

Áramlási citometria használata az andrológiában

Infertilitási vizsgálatok támogatása

Dr. Mikus Endre

Dr. Hajnal Ágnes

Dr. Szabó Ferenc

Nagy Melinda

Bevezető

Gyulladásos sejtek és cytokinek

DNS fragmentáció és a szabadgyökök

Akroszóm reakció

2016.12.02.

Áramlási cytometria

Bevezetés 1/4

- **Az áramlási cytometria szuszpenziók gyors, multiparaméteres vizsgálatára szolgáló módszer**

■ **Alkalmas:**

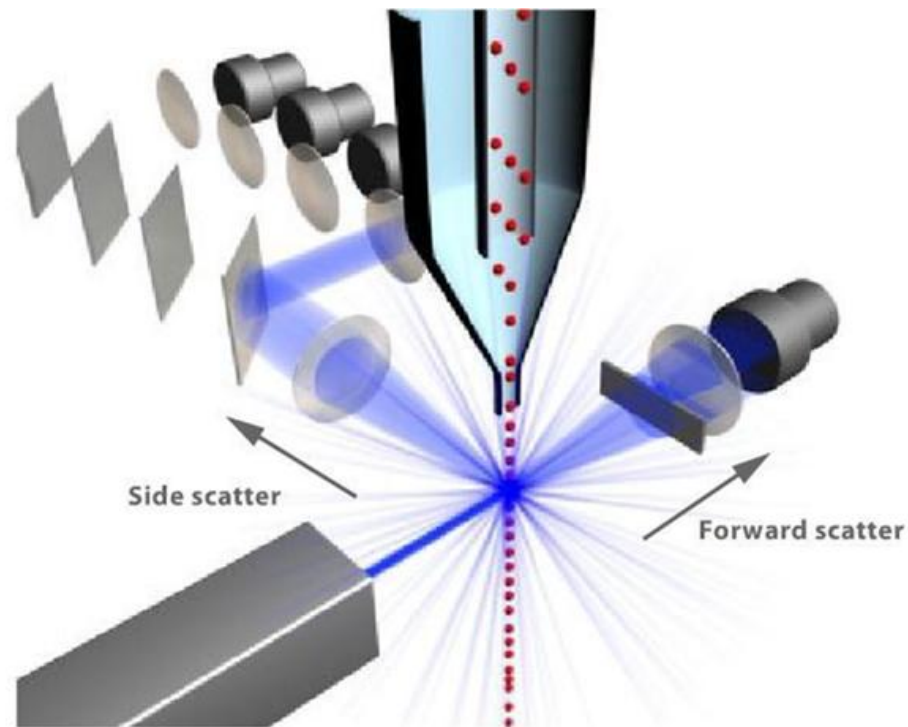
- **Sejtpopulációk elkülönítésére** (alak, fényszórás, antitest kötött fluorokrómok stb. alapján)
- **Sejtek funkcionális állapotának a meghatározására** (élő, apoptotikus, halott, osztódási állapot, citotoxikus kapacitás stb.)
- **Testfolyadékokban található fehérjék** (elsősorban gyulladásos) azonosítására és kvantitatív mérésére

Áramlási cytometria

Bevezetés 2/4

A műszer 3 fő egysége:

- Folyadék rendszer
- Optikai rendszer
- Elektromos rendszer



- **Előnye:** egy mintából sok, specifikus, kvantitatív adat, logikai csoportokba rendezve

Áramlási cytometria

Bevezetés 3/4

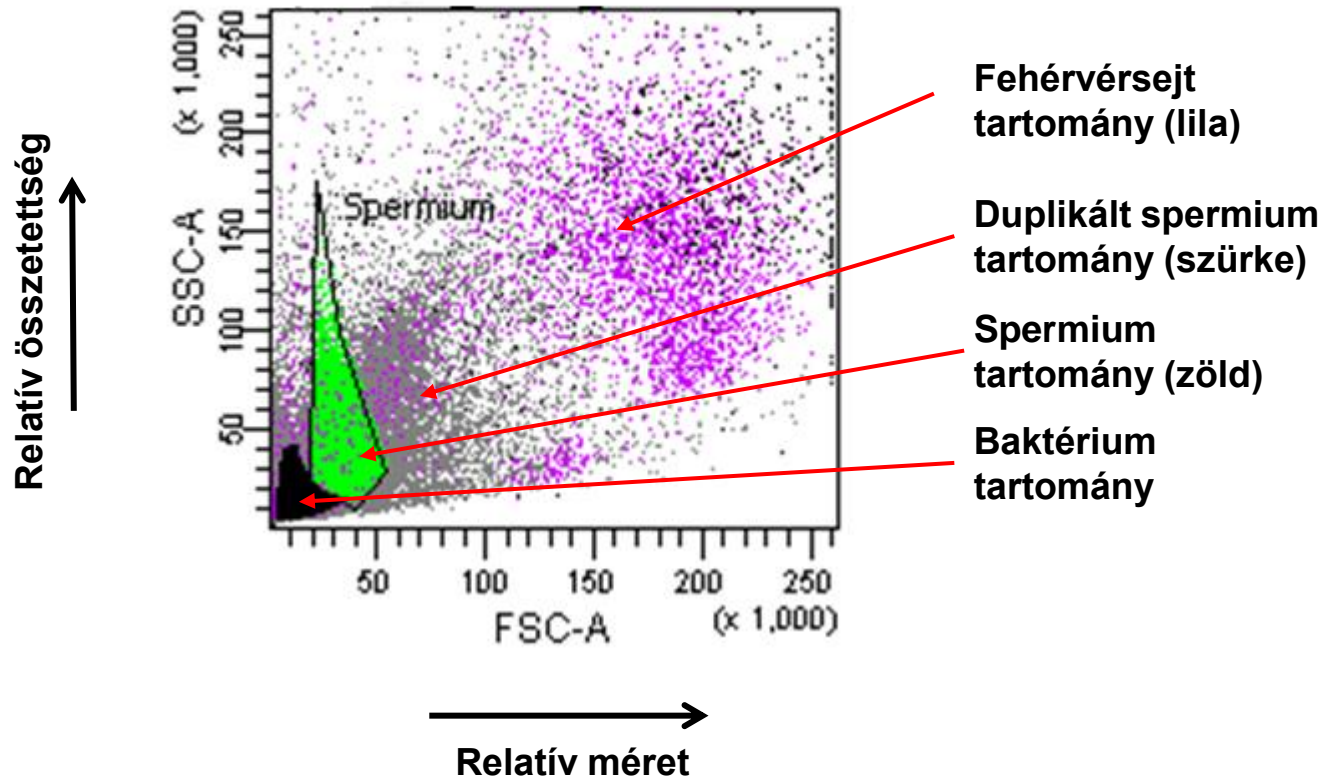
■ Andrológiai alkalmazhatóság:

- **Spermium szám és életképesség** meghatározás, akár több tízezer spermium analízise alapján
- **Gyulladásos sejtek** (granulociták, limfociták alpopulációi pl: T sejt, B sejt, NK sejt stb.), monocita/makrofág azonosítása és megszámlálása
- **Baktériumok azonosítása** (*amennyiben antitest kötött fluorokróm kapható pl. E. coli*)
- **Oldott anyagok azonosítása** és kvantitatív meghatározása (citokinek, kemokine és egyéb proteinek) mesterséges „*részecskékkel*” , úgynevezett „*bead array*”-vel

Áramlási citometriás ondó kép

Bevezetés 4/4

Humán ondó



GYULLADÁS



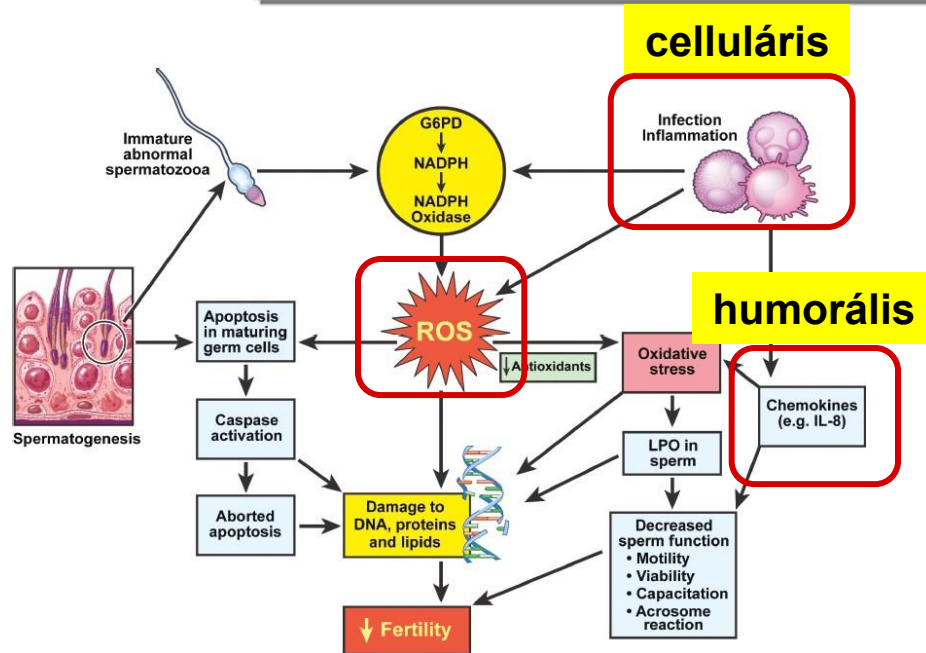
<i>English</i>	<i>Greek/Latin</i>	<i>Caused By</i>
<i>Redness</i>	<i>Rubor</i>	<i>Hyperaemia</i>
<i>Warmth</i>	<i>Calor</i>	<i>Hyperaemia</i>
<i>Swelling</i>	<i>Tumor</i>	<i>Increased permeability</i>
<i>Pain</i>	<i>Dolor</i>	<i>Low pH</i>
<i>Loss of function</i>	<i>Functio laesa</i>	<i>Pain, swelling</i>

8

Celluláris és humorális összetevők

Gyulladás

Sejtes+humorális+ROS



Kiváltó okok

- Fertőzés (bakteriális, vírusos)
- Varicocele
- Sérülés
- Daganat

Eredmény spermium szempontjából:

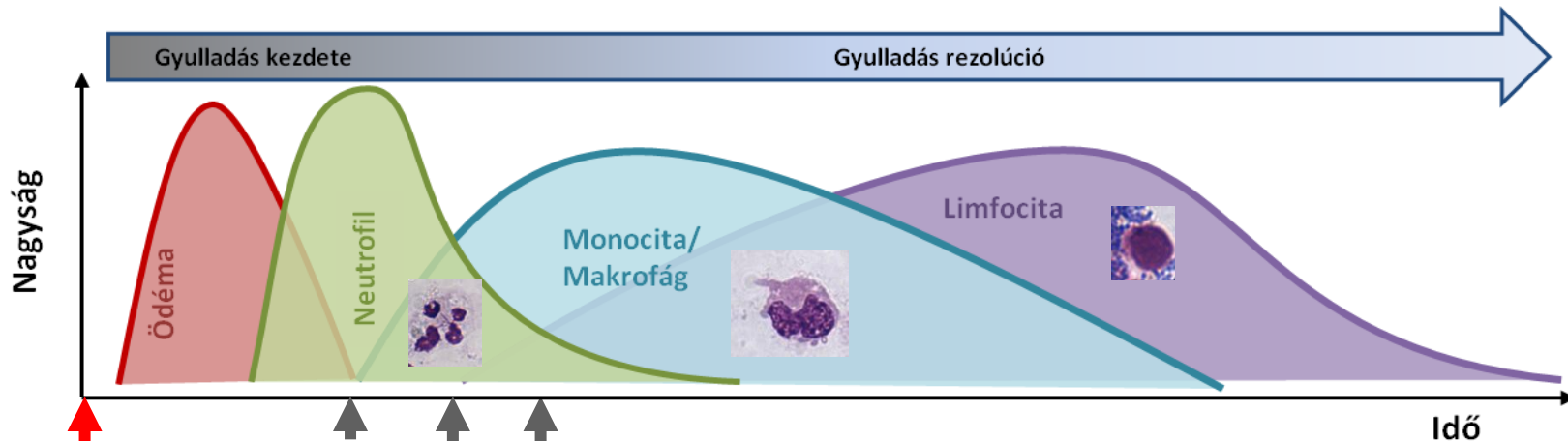
- Csökkent spermium szám
- Rossz morfológia
- Csökkent funkcionális válasz

<https://doctor4patient.wordpress.com/2012/07/21/medical-treatment-of-oligoasthenoteratozoospermia/>

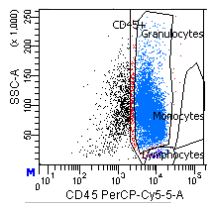
Fertilitási képesség ↓

Gyulladás

Celluláris komponens

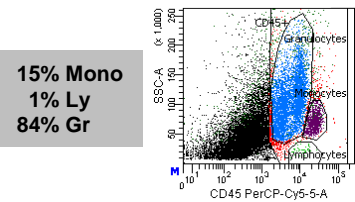
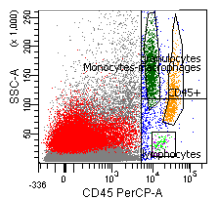


Gyulladást kiváltó ok



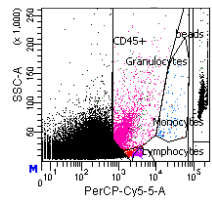
0% Mono
2% Ly
98% Gr

37% Mono
7% Ly
56% Gr



15% Mono
1% Ly
84% Gr

Kezelés



WHO guideline:
>1 × 10⁶ peroxidáz poz. sejt/mL

Granulocita egy a többi leukocita közül!

2.18 Assessment of leukocytes in semen

Leukocytes, predominantly polymorphonuclear leukocytes (PMN, neutrophils), are present in most human ejaculates (Tomlinson et al., 1993; Johanisson et al., 2000). They can sometimes be differentiated from spermatids and spermatocytes in a semen smear stained with the Papanicolaou procedure (see Section 2.14.2).

Fő leukocita a granulocita

There are several other techniques for quantifying the leukocyte population in semen. As peroxidase-positive granulocytes are the predominant form of leukocytes in semen, routine assay of peroxidase activity is useful as an initial screening technique (Wolff, 1995; Johanisson et al., 2000) (see Section 2.18.1).

Peroxidáz pozitív sejtek

Leukocytes can be further differentiated with more time-consuming and expensive immunocytochemical assays against common leukocyte and sperm antigens (Homyk et al., 1990; Eggert-Kruse et al., 1992) (see Section 3.2).

Immunohisztokémia

3.2 Panleukocyte (CD45) immunocytochemical staining

Polymorphonuclear leukocytes that have released their granules, and other species of leukocyte, such as lymphocytes, macrophages or monocytes, which do not contain peroxidase, cannot be detected by the o-toluidine test for cellular peroxidase (see Section 2.18.1), but can be detected by immunocytochemical means. Immunocytochemical staining is more expensive and time-consuming than assessing granulocyte peroxidase activity, but is useful for distinguishing between leukocytes and germ cells.

Immunohisztokémia (áramlási citometria)

3.2.1 Principle

All classes of human leukocytes express a specific antigen (CD45) that can be detected with an appropriate monoclonal antibody. By changing the nature of the primary antibody, this general procedure can be adapted to allow detection of different types of leukocyte, such as macrophages, monocytes, neutrophils, B-cells or T-cells, should they be the focus of interest.

T sejt, B sejt, monocita, makrofág...

Gyulladás

Összefüggések

- Nincs korreláció a granulocita elasztáz, a peroxidáz pozitív sejtek és a „kerek” sejtek száma között.
- A peroxidáz pozitivitás meghatározása nem megbízható indikátora az ondóban található leukocitáknak.
- A peroxidáz teszt nem ad információt a gyulladásos citokinek/kemokinek mennyiségére.
- **A peroxidáz negativitás nem zárja ki a genitális traktus „rejtett” és/vagy steril gyulladásának a fennállását.**

Rev Med Chil. 2003 Jun;131(6):613-6. [Fertil Steril](#). 1992 Dec;58(6):1260-2.

Gyulladás



- Miben segít az áramlási citometria?

Gyulladás

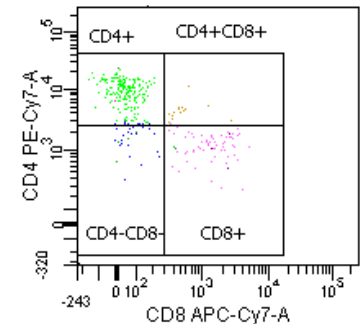
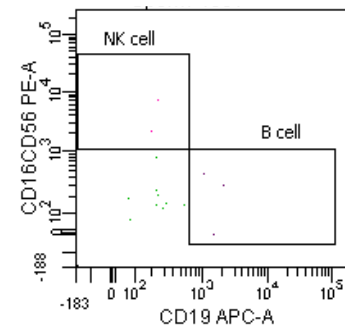
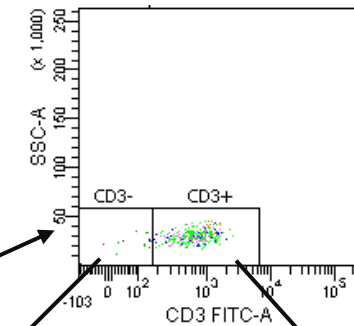
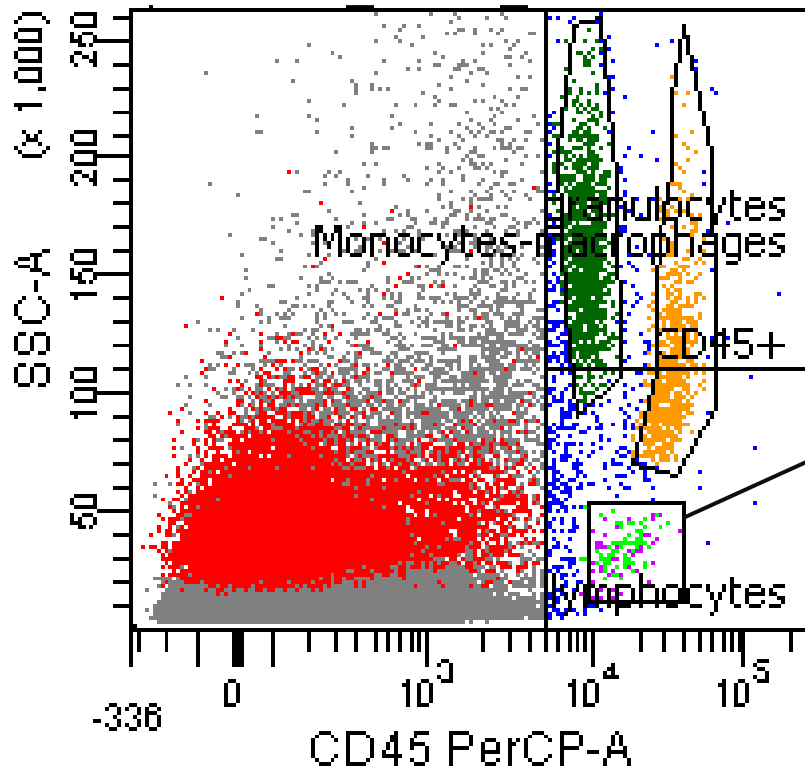
• Áramlási citometria akár egy lépésben

- Leukociták pontos száma és azonosítása felületi markerek alapján. Kiváltja az immunhisztokémiát.
- Gyulladásra jellemző fehérjék kimutatása
 - Multiplex lehetőség= egy mintából egyszerre több, akár 30 citokin és kemokin kvantitatív meghatározása
- Szabad gyök tartalmú sejtek pontos beazonosítása
- Baktériumok jelenléte
- Élő, apoptotikus és elpusztult sejtek kimutatása

Gyulladás

Nemcsak granulociták!

