

A T- és B-limfocita alpopulációk eloszlásának vizsgálata endometriózisos betegekben

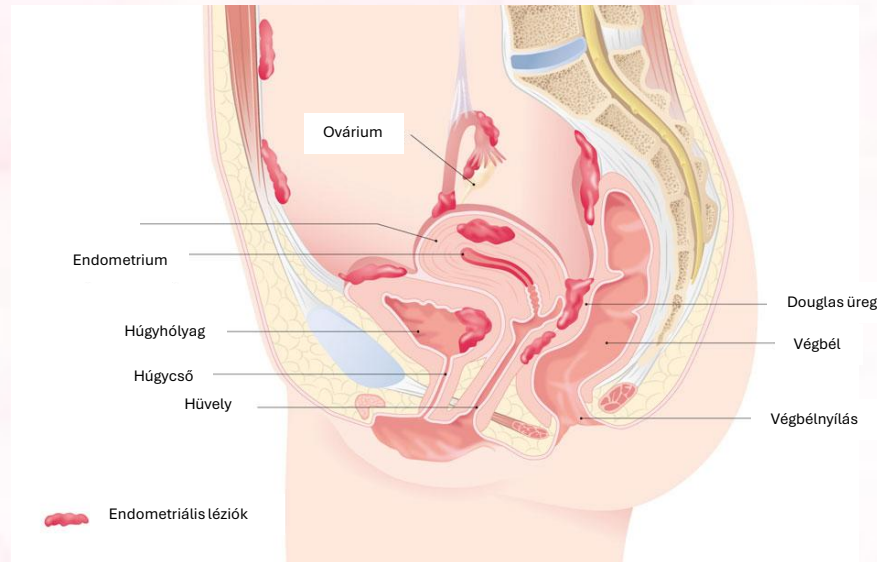
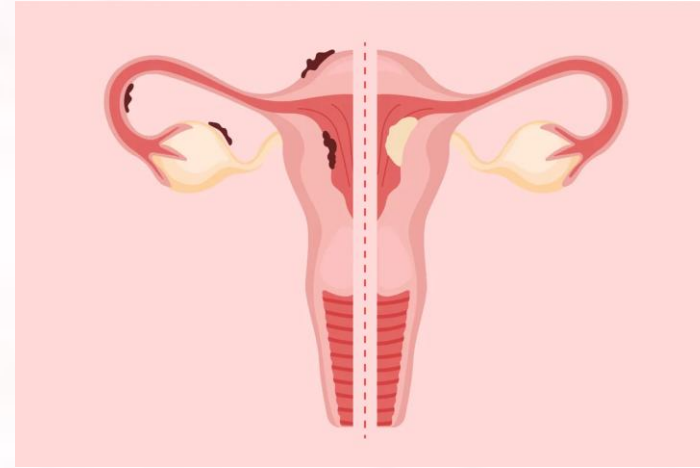
DE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet, Klinikai Immunológiai Tanszék
Debreceni Egyetem



Balogh Gabriella
VI. éves hallgató, ÁOK
Témavezető: Dr. Lampé Rudolf, Dr. Papp Gábor

Endometriózis

- Ösztrogén függő, benignus, krónikus gyulladásos kórkép
- Ektópiás endometriális szövet
- Reproductív korú nők (kb. 10%),
infertilitás (kb. 30%)



Jellegzetes tünetei:



A betegség patofiziológiája

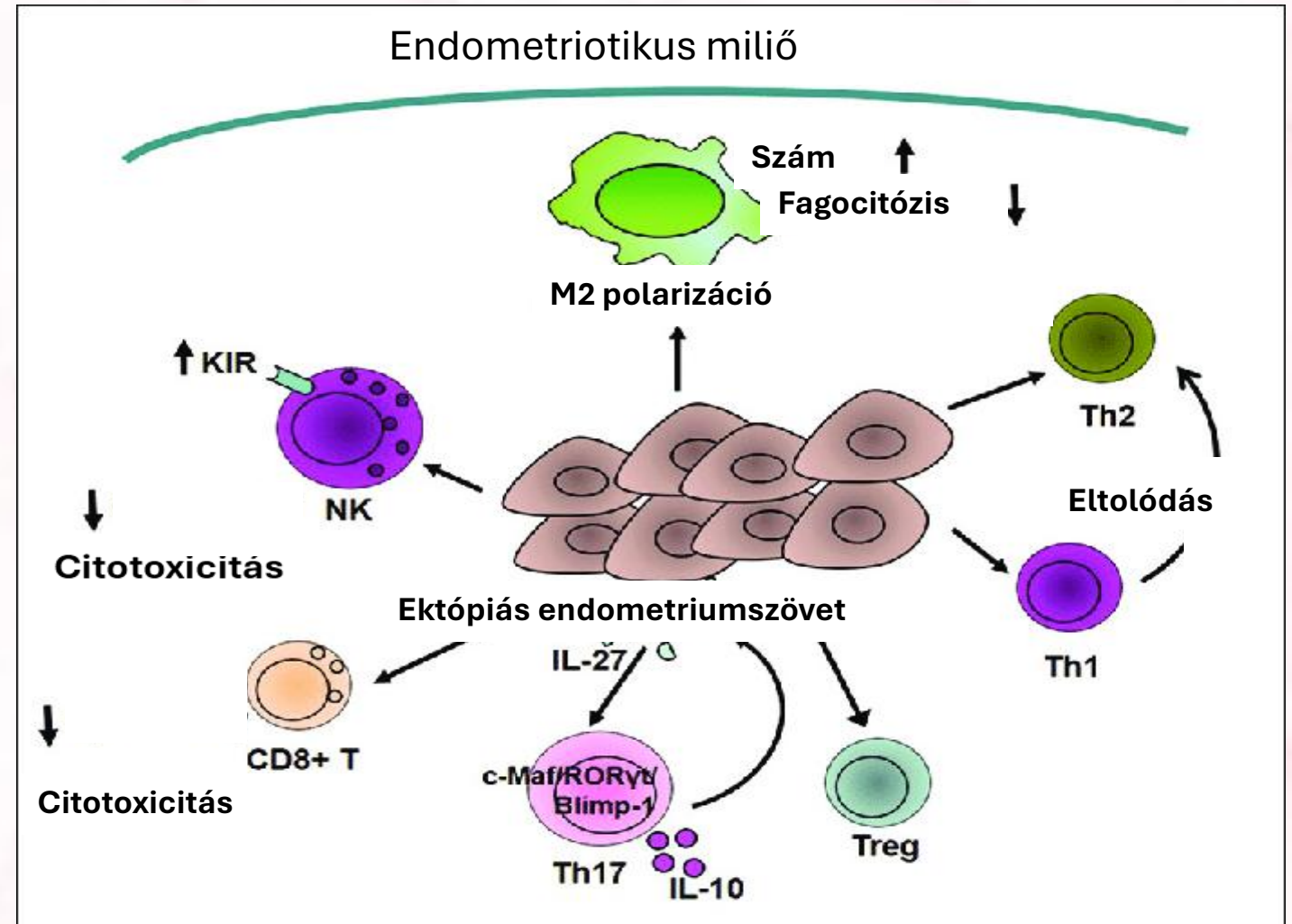
- Multifaktoriális eredetű betegség
- Számos teória
- Kulcsfontosságú: az ektópiás szövetek elleni szervezet által létrehozott gyulladásos és immunológiai válaszok



