



NK cells pohledem reprodukčního gynekologa

PAVEL OTEVŘEL

REPROFIT INTERNATIONAL S.R.O.

REPR  FIT
international

Future**Life**

Aktuální situace : Update in Infertility Treatment : UIT 2020, Sevilla

HFEA 2019 traffic light ratings for common add-ons

Traffic light rating	Procedure
RED No evidence of effectiveness and safety	<ul style="list-style-type: none">• Assisted hatching• Intrauterine culture• Reproductive immunology tests and treatment• IMSI (Intracytoplasmic Morphologic Sperm Injection)• PICSI (Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection)• PGT-A day 3
AMBER Conflicting evidence	<ul style="list-style-type: none">• Artificial egg activation by calcium ionophore• Elective freezing in all cycles• Embryo glue• Endometrial scratching• Time-lapse imaging• PGT-A day 5
GREEN Evidence	<ul style="list-style-type: none">• -

69% kliniků nabízí testy imunity (Kwak-Kim 2013)



20 let výzkumu
c. 3000 původních prací
(NK cells + reproduction)

Mé pracoviště nabízí testování reprodukční imunologie:

- A. každému neplodnému páru
- B. jen pacientům s opakovaným selháním léčby či opakovanými těhotenskými ztrátami
- C. jen, když si pacient sám vyžádá
- D. nikdy nenabízí tyto testy

NK cells pohledem klinika

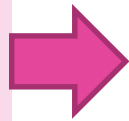
Obsah přednášky

- ❖ Situace v denní praxi
- ❖ Co obecně víme o úloze NK cells v procesu implantace
- ❖ Co očekává klinika od imunologa
- ❖ Současné možnosti na „trhu s diagnostikou a léčbou“
- ❖ Pilotní studie proveditelnosti uterinní laváže a biopsie endometria, naše zkušenosti
- ❖ Návrh další spolupráce a pokračování studie v rámci klinik IVF

Recurrent pregnancy loss Repeated implantation failure Unexplained infertility (8-28%)*

Frustrovaný pacient

- Testy imunity
- Léčbu imunity
- Vyšetření trombofilií
- ERA
- PGT-A
- Sperm DNA fragmentace
- Time lapse
- etc....



Evidence based medicine

- Nejasná inclusion kritéria
- Heterogenita pacientů ve studiích (RIF? Prim? Sec?)
- Nejasné metody testování
- Nejasné názvosloví NK cells
- Směšování pbNK a uNK
- Varování před NÚ léků
- Obavy z off-label podání léků

*Gelbaya TA, : Definition and epidemiology of unexplained infertility. Obstet Gynecol Surv 2014;69:109

Infertile women had significantly decreased numbers of CD56⁺ cells compared to fertile controls
 The abortion group had significantly decreased percentage of the CD56^{bright}CD16⁻ NK cell subset and an increased percentage of the CD56^{dim}CD16⁺ NK cell subset compared to those who delivered
 The percentage of CD56^{dim}CD16⁺ was significantly higher in

Table 1
Studies investigating expression of uNK

Study	N
Klentzeris et al. [9]	24 infertile
Fukui et al. [2]	
Matteoli et al. [2]	
Giuliani et al. [2]	
Kofod et al. [49]	20 control women



Figure 2 Forest plot graphs of clinical pregnancy rates with prednisolone administration.

differences were found in the expression of CD56
 Infertile women had significantly decreased numbers of CD56⁺ cells compared to fertile controls
 Increased number and percentage of CD56⁺ uNK cells served as predictors for achieving pregnancy. Trend towards decreased numbers of CD16⁺ cells in women who became pregnant compared to those, who did not

^a The group who implanted also in

Results
 Infertile women had significantly decreased numbers of

CD56⁺ cells compared to fertile controls
 Increased number and percentage of CD56⁺ uNK cells served as predictors for achieving pregnancy. Trend towards decreased numbers of CD16⁺ cells in women who became pregnant compared to those, who did not

Co dál?!?!

