

Wykorzystanie cytometrii przepływowej do oceny występowania przeciwciał przeciwplemnikowych w surowicy od niepłodnych osób dorosłych i chłopców przed pokwitaniem z wadami w drogach rozrodczych

Flow cytometry application in the evaluation of antisperm antibodies in sera samples of infertile people and prepubertal boys with gonadal disorders

Kamieniczna Marzena¹, Havryluk Anna², Nakonechnyj Andrij³, Boyko Jaryna², Chopyak Valentina², Kurpisz Maciej¹

¹ Zakład Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych, Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań

² Katedra Klinicznej Immunologii i Alergologii, Lwowski Państwowy Uniwersytet Medyczny, Lwów, Ukraina

³ Zakład i Oddział Chirurgii Dziecięcej, Lwowski Państwowy Uniwersytet Medyczny, Lwów, Ukraina

Streszczenie

Cel pracy: Celem podjętych badań była analiza występowania i reaktywności przeciwciał przeciwplemnikowych w surowicy u niepłodnych osób dorosłych oraz chłopców przed pokwitaniem z wadami w drogach rozrodczych w celu określenia trafności doboru metody z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiły próbki surowic krwi obwodowej od niepłodnych kobiet i mężczyzn oraz zdrowych płodnych kobiet i mężczyzn, a także chłopców przed pokwitaniem z wewnątrzem oraz zdrowych chłopców. Oznaczenia przeciwciał przeciwplemnikowych wykonywano przy pomocy IDIBT oraz testu pośredniego cytometrii przepływowej.

Wyniki: Porównanie poziomów przeciwciał przeciwplemnikowych w próbkach surowic u osób dorosłych, oznaczonych techniką cytometrii przepływowej nie wykazało istotnych statystycznie różnic pomiędzy populacją płodnych osób zdrowych i populacją osób niepłodnych we wszystkich badanych klasach immunoglobulin. Porównanie poziomów przeciwciał przeciwplemnikowych w próbkach surowic od zdrowych chłopców i chłopców z wewnątrzem wykazało statystycznie znamienne różnice dla wszystkich badanych klas przeciwciał.

Uzyskano korelację pomiędzy testami IDIBT oraz FCM jedynie w populacji niepłodnych osób dorosłych dla przeciwciał przeciwplemnikowych klasy IgG ($r=0,507$ ($p=0,012$)). Ocena wartości diagnostycznej testu FCM wykazała słabsze wartości detekcyjne dla populacji osób dorosłych w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla populacji chłopców przed pokwitaniem.

Adres do korespondencji:

Maciej Kurpisz
Zakład Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych
Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań
tel. (61) 6579202; Fax: (61) 8233-235
e-mail: kurpimac@man.poznan.pl

Otrzymano: 15.02.2010
Zaakceptowano do druku: 25.07.2010

Wnioski: Metoda oznaczeń przeciwciał przeciwplemnikowych z wykorzystaniem cytometrii przepływową spełnia kryteria doboru trafności testu dla populacji chłopców przed pokwitaniem, ale nie wydaje się być odpowiednia dla populacji osób dorosłych.

Słowa kluczowe: **przeciwciała przeciwplemnikowe / cytometria przepływowa / niepłodność / chłopcy przed pokwitaniem /**

Abstract

Objectives: The aim of the following study was to assess antisperm antibodies in sera samples of infertile men and women, as well as from prepubertal boys by means of flow cytometry.

Material and methods: We tested sera samples of infertile and fertile adult populations, prepubertal boys with gonadal disorders and healthy prepubertal boys. The indirect immunobead test and flow cytometry were used to detect antisperm antibodies.

Results: The comparison of antisperm antibody levels in sera samples of adult infertile versus healthy controls (men and women) evaluated by means of flow cytometry did not reveal statistically significant differences. The only significant correlation found were results obtained by IDIBT and FCM for IgG antisperm antibodies for infertile adult group ($r=0.507$, $p=0.012$). The comparison of antisperm antibody levels in sera samples from prepubertal boys revealed statistically significant differences for all tested antibody isotypes. Diagnostic values compared for both assays showed markedly better discriminatory ability of flow cytometry for analyzed groups of prepubertal boys than for adult populations.

Conclusions: Flow cytometry test may be used to verify antisperm antibody levels in prepubertal boys with testicular failures.