Az immunrendszer szerepe az endometriózis kialakulásában és terjedésében

Ami eddig ismert:

- Makrofágok, NK sejtek, citotoxikus T limfociták csökkent aktivitása

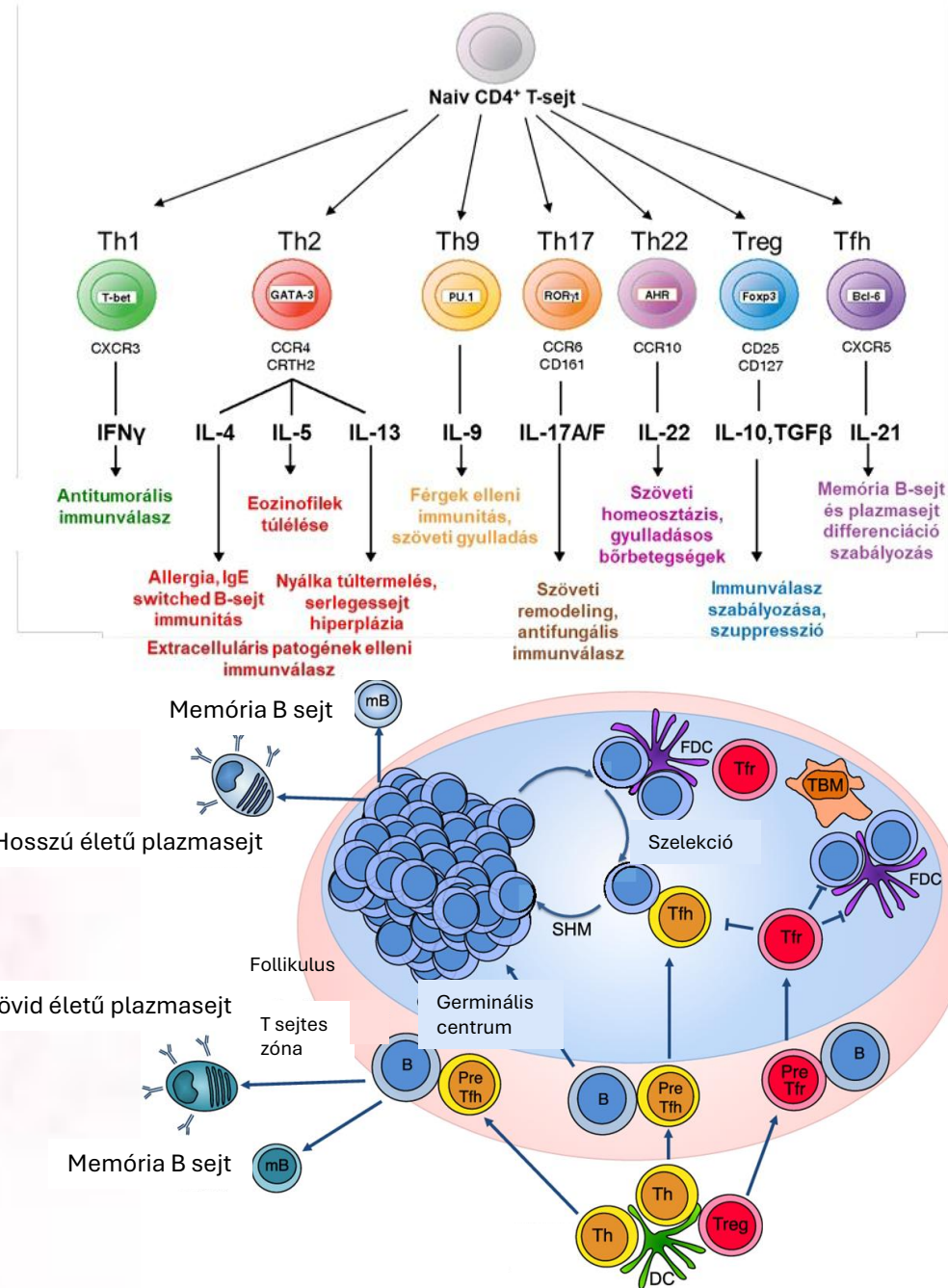


CD4+ és B sejtek szerepe az autoimmunitásban

- CD4+ T helper sejt(Th) szubtypusok: Th1, Th2, Th17, Tfr (regulatorikus T-limfocita), Tfh (follikuláris helper T-limfocita)
- A Tfr sejtek feladata: immunfolyamatok regulálása, immunológiai tolerancia kialakítása, szupresszió segítségével
- A Tfh sejtek feladata: B sejtek érését, aktiválódását, antigén specifikus antitest termelését segítik

Forrás: Felső ábra: Pap Ramóna 2022 A glukokortikoid hormon szerepe a regulatorikus T-sejtek differenciálódásában című PhD értekezéséből (az eredeti ábra forrása: Wambre et al. Curr Opin Immunol. (6):700-6; 2012.)

