>98</b> (98, 100, 98, 94, 100)	es
8,5	<b>97,4</b> (97,100, 100, 95, 95)	s	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>96,6</b> (95,100, 92, 100, 96)	es
15,5	<b>95,6</b> (95, 100, 93, 100, 90)	s	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>95,8</b> (97, 100, 92, 100, 90)	s
29,5	<b>95</b> (90,100, 100, 90, 95)	s	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>95</b> (95, 100, 85, 100, 95)	s
64,5	<b>96</b> (96, 100, 93, 100, 91)	s	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>95</b> (95, 100, 87, 100, 93)	s
189,5	<b>94,8</b> (95, 100, 87, 100, 92)	m	<b>0</b> (0,0,0,0,0)	0	<b>94,6</b> (95, 100, 88, 100, 90)	s

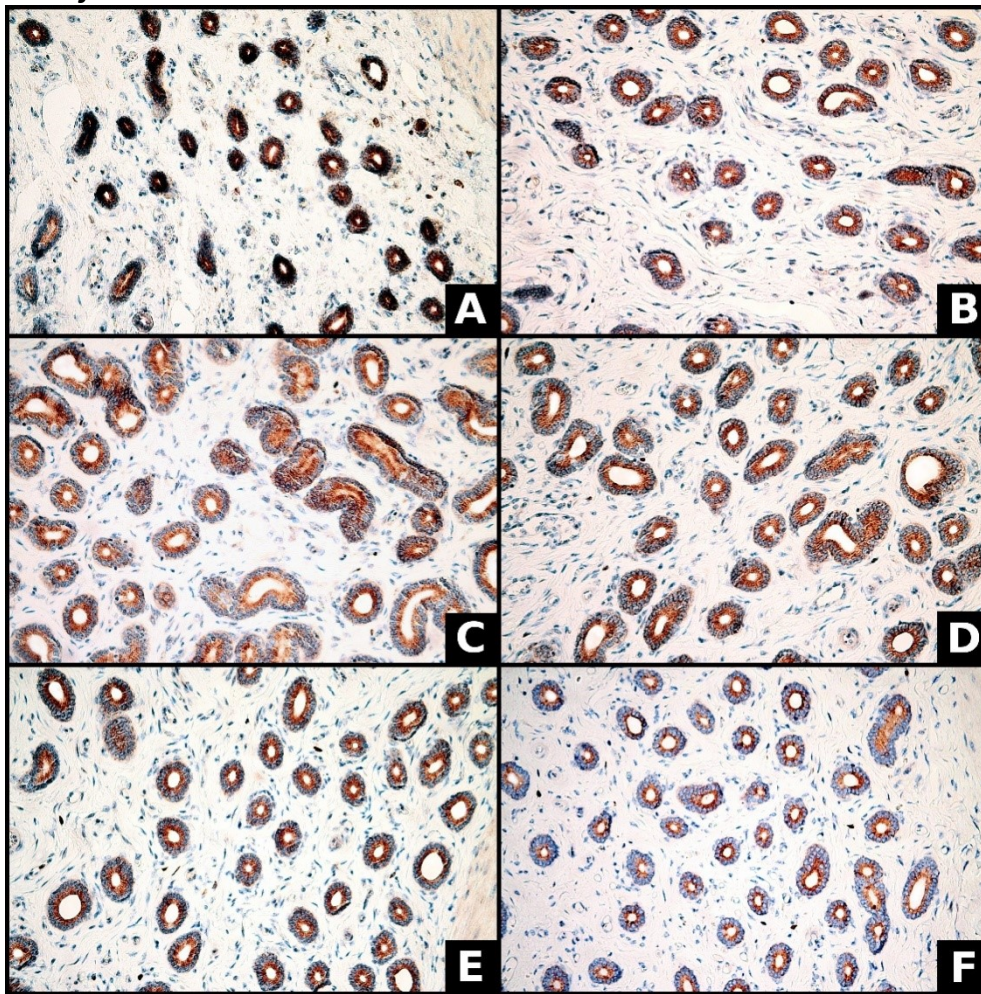
extra silná (es), silná (s), středně silná (m) slabá (w) a žádná reakce (0)

**Tabulka 8. IHC exprese SOX2 v kravském endometriu fixovaném methacarnem a Greenfixem**

Časový interval (dny)	Methacarn		Greenfix	
	% pozitivních buněk	Intenzita IHC	% pozitivních buněk	Intenzita IHC
1,5	0 (0,0,0,0,0)	0	0 (0,0,0,0,0)	0
8,5	0 (0,0,0,0,0)	0	0 (0,0,0,0,0)	0
15,5	0 (0,0,0,0,0)	0	0 (0,0,0,0,0)	0
29,5	0 (0,0,0,0,0)	0	0 (0,0,0,0,0)	0
64,5	0 (0,0,0,0,0)	0	0 (0,0,0,0,0)	0
189,5	0 (0,0,0,0,0)	0	0 (0,0,0,0,0)	0

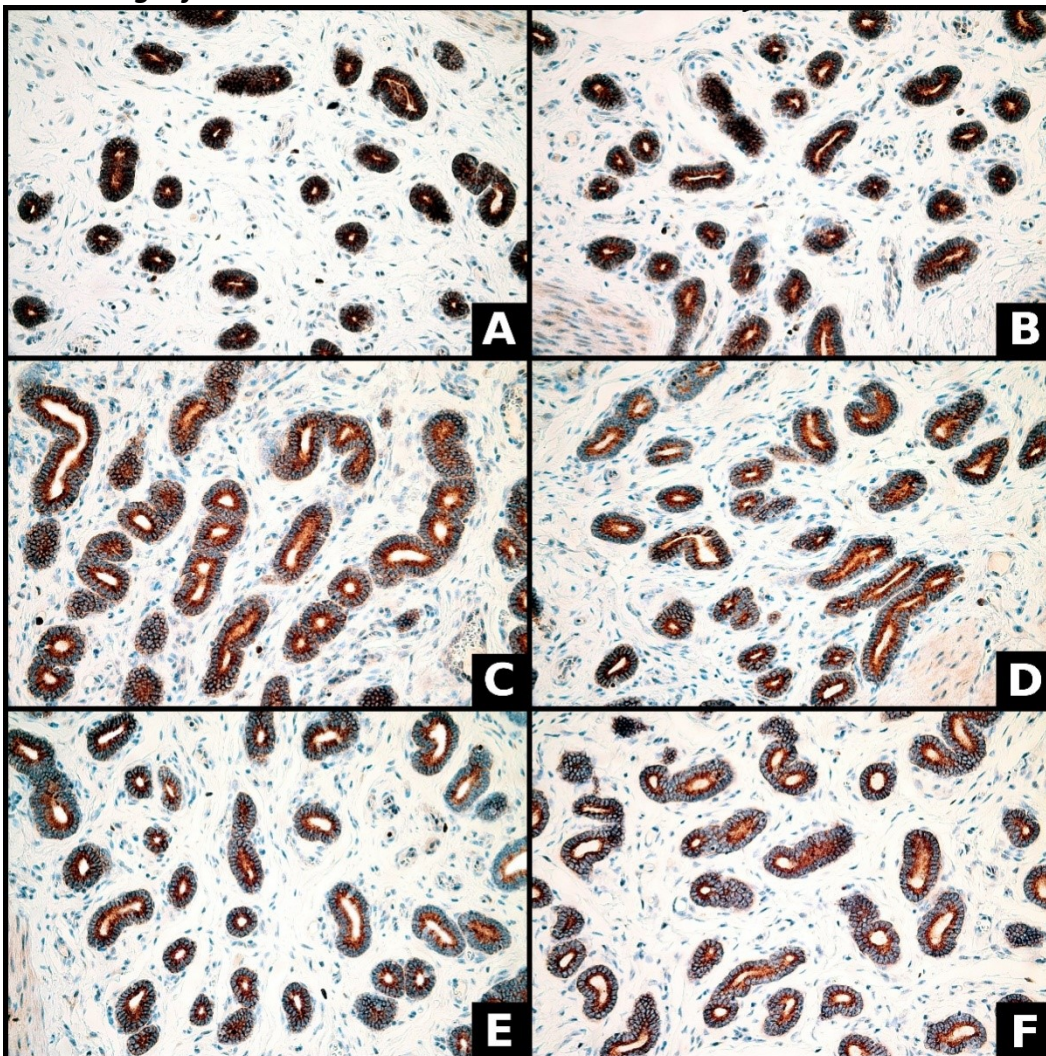
extra silná (es), silná (s), středně silná (m) slabá (w) a žádná reakce (0)