Key words: **antisperm antibodies / flow cytometry / infertility / prepubertal boys /**

Wstęp

Przeciwciała przeciwplemnikowe są jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za wywołanie niepłodności na tle immunologicznym. Wywierają one wpływ na proces spermatogenezy, transport plemników w drogach rozrodczych, wzmożoną fagocytozę, blokowanie kapacytacji plemników i reakcji akrosomalnej, interakcję plemników z komórką jajową oraz przebieg wczesnych etapów rozwoju zarodkowego [1].

U mężczyzn powstawaniu przeciwciał przeciwplemnikowych sprzyja przerwanie bariery krew-jądro oraz niedobór czynników immunosupresyjnych, odgrywających rolę w utrzymaniu aktywnej tolerancji wobec męskich komórek rozrodczych. Innymi czynnikami sprzyjającymi wytwarzaniu przeciwciał przeciwplemnikowych u mężczyzn są: przewlekłe infekcje, żyłaki powróżka, wnetrostwo (kryptorchizm), podwiązanie (przecięcie) nasieniowodów [2].

U chłopców przed pokwitaniem brak jest dojrzałych plemników, czego konsekwencją jest brak w pełni uformowanej bariery anatomicznej oraz stan nieefektywnej immunosupresji.

Najczęstszymi patologiami układu rozrodczego u chłopców są: skręt jądra, ruchome gonady, wnetrostwo. Stwierdzono, że wady anatomiczne w męskich drogach rozrodczych mogą indukować powstawanie przeciwciał reagujących z antygenami powierzchniowymi plemników. Przeciwciała mogą być wykrywane w testach z utrwalonymi antygenami (test radioimmunologiczny CB-RIA, ilościowy test immunosorbentowy ELISA). Przeciwciała przeciwplemnikowe oznacza się także przy pomocy pośredniego testu IBT (ang. *indirect immunobead binding test*; IDIBT). Przy pomocy IDIBT stwierdzono ich występowanie u ok. 7% badanych chłopców z patologią w drogach rozrodczych [3].

Czynnikiem sprzyjającym rozwojowi reakcji autoimmunologicznej u chłopców przed pokwitaniem jest obniżony poziom

testosteronu oraz występowanie w niedojrzałej gonadzie męskiej epitopów o reaktywności krzyżowej z drobnoustrojami (powodujących pierwotne powstawanie przeciwciał w odpowiedzi na antygeny inne niż plemnikowe).

Problem występowania przeciwciał przeciwplemnikowych u chłopców przed pokwitaniem pozostaje nadal kontrowersyjny. Istnieją również doniesienia o braku występowania przeciwciał skierowanych przeciw antygenom plemnikowym w tej grupie wiekowej. W pracach tych przeważnie stosowano test IDIBT z wykorzystaniem żywych plemników [4].

Metody oparte na wykorzystaniu żywych plemników należą do najbardziej informatywnych diagnostycznie metod oznaczania przeciwciał przeciwplemnikowych.

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) rekomenduje do oceny przeciwciał przeciwplemnikowych test IBT oraz test MAR (*mixed antiglobulin reaction*) [5].

Test IBT uważany za „złoty standard” pozwala specyficznie zidentyfikować immunoglobuliny związane z powierzchnią plemnika. W teście DIBT (*direct immunobead binding test*) oznaczane są przeciwciała związane do powierzchni plemników, natomiast test IDIBT wykorzystywany jest do oznaczeń przeciwciał przeciwplemnikowych występujących w płynach ustrojowych, takich jak: surowica, śluz szyjkowy, plazma nasienna i innych o ile są dostępne do badań. Pomiary wykorzystujące cytometrię przepływową (FCM – *flow cytometry measurement*) do oceny przeciwciał utorowały sobie szybki dostęp do aplikacji diagnostycznych. Adaptacja cytometrii przepływową do oceny parametrów nasienia miała miejsce ponad 20 lat temu i pierwotnie dotyczyła oceny zawartości DNA [6].

Obecnie cytometria przepływowa znalazła zastosowanie w ocenie żywotności plemników, funkcji mitochondriów, integralności akrosomu, statusu kapacytacji, płynności błony itp. [7].

