

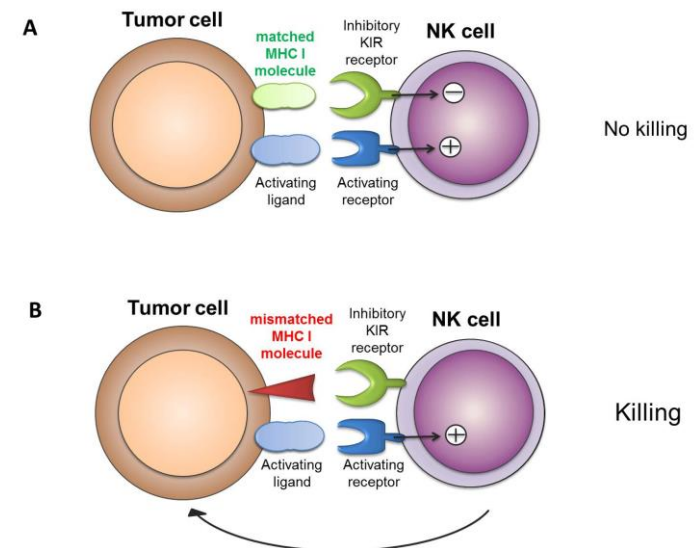


## NK bunky v reprodukčnej imunológii

Kinga Szabóová, Elena Tibenská, Karolína Haramiová

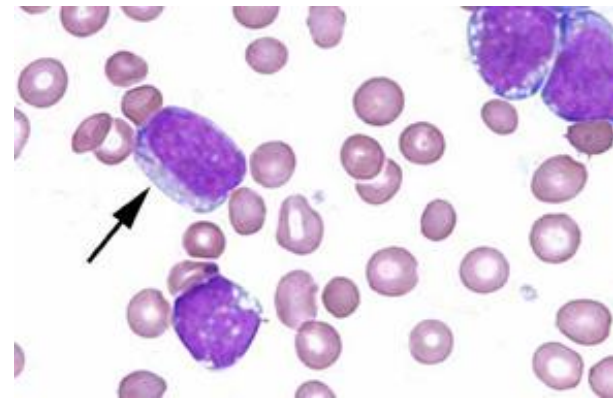
## NK bunky všeobecne (1)

- 3 hlavné typy lymfocytov (T lymfocyty, B lymfocyty a NK bunky)
- Prirodzená imunita
- Ochrana organizmu pred patogénmi a nádorovými bunkami
- Rozpoznávajú a zničia infikované a transformované bunky
- Neohrozujú normálne bunky
- Zmena/ absencia molekúl MHC I. triedy na povrchu infikovaných alebo stresovaných buniek



## NK bunky všeobecne (2)

- 5 subtypov NK buniek v periférnej krvi (PK)
- Prevalencia ~10% z celkového počtu lymfocytov v PK, 1-5% v lymfoidných orgánoch
- Expresia CD69 – stimulácia rôznymi druhmi stimulov (IL-2, mitogény – PWM, PMA, bunkové antigény – K562, JAR, vírusové infekcie)
- Malá alebo chýbajúca cytotoxická aktivita v PK



## NK bunky v reprodukcií

- Endometrium – **uterinné NK bunky (uNK)**
- Pre-ovulačná fáza – malé, negranulované NK bunky v endometriu
- Sekrečná fáza – ↑ počtu NK buniek (↑ hladina progesteronu)
- Koniec menštruačného cyklu – ↓ počtu NK buniek (smrť)
- Fenotyp uNK buniek – non-T lymfocyty, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> (NK bunky v PK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>)
- Expresia NKp44 receptora
- Pôvod uNK buniek – žiadny konsenzus

## NK v tehotenstve (1)

- Tehotenstvo – unikátny a dobre odsledovaný fyziologický proces, ktorý zahŕňa dynamický materno-fetálny dialóg
- Výsledok tehotenstva – lokálna imunitná tolerancia, angiogenéza, cytokínová a hormonálna rovnováha, bunkové a molekulárne mimikry, genetické, epigenetické a environmentálne podnety, súhra prozápalovej a protizápalovej signalizácie, hormonálne zmeny, bunkové udalosti

