Od endometriální tkáně k cytometrickým datům: imunologický pohled

Mgr. Tereza Kovářová
Imunologická laboratoř

Gennet

Obsah

- 1/Endometrium

  Dynamický imunologický orgán

- 2/Uterinní NK buňky

  Cytotoxicita versus angiogeneze, remodelace, komunikace

- 3/T-regulační buňky

  Imunitní tolerance plodu

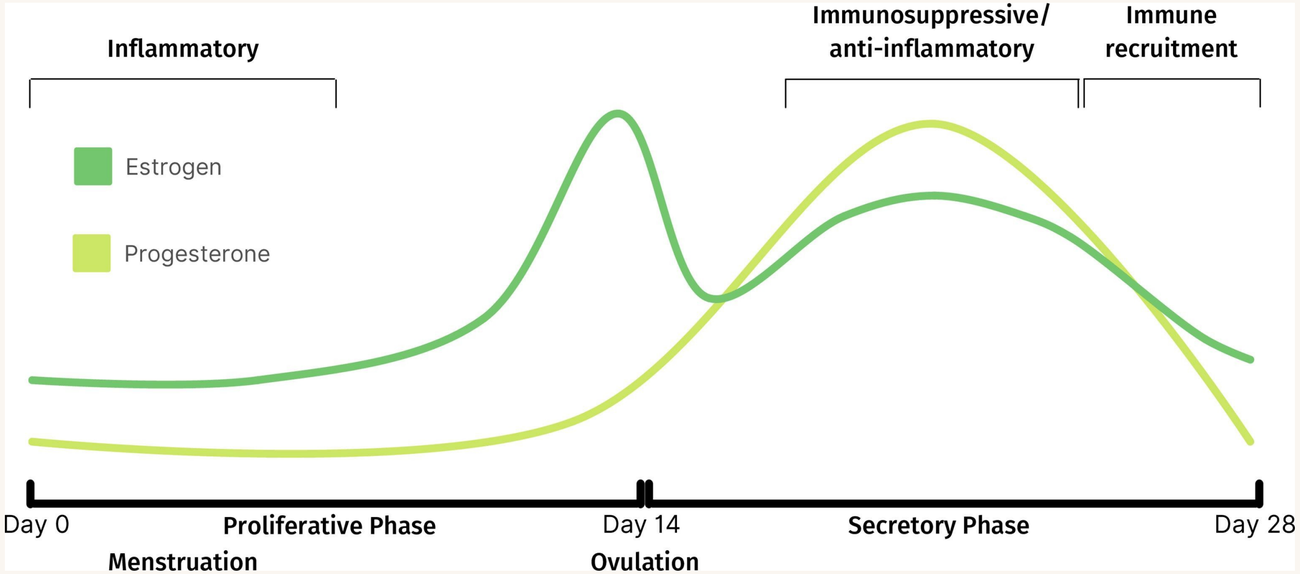
- 4/Plazmatické buňky

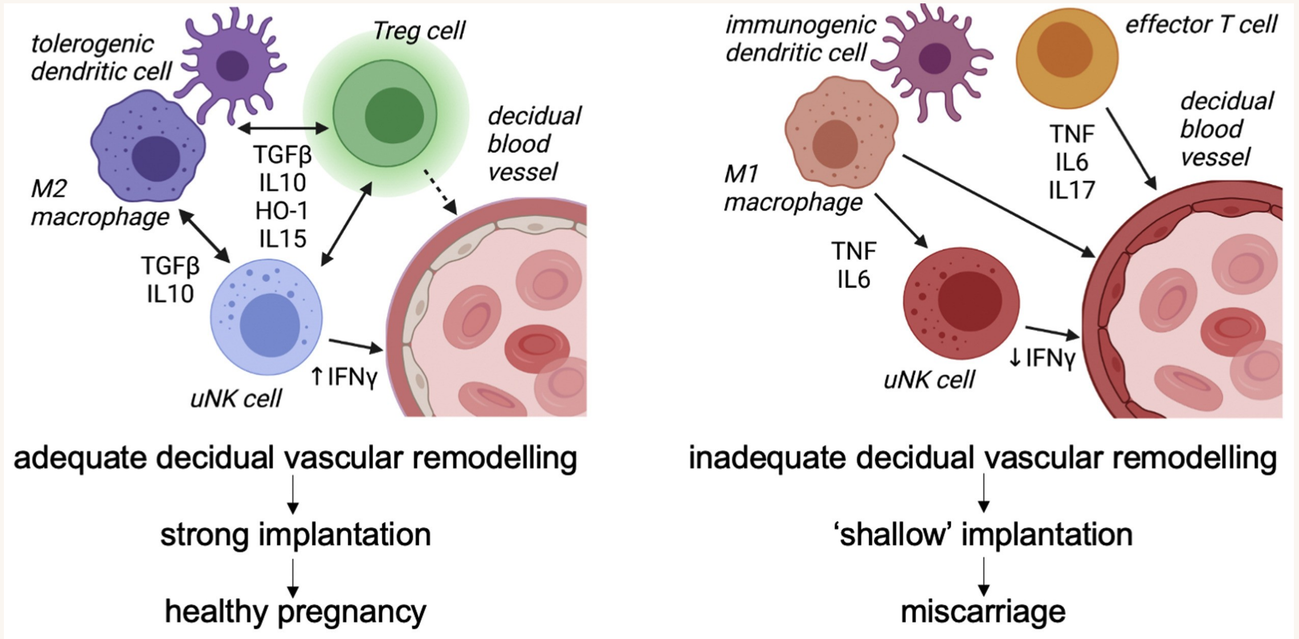
  Vztah k chronické endometritidě

- 5/Shrnutí

Endometrium

- Není statická tkáň: proliferace, diferenciace / decidualizace, rozpad, reparace
- Proliferace → ovulace → sekreční fáze → menstruace
- Rozdílné imunologické zastoupení během cyklu (remodelace tkáně, angiogeneze, decidualizace, odstranění poškozených buněk, reparace, vytvoření vhodného prostředí pro implantaci)
- Implantace embrya – imunologicky specifická situace (Th1 versus Th2)





van der Woude et al., 2022, Front. Oncol. 12:975201
Robertson et al., 2022, Fertil. Steril. 117:1107–1120

