Imunofenotypizace NK buněk u pacientů s protilátkovými imunodeficity

Jana Nechvátalová

Ústav klinické imunologie a alergologie

Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně

Co víme o CVID a IgAD?

CVID
(Běžný variabilní imunodeficit)

- hypogamaglobulinémie (IgG,IgA)
- infekční komplikace
- autoimunitní onemocnění
- granulomatózní zánět
- gastrointestinální komplikace
- malignity

- poruchy B- a T-lymfocytárního kompartmentu
- dysregulace na úrovni neutrofilů
- chronická imunitní aktivace
- snížení počtu NK buněk u části pacientů

IgAD
(Selektivní deficit IgA)

- IgA<0,07g/l
- často asymptomatický průběh
- infekce sliznic
- vyšší výskyt autoimunitních onemocnění

- méně výrazné změny na úrovní B- a T-lymfocytů
- možné společné genetické pozadí s CVID
- omezené údaje o NK buňkách

Detailní imunofenotypizace NK buněk u CVID a IgAD stále chybí.

Proč se zabývat NK buňkami u protilátkových imunodeficitů

Zvýšený výskyt malignit u CVID – NK buňky jako součást protinádorového dohledu

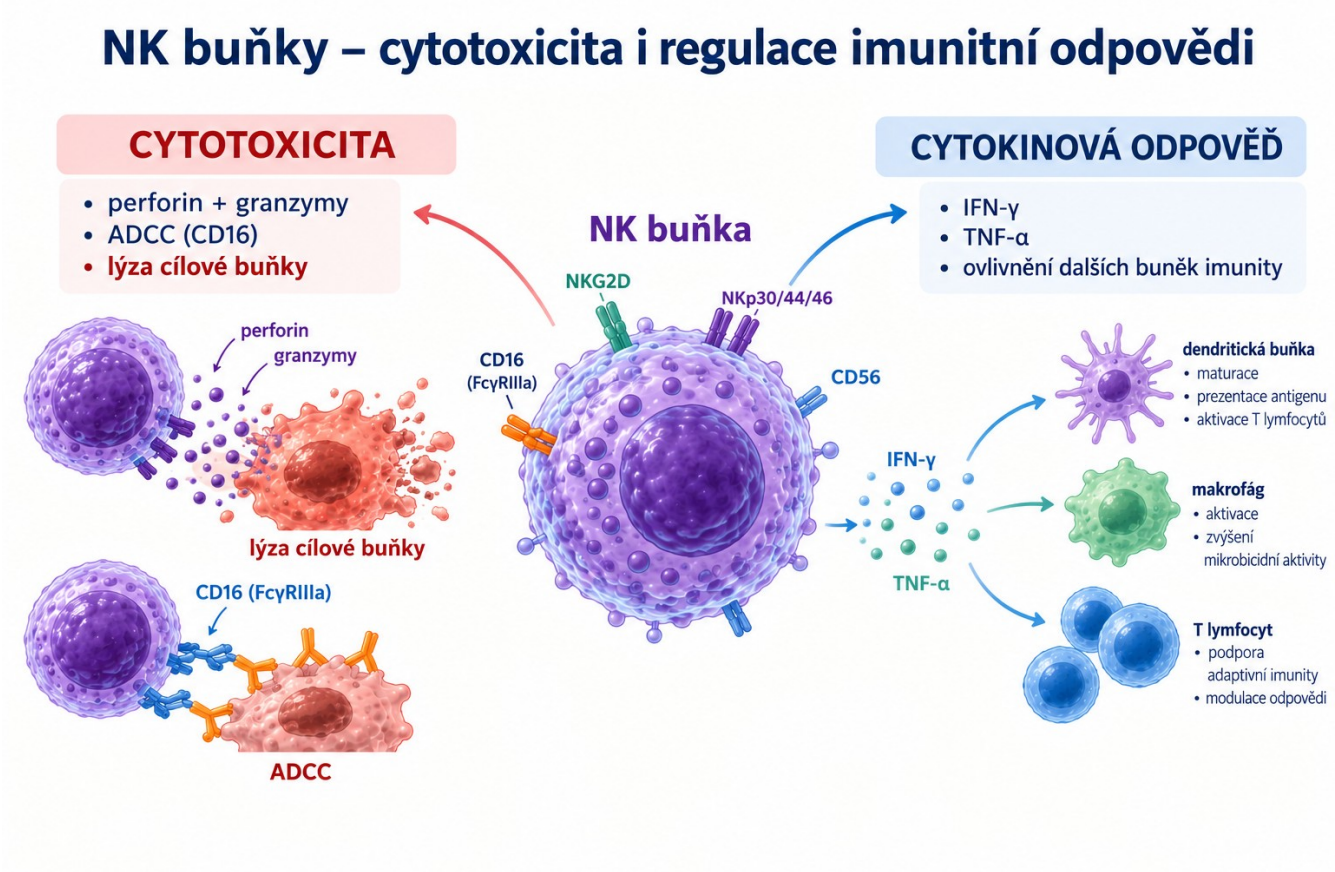
Autoimunitní a zánětlivé komplikace u CVID - zkoumání imunoregulačních vlastností NK buněk

Dřívější studie popsaly snížené počty NK u části pacientů s CVID - nízké počty NK buněk u CVID spojeny s vyšším výskytem závažných bakteriálních infekcí a granulomatózních komplikací.

Různorodost NK buněk - jednotlivé subpopulace se liší receptorovým profilem i funkčním vlastnostmi

Srovnání CVID a IgAD umožňuje hledat společné i rozdílné změny u dvou protilátkových imunodeficitů

NK buňky



NK buňky nemají antigenně specifické receptory, aktivace závisí na tom, zda převáží aktivační nebo inhibiční signály.
(missing-self, induced-self)

buňky vrozené imunity
5 – 20 % lymfocytů v periferní krvi

ADCC
CD16 – Fcγ receptor pro IgG

CD56 (NCAM *Neural Cell Adhesion Molecule* **)**
adhezivní molekula

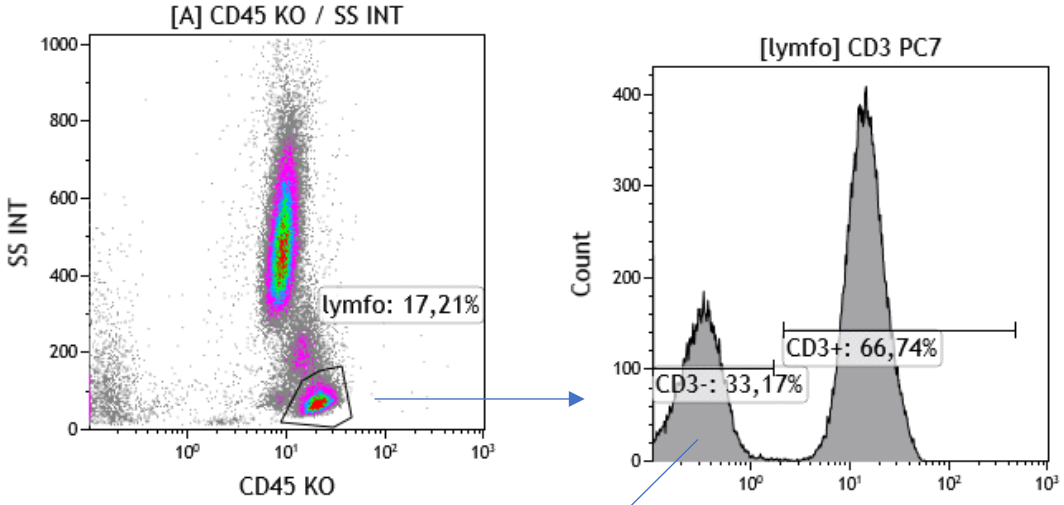
Diferenciace / maturace
CD57, CD27, CD11b, CD62L