Limfocita alpopulációk elkülönítése

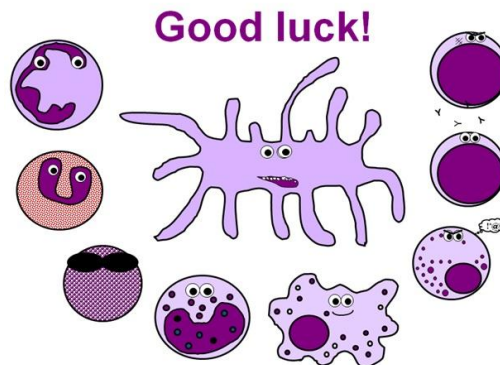


A limfocita alpopulációk szétválaszthatók

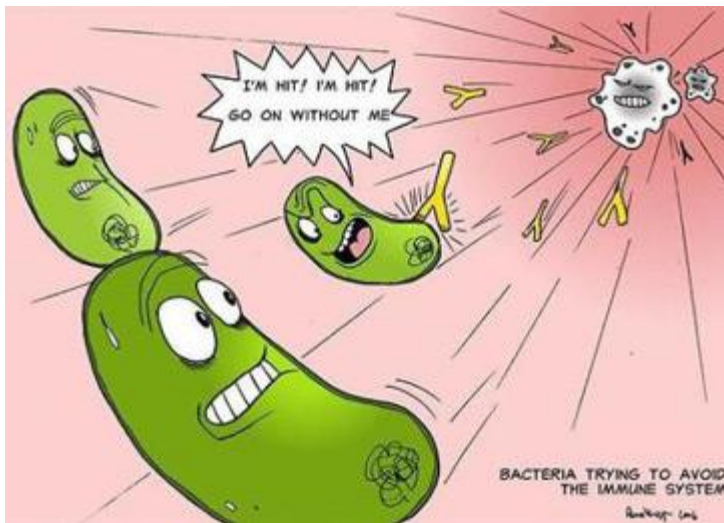
Gyulladás

Miért nem elég a peroxidáz teszt?

- A ondófolyadékban található leukociták összetétele és az általuk termelt „proinflammatorikus” anyagok hatnak a spermatogenezisre és az embrió implantációra.
- A beteg leukospermia kezelés eredményességének a leméréséhez hasznos a részletes analízis. *Pl. monociták megjelenése jele a gyulladás csökkenésének.*

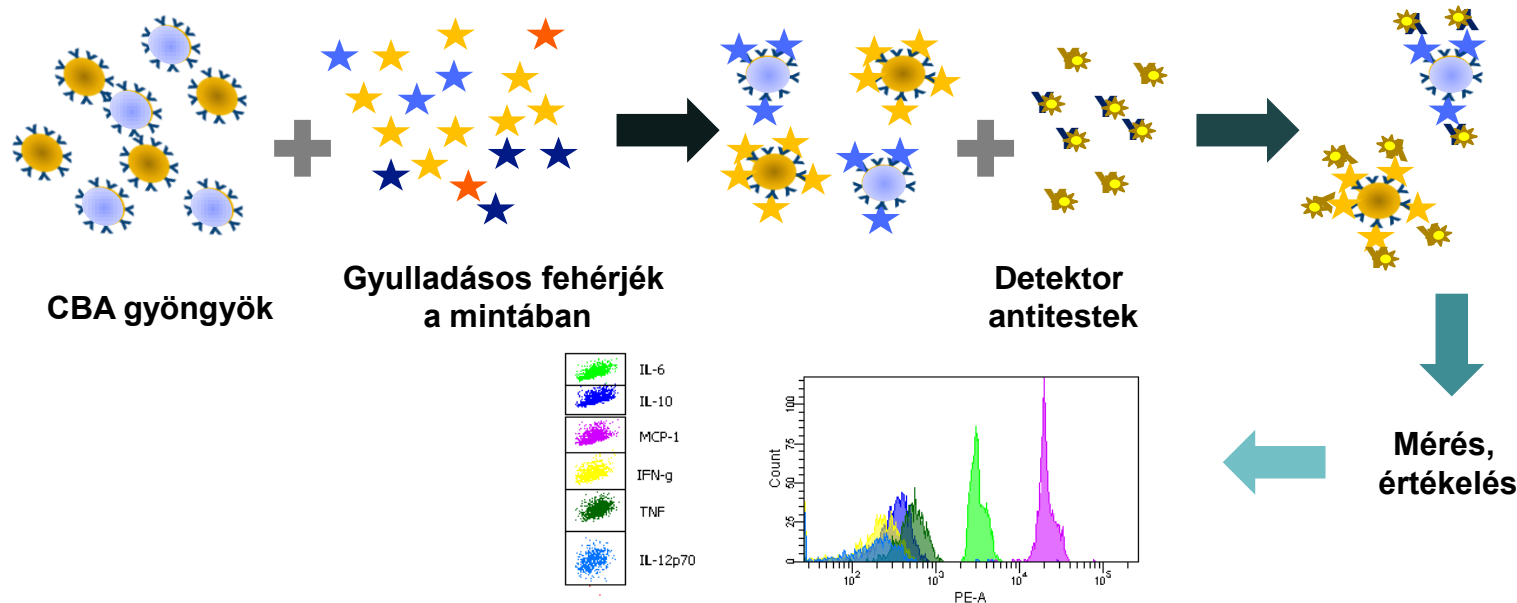


Humorális komponensek



Cytokinek meghatározása áramlási cytométerrel

Cytomeric Bead Array



- **Mesterséges gyöngyök felületéhez kötött antitestekkel kvalitatív és kvantitatív fehérje meghatározás lehetséges**
- **Sok citokine egyidejű vizsgálatát is lehetővé teszi – képzelet szab határt**
- **Kis minta mennyiség**
- **Nagy érzékenységű módszer**
- **IL-6 és IL-8 mérés**

Citokinek

- Gyulladásos sejtek alacsony száma, esetleg hiánya, nem jelenti azt, hogy a gyulladást kizárhatjuk.
- Alacsony gyulladásos sejt koncentráció az ondóban ($0,315 \times 10^6$ sejt/mL gyulladás detektálása), de magas IL-6 és IL-8 mennyisége: **szöveti gyulladást jelez.**

(Artin Aghazarian et al., Evaluation of Leukocyte Threshold Values in Semen to Detect Inflammation Involving Seminal Interleukin-6 and Interleukin-8. *Urology*; <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2015.04.012>)

Szakirodalmi referencia tartomány:

IL-6 koncentráció az ondóplazmában	Magas	>30	pg/mL
	Emelkedett	15-30	pg/mL
	Normál	<15	pg/mL
IL-8 koncentráció az ondóplazmában	Magas	>2000	pg/mL
	Emelkedett	1000-2000	pg/mL
	Normál	<1000	pg/mL

LabMagister referencia tartomány:

IL-6 koncentráció az ondó plazmában	Magas	> 20,3	pg/mL
	Emelkedett	8,8 - 20,3	pg/mL
	Normál	< 8,8	pg/mL
IL-8 koncentráció az ondó plazmában	Magas	> 1931,9	pg/mL
	Emelkedett	788,9 - 1931,9	pg/mL
	Normál	< 788,9	pg/mL

Eggert-Kruse, Waltraud et al.: Relationship of seminal plasma interleukin (IL)-8 and IL-6 with semen quality
Human Reproduction Vol.16, No.3 pp. 517-528, 2001

Fiziológiás és patológiás szerep IL-6

Normál/ Fiziológiás szerep:

- Leukociták mellett Leydig és Sertoli sejtek is termelnek proinflammatorikus citokineket (TNF; INFs; IL-1; IL-6)
- spermatogenezis elindítása és a spermiumok fejlődése, érése
- Sertoli sejtekre: tesztoszteron szintézis
- Prostatata szintén termel IL-6.
- ..

Fertőzésben/ gyulladásban szerep:

- B ill. T sejteket aktiválja és elősegíti a differenciálódásukat



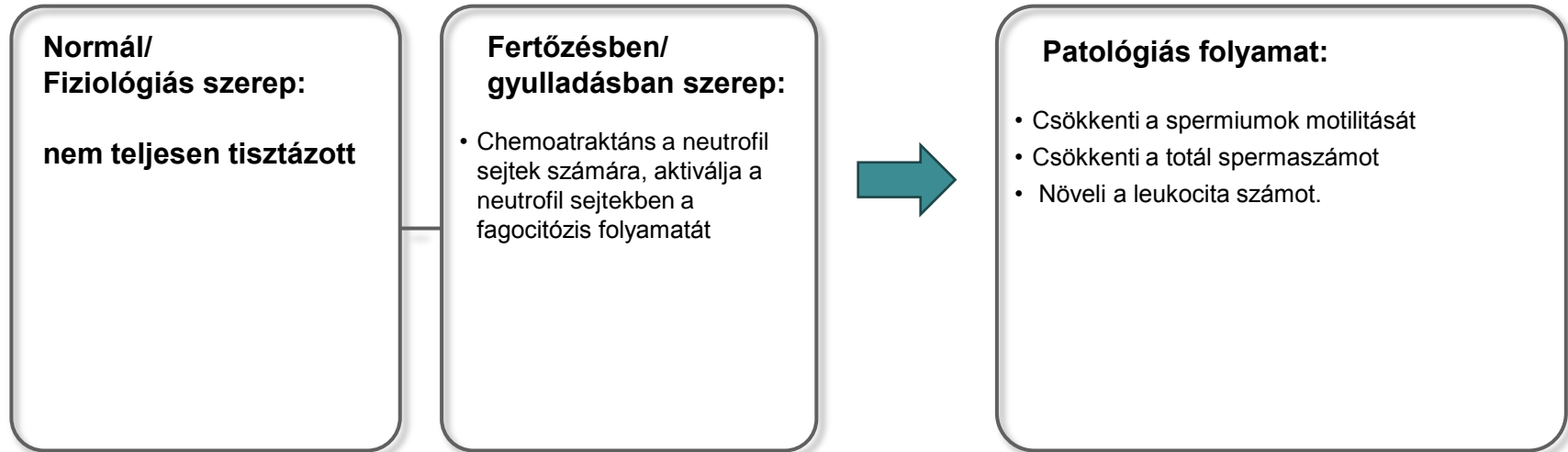
Patológiás folyamat:

- Csökkenti a spermium számot
- Csökkenti a progresszív motilitást
- Negatívan hat a morfológiára, a sejtek vitalitására
- Korreláció a IL-6 szint és a leukocyták száma között leukocytospermiás páciensekben.
- Növeli a nitrogén és oxigén gyökök mennyiségét és csökkenti a totál antioxidáns kapacitást.
- Spermium membrán lipidek peroxidációja – membrán fluiditás megváltozás!