Imunitní buňky endometria

Uterinní NK buňky

CD4+ T lymfocyty

CD8+ T lymfocyty

T-regulační lymfocyty

Neutrofily

Makrofágy

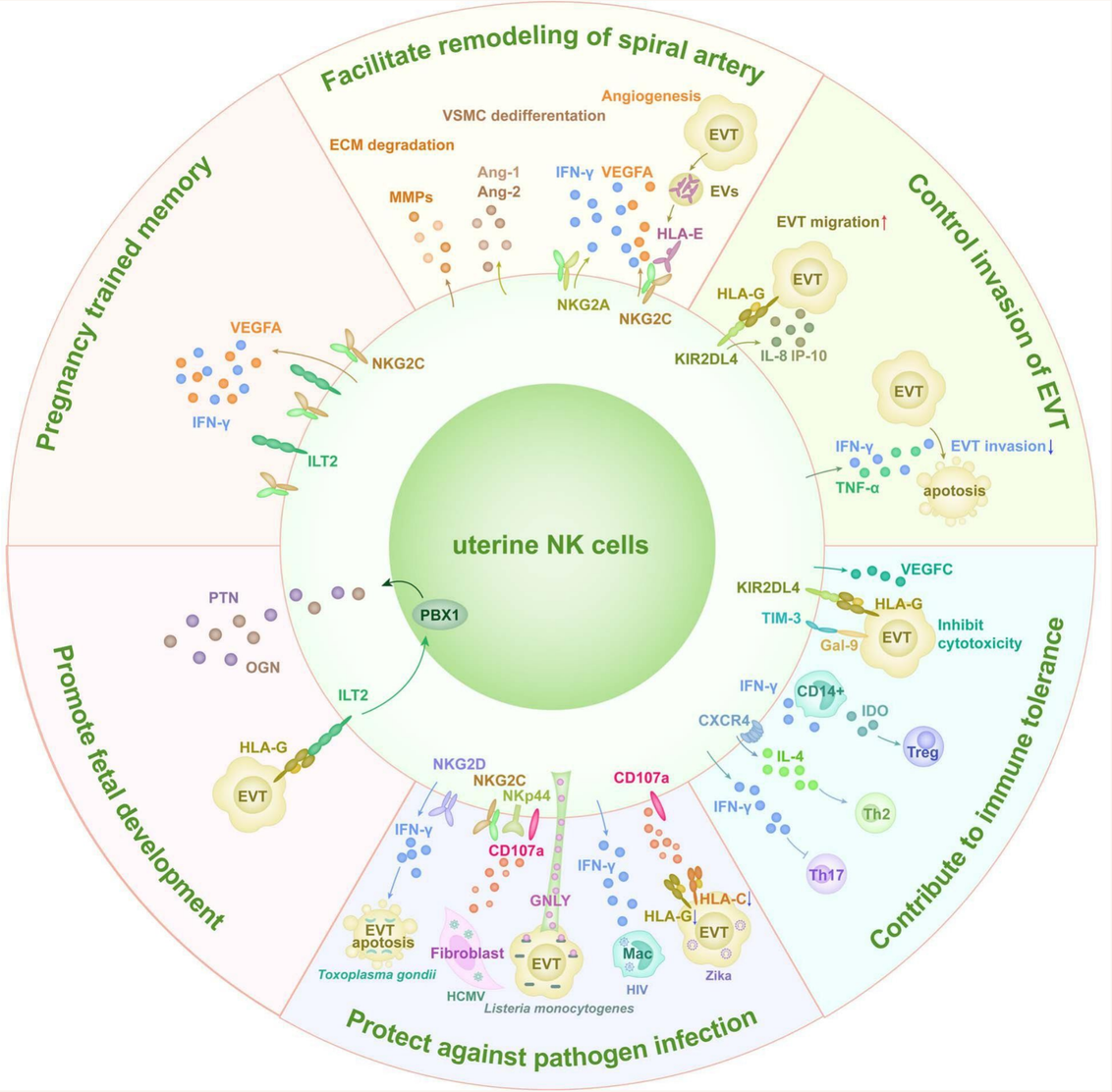
Dendritické buňky

Plazmatické buňky

Uterinní NK buňky (uNK)

Cytotoxicita versus angiogeneze, remodelace, komunikace

- Specializovaná populace NK buněk přítomná v endometriu a decidui
- Výrazně se zvyšují po ovulaci, zejména v sekreční fázi, maximum v rané fázi těhotenství (až 75 %)
- Fenotypicky: CD45⁺CD3⁻CD56^bright CD16⁻
- Nižší cytotoxický a výraznější regulační, proangiogenní a remodelační charakter (v porovnání s pNK)
- Podílejí se na remodelaci spirálních arterií, angiogenezi (VEGF, ANG2) a komunikaci s trofoblastem (HLA-G)
