

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑ

Μαρία Σ Βενετίκου, MD, DipEndo, PhD, Ενδοκρινολόγος

Καθηγήτρια Παθοφυσιολογίας-Νοσολογίας, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας (ΣΕΥΠ),
Τμήμα Βασικών Ιατρικών Μαθημάτων, Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΑΤΕΙ),
Αιγάλεω, Αθήνα

Address for Correspondence: Dr MS Venetikou, MD, DipEndo, PhD, 88, Agias Varvaras St, Halandri,
15231, Athens, Greece, Mobile : 00306974187896, Tel and Fax : 00302106716676, E – mail : mvenet@teiath.gr

Περίληψη

Το άρθρο αυτό είναι μια ανασκόπηση των εφαρμογών της κυτταρομετρίας ροής στην ενδοκρινολογία

Λέξεις κλειδιά : *κυτταρομετρία ροής, ενδοκρινική λειτουργία, επινεφρίδια, γονάδες, εξωσωματική γονιμοποίηση*

Εισαγωγή

Η ενδοκρινολογία έχει κερδίσει πολλά από την κυτταρομετρία ροής. Αρκετές μελέτες έχουν γίνει συνδέοντας τα ενδοκρινικά μεγέθη με τις τεχνικές της κυτταρομετρίας.

Εφαρμογές στην μελέτη στεροειδών των επινεφριδίων

Η μέτρηση επίπεδων του **ενδοκυτταρικού υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών** (glucocorticoid receptor-GCR) μπορεί να είναι χρήσιμη στην παρακολούθηση λειτουργικών διαταραχών του υποθαλαμο-υποφυσιακού επινεφριδιακού άξονα (Hypothalamo-Pituitary Adrenal –HPA) από τις επιδράσεις της παρατεταμένης χορήγησης θεραπείας με στεροειδή. Μετρήσεις δέσμησης κυτοσολικών μορίων έχουν εμπλουτισθεί σήμερα με μέτρηση υποδοχέων μεμονομένων κυττάρων.

Η μέθοδος που γενικά χρησιμοποιείται στην ανίχνευση του GCR είναι η cytosolic radioligand binding assay (CRBA). Είναι ποσοτική αλλά χρειάζεται πολύ χρόνο και μεγάλο αριθμό κυττάρων, που δεν είναι συνήθως καλά χαρακτηρισμένα. Πρόσφατα χρησιμοποιείται ένα **μονοκλωνικό αντίσωμα** ενάντια στον ανθρώπινο GCR (sequence anti50-176 AA) και επιτρέπει την μέτρηση του GCR με κυτταρομετρία ροής. Αυτή η μέθοδος είναι **ημι-ποσοτική**, αλλά επιτρέπει την ανίχνευση του GCR σε καλώς διαφοροποιημένους κυτταρικούς πληθυσμούς. Η σύγκρισή της με καθιερωμένες μεθόδους δέσμησης σε **T-κύτταρα** με γνωστό ποσό GCR έδειξε ανάλογα αποτελέσματα. Μελετήθηκαν υγιή άτομα και ασθενείς με μετατραυματική διαταραχή του στρες (post traumatic stress disorder-PTSD) με ψυχιατρικά συμπτώματα και βιολογικές αλλαγές του HPA άξονα καθώς και αλλαγές στον αριθμό GCR των λεμφοκυττάρων και αλλαγές σε διάφορες ανοσολογικές παραμέτρους. Η υψηλότερη έκφραση του GCR παρατηρήθηκε σε NK κύτταρα και στις δύο ομάδες παρ' ότι οι PTSD ασθενείς είχαν χαμηλότερη σχετική ποσότητα του GCR σε όλους τους 3 λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς (Gotovak et al., 2003).

Η κυτταρομετρική μελέτη της έκφρασης του GCR σε κυτταρικούς υποπληθυσμούς λεμφοκυττάρων μπορεί να είναι χρήσιμη διαδικασία για την παρακολούθηση της ανοσορυθμιστικής δράσης των γλυκοκορτικοειδών σε απάντηση στο στρες.