**Obrázek 11. Imunohistochemická exprese SOX2 v kravském endometriu fixovaném formolem**



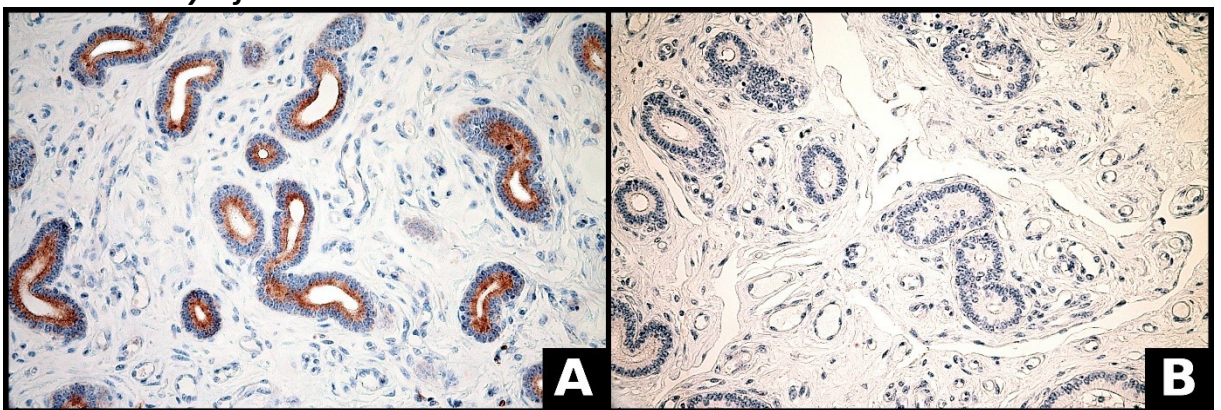
Extra silná reakce u 100 % žlázových buněk po 1,5d (A), silná reakce u 100 % buněk po 8,5d (B), 15,5d (C), 29,5d (D), 64,5d (E) a středně silná reakce u 100 % buněk po 189,5d fixace (F). (zvětšeno 400x)

**Obrázek 12. Imunohistochemická exprese SOX2 v kravském endometriu fixovaném Antigenfixem**



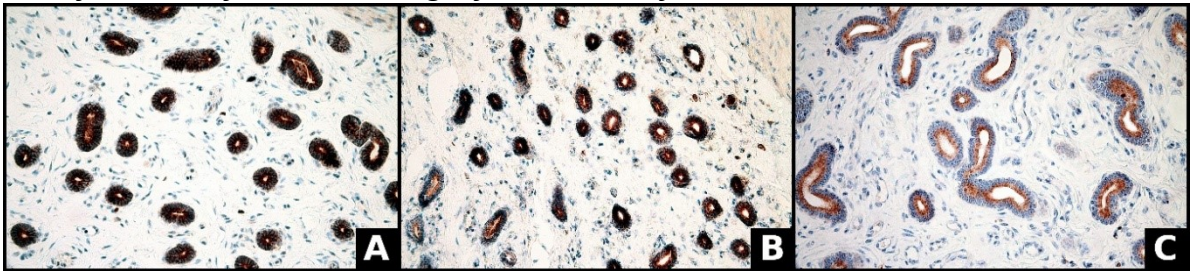
Extra silná reakce u 100 % žlázových buněk po 1,5d (A) a 8,5d (B), silná reakce u 100 % buněk po 15,5d (C), 29,5d (D), 64,5d (E) a po 189,5d fixace (F). (zvětšeno 400x).

**Obrázek 13. Imunohistochemická exprese SOX2 v kravském endometriu fixovaném Bouinovým fixačním roztokem**



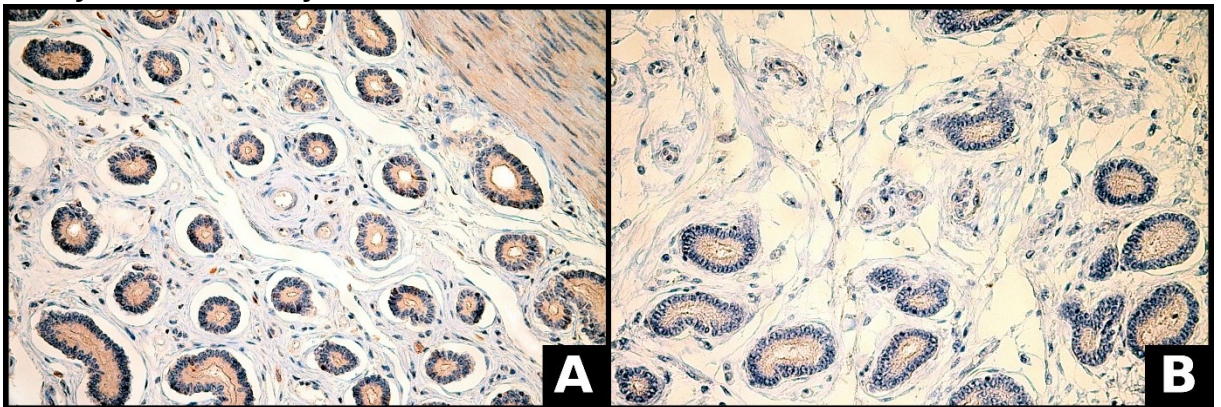
Středně silná reakce u 100 % žlázových buněk po 1,5d (A) a negativní barvení po 8,5d fixace (B). (zvětšeno 400x)

**Obrázek 14. Srovnání imunohistochemické exprese SOX2 v kravském endometriu fixovaném formolem, Antigenfixem a Greenfixem**



Extra silná reakce u 100 % žlázových buněk ve tkáni fixované Antigenfixem (A) po 1,5d fixace, extra silná reakce u 100 % buněk ve tkáni fixované formolem (B) po 1,5d fixace a středně silná reakce u 100 % buněk po fixaci tkáně Bouinem po 1,5d fixace (C). (zvětšeno 400x)

**Obrázek 15. Srovnání imunohistochemické exprese SOX2 v kravském endometriu fixovaném Greenfixem a methacarnem**



Negativní IHC reakce žlázových buněk ve tkáni fixované Greenfixem (A) a methacarnem (B) po 1,5d fixace. (zvětšeno 400x)

### **11.3 Vliv typu fixačního roztoku na morfologickou analýzu buněčných a tkáňových struktur**

Po fixaci tkáně formolem lze hodnotit veškeré buněčné detaily. Jádra jsou vzájemně odlišitelná, jaderné membrány jsou okrouhlé a tenké, jaderný chromatin je hrudkovitý, ložiskově jsou pozorovatelná jádérka. Spolehlivě lze identifikovat mitotické figury (Obr.16 C a Obr.17 A). Cytoplazma je slabě eosinofilní, arteficiální periglandulární retrakce není patrná (Obr.18 C a 19 A). V naší studii se formol jeví jako nejvhodnější fixační roztok pro histomorfologické hodnocení buněk/tkání.

U tkání fixovaných Greenfixem lze také pozorovat veškeré buněčné detaily. Jádra jsou vzájemně rozlišitelná, lze určit jejich tvar, velikost i charakter jaderné membrány. Struktura jaderného chromatinu a jadérek je hůře rozlišitelná než v případě formolu. Mitotické figury jsou obtížněji rozpoznatelné (Obr.16 D). Cytoplazma je středně bazofilní, a periglandulární retrakce je výrazná (Obr.18 D). I tento fixační roztok je však pro účely morfologické analýzy tkání vhodný.