Alsó ábra : Linterman MA. and Hill DL. F1000 Faculty Rev. 5(88); 2016.



A kísérlet célkitűzései

- Meghatározni immunfenotipizálással a CD4+ szubtypusok jelentőségét: follikuláris helper T-limfocita (Tfh) és follikuláris regulatórikus T-limfociták (Tfr), valamint a különböző érett és naiv B-limfocita populációk átfogó vizsgálatát végezni endometriózisban





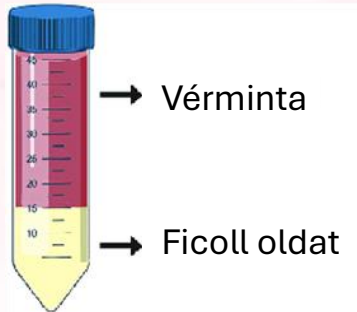
Vizsgált populáció

	Endometriózis (n=18)	Kontroll (n=16)	P-érték
Életkor (év)	29,1 ($\pm 5,2$)	27,5 ($\pm 3,7$)	n.s.
BMI	21,4 ($\pm 2,5$)	20,1 ($\pm 1,7$)	n.s.
Paritás	0-1	0-1	n.s.
Graviditás	0-2	0-2	n.s.

- Kizáró kritériumok: belgyógyászati kórképek, autoimmun megbetegedések, dohányzás, 3 hónapon belüli oltás, hormonterápia
- Szükséges kritériumok endometriózisban szenvedő nők részéről: szövettanilag igazolt endometriózis

A laboratóriumi munka folyamatai

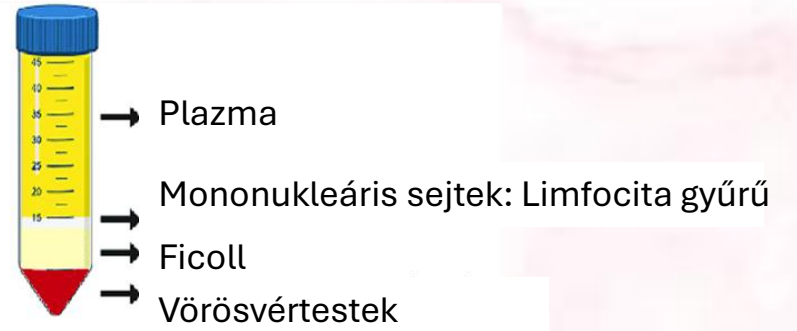
Mononukleáris sejtek szeparálása gradiens centrifugálással Ficoll oldat segítségével



Antikoagulált vér (fiz. sóoldattal hígítva 1:1) rétegzés Ficoll oldat tetejére (keveredésmentesen), centrifugálás



1500 ford., 25°C, 25 perc, lassítás fokozatosan fék nélkül



Limfocita gyűrű begyűjtése, mosás 2x, centrifugálás (1. 1500 ford., 18°C, 10 perc
2. 1000 ford., 18°C, 10 perc)

A limfociták specifikus jelölése és áramlási citometriás mérése

500 μ l BSA PBS, sejtszámolás, limfocita
alcsoporthoz elkülönítése fluoreszcens
monoklonális antitestekkel



Inkubáció 4°C-on hűtőben, 20
percig

Mosás 2x azidos-BSA-PBS,
centrifugálás (1800 ford., 25°C,
4 perc) (PBS- foszfát puffer, pH
kontroll)

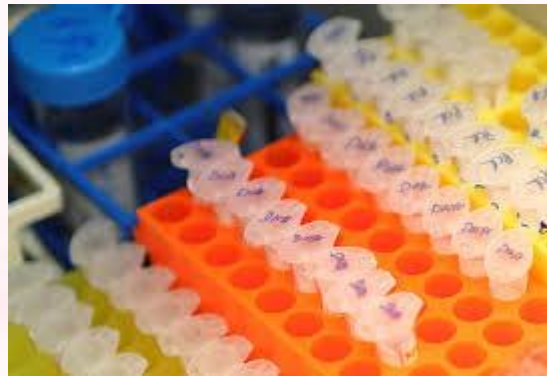
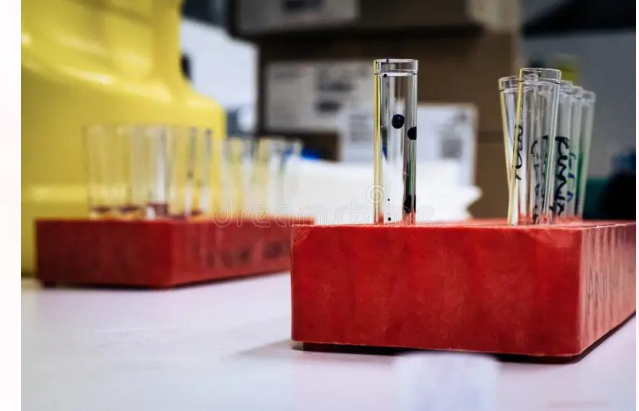
Fixálás 1%-os Paraffin olajjal