- Jejich funkcí NENÍ primárně zabíjet, ale připravit a regulovat prostředí pro placentaci a implantaci embrya



Xu et al., 2022, Biol. Reprod. 107:327–338

Odběr vzorku:

- Nativní cyklus: v období **implantačního okna** (obvykle 20.–23. den cyklu / 7.–9. den po ovulaci)
- Hormonální stimulace: 6. den užívání progesteronu

Menstrual cycle	Proliferative phase (day 10 - 12)	Middle secretory phase (day 22 - 23)	Late secretory phase ～Menstrual phase (day 26 - 28)
Natural Killer cells	+/−	+/++	+++
Macrophages	+	++	+++
Neutrophils	+/−	+/−	+++
Eosinophils	−	−	++
Mast cells	++	++	++
T cells	+	+	+
B cells	+/−	+/−	+

Kitazawa et al., 2020, J. Med. Invest. 250:49–60.

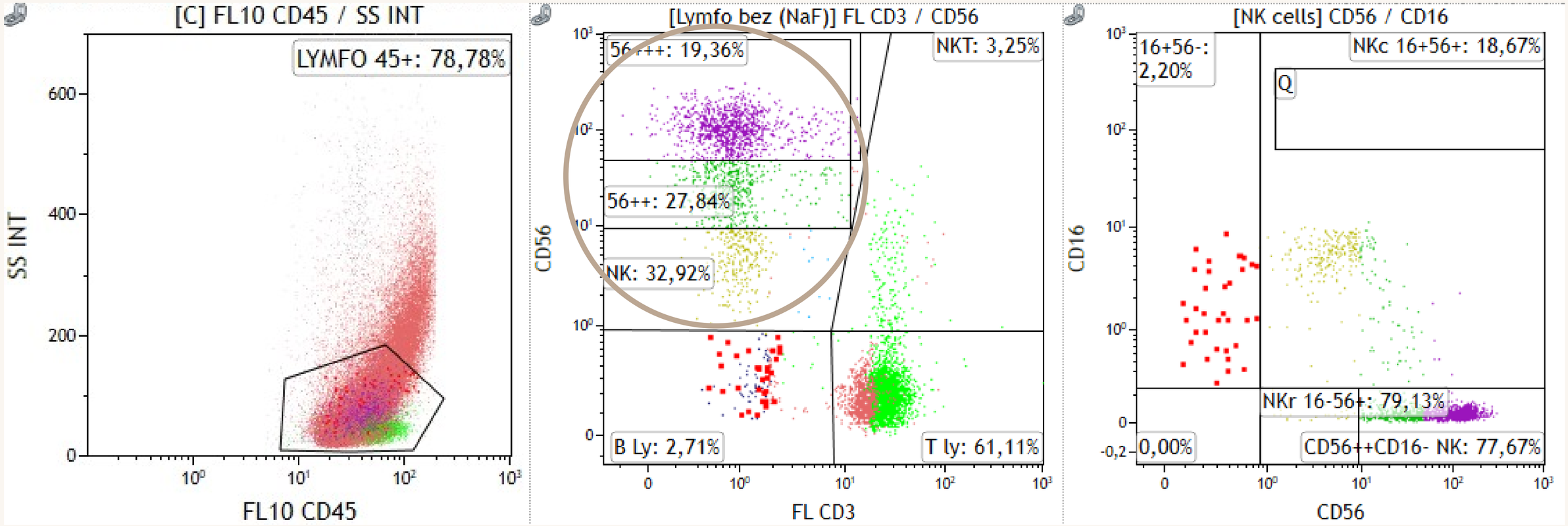
Příprava vzorku:

