

Stanovení cytokinového profilu u infertilních žen

Štěpánka Luxová

2. ročník semináře reprodukční medicíny

26.2.2018

 GENNET

člen skupiny
FutureLife

Obsah

- Tolerance plodu
- Th lymfocyty, cytokiny
- Stanovení intracelulárních cytokinů v IML GENNET
 - Soubor pacientů
 - Postup
 - Výsledky



Tolerance plodu IS matky

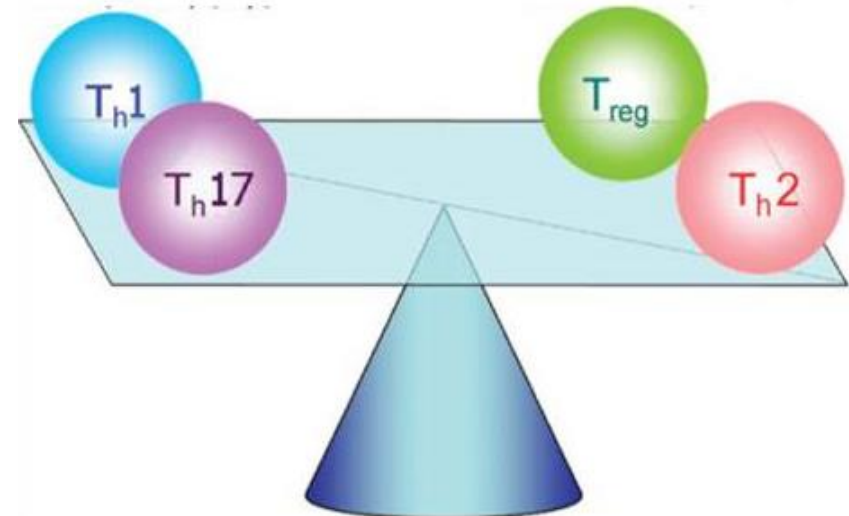
- P. B. Medawar
 - plod - semialogenní transplantát
 - placenta - mechanická bariera
 - matka - funkční suprese lymfocytů v graviditě



- Th1/Th2 paradigma

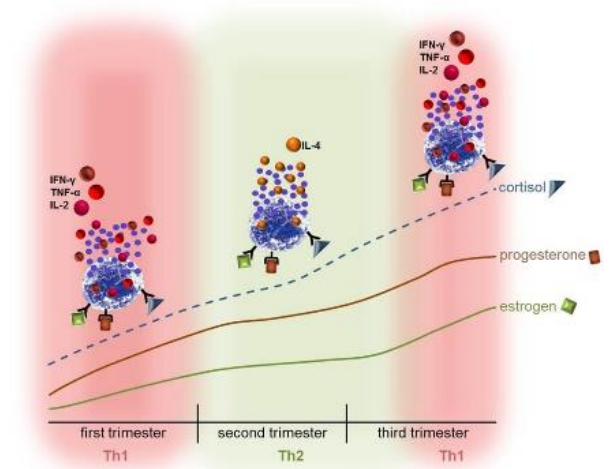


- Th1/Th2/Th17/Treg paradigma



Vliv hormonů na produkci cytokinů

- Progesteron, HCG, estrogeny, kortisol



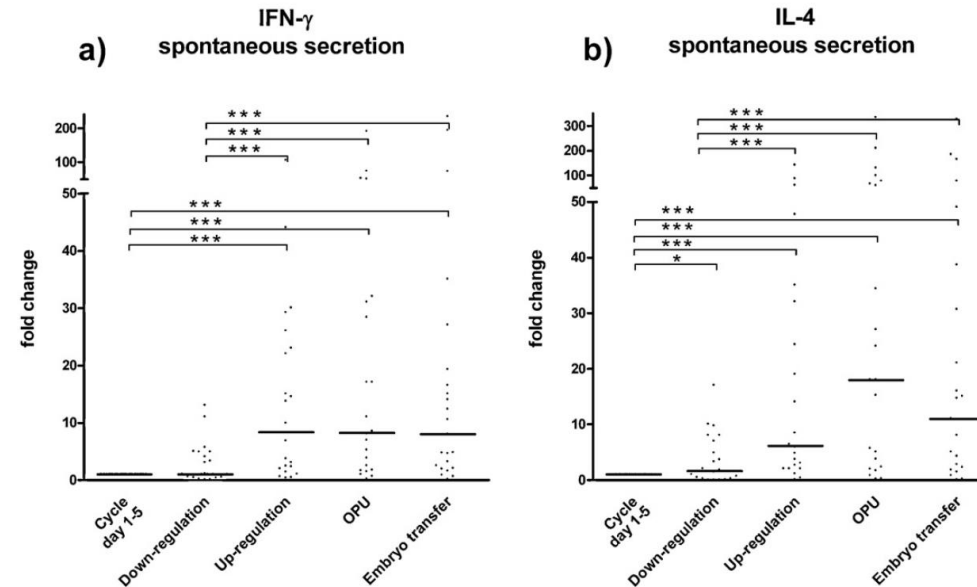
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00231>

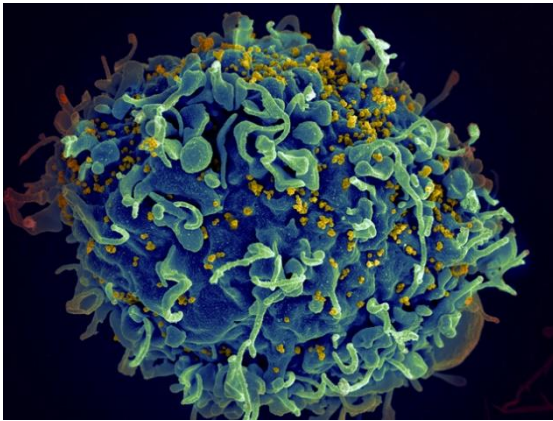
Immunological status in patients undergoing in vitro fertilisation: responses to hormone treatment and rel

M. Persson et al. / Journal of Reproductive Immunology 96 (2012) 58–67

Marie Persson^{a,*}, Christina Ekerfelt^a, Barbara Jablon Jan Ernerudh^a, Maria C. Jenmalm^a, Göran Berg^b

^a Division of Inflammation Medicine, Department of Clinical and Experimental Medicine, F
^b Division of Obstetrics and Gynecology, Department of Clinical and Experimental Medicine, Sweden

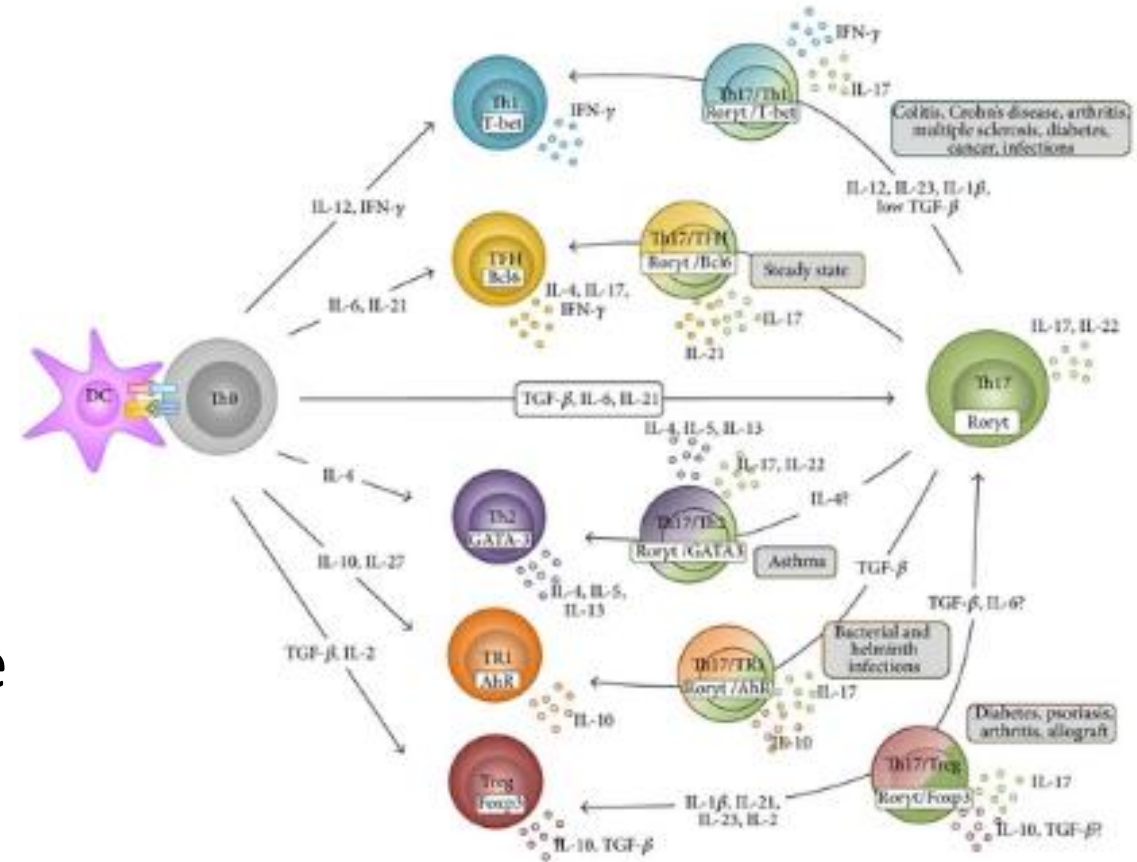




https://cdn.arstechnica.net/wp-content/uploads/2014/03/hiv_03_infected1_full.jpg

Th lymfocyty

- Klíčová regulační role v adaptivní imunitě
- Regulace protilátkové i buňkami zprostředkované imunity
- Působení pomocí přímých kontaktů i cytokinů
- Plasticita