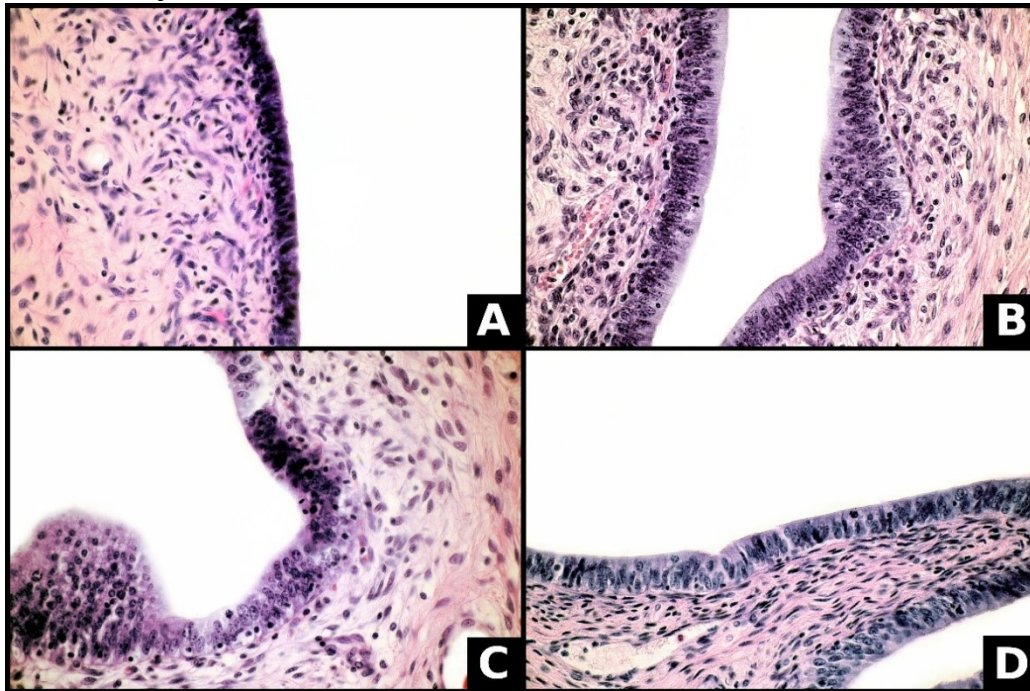
Taky po fixaci tkáně Bouinovým fixačním roztokem lze pozorovat veškeré buněčné detaily, rozlišit jednotlivá jádra a určit jejich tvar i velikost. Zřetelná je také struktura jaderného chromatinu i charakter jaderné membrány. Mitotické figury jsou stejně jako v případě Greenfixu hůře rozpoznatelné (Obr.16 B). Cytoplazma je slabě eosinofilní, periglandulární retrakce není patrná (Obr.18 B). Tento fixační roztok je srovnatelný s Greenfixem.

U tkáně fixované methacarnem lze taktéž pozorovat veškeré buněčné detaily jako je velikost a tvar jader, pozorovat lze také strukturu jaderné membrány, i když obtížněji ve srovnání s formolem, Bouinem i Greenfixem. Mitotické figury jsou obtížně rozpoznatelné (Obr.17 B). Cytoplazma je silně eosinofilní, periglandulární retrakce zde není přítomna (Obr.19 B). Methacarn je pro účely histomorfologické analýzy tkáně použitelný, ale méně vhodný ve srovnání s formolem, Greenfixem a Bouinem.

Po fixaci tkáně Antigenfixem jsou buněčné detaily podstatně hůře pozorovatelné, problematické je i vzájemné odlišení jednotlivých buněk. Jaderné detaily nelze pozorovat, není možné s jistotou hodnotit tvar jader, jaderných membrán. Nehodnotitelné jsou mitotické figury i struktura jaderného chromatinu

(Obr.16 A). Cytoplazma je bazofilní, periglandulární rektrakce je mírná (Obr.18 A). Tento fixační roztok je pro účely histomorfologické analýzy tkáně nevhodný.

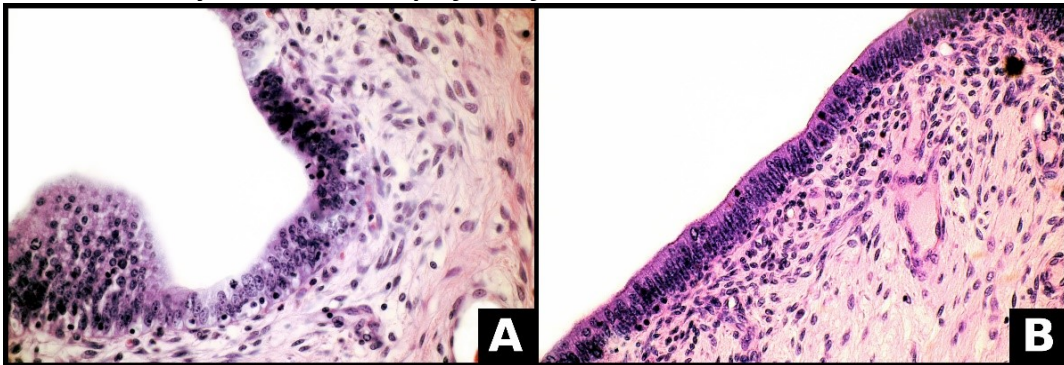
**Obrázek 16. Hodnocení buněčných struktur tkáně endometria prasnice barvené hematoxylinem-eozinem po fixaci Antigenfixem, Bouinem, Formolem a Greenfixem**



Problematické odlišení buněk, nehodnotitelné jaderné detaily a mitotické figury po 1,5d fixace Antigenfixem (A). Pozorovatelné veškeré buněčné i jaderné detaily, patrné mitotické figury po 1,5d fixace Bouinem (B) a formolem (C). Pozorovatelné veškeré buněčné i jaderné detaily, mitotické figury obtížně rozpoznatelné po 1,5d fixace Greenfixem (D). (zvětšeno 400x)

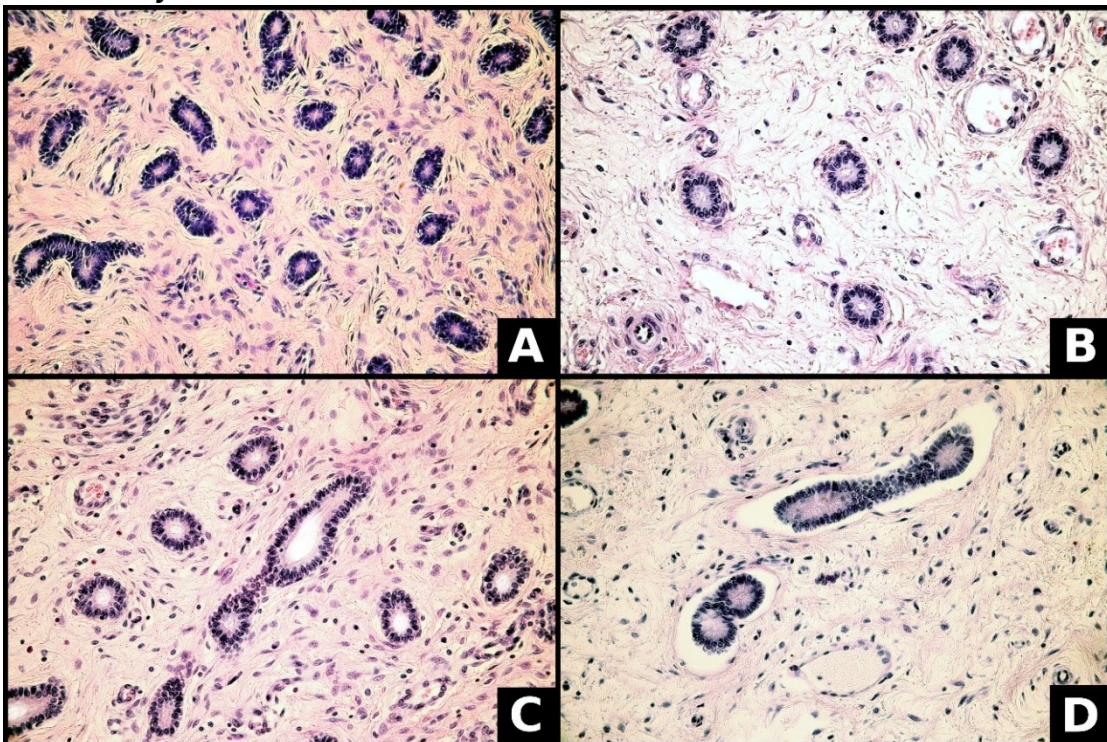


**Obrázek 17. Hodnocení buněčných struktur tkáně endometria prasnice barvené hematoxylinem-eozinem po fixaci formolem a methacarnem**



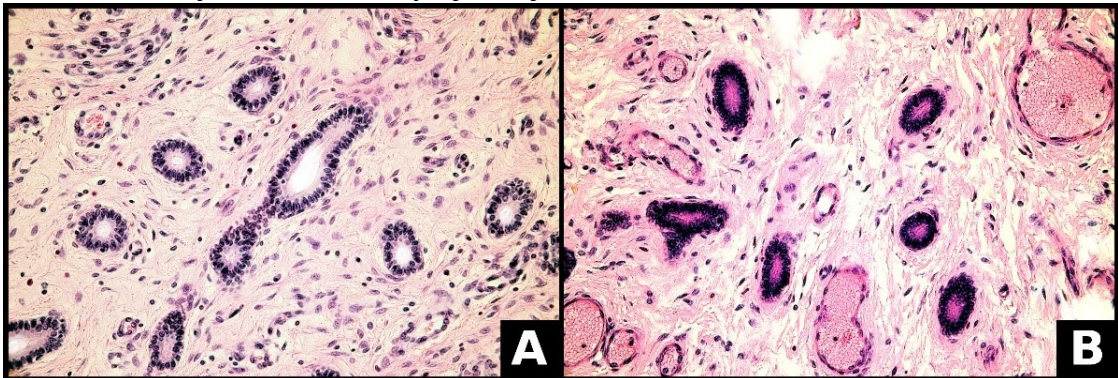
Jednoznačně patrné mitotické figury, slabě eosinofilní cytoplazma buněk po 1,5d fixace formolem (A) a obtížně rozpoznatelné mitotické figury, silně eosinofilní cytoplazma buněk po 1,5d fixace tkáně methacarnem (B). (zvětšeno 400x)