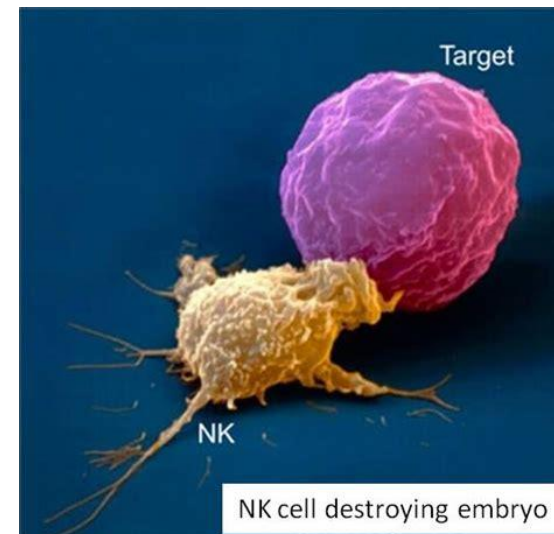


## NK bunky v tehotenstve (2)

- Supresia imunitného systému matky– význam NK buniek
- Vzájomná komunikácia medzi imunitnými bunkami maternice a trofoblastovými bunkami
- Similarita medzi trofoblastovými bunkami a nádorovými bunkami
- uNK bunky podporujú angiogenézu produkciou angiogénnych faktorov, cytokínov a chemokínov
- Podporná úloha NK buniek v maternici s vyvíjajúcim sa plodom a strata cytotoxického fenotypu
- NK bunky počas tehotenstva -  $\uparrow$  hladiny pri počatí,  $\downarrow$  hodnoty od II. trimestra, takmer neprítomné počas pôrodu

## NK bunky a poruchy reprodukcie (1)

- Pozorovanie zvýšených počtov uNK v endometriu žien s reprodukčnými poruchami - úloha v patogenéze
- Žiadny presvedčivý dôkaz, že sú príčinou porúch reprodukcie



## NK bunky a poruchy reprodukcie (2)

- **RIF (Recurrent Implantation Failure)** – uNK bunky hrajú významnú úlohu v procese implantácie, štúdie ukázali zvýšený počet NK buniek v PK u žien s RIF a jedna štúdia ukázala zvýšené počty aj uNK buniek, iné štúdie s menej jasnými výsledkami
- **RM (Recurrent Miscarriage)** - ↑ počet CD56 + buniek v PK od žien s anamnézou RM, sú potrebné ďalšie štúdie na potvrdenie
- **Pre-eklampsia** – nedostatočná prestavba špirálových tepien, kľúčová úloha uNK buniek v remodelácii špirálových tepien, štúdie ukazujúce ↑ počty uNK, ďalšie štúdie ukazujú zníženie uNK buniek



## Úloha testovania NK buniek

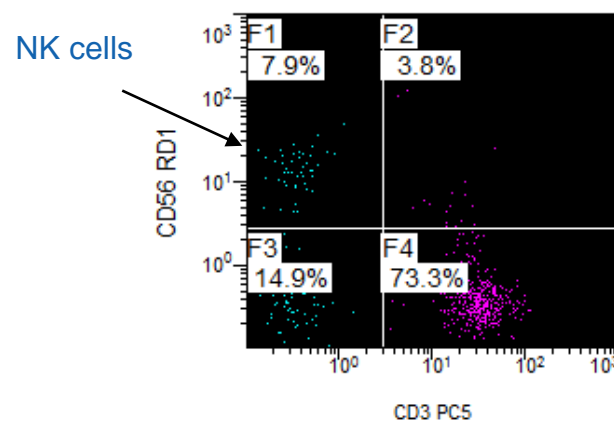
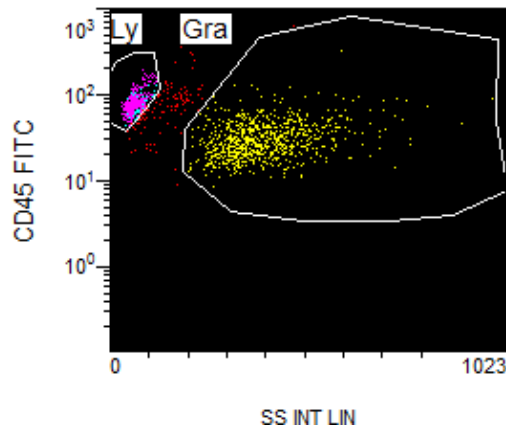
### Testovať PK alebo uNK bunky?