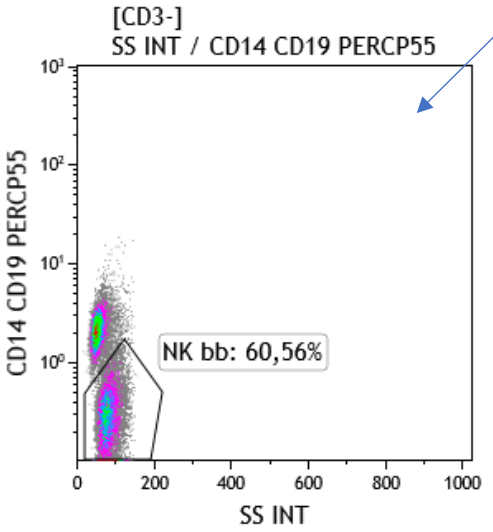
Aktivační receptory
NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, KIR

Inhibiční receptory / NK-cell education
CD94/NKG2 (NKG2A), KIR

Cytokinová odpověď
IL-12R, IL-18R, IL-15R

Fu B, Tian Z, Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. Immunology. 2014 Apr;141(4):483-9 ; Obrázek AI





1- CD56^{bright}CD16^{+}

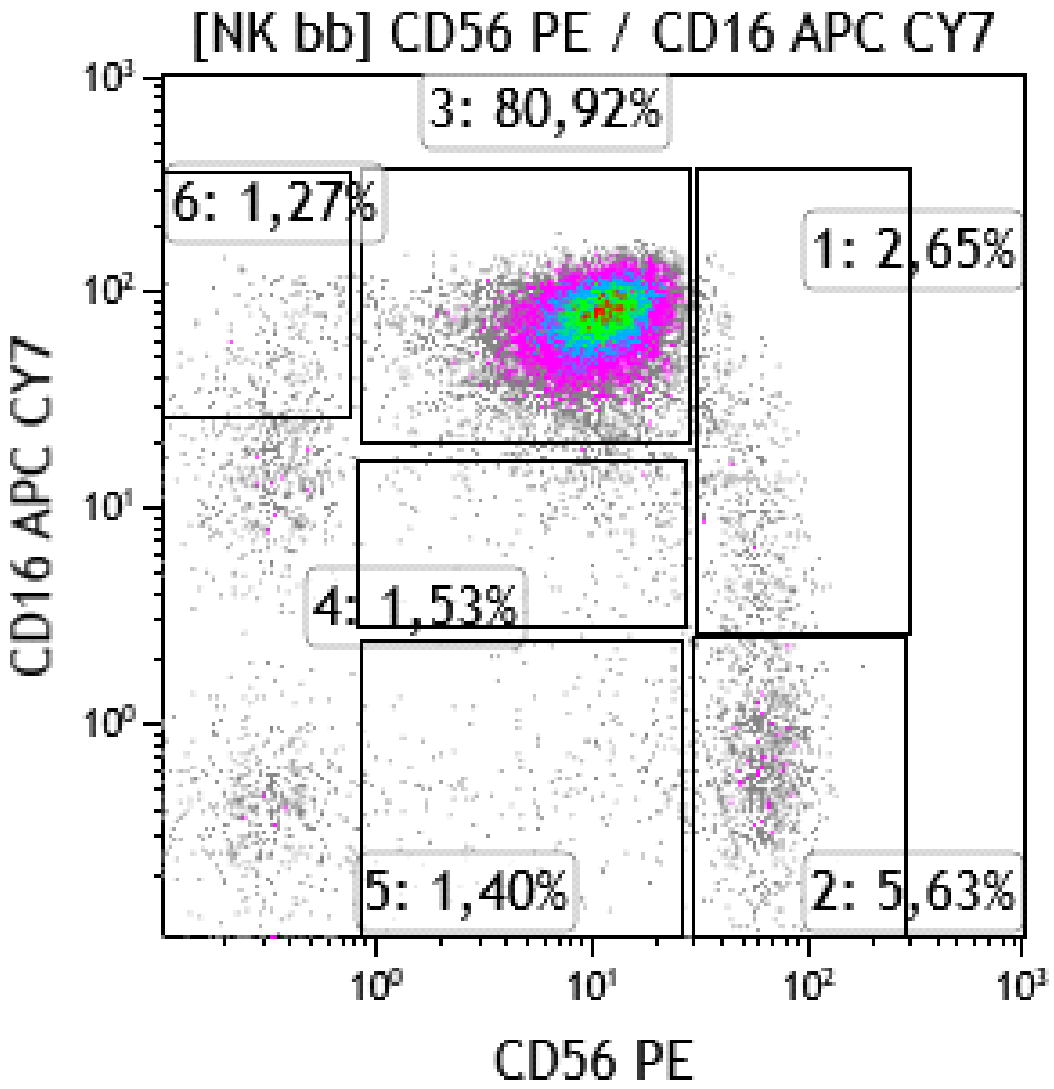
2- CD56^{bright}CD16^{-}

3- CD56^{dim}CD16^{+}

4- CD56^{dim}CD16^{dim}

5- CD56^{dim}CD16^{-}

6- CD56^{-}CD16^{+}



Poli A, Michel T, Theresine M, et al. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. Immunology. 2009;126:458–465.
Amand M, Iserentant G, Poli A, et al. Human CD56dimCD16dim Cells as an Individualized Natural Killer Cell Subset. Front Immunol. 2017;8:699.

heterogenní populace

- podle exprese povrchových znaků se dělí na subpopulace, které se liší zralostí, funkcí

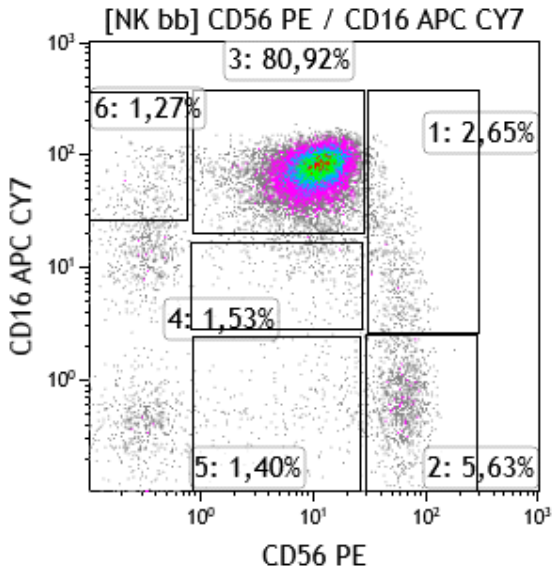
základní rozdělení podle CD56 a CD16:

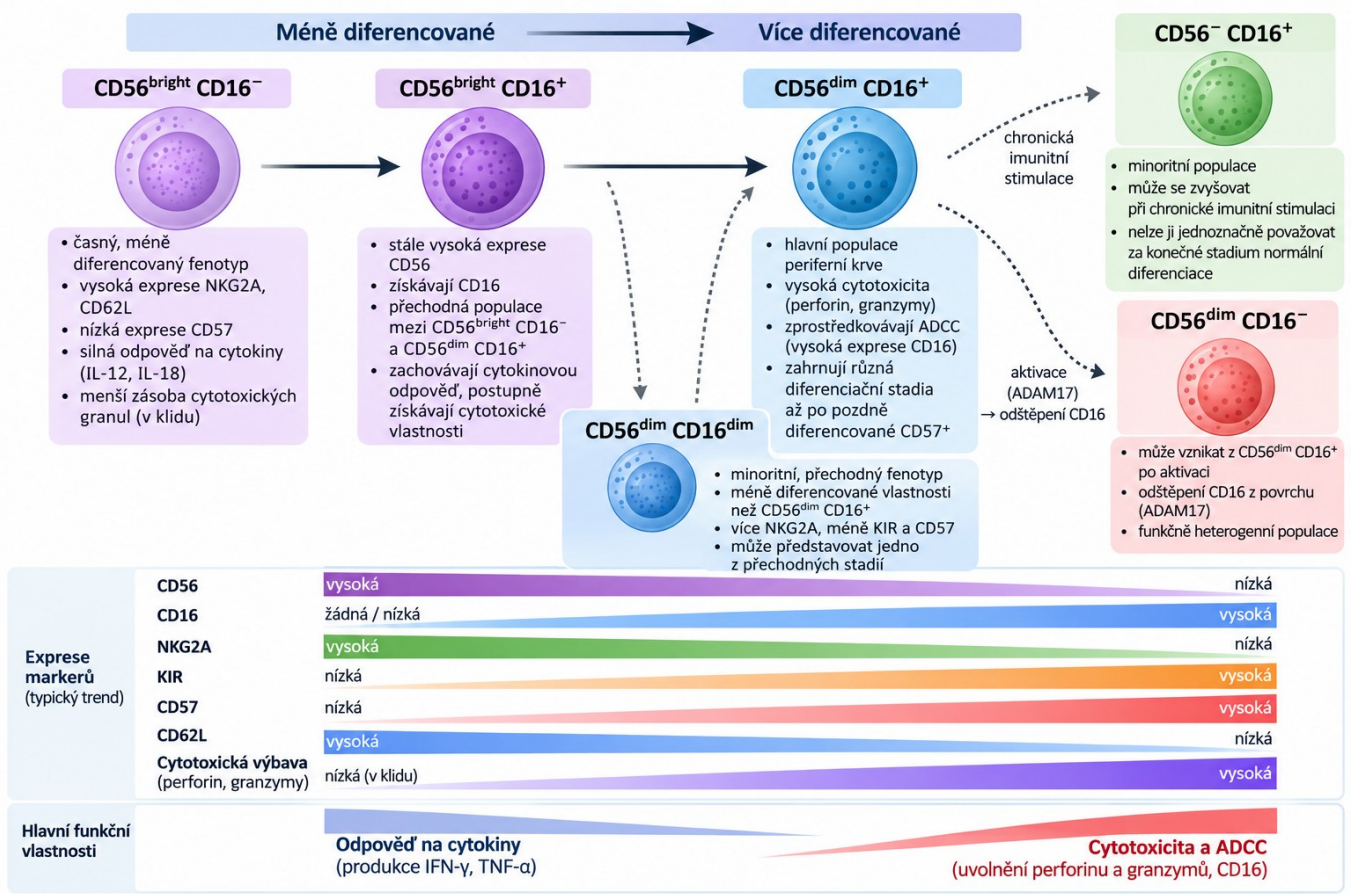
- **CD56^{bright}**

- méně diferencované
- odpověď na cytokiny a produkce cytokinů

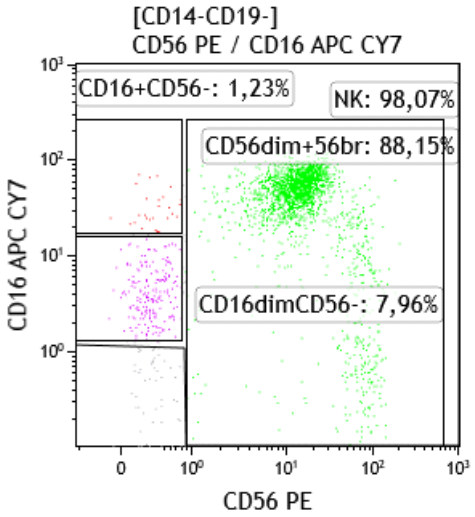
- **CD56^{dim} CD16^{+}**

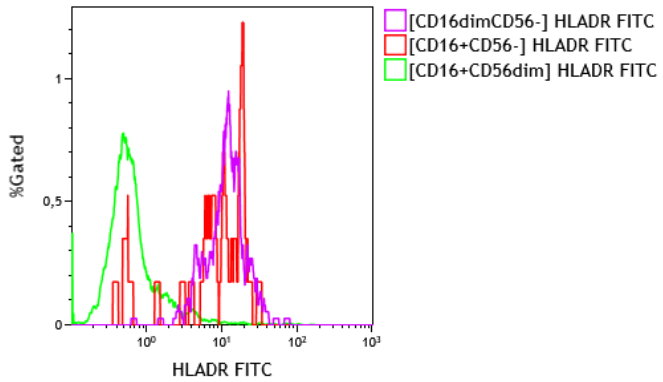
- převažují v periferní krvi
- výrazná cytotoxická funkce