Παρ' ότι δεν μπορεί να αντικαταστήσει την ποσοτική μέτρηση δέσμησης που δίνει περισσότερη πληροφορία σχετικά με τον υποδοχέα, η κυτταρομετρική μέθοδος παρ' ότι είναι ημι-ποσοτική, **προσφέρει προτέρημα στην ανίχνευση ολικού (κυτταροπλασματικού, ελεύθερου, πυρηνικού και ορμονοδεσμευμένου) GCR σε**

καλώς χαρακτηρισμένους κυτταρικούς πληθυσμούς (Gotovac et al., 2003).

Σε επινεφριδιακά αδενώματα του φλοιού (Shono et al., 2002), οι κυτταρομετρικές μελέτες μπορεί να είναι χρήσιμες στην μελέτη της σχέσης του DNA και της πloidίας, των ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών και του κλινικού συνδρόμου, διότι τα κύτταρα συχνά δείχνουν ποικιλία τόσο σε πυρηνικό μέγεθος όσο και σε εμφάνιση. Σε μία μελέτη, 44 αδενώματα που σχετίζονταν με πρωτοπαθή υπεραλδοστερονισμό και 23 αδενώματα που σχετίζονταν με σύνδρομο Cushing συγκρίθηκαν με φυσιολογικούς αδένες ασθενών με νεφρικό καρκίνωμα που χρησιμοποιήθηκαν σαν ομάδα ελέγχου. Οι αδένες, μετά από παραφίνη, εξετάστηκαν σχετικά με το DNA τους με κυτταρομετρία ροής. Η μέθοδος οδήγησε το συμπέρασμα ότι **τα φλοιικά αδενώματα του φλοιού που σχετίζονται με πρωτοπαθή υπεραλδοστερονισμό συχνά φανερώνουν σοβαρό πυρηνικό πλειομορφισμό, και φαίνεται ότι ο πυρηνικός αυτός πλειομορφισμός μάλλον οφείλεται σε τετραπloidική κυτταρική σειρά (stemline).**

Εφαρμογές στην λειτουργία των γονάδων (όρχεων και ωοθηκών)

Η κυτταρομετρία ροής φαίνεται να έχει καλή εφαρμογή στην μελέτη της **σπερματογένεσης καθώς και αυτών καθ' αυτών των σπερματοζωαρίων.**

Πέραν της αρχικής χρησιμοποίησης της κυτταρομετρίας ροής, **στον εμπλουτισμό των σπερματοζωαρίων**, με καλά αποτελέσματα σήμερα χρησιμοποιείται και σε μελέτες αυτού καθ' αυτού του **DNA** των σπερματοζωαρίων.

Η κυτταρομετρία ροής με την βοήθεια ειδικών χρωστικών είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί τόσο για **τον εμπλουτισμό όσο και των διαχωρισμό του σπέρματος σε X και Y πληθυσμούς ανάλογα με τις κλινικές ανάγκες γονιμοποίησης** τόσο σε φυσιολογικούς κύκλους όσο και σε κύκλους IVF. Πρόσφατες μελέτες με εμπλουτισμό (microsort enrichment) των X και Y σπερματοζωαρίων απέδειξε ότι τόσο η γονιμοποίηση, αλλά και αναλογία αποβολών και εγκυμοσύνης δεν διαφέρουν από τις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιείται φυσιολογικό μη διαχωρισμένο (non-sorted) σπέρμα (Karabinus, 2009).

Οι μέθοδοι παραγωγής καλύτερης ποιότητας σπέρματος σε κέντρα IVF με **χαμηλό ποσοστό αποπτωτικών παραγόντων (density gradient centrifugation and swim-up)** βασίζονται στην κυτταρομετρία ροής με άριστα αποτελέσματα σε IVF/ICSI κέντρα (Ricci et al., 2009). Επίσης τεχνικές κυτταρομετρίας ροής με χρώση με φθορισμό είναι χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση απόπτωσης σπέρματος με πιθανή εφαρμογή στο IVF (Marchetti et al., 2004).