- **uNK bunky** – stanovenie imunologickým farbením tkaniva alebo „rozsekaním a rozpúšťaním“ tkaniva a následnou analýzou v PC
  - ich počty sa líšia v priebehu menštruačného cyklu, správne načasovanie odberu vzoriek je veľmi dôležité
  - neexistujú referenčné rozsahy
- **PK NK bunky** – stanovenie expresie CD56+ pomocou PC
  - analýza expresie CD69+ aktivačného antigénu po stimulácii NK buniek v PK

## NK v našom laboratóriu

### Stanovenie expresie CD56+ pomocou PC

- Výsledky v % a v abs. počtoch
- Výsledky ovplyvnené menštruačným cyklom
- Ref. hodnoty 5-24% (0,1-0,5 abs. počty)

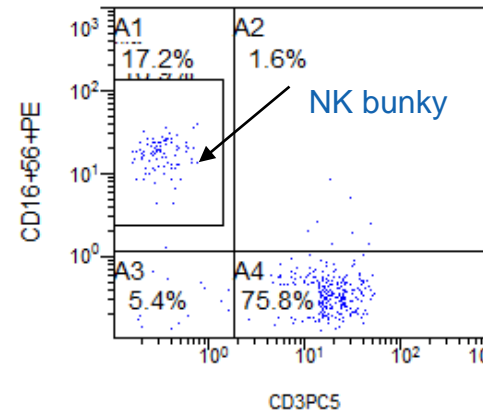
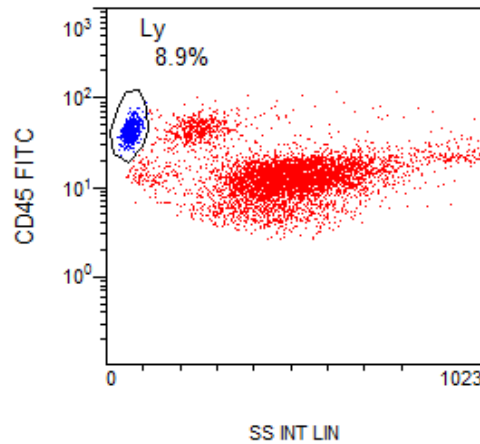


## NK bunky v našom laboratóriu

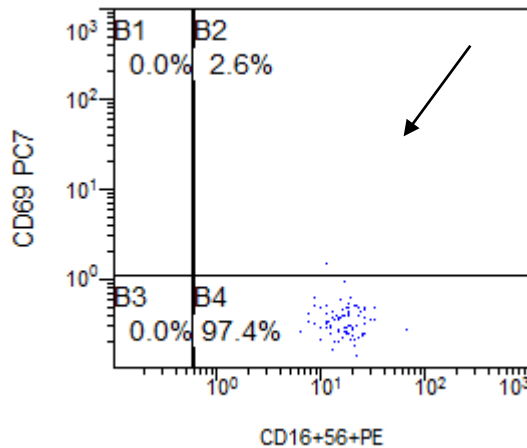
### Analýza expresie CD69 aktivačného antigénu