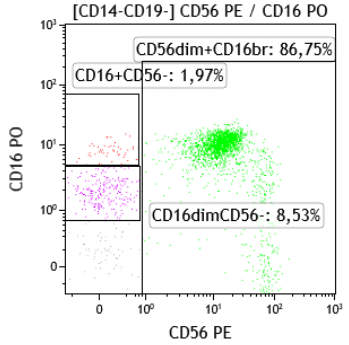


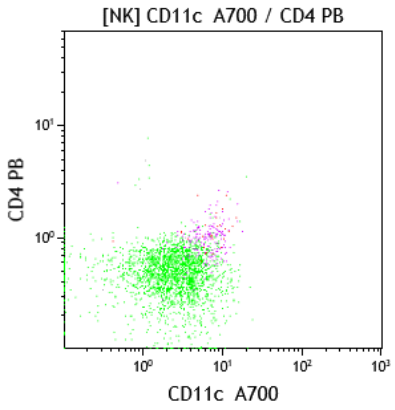


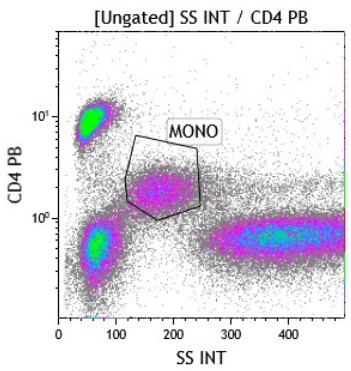
Den odběru

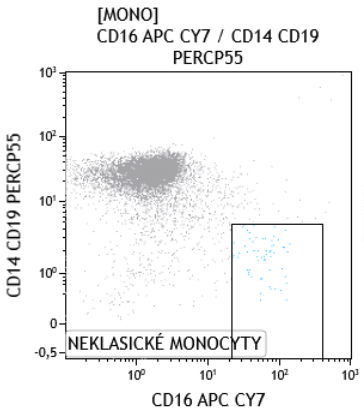


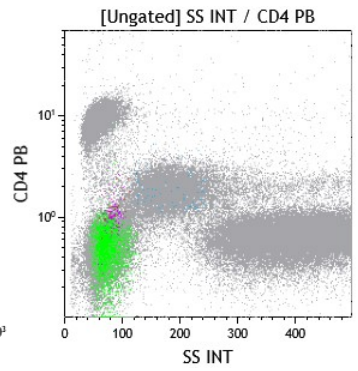




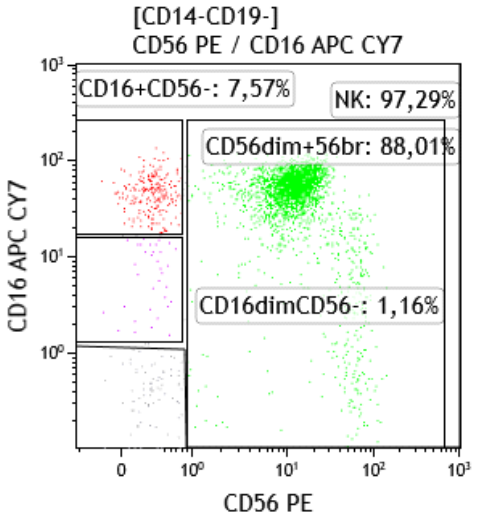


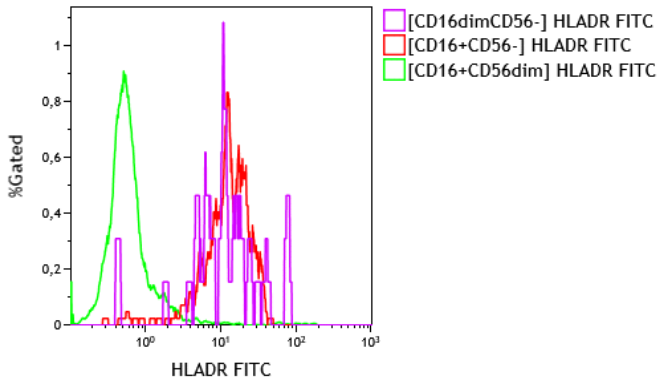


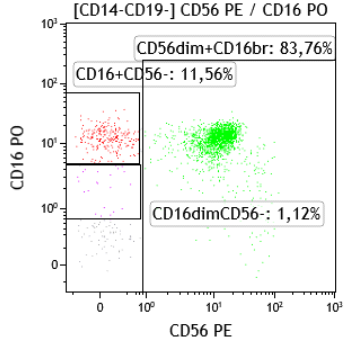


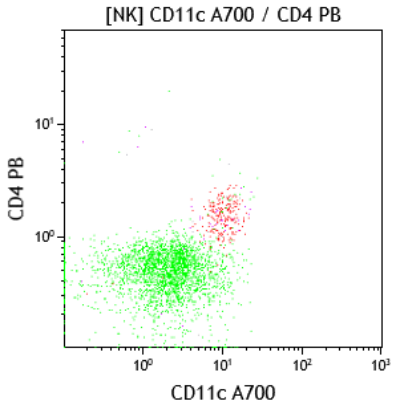


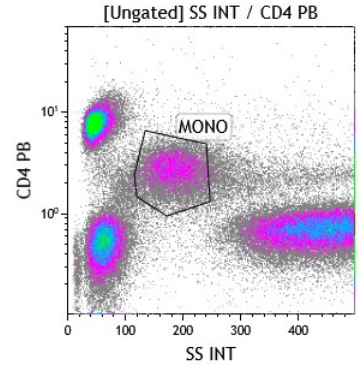
Druhý den

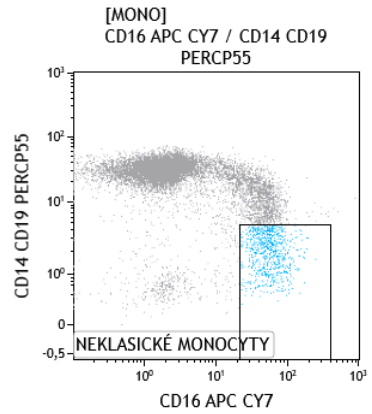


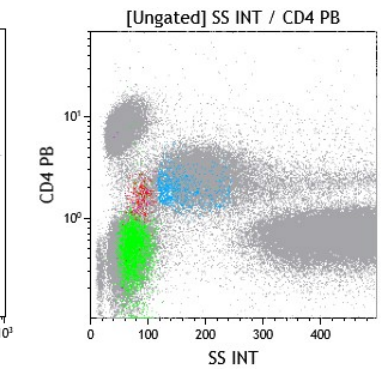


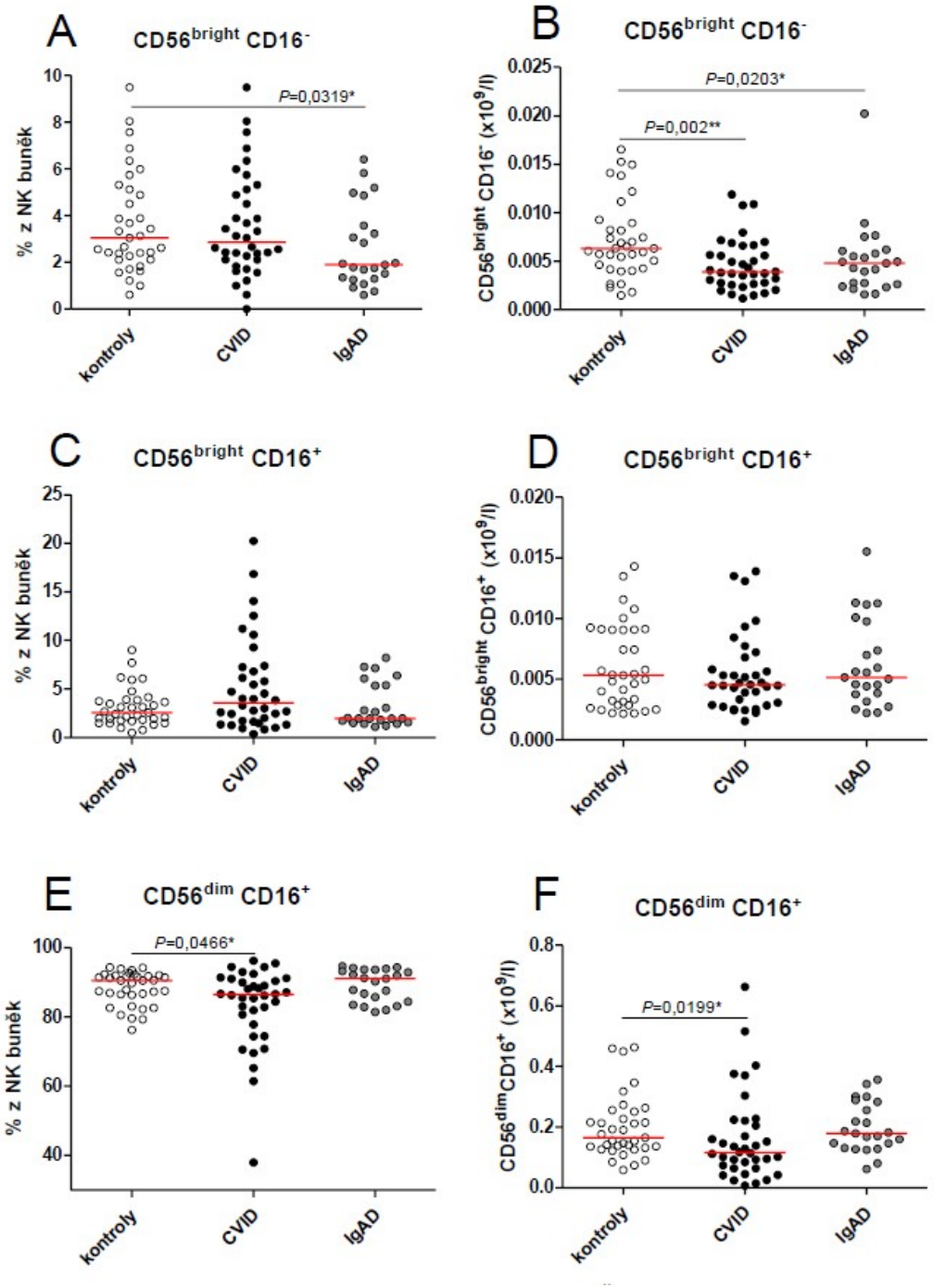








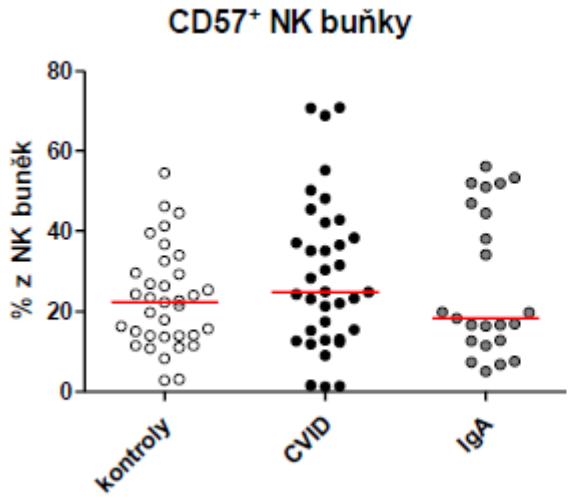


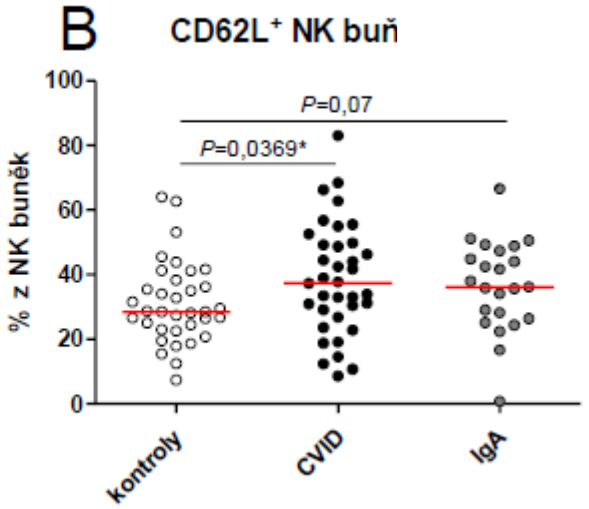


	n	muži	ženy	věk Md (min-max)
Kontroly	31	8	23	47 (23-68)
CVID	32	11	21	45 (24-74)
IgAD	20	5	15	49 (18-66)