ASA

cyclosporin

kortikoidy

LIPIDY

TNF α

IVIG

G-CSF

tacrolimus

prezervativ

scratching

Role NK cells ze současného pohledu I.



- ❖ uNK tvoří 5% v proliferativním a až 30% ze všech buněk v pozdně sekrečním endometriu *
- ❖ významná změny počtu NK buněk v průběhu menstruačního cyklu a prvního trimestru gravidity, mimo jiné vlivem progesteronu a estrogeneru **
- ❖ uNK v době decidualizace mají převážně sníženou toxicitu, produkují angiogenní faktory podporují tvorbu cév a invazi trofoblastu, ***
- ❖ uNK získávají svoji “killing” funkci po vystavení vlivu IL-2, který ale v trofoblastu většinou není v dostatečné koncentraci ****
- ❖ uNK buňky nepřijdou do kontaktu s buňkami embrya, zatímco pbNK ano (s uvolněnými buňkami plodu, cirkulujícími v oběhu matky)

*Bulmer, Mol Immunol 2005; ** Sentman CL, J Immunol 2004 ;*** Hanna et al., Nat Med 2006; **** Lim et al, 1998

Role NK cells ze současného pohledu II.

❖ Co je důležité? Abs. množství nebo poměr?

human
reproduction
update

Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis

Srividya Seshadri* and Sesh Kamal Sunkara

Nejasné ***

careful assessment. It seems that while simple enumeration of cell count is not predictive of IVF success (Thum *et al.*, 2005; Matteo *et al.*, 2007), the level of activation of pbNK cells (e.g. using the CD69 activation marker) is predictive (Thum *et al.*, 2004; Dons'koi *et al.*, 2014).

- ❖ zdroj tvorby uNK nejasný: progenitorové buňky v děloze? Periferní krev?
- ❖ pozitivní korelace mezi hladinou (dim) pbNK a (dim) uNK *
- ❖ Proběhlá úspěšná gravidita je důležitý hráč na hřišti: již rodivší ženy mají více CD56+, ale snížený podíl CD56dim ****

* Sack et al 2014; *** Tang AW, Hum Reprod 2011, **** Fukui A

Role NK cells ze současného pohledu III.

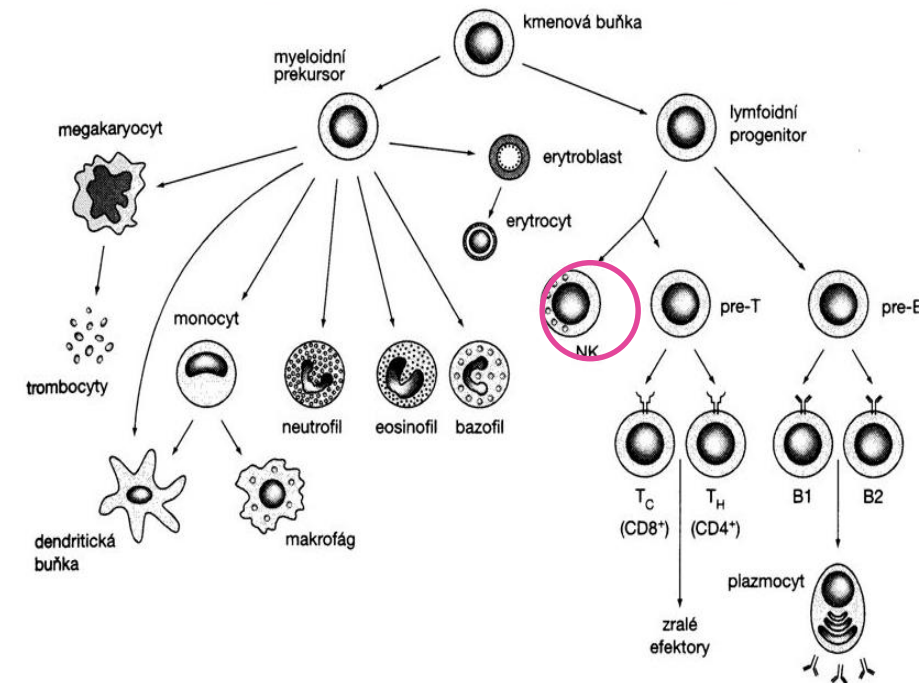
❖ **CD⁵⁶⁺: uNK (dNK) ≠ pbNK cells**

❖ **nutno rozlišovat subtypy CD⁵⁶⁺ a jejich (odlišné) poměry a role v periferní krvi a v děloze:**

