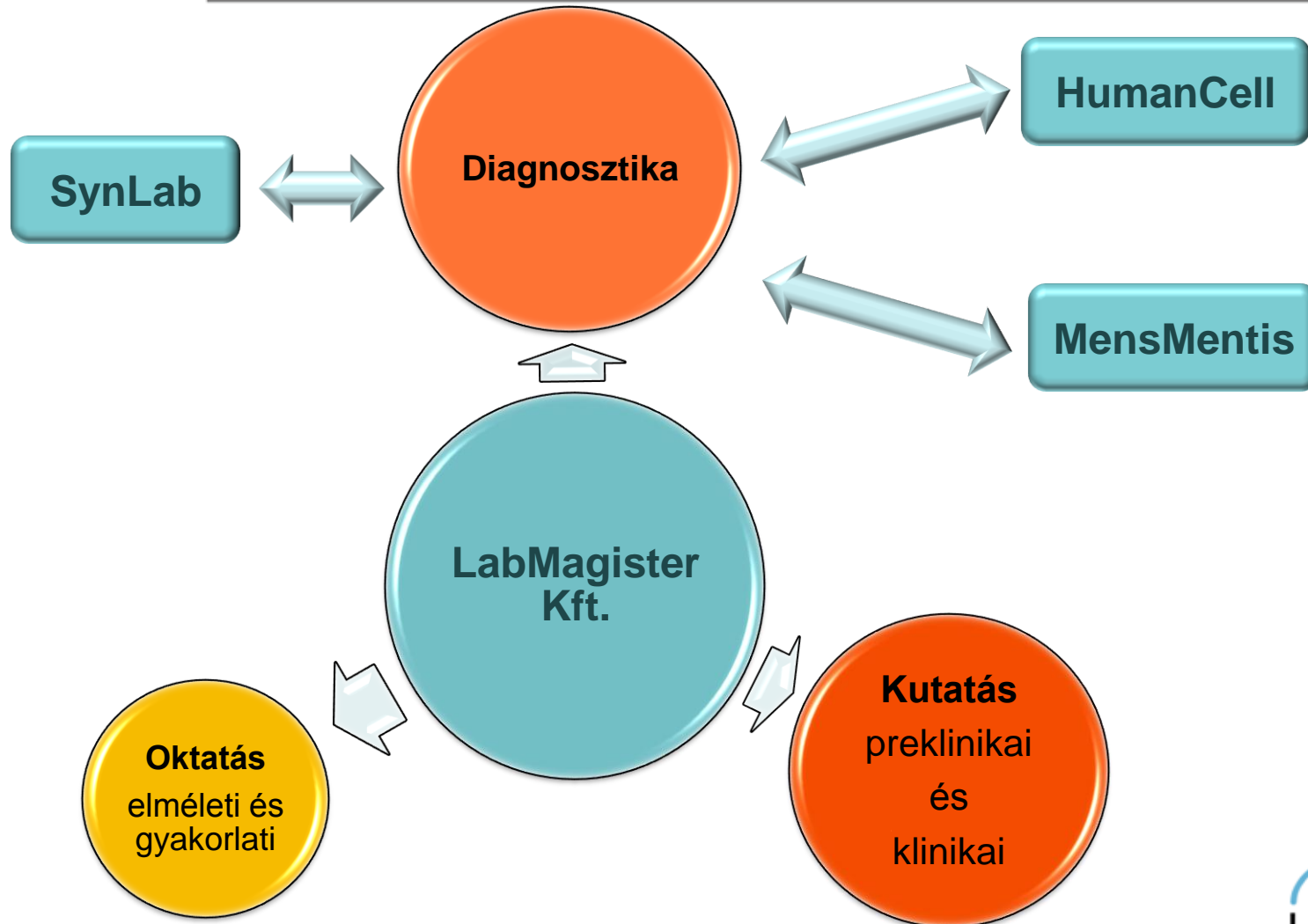


Az áramlási citometria gyakorlati alkalmazása az ondó rutin analízisben

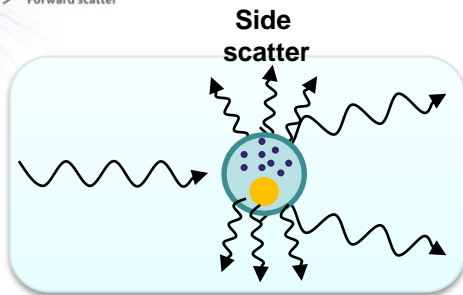
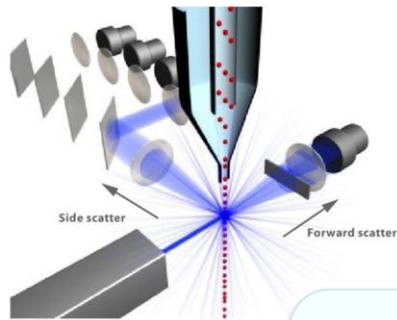
Hajnal Ágnes, Dr Mikus Endre, Dr Venekeiné Losonczi Olga