CVID: ↓ absolutní počet $CD56^{br}CD16^{-}$ a ↓ relativní i absolutní zastoupení $CD56^{dim}CD16^{+}$ NK buněk

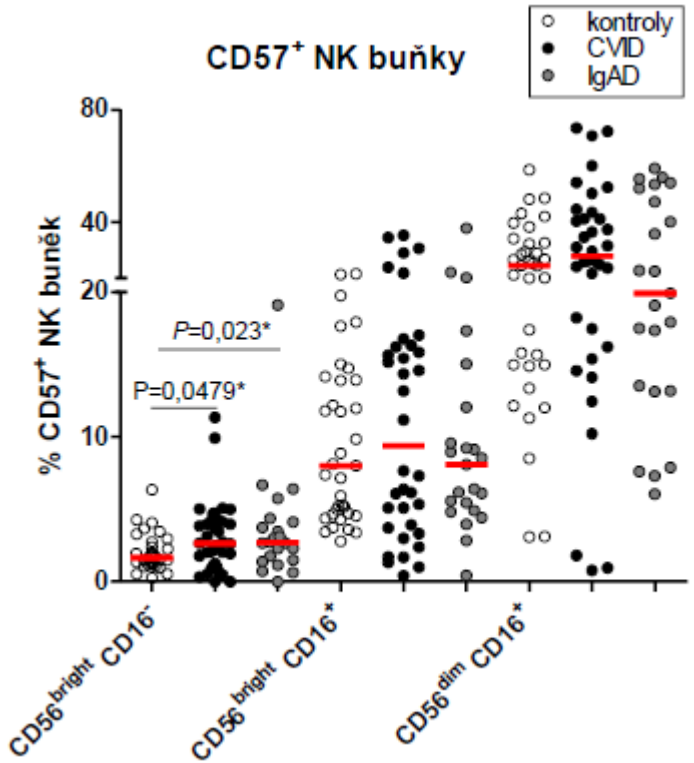
IgAD: ↓ relativní zastoupení i absolutní počet $CD56^{br}CD16^{-}$ NK buněk

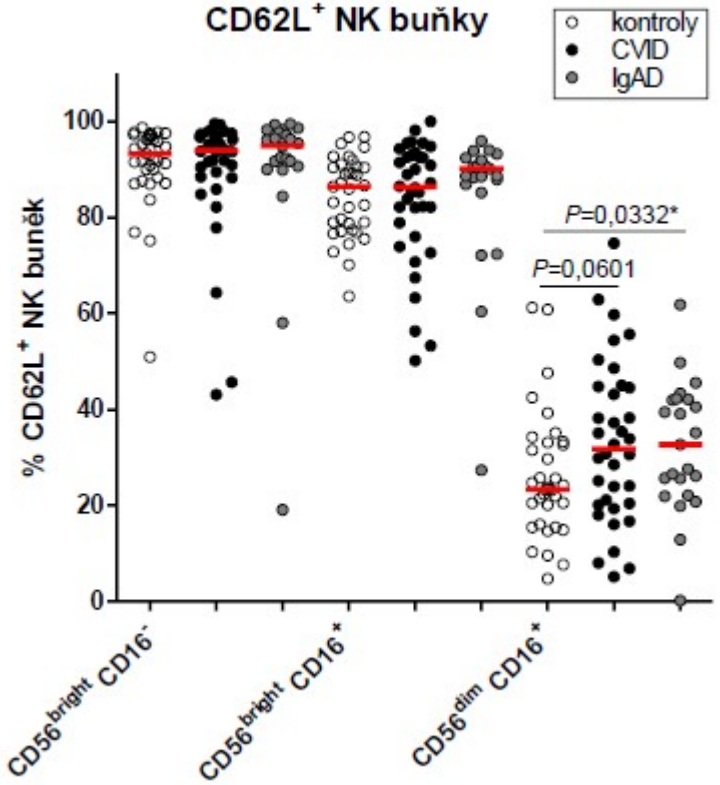


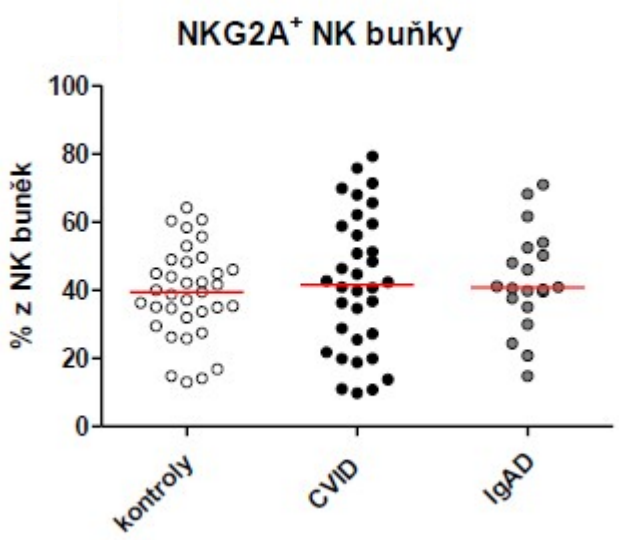


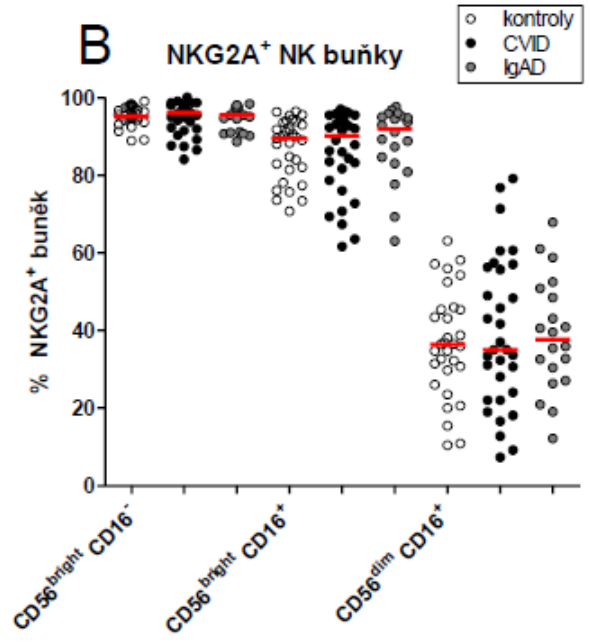
pacienti s CVID i IgAD
- vyšší zastoupení $CD56^{dim}CD62L^{+}$ buněk