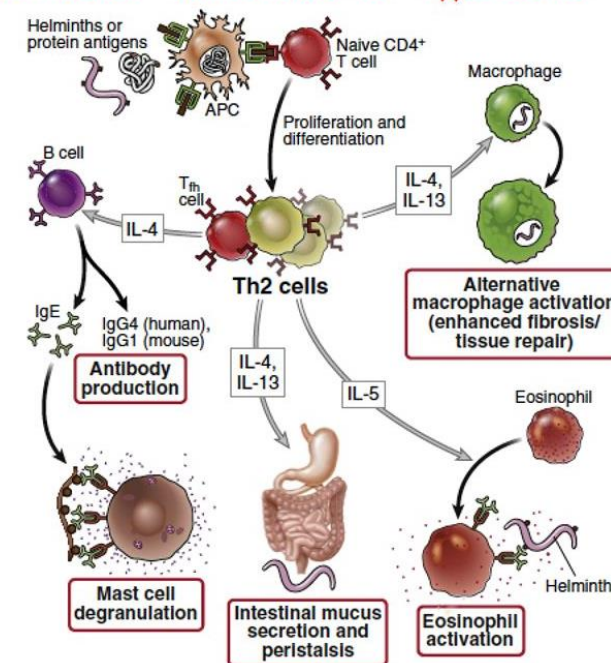
Cytokiny Th2

- IL-10 (CSIV – faktor inhibující syntézu cytokinů)
 - Hlavní zdroj – Th2, Treg, Mo, aktivované MF, B Ly, DC
 - Funkce – protizánětlivý, embryoprotektivní
 - Inhibice produkce prozánětlivých cytokinů (TNF, IL-1, IL-6),
 - Snížení funkce MF
 - Snížení exprese MHC II. třídy a exprese kostimulačních molekul na APC
 - Zvýšení proliferace B ly. a produkce některých Ab

IL-4

- Hlavní zdroj – Th2, NK, žírné buňky, bazofily, eozinofily
- Funkce – protizánětlivý, embryoprotektivní
 - Základní růstový a diferenciační faktor B ly. (přesmyk IgM na IgG1 a IgE)
 - Diferenciace z Th0 na Th2
 - Regulace exprese MHC II. třídy na B ly.
 - Snížení produkce IFN γ u T ly., inhibice sekrece IL-12 z aktivovaných MF
 - Vliv na proliferaci, diferenciaci a apoptózu endotelových, svalových i nervových buněk
 - Nadprodukce IL-4 → alergie, astma

Effector functions of T_H2 Cells

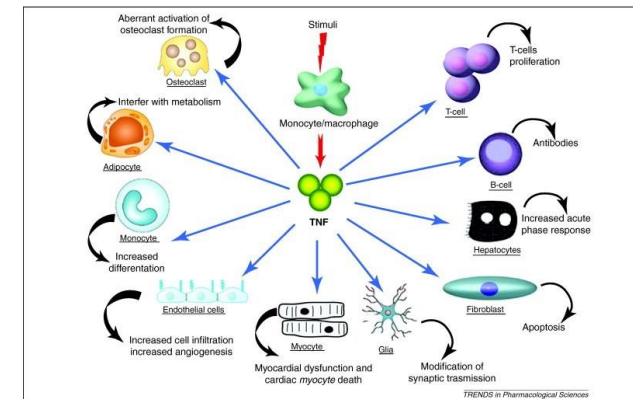


<http://slideplayer.com/slide/10532621/>

Cytokiny Th1

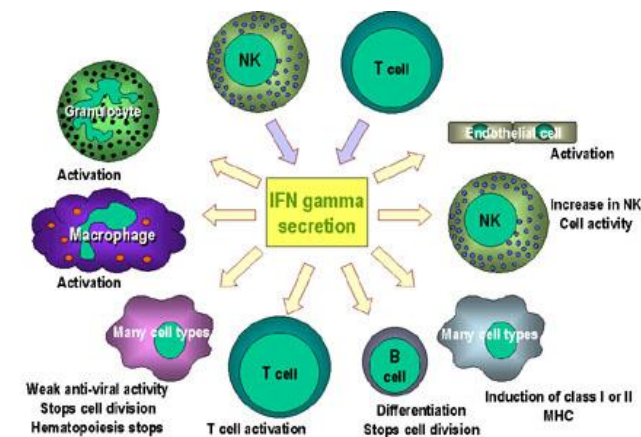
- TNF alfa (kachektin)

- Hlavní zdroj – T lymfocyty, NK, aktivované MF, Ne, Mo, fibroblasty
- Funkce – pleiotropní, prozánětlivý, embryotoxický cytokin
 - Indukce prozánětlivých proteinů (chemokiny, cytokiny, adhezivní molekuly, růstové faktory,...)
 - Podíl na postupné kachektizaci
 - Vliv na termoregulaci, lipidový metabolismus, krevní průtok, koagulaci, inzulínovou rezistenci
 - Embryotoxický účinek (negativní vliv na proliferaci embryonálních buněk, pro-apoptotický signál
 - Nadprodukce - infekce, RA, IBD, celiakie, psoriáza



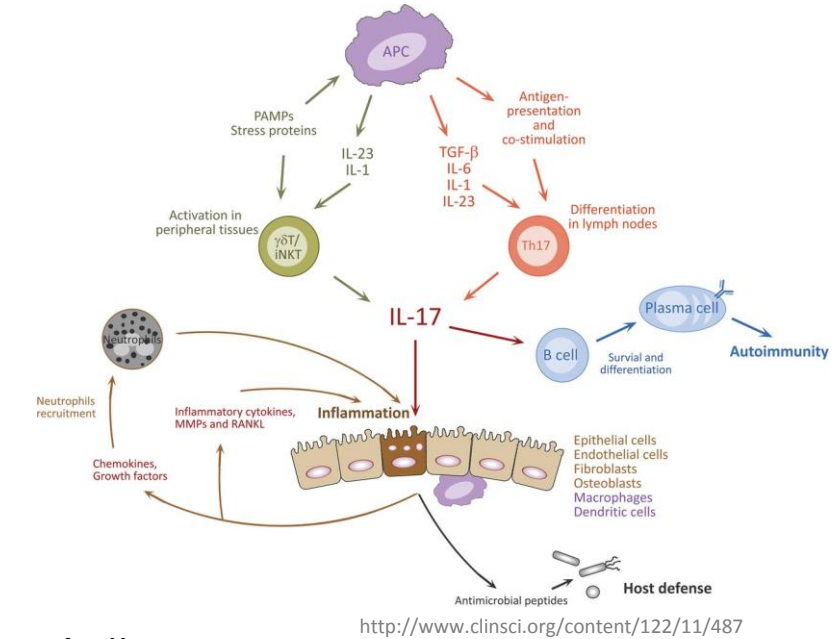
- IFN gama

- Hlavní zdroj – Th1, NK, NKT, Tc , MF, DC
- Funkce – prozánětlivý, embryotoxický cytokin
 - Antiproliferativní a antivirové účinky
 - Zvýšení exprese MHC I. i II. třídy
 - Aktivátor MF a dalších monocytárních fagocytů
 - Blokace Th2 imunitní odpovědi
 - Stimulace aktivity NK buněk a Ne
 - V časně graviditě význam při remodelaci endometriálních cév a angiogenezi



<http://www.pharmagen.eu/en/development/49/>

Cytokiny Th17



- IL-17

- Hlavní zdroj – **Th17**, $\gamma\delta$ T , NK, NKT, MF, DC, Ne

- Funkce – prozánětlivý cytokin

- Stimulace produkce chemokinů → migrace MO, NE do místa zánětu
- Indukce cytokinů (IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , TNF α , TGF β)
- Obrana proti bakteriím a houbám
- Role v mnoha imunopatologických dějích (autoimunitní reakce, transplantační reakce, astma, protinádorová imunita)