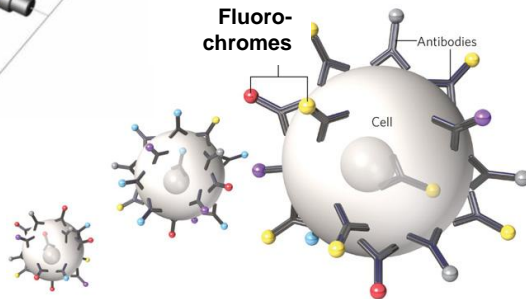
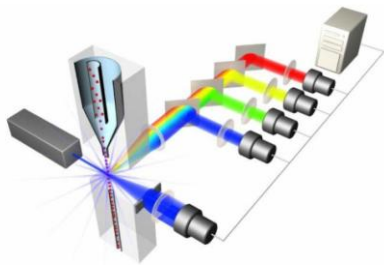
Labmagister Kft. aktivitásai



Áramlási (Flow) cytometria I.



Forward scatter

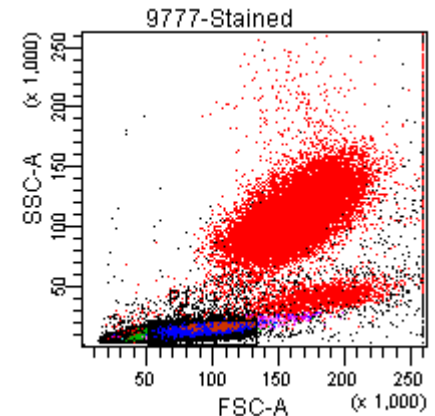
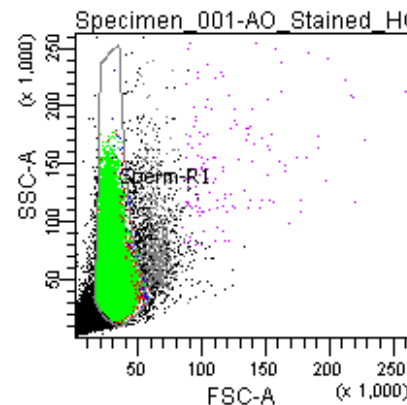


- Vékony kapilláris rendszer
- Sejtek egyedi azonosítása
- Lézervény szóródásával elkülöníthetők a sejtek méret szerint ill. sejtorganellumok gazdasága szerint
- Sejtek felszínén vagy sejten belüli makromolekulákhoz kötődő fluoreszcens molekulákat a lézer fény gerjeszti (antitest kötött vagy egyéb).

Humán ondó

Humán perifériás vér

Sejt granuláltsága ↑



Sejt méret →

Áramlási cytométer andrológiai alkalmazásai



DNS fragmentáció



Szabadgyök tartalom a spermiumokban



Cytokine tartalom

lehetőség

Gyulladásos sejtek



Összetapadt spermiumok

lehetőség

Baktérium tartalom

lehetőség

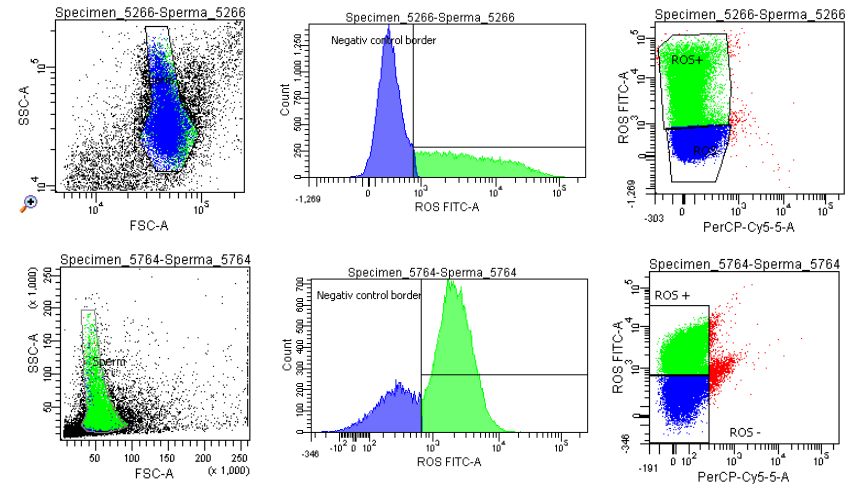
Élő/halott sejtek

DNS fragmentáció és szabadgyök (ROS) tartalom

DNS fragmentációs vizsgálat (SCSA módszer)