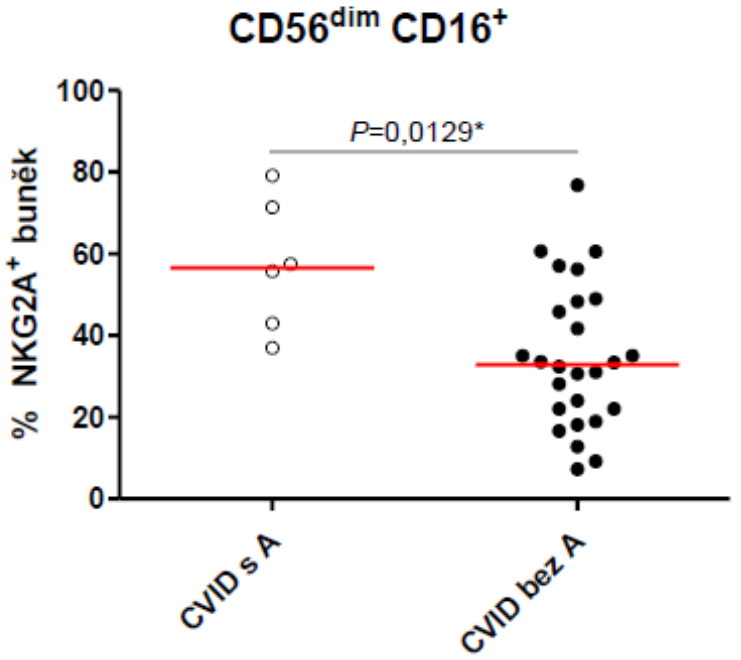
<u>intermediární polyfunkční buňky</u>
- cytotoxicita
- současně schopnost proliferace a produkce IFN-γ po stimulaci cytokiny

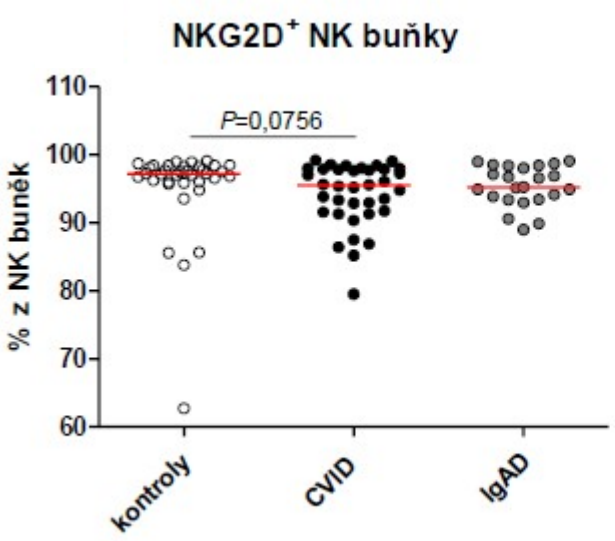


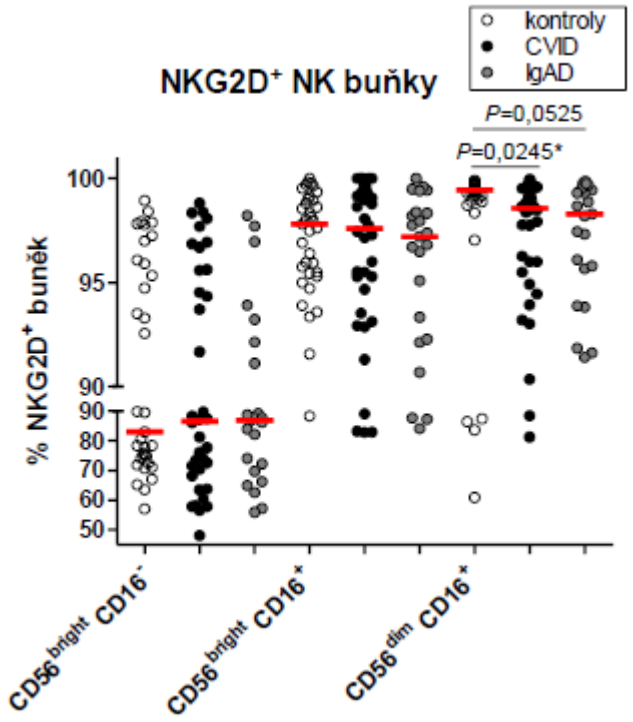


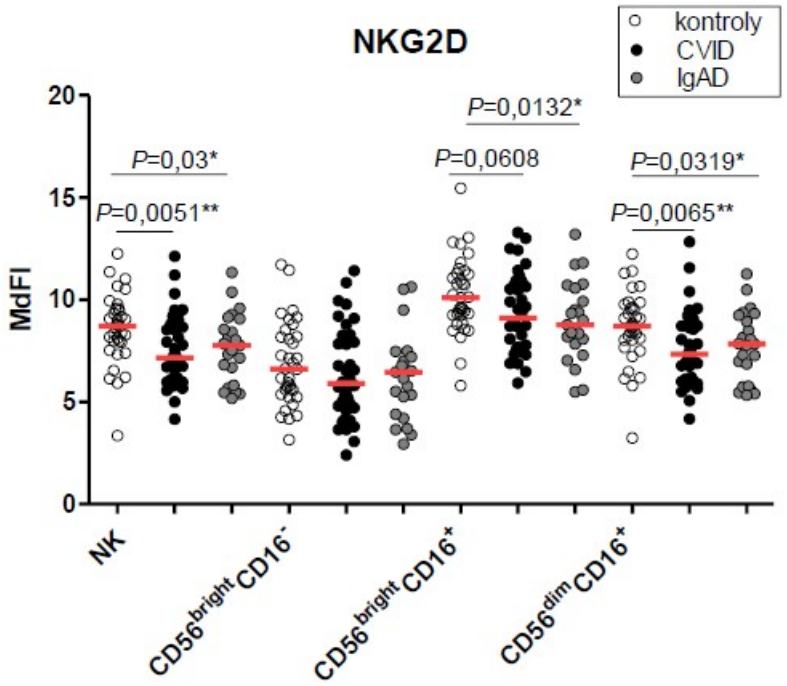

NKG2A+ NK buňky
% z NK buněk
100
80
60
40
20
0
kontroly
CVID
IgAD


B
NKG2A+ NK buňky
kontroly
CVID
IgAD
% NKG2A+ buněk
100
80
60
40
20
0
CD56bright CD16-
CD56bright CD16+
CD56dim CD16+