Stanovení intracelulárních cytokinů v IML GENNET

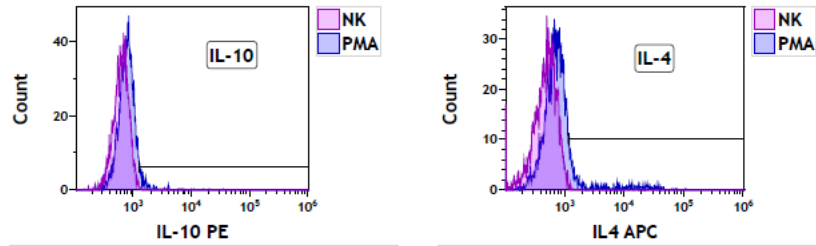
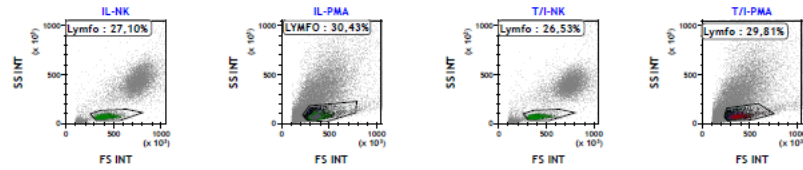
Postup



- Materiál – periferní krev
- Naředit krev 1+1 kultivačním médiem X-VIVO
- Stimulace PMA (0,23ug/ml) +IO (4,6 ug/ml) + brefeldin (0,35ug/ml)
- Inkubace 4 hodiny při 37°C a 5% CO₂
- Povrchové a intracelulární barvení dle protokolu f. Biolegend
(povrchové značení CD3 → fixace → permeabilizace → intracelulární značení IL4, IL-10, TNF-alfa, IFN-gama)
- Akvizice na průtokovém cytometru NAVIOS
- Vyhodnocení pomocí softwaru Kaluza

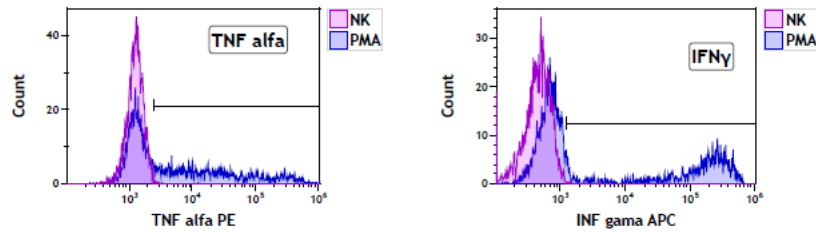
cytokiny 2 IL4_IL10_TNF_INF - Report Sheet 1

[Data Set 1]... 06-Jun-17
 [Data Set 1]... Cytok. 4074 00017587 001.LMD
 [Data Set 2]... Cytok. 4074 00017588 002.LMD
 [Data Set 5]... Cytok. 4074 00017591 005.LMD
 [Data Set 6]... Cytok. 4074 00017592 006.LMD



Marker	%Gated
IL-10	0,30
IL-10	4,54

Marker	%Gated
IL-4	0,27
IL-4	11,53

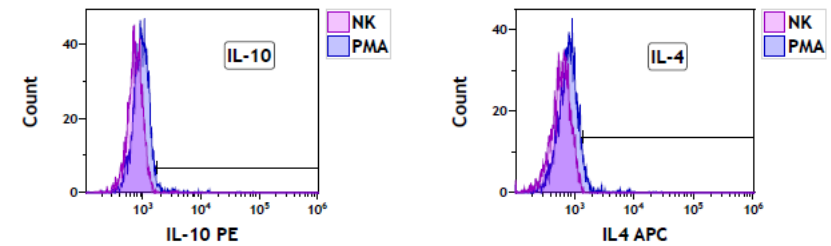
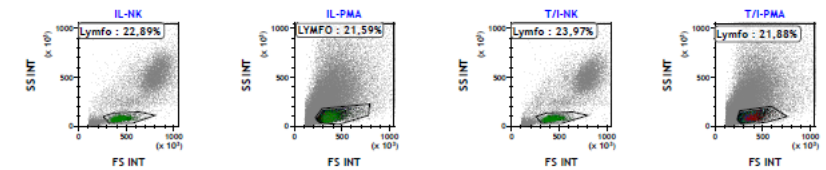


Marker	%Gated
TNF alfa	0,27
TNF alfa	47,39

Marker	%Gated
INF gamma	0,27
INF gamma	38,03

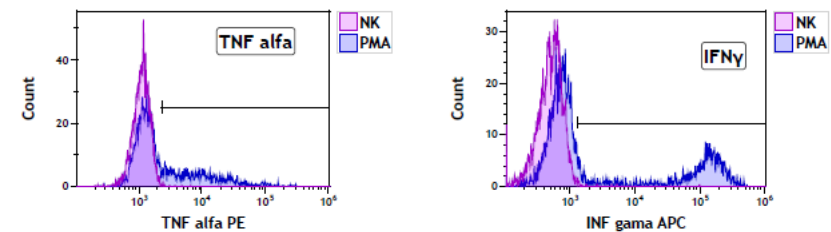
cytokiny 2 IL4_IL10_TNF_INF - Report Sheet 1

[Data Set 1] Dat... 16-Sep-16
 [Data Set 1] Na... Cyt 3117 00005920 001.LMD
 [Data Set 2] Na... Cyt 3117 00005921 002.LMD
 [Data Set 5] Na... Cyt 3117 00005924 005.LMD
 [Data Set 6] Na... Cyt 3117 00005925 006.LMD