- *Homogenizace tkáně (15–30 mg)*
- *Promytí v PBS, centrifugace*
- *Barvení: CD45 KO, CD56 PC7, CD16 APC, CD3 PB*
- *Inkubace (20 minut)*
- *Lyzace erytrocytů (Excellyse I)*
- *Centrifugace*
- *Resuspendace v PBS*
- *Analýza na průtokovém cytometru*

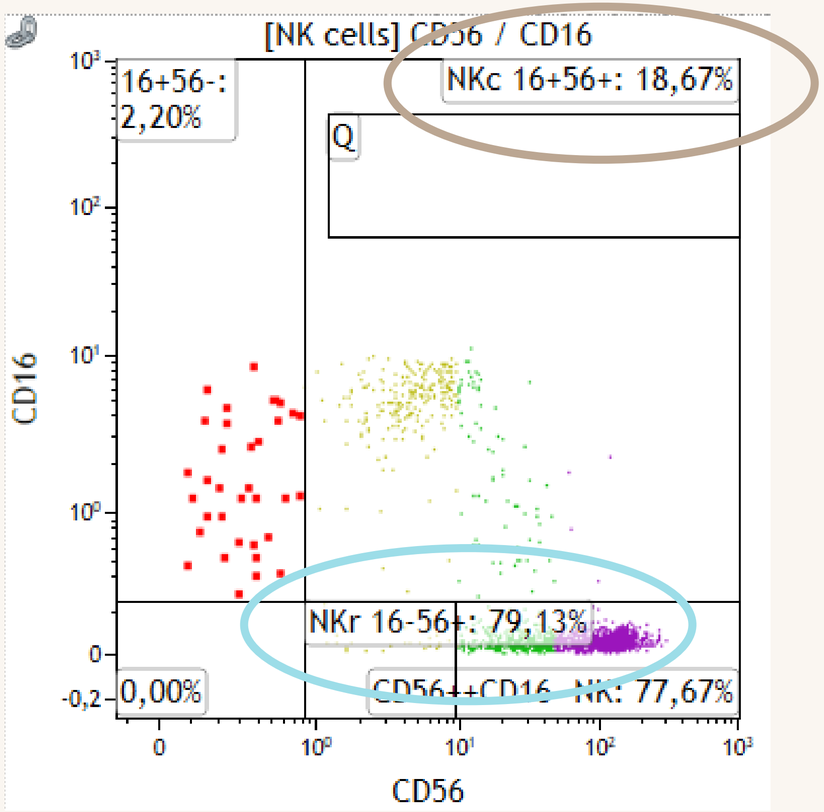
Cytometrické hodnocení uNK

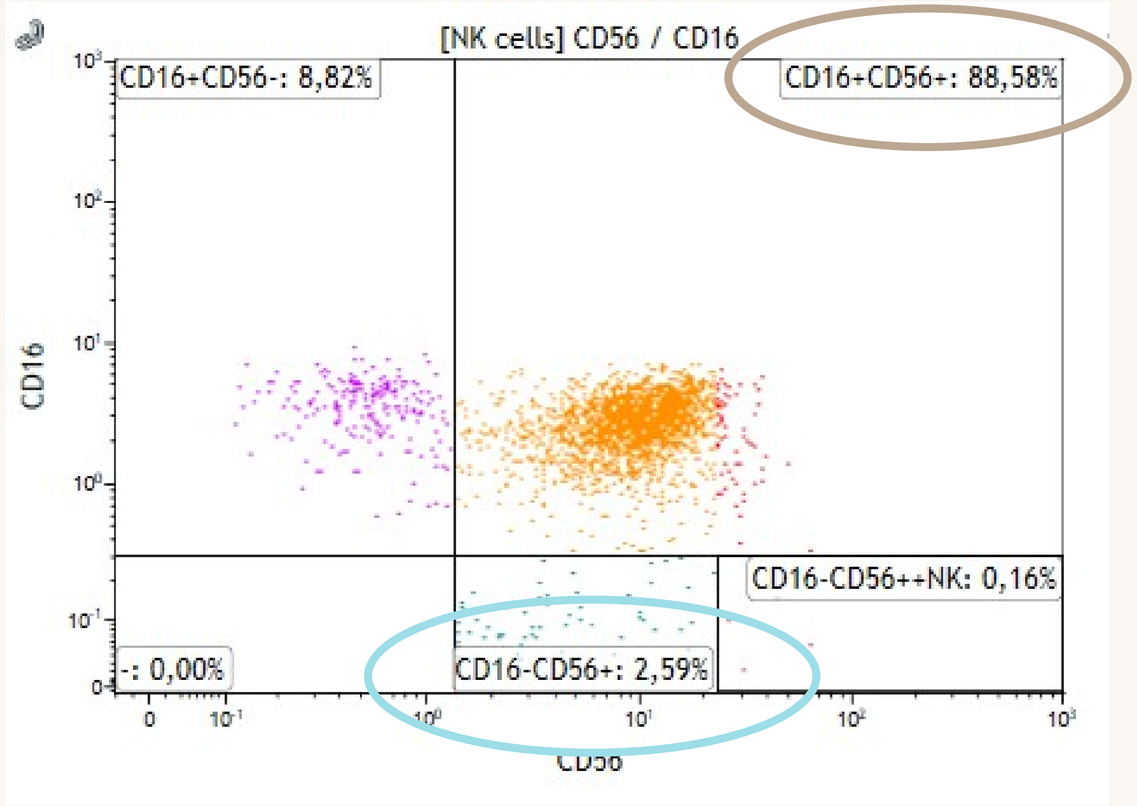
CD45+ lymfocyty

NK lymfocyty



uNK ≠ pNK


[NK cells] CD56 / CD16
16+56-:
2,20%
NKc 16+56+: 18,67%
Q
NKr 16-56+: 79,13%
0,00%
CD56+CD16- NK: 77,67%
CD16
CD56


