

Рівні інтерлейкіну-4 та інтерлейкіну-17 (IL-4, IL-17) крові у пацієнток зі звичним невиношуванням вагітності, яка настала у циклі екстракорпорального запліднення

К.П. Головатюк

Одеський національний медичний університет,
Медичний центр репродуктивного здоров'я «Гамета», м. Одеса

Мета дослідження: вивчення рівнів цитокінів IL-4 і IL-17 у сироватці крові і кондиційних середовищах культур мононуклеарів крові (МНК) і оцінювання асоціативного зв'язку між їхньою продукцією та невиношуванням вагітності, яка настала у циклах екстракорпорального запліднення (ЕКЗ). **Матеріали та методи.** Під спостереженням перебували 240 пацієнток зі звичним невиношуванням вагітності, що настала у циклах ЕКЗ, і 100 умовно здорових фертильних жінок контрольної групи. Визначали концентрації IL-4 та IL-17 у сироватках крові та кондиційних середовищах культур МНК.

Результати. Рівні IL-4 у сироватці крові і в кондиційних середовищах при спонтанній і стимульованій мітогеном секреції достовірно не відрізнялися від таких у контрольній групі, тоді як рівні IL-17 перевищували такі у групі контролю у сироватці, у кондиційних середовищах стимульованих і нестимульованих МНК.

Заключення. Дизрегуляція активності циркулюючих мононуклеарів крові у жінок зі звичним невиношуванням вагітності, що настала після проведення ЕКЗ, супроводжується підвищенням секреції IL-17 і практично незмінною продукцією IL-4 на тлі високих індексів стимуляції продукції цих цитокінів.

Ключові слова: невиношування вагітності, екстракорпоральне запліднення, інтерлейкін-4, інтерлейкін-17, сироватка крові, стимульовані та нестимульовані мононуклеари крові.

Звичне невиношування вагітності (ЗНВ) є серйозним ускладненням з частотою 1–5% серед пар, які намагаються завагітніти [2]. Більше 50% вагітних після екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) стикаються з проблемою невиношування вагітності, особливо у I триместрі [2].

Імунна система жінки відіграє важливу роль у успішному настанні та перебігу вагітності, контролює запліднення, імплантацію, розвиток плода і підтримує саму вагітність [1, 7–9]. Отже, дослідження імунних клітин, імунних медіаторів/цитокінів у периферійній крові матері і генів відкриває нове у розумінні, принаймні, материнських причин ЗНВ.

Загальновідомо, що Th2-тип імунітету сприяє нормальній і успішній вагітності, а Th1-тип імунітету пов'язаний з репродуктивною недостатністю і може бути причиною ідіопатичного рецидивного викидня [10].

Інтерлейкін-4 (IL-4) – мультифункціональний плеїотропний протизапальний цитокін, який в основному продукується Th2-клітинами, відіграє важливу роль як медіатор і модулятор імунної та запальної відповіді. Він залучений не тільки в гуморальний і клітинами медіований

імунітет, але також є есенціальним регулятором імунної відповіді В- і Т-клітин, макрофагів [2, 4, 5]. У зв'язку з цим сьогодні вважають, що ЗНВ пов'язано з патогенними Th17-клітинами, які надлишково секретують інтерлейкін-17 (IL-17) і можуть регулюватися за допомогою IL-4. Розвиток Th17-клітин і секреція цитокінів знижуються у пробірці за впливу IFN- γ та IL-4, що продукуються Th1- і Th2-клітинами відповідно [3, 11]. Деякі дані дозволяють припустити, що Th2-цитокін IL-4 може становити особливий інтерес для боротьби з Th17-індукованим запаленням. В організмі людини знижена реакція на IL-4, як вважають, зумовлює автоімунне запалення.

