

AUTOMATIZÁLT FLOW CITOMÉTERES KLASZTERANALÍZIS SPERMATOLÓGIAI ALKALMAZHATÓSÁGA

KOVÁCS BARNABÁS MIHÁLY – NAGY SZABOLCS TAMÁS

ÖSSZEFOGLALÁS

A mesterséges termékenyítés egyik legfontosabb előnye, hogy előzetesen értékelt termékenyítő-anyagot használhatunk. A fertilitás lehető legpontosabb becslése érdekében a spermiumok számos tulajdonságát vizsgálhatjuk. Az egyik ilyen szempont a spermiumok kromatinállapota, hiszen az apai DNS károsodása negatív hatással lehet a korai embrió fejlődésére. Az egyik leggyakrabban használt módszer az áramlási citométerrel végzett Sperm Chromatin Structure Assay. A citométerrel gyorsan és precízen értékelhetjük a sejteket, viszont a kapott adatok elemzése a hagyományos kézi régióanalízissel meglehetősen időigényes és szubjektív. A szerzők célja egy automatizált adatelemző program (FloCK – Flow Cytometry Clustering by K-means) használatával gyorsabbá és objektívebbé tenni a kapott adatok kiértékelését. Az eredmények szerint a FloCK programmal jól megközelíthetőek a kézi régióanalízissel kapott adatok. Az alacsony arányban előforduló sejtek, mint például a rendellenes kromatin kondenzációt mutató sejtek detektálása azonban nem lehetséges, emiatt a spermiumkromatin-vizsgálatok adatainak elemzésére a FloCK automatizált klaszteranalízis nem megfelelő.

SUMMARY

Kovács, B. M. – Nagy, Sz. T.: APPLICABILITY OF FLOW CYTOMETRIC AUTOMATED CLUSTER ANALYSIS IN SPERMATOLOGY

One of the most important elements of artificial insemination is the use of quality-controlled semen. In order to estimate fertility as accurately as possible, several sperm characteristics should be examined. One of these is the DNA status of the sperm, as the damage of paternal DNA can have a negative impact on the early embryonic development. One of the most frequently used tests is the Sperm Chromatin Structure Assay with flow cytometry. Flow cytometry allows quick and precise analyses, however, the classic manual data analysis is time-consuming and highly dependent on user experience, making it the most limiting aspect of this technology. Our aim was to test a quick and objective alternative approach with an automated data analysis program, so-called Flow Cytometry Clustering by K-means (FloCK). FloCK program can achieve a quick and reliable analysis and the results showed a significant positive strong correlation with the classic manual gating results. The main weakness of the automated cluster analysis is that rare events, in this case the spermatozoa with abnormal chromatin condensation are not detected, therefore our conclusion is that the FloCK approach is not suitable for sperm chromatin test analyses.

BEVEZETÉS

A modern állattenyésztés egyik legfontosabb biotechnológiai eszköze a mesterséges termékenyítés és egyes fajok esetében a mélyhűtve történő spermatárolás. Sikeres alkalmazásának azonban alapfeltétele a mesterséges termékenyítésre szánt sperma minőségellenőrzése (Foote, 1975). Számos spermabírálati szempontot dolgoztak ki az elmúlt évtizedekben azzal a céllal, hogy a fertilitást minél biztosabban megbecsülhessük. A spermavizsgálatok legfontosabb elemei a mennyiség, a konzisztencia, a motilitás és a tömegmozgás. A gyakorlati munka nem minden esetben teszi lehetővé egyéb szempontok értékelését, mint például a morfológia, membrán integritás, akroszóma státusz, DNS állapot, pedig a fertilitás meghatározásának szempontjából ezek fontosak lehetnek (Petrunkina és Harrison, 2011). A vizsgálatok felgyorsítását és objektivitásuk növelését egyes műszerek alkalmazása segítheti, mint például a CASA (Computer-assisted Sperm Analysis), amellyel objektíven értékelhetjük a spermiumok motilitását (Hossain és mtsai, 2011).