Spermium szabadgyök (ROS) tartalmának vizsgálata

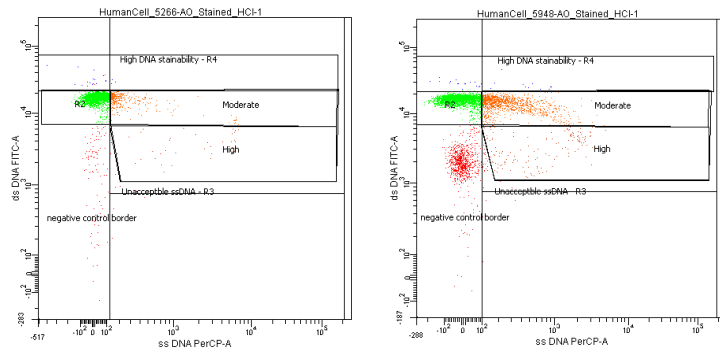
- ➔ Enyhe savas kezelés denaturálja a DNS-t a törések mentén
- ➔ Acridin Orange festék képes kötődni a szimpla szálú illetve a dupla szálú DNS lánchoz
- ➔ Eltérő emissíós maximum a kötődés függvényében



DFI = 12 %

DFI = 27 %

Acridin Orange emisszió 500/526 nm-en (dupla szálú DNS)



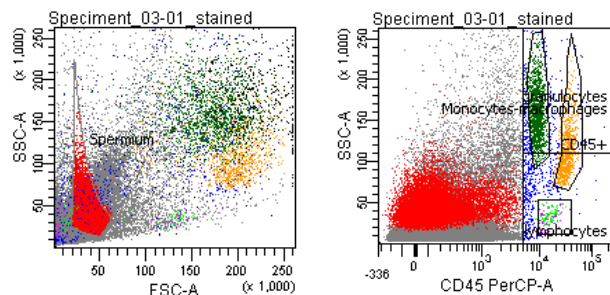
Acridin Orange emisszió 460/650 nm-en (szimpla szálú DNS)

- ➔ Total ROS meghatározás a spermiumon belül 490/525 nm-es emissziós maximumnál
- ➔ Detektálja: hidrogén peroxid, peroxinitrit, hydroxi gyökök
- ➔ Nem detektálja a szuperoxid gyököt, reaktív chlorid és bromid gyököt.
- ➔ A sejtek hány %-a érintett, mennyi a ROS tartalom az egyes sejtekben (fluoreszcencia intenzitás).

Gyulladásos sejtek és citokin tartalom

Gyulladásos sejtek

- ➔ CD45 festék felhasználásával összleukocitaszám meghatározása
- ➔ Sejtpopulációk %-os meghatározása (granulociták/monociták/limfociták)
- ➔ **Megjegyzés:** A vitális festés alkalmazásával az esetlegesen jelenlévő baktériumok is láthatóvá válnak, meghatározhatók a mintából.



Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	165,853	###	100.0
singlets	164,712	99.3	99.3
Spermium	20,141	12.2	12.1
CD45+	2,884	1.8	1.7
lymphocytes	154	5.3	0.1
CD4+CD3+	78	50.6	0.0
Monocytes-macrophage	838	29.1	0.5
granulocytes	1,265	43.9	0.8

Giuseppe Ricci, et al.
Leukocytospermia and sperm preparation - a flow cytometric study
Reproductive Biology and Endocrinology 2009, 7:128 doi:10.1186/1477-7827-7-128

Cytokine tartalom

- ➔ Cytokine meghatározás CBA technikával ondó plazmából
- ➔ 20-30 fg/mL-es koncentrációig képes detektálni a módszer
- ➔ IL-6/IL-8 meghatározás jelenleg

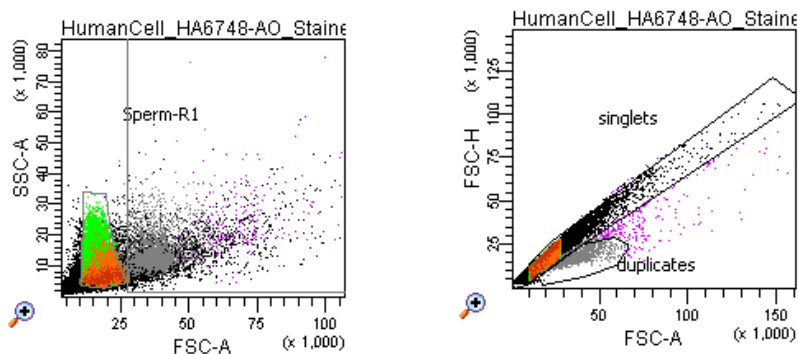
Irodalmi adatok alapján meghatározott, általunk alkalmazott ondó plazma koncentrációk