Мета дослідження: вивчення рівнів цитокінів IL-4 і IL-17 у сироватці крові і кондиційних середовищах культур мононуклеарів крові і оцінювання асоціативного зв'язку між їхньою продукцією та невиношуванням вагітності, яка настала у циклах ЕКЗ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Під спостереженням перебували 240 пацієнток групи Н зі ЗНВ, що настала у циклах ЕКЗ, і 100 умовно здорових фертильних жінок контрольної групи (К) з наявністю в анамнезі хоча б одних термінових пологів і відсутністю епізодів мимовільного переривання вагітності.

Визначення концентрації IL-4 та IL-17 у периферійній крові виконували цитометричним методом з використанням тест-системи BD Sciences на аналізаторі FACSCalibur, BD Sciences (США). Забір цільної периферійної крові проводили у вакуумні пластикові пробірки типу Vacuette об'ємом 4,0 мл під час отримання клітин з додаванням як антикоагулянта динатрієвої солі етилендіамінтетраацетату (ЕДТА) в кінцевій концентрації 2,0 мг/мл або посилювача згортання при виділенні сироватки.

Для виділення сироватки кров центрифугували 30 хв при 3000 об./хв і зберігали при -20 °С до проведення аналізу.

Виділення мононуклеарних клітин (МНК) з цільної крові виконували стандартно, у градієнті щільності фіколурографіну. Клітини культивували у повному культуральному середовищі RPMI 1640, що містить: 10% ЕТС, 2 мМ L-глутаміну, 80 мкг/мл гентаміцину, 100 мкг/мл ампіциліну і 5×10^{-5} М β -меркаптоетанолу. Культивування МНК проводили у 24-луноквих плоскодонних планшетах, в кожну лунку вміщували 1 мл повного культурального середовища, що містить 1×10^6 клітин. Клітини стимулювали мітогеном конканаваліном А у концентрації 10 мкг/мл. Кондиційні середовища збирали через 24 год після початку інкубації клітин і зберігали при -20 °С до проведення аналізу. Уміст цитокінів у сироватках крові та кондиційних

БЕСПЛОДИЕ И ПЛАНИРОВАНИЕ СЕМЬИ

Рівні цитокінів в обстежених жінок, пг/мл (M±m)

Цитокін	Група Н, n=240	Група К, n=100
<i>У сироватці крові обстежених жінок</i>		
IL-4	7,34±0,17	7,12±0,21
IL-17	85,87±2,16*	65,13±2,53
<i>У кондиційних середовищах нестимульованих МНК</i>		
IL-4	1,82±0,32	1,99±0,15
IL-17	56,82±0,44*	47,86±2,14
<i>У кондиційних середовищах стимульованих МНК</i>		
IL-4	12,02±0,56	12,87±0,65
IL-17	432,05±7,22*	322,37±9,17

Примітка. * – Статистично достовірна різниця з показником групи К (p<0,05).

середовищах культур МНК визначали за допомогою комерційних наборів компанії BioRad з використанням обладнання і програмного забезпечення Bio-Plex Protein Assay System (Bio-Rad, США). Для визначення цитокінпродукувальної активності МНК обчислювали індекс стимуляції продукції цитокінів як відношення рівня цитокінів у кондиційних середовищах культур стимульованих МНК до рівня цитокінів у кондиційних середовищах культур нестимульованих МНК.

Статистичне оброблення отриманих даних здійснено за допомогою електронної програми Microsoft Office 2007 for Windows XP Professional, STATISTICA 6.0 (Stat. Soft. Inc., США) з визначенням достовірності відмінностей при значенні p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Досліджувані групи були репрезентативні за віком. Середній вік обстежених жінок групи Н становив 29,80±0,30 року, а жінок групи К – 30,09±0,30 року (p>0,05). Переривання вагітності в групі Н у I триместрі мали 51,25% пацієнок, у II – 34,17%, у III – 14,58%.