Wykorzystanie cytometrii przepływowej do oceny występowania przeciwciał przeciwplemnikowych pozwoliło na zobiektywizowanie metod immunofluorescencyjnych. Umożliwiło ocenę dużo większej liczby plemników (>10 000) w krótkim czasie w porównaniu z testem IBT, w którym ocena dotyczy zwykle 200 komórek. Dodatkowym atutem wydaje się być wyeliminowanie subiektywnej oceny obserwatora(ów) na korzyść komputerowej analizy danych. Być może czynnik ten obok prawidłowego doboru surowic pacjentów do badań pozwoli na rozwiązanie kontrowersji wokół występowania przeciwciał przeciwplemnikowych u chłopców przed pokwitaniem.

Cel pracy

Celem podjętych badań była analiza występowania i reaktywności przeciwciał przeciwplemnikowych w surowicy u niepełnych osób dorosłych oraz chłopców przed pokwitaniem z wadami w drogach rozrodczych w celu określenia trafności doboru metody z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

Materiał i metody

Surowica

Materiał do badań stanowiły próbki surowic krwi obwodowej pozyskane od niepełnych kobiet (n=10) i mężczyzn (n=22), płodnych kobiet (n=6) i mężczyzn (n=4), chłopców przed pokwitaniem z wnetrostwem (n=33), zdrowych chłopców przed pokwitaniem (n=10). Wiek badanych osób dorosłych wynosił od 25-44 lat. Grupę niepełnych kobiet i mężczyzn stanowiły osoby długotrwale leczone (2-8 lat) z powodu niepełności.

U kobiet przeprowadzono komplet szczegółowych badań ginekologicznych z uwzględnieniem laparoskopii i histeroskopii (m.in. prawidłowa owulacja oraz profil hormonalny, drożne jajowody), wykluczono endometriozę.

Wszyscy mężczyźni posiadali prawidłowe spermioqramy (normozoospermia). Z powodu braku zdefiniowanej przyczyny niepełności pacjentów zakwalifikowano do grupy niepełności małżeńskiej z niewyjaśnionych przyczyn, tzw. niepełności idiopatycznej.

Plemniki

Plemniki stanowiące źródło antygenów plemnikowych pozyskiwano z normozoospermicznych ejakulatów. Plemniki badano bezpośrednim testem z użyciem paciorków poliakryloamidowych opłaszczonych antyglobulinami (DIBT – *direct immunobead binding test*) w celu wykluczenia opłaszczenia autoprzeciwciałami. Oznaczenia poziomu przeciwciał przeciwplemnikowych wykonywano przy użyciu testu pośredniego z użyciem paciorków poliakryloamidowych opłaszczonych antyglobulinami (IDIBT – *indirect immunobead binding test*) [4] oraz pośrednią metodą oznaczania przeciwciał przeciwplemnikowych w surowicy z wykorzystaniem cytometru przepływowego.

Badane na obecność przeciwciał przeciwplemnikowych próbki surowicy inkubowano z frakcją plemników o zachowanym ruchu postępowym, uzyskaną od zdrowych ochotników.

Następnie plemniki inkubowano z przeciwciałem poliwalentnym skierowanym przeciw ludzkiej immunoglobulinie A, G lub M sprzężonym z fluorochromem np. FITC (*fluorescein isothiocyanate*). Do badanej próbki plemników dodawano jodek propidyny w celu eliminacji odczytu martwych komórek. Ocenie poddawano co najmniej 25 000 komórek.

Oznaczenia wykonano przy użyciu cytometru przepływowego firmy Beckman Coulter Cell Lab QuantaTMSC oraz przeciwciał: Cell Lab Goat F(ab')₂: Anti-Human IgA; Anti-Human IgG; Anti-Human IgM; Anti-Human Ig(A+G+M).

Obliczenia statystyczne

Obliczenia statystyczne wykonano przy pomocy programu STATISTICA 7. Różnice statystyczne pomiędzy badanymi grupami oszacowano przy użyciu dwóch testów nieparametrycznych: dla zmiennych zależnych – testu Wilcozona oraz dla zmiennych niezależnych – testu U Manna-Whitneya. Korelacje między badanymi parametrami obliczono wyliczając współczynnik korelacji rang Spearmana. Oznaczeń wartości progowych dokonano przy pomocy wykresów krzywej ROC (*receiver operating curve*).