Marker	%Gated
IL-10	0,26
IL-10	2,63

Marker	%Gated
IL-4	0,20
IL-4	6,79

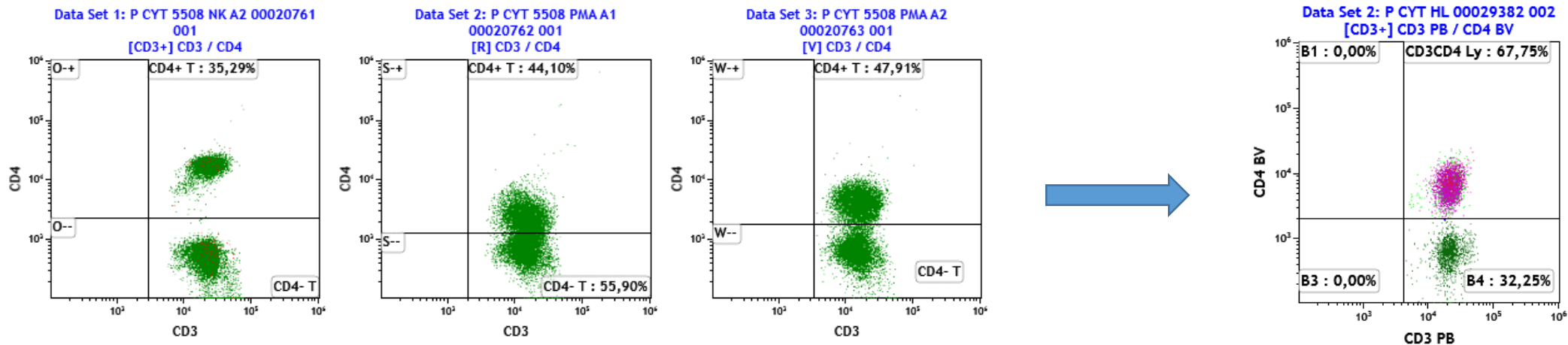


Marker	%Gated
TNF alfa	0,33
TNF alfa	33,21

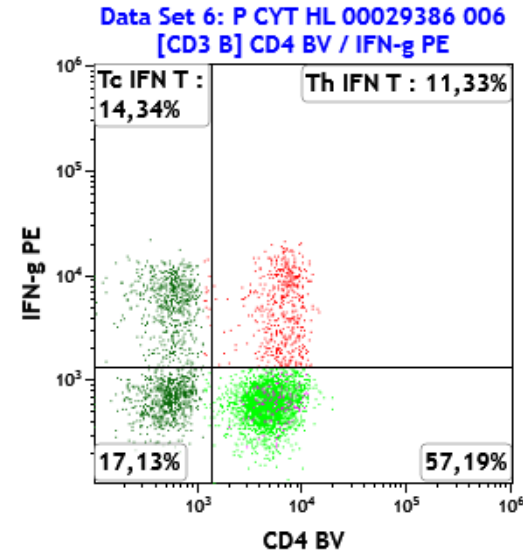
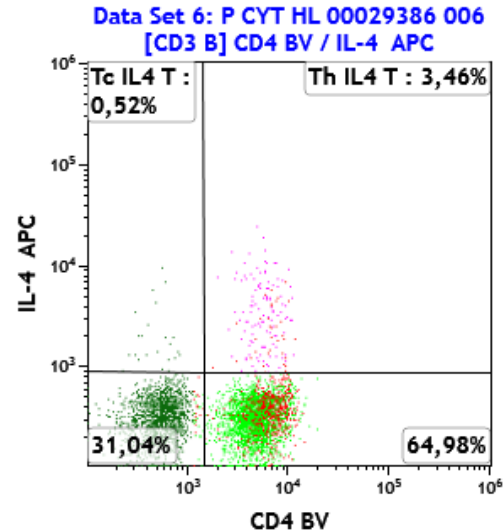
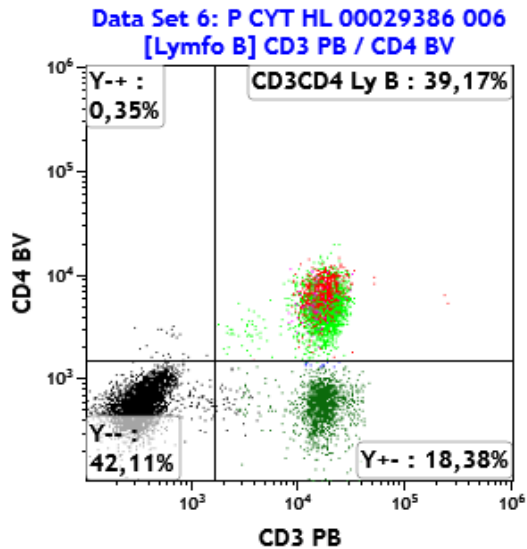
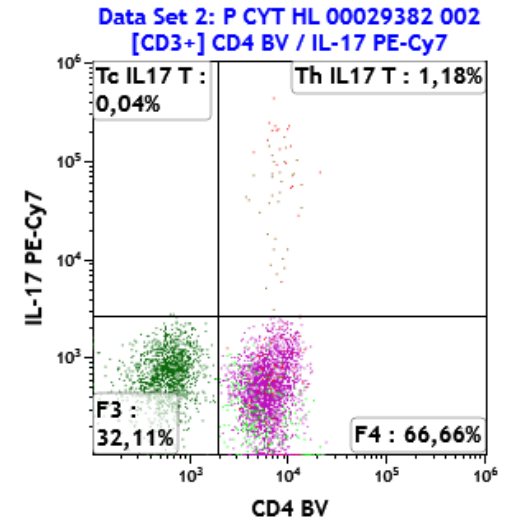
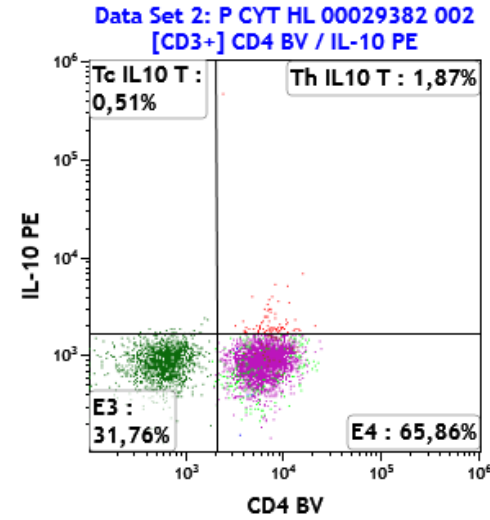
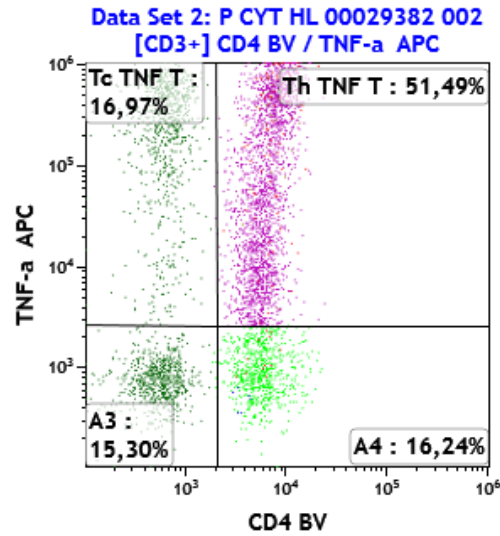
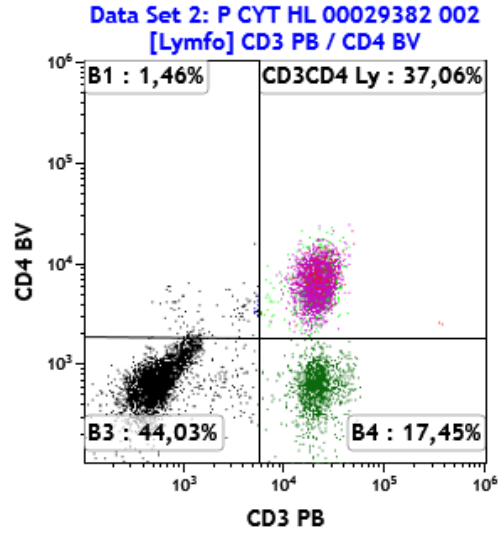
Marker	%Gated
INF gamma	0,39
INF gamma	32,89

Modifikovaný postup

- Změna stimulace: PMA (0,023ug/ml) +IO (4,5 ug/ml) + brefeldin (4,5ug/ml)
- Změna v přípravě vzorků pro FC: protokol dle Beckman Coulter (PerFix-nc)
 - Snížení počtu promývání
 - Současné značení povrchových a intracelulárních znaků
- Nově identifikace TH17 –IL-17



Modifikovaný postup



Intracelulární cytokiny - studie

- Sledované období 1.9.2016 – 31.8.2017
- Počet provedených vyšetření: 316
- Počet vyšetřených žen: 295 (17x 2 odběry, 2x 3 odběry)
- Do studie zařazeno 142 žen
 - Důvody vyloučení ze studie
 - Nedostatečné informace
 - Odběr v době hormonální stimulace nebo jiná medikace
 - Mužský faktor infertility (OAT, vysoká fragmentace DNA, vysoká apoptóza)