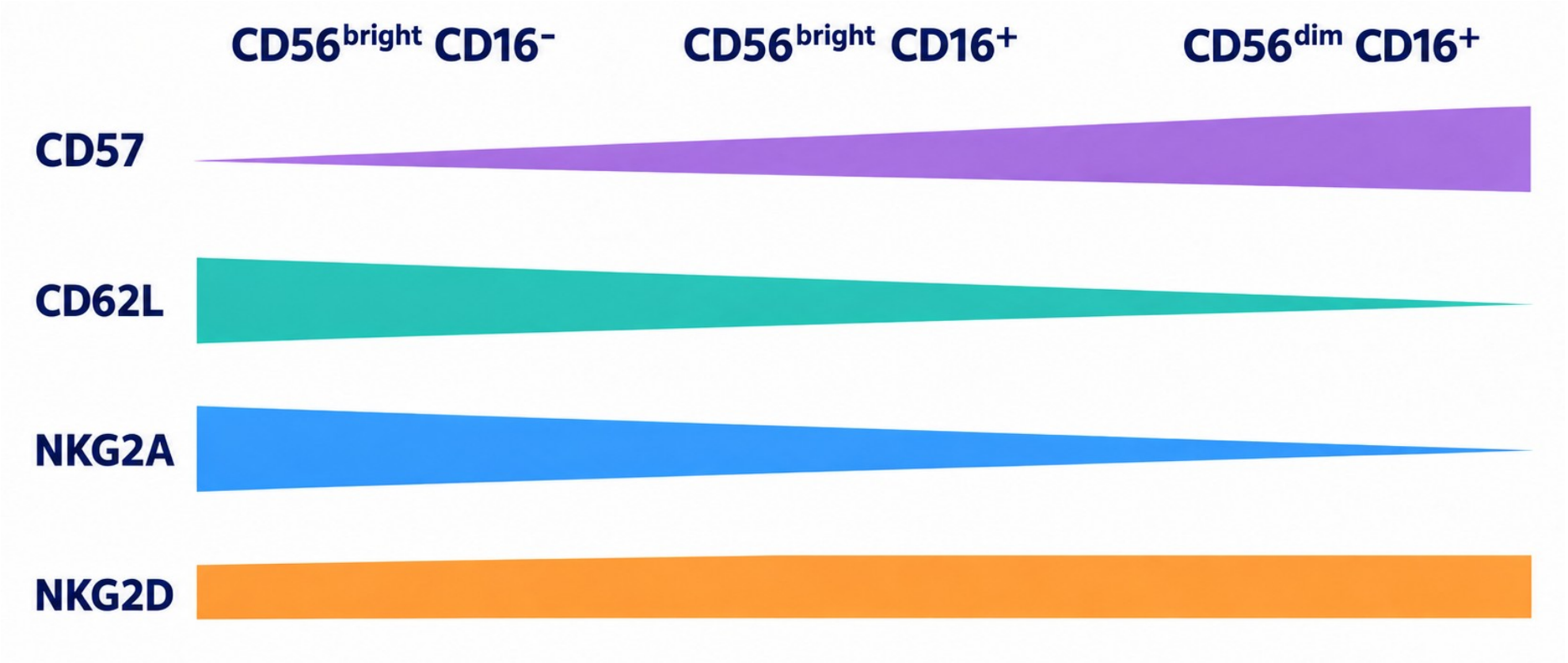

CD56dim CD16+
% NKG2A+ buněk
P=0,0129*
100
80
60
40
20
0
CVID s A
CVID bez A

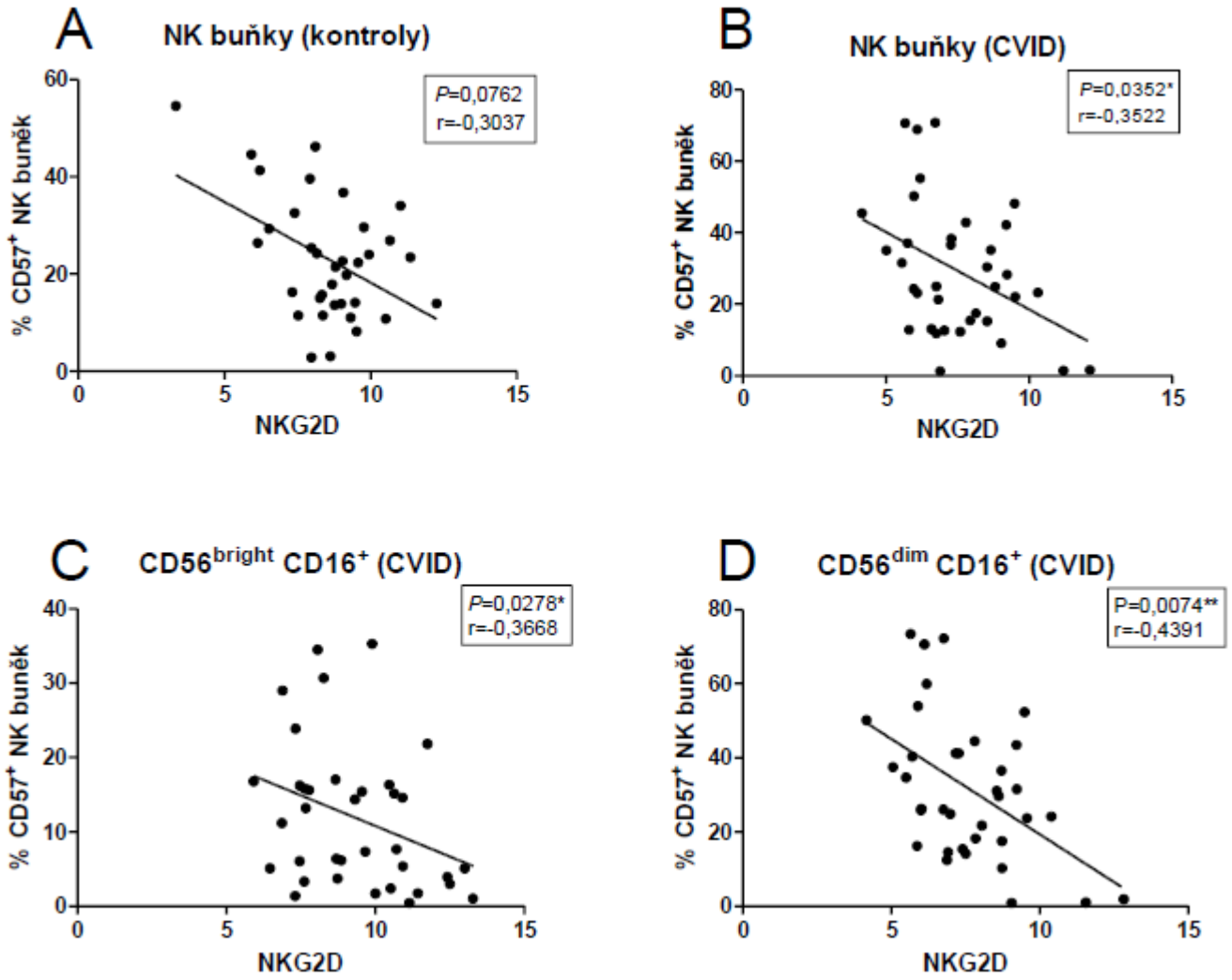

NKG2D+ NK buňky
% z NK buněk
P=0,0756
110
100
90
80
70
60
kontroly
CVID
IgAD


NKG2D+ NK buňky
kontroly
CVID
IgAD
% NKG2D+ buněk
P=0,0525
P=0,0245*
100
95
90
90
80
70
60
50
CD56bright CD16-
CD56bright CD16+
CD56dim CD16+


NKG2D
kontroly
CVID
IgAD
MdFI
P=0,03*
P=0,0051**
P=0,0132*
P=0,0608
P=0,0319*
P=0,0065**
20
15
10
5
0
NK
CD56bright CD16-
CD56bright CD16+
CD56dim CD16+

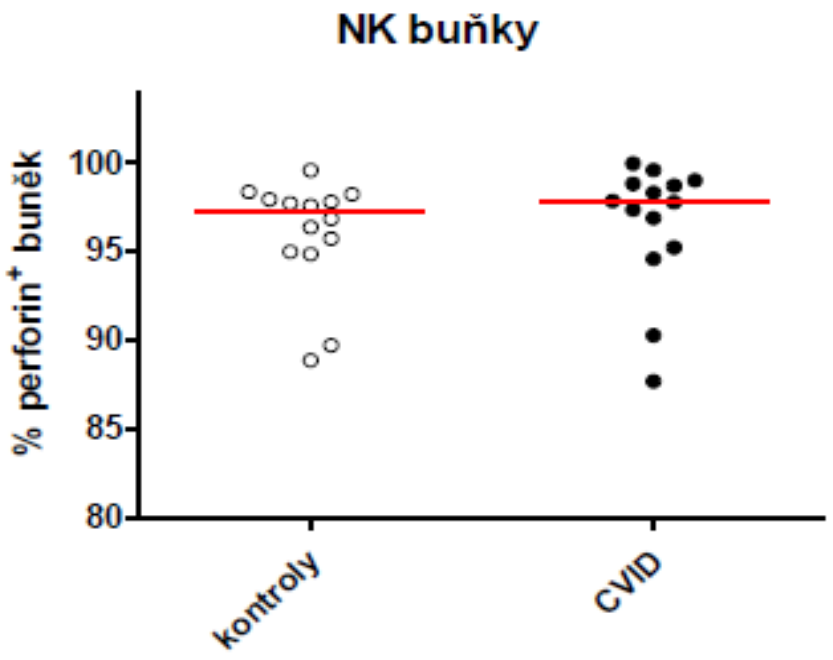
Zastoupení buněk pozitivních pro sledované znaky v jednotlivých NK subpopulacích