**Obrázek 18. Histomorfologický obraz tkáně endometria prasnice barvené hematoxylinem-eozinem po fixaci Antigenfixem, Bouinem, Formolem a Greenfixem**



Mírná periglandulární retrakce a celkové středně eosinofilní barvení po 1,5d fixace Antigenfixem (A). Bez periglandulární retrakce a celkové slabě eosinofilní barvení po 1,5d fixace Bouinovým fixačním roztokem (B). Bez periglandulární retrakce, slabě eosinofilní barvení po 1,5d fixace formolem (C). Výrazná periglandulární retrakce a celkové slabě eosinofilní až prohledlé barvení po 1,5d fixace Greenfixem (D). (zvětšeno 600x)

**Obrázek 19. Histomorfologický obraz tkáně endometria prasnice barvené hematoxylinem-eozinem po fixaci formolem a methacarnem**



Bez periglandulární retrakce s celkovým slabě eosinofilním barvením po 1,5d fixace formolem (A). Bez periglandulární retrakce s celkovým silně eosinofilním barvením po 1,5d fixace methacarnem (B). (zvětšeno 600x)

## 12. DISKUSE

### 12.1 Vliv délky fixace a typu fixačního roztoku na IHC

Cílem této práce bylo prokázat vliv typu fixačního roztoku a délky fixace na imunohistochemickou analýzu kmenových buněk ve tkáni endometria. Fixace je stěžejním procesem preanalytické fáze, který signifikantně ovlivňuje hodnocení preparátu při histopatologickém vyšetření. Z tohoto důvodu se výzkum zaměřuje právě na tuto oblast. Nejpoužívanějším fixačním roztokem v rutinní histopatologické laboratoři je formol (Gatta, et al., 2012). Práce s formolem je z důvodu jeho prokázané kancerogenity spojena se značnými riziky pro pracovníky laboratoří (Costa, et al., 2008). Při fixaci formolem navíc dochází k maskování antigenních míst tkáně, což má negativní vliv na IHC. Tyto vlivy se však podařilo minimalizovat technikou demaskování antigenů. Navíc je tkáň fixovaná ve formolu nepoužitelná pro molekulární metody, které jsou v současné době velmi na vzestupu. Všechny tyto důvody vedly na poli výzkumu k intenzivnímu hledání alternativního fixačního roztoku (Buesa, 2008).

Do naší studie bylo zařazeno celkem 5 fixačních roztoků. Methacarn a Greenfix jsou fixační roztoky na bázi alkoholu, které způsobují koagulaci proteinů. Formol a Antigenfix patří mezi zesítující fixační roztoky, které prostřednictvím svých aldehydových skupin působí zesílení proteinů. Bouin je směsný fixační roztok na bázi kyseliny pikrové, která tvoří nerozpustné sraženiny, a formolu. Dle našich výsledků se fixační roztoky působící zesílení proteinů ve srovnání s fixačními roztoky na bázi alkoholu jeví pro IHC jako vhodnější.

Zkoumáním těchto vlivů se kromě nás zabývalo i několik jiných autorů a tak lze naše výsledky komparovat s několika studiemi. Paavilainen se spolupracovníky zařadili do své studie několik fixačních roztoků na bázi aldehydu i alkoholu, dospěli ke stejnému závěru jako my, tedy že po fixaci tkáně fixačními roztoky na bázi aldehydu je intenzita IHC reakce vyšší ve srovnání s alkoholovými fixačními roztoky (Paavilainen et al., 2010). Tito autoři však do své studie zařadili pouze tkáň fixovanou po dobu 24 hod.

Fixační roztok methacarn je dle našich zjištění zcela nevhodný pro IHC, exprese nebyla zaznamenána ani u jednoho z použitých markerů v žádném čase, přestože je dle

výrobců uváděno, že methacarn je vhodný pro IHC barvení. Jednou z uváděných předností je schopnost chránit antigenní místa tkáně, což dle doporučení také umožňuje vynechat demaskování antigenů. To však rozporuje studie autorů pod vedením Milchevy, kteří zmiňují absenci barvení při vynechání techniky demaskování antigenů. Absence IHC barvení při fixaci tkáně methacarnem může být důsledkem denaturace vazebného místa cílového antigenu. Proto naopak doporučují provádět demaskování antigenů vždy a uvádějí, že při použití této techniky došlo ke snížení nespecifického barvení pozadí, které je způsobené sekundární protilátkou, a také že po fixaci tkáně methacarnem bylo dosaženo intenzivnější IHC reakce než u vzorků fixovaných formolem. Pro tento experiment použili autoři myší tkáně, které fixovali 48 hodin (Milcheva et al., 2013). Delfour se spolupracovníky testovali vliv na imunohistochemickou expresi ESR1, HER2 a PR v nádorové tkáni prsu, získali po 24hodinové fixaci methacarnem výsledky srovnatelné s formolem (Delfour et al., 2006). V další studii Mitchell a kolektiv považují methacarn dokonce za nejlepší fixační prostředek pro zachování antigenicity, přičemž ve své studii srovnávají fixační roztoky formol, Bouin, Carnoy, B-5 a modifikovaný methacarn. Modifikace methacarnu spočívala v nahrazení chloroformu inhibisolem. Tato změna však neměla dle autorů vliv na antigenicitu tkáně, neboť hlavní sloučeninou methacarnu podílející se na fixaci je methanol (Mitchell et al., 1985). Tyto výsledky jsou zcela v rozporu s našimi. Naše práce je tedy první studií, ve které byl prokázán negativní vliv methacarnu na imunohistochemické barvení.

Dalším použitým fixačním roztokem byl v naší studii Bouinův roztok. U tohoto fixativa bylo dosaženo výsledků pouze po 1,5 dni fixace. U protilátky SOX2 bylo nabarveno 96 % buněk a reakce byla středně silná, u PR byla zaznamenána slabá reakce s 7,2 % marker pozitivních buněk. Bouinův fixační roztok do své studie zařadili i výše zmíněný kolektiv autorů pod vedením Mitchella. Ti uvádějí, že u některých z použitých protilátek (Aktin, EMA, Faktor VIII, Kolagen IV) byl zaznamenán signifikantní pokles imunoreaktivity. Například exprese EMA byla ve tkáni fixované formolem a Bouinovým fixačním roztokem stejná, naopak u kolagenu IV došlo v případě Bouinu k signifikantnímu poklesu intenzity reakce ve srovnání s formolem (Mitchell et al., 1985). Tyto výsledky jsou srovnatelné s našimi. Gatta se spolupracovníky fixovali

24 hodin různé tkáně (např. plíce, střeva, ledviny, ovaria) v 6 různých fixačních roztocích (formol, Bouin, Hollande, Greenfix, UPM, CyMol). IHC barvení bylo provedeno za použití protilátek pancytokeratinu (PAN-CK), CD31, Ki-67, S100 a CD68. Autoři uvádějí, že pro protilátky PAN-CK a Ki-67 byla intenzita reakce a % pozitivních buněk nižší ve tkáních fixovaných Bouinovým fixačním roztokem ve srovnání s fixací formolem. Stejný výsledek byl zaznamenán také u protilátky CD31, naopak u CD68 byla intenzita reakce u tkáně fixované v Bouinu a všech ostatních fixačních roztocích vyšší ve srovnání s formolem (Gatta et al., 2012). V naší studii byla po fixaci Bouinovým fixačním roztokem zaznamenána pro protilátky PR i SOX2 nižší intenzita reakce ve srovnání s formolem. Naše výsledky jsou tedy po 24 hod. fixaci srovnatelné. Z výsledků této studie a přiložené obrazové dokumentace lze také vyvodit, že cytoplazma odolává vlivům fixace lépe než jádro, což je v souladu s našimi zjištěními. To však rozporují například Matsuda se spolupracovníky, kteří ze svých výsledků vyvozují, že rozdíly v imunoreaktivitě závisí pouze na fixaci, nikoliv na celulární lokalizaci antigenu (Matsuda et al., 2011).

Kromě nás se vlivem Greenfixu na IHC zabývali pouze Gatta se spolupracovníky, jejichž výsledky jsou ve srovnání s našimi odlišné. U tohoto fixačního roztoku uvádějí intenzitu reakce a % marker pozitivních buněk po krátkodobé fixaci srovnatelné s formolem (Gatta et al., 2012). Podle výsledků naší práce je však Greenfix signifikantně horším fixačním roztokem ve srovnání s formolem. Navíc jsme jako první prokázali, že dlouhodobá fixace Greenfixem negativně ovlivňuje IHC.

