

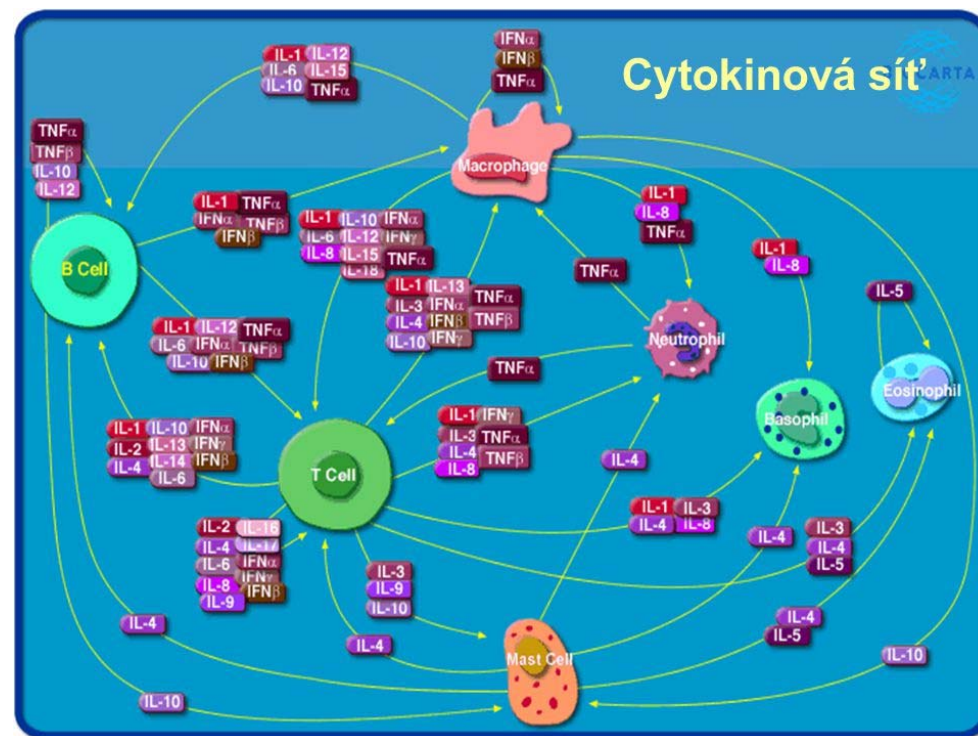


Prvé skúsenosti so stanovením IC pomocou reagensí Duractive a DuraClone IF T helper cell tube v reprodukčnej medicíne

K. Szabóová, E. Tibenská

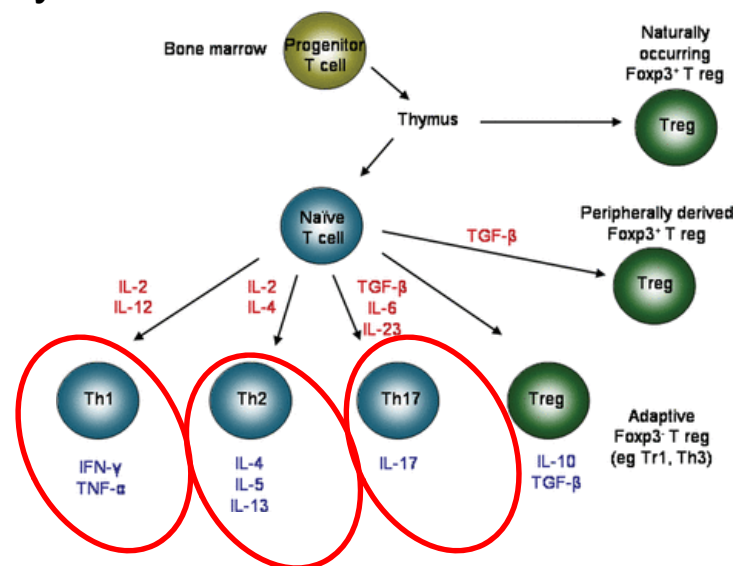
Cytokíny - všeobecne

- Molekuly prenášajúce dôležité informácie medzi bunkami
- Vplyv na reguláciu rastu, delenie bunky, diferenciáciu, zápal a obranyschopnosť
- Sekrécia cytokínov je krátkodobá
- Po stimulácii sa syntetizujú *de novo*
- Nie sú antigénovo špecifické
- Pôsobenie v nízkych koncentráciách
- Th lymfocyty