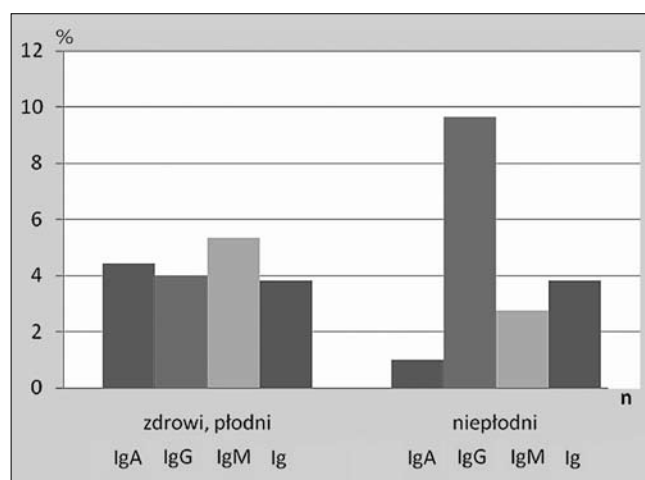
Badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej, a próbki pochodziły z niewykorzystanego materiału biologicznego pozyskanego po przeprowadzeniu diagnostyki.

Wyniki

Przy pomocy testu IDIBT oznaczono przeciwciała przeciwplemnikowe w surowicy od 42 osób dorosłych. W próbkach surowic od płodnych osób dorosłych (n=10) nie stwierdzono obecności przeciwciał przeciwplemnikowych. Wśród surowic od osób niepełnych (n=32) przeciwciała przeciwplemnikowe przekroczyły wartość 20% związanych plemników w 11 próbkach. (Tabela I).

W próbkach surowic u zdrowych chłopców nie stwierdzono obecności przeciwciał przeciwplemnikowych. W próbkach surowic od chłopców z wnetrostwem zanotowano trzy przypadki pozytywne (powyżej 20%) oraz dwa powyżej 10% związanych przeciwciałami. (Tabela II).

Oznaczono przeciwciała przeciwplemnikowe w próbkach surowic u osób dorosłych (n=42) pośrednim testem cytometrii przepływowej. Porównanie poziomów przeciwciał w badanych klasach IgA, IgG, IgM oraz łącznie Ig(A+G+M) pomiędzy populacjami osób zdrowych i płodnych (n=10) wobec niepełnych (n=32) nie wykazało istotnych statystycznie różnic (Rycina 1), (Tabela III).



Rycina 1. Przeciwciała przeciwplemnikowe oznaczone w populacji osób dorosłych testem z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Wyniki reprezentują obliczone wartości mediany dla poszczególnych klas immunoglobulin.

Tabela I. Przeciwciała przeciwciałek klasy IgA, IgG, IgM oznaczone u osób dorosłych, niepełnych, testem IDIBT.

izotyp	n	mediana	minimum	maksimum	odchylenie przeciętne	punkt odcięcia dla wartości pozytywnych
IgA	24	0,00	0,00	37,00	7,28	20,00
IgG	24	1,00	0,00	65,00	19,47	20,00
IgM	24	0,00	0,00	32,00	3,61	20,00
Ig	9	16,00	2,00	21,00	4,74	20,00

Tabela II. Przeciwciała przeciwciałek klasy IgA, IgG, IgM oznaczone u chłopców z wnetrostwem, testem IDIBT.

izotyp	n	mediana	minimum	maksimum	odchylenie przeciętne	punkt odcięcia dla wartości pozytywnych
IgA	6	0,00	0,00	34,00	8,38	10
IgG	6	9,00	0,00	15,00	3,10	10
IgM	6	0,00	0,00	3,00	2,15	10
Ig	27	10,00	0,00	24,00	6,25	10

Tabela III. Przeciwciała przeciwciałek klasy IgA, IgG, IgM oznaczone u osób dorosłych, niepełnych techniką cytometrii przepływowej.

izotyp	n	mediana	minimum	maksimum	odchylenie przeciętne	punkt odcięcia dla wartości pozytywnych
IgA	32	0,98	0,28	33,99	7,14	1,29
IgG	32	9,66	0,11	69,72	13,63	6,17
IgM	32	2,76	0,62	50,23	6,15	6,52
Ig	32	3,83	0,63	37,03	7,60	3,90

Tabela IV. Przeciwciała przeciwciałek klasy IgA, IgG, IgM oznaczone u chłopców z wnetrostwem techniką cytometrii przepływowej.

izotyp	n	mediana	minimum	maksimum	odchylenie przeciętne	punkt odcięcia dla wartości pozytywnych
IgA	33	4,66	0,26	72,75	8,67	2,38
IgG	33	3,85	0,10	55,97	11,17	1,19
IgM	33	6,32	0,20	59,72	8,71	3,50
Ig	33	5,36	0,36	52,88	9,72	2,42

Przeciwciała przeciwciałek oznaczono w próbkach surowic od 43 chłopców przed pokwitaniem, przy pomocy testu cytometrii przepływowej. Porównując poziomy przeciwciał uzyskane dla chłopców zdrowych ($n=10$) i chłopców z wnetrostwem ($n=33$) uzyskano statystycznie znamienne różnice dla wszystkich badanych klas przeciwciał. (Rycina 2), (Tabela IV).

