

Organotypické plátkové kultúry (OTSC)

Vzorka: čerstvé nádorové tkanivo

Reagencie a materiály: PBS, nízkotaviaca agaróza, sekundové lepidlo, acetón, platne s 12 alebo 24 jamkami

Nastavenia Compresstome®:

- Hrúbka rezu: 300 µm
- Rýchlosť: 2-3
- Oscilácia: 3-5

Zloženie média:

- RPMI 1640
- 5 % FBS
- 1 % GlutaMAX™
- 1 % penicilín-streptomycín
- 5 µg/ml inzulín
- 1 mM N-acetylcysteín

Konečné zloženie média závisí od dizajnu experimentu, liečebných podmienok a zamýšľaného účelu štúdie.

A. Zakladanie OTSC pomocou Compresstome®

1. Pripravte médium podľa vyššie uvedeného zloženia.
2. Pridajte 1 ml média do 24-jamkovej platne alebo 1,5 ml do 12-jamkovej platne. Ak sa liečba nepodáva, môže sa použiť väčšie množstvo média, ale treba mať na pamäti, že nadmerné množstvo média môže ovplyvniť **distribúciu kyslíka v kultúre**.
3. Platne s médiom predhrejte na 37 °C.
4. Pripravte Compresstome®. Ak sa stroj nenachádza v laminárnom boxe, vložte ho tam, dôkladne ho dezinfikujte etanolom (najmä vaňu) a vystavte UV žiareniu na sterilizáciu.

POZNÁMKA: MAJTE NA PAMÄTI, ŽE VAŇA A KOVOVÁ ČASŤ CYLINDRA SA NEDAJÚ UMYŤ ACETÓNOM! Iné časti, ako držiak žiletky a plastová časť cylindra, kde sa použilo sekundové lepidlo, sa dajú čistiť acetónom.

5. Pripravte cylinder a držiak na žiletku.
6. Pripevnite žiletku na držiak pomocou sekundového lepidla.
7. Vložte držiak na žiletku s pripevnenou čepeľou do Compresstome®.
8. Pripravte tkanivo podľa svojich experimentálnych preferencií.
9. Naneste malé množstvo lepidla na plastovú časť cylindra a pripevnite naň tkanivo. Nechajte lepidlo úplne zaschnúť.
10. Pripravte 2% nízkotaviacu agarózu, roztopte ju a nechajte vychladnúť na približne telesnú teplotu.
11. Keď agaróza dosiahne optimálnu teplotu, stabilizujte vzorku jemným krúživým nanášaním agarózy okolo nej. **POZNÁMKA: NELEJTE HORÚCU AGARÓZU NA PRILEPENÉ TKANIVO!**

12. Ochlad'te cylinder pomocou chladiaceho držiaka.
 13. Nastavte podmienky Compresstome® (hrúbka rezu, rýchlosť a osciláciu, podľa potreby) a vložte cylinder do stroja do otvoru vane.
 14. Piest nastavte opatrne, aby bol cylinder pevne upevnený a plynulo sa pohyboval počas rezania.
 15. Naplňte nádobu vychladeným PBS mierne nad úroveň vzorky, ale pod horný okraj vane.
 16. Skontrolujte všetky nastavenia a začnite s rezaním. Začnite s jedným rezom, aby ste overili správne podmienky rezania, potom pokračujte kontinuálnym krájaním. Odporúča sa najskôr rezať o niečo hrubšie rezy ako je požadované a postupne ich znižovať na cieľovú hrúbku.
 17. Pomocou pinzety opatrne zbierajte plátky a prenášajte ich do pripravených jamiek s médiom na platni.
 18. Kultivujte rezy pri 37 °C vo vlhkej atmosfére s 5 % CO₂ požadovanú inkubačnú dobu.
-

B. Resazurínový test životaschopnosti

Dôležité: Resazurín je citlivý na svetlo a mal by byť chránený pred svetlom, kedykoľvek je to možné.

1. Posledný deň experimentu odstráňte z jamiek celé médium. Pripravte zásobný roztok resazurínu (10 mg/ml) a zriedte ho v pomere 1:150 v rovnakom médiu, ktoré sa používalo počas experimentu.
2. Ak používate pozitívnu kontrolu, vyberte jednu jamku na začiatku experimentu a pred pridaním resazurínu odstráňte médium a inkubujte plátky v 70 % etanole po dobu 1 hodiny.
3. Po 1-hodinovej inkubácii pri 37 °C a 5 % CO₂ odstráňte etanol a plátky premyte 2-3-krát roztokom PBS.
4. Pridajte 1 ml zriedeného roztoku resazurínu do každej jamky. Objem sa môže líšiť v závislosti od formátu platne, ale všetky plátky musia byť ponorené v roztoku.
5. Pripravte blank výberom prázdnej jamky alebo skúmavky obsahujúcej iba zriedený roztok resazurínu. Inkubujte ho za rovnakých podmienok ako ostatné vzorky.
6. Inkubujte platňu 4-6 hodín pri 37 °C a 5 % CO₂. Chráňte ju pred svetlom.
7. Po inkubácii odoberte z každej jamky 100 µl do platne s 96-jamkovej platne.
8. Odmerajte fluorescenciu pri príslušnej vlnovej dĺžke (napr. excitácia: 545 nm, emisia: 600 nm; Braun et al., 2021) na detekciu resazurínu/resorufínu.

POZNÁMKA: Pri vykonávaní testu životaschopnosti resazurínom by mala byť vždy zahrnutá pozitívna kontrola, aby sa potvrdilo, že test funguje správne.