IL-8 conc. in the semen plasma:	High	2000	pg/mL
	Elevated	1000-2000	pg/mL
	Normal	<1000	pg/mL
IL-6 conc. in the semen plasma:	High	>15	pg/mL
	Normal	<15	pg/mL

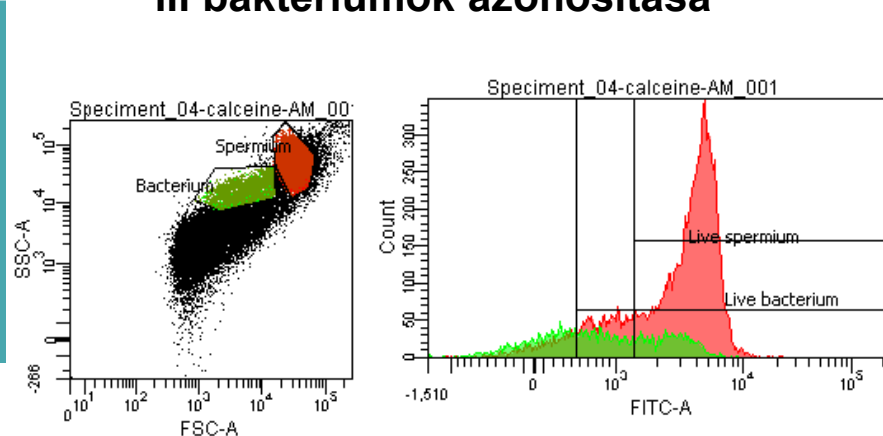
Waltraud Eggert-Kruse, et al.
Relationship of seminal plasma interleukin (IL) -8 and IL-6 with semen quality
Human reproduction Vol. 16; No. 3, pp. 517-528, 2001

Egyéb paraméterek

Duplikátumok azonosítása



Élő/ apoptotikus/ halott sejtek ill baktériumok azonosítása

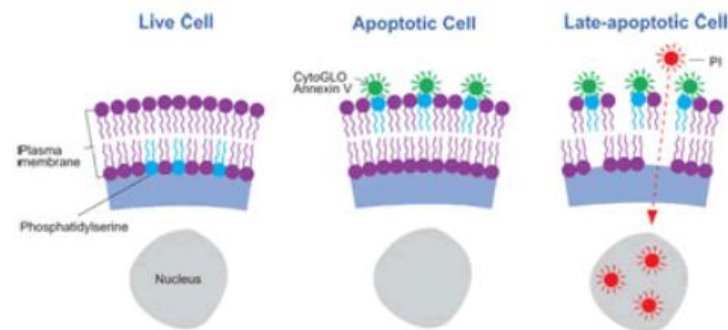


▶ Vitális festékekkel történő azonosítás (pl. Calcein AM, Toluidine Orange/PI, stb)

▶ A fluoreszcencia intenzitás mértékéből meg tudjuk határozni az élő, haldokló ill. az elpusztult sejteket

▶ A mintában jelenlévő baktériumok is detektálhatók

▶ Fluoreszcens jelzett antitest esetén nem csak Gram +/-, hanem baktérium törzsek azonosítás is.



http://www.biomol.de/infos_imgenex.html?id=647



Hátrány

Előny

Drága
műszerezettség

Szaktudás

Gyors,
Kvantitatív

Rövid vizsgálati idő

Nagy elemszám

Párhuzamos
vizsgálatok

Back up slides

Halosperm-SCSA összehasonlítás

Halosperm

- a vizsgáló látja a sejteket.
- könnyen elvégezhető a vizsgálat
- IVD minősítésű kitta elérhető

- szubjektív
- időigényes
- max. 2-300 sejt
- Vegyifülkeét igényel

- Halo nélküli spermium

Előny

Hátrány

Mért paraméter

SCSA

- objektív
- rövid idő
- nagy elemszám (10000 db sejt)
- Általásosan, irodalomban leírt protokoll alapján (1980-as évektől)

- drága műszerigény
- a vizsgáló nem látja a sejteket.

- ss DNA tartalmú sejtek
- DNS fragmentációs index

Négy péda:

	<i>degradálódott DNS tartalom</i> <i>Halosperm</i>	<i>DNS Fragmentációs Index</i> <i>SCSA</i>
– 1. Normozoospermia	18%	15%
– 2. Oligozoospermia	29%	27,7%
– 3. Asthenozoospermi	27%	28,3%
– 4. 69 éves, 80%-os HBA teszt	25%	23,4%

A mérési eredmények a Labmagister kft eredményei