Univerzita Komenského v Bratislave
Lekárska fakulta

Špitálska 24
813 72 Bratislava

Ústav histológie a embryológie
LFUK

Protokol 03/2025: Ko-kultivácia epitelových buniek z vajíčkovodov (UTEC) a spermií.

1. Odber tkanív

- primárne kultúry UTEC, alebo komerčná UTEC línia
- Samoodber ejakulátu darcom (informovaný súhlas zúčastnených; etická komisia – ETICKÁ KOMISIA LEKÁRSKEJ FAKULTY v BRATISLAVE – No.73/2024) v súlade s medzinárodne akceptovanou praxou.
- Pred vykonaním experimentov – analýza viability epitelových buniek vajíčkovodu (UTECs) pomocou intravitálneho farbenia trypánovou modrou. Vyhodnotenia pomocou bunkového analyzátora CEDEX XS.
- Kultivácia primárnej kultúry UTEC – viď protokol 02a/2025
- Kultivácia buniek komerčnej línie UTEC - kultivačné postupy odporúčané dodávateľom UTEC línie.

2. Spracovanie ejakulátu

- Kolekcia ejakulátu samoodberom – masturbáciou, do sterilnej skúmavky. Spracovanie do 2 hodín po odbere. Ejakulát sa nechá skvapalniť pri izbovej teplote (20-30 minút). V prvom kroku je ejakulát purifikovaný prostredníctvom Sperm Washing Medium (21 mM HEPES + 4 mM hydrogénuhličitan sodný). Izolácia spermií pomocou gradientu hustoty a swim-up metódou.
- Pomocou aseptickej techniky prenesieme skvapalnený ejakulát do sterilnej 10 ml kónickej skúmavky na odstreďovanie a pridáme 2 až 3 objemy Sperm Washing Medium zohriateho na izbovú teplotu (napríklad 2 ml vzorky ejakulátu si vyžaduje 4 až 6 ml média). Ak je objem zmesi spermií s médiom väčší než 5 ml, rozdelíme ho do dvoch sterilných skúmaviek. Minimalizáciou objemu v každej skúmavke na 4 – 6 ml sa maximalizuje výťažok spermií.

- Skúmavky centrifugujeme pri okolitej teplote 10 minút - 200 – 300 x g.
- Následne po centrifugácii odstránime pomocou sterilnej pipety aspiráciou supernatantu nachádzajúci sa nad „peletou spermií“. Spermie sa potom resuspendujú jemným poklepaním skúmavky zvonka ukazovákom.
- Počet spermií v 1 ml vyrátame pomocou Maklerovej komôrky. Následne vzorku nariedime, aby sme dostali približný počet 1000 – 1500 spermií na jednu jamku (6-jamková platňa).

3. Ko-kultivácia UTEC so spermiami v monovrstve

- Kultivácia buniek prevedená podľa kultivačných postupov odporučených dodávateľom komerčnej UTECs línie, alebo podľa protokolu na kultiváciu primárnych kultúr.
- Vysejeme určený počet spermií do 6-jamkovej platne na už kultivované UTEC, pričom konfuencia UTEC by mala byť približne 70%.
- Ko-kultúru inkubujeme v určených časových intervaloch.

4. Analýza vzoriek

- UTECs a spermie – ko-kultivácia štandardnými postupmi a v časových odstupoch (0 h–3 h–6 h) a analýza expresie vybraných markerov.
- Po ko-kultivácii stanovujeme viabilitu spermií a UTECs pomocou MTT Cell Viability Assay a génovú expresiu imunitných markerov UTECs pomocou real-time PCR. Analýza expresie povrchových markerov UTECs je vykonaná aj prietokovou cytometriou, pričom získané údaje sú analyzovaná systémom MACS Quant Analyzer 10. Získané výsledky vyhodnocujeme v spolupráci s I. gynekologicko-pôrodníckou klinikou LF UK a UN Bratislava a IVF klinikou ISCARE za účelom analýzy možností aplikácie do klinickej praxe.