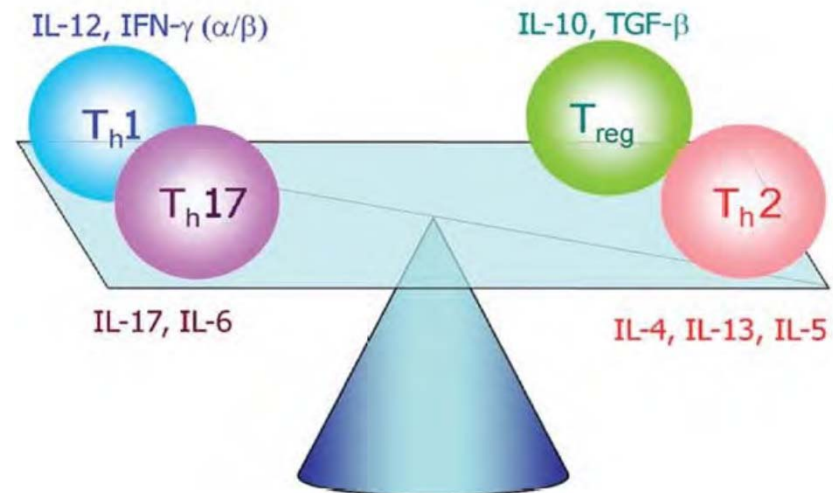
Th lymfocyty

- Boj proti intracelulárne parazitujúcim mikroorganizmom, oneskorený typ hypersenzitívnych reakcií, usmrcovanie vhodných terčových štruktúr
- Kľúčová regulačná úloha v adaptívnej imunite
- Regulácia protilátkovej i bunkovej imunity
- Pôsobenie pomocou primárneho kontaktu aj cytokínov
- Plasticita
- Vplyv hormónov na produkciu cytokínov – Progesterón, HCG, estrogény, kortizol



Th lymfocyty a cytokíny v reprodukčnej imunológii

- **Porucha IS** – cca 20% podiel imunologických faktorov z celkového počtu infertilit „neznámej“ etiológie
- **Th lymfocyty a cytokíny** – tolerancia embrya
- **Th1/Th2/Th17/Treg koncepcia**



Cytokíny Th1

TNF alfa

- T lymfocyty, NK, aktivované MF, Ne, Mo, fibroblasty
- Funkcia – pleiotropný, prozápalový, embryotoxický
- Indukcia prozápalových proteínov (chemokíny, cytokíny, adhezívne molekuly, rastové faktory)
- Vplyv na termoreguláciu, lipidový metabolismus, krvný prietok, koaguláciu, inzulínovú rezistenciu
- Embryotoxický účinok (negatívny vplyv na proliferáciu embryonálnych buniek, pro-apoptotický signál)
- Nadprodukcia - infekcie, RA, IBD, celiakia, psoriáza

IFN gama

- Th1, NK, NKT, Tc, MF, DC
- Funkcia – prozápalový, embryotoxický
- Antiproliferatívne a antivírusové účinky
- Zvýšenie expresie MHC I. i II. triedy
- Aktivátor MF a ďalších monocytárných fagocytov
- Blokovanie Th2 imunitnej odpovede
- Stimulácia aktivity NK buniek a neutrofilov
- Vo včasnej gravidite význam pri remodelácii endometriálnych ciev a angiogenéze

IL2

- Th1
- Funkcia – protizápalový, embryotoxický
- Hlavný rastový faktor pre T ly
- Diferenciácia, proliferácia a aktivácia NK buniek, ↑ proitlúkovú odpoveď
- V nízkych koncentráciách podporuje vývoj Tregs, vo zvýšených koncentráciách blokuje ich supresívne funkcie

Cytokíny Th2

IL-4

- Th2, NK, žírne bunky, bazofily, eozinofily
- Funkcia – protizápalový, embryoprotektívny
- Základný rastový a diferenciacný faktor B ly
- Diferenciácia z Th0 na Th2
- Regulácia expresie MHC II. triedy na B ly
- Zníženie produkcie IFN γ u T ly, inhibícia sekrécie IL-12 z aktivovaných MF
- Vplyv na proliferáciu, diferenciaciu a apoptózu endotelových, svalových i nervových buniek
- Nadprodukcia IL-4 → alergia, astma