Obliczone na podstawie krzywej ROC punkty odcięcia dla wartości pozytywnych (test cytometrii przepływowej), w populacji niepełnych osób dorosłych, były generalnie wyższe niż dla populacji chłopców i wynosiły: dla przeciwciał klasy IgA $>1,29$, dla przeciwciał klasy IgG $>6,17$, dla przeciwciał klasy IgM $>6,52$ oraz dla przeciwciał Ig (A+G+M) $>3,9$. (Tabela III).

Obliczone na podstawie krzywej ROC punkty odcięcia dla wartości pozytywnych, w populacji chłopców przed pokwita-

niem, wynosiły: dla przeciwciał klasy IgA $>2,38$, dla przeciwciał klasy IgG $>1,19$, dla przeciwciał klasy IgM $>3,50$ oraz dla przeciwciał Ig (A+G+M) $>2,42$. (Tabela IV).

Porównanie wyników uzyskanych przy pomocy testu IBT oraz FCM wykazało istnienie tylko jednej korelacji pomiędzy zastosowanymi testami tj. dla przeciwciał przeciwciałek klasy IgG w populacji osób dorosłych, gdzie współczynnik korelacji rang Spearmana wynosił $r=0,507$ ($p=0,012$). (Rycina 3).

Ocena wartości diagnostycznej testu wykrywania przeciwciał przeciwciałek w populacji chłopców przed pokwitaniem oraz populacji osób dorosłych wykazała generalnie niższe wartości dla populacji osób dorosłych poza wartościami dla przeciwciał przeciwciałek klasy IgG w próbkach surowic od osób dorosłych. (Tabela V, tabela VI).

Tabela V. Ocena wartości diagnostycznych testu z wykorzystaniem cytometrii przepływowej dla wykrywania AsA w populacji chłopców przed pokwitaniem.

	IgA	IgG	IgM	Ig
Czułość	78	78	78	72
Swoistość	90	50	90	80
PPV	96	83	96	92
NPV	56	42	54	47

Tabela VI. Ocena wartości diagnostycznych testu dla wykrywania AsA w populacji osób dorosłych.

	IgA	IgG	IgM	Ig
Czułość	59	56	63	50
Swoistość	100	90	50	60
PPV	100	95	80	80
NPV	43	39	29	27

Dyskusja

Występowanie przeciwciał przeciwplemnikowych u chłopców z wadami anatomicznymi w układzie rozrodczym (np. z wnątrostwem) jest przedmiotem licznych doniesień.

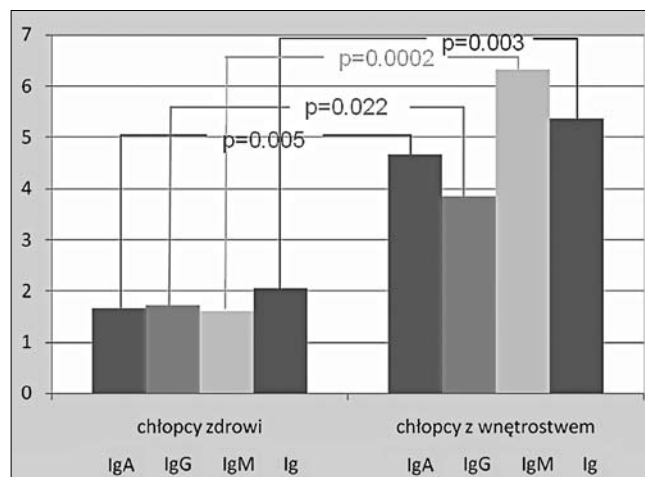
We wcześniej opublikowanych pracach wskazywaliśmy, że przeciwciała przeciwplemnikowe występują w populacji chłopców przed pokwitaniem z wadami w układzie rozrodczym [3, 8]. Obecność takich przeciwciał stwierdziliśmy za pomocą wielu testów detekcyjnych. Początkowo przeciwciała oznaczano przy pomocy technik ELISA i radioimmunologicznego z utrwalanymi antygenami plemnikowymi [8].