Az egyik leghatékonyabb módszer a spermavizsgálatok elvégzésére az áramlási (flow) citométer használata. Mára a kutatási felhasználáson túl a termékenyítő állományok körében is elterjedt a spermavizsgálatok rutinszerű elvégzésére (Hossain és mtsai, 2011). Az áramlási citometria egy olyan eljárás, amellyel folyadékban szuszpendált mikroszkopikus részecskéket, például sejteket vagy kromoszómákat tudunk vizsgálni. A módszer lehetővé teszi több ezer, vagy tízezer sejt számos tulajdonságának egyszerre történő vizsgálatát. A technológia alkalmas továbbá a sejtek szortírozására is, amit az ivardeterminált termékenyítőanyag előállítása esetén használhatunk ki (Longobardi Givan, 2001). Az elmúlt évtizedekben rohamosan fejlődött ez a terület, elsősorban a hardware és a reagensek tekintetében. A multiparaméteres vizsgálatok olyan komplex adatahalmazt eredményeznek, amit már nem lehet hatékonyan a hagyományos adatelemzési módszerekkel értékelni (Shapiro, 2004). A klasszikus citométeres adatelemzés a kézi régióanalízisen alapszik, amelynek során a szakemberek manuálisan, szubjektíven különítik el a vizsgálat szempontjából fontos sejtcsoportokat. Ez az eljárás viszont az áramlási citométeres vizsgálatok legkényesebb pontja, hiszen rendkívül időigényes, és magában foglalja az emberi hibalehetőséget (Bashashati és mtsai, 2009).

A szubjektivitás kiküszöbölése érdekében már több fél-automata, illetve automata adatelemző szoftvert fejlesztettek, amellyel precíz, jól ismételhető elemzéseket végezhetünk, viszont nem igazán lehetett ezeket egymással, illetve a hagyományos kézi régióanalízissel összehasonlítani. A FlowCap összefogás keretén belül számos citometriával foglalkozó szakember hasonlította össze ezeket a programokat, vizsgálva azok hatékonyságát, egyszerűségét, és gyorsaságát (Aghaeepour és mtsai, 2013).

A kutatásunk során egy ilyen automatizált adatelemző módszer, a FloCK (Flow cytometry Clustering by K-means) alkalmazhatóságát teszteltük a Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) adatsorain, és az így kapott eredményeket összevetettük egy tapasztalt szakember szubjektív régióanalízise során kapottakkal.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatainkat a Pannon Egyetem Georgikon Karának Sejtanalitikai laboratóriumában végeztük, melyben a Sperm Chromatin Structure Assay-vel korábban

Nagy és mtsai (2013) által hagyományos adatelemzési megközelítéssel értékelt 43 Ayrshire bika spermamintájának eredményeit elemeztük újra a FloCK programmal.

Sperm Chromatin Structure Assay

A felolvasztott sperma hígítása 0,01M TRIS, 0,15M NaCl, 1 mM EDTA tartalmú, 7,4 pH-jú pufferrel történt. Egy perc után 200 μ l hígított sperma össze lett keverve 400 μ l sav-detergens oldattal, ami 0,15M NaCl, 0,08 N HCl, 0,1% Triton-x100-t tartalmazott, majd 30 másodperccel később a mintát akridin-narancs festékoldattal kezeltük (0,2 M Na_2HPO_4 , 1mM EDTA, 0,15 M NaCl, 0,1 M citromsav, 6 mg/ml akridin-narancs). A vizsgálat 3 perccel a savas kezelés után kezdődött.

A mérés egy FACSSStar Plus típusú (Becton Dickinson, USA) standard optikájú, 488 nm argon-ion lézerrel felszerelt citométerrel történt. A kétszálú DNS-hez kötött akridin narancs zölden fluoreszkál (530 ± 30 nm), míg az egyszálú DNS-hez kötött festék vörösen (> 630 nm). A zöld fluoreszcencia rögzítését FL1 (528/28 nm), a vörös rögzítését FL3 (> 630 nm) detektorral végeztük. A vizsgálat mintánként 10000 esemény gyűjtése után lett leállítva (Nagy és mtsai, 2013). A kézi régióanalízist és a DNS-fragmentációs index kiszámítását egy tapasztalt citométeres szakember végezte (Nagy és mtsai, 2013).

