

(15) **NAGY SZ. T.**

Automatizált sejtanalitikai eszközök a mezőgazdasági kutatás szolgálatában

Automatized cell analysis tools for agricultural research

nagy.szabolcs@georgikon.hu

Pannon Egyetem, Georgikon Kar, Állattudományi és Állattenyésztési Tanszék, egyetemi docens

Összefoglalás

Az olyan korszerű laboratóriumi sejtanalitikai módszerek, mint a flow citometria precíz és pontos értékelő eszközei a különböző sejtípusok élettani funkcióinak. Flow citometria segítségével értékelhető a sejtek kromatinállományának, plazmamembránjának állapota, mitokondriumainak funkcionális státusza. Az automatizált sejtanalitikai módszerek évtizedek óta használatosak humánegészségügyi vizsgálatokban, de egyre fontosabb szerepet kapnak más tudományterületeken is, így a mezőgazdasági kutatás fontos eszközei lehetnek. Végezhetők állattenyésztési /állategészségügyi kísérletek (spermatológiai sejtanalitika, sejtciklus-vizsgálatok, tőgyegészségügy stb.), növényteni /termesztési vizsgálatok (ploidia-vizsgálatok, pollenvizsgálatok stb.), élelmiszeripari mérések (pl. sörélesztő törzsek élősejtaránya), környezetvédelmi vizsgálatok (vízminőség, talajmikrobiológia stb.).

Summary

The advanced laboratory cell analytical methods such as flow cytometry are precise and accurate evaluation tools of the physiological functions of different cell types. Flow cytometry offers assessments of the chromatin status, plasma membrane integrity, functional status of mitochondria. The automated cell analysis methods have been used for decades in human health studies, but their role is more and more important in other areas of science, including agricultural research. We can perform animal husbandry / veterinary studies (spermatology, cell cycle studies, udder health studies, etc.), Botanical / crop production tests (ploidy, pollen studies etc), applications in food industry (e.g. yeast strain viability), environmental studies (water quality, soil microbiology, etc..).

A flow citometria, vagy áramlási sejtanalízis rövid idő alatt nagyszámú sejt (10 000 sejt mintánként, másodpercenként akár 1000-2000 sejt) objektív értékelését teszi lehetővé. A vizsgált sejtek egy vivőfolyadékban egyesével jutnak a mérőkamrába, ahol egy lézersugáron haladnak keresztül. A visszavert fény a sejtek méretéről és belső összetettségéről ad információt, a lézer pedig a sejtekhez kötődő fluoreszcens festékeket (illetve az egyes sejtípusokban megtalálható pigmenteket) is gerjeszti, így a berendezések multiparaméteres analízisre is alkalmasak (Shapiro, 1983).

A citométerek bonyolultabb – és drágább – típusai képesek sejtseparálásra (például spermaszexálásra), de léteznek olcsóbb, egyszerűbb, úgynevezett „asztali” modellek is, amelyek ha az egyes sejtípusok szétválogatására nem is, de mérésére alkalmasak.

Flow citometria segítségével értékelhető a sejtek kromatinállományának, plazmamembránjának állapota, mitokondriumainak funkcionális státusza. Az automatizált sejtanalitikai módszerek évtizedek óta használatosak humánegészségügyi vizsgálatokban, de egyre fontosabb szerepet kapnak más tudományterületeken is, így a mezőgazdasági kutatás fontos eszközei lehetnek. Végezhetők állattenyésztési /állategészségügyi kísérletek (spermatológiai sejtanalitika, sejtciklus-vizsgálatok, tőgyegészségügy stb.), növényteni /termesztési vizsgálatok (ploidia-vizsgálatok, pollenvizsgálatok stb.), élelmiszeripari mérések (pl. sörélesztő törzsek élősejtaránya), környezetvédelmi vizsgálatok (vízminőség, talajmikrobiológia stb.).

LIV.

GEORGIKON NAPOK

54th Georgikon Scientific Conference

A metodika kiválóan alkalmazható szuszpenzióban található sejtek értékelésére, így mára a hematológia és spermatológia korszerű vizsgálati módszerének tekinthető (Hossain és mtsai, 2011), de használható szövetek tanulmányozására is, megfelelő mintaelőkészítési lépésekkel.

Korábbi munkánk során a flow citometriát elsősorban spermatológiai vizsgálatokra alkalmaztuk, elsősorban a mélyhűtve tárolt termékenyítő anyag minőségellenőrzése volt célunk. Az alábbiakban az általunk alkalmazott tesztek rövid ismertetését közlöm.