W dalszej kolejności przeciwciała przeciwplemnikowe wykrywano testami z użyciem żywych plemników (IDIBT i FCM) [3]. Jednocześnie w literaturze przedmiotu ukazywały się publikacje negujące występowanie przeciwciał przeciwplemnikowych u chłopców przed pokwitaniem [4].

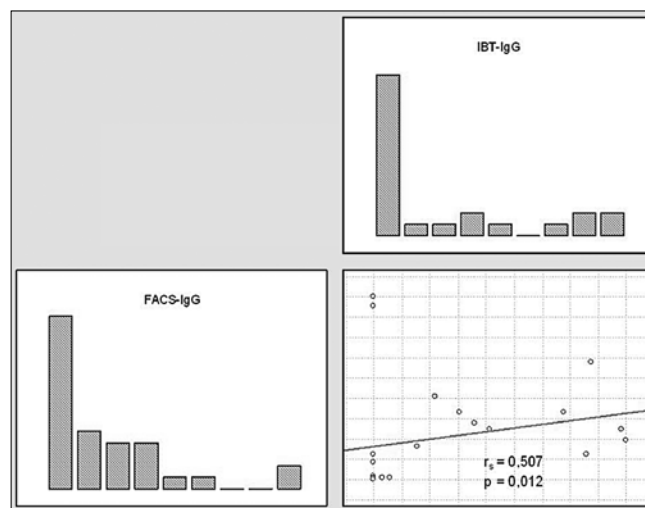
W obecnej pracy przedstawiono badania wykonane przy pomocy cytometrii przepływowej walidując je wobec rekomendowanego przez WHO testu IBT dla oceny przeciwciał przeciwplemnikowych u osób dorosłych.

Uzyskane wyniki oznaczania przeciwciał przeciwplemnikowych w teście rekomendowanym przez WHO sugerują wiarygodne oznaczanie przeciwciał przeciwplemnikowych techniką IBT w populacji osób dorosłych i brak zdolności dyskryminacyjnych tego testu dla populacji chłopców przed pokwitaniem [4].

Uzyskane przez nas wyniki sugerują, że pośrednia metoda z wykorzystaniem cytometrii przepływowej dobrze rozróżnia poziomy przeciwciał przeciwplemnikowych w grupie chłopców



Rycina 2. Przeciwciała przeciwplemnikowe oznaczone w populacji chłopców przed pokwitaniem przy pomocy cytometrii przepływowej. Wyniki reprezentują obliczone wartości mediany dla poszczególnych klas immunoglobulin.



Rycina 3. Korelacja pomiędzy testem IDIBT i testem pośrednią cytometrii przepływowej dla oznaczania przeciwciał przeciwplemnikowych klasy IgG w surowicy niepełnych osób dorosłych ($r_s=0,507$; $p=0,012$).

przed pokwitaniem z wadami anatomicznymi w drogach rozrodczych wobec populacji zdrowej. Nie jest za to wiarygodna w grupie niepełnych osób dorosłych (brak statystycznie znaczących różnic pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną). Karimi i wsp. [9] także podjęli próbę oceny poziomów przeciwciał przeciwplemnikowych w surowicy przy pomocy cytometrii przepływowej. Podobnie jak i w naszych badaniach nie uzyskali oni korelacji pomiędzy poziomami przeciwciał klasy IgA, G, M a niepełnością. Wskazali zatem, że pośrednia metoda FCM nie jest użyteczna w rozróżnieniu pomiędzy populacją dorosłych osób płodnych wobec niepełnych.

Warto zauważyć, że FCM do tej pory nie uzyskała rekomendacji Światowej Organizacji Zdrowia jako metoda oznaczeń przeciwciał przeciwplemnikowych. Jedną z przyczyn jest fakt, że nie wszystkie rodzaje przeciwciał przeciwplemnikowych są odpowiedzialne za wywoływanie niepełności. Niektóre mogą na przykład występować zarówno w populacji zdrowych (płodnych) jak i niepełnych osób [10].