FloCK adatelemzés

Az adatok kiértékelését a FloCK – Flow Cytometry Clustering by K-means programmal végeztük (<http://theory.bio.uu.nl/tjibbe/flock/>; Utrecht University, 2009, 0.9.16 verzió). Ez egy K-közép klaszterelemző program, aminek segítségével nagy adathalmazt homogén csoportokra (klaszterekre) tudunk bontani. Az algoritmus az előre beállított várható klaszterek száma alapján véletlenszerűen kijelöli

1. ábra FloCK vizsgálat

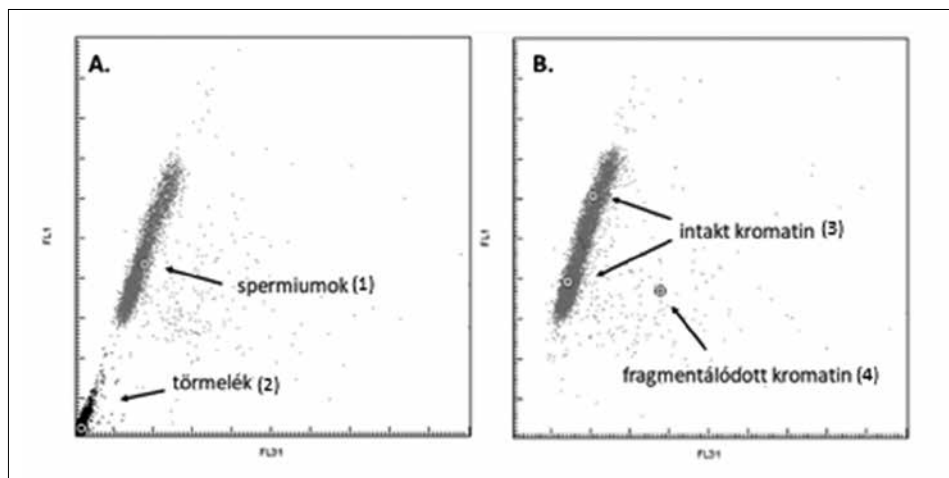


Figure 1. FloCK analysis

sperm (1); debris (2); intact DNA (3); fragmented DNA (4)

a klaszterek középpontjait, majd ezekhez hozzárendeli a legközelebb található eseményeket, így kialakítva a klasztereket. Ezután a program a kialakult klaszterek középpontját újraszámolja, és ismét hozzárendeli a legközelebbi pontokat, majd ezt addig ismétli, amíg ezáltal egy stabil állapotot el nem ér.

A K-klaszteranalízis előnye, hogy rendkívül gyorsan és egyszerűen lehet nagy adatmennyiségeket értékelni, egyik hátránya viszont, hogy a kezdő klaszterközéppontok véletlenszerű kijelölése miatt a módszer magában hordozhatja a rossz ismételhetőséget. A másik hátránya pedig, hogy az elnyújtott populációkat hajlamos több csoportra felosztani (*Pang-Ning és mtsai*, 2005).

A klaszteranalízishez szükséges várható klaszterek számát a hagyományos SCSA eredmények alapján határoztuk meg: az intakt spermiumok mellett fragmentált és rendellenes kromatinkondenzációjú csoportok megjelenését vártuk. A vizsgálat során fontos, hogy a törmelékeket, szennyeződések kizárjuk a vizsgálatból.

Az első klaszterezés során kizártuk a törmelékeket, az elemzésbe bevont események így kizárólag spermiumok voltak (1. ábra). A spermiumokkal újabb klaszterezést végeztünk és ezután kaptuk meg az 1. b ábrán látható spermium-klaszttereket. Ebben az esetben látszik, hogy ezt az elnyújtott populációt két részre osztja a program, de a vizsgálat szempontjából ezeket egy klaszterként kezeltük. A rendellenes kromatinkondenzációt mutató spermiumokat egy esetben sem sikerült azonosítani a FloCK programmal.

Statisztikai módszerek

A statisztikai elemzésekhez az R 3.6.1 verzióját használtuk. A kézi régióanalízissel kapott adatok és a FloCK program eredményeit Spearman-féle rangkorrelációval hasonlítottuk össze. A FloCK program ismételhetőségét a Bland-Altman módszer-egyeztési statisztikával (*Bland és Altman*, 1986) értékeltük.