Vůbec jako první jsme popsali vliv fixace tkáně Antigenfixem na IHC. Antigenfix se dle našich výsledků jeví jako velmi vhodný jak pro účely krátkodobé, tak i pro účely dlouhodobé fixace. Výsledky IHC barvení byly zcela srovnatelné s formolem. Pro objektivní srovnání však neexistují žádné dostupné studie, kde by byl tento fixační roztok použit. S ohledem na naše výsledky by měl být zcela jistě předmětem dalšího výzkumu.

Vlivem délky fixace na IHC se zabýval Chung s kolegy. Myší tkáně, konkrétně játra, slezinu a ledviny fixovali ve formolu, 70 % ethanolu a BE70 (pufrovaný ethanol) po dobu 4 hodin, 12 hodin, 1 dne, 1 týdne a 1,3 a 6 měsíců. Pro IHC barvení byly použity protilátky Ki-67, H3 a AQP1. IHC reakce při použití protilátky AQP1 byla

po 24hodinové fixaci intenzivnější ve tkáni fixované BE70 ve srovnání s formolem. Expres AQP1 po fixaci BE70 byla stálá po dobu 4 hodin až 3 měsíců, po 6 měsících byl zaznamenán její mírný pokles. Naopak ve tkáni fixované formolem docházelo v průběhu času k výraznému poklesu intenzity reakce i % marker pozitivních buněk. Po 6 měsících reakce zcela vymizela. Intenzita reakce Histonu H3 byla po fixaci BE70 stabilní v časovém rozmezí 4hod- 6 měsíců, u tkání fixovaných ve formolu byla intenzita reakce nejvyšší po 1 dni fixace, k signifikantnímu poklesu došlo po 1 měsíci a dále také po 3 a 6 měsících. K úplnému vymizení reakce po 6 měsících v tomto případě nedošlo. Autoři na základě svých výsledků uvádějí, že pro účely dlouhodobé fixace jsou vhodnější fixační roztoky na bázi alkoholu než fixační roztoky způsobující zesílení proteinů (Chung et al., 2018). Naše výsledky však poukazují na přesný opak. Jako první prokazujeme, že z pohledu dlouhodobé fixace jsou alkoholové fixační roztoky pro IHC nevhodné.

## **12.2 Expres SOX2 a PR v endometriu**

Jak již bylo zmíněno v úvodu, SOX2 se podílí na regulaci embryonálního vývoje a buněčného osudu. (Schaefer, Lengerke, 2020). Expresi SOX2 v kravském endometriu kromě nás popisují také Cabezas se spolupracovníky, kteří uvádějí, že SOX2 je exprimován v jádře žlázových a některých stromálních buněk. (Cabezas et al., 2014). V našem případě byl marker SOX2 exprimován ve žlázových buňkách, nikoliv však v jádře, ale cytoplazmě. To ovšem souvisí s použitím konkrétní protilátky. Cytoplazmatickou expresi SOX2 popisují také Perry a kolektiv, kteří použili stejnou protilátku (Perry et al., 2013).

PR se nachází v jádře epitelí a stromálních buněk během proliferační fáze cyklu. Rozlišujeme dvě izoformy, PR $\alpha$  a PR $\beta$ , které regulují transkripci genů reagujících na progesteron (Grafam, Clarke, 1997). IHC analýzou bylo prokázáno, že během sekreční fáze převládá izoforma PR $\alpha$ , u PR $\beta$  byl zaznamenán pokles exprese ve stromálních i žlázových buňkách v druhé polovině menstruačního cyklu. Stromální buňky zona functionalis jsou během sekreční fáze citlivé k progesteronu, naproti tomu zona basalis má perzistentní expresi PR v průběhu celého menstruačního cyklu (Mote et al., 2001).

Skupina autorů pod vedením Schüringa prokazovala expresi PR a ESR1 v kulturách buněk, u kterých bylo zjištěno, že vykazují vlastnosti kmenových buněk. Biopsie byla u žen provedena během luteální fáze cyklu. Autoři uvádějí, že po prvním klonovacím cyklu došlo k výraznému poklesu exprese ESR1, zatímco exprese PR zůstala téměř nezměněna, u některých vzorků dokonce došlo k mírnému vzrůstu exprese. Jedná se o poměrně neočekávaný nález, neboť dle dosud publikovaných výsledků autoři očekávali, že také u exprese PR dojde k poklesu. Recentně máme k dispozici pouze omezené množství informací o možné funkci estrogenu a progesteronu u endometriálních kmenových buněk. Z dosud dostupných poznatků se předpokládá, že tyto buňky reagující na hormony jsou součástí niche kmenových buněk, které parakrinními cestami ovlivňují proliferaci epiteliálních kmenových buněk (Schüring et al., 2011).

Ka se spolupracovníky stanovili expresi PR v prasečím endometriu během estrálního cyklu. Nejvyšší exprese PR byla zaznamenána do 5. dne cyklu, v 10. a 11. dni klesla a zůstala nízká do další fáze proestru. PR je silně exprimován mezi 0-5 dni cyklu v buňkách povrchového a žlázoového epitelu a ve stromálních buňkách. Exprese od 7. dne cyklu klesá, od 12. dne je již nedetekovatelná a od 18. dne cyklu dochází k jejímu opětovnému nárůstu (Ka et al., 2018).

### ***12.3 Vliv volby fixačního roztoku na morfologickou analýzu buněčných a tkáňových struktur***

Gatta se spolupracovníky hodnotili vliv fixace na morfologickou analýzu tkání po 24 hod. fixace formolem, Bouinovým fixačním roztokem, Greenfixem, UPM a CyMol. Zjistili, že výsledky morfologické analýzy tkání fixovaných Greenfixem byly velmi podobné jako po fixaci formolem. Nedošlo k žádným změnám cytoplazmatické ani jaderné morfologie. Podobných výsledků bylo dosaženo také s Bouinovým fixačním roztokem, u kterého autoři popisují lepší rozlišitelnost jaderného chromatinu než po fixaci Greenfixem (Gatta et al., 2012). V naší studii hodnotíme Bouinův fixační roztok jako srovnatelný s formolem, po fixaci Greenfixem byla struktura jaderného chromatinu a jadérek hodnotitelná, ale hůře v porovnání s formolem. Navíc jsme

u Greenfixu zaznamenali výraznou periglandulární retrakci. Nicméně jsou naše výsledky přibližně srovnatelné.

Moelans a kolektiv, kteří porovnávali kvalitu morfologie tkáně po fixaci formolem a fixačními roztoky F-Solv, FineFIX a RCL2 dosáhli stejně jako my po fixaci formolem nejlepších výsledků. Tito autoři zmiňují, že u fixačních roztoků na bázi alkoholu dochází k výraznější retrakci tkáně ve srovnání s formolem (Moelans et al., 2011). Naopak Haque se spolupracovníky považují fixační roztoky na bázi alkoholu pro zachování morfologie dokonce za lepší než formol. Po zhodnocení buněčných detailů jako je odlišitelnost jader, viditelnost jaderných struktur a buněčných membrán považují methacarn za nejlepší, následovaný fixačním roztokem na bázi ethanolu EthMeth a formolem (Haque et al., 2020). Kolektiv autorů pod vedením Milchevy považují methacarn za srovnatelný s formolem (Milcheva et al., 2013). Naopak dle výsledků naší studie je formol jednoznačně lepším fixačním roztokem ve srovnání s methacarnem. Jako nejhorší se v naší studii pro zachování buněčné morfologie ukázal Antigenfix, u kterého nebylo možné hodnotit buněčné detaily a vzájemné odlišení jednotlivých buněk bylo obtížné. U antigenfixu je námi jasně demonstrována důležitost volby fixačního roztoku pro následnou analýzu, jelikož Antigenfix se pro účely IHC jevil jako velmi vhodný, srovnatelný s formolem, kdežto pro morfologickou analýzu se z použitých fixativ jeví jako nejhorší.



## 13. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo nastudování problematiky vlivu fixace tkáně na imunohistochemickou analýzu. Teoretická část práce byla rozdělena na 3 hlavní části. S použitím recentní literatury byla v první části popsána fixace tkáně, faktory ovlivňující fixaci a typy fixačních roztoků. Další část byla věnována histologické deskripci endometria, kmenovým buňkám v této tkáni a jejich markerům. Poslední část byla věnována imunohistochemii, používaným detekčním systémům, popsán byl také standardní IHC protokol a možnosti hodnocení této metody.