Φυσικά η χρήση των ανωτέρω τεχνικών δεν βρίσκει θιασώτες μόνο στην ανθρώπινη αναπαραγωγή όταν συντρέχουν κλινικοί λόγοι επιλογής αλλά και στην κτηνιατρική επιλογή αναλόγων εμβρύων με τεχνικές εμπλουτισμού σπέρματος για λόγους ελεγχόμενης ζωικής αναπαραγωγής (Palma et al., 2008, Lu et al., 2007, Puglisi et al., 2006) με άριστα αποτελέσματα αλλά και ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις που ενδέχεται να βοηθούν την πρόοδο στην υποβοηθούμενη ανθρώπινη με τροποποίηση των μεθόδων και των ηθικών κανόνων και περιορισμών.

Παράλληλα η κυτταρομετρία ροής μπορεί να ελέγξει τόσο την **ακεραιότητα του DNA** των σπερματοζωαρίων που θα χρησιμοποιηθούν σε τεχνικές ICSI/IVF (Candini et al., 2004), όσο και το ποσοστό χαρακτηριστικών του **όπως μεθυλίωση και ανωμαλία δομής και αριθμού (πloidία).**

Σε μία μελέτη IVF κύκλων σχετικά με την μεθυλίωση του DNA των σπερματοζωαρίων που μετρήθηκε με τεχνική κυτταρομετρίας ροής, όταν η μεθυλίωση ήταν αυθαίρετα υψηλή (>555 Units), η συχνότης επίτευξης εγκυμοσύνης σε IVF κύκλους ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη (Benchaib et al., 2005). Σε

φυσιολογικά γόνιμους άνδρες σε κύκλους IVF γυναικών η μεθλίωση του σπερματικού DNA είναι δυνατόν στο μέλλον να αποτελέσει μία εύκολη παράμετρο επιλογής καταλληλοτέρου σπέρματος προς γονιμοποίηση.

Επίσης στις εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής βασίζονται και μελέτες άλλων παραμέτρων του σπέρματος όπως η **γλυκοζυλίωση** (θεωρείται ότι προστατεύει το σπέρμα από τις ανοσολογικές επιδράσεις του γυναικείου συστήματος) (Seppala et al., 2007), καθώς και η διερεύνηση σχέσεων μεταξύ του δυναμικού ενέργειας της **μιτοχονδριακής μεμβράνης**, της κινητικότητας και του δυναμικού γονιμοποίησης (Kasai et al., 2002), σε συνδυασμό με **ROS** (reactive oxygen species), **κατακερματισμό του DNA και ζωτικότητα** (Machetti et al., 2002).

Επίσης με την βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής μπορεί να αξιολογηθεί η φυσιολογικότητα η μη του «πακεταρίσματος» της χρωματίνης (chromatin packing) που θεωρούμε ότι συνεισφέρει στην εκδήλωση της ανδρικής υπογονιμότητας (Filatov et al., 1999).

Σε 25 μη γόνιμους άνδρες με αζωοσπερμία η oligοσπερμία, διεξήχθη μια κυτταρομετρική μελέτη, ώστε να διερευνηθεί η **πλοιδία του DNA** με ταυτόχρονη ιστοπαθολογική μελέτη σε ορχικούς ιστούς.

Η ιστολογική εξέταση έχει δυσκολία να ποσοτικοποιήσει την σπερματογένεση, ενώ η κυτταρομετρία ροής έδειξε την χαρακτηριστική πλοιδία που αντιστοιχεί στην φυσιολογική σπερματογένεση, σε υποσπερματογένεση και σε πλήρη αναστολή (arrest) της σπερματογένεσης, υποσχόμενη στο μέλλον και με περισσότερες μελέτες να αποδείξει ότι η μέθοδος αυτή αφ' ενός συμβαδίζει με την ιστολογική, αφ' ετέρου είναι αντικειμενική επαναλαμβανόμενη αλλά και ποσοτική, δύναται δε να εφαρμοσθεί με ευκολία ακόμη και στα εξωτερικά ιατρεία. Παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με την διερεύνηση της σπερματογένεσης έδειξαν και οι Kostakopoulos et al., σχετικά με την σπερματογένεση, την ορχική βιοψία και την πλοιδία του DNA συγκρίνοντας την ιστολογική προσέγγιση με την κυτταρομετρία ροής. Φαίνεται ότι **υπάρχει καλός συσχετισμός μεταξύ της ιστοπαθολογικής εξέτασης και των ευρημάτων της κυτταρομετρίας.**