[NK cells] CD56 / CD16
CD16+CD56-: 8,82%
CD16+CD56+: 88,58%
CD16-CD56++NK: 0,16%
-: 0,00%
CD16-CD56+: 2,59%
CD16
CD56

Imunitní buňky endometria

Uterinní NK buňky

CD4+ T lymfocyty

CD8+ T lymfocyty

T-regulační lymfocyty

Neutrofily

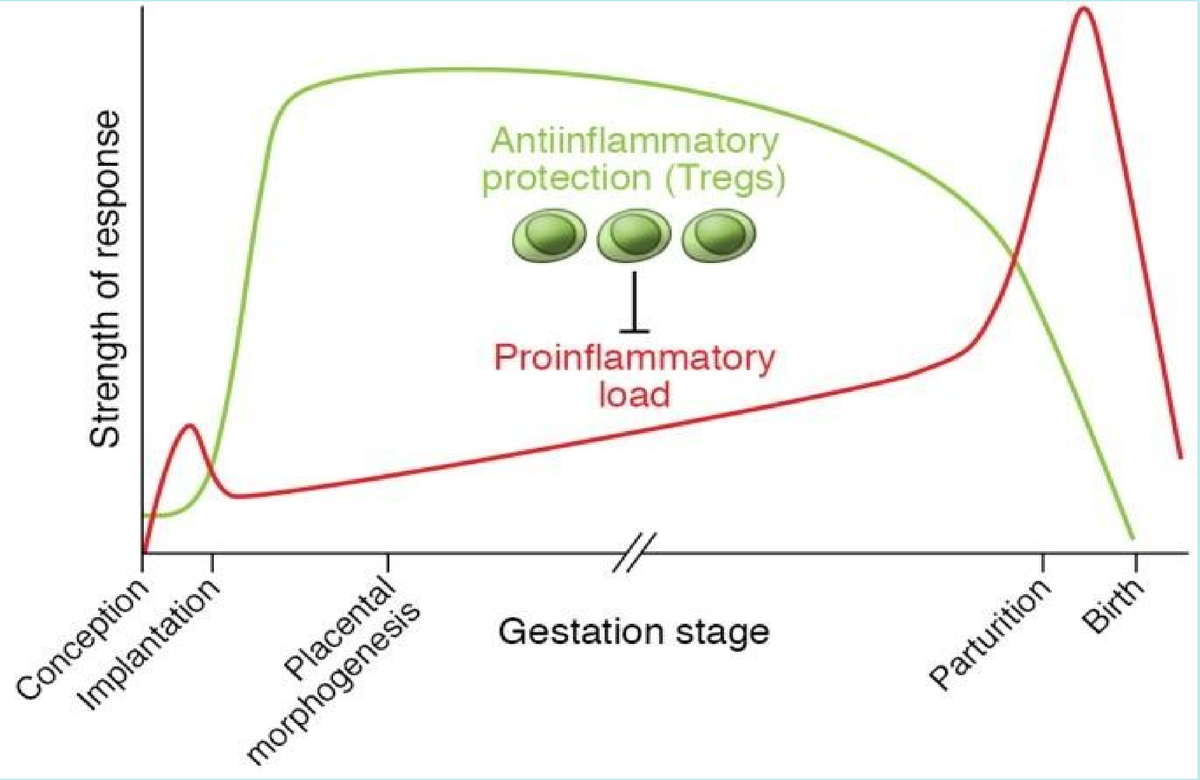
Makrofágy

Dendritické buňky

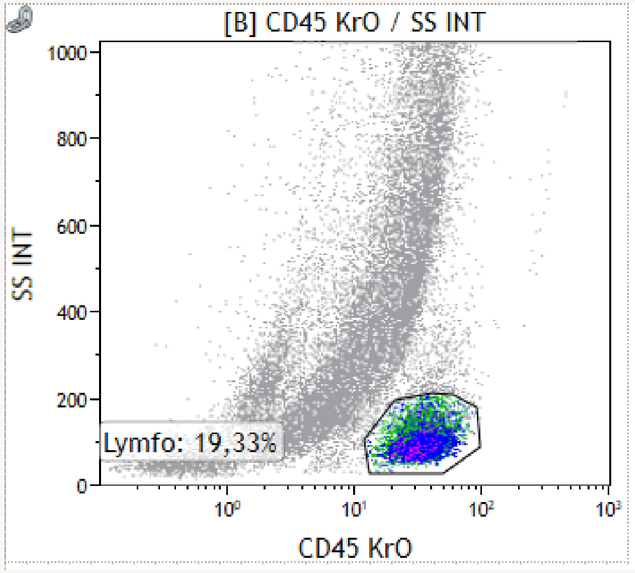
Plazmatické buňky