Rozpatrując dynamiczny rozwój metod diagnostycznych związanych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, opublikowano stosunkowo niewiele doniesień dotyczących zastosowania tej techniki do oceny przeciwciał przeciwpłemnikowych [11, 12, 13, 14, 15, 16]. Jedną z niewątpliwych korzyści wynikających z zastosowania FCM jest możliwość zwiększenia liczby komórek poddawanych ocenie. W teście IDIBT zwykle wykonywana jest ocena 200 komórek, natomiast w teście z wykorzystaniem cytometrii przepływowej najmniejszą liczbą poddawaną ocenie jest 15 000. Sam pomiar dokonywany jest w stosunkowo krótkim czasie. Komputerowa ocena pozwala na pozbycie się subiektywizmu oceny mikroskopowej. FCM daje też możliwość większej powtarzalności badań. Podobnie jak test IBT, cytometria opiera się na detekcji przeciwciał reagujących z antygenami powierzchniowymi żywych plemników. Klasyfikacja izotypów przeciwciał możliwa jest w teście IBT jak i w teście z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (dotyczy przeciwciał klasy IgA, IgG, IgM). Jednak jedynie w teście IBT można określać topografię wiązania przeciwciał do powierzchni plemników.

Przedmiotem dyskusji pozostaje pytanie, czy przeciwciała związane do końcowego odcinka witki są wykrywane mniej precyzyjnie w FCM od tych związanych z powierzchnią główki. Przeciwciała przeciwpłemnikowe w surowicy chłopców przed pokwitaniem, w teście IDIBT, są wykrywane głównie w końcowym odcinku witki [3]. Z kolei gęstość antygenów na powierzchni główki może być większa w porównaniu z witką i przez to potencjalnie więcej przeciwciał może wiązać się do główki plemnika w teście pośrednim FCM. Haas [11] wskazywał, że test IDIBT jest bardziej czuły od pośredniej metody FCM dla wykrywania niskich poziomów przeciwciał przeciwpłemnikowych.

W naszych badaniach ta zależność jest odwrotna. Pacjenci, u których nie stwierdzono obecności przeciwciał pośrednim testem IBT wykazywali pewne poziomy przeciwciał przeciwpłemnikowych metodą FCM. Do oznaczeń metodą FCM stosowaliśmy fragmenty F(ab')₂ poliklonalnych przeciwciał, wykluczaliśmy przez to problem odczynów fałszywie dodatnich mediowanych przez receptory Fc obecne na plemnikach.

Różnice związane z topografią wykrywania przeciwciał w teście IDIBT oraz pośrednim teście FCM mogą być główną przyczyną braku korelacji wyników oznaczeń przeciwciał przeciwpłemnikowych uzyskanych przy pomocy tych dwóch testów. Räsänen i wsp. [17] zaobserwowali pozytywną korelację między pośrednim testem cytometrii przepływowej i IDIBT dla przeciwciał klasy IgG w płazmie nasiennej. W naszych badaniach również wykazaliśmy pozytywną korelację pomiędzy tymi testami dla przeciwciał klasy IgG w surowicy, jednak tylko w populacji osób dorosłych. (Rycina 3).

Nie uzyskano korelacji dla przeciwciał przeciwpłemnikowych pozostałych klas zarówno w populacji osób dorosłych jak i żadnych korelacji dla przeciwciał przeciwpłemnikowych, oznaczonych w populacji chłopców przed pokwitaniem pomiędzy stosowanymi testami.

Parametry wskazujące na trafność doboru testu detekcyjnego wskazywały jednoznacznie na wyższość testu FCM dla oznaczania przeciwciał przeciwpłemnikowych w populacji chłopców przed pokwitaniem w porównaniu z IDIBT.

Diagnostyka immunologiczna pomijana jest w algorytmach diagnostyczno-terapeutycznych niepłodności w kraju, pomimo pojawiania się wciąż nowych faktów naukowych [18]. Wiąże się

to z brakiem ośrodków diagnostycznych, które chciałyby wykonywać procedury zgodne z rekomendacjami WHO.

Badania metodą cytometrii przepływowej mogłyby jednak doprowadzić do upowszechnienia diagnostyki przeciwciał przeciwpłemnikowych, ze względu na obiektywizm i prostotę pomiaru. Wiąże się to jednak z zakupem stosunkowo kosztownego instrumentu i stosownym przeszkoleniem personelu. Dalsza walidacja pomiarów przeprowadzonych przy użyciu cytometrii przepływowej wobec testów rekomendowanych przez WHO leży w sferze pilnych zadań badawczych autorów niniejszej pracy.