Plazmamembrán-integritás

Az élő és elhalt sejtek aránya egyszerűen megállapítható fluoreszcens festékkombinációk segítségével. Több ilyen kombináció ismert, de a leggyakrabban használt változatban az élő sejteket egy zölden fluoreszkáló festékkel jelöljük (SYBR 14), az elhalt sejteket pedig egy vörösen fluoreszkáló festékkel (propidium-jodid, PI). Az élő sejtek esetében intenzív zöld fluoreszcenciát mérünk, az elhalt sejtek pedig intenzív vörös fluoreszcenciát mutatnak (Garner és mtsai, 1994). Azokat a sejteket, amelyek intenzív zöld ÉS vörös fluoreszcenciát jeleznek, „haldoklónak” szokás nevezni. Ez a festékkombináció azonban csak a spermiumok feji doménjének plazmamembrán-integritásáról ad információt. Az OTKA által támogatott, F049075 számú, „Emlősspermiumok vizsgálata domén-specifikus fluoreszcens jelöléssel” című pályázatomban megvalósítása során azonban kidolgoztam egy olyan fluoreszcens festékkombinációt - LIVE/DEAD Reduced Biohazard Viability Kit (vörös), Hoechst 33342 (kék), Alexa Fluor 488 PNA (zöld) - amely alkalmas a spermiumok feji és farki plazmamembránjának, valamint az akroszóma integritásának egyidejű értékelésére (Nagy, 2007).

Plazmamembrán- és akroszóma-integritás

A fenti kombinációt továbbfejlesztve, egy olyan festéket (PE-PNA) alkalmazunk, amely a sérült akroszómához kötődve narancssárga fluoreszcenciát mutat. Így négy sejtípust tudunk megkülönböztetni: élő sejtek ép akroszómával, élő sejtek sérült akroszómával, elhalt sejtek ép akroszómával és végül elhalt sejtek sérült akroszómával (Nagy és mtsai, 2003).

Mitokondriális aktivitás, membránpotenciál

Az aktív mitokondriumok aránya elvileg szoros kapcsolatban áll a sejtek motilitásával. Kidolgoztunk egy új fluoreszcens festési eljárást a spermiumok mitokondriális membránpotenciáljának értékelésére (Hallap és mtsai., 2005a): a sejteket először a membrán-permeábilis, DNS-specifikus SYBR 14 próbával jelöltük a biztos detektálás érdekében, majd az alacsony és nagy mitokondriális membránpotenciált mutató spermiumokat Mitotracker Deep Red festék segítségével különítettük el.

Korai membránváltozások

A plazmamembrán foszfolipid aszimmetriája fiziológiás körülmények között a petesejtbe való bejutást megelőzően, a kapacitáció folyamata során megváltozik. A spermiumok mélyhűtése gyakran hasonló változásokat eredményez, ez azonban kedvezőtlen, mert a sejtek az ilyen változást követően hamar elpusztulnak, így nem képesek termékenyítésre. A korai membránváltozások flow citométerrel történő detektálására Merocianin540, Yo-Pro 1 és Hoechst 33342 kombinációját alkalmaztuk (Hallap és mtsai, 2006).

Kromatinállomány integritása, DNS-fragmentáció, kromatinkondenzáció

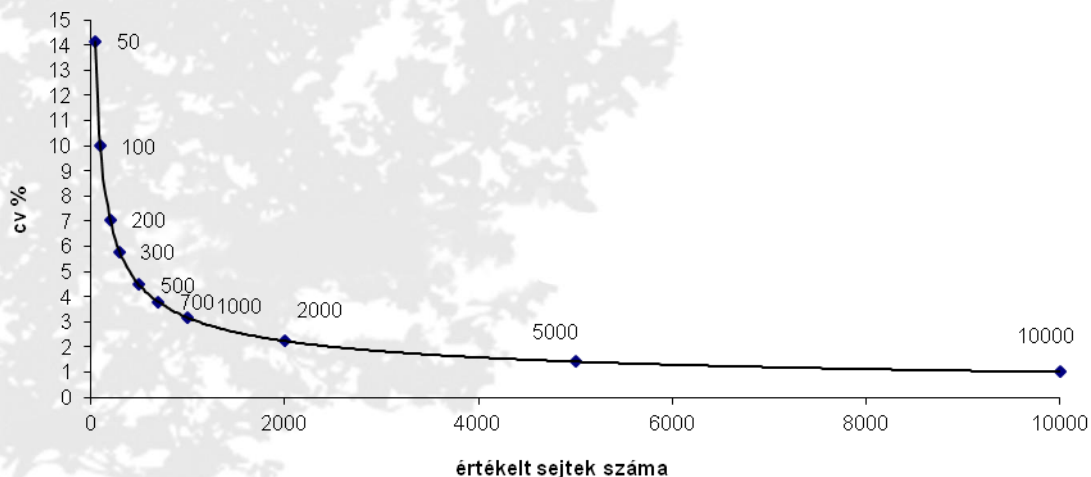
A spermiumok kromatin-állományának szerkezeti rendellenességei a termékenyítőképeség, illetve a hím pronukleusz-képződés zavarait okozhatják, továbbá káros hatással lehetnek az embrió fejlődésére is (Evenson, 1999). A DNS épségét értékelő teszt lényege röviden a következő: a spermamintát rövid idejű savas kezelésnek vetjük alá, majd akridin narancs festékkel festjük. Az akridin narancs az ép, kétszálú DNS-hez kötődve zölden, míg a denaturálódott, egyszálú DNS-hez kötődve vörösen fluoreszkál. Citométer segítségével az egyes sejtek zöld/vörös fluoreszcencia-intenzitását mérjük. A