Alufóliával fedés, 4°C, hűtő



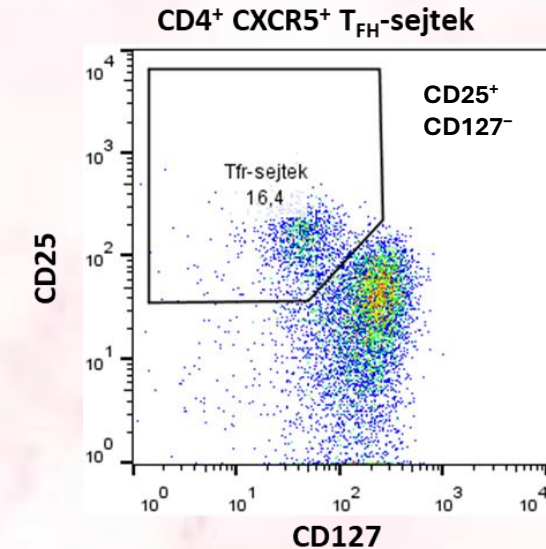
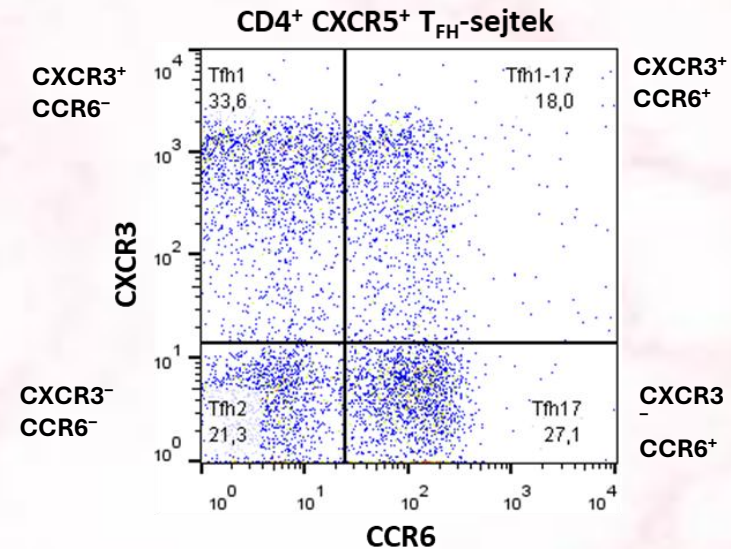
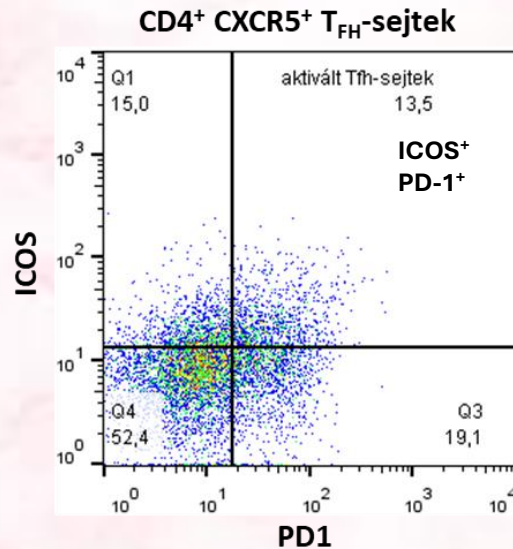
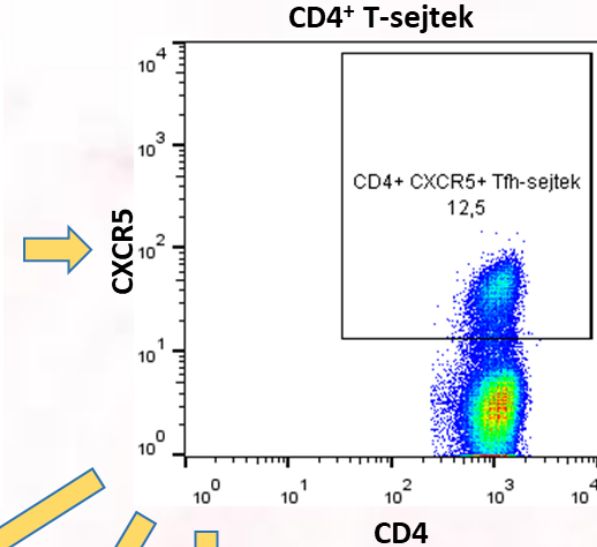
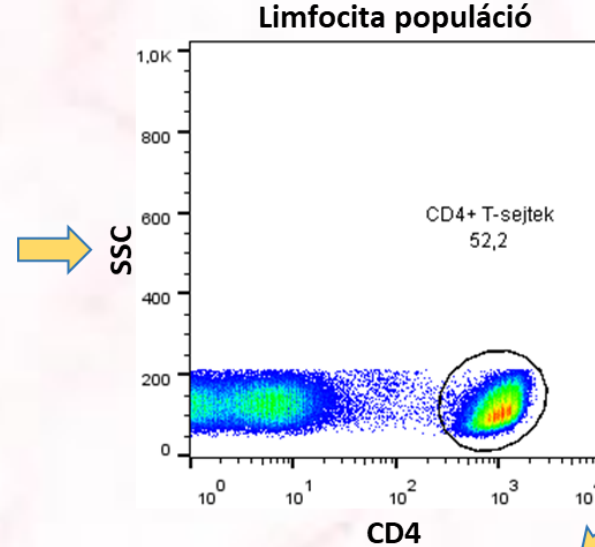
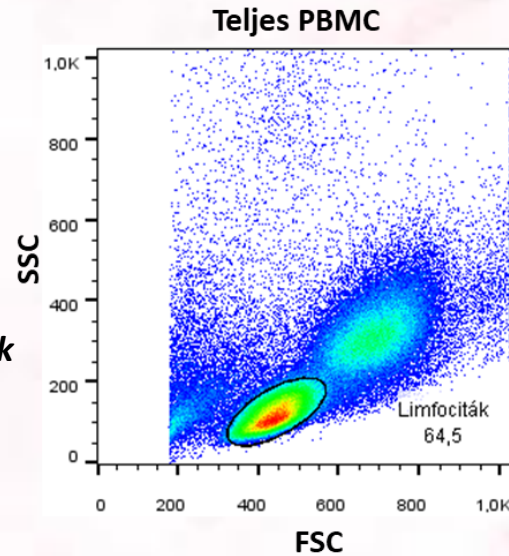
Áramlási citometriás mérés FACSCalibur,
kiértékelés FlowJo v10.0.7 software

*Pozitív és negatív populációk elkülönítése
FMO - fluorescence minus one - kontrolllok
alapján