EREDMÉNYEK

A Bland-Altman elemzés szerint a méréspárok közti átlagos eltérés $d=0,36\%$, a szórás $SD=0,31\%$, az ismételhetőség határai ($d\pm 2SD$) $0,98$, illetve $-0,26\%$ voltak. Az ismételhetőségi határokon kívül 3 esemény volt (2. ábra).

A Spearman-féle rangkorreláció eredményeit az alábbi korrelációs mátrixba rendeztük (1. táblázat). A táblázatban látható, hogy a kézi régióanalízis és a FloCK klaszteranalízis mindkét futtatása között szignifikáns ($p < 0,001$) szoros pozitív korreláció volt kimutatható.

Összességében elmondható, hogy sikeresen alkalmaztuk a FloCK automatizált klaszteranalízist az SCSA spermatológiai vizsgálat adatelemzése során.

A FloCK automatizált adatelemző program alkalmas az áramlási citométerrel végzett spermatológiai vizsgálatok adatelemzési munkáinak megkönnyítésére. A Sperm Chromatin Structure Assay esetében az intakt és a DNS fragmentációt mutató sejteket sikeresen elkülönítettük, azonban a rendellenes kromatinkondenzációt mutató sejtek automata azonosítása nem sikerült. Ennek oka az lehetett, hogy ezek a sejtek rendkívül alacsony arányban voltak jelen a sejtekben. A ritka események detektálására a FloCK program tehát nem alkalmas, így hasonló esetekben más adatelemző módszerek lehetnek hasznosak, mint például az R környezetben futó Barcoding vagy Fingerprinting alkalmazások (*Rogers és mtsai*, 2008; *Koch és mtsai*, 2013).

2. ábra FloCK vizsgálat ismételhetősége

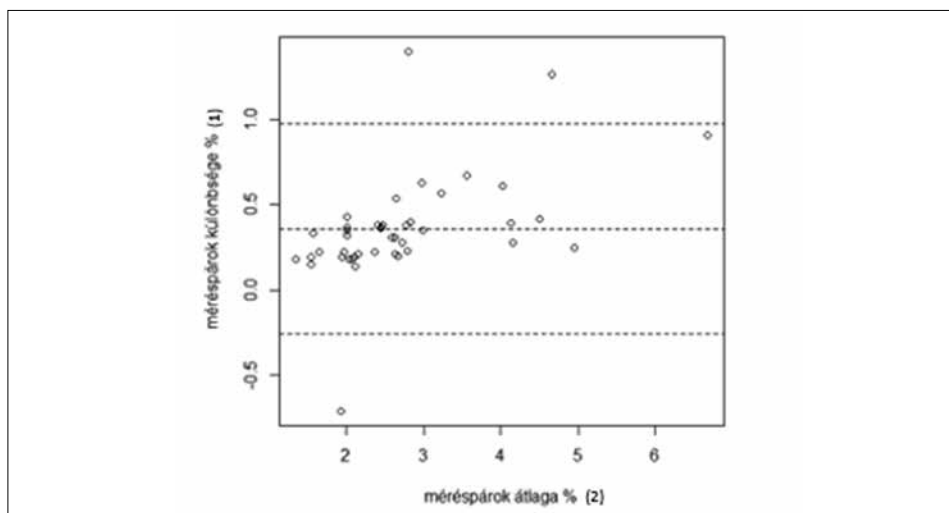


Figure 2. FloCK test repeatability

difference of paired measurements (1); average of paired measurements (2)

1. táblázat

A manuális és automatizált módszerek kapcsolata

	FloCK Frag. 1	FloCK Frag. 2	FloCK Intact 1	FloCK Intact 2	HIGR	INTACT	DFI
FloCK Frag. 1	Rs=1,00	0,92*	-0,99*	-0,92*	0,13	-0,88*	0,85*
FloCK Frag. 2	0,92*	1,00	-0,92*	-0,99*	0,03	-0,83*	0,82*
FloCK Intact 1	-0,99*	-0,92*	1,00	0,92*	-0,13	0,88*	-0,85*
FloCK Intact 2	-0,92*	-0,99*	0,92*	1,00	-0,03	0,83*	-0,82*
HIGR	0,13	0,03	-0,13	-0,03	1,00	-0,13	-0,06
INTACT	-0,88*	-0,83*	0,88*	0,83*	-0,13	1,00	-0,97*
DFI	0,85*	0,82*	-0,85*	-0,82*	-0,06	-0,97*	1,00