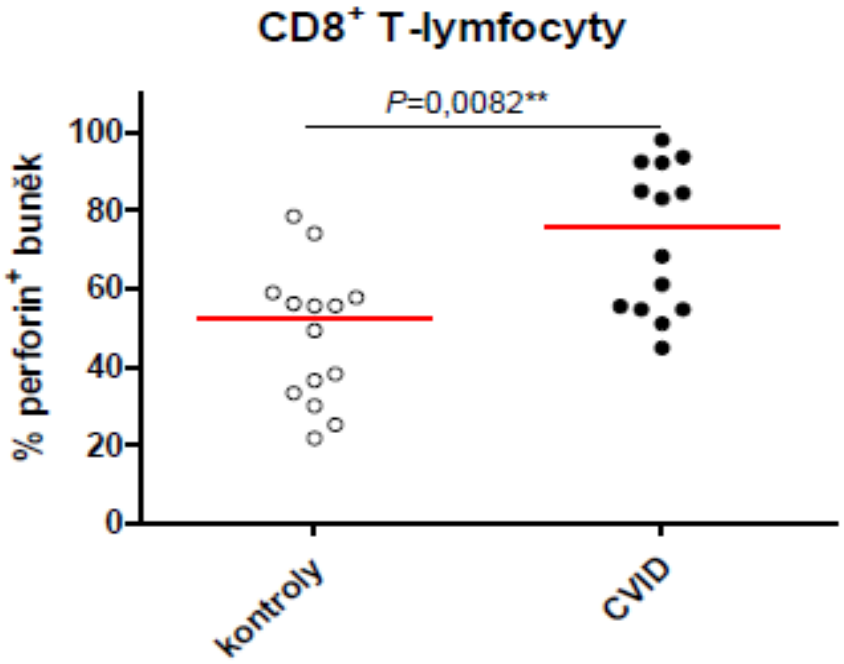




Nižší exprese NKG2D souvisí s vyšším stupněm diferenciace NK buněk.

Intracelulární značení perforinu (CD45, CD3, CD14, CD16, CD8, perforin)





Shrnutí

Naše výsledky ukazují, že u pacientů s protilátkovými imunodeficity se mění nejen zastoupení NK buněk, ale také jejich diferenciační a receptorový profil.

U CVID jsme pozorovali úbytek dominantní $CD56^{dim}CD16^{+}$ subpopulace s výrazným cytotoxickým potenciálem.
U IgAD se pokles $CD56^{br}CD16^{-}$ buněk s významnou úlohu v produkci cytokinů a regulaci imunitní odpovědi.

Vyšší zastoupení $CD62L^{+}$ buněk v $CD56^{dim}$ populaci - tyto buňky mohou kombinovat cytotoxické schopnosti se schopností proliferace a odpovědi na cytokiny.

Snížená exprese NKG2D by mohla souviset s dlouhodobou imunitní aktivací a ovlivňovat schopnost NK buněk reagovat prostřednictvím tohoto receptoru.
Vyšší podíl $NKG2A^{+}$ buněk u pacientů s CVID a autoimunitou může představovat snahu o omezení nadměrné imunitní odpovědi zesílením inhibičních mechanismů. Tento nález potřeba ověřit na větším souboru.

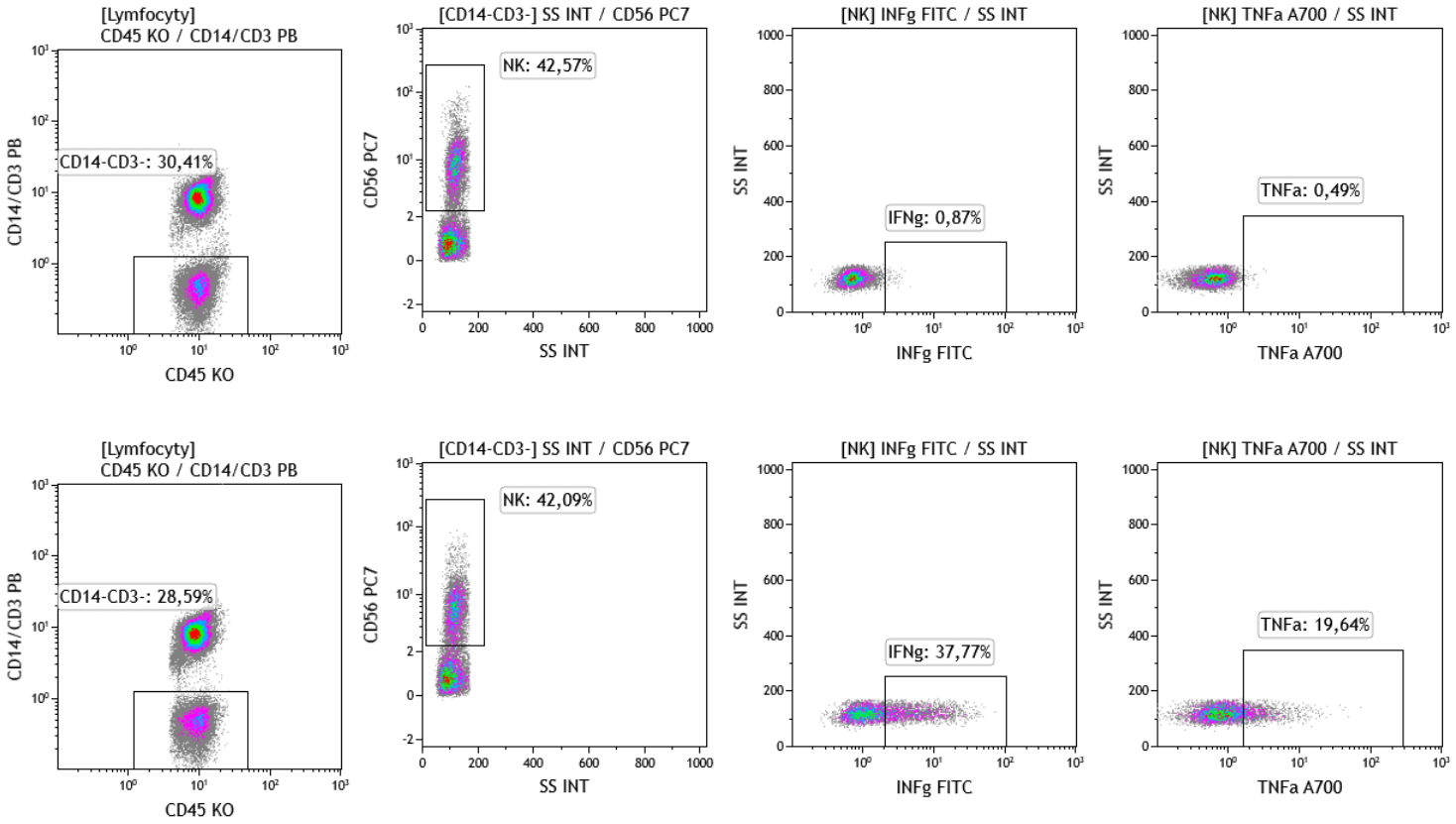
Výsledky naznačují možnou souvislost změněného fenotypu NK buněk s chronickou aktivací a dysregulací imunitního systému. Funkční význam těchto změn nyní zkoumáme vyšetřením cytokinové odpovědi NK buněk po stimulaci.

Stimulace NK buněk

DURActive 4 - stimulace NK pomocí IL-12 a IL-18, brefeldin
stimulace 3-5h, ve vodní lázni (37°C)

DURAClone IF NK Activation panel - CD45, CD3/CD14, CD56, IFN-γ, TNF-α

PerFix-n – fixace a permeabilizace - umožňuje spolehlivé barvení extracelulárních i intracelulárních epitopů



Děkuji za pozornost