Dalším ze stanovených cílů bylo prokázat, jak délka fixace a typ fixačního roztoku ovlivňují imunohistochemickou analýzu tkání. Bylo prokázáno, že pro účely krátkodobé i dlouhodobé fixace je nejlepším fixačním roztokem formol. Dalším vhodným fixačním roztokem je Antigenfix. Výsledky fixace formolem a Antigenfixem byly srovnatelné, tedy i Antigenfix se hodí jak pro krátkodobou, tak pro dlouhodobou fixaci. Dalším v pořadí je Bouinův fixační roztok. Bouinův fixační roztok lze doporučit pouze pro krátkodobou fixaci, pro účely dlouhodobé fixace je nevhodný. Fixační roztok Greenfix je pro dlouhodobou fixaci nevhodný a ani pro krátkodobou fixaci jej nelze doporučit. Fixační roztok methacarn se jeví pro účely imunohistochemického barvení jako zcela nevhodný. Dále bylo prokázáno, že cytoplazma odolává vlivům fixace lépe než jádro.

Mezi jednotlivými fixačními roztoky a ve sledovaných obdobích byly prokázány signifikantní rozdíly a oba stanovené cíle byly naplněny.

Závěrem uvádíme souhrn nových poznatků vyplývajících z výsledků naší práce, které nebyly doposud ve vědecké literatuře publikovány. Jako první jsme prokázali negativní vliv methacarnu na imunohistochemické barvení. Naše práce je první studií, která ukázala, že dlouhodobá fixace Greenfixem je pro účely IHC nevhodná. Vůbec poprvé jsme popsali vliv fixace Antigenfixem na IHC. Nově jsme taky zjistili, že pro dlouhodobou fixaci jsou alkoholové fixační roztoky nevhodné.

## 14. POUŽITÉ ZKRATKY

<b>zkratka</b>	<b>význam zkratky</b>	<b>český význam</b>
<b>ABC</b>	ATP binding cassette	ATP vázající kazety
<b>bmMSC</b>	Bone-marrow mesenchymal stem cell	Mezenchymální kmenová buňka pocházející z kostní dřeně
<b>bmSC</b>	Bone-marrow stem cell	Kmenová buňka pocházející z kostní dřeně
<b>CFU</b>	Colony forming unit	Jednotka tvořící kolonie
<b>DAB</b>	3,3'diaminobenzidine tetrachlorid	3,3'diaminobenzidine tetrachlorid
<b>eMSC</b>	Endometrial mesenchymal stem cell	Endometriální mezenchymální kmenová buňka
<b>eSC</b>	Endometrial stem cell	Endometriální kmenová buňka
<b>ESR</b>	Estrogene receptor	Estrogenový receptor
<b>HE</b>	Hematoxylin-eosin	Hematoxylin-eozin
<b>HIER</b>	Heat induced epitope retrieval	Teplem indukované demaskování epitopů
<b>IHC</b>	Imunohistochemistry	Imunohistochemie
<b>MP</b>	Main population	Hlavní populace
<b>mSC</b>	Mesenchymal stem cell	Mezenchymální kmenová buňka
<b>MSCA-1</b>	Mesenchymal stem cell antigen-1	Antigen mezenchymálních kmenových buněk-1
<b>PAP</b>	Peroxidase-antiperoxidase	Peroxidáza-antiperoxidáza
<b>PDGFR<math>\beta</math></b>	Platelet derivated growth factor receptor $\beta$	Receptor $\beta$ růstového faktoru dovozený z krevních destiček
<b>PR</b>	Progesterone receptor	Progesteronový receptor
<b>SP</b>	Side population	Vedlejší populace
<b>SSEA-1</b>	Stage specific embryonal antigen -1	Stádiově specifický embryonální antigen- 1
<b>TNAP</b>	Tissue nonspecific alkaline phosphatase	Tkáňově nespecifická alkalická fosfatáza

## 15. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Fáze cyklu a jeho charakteristiky .....	21
Tabulka 2. Standardní IHC protokol .....	35
Tabulka 3. Použité fixační roztoky.....	38
Tabulka 4. Použité protilátky.....	40
Tabulka 5. IHC exprese PR v prasečím endometriu fixovaném ve formolu, Bouinu a Antigenfixu .....	43
Tabulka 6. IHC exprese PR v prasečím endometriu fixovaném v methacarnu a Greenfixu.....	44
Tabulka 7. IHC exprese SOX2 v kravském endometriu fixovaném ve formolu, Bouinu a Antigenfixu .....	50
Tabulka 8. IHC exprese SOX2 v kravském endometriu fixovaném methacarnem a Greenfixem	51

## 16. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Schématické znázornění stěny děložní .....	19
Obrázek 2. Schéma přímé metody.....	31
Obrázek 3. Schéma nepřímé dvojestupňové metody.....	32
Obrázek 4. Schéma nepřímé trojestupňové metody peroxidáza-antiperoxidáza .....	33
Obrázek 5. Schéma nepřímé trojestupňové metody avidin-biotin komplex .....	34
Obrázek 6. Imunohistochemická exprese PR ve tkáni endometria prasnice fixované formolem .....	45
Obrázek 7. Imunohistochemická exprese PR ve tkáni endometria prasnice fixované Antigenfixem .....	46
Obrázek 8. Imunohistochemická exprese PR ve tkáni endometria prasnice fixované Bouinovým fixačním roztokem.....	47
Obrázek 9. Imunohistochemická exprese PR ve tkáni endometria prasnice fixované Greenfixem .....	47
Obrázek 10. Imunohistochemická exprese PR ve tkáni endometria prasnice fixované methacarnem .....	48
Obrázek 11. Imunohistochemická exprese SOX2 v kravském endometriu fixovaném formolem .....	52
Obrázek 12. Imunohistochemická exprese SOX2 v kravském endometriu fixovaném Antigenfixem .....	53
Obrázek 13. Imunohistochemická exprese SOX2 v kravském endometriu fixovaném Bouinovým fixačním roztokem.....	53
Obrázek 14. Srovnání imunohistochemické exprese SOX2 v kravském endometriu fixovaném formolem, Antigenfixem a Greenfixem .....	54
Obrázek 15. Srovnání imunohistochemické exprese SOX2 v kravském endometriu fixovaném Greenfixem a methacarnem .....	54
Obrázek 16. Hodnocení buněčných struktur tkáně endometria prasnice barvené hematoxylinem-eozinem po fixaci Antigenfixem, Bouinem, Formolem a Greenfixem.....	56
Obrázek 17. Hodnocení buněčných struktur tkáně endometria prasnice barvené hematoxylinem-eozinem po fixaci formolem a methacarnem .....	57
Obrázek 18. Histomorfologický obraz tkáně endometria prasnice barvené hematoxylinem-eozinem po fixaci Antigenfixem, Bouinem, Formolem a Greenfixem .....	57
Obrázek 19. Histomorfologický obraz tkáně endometria prasnice barvené hematoxylinem-eozinem po fixaci formolem a methacarnem .....	58

## 17. POUŽITÁ LITERATURA

1. ASMANI MN, ET AL. Three-dimensional culture of differentiated endometrial stromal cells to oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) in fibrin hydrogel. *Cell Biology International*. 2013, **37**(12), 1340-9.
2. AVRAMEAS S, URIEL J. Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*. 1966, **262**(24), 2543–5.
3. BACH SP, RENEHAN AG, POTTEN CS. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis*. 2000, **21**(3), 469-76.
4. BAKER, JR. Fixation in cytochemistry and electron-microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1958, **6**(5), 303-8.
5. BANCROFT JD, STEVENS A. Theory and Practice of Histological Techniques. *Churchill Livingstone*. Edinburg, 1996, 766.
6. BANCROFT, JD a M GAMBLE. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 5. Philadelphia: Elsevier, 2002. ISBN 978-0-44-306435-7.
7. BATTIFORA H, KOPINSKI M. The influence of protease digestion and duration of fixation of the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1986, **34**, 1095–1100.
8. BIANCO P, ET AL. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications, *Stem Cells*, 2001, **19**, 180-192.
9. BITENSKY L, COHEN S. The histochemical demonstration of alkaline phosphatase in unfixed frozen sections. *Quarterly Journal of Microscopical Science*. 1965, **106**(2), 193–196.
10. BODEY B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2002, **2**(4), 371–93.