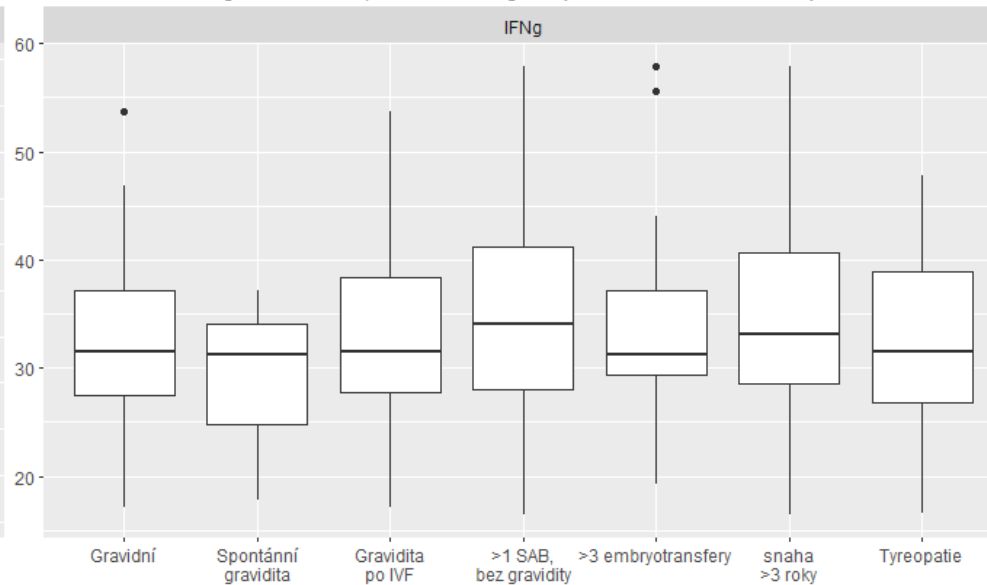
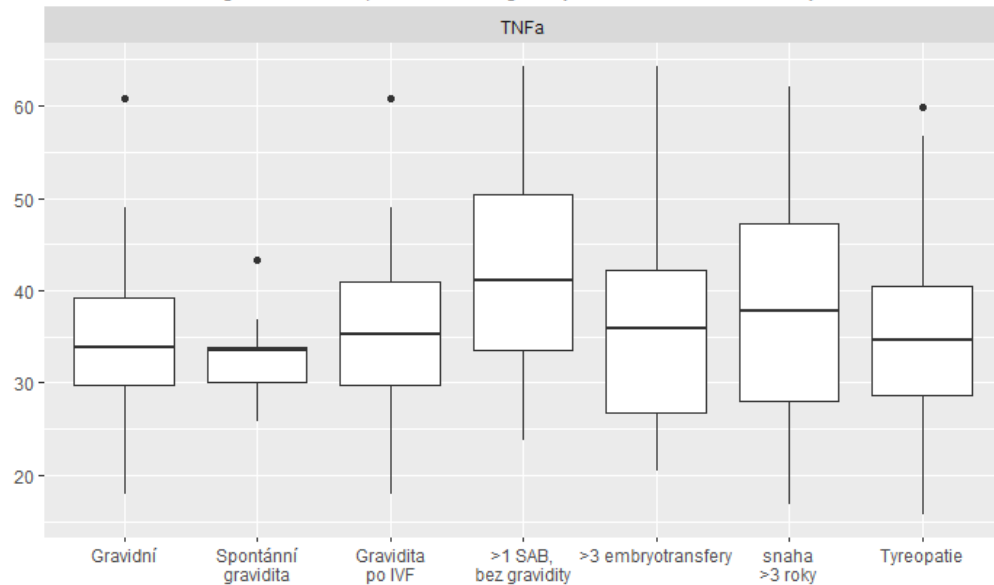
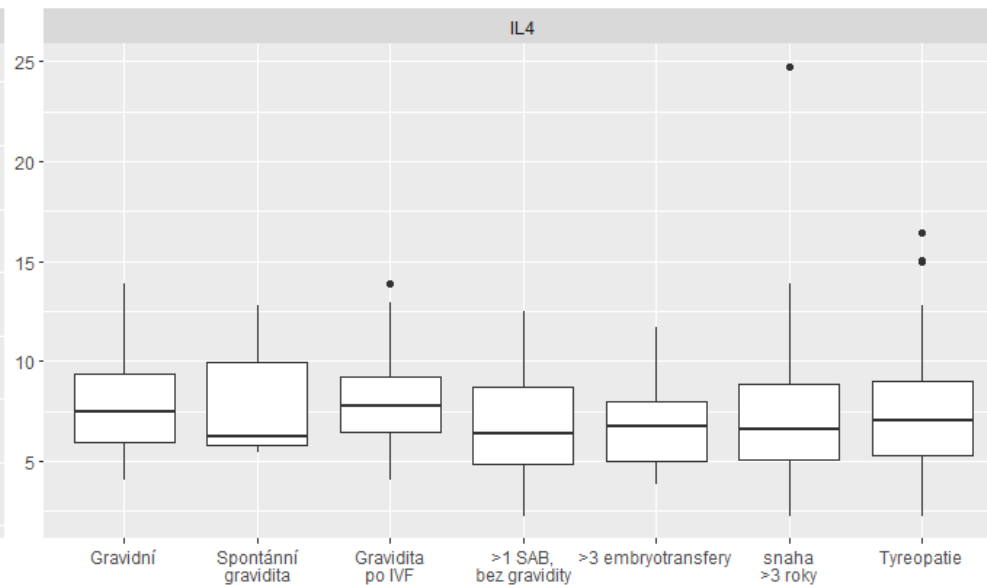
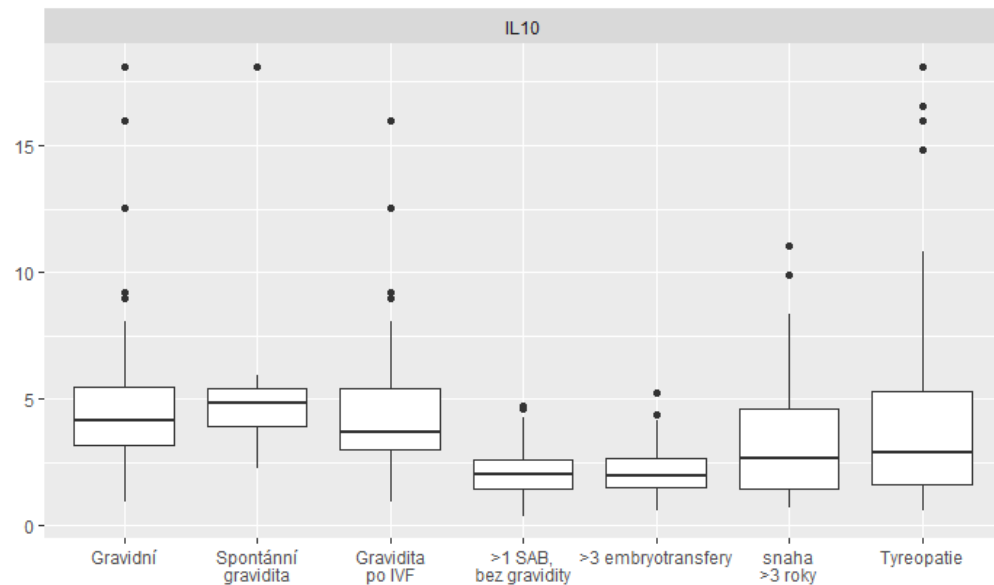
Soubor pacientek



	počet	věk (roky)	ET/KET	SAB
Gravidní	54	34,5 (25,7-46,2)	1,7	0,7
spontánní gravidita	10	33,6 (27,9 - 41,0)	0,8	0,7
gravidní po IVF	44	34,8 (25,7 - 46,2)	1,9	0,7
≥ 2 SAB bez gravidity	30	37,1 (25,6 - 45,5)	1,8	3,1
≥ 4 ET/KET bez gravidity	23	39,0 (31,0 - 48,2)	5,7	0,7
onemocnění ŠŽ	57	36,4 (28,4 - 48,2)	2	0,9
endometrióza	16	33,9 (25,6-39,4)	1,3	0,9