**Alacsony koncentrációban: fiziológiás
elengedhetetlen a spermium fejlődéséhez**

**Magas koncentrációban: patológiás
károsító hatású**

Fiziológiás és patológiás szerep IL-8



**Alacsony koncentrációban:
szerepe nem ismert**

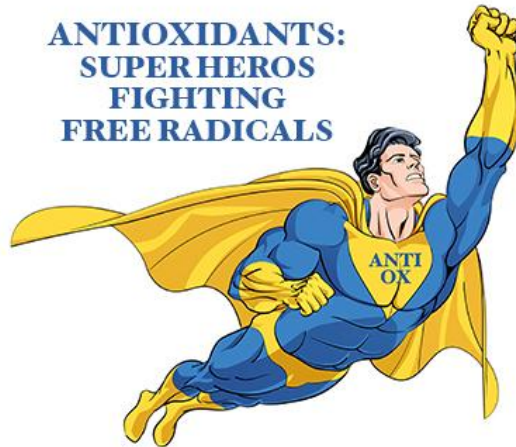
**Magas koncentrációban: patológiás
károsító hatású**

Összefoglaló

- Az ondó plazmában a gyulladásoos sejtek **3 fő csoportjának** (granulocita, limfocita és monocita/makrofág) **mindegyike** jelen van a gyulladásoos állapot során.
- **Rejtett gyulladásoosok** esetén az ondó plazmában a gyulladásoos sejtek száma alacsony, a citokineké magas.
- Rejtett gyulladásoosok kimutatására alkalmas módszer a seminális plazmában való **IL-6/IL-8** citokin mérés

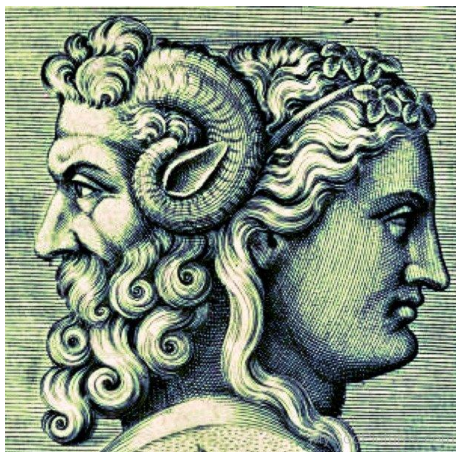
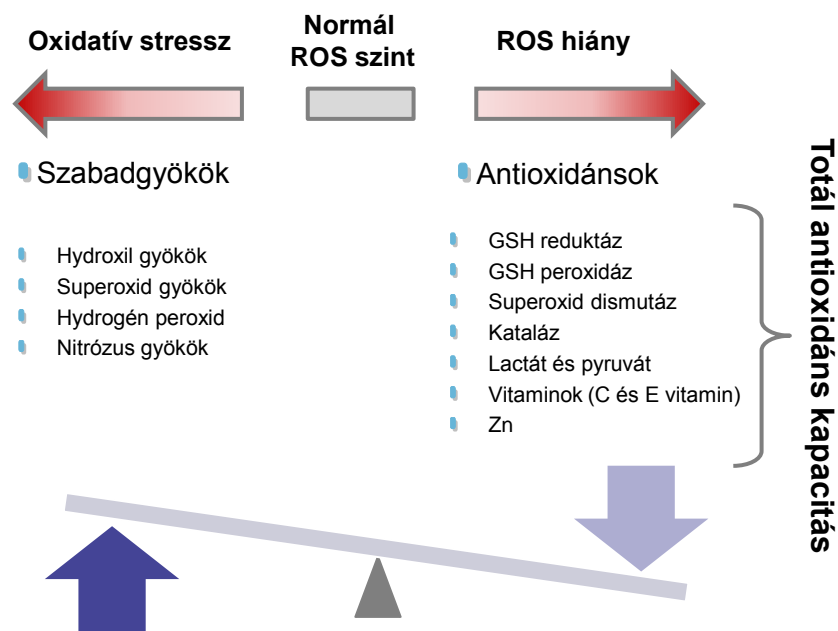
SZABADGYÖKÖK ÉS A DNS FRAGMENTÁCIÓ

ANTIOXIDANTS:
SUPERHEROS
FIGHTING
FREE RADICALS

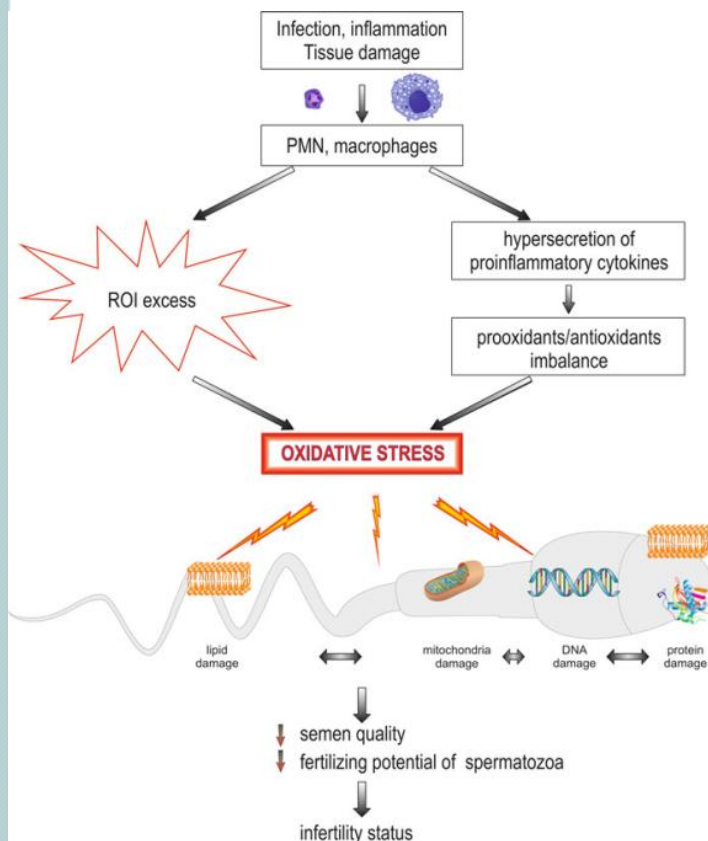


Redox egyensúly

**Kis mennyiségben elengedhetetlen,
Nagy mennyiségben károsító hatású**



Szabadgyökök az ondóban

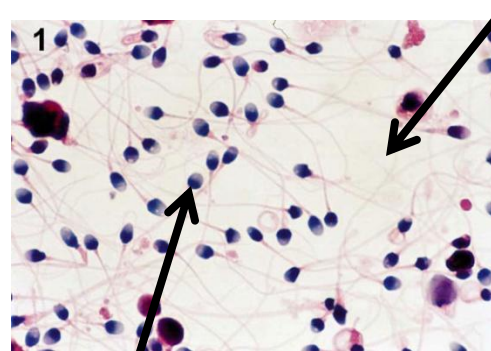
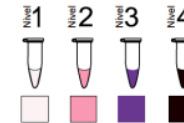


- Fiziológiásan a spermium normális fejlődéséhez, és funkciójához kis mennyiségben elengedhetetlen (mozgás, kapacitáció és akroszóma reakció → fertilitás folyamatához).
- Számos faktor hozzájárul a szabadgyök megnövekedéséhez:
 - Környezeti/ életvitel (drog/gyógyszer, dohányzás, szennyezés)
 - Patológias folyamatok a férfi szaporító szervben,
 - Szisztémás patológias folyamatok
- Megnövekedett oxidatív gyökök 30-80%-ban felelősek a férfi infertilitásért.

Szabadgyökök

Gyorsteszték

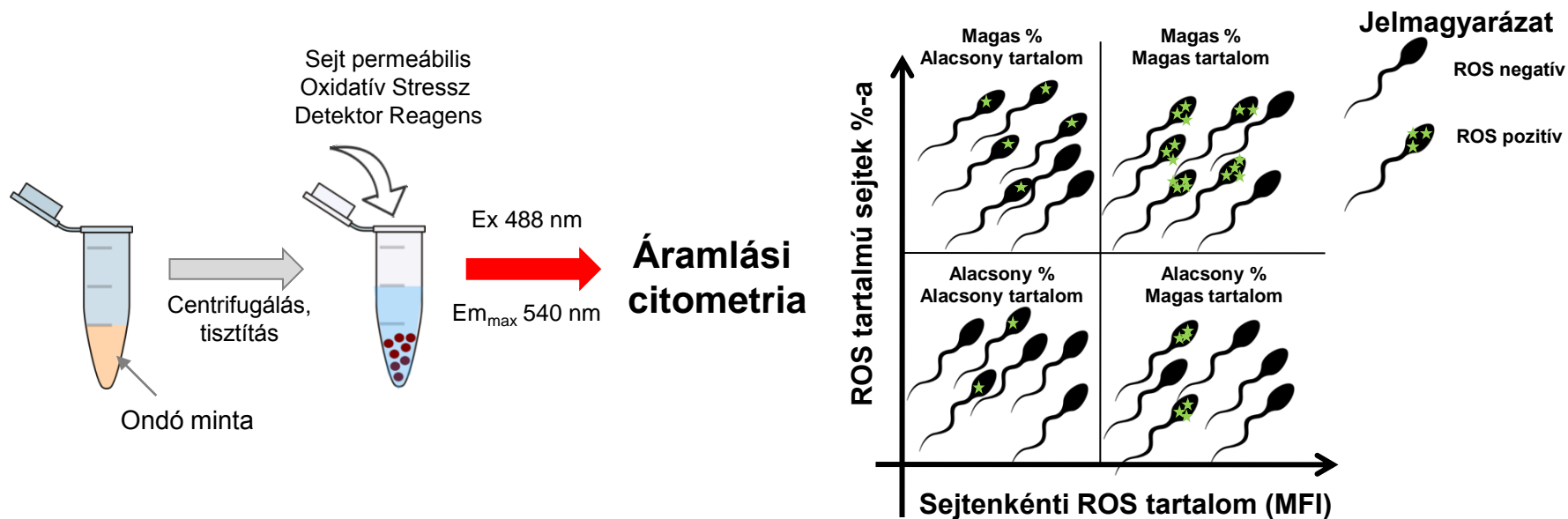
- Szabadgyökök az ondó plazmában
- Szemikvantitatív megközelítés



Áramlási citometria

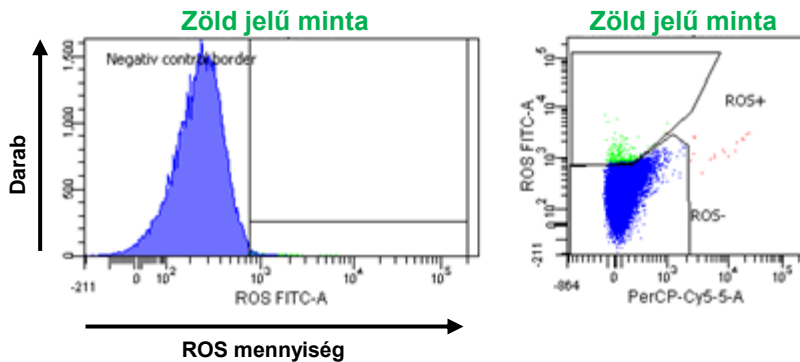
- Szabadgyököket tartalmazó spermiumok pontos száma/százaléka
- Szabadgyökök mennyisége a spermiumokban