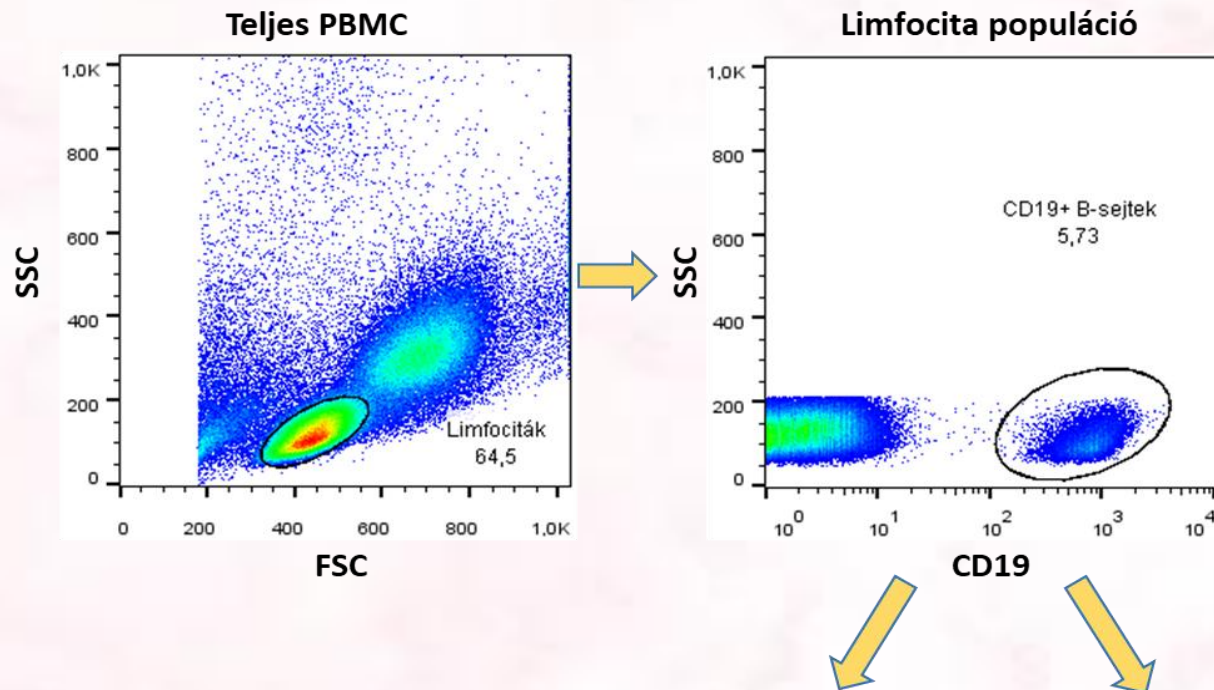


Adatanalízis: a T-sejt alpopulációk elemzése

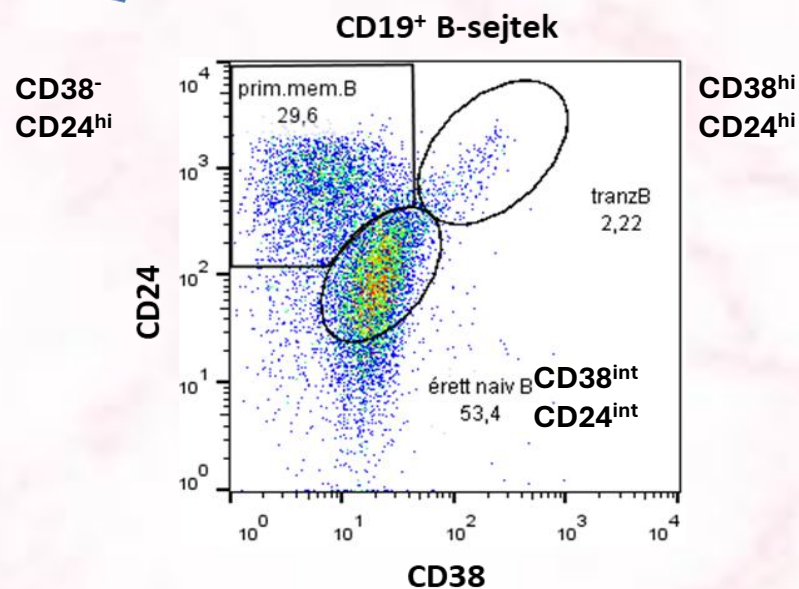
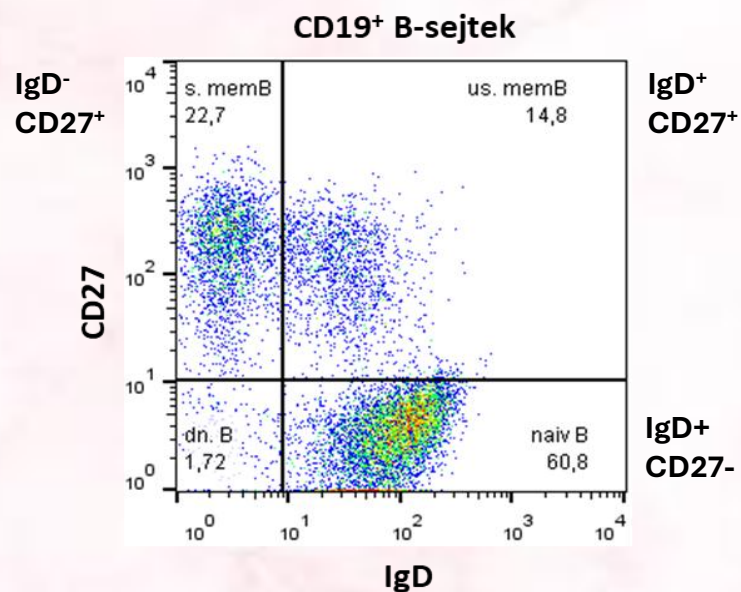
$CD4^+ CXCR5^+ ICOS^+ PD-1^+$ = *aktivált T_{FH} -sejtek*
 $CD4^+ CXCR5^+ CXCR3^+ CCR6^-$ = *T_{FH1} -sejtek*
 $CD4^+ CXCR5^+ CXCR3^+ CCR6^+$ = *$T_{FH1/17}$ -sejtek*
 $CD4^+ CXCR5^+ CXCR3^- CCR6^+$ = *T_{FH17} -sejtek*
 $CD4^+ CXCR5^+ CXCR3^- CCR6^-$ = *T_{FH2} -sejtek*
 $CD4^+ CXCR5^+ CD127^- CD25^+$ = *T_{FR} -sejtek*