Wnioski

Metoda oznaczeń przeciwciał przeciwpłemnikowych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej spełnia kryteria doboru trafności testu dla populacji chłopców przed pokwitaniem. Dla populacji osób dorosłych kluczowym będzie zdiagnozowanie większej grupy niepłodnych osób, ponieważ dla badanej grupy kryteria doboru trafności testu nie zostały spełnione.

Jednakże przeprowadzone badania dają przesłankę, że nie wszystkie parametry statystyczne uda się poprawić poprzez proste zwiększenie liczebności grupy, tak więc wnioski wyprowadzone z toku przedstawionych badań w aspekcie detekcji przeciwciał przeciwpłemnikowych u chłopców przed pokwitaniem należy uważać za uzasadnione.

Pracę przygotowano w ramach realizacji grantu KBN nr N406 078 31/3016 oraz NR13 0066 06.

Piśmiennictwo

- Domagała A, Kasprzak M, Kurpisz M. Odpowiedź immunologiczna przeciw plemnikom w układzie rozrodczym człowieka. *Ginekol Pol.* 1996, 67, 304-308.
- Urry L, Carrell D, Starr N. The incidence of antisperm antibodies in infertility patients with a history of cryptorchidism. *J Urol.* 1994, 151, 381-383.
- Domagała A, Havryluk A, Nakonechny A, [et al.]. Antisperm antibodies in prepubertal boys with cryptorchidism. *Arch Androl.* 2006, 52, 411-416.
- Mirilas P, Mamoulakis C, De Almeida M. Puberty does not induce serum antisperm surface antibodies in patients with previously operated cryptorchidism. *J Urol.* 2003, 170, 2432-2435.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. *WHO Press*, Geneva, Switzerland, 5th ed. 2010, 108-114.
- Evenson D, Darzynkiewicz Z, Melamed M. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science.* 1980, 210, 1131-1133.
- Cordelli E, Eleuteri P, Leter G, [et al.]. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception.* 2005, 72, 273-279.
- Kurpisz M, Kasprzak M, Mazurkiewicz I. The easy formation of antisperm antibodies in prepubertal boys and the difficult humoral response in severe-combined immunodeficiency mice. *Fertil Steril.* 1996, 66, 805-808.
- Karimi F, Khazaei S, Alaedini F. Serum antisperm antibodies in fertile and infertile individuals. *Iran J Med Sci.* 2008, 33, 88-93.
- Paradisi R, Pession A, Bellavia E, [et al.]. Characterization of human sperm antihens reacting with antisperm antibodies from antologous sera and seminal plasma in a fertile population. *J Reprod Immunol.* 1995, 28, 61-73.
- Haas G, D'Cruz O, DeBault L. Comparison of the indirect immunobead, radiolabeled, and immunofluorescence assays for immunoglobulin G serum antibodies to human sperm. *Fertil Steril.* 1991, 55, 377-388.
- Sinton E, Riemann D, Ashton M. Antisperm antibody detection using concurrent cytofluorometry and indirect immunofluorescence microscopy. *Am J Clin Pathol.* 1991, 95, 242-246.
- Räsänen M, Hovatta O, Penttilä I, [et al.]. Detection and quantitation of sperm-bound antibodies by flow cytometry of human semen. *J Androl.* 1992, 13, 55-64.
- Ke R, Dockter M, Majumdar G, [et al.]. Flow cytometry provides rapid and highly accurate detection of antisperm antibodies. *Fertil Steril.* 1995, 63, 902-906.
- Nikolaeva, Kulakov V, Goukasian I, [et al.]. Flow cytometry study on the effect of serum and peritoneal fluid of women on sperm-binding activity of immunoglobulin G antisperm antibodies. *Fertil Steril.* 1997, 67, 680-686.
- Bohring C, Skrzypek J, Krause W. Influence of antisperm antibodies on the acrosome reaction as determined by flow cytometry. *Fertil Steril.* 2001, 76, 275-280.
- Räsänen M, Agrawal Y, Saarikoski S. Seminal fluid antisperm antibodies measured by direct flow cytometry do not correlate with those measured by indirect flow cytometry, the indirect immunobead test, and the indirect mixed antiglobulin reaction. *Fertil Steril.* 1996, 65, 170-175.
- Krause W, Naz R. Immune Infertility. The impact of immune reactions on human infertility. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.