❖ **NK CD56+: (dim 90%/10%?, bright 10%/90%?, ev. superbright)**

❖ **uNK i pbNK mají imunomodulační funkci, nejsou jen efektorovými buňkami**

❖ **pokles populace cytotoxických CD⁵⁶⁺ CD¹⁶⁺ je považován za proimplantační**



Role NK cells ze současného pohledu III.

❖ významná role $CD^{4+} T_{reg}$ (Fox^{P3+}) v imunotoleranci*

❖ kombinace (polymorfních) KIR receptorů NK buněk s (polymorfními) HLA-C a HLA -G paternálními variantami v trofoblastu je považován za zásadní pro invazi / odmítnutí trofoblastu***

*Sasaki Y, Hum Reprod 2004; ***Moffet et al; 2015



Role NK cells ze současného pohledu V.

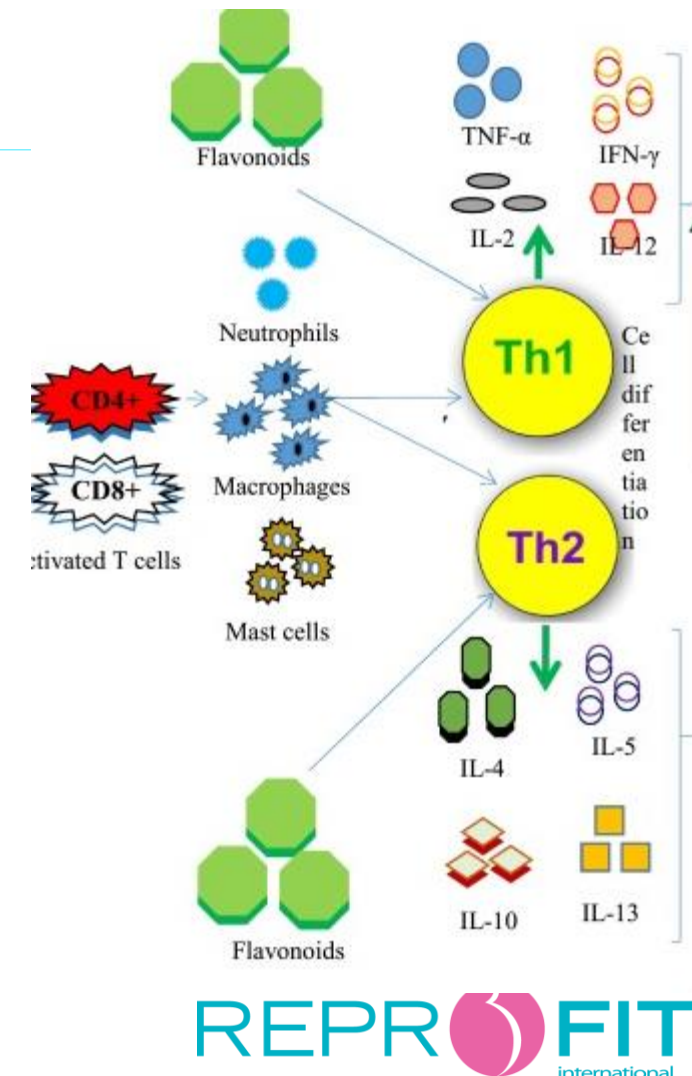
❖ T helper cells:

Th1 (IL-2, INF- α , TNF- α) / Th2 (IL-4, IL-5, IL-10).

❖ Th2 dominance je považována za proimplantační?*

➔ snížení uNK cytotoxicity pomocí citokinů?