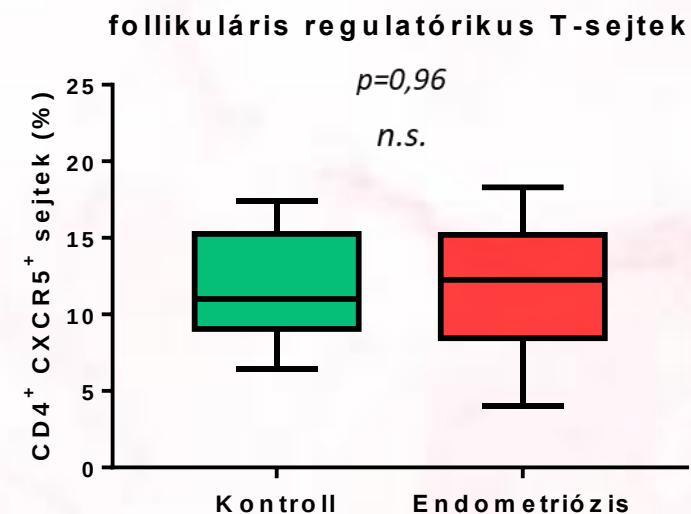
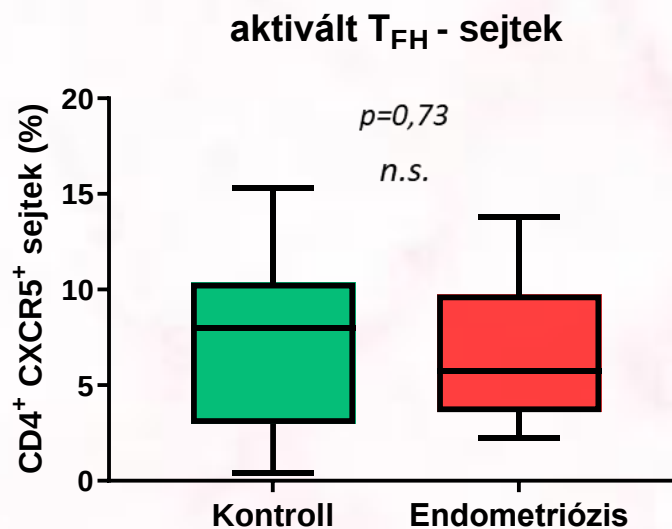
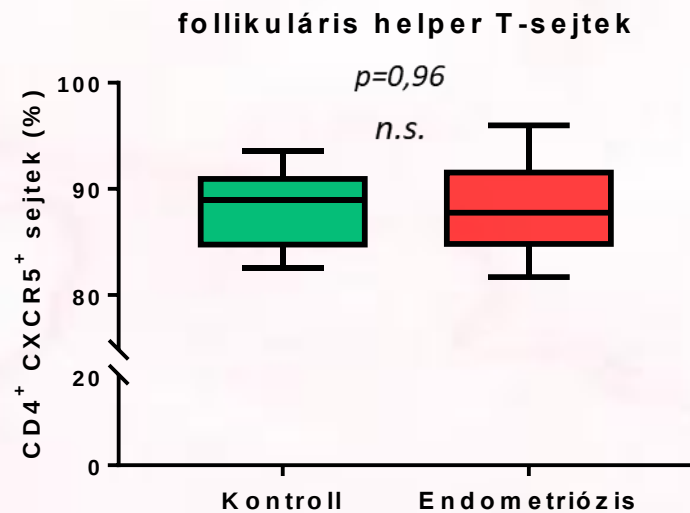
Adatanalízis: a B-sejt alpopulációk elemzése



CD19 ⁺	IgD ⁺	CD27 ⁻	= <i>naív B-sejtek</i>
CD19 ⁺	IgD ⁺	CD27 ⁺	= <i>un-switched memória B-sejtek</i>
CD19 ⁺	IgD ⁻	CD27 ⁺	= <i>switched memória B-sejtek</i>
CD19 ⁺	CD38 ^{hi}	CD24 ^{hi}	= <i>tranzícionális B-sejtek</i>
CD19 ⁺	CD38 ^{int}	CD24 ^{int}	= <i>érett-naív B-sejtek</i>
CD19 ⁺	CD38 ⁻	CD24 ^{hi}	= <i>primer memória B-sejtek</i>