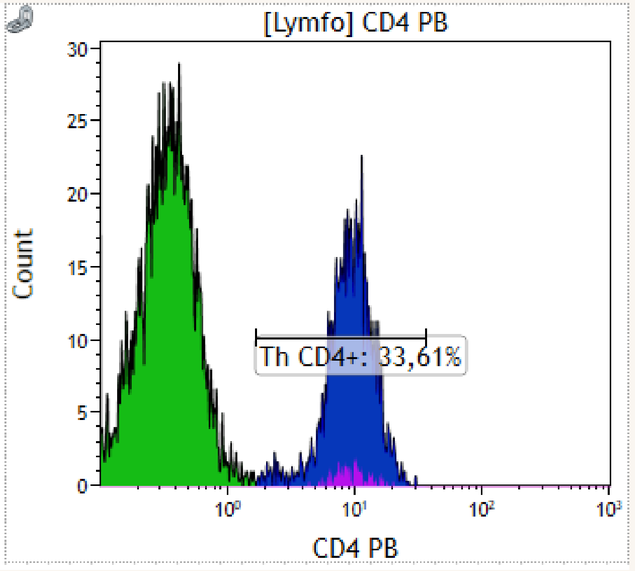
T-regulační lymfocyty

- Implantace embrya / placentace
- Tolerance fetálních / paternálních antigenů
- IL-10, TGF-β
- ↓ Tregs: porucha implantace, předčasný porod, opakované těhotenské ztráty, růstová restrikce plodu



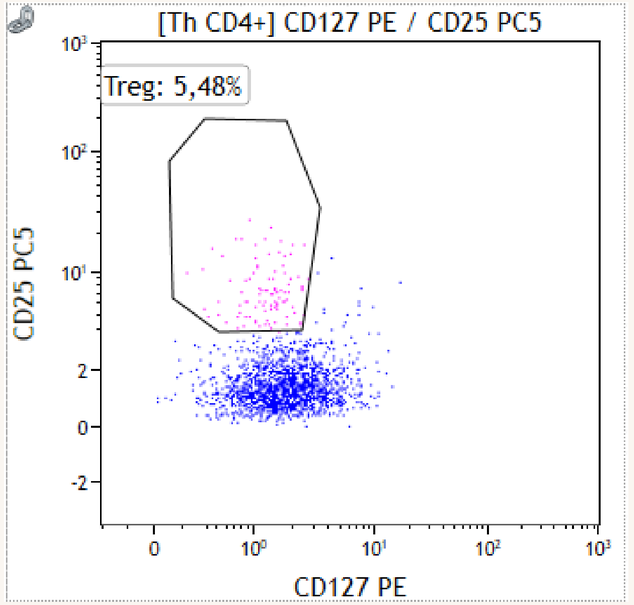
Robertson et al., 2018, J. Clin. Invest. 128:4224–4235.