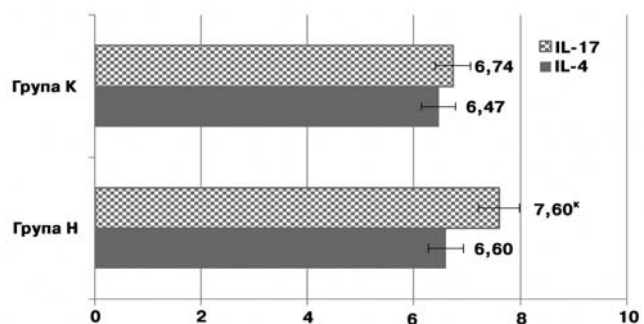
Під час порівняльного аналізу рівнів цитокінів було встановлено, що у жінок зі ЗНВ, що настала в циклах ЕКЗ, рівні IL-4 у сироватці крові і в кондиційних середовищах при спонтанній і стимульованій мітогеном секреції достовірно не відрізнялися від таких у контрольній групі, тоді як рівні IL-17 перевищували такі в групі контролю у сироватці, у кондиційних середовищах стимульованих і нестимульованих МНК (таблиця).

Індекс стимуляції продукції IL-4 у групі Н був

Уровни интерлейкина-4 и интерлейкина-17 (IL-4, IL-17) крови у пациенток с привычным невынашиванием беременности, которая наступила в цикле экстракорпорального оплодотворения К.П. Головатюк

Цель исследования: изучение уровней цитокинов IL-4 и IL-17 в сыворотке крови и кондиционных средах культур мононуклеаров крови (МНК) и оценка ассоциативной связи между их продукцией и невынашиванием беременности, которая наступила в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

Материалы и методы. Под наблюдением находились 240 пациенток с привычным невынашиванием беременности, наступившей в циклах ЭКО, и 100 условно здоровых фертильных женщин контрольной группы. Определяли концентрации IL-4 и IL-17 в сыворотках крови и кондиционных средах культур МНК.



Індекси стимуляції продукції цитокінів IL-4 та IL-17 у жінок зі ЗНВ після ЕКЗ

6,60±0,47 (p>0,05), IL-17 – 7,60±0,85 (p<0,05); у групі К – відповідно 6,47±0,43 і 6,74±0,56 (малюнок).

Виявлений дисбаланс продукції цитокінів IL-4 і IL-17 свідчить про те, що сироватковий цитокіновий фон формується не тільки залежно від кількості циркулюючого пулу імункомпетентних клітин, але і від їхніх функціональних властивостей, можливо, пов'язаних зі зміною генетичної детермінованості.

ВИСНОВКИ

Дизрегуляція активності циркулюючих мононуклеарів крові у жінок зі звичним невынашиванням вагітності, що настала після проведення ЕКЗ, супроводжується підвищенням секреції IL-17 і практично незмінною продукцією IL-4 на тлі високих індексів стимуляції продукції цих цитокінів.

Результаты. Уровни IL-4 в сыворотке крови и в кондиционных средах при спонтанной и стимулированной миотеном секреции достоверно не отличались от таковых в контрольной группе, тогда как уровни IL-17 превышали таковые в группе контроля в сыворотке, в кондиционных средах стимулированных и нестимулированных МНК.

Заключение. Дизрегуляция активности циркулирующих мононуклеаров крови у женщин с привычным невынашиванием беременности, наступившей после проведения ЭКО, сопровождается повышением секреции IL-17 и практически неизменной продукцией IL-4 на фоне высоких индексов стимуляции продукции этих цитокинов.

Ключевые слова: экстракорпоральное оплодотворение, невынашивание беременности, интерлейкин-4, интерлейкин-17, сыворотка крови, стимулированные и нестимулированные мононуклеары крови.

Levels interleukine-4 and interleukin-17 (IL-4, IL-17) of blood in patients with habitual recurrent pregnancy loss, which occurred in a loop in vitro fertilization
K.P. Golovatyuk

The objective: was to investigate the levels of cytokines IL-4 and IL-17 in serum and conditioned medium cultures of blood mononuclear cells (MNC) and evaluation association between their products and miscarriage, which occurred in IVF cycles.