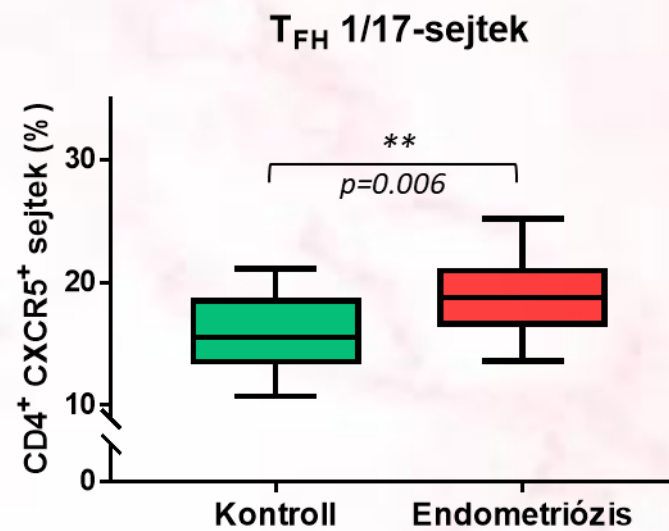
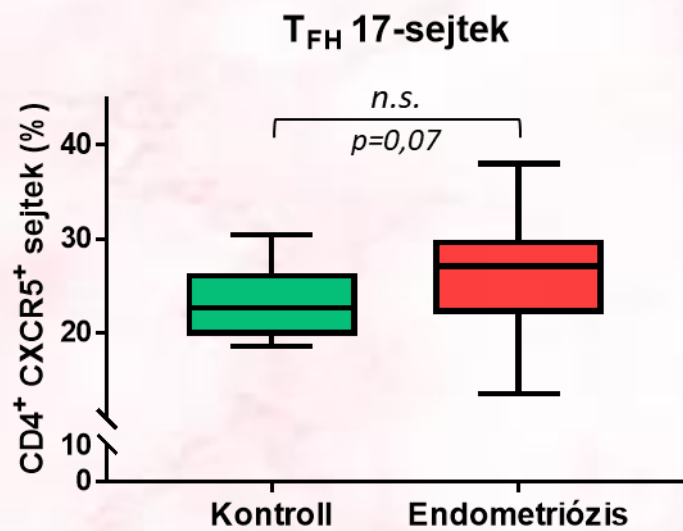
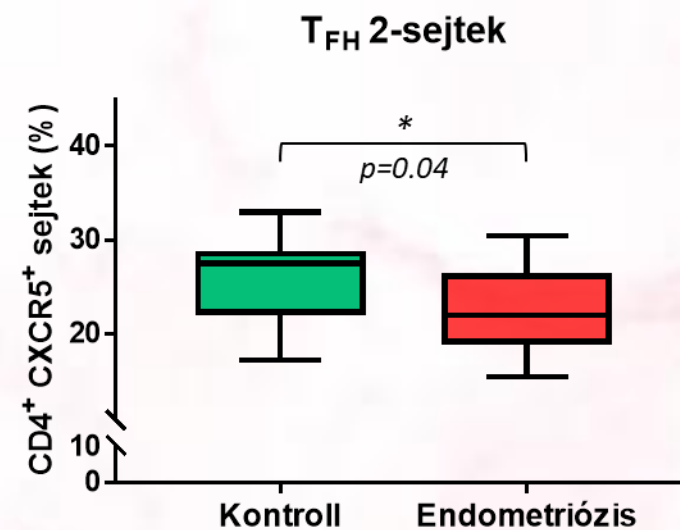
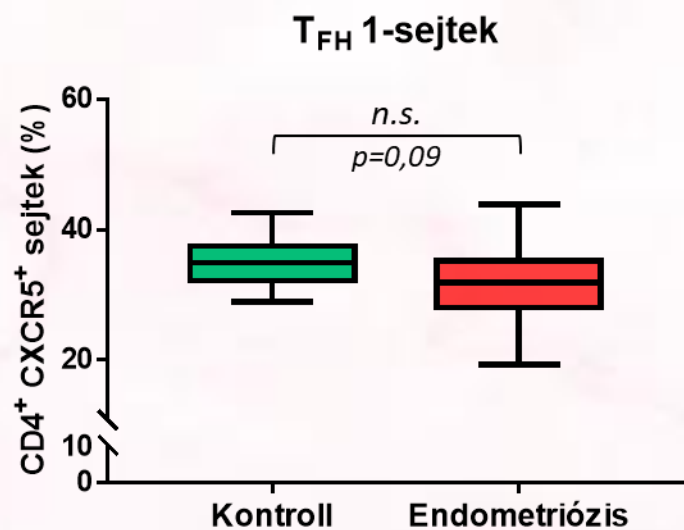


Eredmények 1



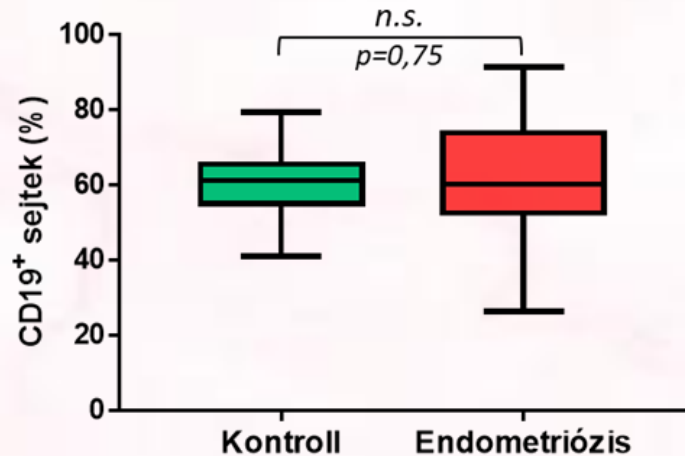
- Normál eloszlás: Shapiro–Wilk teszt
- Kétmintás párosítatlan kétoldali Student-féle T-próba, (statisztikailag szignifikáns az eltérés ha: $p < 0,05$ * ; $p < 0,01$ **)
- Box-whiskers diagram: 25. és 75. percentilis, medián, minimum, maximum