IL-10

- Th2, Treg, Mo, aktivované MF, B Ly, DC
- Funkcia – protizápalový, embryoprotektívny
- Inhibícia produkcie prozápalových cytokínov (TNF, IL-1, IL-6),
- Zníženie funkcie MF
- Zníženie expresie MHC II. triedy a expresie kostimulačných molekúl na APC
- Zvýšenie proliferácie B ly a produkcie niektorých Ab

Cytokíny Th17

IL-17

- Th17, $\gamma\delta$ T , NK, NKT, MF, DC, Ne
- Funkcia – prozápalový cytokín
- Stimulácia produkcie chemokínov
- Indukcia cytokínov (IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , TNF α , TGF β)
- Obrana proti bakteriám a kvasinkám
- Úloha v mnohých imunopatologických dejoch (autoimunitné reakcie, transplantačné reakcie, astma, protinádorová imunita)

Stanovenie IC v našom laboratóriu

- Materiál – periférna krv (Li-Hep)
- Riedenie krvi 1:1 (kultivačné médium RPMI 1640)
- Stimulácia PMA + IO + brefeldin A
- Inkubácia 4 hodiny pri 37°C a 5% CO₂
- Povrchové a intracelulárne značenie
- (povrchové značenie CD3 a CD4 → fixácia → permeabilizácia → intracelulárne značenie IL4, IL-2, TNF-alfa, IFN-gama)
- Meranie na prietokovom cytometri FC500
- Časovo náročná metóda



Stanovenie IC v našom laboratóriu

- Materiál – periférna krv (Li-Hep)
- Riedenie krvi 1:1 (kultivačné médium RPMI 1640)
- Stimulácia PMA + IO + brefeldin A
- Inkubácia 4 hodiny pri 37°C a 5% CO₂
- Povrchové a intracelulárne značenie
- (povrchové značenie CD3 a CD4 → fixácia → permeabilizácia → intracelulárne značenie IL4, IL-2, TNF-alfa, IFN-gama)
- Meranie na prietokovom cytometri FC500
- Časovo náročná metóda



Stanovenie IC pomocou DurActive a DuraClone IF T helper (reagencie)

- DurActive skúmavky

	Aktivácia vzoriek	Množstvo krvi
DurActive 1	PMA/IO/ BFA	50 µl PK (LiHep)
DurActive 2	PMA/IO	

- DuraClone IF T Helper skúmavky

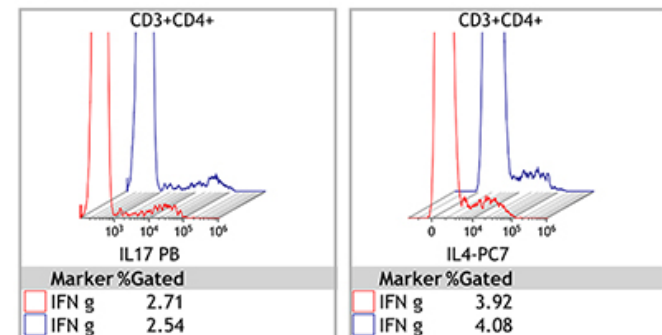
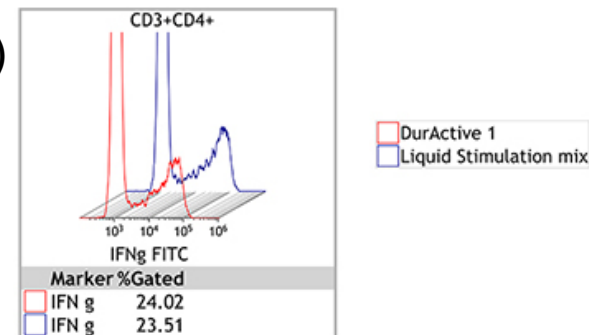
- IFN γ – FITC
- IL-4 – PC7
- CD4 – APC
- CD3 – Alexa Flour 750
- IL-17a – PB

- PerFix-nc Kit



Stanovenie IC pomocou DurActive a DuraClone IF T helper (aktivácia)

- Materiál – periférna krv (LiHep)
- Stimulácia DurActive 1 (IO + PMA + Brefeldin A)
 DurActive 2 (IO + PMA)
- Inkubácia 3 hodiny pri 37°C a 5% CO₂