Patients and methods. We observed 240 patients with recurrent miscarriage, came in IVF cycles, and 100 apparently healthy fertile women in the control group. The concentrations of IL-4 and IL-17 in serum and conditioned medium of MNC cultures were determined.

Results. The levels of IL-4 in the serum and conditioned medium in spontaneous and stimulated mitogen secretion was not significantly different from those in the control group, whereas IL-17 levels were higher than those in the control group serum, in conditioned media of stimulated and non-stimulated MNCs.

Conclusion. Disregulation of activity of circulating blood mononuclear cells in women with recurrent miscarriage that followed IVF, is accompanied by increased secretion of IL-17 and almost constant production of IL-4 on the back of high stimulation index of production of these cytokines.

Key words: *in vitro fertilization, miscarriage, interleukin-4, interleukin-17, serum stimulated and non-stimulated mononuclear blood.*

Сведения об авторе

Головатюк Екатерина Петровна – ООО «Медицинский центр репродуктивного здоровья «Гамета», 65039, г. Одесса, ул. Слепнева, 3-А; тел.: (048) 738-68-69. E-mail: info@gameta.od.ua

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Cytokines in recurrent pregnancy loss [Текст] / Saini V., Arora S., Yadav A. [et al.] // Clin. Chim. Acta. – 2011. – Vol. 412, N 9–10. – P. 702–8. doi: 10.1016/j.cca.2011.01.002.
2. High interleukin-4 expression and interleukin-4 gene polymorphisms are associated with susceptibility to human paracoccidiodomycosis [Текст] / Mendonza M.S., Perazolli T.S., Silva-Vergara M.L. [et al.] // Jr. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2015. – Vol. 110, N 6. – P. 781–785. doi: 10.1590/0074-02760150197.
3. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells [Текст] / Korn T., Mitsdoerffer M., Croxford A.L. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2008. – Vol. 105, N 47. – P. 18460–5. doi: 10.1073/pnas.0809850105.
4. Interleukin-4 gene polymorphism is not involved in the risk of recurrent pregnancy loss [Текст] / Saijo Y., Sata F., Yamada H. [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 2004. – Vol. 52, N 2. – P. 143–146.
5. Lack of Association of the Polymorphisms IL-17A(?197G/A) and IL-17F (+7488A/G) with Multibacillary Leprosy in Mexican Patients [Текст] / Escamilla-Tilch M., Estrada-Garcia I., Granados J. [et al.] // International Journal of Genomics. – 2014. – Vol. 2014. Article ID 920491, 5 p. http://dx.doi.org/10.1155/2014/920491.
6. Rasti Z. The IL-6-634C/G polymorphism: a candidate genetic marker for the prediction of idiopathic recurrent-pregnancy loss [Текст] / Rasti Z., Nasiri M., Kohan L. // Int. J. Reprod. Biomed (Yazd). – 2016. – Vol. 14, N 2. – P. 103–8.
7. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? [Текст] / Guerin L.R., Prins J.R., Robertson S.A. // Hum. Reprod. Update. – 2009. – Vol. 15. – P. 517–535.
8. Robertson S.A. Immune regulation of conception and embryo implantation-all about quality control? [Текст] / S.A. Robertson // J. Reprod. Immunol. – 2010. – Vol. 85. – P. 51–57.
9. The immune system during pregnancy [Текст] / Munoz-Suano A., Hamilton A.B., Betz A.G. [et al.] // Immunol. Rev. – 2011. – Vol. 241. – P. 20–38.
10. The relationship between cytokine gene polymorphism and unexplained recurrent spontaneous abortion in Saudi females [Текст] / Alkhuriji A.F., Alhaimidi A.R., Babay Z.A. [et al.] // Saudi Medical Journal. – 2013. – Vol. 34. – P. 484–489.
11. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease [Текст] / Afzali B., Lombardi G., Lechler R. [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 2007. – P. 148, N 1. – P. 32–46. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03356.x.

Статья поступила в редакцию 12.09.2016