- Detekcia aktivačného antigénu CD69+ na povrchu NK buniek po stimulácii vzorky ľudskej heparinizovanej PK reagensiou stimulačnej kontroly (PMW) a/alebo iným stimulom
- Negatívna kontrola – bez stimulačnej reagensie, expresiu CD69+ nevykazuje
- ❖ 24/48 h inkubácia so stimulačnými reagensiami (PMW a JAR bunky)
- ❖ Označenie pomocou kokteilu MoAb (CD45+ -FITC, CD16+CD56+ -PE, CD3+ - PE-Cy5, CD69+ - PE-Cy7)
- ❖ Lýza RBC
- ❖ Analýza pomocou PC (min. 2000 NK buniek)
- ❖ Interpretácia výsledkov NC < 5%, PC > 20%, JAR bunky – stanovenie ref. hodnôt

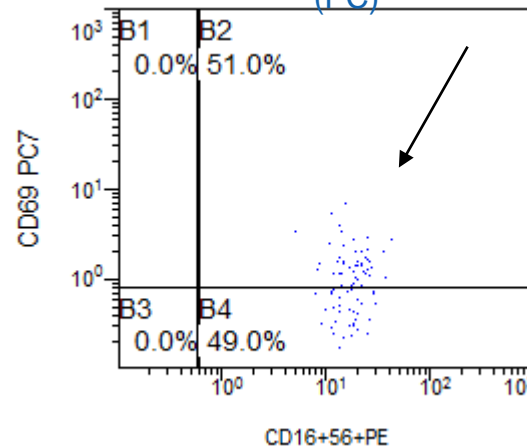
## NK bunky v našom laboratóriu Expresia CD69 povrchového antigénu



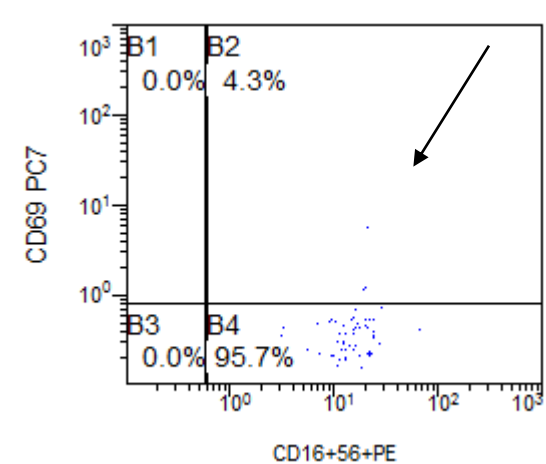
Bez stimulácie (NC)



Stimulácia s PMW (PC)