11. BRANTZAEG P. The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. *Journal of Immunological Methods*. 1998, **216**(1-2), 49-67.
12. BUESA RJ. Histology without formalin? *Annals of Diagnostic Pathology*. 2008, **12**(6), 387-96.
13. CABEZAS J, ET AL. The endometrium of cycling cows contains populations of putative mesenchymal progenitor cells. *Reproduction in Domestic Animals*. 2014, **49**(4), 550-9.
14. CABEZAS J, ET AL. The endometrium of cycling cows contains populations of putative mesenchymal progenitor cells. *Reproduction in Domestic Animals*. 2014, **49**(4), 550-559.
15. CAMPO H, CERVELLÓ I, SIMÓN C. Bioengineering the Uterus: An Overview of Recent Advances and Future Perspectives in Reproductive Medicine. *Annals of Biomedical Engineering*. 2017, **45**, 1710–1717.
16. CAPELA A, TEMPLE S. Lex/ssea-1 is expressed by adult mouse cns stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron*. 2002, **35**(5), 865–875.
17. CARLETON HM, DURY RAB, WALLINGTON EA. Carleton's Histological Technique. 5th ed. *Oxford University Press*. New York, 1980.
18. CARSON FL. Histotechnology. 2nd ed. *ASCO Press*. Chicago, 1997.
19. CERVELLÓ I, ET AL. Human endometrial side population cells exhibit genotypic, phenotypic and functional features of somatic stem cells. *PLoS ONE*. 2010, **5**, e10964
20. CERVELLÓ I, ET AL. Reconstruction of endometrium from human endometrial side population cell lines. *PLoS One*. 2011, **6**(6), e21221.
21. CERVELLÓ I, SIMON C. Somatic stem cells in the endometrium. *Reproductive Science*. 2009, **16**(2), 200–205.

22. COONS AH, LEDUC EH, CONNOLLY JM. Studies on antibody production. I: A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *Journal of Experimental Medicine*. 1955, **102**(1), 49–60.
23. COSTA S, ET AL. Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology*. 2008, **252**(1-3), 40-8.
24. CRISAN M, ET AL. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008, **3**(3), 301-13.
25. DABBS, DJ. Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications. 3rd ed. *Saunders/Elsevier*. Philadelphia, 2010. ISBN 978-1-4160-5766-6.
26. DELFOUR CH, ET AL. RCL2, a new fixative, preserves morphology and nucleic acid integrity in paraffin-embedded breast carcinoma and microdissected breast tumor cells. *The Journal of molecular diagnostics*. 2006, **8**(2), 157–169.
27. DIMITROV R, ET AL. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction*. 2008, **135**(4), 551-8.
28. DOMINICI M, ET AL. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006, **8**, 315–317.
29. DOYLE SP, OLEARY JJ. The search for the universal fixative or “magic juice”. *Journal of Pathology*. 1992, **166**, 331–332.
30. DVOŘÁK K, ET AL. Základy histopatologických vyšetřovacích metod. [online] Brno: Masarykova univerzita. [cit. 2021-11-05]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1411/jaro2016/BLKHM0422c/um/Zaklady\\_histopatologickyh\\_vysetrovacich\\_metod.pdf](https://is.muni.cz/el/1411/jaro2016/BLKHM0422c/um/Zaklady_histopatologickyh_vysetrovacich_metod.pdf)
31. ECKFELDT CE, MENDENHALL EM, VERFAILLIE CM. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005, **6**(9), 726-37.

32. ELTOUM, IE., ET AL Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *Journal of Histotechnology*. 2001, **24**(3), 173-90.
33. EURELL JA, FRAPPIER BL. Dellmann's Textbook of Veterinary Histology. 6th ed. Wiley. New Jersey, 2006. ISBN: 978-0-7817-4148-4.
34. FOX N, ET AL. Immunohistochemical localization of the mouse stage-specific embryonic antigen 1 in human tissues and tumors. *Cancer Research*. 1983, **43**(2), 669–678.
35. FOX, CH., ET AL. Formaldehyde Fixation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1985, **33**(8), 845-53.
36. FREIDA, L., CARSON, CHH. Histotechnology: A Self Instruction Text. 3rd ed., *American Society for Clinacal Pathology*. Hong Kong, 2009.
37. GARGETT CE, ET AL. Isolation and Culture of Epithelial Progenitors and Mesenchymal Stem Cells from Human Endometrium. *Biology of Reproduction*, 2009, **80**(6), 1136–1145.
38. GARGETT CE, MASUDA H. Adult stem cells in the endometrium. *Molecular Human Reproduction*. 2010, **16**(11), 818-34.
39. GARGETT CE, SCHWAB KE, DEANE JA. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Human Reproduction Update*. 2016, **22**(2), 137-63.
40. GARGETT CE. Uterine stem cells: what is the evidence? *Human Reproduction Update*. 2007, **13**(1), 87-101.
41. GARRY R, ET AL. A re-appraisal of the morphological changes within the endometrium during menstruation: a hysteroscopic, histological and scanning electron microscopic study. *Human Reproduction*. 2009, **24**(6), 1393–1401.
42. GATTA LB, ET AL. Application of alternative fixatives to formalin in diagnostic pathology. *European journal of histochemistry*. 2012, **56**(2), e12.

43. GRAHAM JD, CLARKE CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*. 1997, **18**(4), 502-519.
44. GRIZZLE WE, FREDENBURGH JL, MYERS RB. Fixation of tissues. In: Bancroft JD, Gamble M, editors. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6th ed. Philadelphia, USA: *Elsevier Limited*. 2008, 56–63.
45. GUESDON JL, TERNYNCK T, AVRAMEAS S. The uses of avidin–biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979, **27**(8), 1131-39.
46. GUSTAVSON MD, ET AL. Standardization of HER2 immunohistochemistry in breast cancer by automated quantitative analysis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2009, **133**(9), 1413-9.
47. HAINES DM, WEST KH. Immunohistochemistry: forging the links between immunology and pathology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2005, **108**(1-2)151–6.
48. HAQUE Z, ET AL. Alcohol-Based Fixatives can Better Preserve Tissue Morphology than Formalin. *International Journal of Morphology*. 2020, **38**(5), 1371-1375.
49. HAYAT, MA. Fixation and embedding. In: Hayat, MA. *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods for Light and Electron Microscopy*. *Kluwer Academic*, New York, 2002.
50. HEWITT, SM., ET AL. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2008, **132**(12), 1929-35.
51. HOPWOOD, D. Some aspects of fixation with glutaraldehyde. A biochemical and histochemical comparison of the effects of formaldehyde and glutaraldehyde fixation on various enzymes and glycogen, with a note on penetration of glutaraldehyde into liver. *Journal of Anatomy*. 1967, **101**(1), 83-92.



52. HORNICKEL I, ET AL. Demonstration of substances of innate immunity in the esophagus epithelium of domesticated mammals. Part I—methods and comparative fixation evaluation. *Acta Histochemica*. 2011, **113**(2), 175-188.
53. HOŘEJŠÍ V, BARTŮŇKOVÁ J. Základy imunologie. 4. vyd. Praha: Triton. 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.
54. HOSHI K, ET AL. Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochemistry and Cell Biology*. 1997, **107**, 183–191.
55. HSU SM, RAINE L. Protein A, avidin and biotin in immunocytochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1981, **29**(11), 1349-53.
56. HUANG CC, ET AL. Stromal-to-epithelial transition during postpartum endometrial regeneration. *PLoS One*. 2012, **7**(8), e44285.
57. HUANG SN, MINASSIAN G, MORE JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigation*. 1976, **35**(4), 383–90.
58. CHAN RW, SCHWAB KE, GARGETT CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biology of Reproduction*. 2004,**70**(6), 1738–1750
59. CHUNG JY, ET AL. Histomorphological and Molecular Assessments of the Fixation Times Comparing Formalin and Ethanol-Based Fixatives. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2018, **66**(2), 121-135.
60. JACOB M, KONRAD K, JACOB HJ. Early development of the müllerian duct in avian embryos with reference to the human. An ultrastructural and immunohistochemical study. *Cells Tissues Organs*. 1999, **164**(2), 63-81.
61. KA H., ET AL. Endometrial response to conceptus-derived estrogen and interleukin-1 $\beta$  at the time of implantation in pigs. *Journal of animal science and biotechnology*. 2018, **9**, 44.