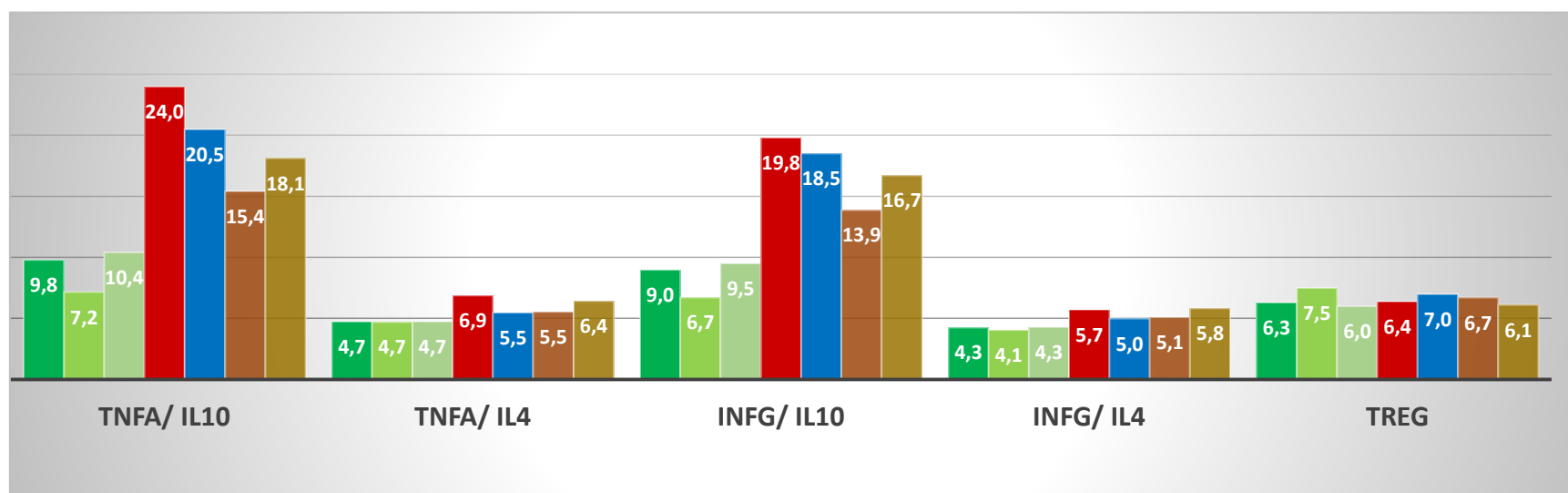
Výsledky – jednotlivé cytokiny

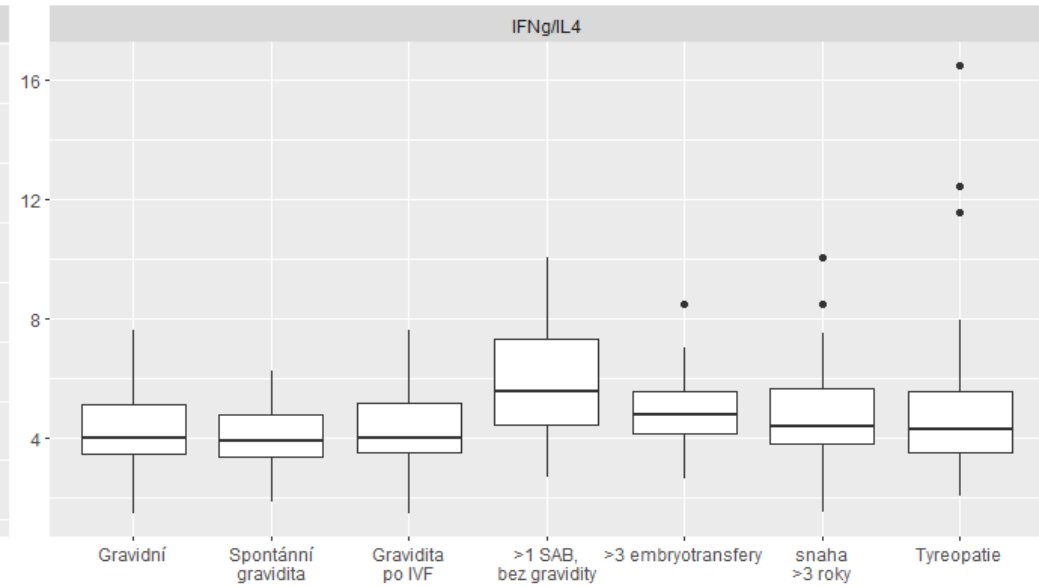
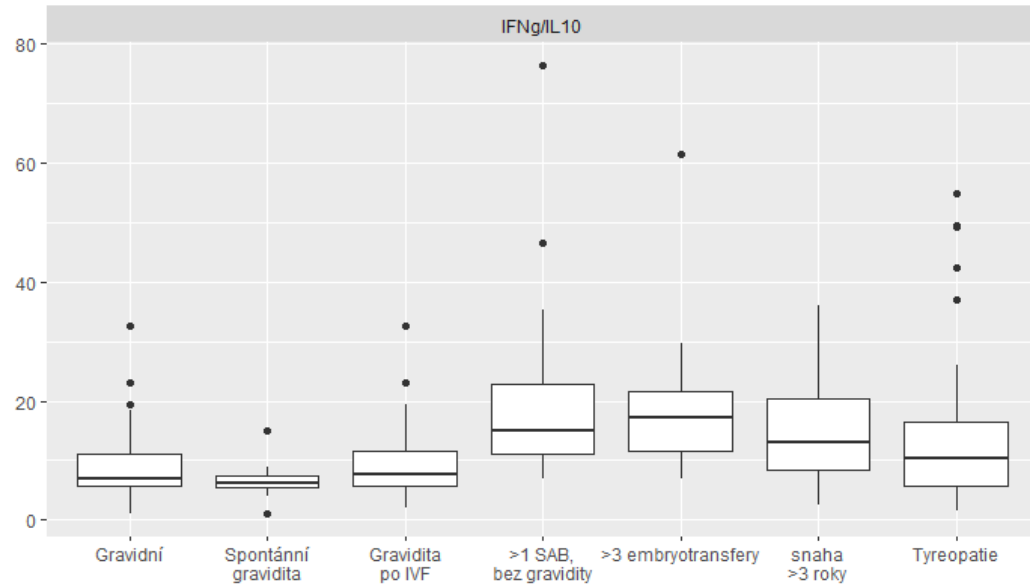
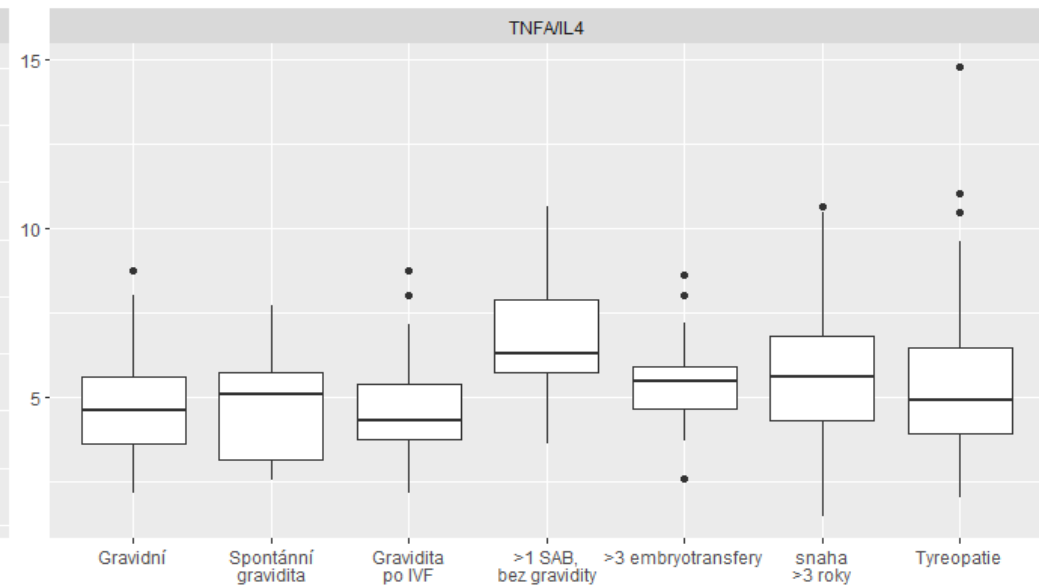
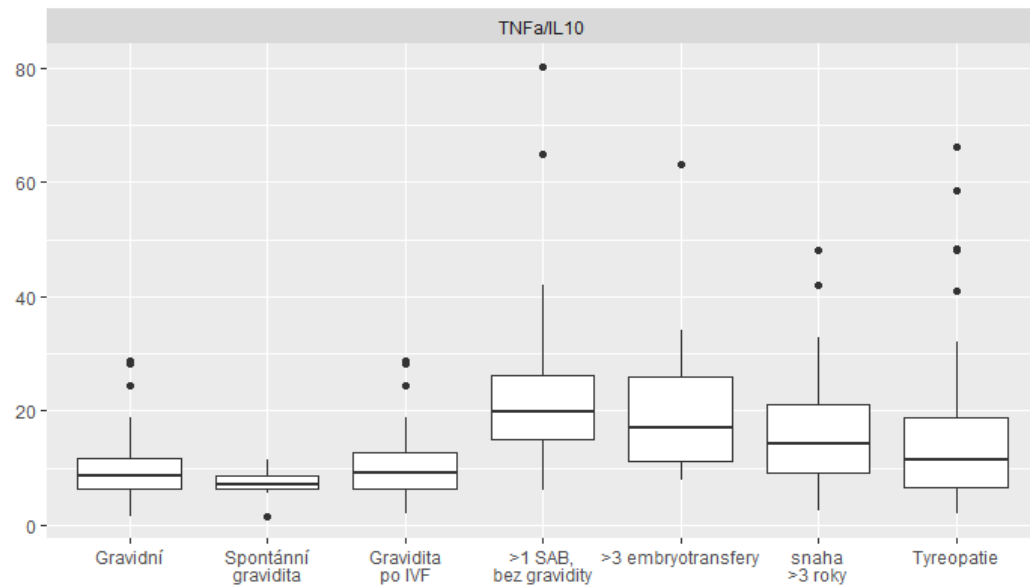
	IL-10			IL-4			TNF-alfa			IFN-gama		
	průměr	SD	P-value	průměr	SD	P-value	průměr	SD	P-value	průměr	SD	P-value
gravidní	4,9	3,27		8,0	2,46		35,3	8,18		32,1	8,14	
spontánní gravidita	5,9	4,43	NS	7,8	2,62	NS	33,0	4,89	NS	29,1	6,58	NS
gravidní po IVF	4,7	2,96	NS	8,1	2,46	NS	35,8	8,73	NS	32,8	8,37	NS
≥ 2 SAB bez gravidity	2,3	1,18	<0,001	6,7	2,64	0,03	42,4	11,09	0,004	35,4	10,88	NS
≥ 4 ET/KET bez grav.	2,3	1,17	<0,001	7,1	2,49	NS	36,9	11,87	NS	33,2	9,77	NS
onemocnění ŠŽ	4,4	4,10	NS	7,5	3,01	NS	35,7	9,99	NS	32,2	8,40	NS
endometrióza	2,6	1,78	0,009	5,5	1,55	<0,001	33,1	10,3	NS	30,4	8,55	NS



Výsledky – T1/T2

	TNF-alfa/IL-10			TNF-alfa/IL-4			IFN-gama/IL-10			IFN-gama/IL-4		
	průměr	SD	P-value	průměr	SD	P-value	průměr	SD	P-value	průměr	SD	P-value
gravidní	9,8	5,94		4,7	1,57		9,0	5,74		4,3	1,27	
spontánní gravidita	7,2	2,55	NS	4,7	1,73	NS	6,7	3,59	NS	4,1	1,89	NS
gravidní po IVF	10,4	6,35	NS	4,7	1,55	NS	9,5	6,04	NS	4,3	1,57	NS
≥ 2 SAB bez gravidity	24,0	16,16	<0,001	6,9	1,85	<0,001	19,8	14,36	<0,001	5,7	1,81	<0,001
≥ 4 ET/KET bez grav.	20,5	12,75	<0,001	5,5	1,40	0,06	18,5	11,66	0,001	5,0	1,42	0,04
onemocnění ŠŽ	15,4	13,84	0,04	5,5	2,37	0,04	13,9	12,05	0,008	5,1	2,54	0,04
endometrióza	18,1	13,64	0,03	6,4	2,92	0,04	16,7	12,46	0,03	5,8	2,23	0,02





Závěr

- Těžko standardizovatelná metoda (mnoho faktorů)
- Každá laboratoř musí stanovit vlastní normy
- Spíše než zastoupení jednotlivých subpopulací lymfocytů produkujících daný cytokin je vhodné uvádět na výsledkových listech poměr Th1/Th2 (TNFa/IL-10)
- Signifikantní rozdíly v Th1/Th2 mezi kontrolní skupinou (gravidní ženy) a pacientkami s opakovanými aborty či s opakovanými neúspěšnými IVF cykly
- Převažující Th1 imunitní odpověď u žen s thyreopatiemi. Dostatečná substituce?
- Převažující Th1 imunitní odpověď u žen s endometriózou

Děkuji Vám za pozornost.