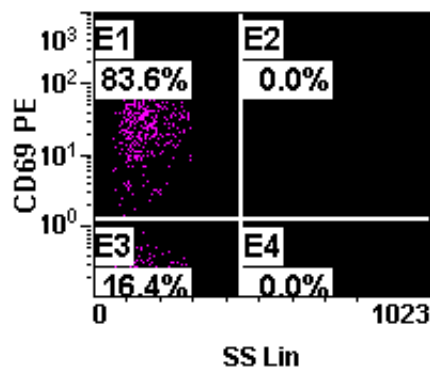


Stanovenie IC pomocou DurActive a DuraClone IF T helper (farbenie)

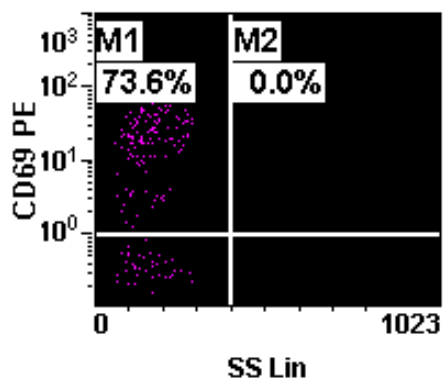
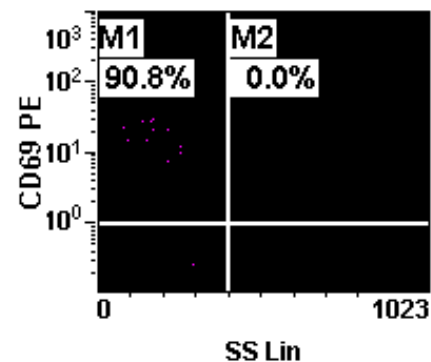
- Do označených cytometrických skúmaviek napipetuj 50 μ l príslušnej krvi
- Pridaj 25 μ l Fixačného činidla R1 z PerFix-nc, zvortexuj a inkubuj 15 minút
- Pridaj 2 ml 1 x PBS, zvortexuj, centrifugácia 200g, 5 minút. , aspiruj supernatant
- K peletu pridaj 25 μ l FBS, zvortexuj na resuspendovanie peletu, a pridaj 300 μ l Permeabilizačného činidla R2 z PerFix-nc a znovu zvortexuj
- Na dno DuraClone skúmavky napipetuj ďalšiu žiadanú kvapalnú protilátku (5 μ l TNF α -BD)
- Celý obsah skúmavky so vzorkou prenes do príslušnej DuraClone skúmavky s protilátkami, zvortexuj pri vysokých otáčkach cca 6-8 sekúnd na rozpustenie protilátok
- Inkubuj 45 minút pri izbovej teplote
- Priprav 1x finálny roztok 3,5 ml na 1 pacienta z 10 x konc. finálneho roztoku R3 z PerFix-nc
- Pridaj 3 ml 1 x riedeného finálneho roztoku a zvortexuj
- Centrifugácia 500g, 5 minút, aspiruj supernatant
- Pridaj znovu 500 μ l riedeného finálneho roztoku
- Meranie na cytometri NAVIOS EX na správne nastavenom a skompenzovanom protokole



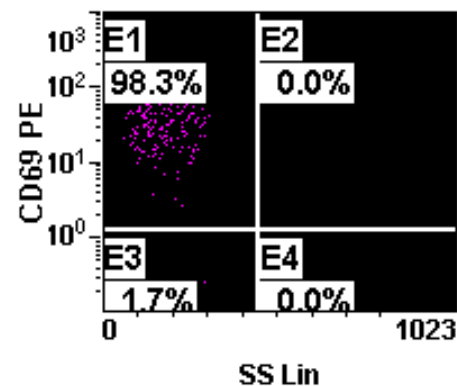
Aktivácia vzorky (porovnanie)