Η κυτταρομετρία έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της επίδρασης των γοναδικών στεροειδών στην διάρκεια των φάσεων του εμμηνορυσιακού κύκλου και την επίδραση αυτών καθ' αυτών των ορμονών επί του ανοσολογικού συστήματος.

Έτσι τόσο οι ορμόνες του φύλου όσο και οι υποφυσιακές ορμόνες έχουν επίδραση στην ενεργοποίηση ειδικών υποπληθυσμών των T λεμφοκυττάρων που μπορεί να επηρεάζει την ανοσολογική απάντηση και τις παρατηρούμενες διαφορές των δύο φύλων.

Πολλές μελέτες γίνονται ήδη και σε υποπληθυσμούς λεμφοκυττάρων γυναικών που χρησιμοποιούν υψηλές δόσεις υποφυσιακών γοναδοτροφινών για την διέγερση των ωοθηκών στην διάρκεια εξωσωματικής γονιμοποίησης (in vitro fertilization) (IVF).

Επίσης, η έκφραση των ενδοκυτταρίων κυτοκινών σε **T-helper-1 (Th-1)** και **T-helper-2 (Th-2)** λεμφοκύτταρα έχει επιχειρηθεί σε γυναίκες με αυτόματες αποβολές η και υπογονιμότητα με επανειλημμένες αποτυχίες μετά από κύκλους IVF.

Τα T-helpers είναι είτε CD3+ είτε CD4+ ανάλογα με το προφίλ των κυτοκινών τους. Τα Th-1 παράγουν ιντερφερόνη-γ (INF-γ), ιντερλευκίνη- 2 [(Inteleukin-2) (IL-2)] και Tumour Necrosis Factor-α (TNF-α), ενώ τα Th-2 παράγουν IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13. Σε φυσιολογική εγκυμοσύνη ανευρίσκονται ως απεδείχθη πρόσφατα υψηλά ποσά Th-2, IL-6, IL-10, ενώ σε απώλειες εγκυμοσύνης υψηλά Th-1 και INF-γ. Με την βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής μελετάται ο έλεγχος των περισσότερων κλασμάτων αυτών των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών σε προοπτικές μελέτες για την

ανακάλυψη του ρόλου των σε αυτόματες αποβολές αλλά και σε υπογόνιμες γυναίκες με πολλές αποτυχίες εμφύτευσης μετά από IVF. **Υπάρχει δε ένδειξη ότι η αρθμητική υπεροχή και ανοσολογική απάντηση των Th1 και η συνεισφορά των παραγωμένων κυτοκινών τους ενοχοποιείται σε επανειλημμένες αυτόματες αποβολές αλλά και επανειλημμένων αποτυχιών IVF κύκλων** (Kwak-Kim et al., 2003).

Σε διερεύνηση μέσω κυτταρομετρίας ροής του ανοσολογικού προφίλ του ωοθυλακικού υγρού γυναικών με ενδομητρίωση, σαλπινγικό παράγοντα και γυναικών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα που λάμβαναν μέρος σε IVF θεραπεία, **παρατηρήθηκε ότι στην ιδιοπαθή υπογονιμότητα υπήρχε μεγαλύτερο ποσοστό T λεμφοκυττάρων στο ωοθυλακικό υγρό, ενώ οι ασθενείς με ενδομητρίωση υψηλότερος αριθμός Natural Killers (NK) κυττάρων και B λεμφοκυττάρων** (Lachapelle et al., 1996). Σε άλλες μελέτες με κυτταρομετρία ροής σε γυναίκες στην διάρκεια θεραπείας με IVF παρατηρήθηκε αύξηση τόσο των CD3+, όσο και των HLA-DR+ κυττάρων τόσο στο ωοθυλακικό υγρό όσο και στο πλάσμα (Castilla et al., 1990).