❖ Th1/Th2 ... pravděpodobně příliš zjednodušené, nevystihující komplexnost procesů



*Wegmann TG; Immunol Today 1993

Komerční testování I.

„We found dysregulation of the immune environment in 81.5% of cases of women with implantation failures“

Immune Endometrial Evaluation

OVER-IMMUNE ACTIVATION

IL-18/TWEAK > 0.12 → Th-1 in exces
± IL-15/Fn-14 > 3 → cytotoxic uNK cells
± CD56+ cells > 100 → hyper mobilization of uNK cells

OVER-IMMUNE ACTIVATION

IL-18/TWEAK > 0.12 → Th-1 in exces
IL-15/Fn-14 < 0.3 → immature uNK cells

LOW-IMMUNE ACTIVATION

IL-15/Fn-14 < 0.3 → immature uNK cells
± CD56+ cells < 10 → low recruitment of uNK cells
± IL-18/TWEAK < 0.02 → Th-2 low

Specific Therapeutic Recommendation

- Luteal support with high dose of progesterone with estradiol
- Control of the pro-inflammatory environment (Prednisolone or Intralipid®)
- No exposition to seminal plasma

- Local injury the cycle before
- Luteal support with high dose of progesterone with estradiol
- Control of the pro-inflammatory environment (Prednisolone or intralipid®)
- No exposition to seminal plasma

- Local injury the cycle before
- Mild stimulation – replacment of frozen embryo in natural cycle
- Luteal support with hCG
- Exposition to seminal plasma



WILEY

AMERICAN JOURNAL OF
REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY

This Article

For Authors

Learn More

Submit

Am J Reprod Immunol. 2016 Feb 11; 75(3): 388–401.

Published online 2016 Jan 18. doi: [10.1111/aji.12483](https://doi.org/10.1111/aji.12483)

PMCID: PMC4849202

PMID: [26777262](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26777262/)

The Uterine Immune Profile May Help Women With Repeated Unexplained Embryo Implantation Failure After *In Vitro* Fertilization

[Nathalie Lédée](#),^{1, 2, 3} [Marie Petitbarat](#),¹ [Lucie Chevrier](#),¹ [Dominique Vitoux](#),⁴ [Katia Vezmar](#),¹ [Mona Rahmati](#),^{2,}

REPR  FIT
international

FutureLife

Komerční testování II.

Several studies indicate that about 20-30% of patients with implantation failure or recurrent miscarriage have an increased number of uterine natural killer cells that may be harmful.

Glucocorticoide

In a study with women suffering from idiopathic recurrent miscarriages and elevated uterine killer cells, administration of 20 mg prednisolone orally daily from cycle day 1-21 resulted in a significant reduction in uterine killer cells (19). Nevertheless, it should be kept in mind that glucocorticoids may also cause side effects, such as the development of gestational diabetes, arterial hypertension, preterm labor, decreased birth weight and disorders of pediatric neurological development and cleft lip and palate (22-24).

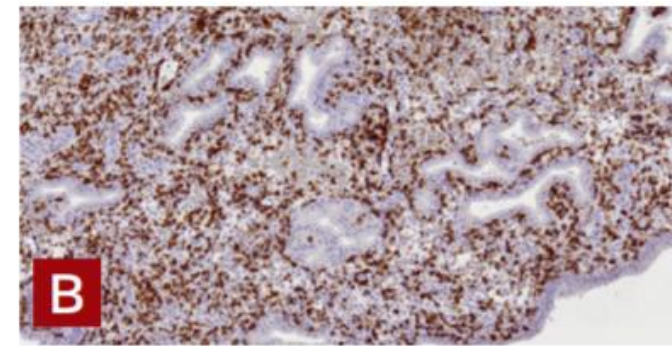
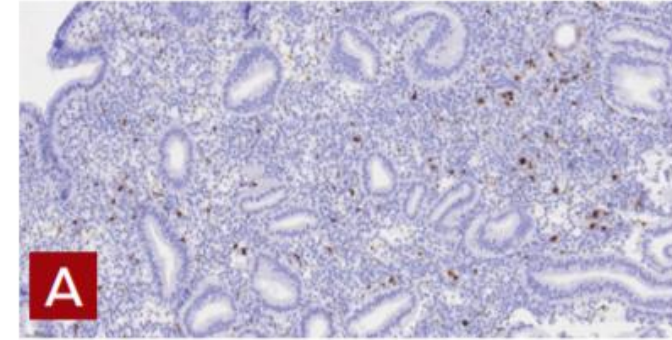
Lipid infusions