Příprava vzorku:

- Homogenizace tkáně (15–30 mg)
- Promytí v PBS, centrifugace
- Barvení: CD45 KO, CD4 PB, CD25 PC5, CD127 PE
- Inkubace (20 minut)
- Lyzace erytrocytů (Versallyse I)
- Analýza na průtokovém cytometru



Imunitní buňky endometria

Uterinní NK buňky

CD4+ T lymfocyty

CD8+ T lymfocyty

T-regulační lymfocyty

Neutrofily

Makrofágy

Dendritické buňky

Plazmatické buňky

Plazmatické buňky

- Terminálně diferencovaný B lymfocyt (produkce protilátek)
- Za fyziologických podmínek NENÍ dominantní populací endometria

antigenní stimul
↓
B-lymfocyty → plazmatické buňky
↓
$CD138^+$ buňky ve stromatu
↓
změna endometriálního prostředí
↓
možné poruchy reprodukce

Chronická endometritida (CE)

- Perzistující zánět endometria
- Infiltrace plazmatickými buňkami (CD138+)
- Infertilita, porucha receptivity endometria, opakovaná implantační selhání, opakované těhotenské ztráty
- Metaanalýza (2022), 4145 pacientek s CE, horší klinická gravidita a ongoing pregnancy/live birth ve srovnání se ženami bez CE (po úspěšné léčbě se výsledky přibližovaly skupině bez CE)

Chronic Endometritis in Infertile Women: Impact of Untreated Disease, Plasma Cell Count and Antibiotic Therapy on IVF Outcome—A Systematic Review and Meta-Analysis

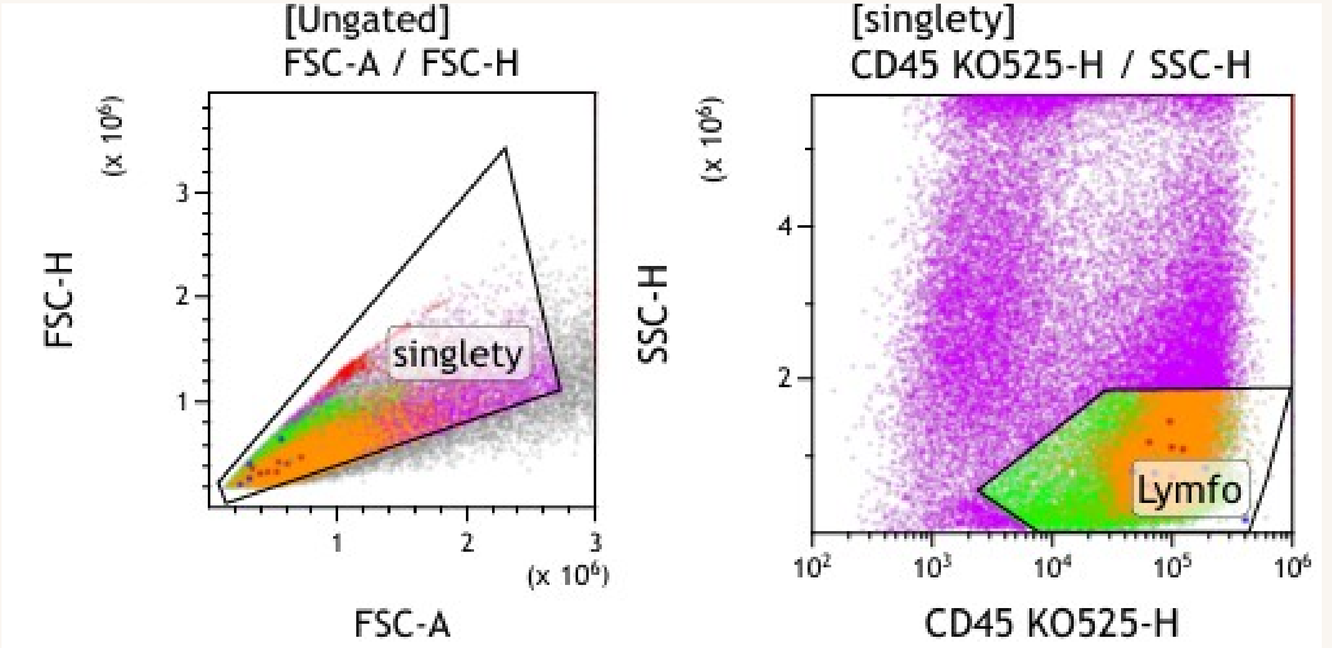
by Amerigo Vitagliano [1], Antonio Simone Laganà [2,*], Dominique De Ziegler [3], Rossana Cicinelli [1], Carla Mariaflavia Santarsiero [1], Giovanni Buzzaccarini [4], Vito Chiantera [2], Ettore Cicinelli [1] and Marco Marinaccio [1]