Σε πιο πρόσφατες επίσης μελέτες με την χρήση της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής παρατηρήθηκε ότι μετά από IVF κύκλους συνδυαζόμενους με αποτυχία υπήρχε σημαντική αύξηση του περιφερικού αριθμού των B-CD 19+5+ και σε μερικές ασθενείς και αύξηση των NK κυττάρων (Putowski et al., 2004).

Τα NK λεμφοκύτταρα είναι μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος και εκφράζουν τα επιφανειακά αντιγόνα CD16 και CD56, ιδίως δε το πρώτο εκφράζεται στην πλειονότητα των κυττάρων αυτών. Το CD16 είναι χαμηλής συγγένειας υποδοχέας για τα συμπλέγματα IgG και υπεύθυνος για την εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταροτοξικότητα. Μέσω δε του αντιγόνου CD56, τα NK κύτταρα χωρίζονται σε CD56dim και CD56bright. Τα μεν πρώτα είναι κυτταροτοξικά, τα δε δεύτερα έχουν χαμηλή κυτταροτοξικότητα, αλλά παράγουν ανοσορρυθμιστικές κυτοκίνες όπως η ιντερφερόνη-α και ο TGF-α. Επίσης ενεργοποιητικοί υποδοχείς εκφράζονται στα NK κύτταρα, όπως το CD69 καθώς και άλλοι δείκτες.

Το 90% των περιφερικών NK είναι CD56dim και εκφράζουν υψηλά επίπεδα CD16, που δεν ποικίλουν στην διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου, αλλά ειδικά στην εγκυμοσύνη τα NK είναι κατασταλαμένα. Έχει ήδη αναφερθεί ότι σε πειραματόζωα με έλλειψη σε NK κύτταρα υπάρχει απώλεια εμβρύων, έχει δε αναφερθεί ότι τα NK κύτταρα στο ενδομήτριο ελέγχουν την εξάπλωση της τροφοβλάστης και γι' αυτό αυξάνονται την περίοδο της εμφύτευσης. Διάφορες μελέτες σχετικά με την σχέση στην ενεργοποίηση των NK κυττάρων και την επίδρασή τους στο IVF έχουν γίνει και πολλές διαφορετικές μεθοδολογίες έχουν αναφερθεί.

Οι διάφοροι ερευνητές φαίνεται να συμφωνούν ότι αύξηση των ενεργοποιημένων CD56dim, CD16+ και CD69+ σχετίζεται με ελάττωση της αναλογίας εμφύτευσης σε γυναίκες που βρίσκονται σε θεραπεία με IVF και ότι μπορεί να αποτελέσουν ένα διαγνωστικό test σε αυτές τις γυναίκες. Οι μελέτες των NK κυττάρων γίνονται με κυτταρομετρία ροής και ανάλογο gating (Rai et al., 2005).

Αρκετοί ερευνητές έχουν αναρωτηθεί και μελετούν ήδη τα ανωτέρω σε σχέση με τις μεθόδους υποβοήθησης της αναπαραγωγής και κυρίως τις μεθόδους IVF. Η κυτταρομετρία ροής αποδεικνύεται σημαντική στην καταμέτρηση περιφερικών λεμφοκυττάρων, ώστε να ορίσει τους απόλυτους αριθμούς των NK και των υποκατηγοριών τους σε σχέση με τις διάφορες φάσεις των πρωτοκόλλων του IVF.

Μερικές βέβαια μελέτες δεν παρατήρησαν τέτοιες διαφορές που να προβλέπουν με ασφάλεια διαφορετική ανταπόκριση των κύκλων μόνο με βάση την περιφερική απαρτίωση των ομάδων των NK κυττάρων (Thum et al., 2005). Ωστόσο οι μελέτες

συνεχίζονται με την καταμέτρηση αλλά και την λήψη υπ' όψιν και άλλων παραμέτρων τόσο ορμονικών, όσο και ιστικών.