aktivácia na
CD3+



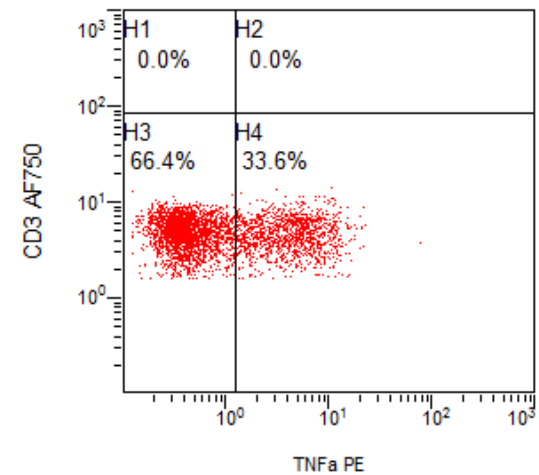
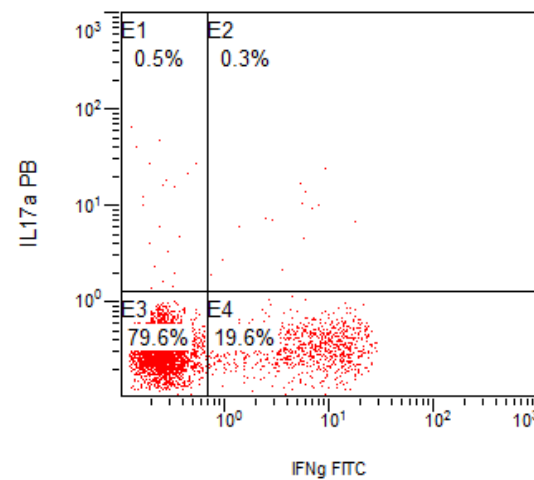
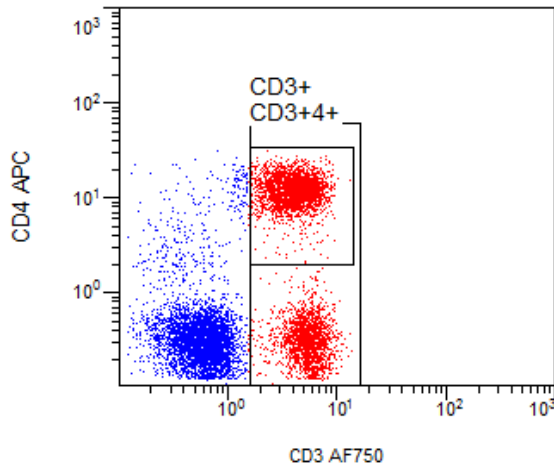
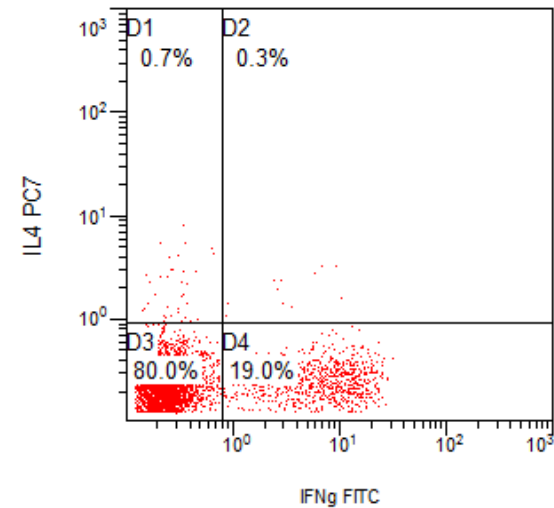
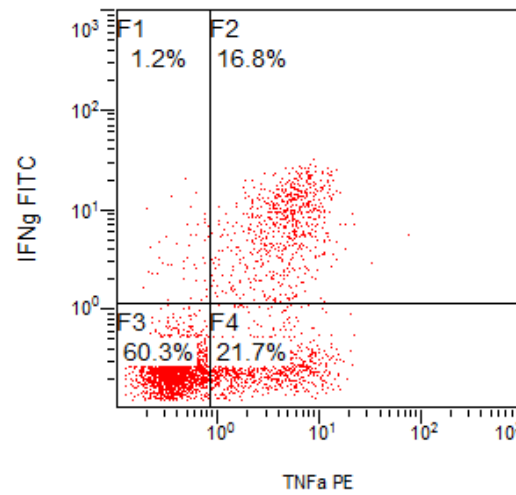
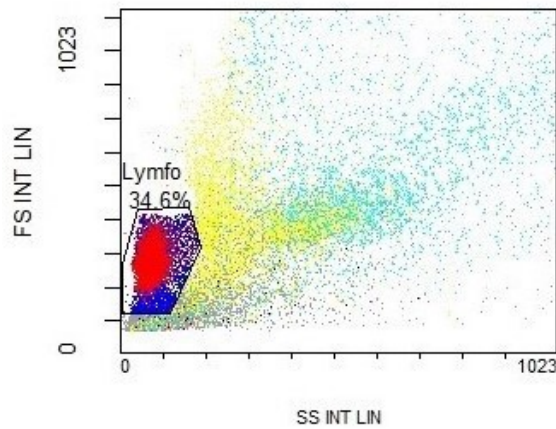
aktivácia na
CD3+CD4+