Stimulácia s JAR

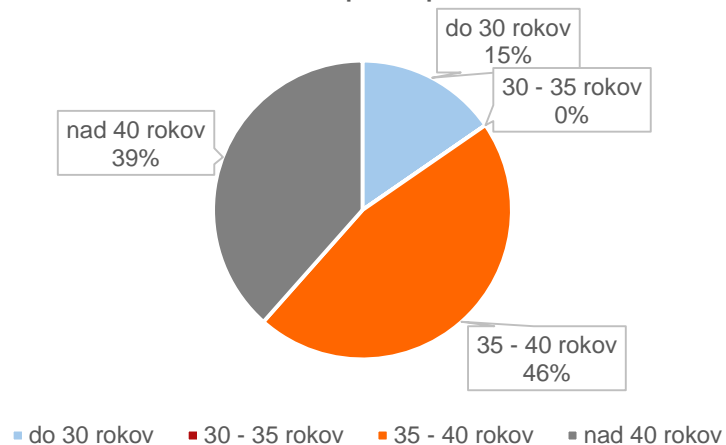


## Nastavenie metódy

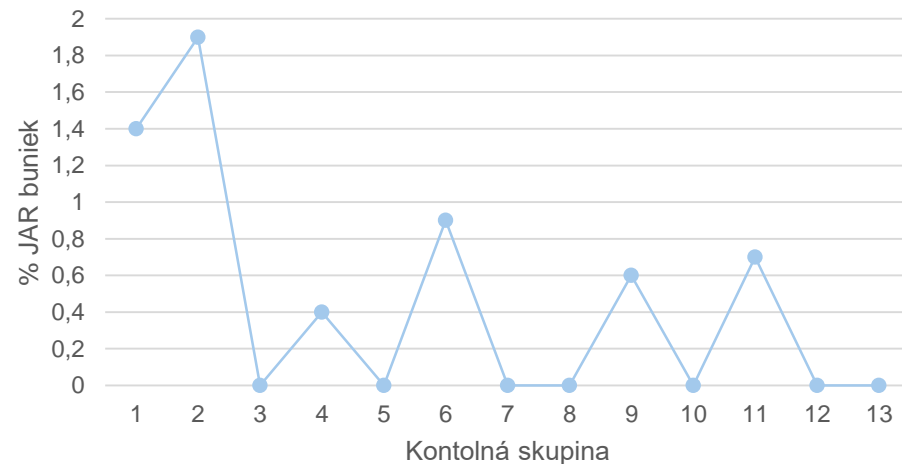
### Kontrolný súbor

- 13 žien vo fertilnom veku, bez reprodukčných ťažkostí
- Vek 27 - 49

Kontrolná skupina podľa veku



Stimulácia JAR - bunky



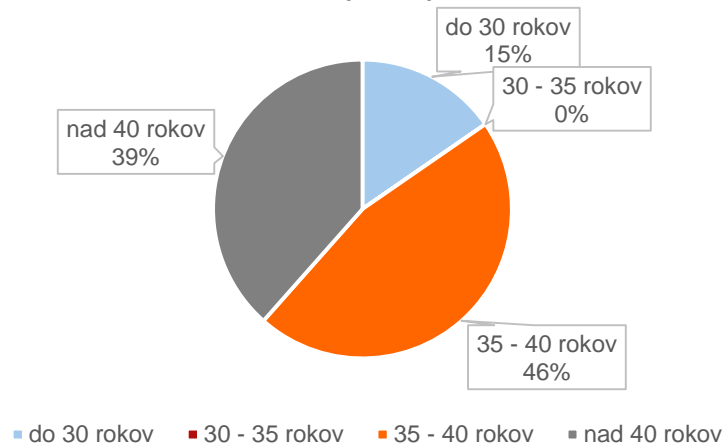
- Vplyv inkubácie (24/48 hod) na výsledok testu – žiadny
- Vplyv času spracovania vzorky na výsledok testu