normális szerkezetű kromatin ép marad a savas kezelés során, így csak minimális vörös fluoreszcenciát mutat. A rendellenes kromatin-állományú spermiumok DNS-e azonban részlegesen denaturálódik a savas kezelés hatására, megnövekedett vörös fluoreszcenciát eredményezve. A vörös és zöld fluoreszcencia aránya az ún. DNS-fragmentációs indexet adja. A rendellenes kromatinkondenzációjú sejtek intenzívebb zöld fluoreszcenciát mutatnak. A tesztet korábban tenyészbikák spermaminőségének különböző életkorokban való összevetésére alkalmaztuk (Hallap és mtsai, 2005b).

Sejtkoncentráció mérése

A fent említett módszerek mindegyike kombinálható elvileg a sejtkoncentráció egyidejű mérésével. Többféle lehetőség is adott, az alkalmazott citométer típusától függően: vagy a mintához kevert, ismert koncentrációjú fluoreszcens mikrogöngyök segítségével határozhatjuk meg a spermiumkoncentrációt, vagy egyes műszerek lehetővé teszik az ún. volumetrikus sejt számlálást, amikor is adott térfogatú minta értékelése során állapítjuk meg az ondósejtek számát.

A módszer nagy előnye a gyorsasága: másodpercenként több ezer sejtet értékelhetünk, emellett precíz, hiszen egy mintáról nem 100-200 sejt számlálásával (mint mikroszkóppal), hanem általában 10 000 esemény értékelésével alkotunk képet. Az értékelt sejtek száma pedig befolyásolja a mérés precizitását, n sejtet számolva a szórás $n^{1/2}$ lesz.



1. ábra: Variációs koefficiens (cv %) változása az értékelt sejt szám függvényében.

Köszönetnyilvánítás

Vizsgálataink a „Tudományos képzés műhelyeinek támogatása a Pannon Egyetemen” című „TÁMOP 4.2.2/B-10/1-2010-0025” azonosítószámú projekt támogatásával valósultak meg.

Irodalomjegyzék

- EVENSON, DP. (1999) Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reproduction, Fertility and Development*, 1999;11(1):1-15.
- HALLAP, T., NAGY, S., JAAKMA, U., JOHANNISSON, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2005a) Mitochondrial activity of frozen-thawed bull spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology*, 63: 2311-2322.

- HALLAP, T., NAGY, S., HÅÅRD, M., JAAKMA, U., JOHANNISSON, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2005b) Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen is maintained over age in AI bulls. *Theriogenology*, 63:1752-1763.
- HALLAP, T., NAGY, S., JAAKMA, U., JOHANNISSON, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ H. (2006) Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. *Theriogenology*, 65:1122-1136.
- HOSSAIN, MS., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M., NAGY, S., SIQUEIRA, AP., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2011) Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: State of the art. *Asian Journal of Andrology*, 13: 406-419.
- NAGY, SZ. (2007) Bikaspermiumok vizsgálata doménspecifikus fluoreszcens jelöléssel. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 129(8): 464-468.
- GAMER, DL., JOHNSON, LA., YUE, ST., ROTH, BL., HAUGLAND, RP. (1994) Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Journal of Andrology*, 15: 620-629.
- SHAPIRO, HM. (1983) Multistation multiparameter flow cytometry: a critical review and rationale. *Cytometry*, 3(4):227-243.

LIV.
GEORGIKON NAPOK

54th Georgikon Scientific Conference