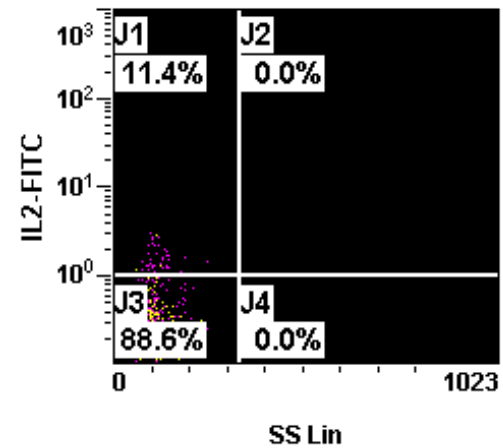
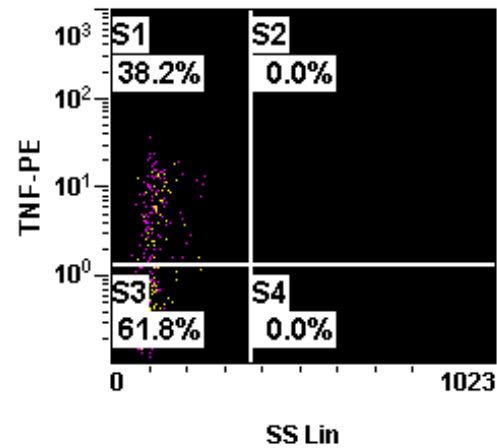
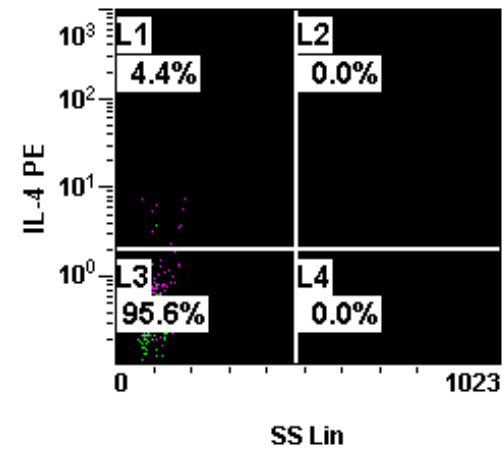
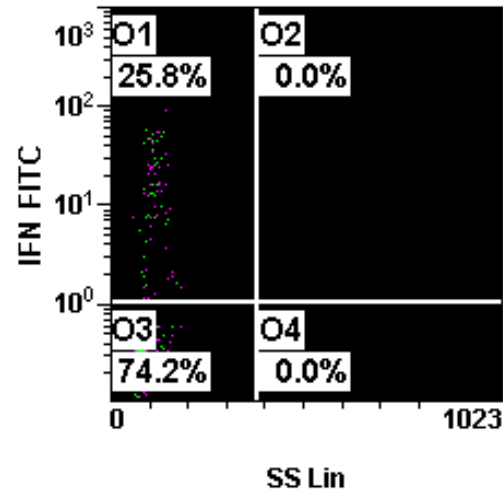
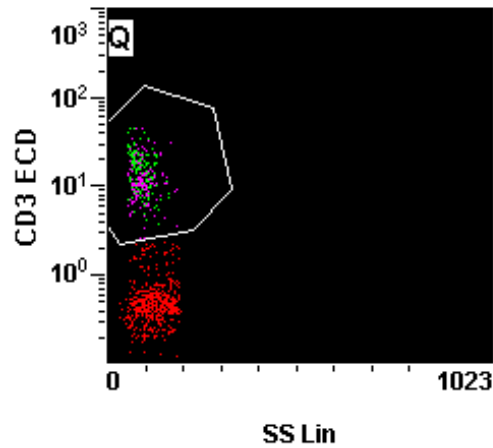
DurActive 2
(inkubácia 3 h)

Starý protokol
(inkubácia 4 h)