## Nastavenie metódy

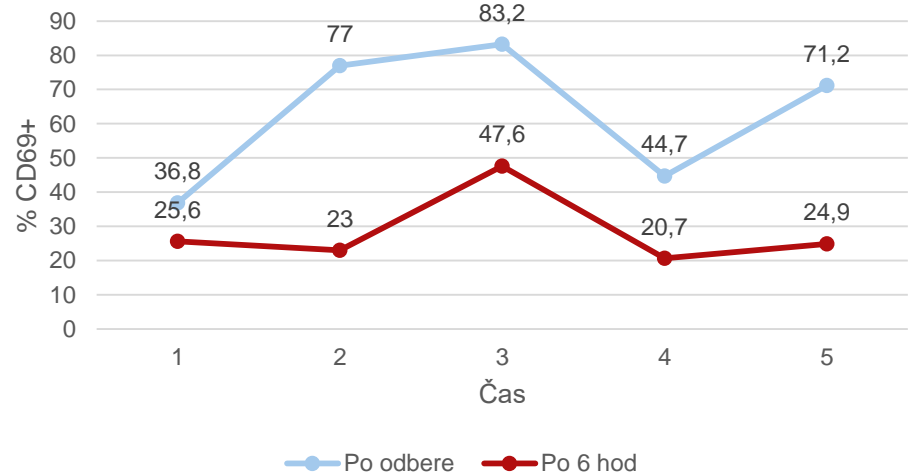
### Kontrolný súbor

- 13 žien vo fertilnom veku, bez reprodukčných ťažkostí
- Vek 27 - 49

Kontrolná skupina podľa veku



Vplyv času na PK



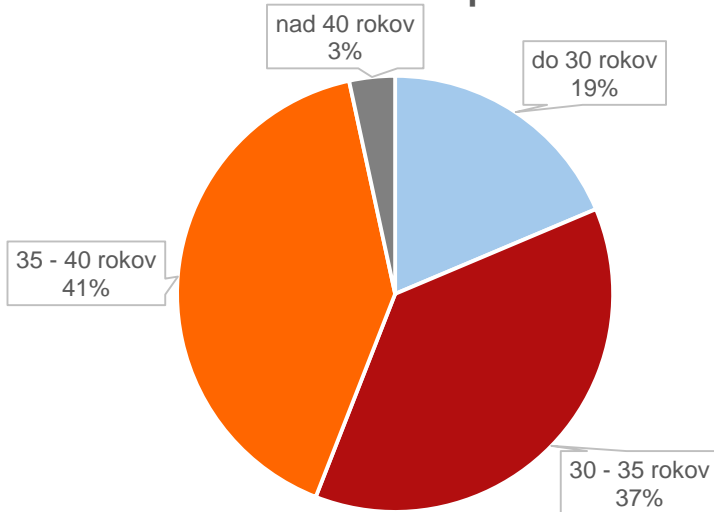
- Vplyv inkubácie (24/48 hod) na výsledok testu – žiadny
- Vplyv času spracovania vzorky na výsledok testu

## Súbor pacientiek

- 59 pacientiek (október 2018 – marec 2019), 1. odber
- Vek 25 – 46
- Dg N97

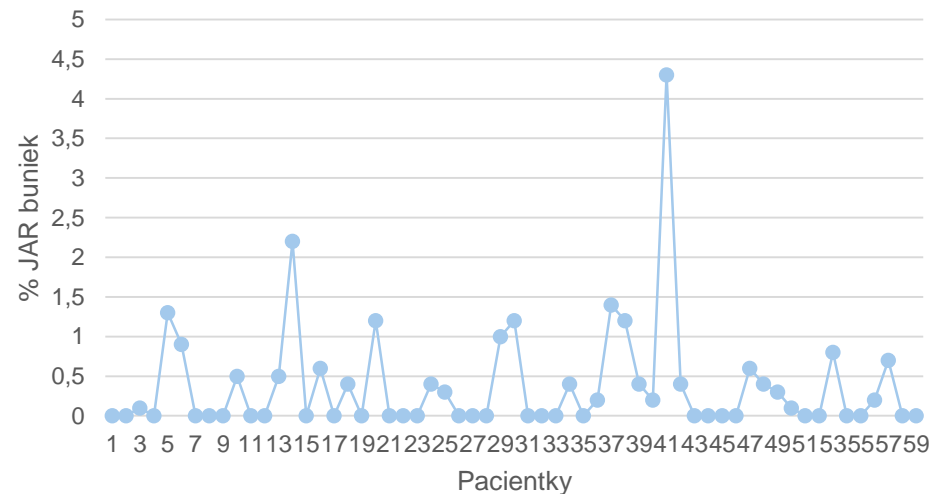
do 30 rokov	30 - 35 rokov	35 - 40 rokov	nad 40 rokov
11	22	24	2

Rozdelenie súboru podľa veku



■ do 30 rokov ■ 30 - 35 rokov ■ 35 - 40 rokov ■ nad 40 rokov

Stimulácia - JAR bunky



## Záver

- Vzťah medzi NK bunkami a reprodukciou – najviac kontroverzná oblasť v reprodukčnej imunológii
- NK bunky – hlavné typy lymfocytov v sliznici maternice pri implantácii a počas skorého štádia tehotenstva
- uNK bunky sa líšia od NK buniek v PK
- Funkcia uNK buniek v tehotenstve zatiaľ nie je dobre známa
- Testy na meranie cirkulujúcich NK buniek v ľudskej PK neposkytujú žiadne užitočné informácie o uNK bunkách, ale tieto merania môžu byť užitočné v budúcnosti, keď budeme vedieť viac o vzťahu uNK a NK buniek v PK

Pochopenie funkcie uNK buniek je určite jednou hlavnou výzvou reprodukčnej imunológie.



# Ďakujem za pozornosť!