Poděkování

- MUDr. Jan Diblík, PhD. - Ambulance lékařské genetiky, GENNET s.r.o. Praha
- RNDr. Zuzana Krátká, PhD.- Imunologická laboratoř, GENNET s.r.o. Praha
- Kolektiv imunologické laboratoře GENNET s.r.o. Praha
- Bc. Petra Hánová - IPO IVF, GENNET s.r.o. Praha

www.gennet.cz

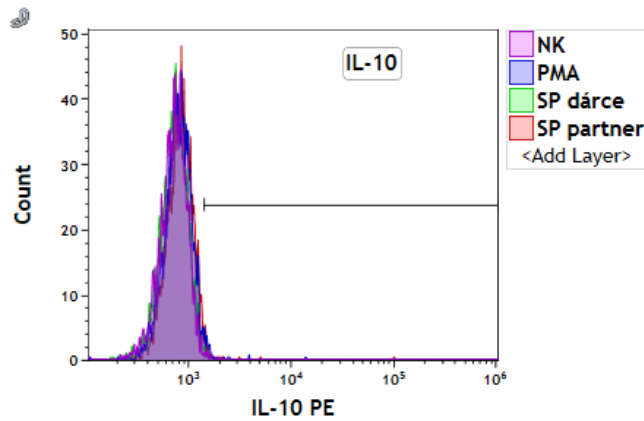
Stepanka.luxova@gennet.cz



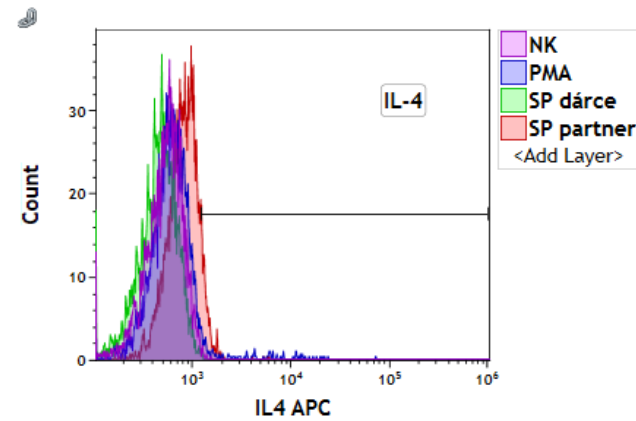
GENNET

člen skupiny
FutureLife

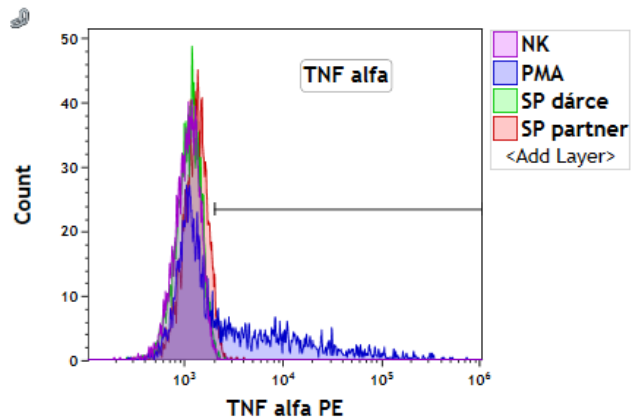
Stimulace spermiemi



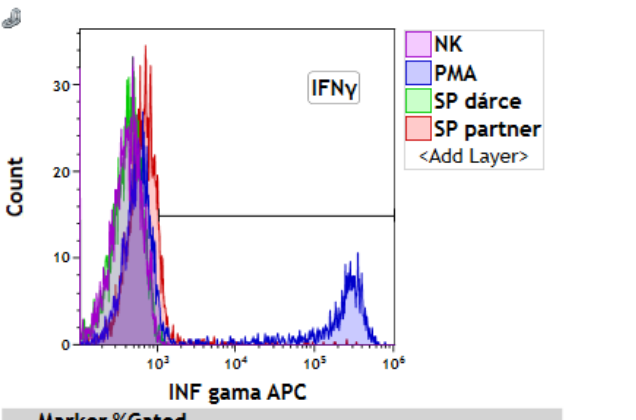
Marker	%Gated
IL-10	0,44
IL-10	1,87
IL-10	0,54
IL-10	1,73



Marker	%Gated
IL-4	0,40
IL-4	4,07
IL-4	0,13
IL-4	9,56



Marker	%Gated
TNF alfa	0,47
TNF alfa	40,38
TNF alfa	0,70
TNF alfa	4,49



Marker	%Gated
IFN γ	0,44
IFN γ	31,59
IFN γ	0,63
IFN γ	10,77

- 1. odběr 11.7.2017 LČ -4731 stimulace spermiemi partnera
- 2. odběr 20.9.2017 LČ 6206 stimulace spermiemi dárcce

Muž: NOR 33, MARA50%, Leu 4,3, APOZ 74%
 Žena: věk 36 let, 1 SAB 7tt
 Snaha o početí: 3 roky

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

J.Y.H.Kwak-Kim^{1,2,3}, H.S.Chung-Bang¹, S.C.Ng², E.L.Ntrivalas², C.P.Mangubat¹, K.D.Beaman², A.E.Beer^{1,2} and A.Gilman-Sachs²

¹Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology and ²Department of Microbiology and Immunology, Finch University of Health Sciences/The Chicago Medical School, 3333 Green Bay Road, N. Chicago, IL 60064, USA

³To whom correspondence should be addressed. E-mail: Kwakj@finchcms.edu

BACKGROUND: We aimed to study blood lymphocytes of women with recurrent pregnancy losses (RPL) and multiple implantation failures (MIF) after IVF cycles. **METHODS:** We studied 14 women with RPL and 14 women with MIF. Twenty-one non-pregnant women containing IFN- γ , TNF- α /IL-4 and TNF- α /IL-10 in C measured by 4-colour flow cytometry. **RESULTS:** The proportion of TNF- α p ($P < 0.05$) and TNF- α /IL-10 ($P < 0.001$) were significantly higher in RPL and MIF women compared with SAB as compared with immune responses in peripheral blood of multiple implantation failures in IVF.

Key words: implantation failures/IVF failure

REVIEW ARTICLE

Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy

Shigeru Saito, Akitoshi Nakashima, Tomoko Shima, Mika Ito

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Toyama, Toyama, Japan

Keywords

Abortion, cytokine network, implantation, preterm labor, reproduction

Correspondence

Shigeru Saito, MD, PhD, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama-shi, Toyama 930-0194, Japan.
E-mail: s30saito@med.u-toyama.ac.jp

Submitted March 5, 2010;
accepted March 5, 2010.

Citation

Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 601-610

doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x

T-helper (Th) cells play a central role in modulating immune responses. The Th1/Th2 paradigm has now developed into the new Th1/Th2/Th17 paradigm. In addition to effector cells, Th cells are regulated by regulatory T (Treg) cells. Their capacity to produce cytokines is suppressed by immunoregulatory cytokines such as transforming growth factor (TGF)- β and interleukin (IL)-10 or by cell-to-cell interaction. Here, we will review the immunological environment in normal pregnancy and complicated pregnancy, such as implantation failure, abortion, preterm labor, and preeclampsia from the viewpoint of the new Th1/Th2/Th17 and Treg paradigms.

Table 1 Th1/Th2/Th17 and Treg Cells in Normal Pregnancy and Abortion

	Normal pregnancy		Abortion		Depletion of Th1, Th2, Th17 or Treg cells
	Peripheral blood	Uterus	Peripheral blood	Uterus	
Th1 cells	↘	↓	↗ →	↑ →	Abortion is not observed.
Th2 cells	↗	↑	→	↓ → ↑ (conflict data)	Abortion is not observed.
Th17 cells	→ ↘	↗	→ ↗	→ (missed abortion) ↑ (inevitable abortion) ↑ (recurrent abortion; inevitable abortion)	There is no data, but IL-17 null mice are fertile.
Treg cells	↑	↑↑	→	→	Abortion and implantation failure are observed in allogeneic pregnancy.