Szabadgyökök Mérés menete



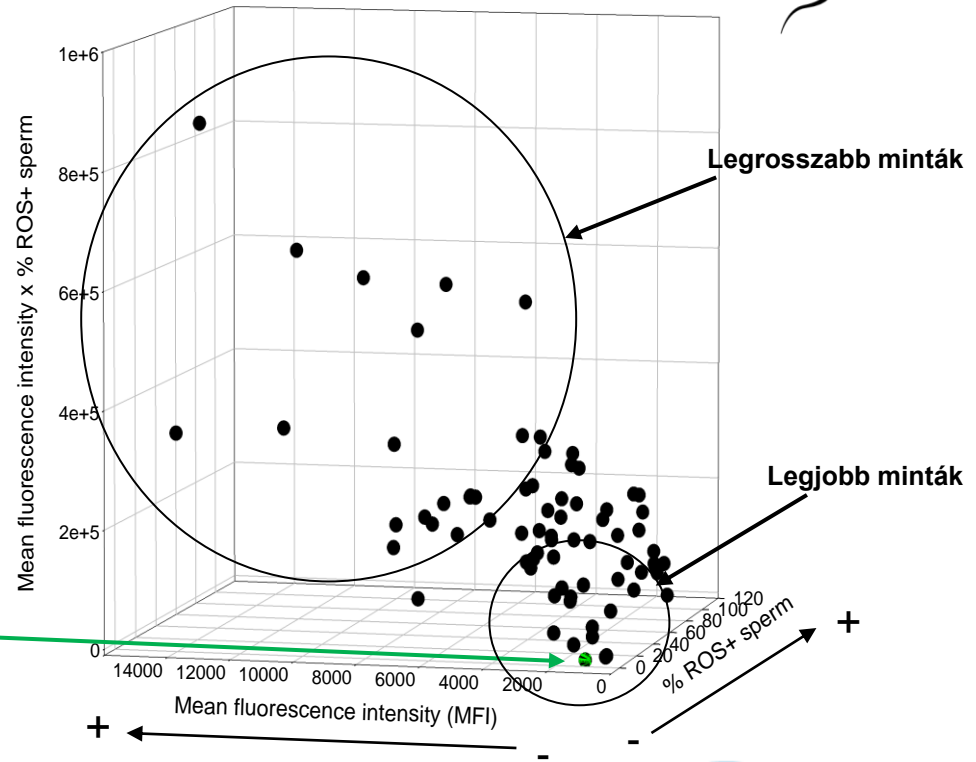
- ➔ **Total ROS meghatározás a spermiumon belül standard zöld detekciós tartományban**
- ➔ **Széles skálán detektálja oxigén és nitrogén gyököket (többek között: hidrogén peroxid, peroxinitrit, hidroxil gyökök, stb...)**
- ➔ **Nem detektálja a szuperoxid gyököt, reaktív klorid és bromid gyököt.**
- ➔ **Értékelés: a sejtek hány %-a érintett ill., mennyi a ROS tartalom az egyes sejtekben (fluoreszcencia intenzitás).**

Alacsony szabadgyök tartalmú minta



- Alacsony % ROS sejtenként (0.5%)
- Alacsony MFI (1086)

Szabadgyök paraméterek közötti kapcsolat

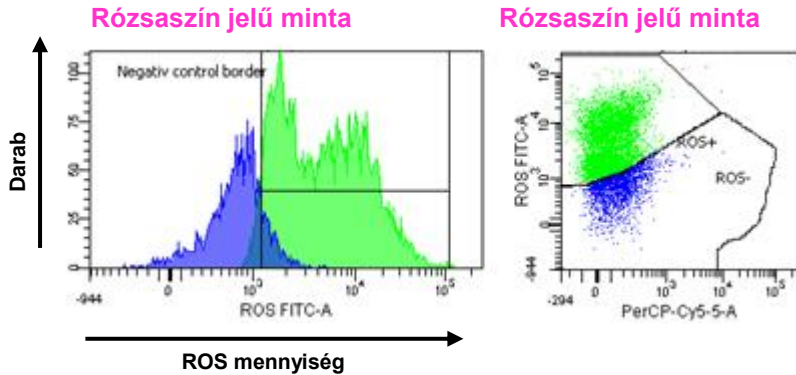


Z = % ROS tartalom
 X = Sejtenkénti szabadgyök tartalom
 Y = Súlyozott ROS érték (% × sejtenkénti ROS)

Zöld jelű minta

Kiváló minőségű minta ROS vonatkozásban

Magas szabadgyök tartalmú minta



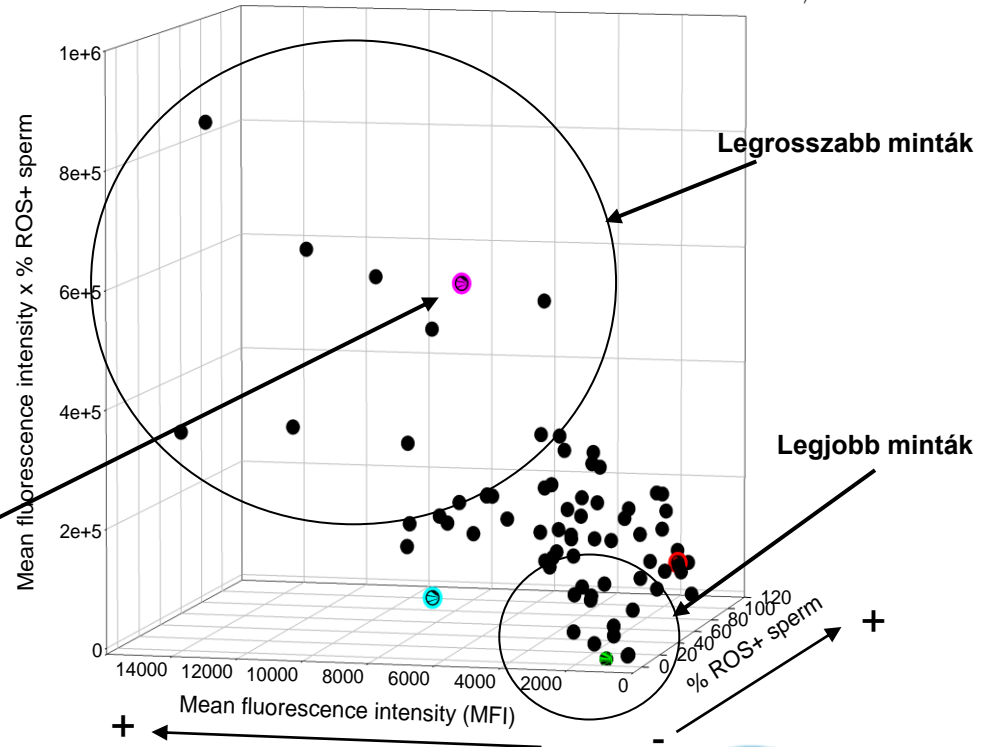
Z = % ROS tartalom
 X = Sejtenkénti szabadgyök tartalom
 Y = Súlyozott ROS érték (% × sejtenkénti ROS)

Rózsaszín jelű minta

Igen rossz minőségű minta ROS vonatkozásban

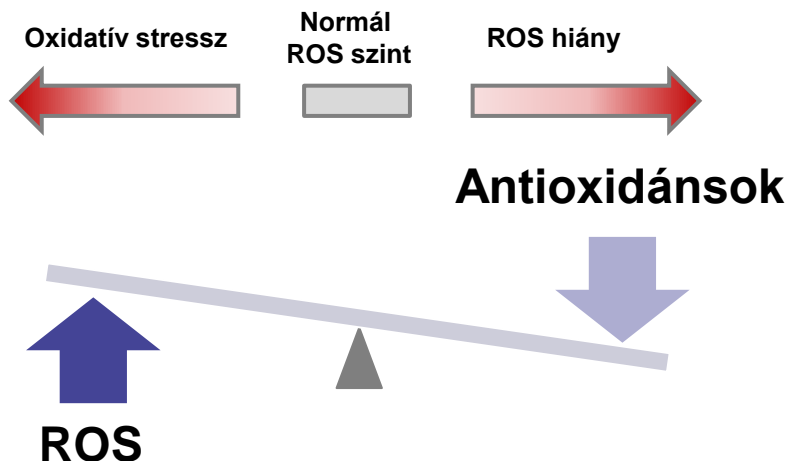
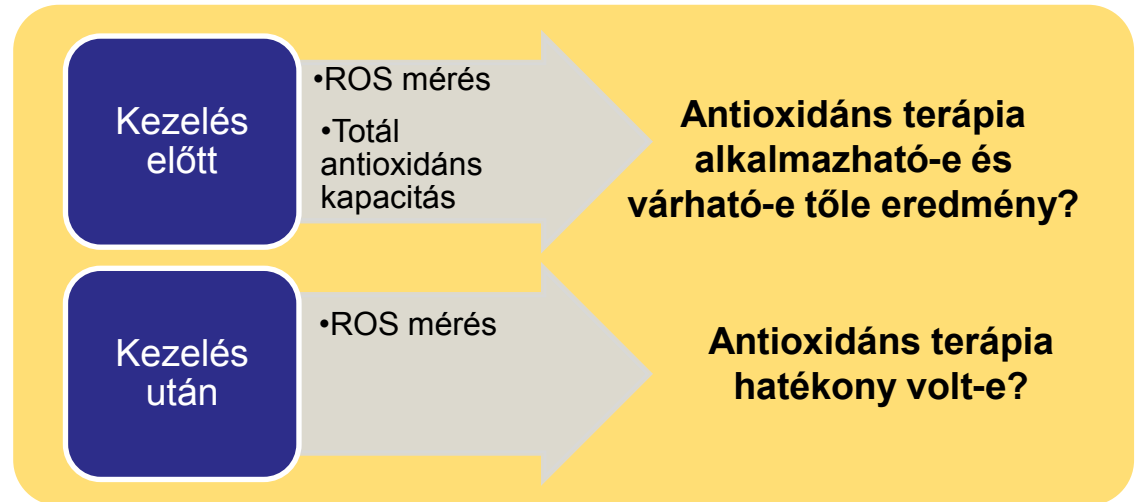
- Magas % ROS+ (73.7%)
- Magas MFI (7609)