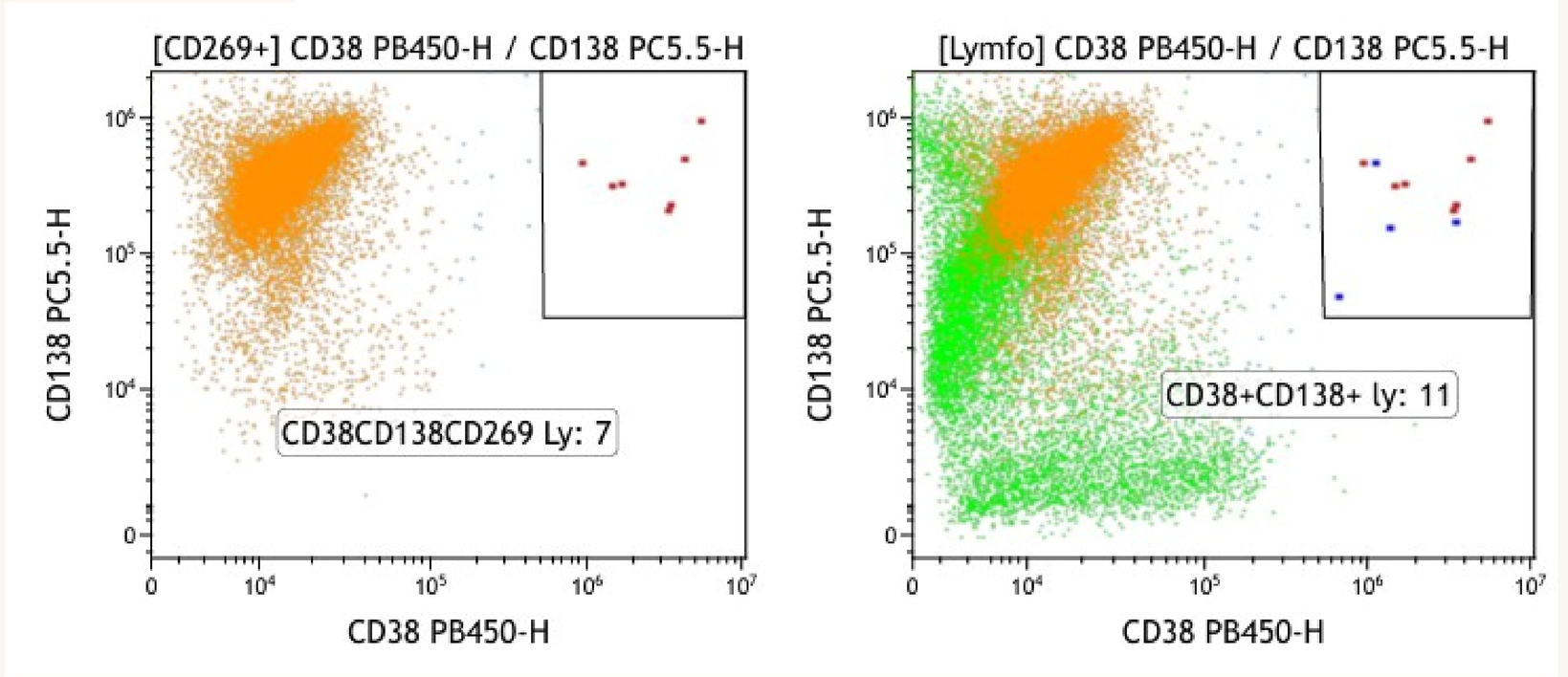
Příprava vzorku:

- Homogenizace tkáně (15–30 mg)
- Promytí v PBS, centrifugace
- Barvení: CD45 KO, CD38 PB, CD138 PC5.5, CD269 APC
- Inkubace (20 minut)
- Lyzace erytrocytů (Excellyse I)
- Centrifugace
- Resuspendace v PBS
- Analýza na průtokovém cytometru

Ve fázi výzkumu

- Marker: CD138+
- Histologie / imunohistochemie (cut off >5 buněk / zorné pole)





Shrnutí

- Endometrium – dynamický imunologický orgán (rozdílné zastoupení imunitních buněk v průběhu cyklu)

1/Uterinní NK buňky

Fyziologický stav:

Angiogeneze, remodelace spirálních arterií, komunikace s trofoblastem

Patologický stav:

Převažuje cytotoxický fenotyp, prozánětlivá odpověď

2/T-regulační buňky

Fyziologický stav:

Regulace mateřské imunitní odpovědi, kontrola zánětu, podpora tolerogenního prostředí, podpora implantace, placentace

Patologický stav:

Nízké zastoupení – narušení tolerance, posun k prozánětlivé odpovědi

3/Plazmatické buňky

Fyziologický stav:

Nízké zastoupení

Patologický stav:

Chronická endometritida

- Infertilita, porucha receptivity endometria, opakovaná implantační selhání, opakované těhotenské ztráty, předčasný porod, růstová restrikce plodu

Děkuji za pozornost

- Imunologická laboratoř Gennet s. r. o.
- tereza.kovarova@gennet.cz
- +420 242 456 845