Eredmények 2

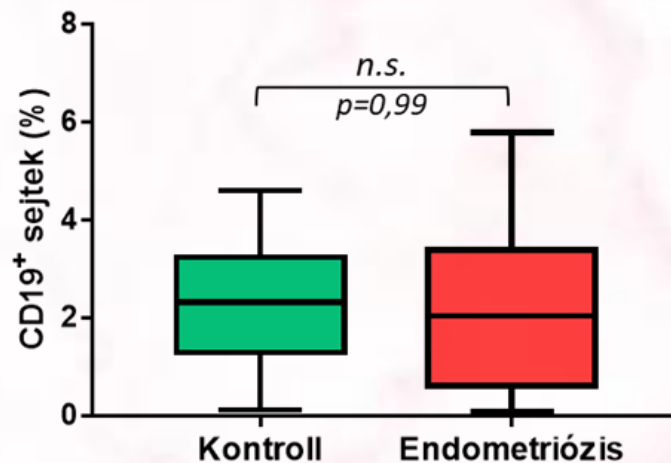


Eredmények 3

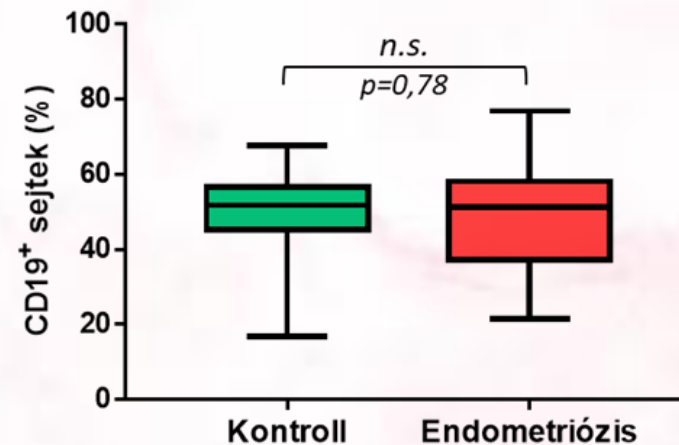
naív B-sejtek



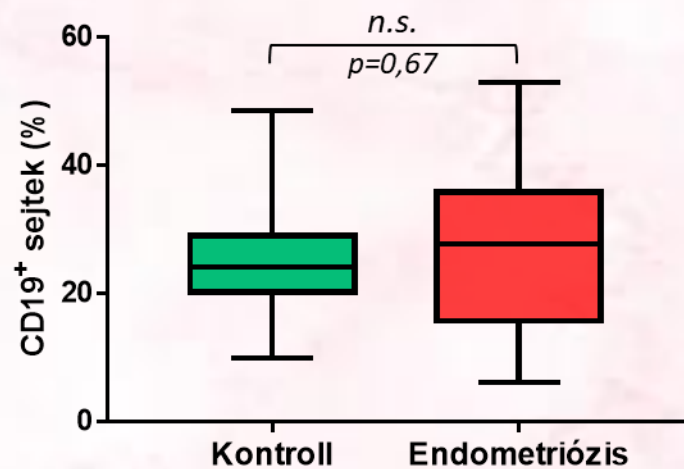
tranzícionális B-sejtek



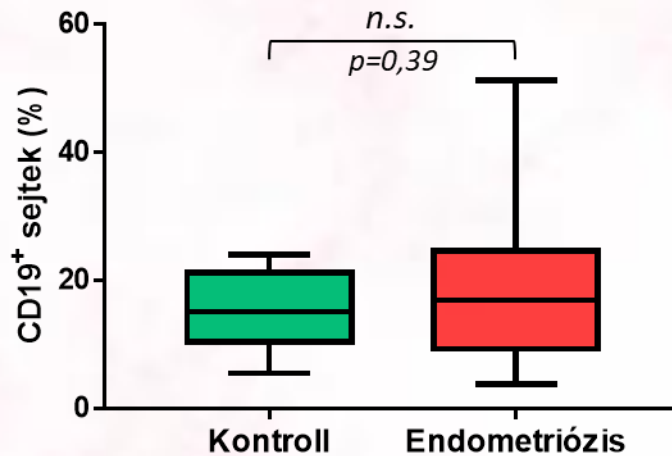
érett-naív B-sejtek



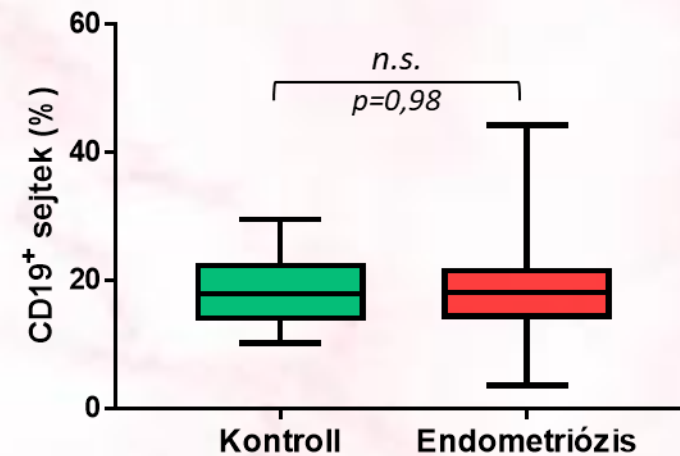
primer memória B-sejtek



un-switched memória B-sejtek



switched memória B-sejtek





Eredmények kiértékelése



- Szignifikánsan csökkent a Tfh 2 sejtek, szignifikánsan nőtt a Tfh 1/17 sejtek aránya
- A Tfh 2 sejtek csökkenése, az ektópiás endometriális szövet lokális környezetébe gyülekezés, alternatív makrofág polarizáció, csökkent fagocita képesség, endometriális szövet proliferációja, angiogenezis
- A Tfh 1/17-sejtek növekedése, gyulladásos folyamat kiterjedése
- A B-sejt alcsoportok esetén nincs szignifikáns eltérés, így a betegekben a humorális immunválasz mérsékeltebb szerepű lehet
- A Tfh sejtek fontos szerepe, az endometriális szövet körül tapasztalható szöveti remodelling folyamatában, a gyulladásos folyamat kiterjesztésében, további vizsgálatuk és célzott terápiás eljárás alá vonásuk új, akár kuratív megoldás lehet

Köszönöm a figyelmet!



Köszönetnyilvánítás

- Dr. Lampé Rudolf
 - Dr. Lukács Luca
 - Dr. Krasznai Zoárd
 - Dr. Papp Gábor
 - Dr. Diós Ádám
-
- DE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet
 - Klinikai Immunológiai Tanszék, Laboratóriumi személyzet

Saját munkám a kutatásban

- Szakrendelésen való részvétel, mintavétel és minták szállítása- DE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet
- Laboratóriumi kutatásban való részvétel (szeparálás, centrifugálás, sejtszámolás, festés, minták előkészítése a méréshez)- Klinikai Immunológiai Tanszék
- Eredmények dokumentálása
- Adatok feldolgozásában és kiértékelésében való részvétel (segítséggel)



Etikai engedély száma: 5948-2022