Szabadgyök paraméterek közötti kapcsolat



Oxidatív státus – Antioxidáns kezelés

**Túl sok a jóból?
Nil nocere**



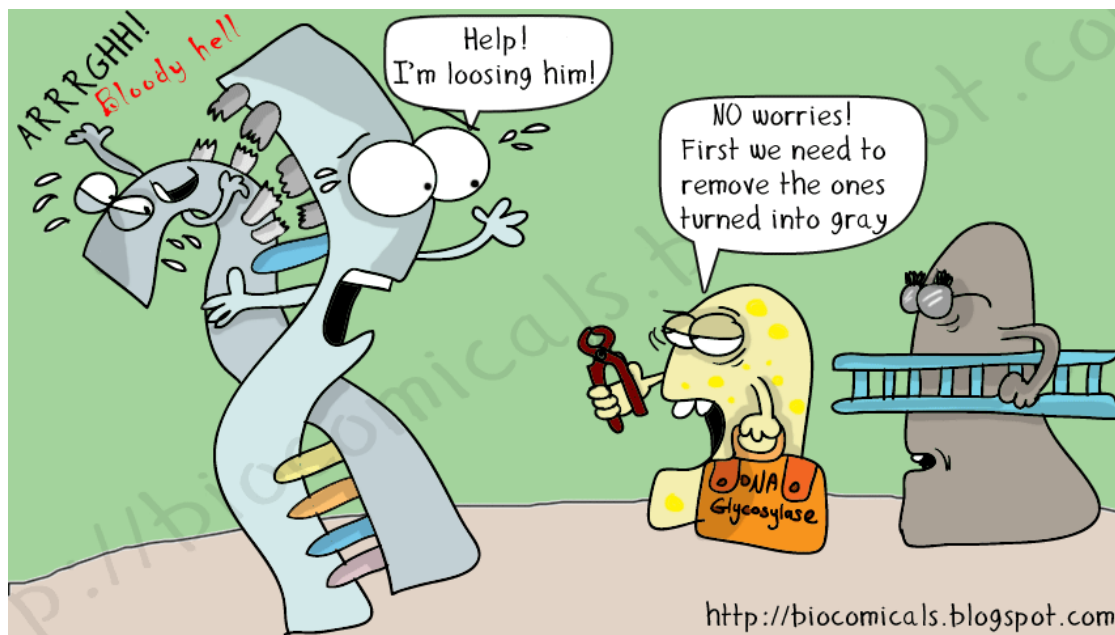
Antioxidáns paradoxon
ROS ↔ Total Antioxidáns Kapacitás

Összefoglalás

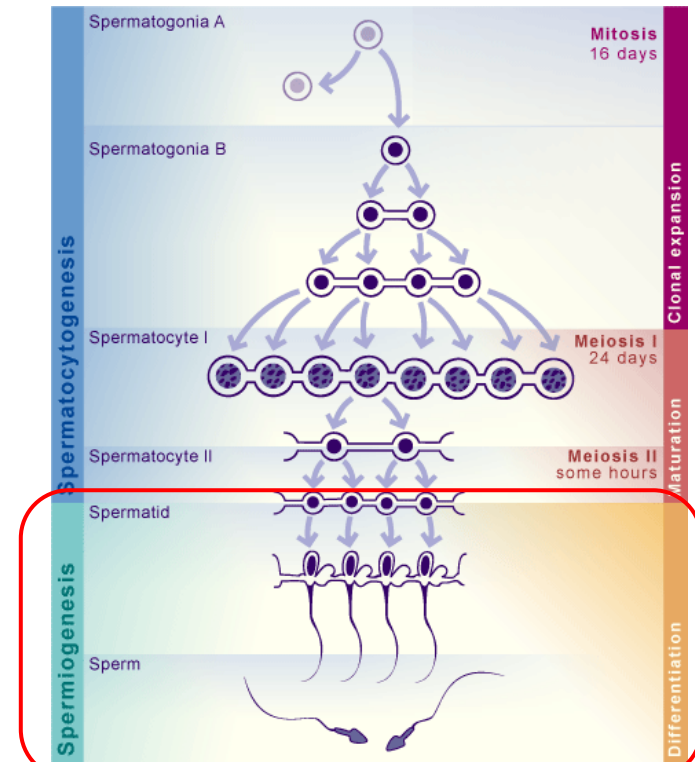
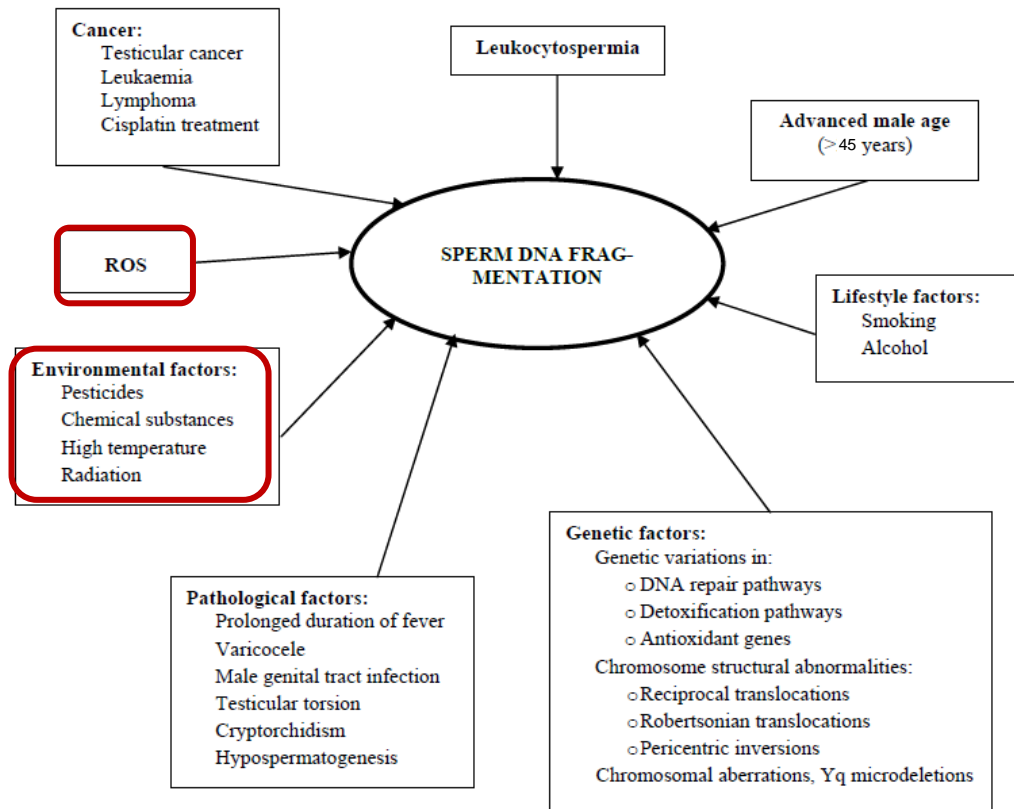
- Kis mennyiségű szabadgyök elengedhetetlenül szükséges a normális spermium fejlődéshez és működéshez
- Férfi infertilitás (~30-80%-ban) egyik oka lehet a magas szabadgyök tartalom.
- Antioxidáns terápia hatásos, olyan pácienseknél
 - Magas a ROS tartalom
 - Alacsony a total antioxidáns kapacitás
- **Ha ez a két paraméter nincs tisztázva, az antioxidáns kezelés károsító lehet.**

DFI-DNS fragmentációs index

DNS ÁLLOMÁNY TÖREDEZETTSÉGE



DNS károsító faktorok

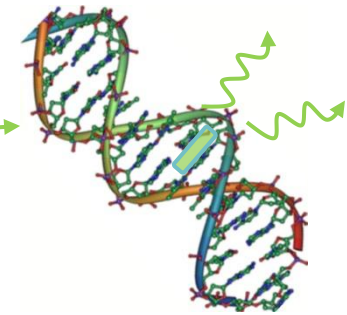


<http://www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato03.html>

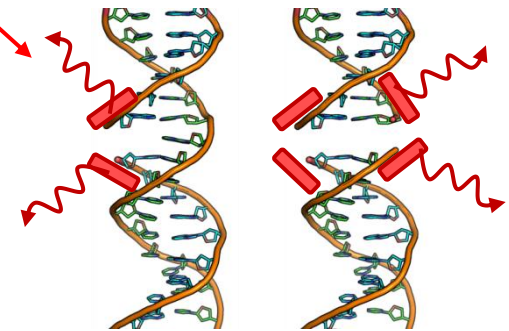
E. Evgeni et al. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters; J. Reprod Infertil, 2014; 15(1):2-14.

DNS fragmentáció Módszer

- ➔ Nem toroidal ss vagy ds DNS törések kimutatására alkalmas
- ➔ Enyhe savas kezelés denaturálja a DNS-t
- ➔ Acridin Orange (AO) festék képes kötődni az ép (dupla szálú) ill. a töredezett (szimpla szálú) DNS lánchoz
- ➔ Eltérő emissziós maximum a kötődés függvényében