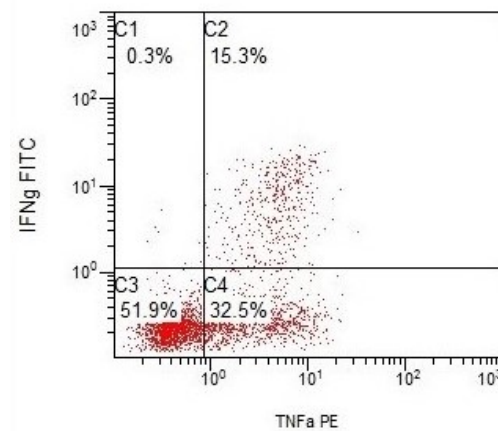
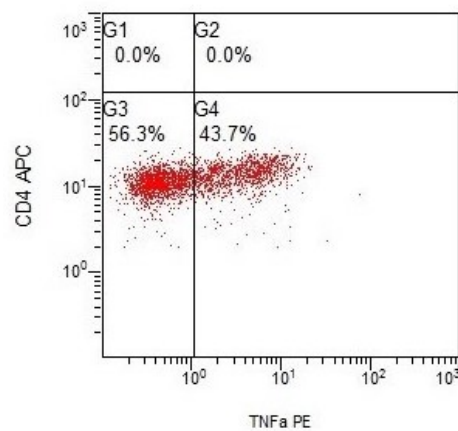
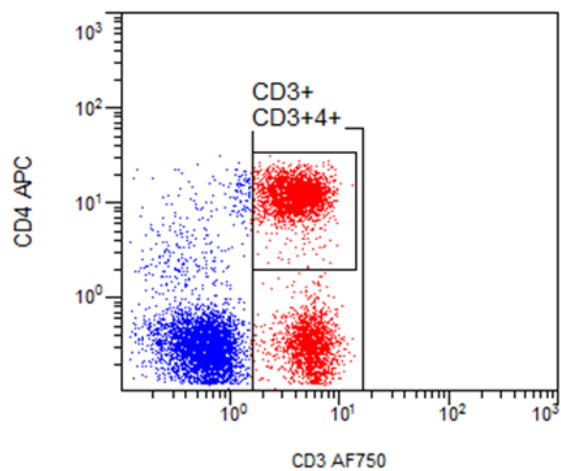
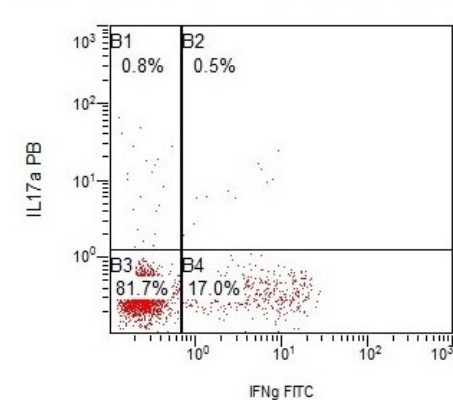
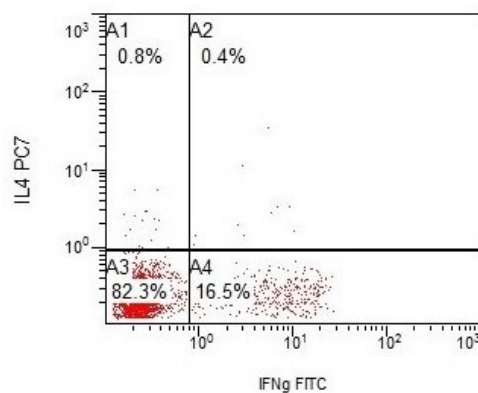
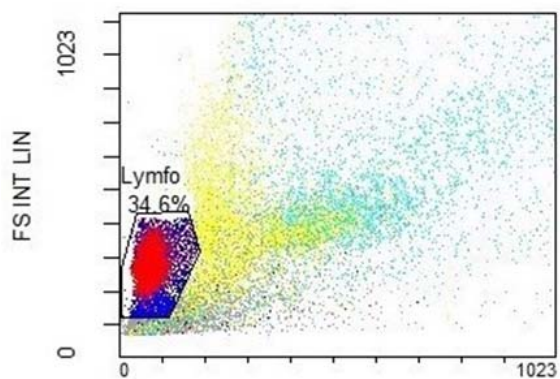
Farbenie (gate CD3+ DuraClone IF T helper)