* $p < 0,001$

FloCK Frag. 1: FloCK első futtatás – DNS fragmentáció; FloCK Frag 2: FloCK második futtatás – DNS fragmentáció; FloCK Intact 1: automatizált klaszteranalízis első futtatásával kapott intakt DNS-sel rendelkező sejtek; FloCK Intact 2: FloCK második futtatás - intakt sejtek; HIGR: rendellenes kromatin kondenzáció; INTACT: hagyományos elemzéssel kapott intakt DNS-sel rendelkező sejtek; DFI: kézi régióanalízis – DNS fragmentáció

Table 1. The relationship between manual and automated methods

FloCK Frag. 1: spermatozoa with fragmented DNA as measured with FloCK – first run; FloCK Frag 2: spermatozoa with fragmented DNA as measured with FloCK – second run; FloCK Intact 1: spermatozoa with intact DNA as measured with FloCK – first run; FloCK Intact 2: spermatozoa with intact DNA as measured with FloCK – second run; HIGR: abnormal chromatin condensation; INTACT: spermatozoa with intact DNA as measured by the conventional analysis; DFI: DNA fragmentation measured with manual region analysis

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-19-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának szakmai támogatásával készült.

IRODALOMJEGYZÉK

- Aghaeepour, N. - Finak, G. - FlowCAP Consortium - DREAM Consortium - Hoos, H. - Mosmann, T. R. - Brinkman, R. - Gottardo, R. - Scheuermann, R. H. (2013): Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nat. Methods*, 10. 228-238.
- Bashashati, A. - Brinkman, R. R. (2009): Survey of flow cytometry data analysis methods. *Adv. Bioinformatics*, 1-19.
- Bland, J. M. - Altman, D. G. (1986): Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, i:8476, 307-310.
- Foote, R. H. (1975): Semen quality from the bull to the freezer: an assessment. *Theriogenology*, 3. 219-235.
- Hossain, M. S. - Johannisson, A. - Wallgren, M. - Nagy, S. - Siqueira, A. P. - Rodriguez-Martinez, H. (2011): Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality. *Asian J. Androl.*, 13. 406-419.
- Koch, C. - Fetzer, I. - Schmidt, T. - Harms, H. - Müller, S. (2013): Monitoring functions in managed microbial systems by cytometric bar coding. *Environ. Sci. Technol.*, 47. 1753-1760.
- Longobardi Givan, A. (2001): Flow cytometry: First principles. Wiley-Liss, Inc., 296.
- Nagy, S. - Johannisson, A. - Wahlsten, T. - Ijäs, R. - Andersson, M. - Rodriguez-Martinez, H. (2013): Sperm chromatin structure and sperm morphology: Their association with fertility and AI-dairy Ayrshire sires. *Theriogenology* 79. 1153-1161.
- Pang-Ning, T. - Steinbach, M. - Kumar, V. (2005): Introduction to data mining. Pearson, 792.
- Petrunkina, A. M. - Harrison, R. A. P. (2011): Cytometric solutions in veterinary andrology: Developments, advantages, and limitations. *Cytometry*, 79. 338-348.
- Rogers, W. T. - Moser, A. R. - Holyst, H. A. - Bantly, A. - Mohler, E. R. - Scangas, G. - Moore, J. S. (2008): Cytometric fingerprinting quantitative characterization of multivariate distributions. *Cytometry A*, 73. 430-441.
- Shapiro, H. (2004): The evaluation of cytometers. *Cytometry*, 58. 13-20.

Érkezett: 2020. január

Szerzők címe: Kovács B. M. - Nagy Sz. T.
Pannon Egyetem Georgikon Kar, Állattudományi Tanszék

Authors' address: University of Pannonia, Georgikon Faculty
H-8360 Keszthely, Deák Ferenc u. 16.
nagy.szabolcs@georgikon.hu