→ : no change, ↗ : slightly elevate, ↑ : elevate, ↑↑ : markedly elevate, ↘ : slightly decrease, ↓ : decrease.

REVIEW ARTICLE

Immunological Modes of Pregnancy Loss: Inflammation, Immune Effectors, and Stress

Joanne Kwak-Kim^{1,2}, Shihua Bao¹, Sung Ki Lee³, Joon Woo Kim⁴, Alice Gilman-Sachs²

¹Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Chicago Medical School, Rosalind Franklin University of Medicine and Science, Vernon Hills, IL, USA;

²Department of Microbiology and Immunology, Chicago Medical School, Rosalind Franklin University of Medicine and Science, North Chicago, IL, USA;

³Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Konyang University, Seo-gu, Daejeon, Korea;

⁴The Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Northwestern University Feinberg School of Medicine, McGaw Pavilion, Chicago, IL, USA

Keywords

Angiogenesis, multiple implantation failure, natural killer cell, recurrent pregnancy loss, stress, uterine blood flow

Correspondence

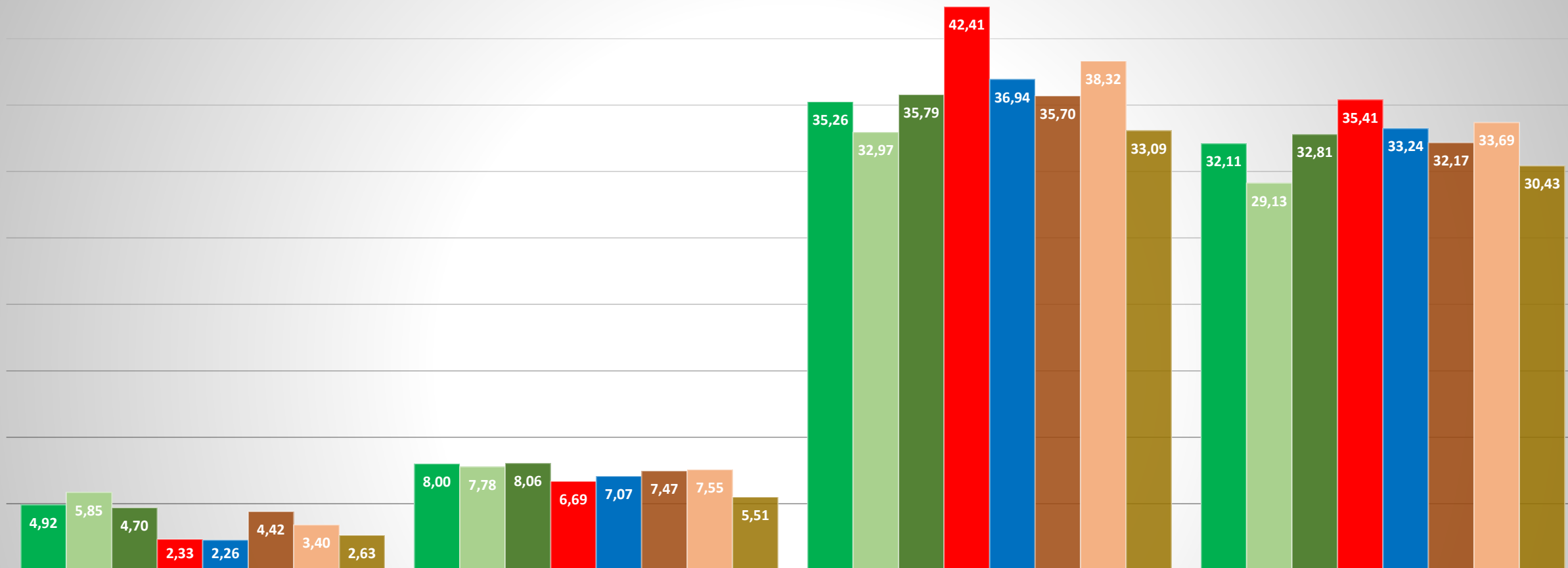
Joanne Kwak-Kim, Department of Obstetrics and Gynecology, Chicago Medical School, Rosalind Franklin University of Medicine and Science, 830 West End Court, Suite 400, Vernon Hills, IL 60061, USA.
and
Department of Microbiology and Immunology, Chicago Medical School, Rosalind Franklin University of Medicine and Science, North Chicago, IL 60064, USA.
E-mail: joanne.kwakkim@rosalindfranklin.edu

Submission February 16, 2014;
accepted February 20, 2014.

Citation

Kwak-Kim J, Bao S, Lee SK, Kim JW, Gilman-Sachs A. Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors and stress. *Am J Reprod Immunol* 2014; 68: 11-21

Inflammatory immune response plays a key role in reproductive failures such as multiple implantation failures (MIF), early pregnancy loss, and recurrent pregnancy losses (RPL). Cellular immune responses particularly mediated by natural killer (NK), and T cells are often dysregulated in these conditions. Excessive or inappropriate recruitment of peripheral blood NK cells to the uterus may lead to cytotoxic environment *in utero*, in which proliferation and differentiation of trophoblast is hampered. In addition, inadequate angiogenesis by uterine NK cells often leads to abnormal vascular development and blood flow patterns, which, in turn, leads to increased oxidative stress or ischemic changes in the invading trophoblast. T-cell abnormalities with increased Th1 and Th17 immunity, and decreased Th2 and T regulatory immune responses may play important roles in RPL and MIF. A possible role of stress in inflammatory immune response is also reviewed.



■ gravidní (54)

■ spontánní gravidita (10)

■ gravidní po IVF (44)

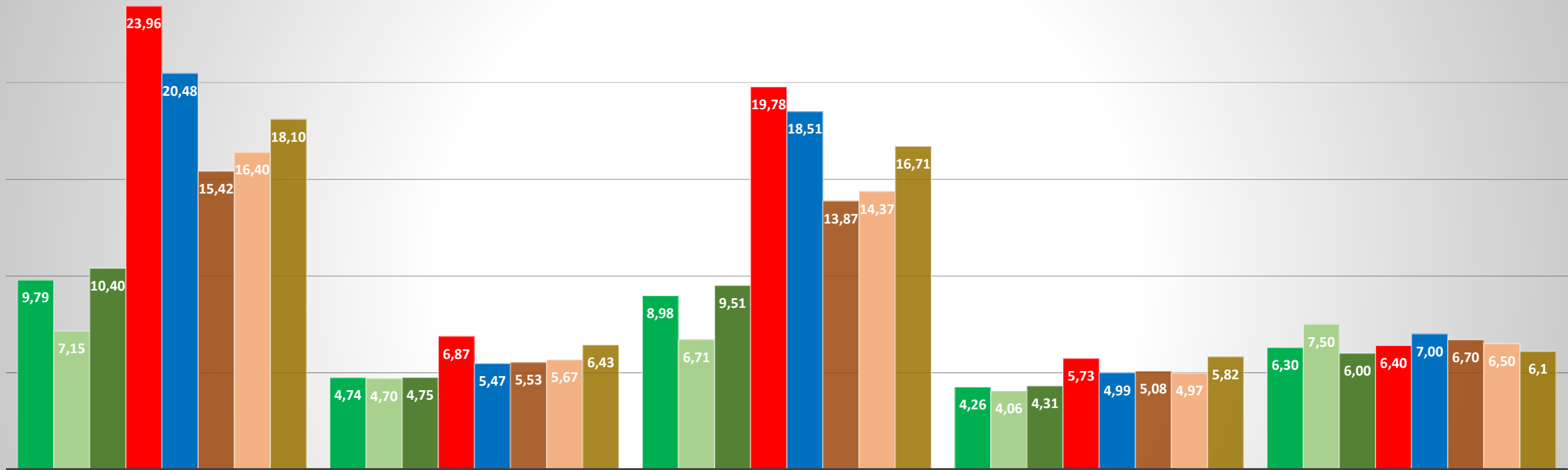
■ ≥ 2 SAB bez gravidity (30)

■ ≥ 4 ET/KET bez gravidity (23)

■ onemocnění ŠŽ (57)

■ snaha o graviditu ≥ 4 roky (45)

■ endometrióza (16)



TNFA/ IL10

TNFA/ IL4

INFG/ IL10

INFG/ IL4

TREG

■ gravidní (54)

■ spontánní gravidita (10)

■ gravidní po IVF (44)

■ ≥ 2 SAB bez gravidity (30)

■ ≥ 4 ET/KET bez gravidity (23)

■ onemocnění ŠŽ (57)

■ snaha o graviditu ≥ 4 roky (45)

■ endometrióza (16)

Modifikovaný postup