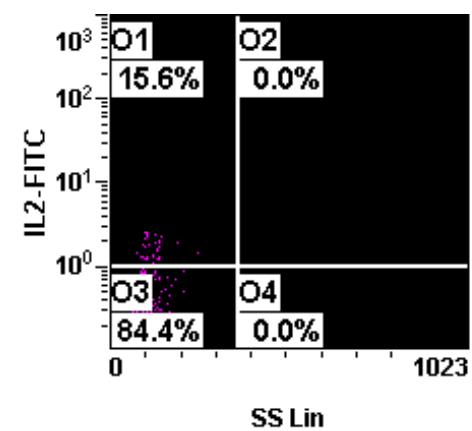
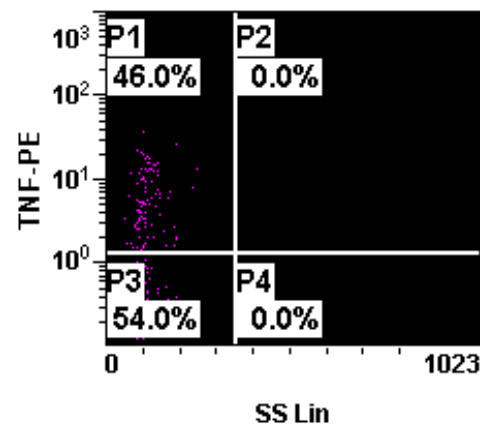
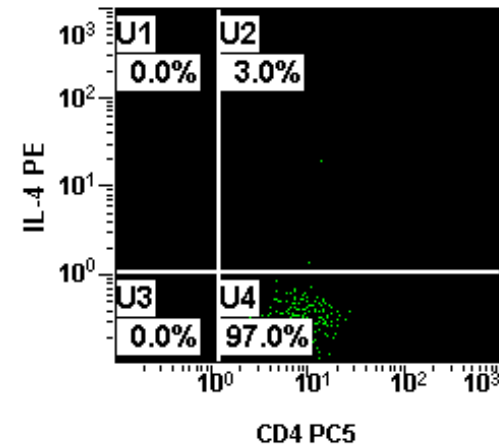
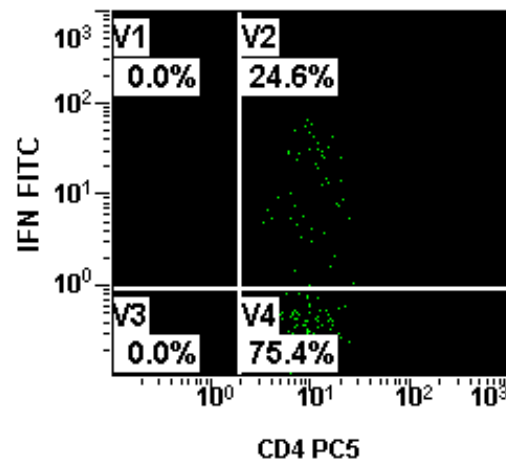
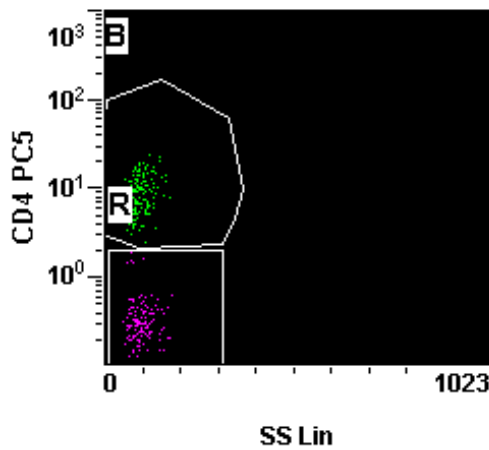
Farbenie (gate CD3+ starý protokol)



Farbenie (gate CD3+CD4+ DuraClone IF T helper)



Farbenie (gate CD3+CD4+ starý protokol)



Záver

- **DurActive skúmavky** – sušené, ready-to-use reagencie, skladovanie pri izbovej teplote, eliminácia zamrazených alikvotov PMA, IO, BFA
- **DuraClone IF T helper skúmavky** – kompenzačný kit v súprave, sušené, ready-to-use reagencie, možnosť dokvapnúť ďalšiu žiadanú kvapalnú protilátku, skladovanie pri izbovej teplote
- **PerFix-nc Kit (no centrifuge assay Kit)** – 2 ready-to-use reagencie, 1 konc. roztok (riedenie 10x), eliminácia premývacích procedúr počas postupu (potrebné 1 premývanie), možnosť povrchového a intracelulárneho značenia naraz, skladovanie pri izbovej teplote
- Časovo výhodnejšia/finančne náročnejšia metóda
- Poskytuje vyššiu intra/interlaboratórnu štandardizáciu
- Stanovenie nových referenčných hodnôt pre IC

Ďakujem za pozornosť!