Η σωστή ανάπτυξη των ωοθυλακίων εξαρτάται και από το απαραίτητο περιβάλλον κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων **και τα μακροφάγα** είναι σημαντική πηγή αυτών των παραγόντων.

Τα μακροφάγα είναι επαγγελματικά φαγοκύτταρα και μπορούν να πέσουν τεμάχια γρηγορότερα και καλύτερα από άλλα κύτταρα λόγω έκφρασης των κυτταρικών υποδοχέων τους. Τα ωοθηκικά μακροφάγα πιθανώς χρησιμοποιούν την φαγοκυττάρωση για να απομακρύνουν αποπτωτικά κύτταρα στην διάρκεια ειδικών φάσεων αναπροσαρμογής των ιστών. Επίσης φαγοκυττάρωνουν ατρητικά κοκκιώδη κύτταρα και αποπτωτικά ωχρινικά συντελώντας έτσι στην ωοθηκική ατρησία και ωχρινόλυση. Παρουσιάζουν πεπτιδικά αντιγόνα επιφανείας και ενεργοποιούν T λεμφοκύτταρα, παράγουν δε κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Δείχνουν δε αλλαγές αριθμού και φαινοτύπου τους ανάλογα με το στάδιο του εμμηνορυσιακού κύκλου και λόγω έκκρισης διαφόρων ενεργών βιομορίων έχουν επίδραση στις διαδικασίες της ωοθήκης.

Οι επιφανειακοί υποδοχείς που εκφράζουν τα μακροφάγα βοηθούν τον εντοπισμό και διαχωρισμό τους όπως η σχεδόν αποκλειστική πρωτεΐνη F4/80 και CD68 (γνωστή ως ανθρώπινη μικροσιαλίνη). Παρ' ότι δεν γνωρίζουμε πολλά για την λειτουργία της F4/80 έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για την απομόνωση των μακροφάγων στους ιστούς. Η CD68 είναι ενδοκυτταρικός δείκτης των μακροφάγων και έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε ανοσοιστοχημικές μελέτες. Τα CD68 θετικά κύτταρα βρίσκονται στις ωοθήκες κυρίως σε αγγειακό συνδετικό ιστό αλλά και περιοχές ωχρού. Άλλοι δείκτες περιλαμβάνουν τους Class II MHC (περιορρηκτικά), τους Fc υποδοχείς, υποδοχείς συμπληρώματος, υποδοχείς μαννόζης, sialoadhesin, scavenger receptors κ.α (Wu et al., 2004). Παράγουν κυτοκίνες, χυμοκίνες και αυξητικούς παράγοντες.

Ένα ποικίλο σύστημα κυτοκινών παράγεται επίσης, όπως η IL-1,-6,-10,12, η ιντερφερόνη α, ο TNFα και ο granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), επηρεάζοντας την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του ωοθυλακίου, την ωορρηξία και την δημιουργία του ωχρού.

Πρόσφατες μελέτες στην υποβοήθηση της ανθρώπινης αναπαραγωγής μέσω IVF, ενοχοποιούν την συμμετοχή της έκκρισης μεγάλου αριθμού κυτοκινών στην δημιουργία του συνδρόμου της υπερδιέγερσης των ωοθηκών (Mathur et al., 1997).

Η παραγωγή χυμοκινών περιλαμβάνει 2 οικογένειες την C-C οικογένεια που περιλαμβάνει την monocyte chemoattractant protein (MCP-1) και MCP-3, την οικογένεια RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) και την οικογένεια C-X-C που συγκεντρώνει εκλεκτικά ουδετερόφιλα και περιλαμβάνει την IL-8, τον ENA-78 (epithelial-derived neutrophil attractant-78), και το GROα (growth regulated oncogene).

Οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα μακροφάγα είναι ο EGF, IGF, VEGF, TGFα και β και είναι όλοι σημαντικοί για την φυσιολογική ωοθηκική λειτουργία, εκφράζονται δε στα κοκκιώδη και στα κύτταρα της θήκης αλλά και στα μακροφάγα κύτταρα. Στην διάρκεια του κύκλου πιθανώς ο ρόλος τους είναι τροποποιητικός μέσω παρακρινικού μηχανισμού. Η ακριβής συμμετοχή των μακροφάγων δεν είναι γνωστή λόγω του ότι οι κυτοκίνες και η αυξητικοί παράγοντες παράγονται τόσο από τα κύτταρα της θήκης, τα κοκκιώδη αλλά και τα μακροφάγα, η δε συμμετοχή τους μπορεί να μελετηθεί μόνο με απομόνωση και μελέτη του κλάσματος των μακροφάγων (Wu et al., 2004).

Πάντως η εφαρμογή της κυτταρομετρίας βοηθά στην διερεύνηση της διασύνδεση της

ανοσολογικής λειτουργίας με την ενδοκρινική σε ποικίλες καταστάσεις. Φαίνεται δε ότι σε καταστάσεις πιο άγνωστες, όπως η ιδιοπαθής υπογονιμότητα, η συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στο μέλλον θα είναι μεγαλύτερη.

Βιβλιογραφία

1. Gotovak K., Sabionello A., Rabatiack S., Berki T., Dekaris D. (2002). "Flow cytometric determination of glucocorticoid receptor (GCR) expression in lymphocyte subpopulations: lower quantity of GCR in patients with post-traumatic stress disorder". *Clinical Experts in Immunology*, 13(12): 335-339.
2. Shono T., Sakai H., Takehara K., Honda S., Kanetake H. (2002). "[Analysis of numerical chromosomal aberrations in adrenal cortical neoplasms by fluorescence in situ hybridization](#)". *Journal of Urology*, 168 :1370-1373.
3. Karabinus D.S. (2009). "Flow cytometric sorting of human sperm:Microsoft clinical trial update". *Theriogenology*. 71 (1): 74-79
4. Marchetti C., Gallego M.A., Defossez A., Formstecher P., Marchetti P. (2004). "Staining of human sperm with fluorochrome-labelled inhibitor of caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters". *Human Reproduction*, 19 (5) 1127-1134.
5. Ricci G., Perticarari S., Boscolo R., Montico M., Guaschino S., Presani G. (2009). "Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient density centrifugation technique". *Fertility Sterility*, 91 (2):632-638.
6. Palma G.A., Olivier N.S., Neumuller Ch. Sinowatz F. (2008). "Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of in vitro fertilization and ultrastructure of in vitro produced bovine blastocysts". *Anatomy Histology Embryology*, 37 (1):67-73.
7. Lu Y., Liang X.W., Zhang M., Wang W.L., Kitiyanant Y., Lu S.S., Meng B., Lu K.H. (2007). "Birth of twins after in vitro fertilization with flow cytometric sorted buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm". *Animal Reproductive Science*, 100 (1-2): 192-196.
8. Puglisi R., Vanni R., Galli A., Balduzzi D., Parati K., Bongioni G., Crotti G., Duchi R., Galli C., Lazzari G., Aleandri R. (2008). "In vitro fertilization with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by real time PCR". *Reproduction*, 132 (3) 519-526.
9. Candini L., Lombardo F., Paoli D., Caruso F., Eleuteri P., Ieter G., Cirimina R., Culasso F., Dondero F., Lenzi A., Spano M. (2004). "Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage". *Human Reproduction*, 19 (6) 1409-1417.
10. Benchaib M., Braun V., Ressenkoff D., Lornage J., Durand P., Niveleau A., Guerin J.F. (2005). "Influence of global sperm DNA methylation on IVF results". *Human Reproduction*, 20 (3) 768-773..
11. Seppala M., Koistinen H., Koistinen R., Chiu P.C.N., Yeung W.S.B. (2007). "Glycosylation related actions of glycodefin: gamete, cumulus cell, immune cell and clinical associations". *Human Reproduction*, 13 (3) :275-287.
12. Marchetti C., Obert G., Deffossez A., Formstecher P., Marchetti P. (2002). "Study of mitochondrial potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm". *Human Reproduction*, 17 (5) 1257-1265.