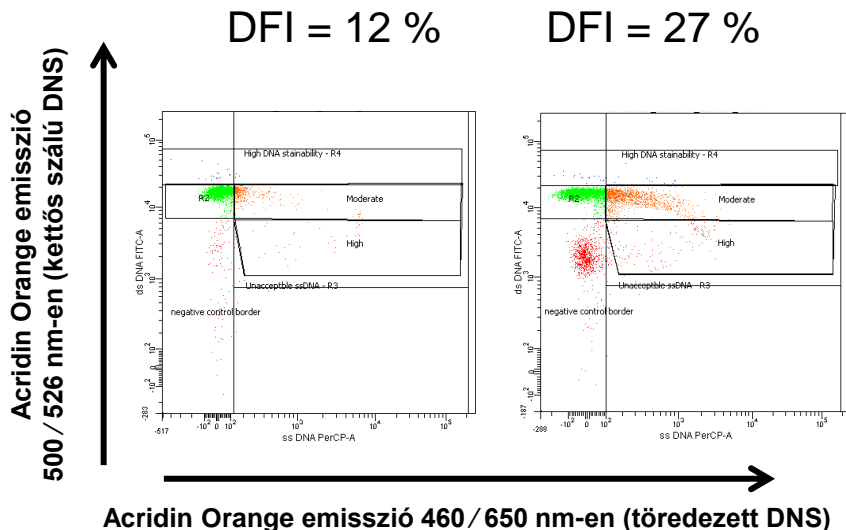


Interkaláció az ép DNS spirálba

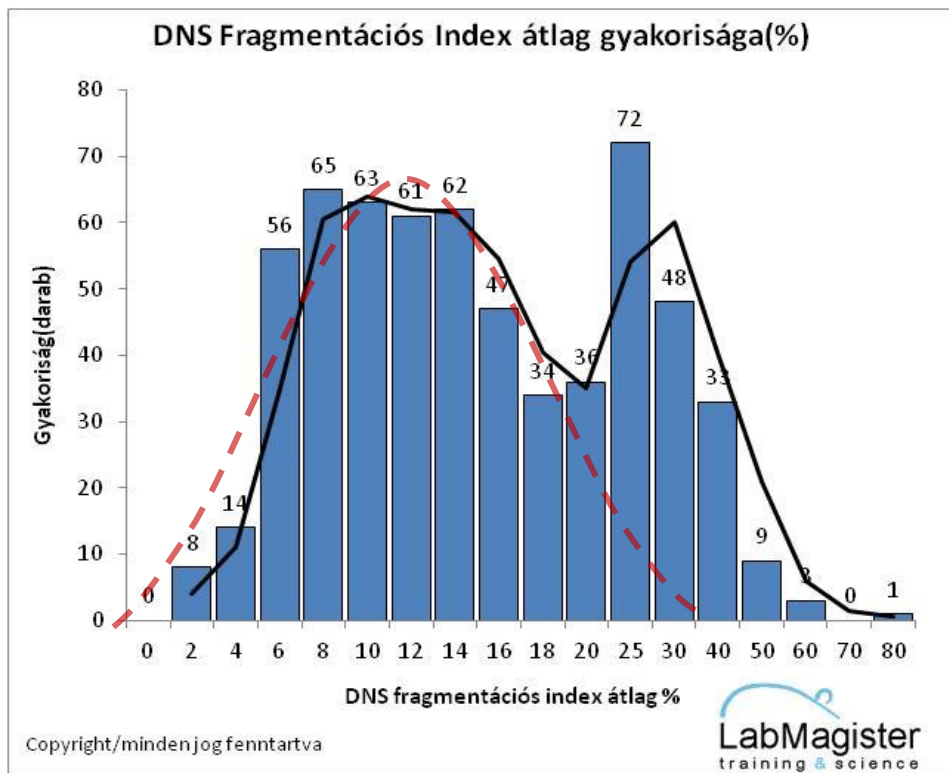


Törések mentén **komplexxépződés**
DNS a cukorláncával

DFI = DNS fragmentációs index



Vizsgált minták populáció megoszlása



Normál eloszláshoz képest
eltolódás –
előválogatás anamnesis
alapján

Átlag %	15,7
SD	10,2
Kvartilis 1	8,4
Medián %	13,1
Kvartilis 3	20,7
N	613

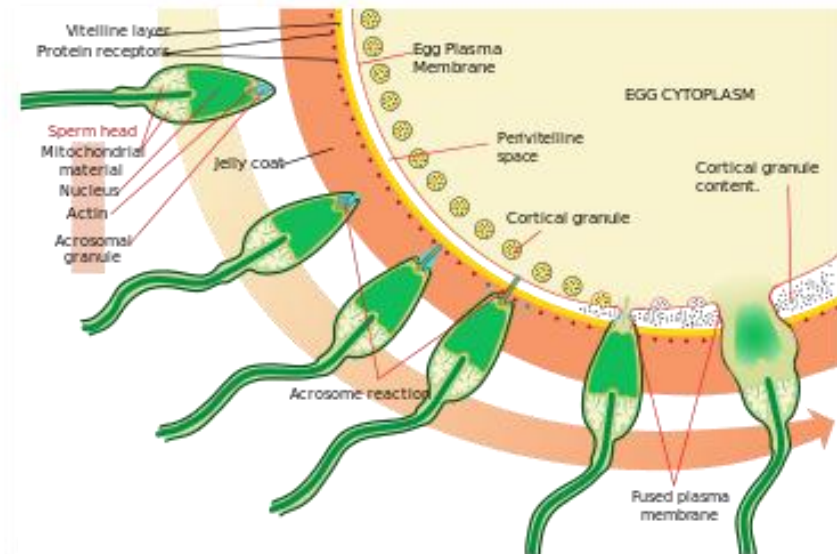
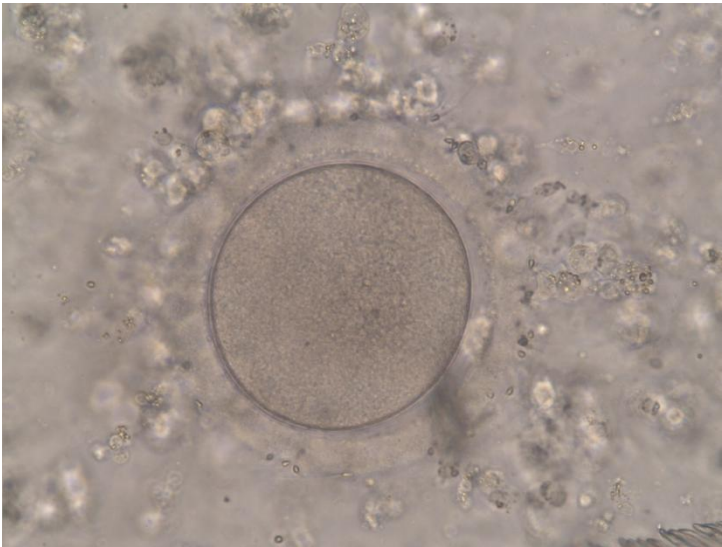
DFI <15% → Spontán

DFI ≥25-30% → Nincs fertil.

Összefoglalás

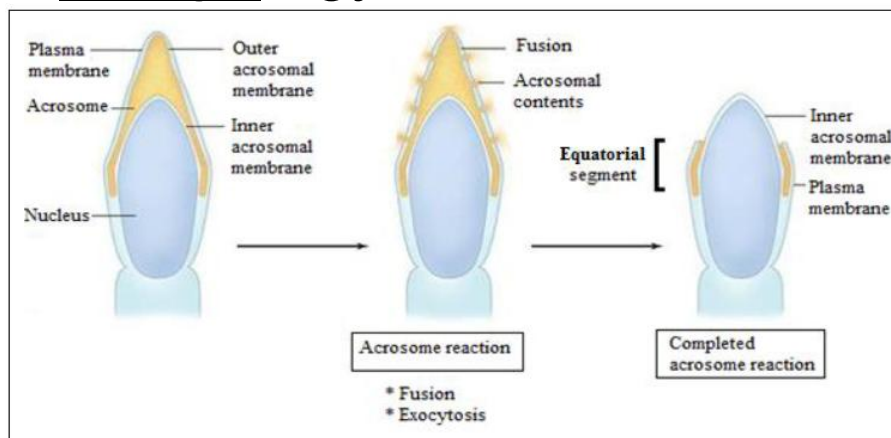
- DFI <15% OK
- DNS állomány töredezettsége infertilitási problémát okoz.
 - Nem történik meg a megtermékenyítés (DFI: $\geq 25-30\%$!!!)
 - Első trimeszterben elhal az embrió (abortusz háttérében a férfi áll)
- Aszisztált reprodukciós eljárások (DFI: 15-25% !) előtt, illetve gyakori vetélések kapcsán a DNS integritását javasolt ellenőrizni.

AKROSZÓMA REAKCIÓ

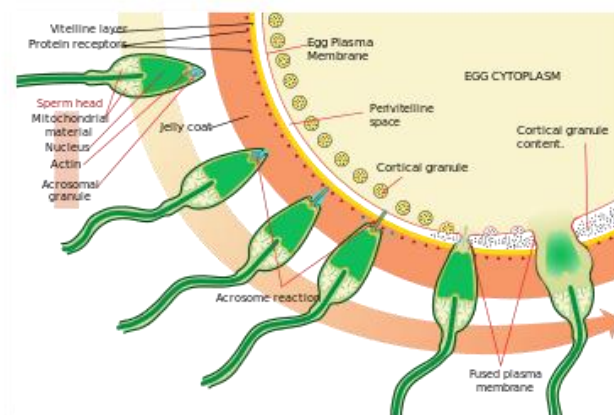


Akroszóma reakció probléma- meddőség összefüggés

- A **korai** akroszóma reakció és/vagy az akroszóma reakció **hiánya** egyik fontos oka a férfi infertilitási problémának.



<https://humanphysiology2011.wikispaces.com/15.+Reproductive+Physiology>



https://en.wikipedia.org/wiki/Human_fertilization

Aktiváció

Akroszóma
Reakció

termékenyítés

Akroszóma reakció probléma- meddőség összefüggés

- IVF beavatkozások során használt **normozoospermiát** mutató mintában a spermiumok csupán **15-40%-a képes** AR, *in vitro* körülmények között
- Az **abnormális AR**-t produkáló spermiumok **33 %-a normozoospermiát** mutat.

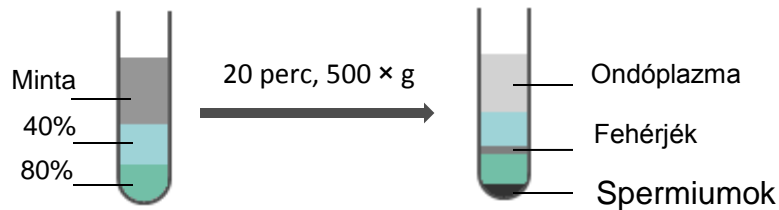
Fenotípus OK
(sejtszám, morfológia)

≠

Funkcionálisan OK
(mozgás, aktiváció, sejt felszíni receptorok,
sejten belüli szignalizációs út)

Akroszóma reakció mérés folyamata

1. Spermiumok szepearálása
sűrűséggrádiens centrifugálással



2. Inkubálás kapacitációt elősegítő
körülmények között:

Spermium szuszpenzió (10^6 db/ml)



3 hours



37°C, 5% CO₂

3. AR indukálása Ca²⁺ ionoforral

Minta

1. Kontroll cső: Ø Ca²⁺ ionofor
Spontán AR%

2. Teszt cső: 10 µmol/l Ca²⁺ ionofor
Indukált AR%



30 min



37°C, 5% CO₂

4. CD46 és propidium-jodid jelölés,
áramlási citometriás mérés

Propidium-jodid:

Életképtelen spermiumok kizárása

CD46-FITC:

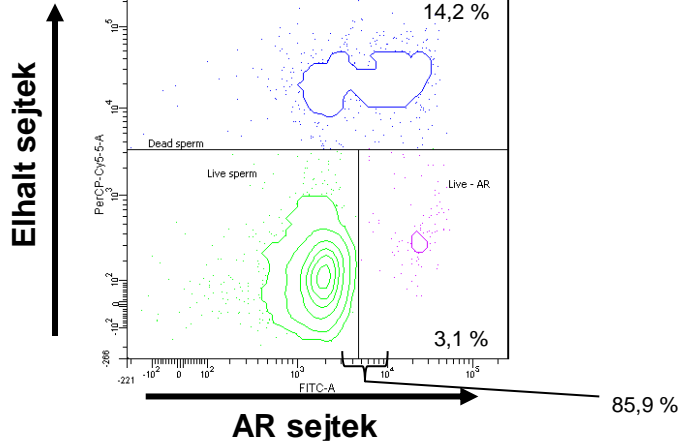
Intakt akroszóma: negatív

AR végbement: pozitív

Példák

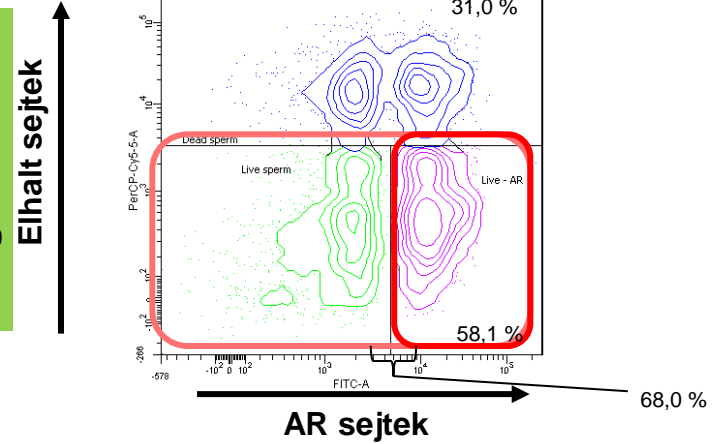
Spontán akroszóma reakció

Nincs spontán AR

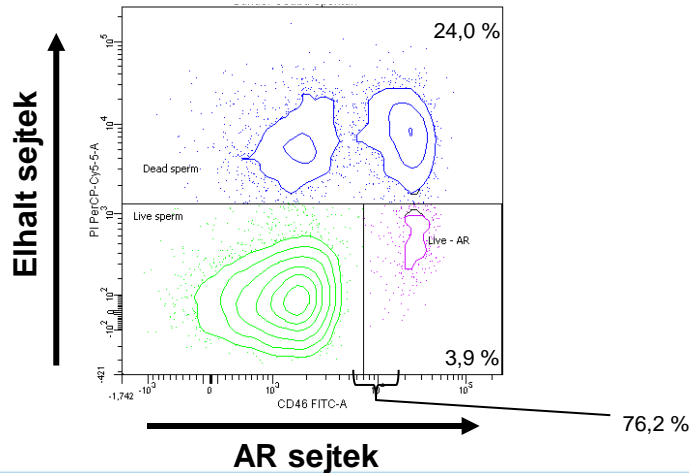


Indukált akroszóma reakció

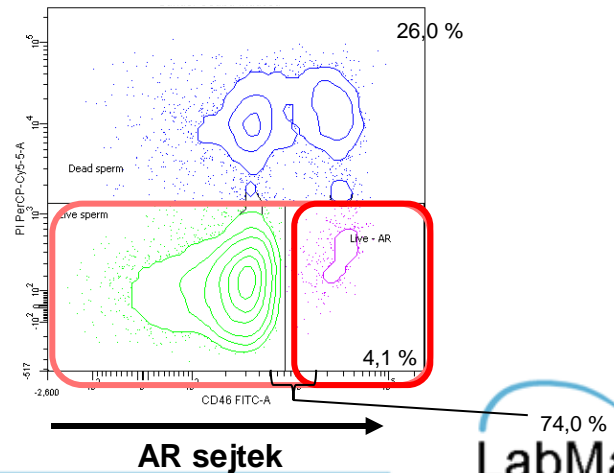
Megfelelő AR



Nincs spontán AR



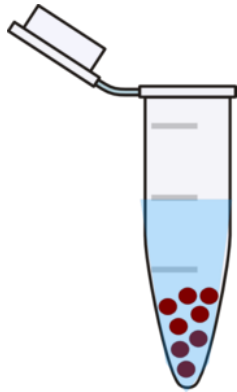
Elégtelen AR



Értékelés

(WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen V.)

1. Tesztcső (spermiumok – Kontroll)



Prematurális (Spontán) AR mutató sejtek %-os aránya

≥ 15%

Prematurális (spontán) akroszóma reakció:

Az akroszóma reakció a megfelelő stimulus hiányában is, idő előtt végbemegy.

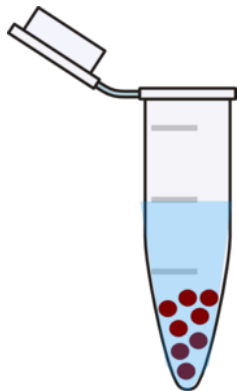
!!!

0 - 15%

Alacsony prematurális (spontán) akroszóma reakció

OK

2. Tesztcső (spermiumok + Ca²⁺ ionofore – Indukált) - 1. Tesztcső (Kontroll)



ARIC pontszám (Acrosome Reaction after Ionophore Challenge):

$$ARIC = AR\%(indukált\ minta) - AR\%(kezeletlen\ minta)$$

≥ 15%

Megfelelő akroszóma reakció

OK

10–15%

Feltehetően elégtelen akroszóma reakció

!

0 - 10%

Elégtelen akroszóma reakció

!!!

Eddigi eredményeink

AR% kezeletlen	AR% indukált	ARIC	Értékelés Spermogram alapján
1,0	10,6	9,6	Oligoteratozoospermia
1,1	34,3	33,2	Normozoospermia
7,5	22,7	15,2	Normozoospermia
3,1	58,1	55,0	Normozoospermia
1,8	9,9	8,1	Oligoteratozoospermia
1,6	15,7	14,1	Normozoospermia
3,3	19,7	16,4	Nincs adat
2,7	21,8	19,1	Oligoteratozoospermia
3,7	26,1	22,4	Oligoteratozoospermia
4,8	33,6	28,8	Normozoospermia
3,9	4,1	0,20	Oligozoospermia
2,9	40,3	37,4	Normozoospermia
1,6	21,2	19,6	Oligozoospermia

n = 13

Rossz AR

Normozoospermia = 6 → 1

Nem normozoospermia = 6 → 3

Értékelési kategóriák:

AR% a kezeletlen mintában:	≥ 15%	Prematurális (spontán) akroszóma reakció: Az akroszóma reakció a megfelelő stimulus hiányában is, idő előtt végbemegy.
	< 15%	Nincs prematurális (spontán) akroszóma reakció
ARIC pontszám:	< 10%	Elégtelen akroszóma reakció
	10-15%	Feltehetően elégtelen akroszóma reakció
	≥ 15%	Megfelelő akroszóma reakció

Fenotípus OK
(sejtszám, morfológia)

?

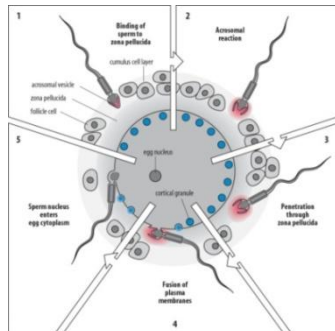
Funkcionálisan OK
(mozgás, aktiváció, sejt felszíni receptorok, sejtben belüli szignalizációs út)

Férfi oldali kivizsgálások

Infertilitási probléma

Habituális abortusz vizsgálatokkal párhuzamosan:

- Anatómiai elváltozások, sérülés
- Spermatogram
- **DNS fragmentáció**
(összefüggés első trimeszterben való abortusszal)
- Genetikai vizsgálat (FISH technika)
(Kromoszóma törések és aberrációk kimutatása)



Aszisztált reprodukció lehetősége felmerül:

- HBA
- **Akroszóma reakció**
- **DNS fragmentáció**,
(ha még nem történt meg)

Eldönthető:
Terápia
vagy
inszeminálás, IVF, ICSI
+ *in vitro* beavatkozások

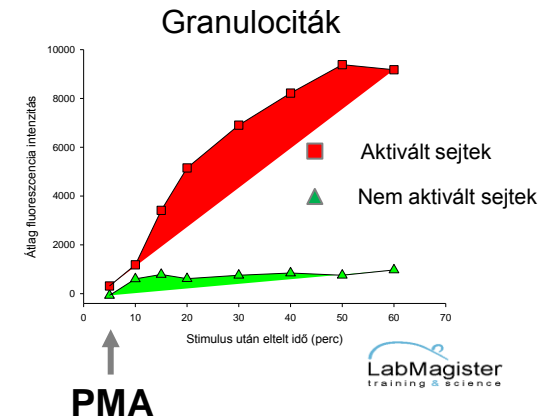
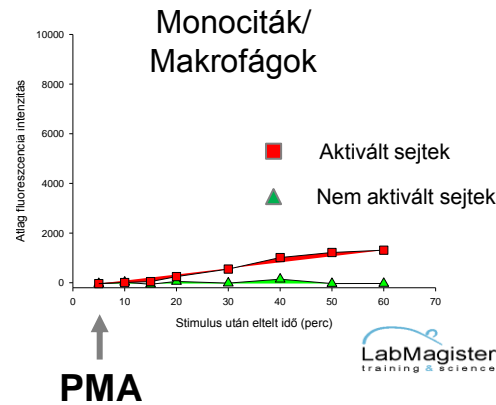
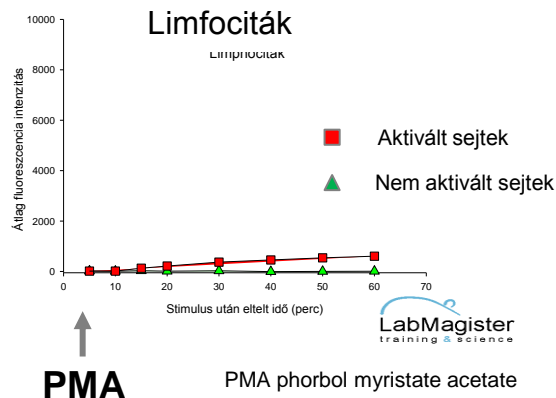
Köszönjük a figyelmet!

COUNTERTHINK



Szabadgyök

Peroxidáz teszt pozitívítás=gyulladás?



- **A granulociták szabadgyök termelése és stimulusra adott válasza a legnagyobb a fehérvérsejtek között**
- **Mononucleáris leukociták peroxidáz negatívak**

<https://doctor4patient.wordpress.com/2012/07/21/medical-treatment-of-oligoasthenoteratozoospermia/>