62. KATO K, ET AL. Characterization of side-population cells in human normal endometrium. *Human Reproduction*. 2007, **22**(5), 1214–1223.
63. KEY M. Immunohistochemistry staining methods, Immunohistochemical staining methods. 5th edition. *Dako*. California, 2009.
64. KHAZIPOV R, ET AL. Atlas of the Postnatal Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Neuroanatomy*. 2015, **9**, 61.
65. KIERNAN, JA. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today*. 2000, **8**(1), 8-12.
66. KIM SH, ET AL. An improved protocol of biotinylated tyramine-based immunohistochemistry minimizing nonspecific background staining. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2003, **51**(1), 129-132.
67. KIM SW, ROH J, PARK CS. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *Journal of Pathology and Translational Medicine*. 2016, **50**(6), 411-418.
68. KNOWLES BB, ADEN DP, SOLTER D. Monoclonal antibody detecting a stage-specific embryonic antigen (SSEA-1) on preimplantation mouse embryos and teratocarcinoma cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1978, **81**, 51–53.
69. KOBAYASHI A, BEHRINGER PR. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature Reviews Genetics*. 2003, **4**(12), 969-80.
70. KÖRBLING M, ESTROV Z. Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept? *New England Journal of Medicine*. 2003, **349**(6), 570–82.
71. LA RUSSA VF, ET AL. Marrow stem cells, mesenchymal progenitor cells, and stromal progeny, *Cancer investigation*. 2002, **20**, 110-123.
72. LEONG AS-Y. Fixation and fixatives. In: Woods AE, Ellis RC, eds. *Laboratory Histopathology*. Churchill Livingstone. New York, 1994

73. LI L, XIE T. Stem cell niche: structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2005, **21**(1), 605-31.
74. LILIE RD, FULLMER HM. Histopathologic Technique and Practical Histochemistry. 4th ed. *McGraw-Hill*. New York, 1976.
75. LUCOCQ JM, ROTH J. Colloidal gold and colloidal silver–metallic markers for light microscopic histochemistry. *In: Immunocytochemistry*. BULLOCK GR, PETRUSZ P. *Academic Press*. New York, 1985, 203-236.
76. LUNA LG. Histopathological Methods and Color Atlas of Special Stains and Tissue Artifacts. *American Histolabs*. Gaithersburg, 1992.
77. MASON, JT a TJ O’LEARY. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991, **39**(2), 225-39.
78. MASUDA H, ET AL. A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells. *Cell Transplantation*. 2012, **21**(10), 2201-14.
79. MASUDA H, ET AL. Stem cell-like properties of the endometrial side population: Implication in endometrial regeneration. *PLoS ONE*. 2010, **5**(4) e:10387.
80. MATOS LL, ET AL. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomarker Insights*. 2010, **5**, 9-20.
81. MATSUDA Y, ET AL. Comparison of fixation methods for preservation of morphology, RNAs, and proteins from paraffin-embedded human cancer cell-implanted mouse models. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2011, **59**(1), 68-75.
82. MEDAWAR, PB. The rate of penetration of fixatives. *Journal of the Royal Microscopical Society*. 1941, **61**(1), 46-57.
83. MIERNIK K, KARASINSKI J. Porcine uterus contains a population of mesenchymal stem cells. *Reproduction*. 2012, **143**(2), 203–209.

84. MILCHEVA R, ET AL. Alcohol based fixatives provide excellent tissue morphology, protein immunoreactivity and RNA integrity in paraffin embedded tissue specimens. *Acta Histochemica*. 2013, **115**(3), 279-89.
85. MINGUELL JJ, ERICES A, CONGET P. Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*. 2001, **226**, 507-520.
86. MITCHELL D, IBRAHIM S, GUSTERSON BA. Improved immunohistochemical localization of tissue antigens using modified methacarn fixation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1985, **33**(5), 491-5.
87. MIYAZAKI K, ET AL. Stem cell-like differentiation potentials of endometrial side population cells as revealed by a newly developed in vivo endometrial stem cell assay. *PLoS ONE*. 2012, **7**, e50749.
88. MOELANS CB, ET AL. Formaldehyde substitute fixatives. Analysis of macroscopy, morphologic analysis, and immunohistochemical analysis. *American Journal of Clinical Pathology*. 2011, **136**(4), 548-56.
89. MONTERO, C. The antigen–antibody reaction in immunohistochemistry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2003, **51**(1), 1-4.
90. MOORE KA, LEMISCHKA IR. Stem cells and their niches. *Science*. **311**(5769), 1880-5.
91. MOTE PA, ET AL. Detection of progesterone receptor forms A and B by immunohistochemical analysis. *Journal of Clinical Pathology*. 2001, **54**(8), 624-630.
92. NAKANE PK. Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1968, **16**(9), 557–60.
93. NGUYEN HPT, ET AL. N-cadherin identifies human endometrial epithelial progenitor cells by in vitro stem cell assays. *Human Reproduction*. 2017, **32**(11), 2254–2268.

94. PAAVILAINEN L, ET AL. The impact of tissue fixatives on morphology and antibody-based protein profiling in tissues and cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2010, **58**(3), 237-46.
95. PADYKULA HA. Regeneration in the primate uterus: the role of stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991, **622**, 47-56.
96. PERRY KJ, THOMAS AG, HENRY JJ. Expression of pluripotency factors in larval epithelia of the frog *Xenopus*: evidence for the presence of cornea epithelial stem cells. *Developmental Biology*. 2013, **374**(2), 281-94.
97. POLAK JM, VAN NOORDEN S. Introduction to Immunocytochemistry, 3rd ed. *Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford*, 2003.
98. PUCHTLER, H., ET AL. Carnoy fixation: practical and theoretical considerations. *Journal Histochemie. Histochemistry. Histochimie*. 1968, **16**(4), 361-71.
99. RADULESCU RT, BOESNISCH T. Blocking endogenous peroxidases: a cautionary note for immunohistochemistry. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2007, **11**(6), 1419.
100. RAMOS-VARA JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 2005, **42**(4), 405-426.
101. SABATINI DD., BENSCH K, BARNEET RJ. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *Journal of Cell Biology*. 1963, **17**(1), 19-58.
102. SCARPIN KM, ET AL. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. 2009. *Nuclear Receptor Signaling*. 2009, **7**(9)
103. SHACKELFORD C, ET AL. Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. *Toxicologic Pathology*. 2002, **30**(1), 93-6.

104. SHARP PA. Split genes and RNA splicing. *Cell*. 1994, **77**(6),805–815.
105. SHOAE-HASSANI A, ET AL. Endometrial stem cell differentiation into smooth muscle cell: A novel approach for bladder tissue engineering in women. *BJU International*. 2013, **112**(6), 854–863.
106. SHOSTAK S. (Re)defining stem cells. *Bioessays*. 2006, **28**(3), 301-8.
107. SCHAEFER T, LENGERKE C. SOX2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond. *Oncogene*. 2020, **39**, 278–292.
108. SCHÜRUNG AN, ET AL. mRNA-expression of ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and PR in clonal stem cell cultures obtained from human endometrial biopsies. *Scientific World Journal*. 2011,**11**, 1762-9.
109. SCHWAB KE, GARGETT CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Human Reproduction*. 2007, **22** (11), 2903-11.
110. SCHWAB KE, HUTCHINGSON P, GARGETT CE. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. *Human Reproduction*. 2008, **23**(4), 934-43.
111. SCHWAB KE, CHAN RW, GARGETT CE. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertility and Sterility*. 2005, **84**(2), 1124-30.
112. SOBIESIAK M, ET AL. The mesenchymal stem cell antigen MSCA-1 is identical to tissue non-specific alkaline phosphatase. *Stem Cells and Development*. 2010, **19**(5), 669-77.
113. TAYLOR HS. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA*. 2004, **292**, 81–85.

114. TEMPEST N, MACLEAN A, HAPANGAMA DK. Endometrial Stem Cell Markers: Current Concepts and Unresolved Questions. *International journal of molecular sciences*, 2018, **19**(10), 3240.
115. THORNWAITE JT, ET AL. The use of electronic cell volume analysis with the AMAC II to determine the optimum glutaraldehyde fixative concentration for nucleated mammalian cells. *Scanning Electron Microscopy*. 1978, **2**, 1123.
116. TSUJI S, ET AL. Side population cells contribute to the genesis of human endometrium. *Fertility and Sterility*. 2008, **90**(4), 1528–1537.
117. ULRICH D, ET AL. Mesenchymal stem/stromal cells in post-menopausal endometrium. *Human Reproduction*. 2014, **29**(9), 1895-905.
118. VALENTIJN AJ, ET AL. SSEA-1 isolates human endometrial basal glandular epithelial cells: phenotypic and functional characterization and implications in the pathogenesis of endometriosis. *Human Reproduction*. 2013,**28**(10), 2695-708.
119. VAN HECKE, D: Routine immunohistochemical staining today: choices to make, challenges to take. *Journal of Histotechnology*. 2002, **25**(1), 45–54.
120. VERDI J, ET AL. Endometrial stem cells in regenerative medicine. *Journal of Biological Engineering*. 2014, **8**, 20.
121. WOLFF EF, ET AL. Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrium by in vitro chondrogenesis. *Reproductive Sciencis*. 2007, **14**(6), 524-33.
122. YAZIJI H, BARRY T. Diagnostic Immunohistochemistry: what can go wrong? *Advances in Anatomic Pathology*. 2006, **13**(5), 238–46.