13. Filatov M., Semenova E.V., Vorobeva O.A., Leonteva O.A., Drobchemko E.A. (1999). "Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results". *Molecular Human Reproduction*, 5 (9): 825-830.
14. Kasai T., Ogawa K., Mizuno K., Nagai S., Uchida Y., Ohta S., Fujie M., Suzuki K., Hirata S., Hoshi K. (2002). "Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility and fertility potential". *Journal of Asian Andrology*, 4 (2) 97-103.
15. Lee S.E., Choo M.S. (1991). "Flow cytometric analysis of testes in infertile men: a comparison of ploidy to the routine histopathologic study". *European Urology*, 20 (1): 33-38.
16. Kostakopoulos A., Georgoulakis J., Deliveliotis C., Spanakis G., Filipidou A., Tamvakis N. (1997). "Deoxyribonucleic acid and flow cytometry in the assessment of spermatogenesis". *Journal of Urology*, 158 (1) 79-81.
17. Giglio T., Imro M.A., Filaci G., Scudelati G., Puppo F., De Cecco L., Indiveri F., Constantini S. (1994). "Immune cell circulating subsets are affected by gonadal function". *Life Sciences*, 54 (18) 1305-1312.
18. Kwak-Kim J.Y.H., Chung-Bang H.S., Ng S.C., Ntrivalas E.I., Mangubat C.P., Beaman K.D., Beer A.E., Gilman-Sachs A. (2003). "Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF". *Human Reproduction*, 18 (4), 767-773.
19. Lachapelle M.H., Hemmings R., Roy D.C., Falcone T., Miron P. (1996). "Flow cytometric evaluation of leukocyte subpopulations in the follicular fluids of infertile patients". *Fertility Sterility*, 65 (6): 1135-1140.
20. Castilla Ja, Sampaio A, Molina R, Samaniego F, Mozas J, Vergara F, Carrido F, Herruzo AJ (1990). Mononuclear cell subpopulations in human follicular fluid from stimulated cycles. *Am J Reprod Immunol*, 22(3-4) 127-129.
21. Putowski I., Darmochwal-Kolarz D., Rolinski J., Oleszczuk J., Jakowicki J. (2004). "The immunological profile of infertile women after repeated IVF failure". *European Journal of Obstetrical and Gynecological Reproductive Biology*, 112 (2): 192-196.
23. Rai R., Sacks G., Trew G. (2005). "Natural killer cells and reproductive failure-theory, practice and prejudice". *Human Reproduction*, 20 (5): 1123-1126.
24. Thum M.Y., Bhaskaran S., Bansal A.S., Shehata H., Ford B., Sumar N., Abdalla H.I. (2005). "Simple enumerations of peripheral blood natural killer (CD56+NK) cells, B cells and T cells have no predictive value in IVF treatment outcome". *Human Reproduction*, 20 (5): 1272-1276.
25. Wu R., Van der Hoek K.H., Ryan N.K., Norman R.J., Robker R.L. (2004). "Macrophage contributions to ovarian function". *Human Reproduction*, 10 (2), 119-133.
26. [Mathur R.S.](#), [Jenkins J.M.](#), [Bansal A.S.](#) (1997). "The possible role of the immune system in the aetiopathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome". *Human reproduction*, 12(12):2629-34.

FLOW CYTOMETRY AND ITS APPLICATIONS IN ENDOCRINOLOGY

Μαρία Σ Βενετίκου, MD, DipEndo, PhD, Consultant Endocrinologist and Professor of Pathophysiology and Nosology, School of Health and Caring Professions, Department of Medical Sciences, Technological Educational Institution of Athens (ATEI), Aigaleo, Athens

Abstract

This article is a review on the applications of flow cytometry in endocrinology

Key words: *flow cytometry, endocrine function, adrenals, gonads, in vitro fertilization (IVF)*