Lipid infusions contain soybean oil and have been used for many years in the treatment of intensive care patients for nutritional therapy. Studies have shown that lipid infusions may lower the activity of natural killer cells in peripheral blood (25-28). A study focusing the administration of lipid infusions in women with elevated uterine killer cells does not yet exist so far. No side effects have been reported for the use of lipid infusions in the present studies in patients with implantation failure or miscarriage. However, an allergy to soy, peanuts and egg yolks must be ruled out before administration of soy-containing lipid infusions.

Treatment in case of elevated plasma cells or detection of chronic endometritis

Chronic endometritis is treated with antibiotics for 14 to 21 days. Following this treatment, a decrease in the inflammatory response has been shown and is linked to an increased live birth rate (7,8,12). Among others, the broad-spectrum antibiotic doxycycline is usually recommended for 14 or 21 days (12). Different doses are used in the studies (e.g. 100 mg doxycycline twice daily for 14 days (8,29)). Alternatively, ofloxacin (400 mg) combined with metronidazole (500 mg) can be given twice a day for a total of 14 days (14).

REPRO
gnostics



REPRO  FIT
international

FutureLife

Testování uNK buněk in situ – studie proveditelnosti



Primární cíl: ověřit praktické provedení

1. **laváže** dutiny děložní v jedné době s
2. **biopsií** endometria a s
3. odběrem **periferní krve**
4. **logistiku** transportu vzorků do laboratoře
5. **kvalitu a hodnotitelnost** odebraného materiálu

Sekundární cíl: labor. hodnoty

1. pbNK v relativních i abs. hodnotách
2. uNK v relativních i abs. hodnotách



Poučení / Informovaný souhlas / Protokol



Informace o studii pro pacientku

Pilotní vědecká studie: TESTOVÁNÍ UTERINNÍCH IMUNOLOGICKÝCH PARAMETRŮ IN SITU

Hlavní řešitel studie: MUDr. Pavel Otevřel²
Spoluřešitelé: MUDr. Karín Maličková¹, Ing. Štěpánka Luxová²

¹ Gennet, Kostelní 9, 170 00 Praha 7, Česká republika
² Reprofit International s.r.o., Hlinky 48/122, 603 00 Brno, Česká republika

Vážená paní, milá slečno,

Rozhodla jste se zúčastnit studie, zabývající se vyšetřením imunologických parametrů v děloze. Chtěli bychom Vás blíže informovat o plánovaném výkonu.

CÍL STUDIE

K uchycení embrya je třeba, aby prostředí v děloze bylo nastaveno pro embryo příznivě. Procesy probíhající ve sliznici děložní v průběhu uchycování embrya jsou u většiny žen přirozeně nastaveny tak, aby nedocházelo k poškození embrya. Na druhé straně musí být sliznice chráněna, aby se nestala vstupní branou zánětu a infekce. Tyto dva procesy musí být v rovnováze. Na nastavení takové rovnováhy se složky imunitního systému podílí zásadní měrou.

Cílem studie je vyšetřit imunitní změny v děložní sliznici v období uhnízdění embrya. Zároveň je cílem porovnat imunitní prostředí v děloze s imunitními parametry získanými vyšetřením krve. K tomu je třeba získat vzorek děložní sliznice, výplach dutiny děložní a vzorek krve.

VÝKON

Odběr vzorků se provádí bez anestezie, je sám o sobě nebolestivý a dá se přirovnat k provedení embryotransferu. Po zavedení gynekologických zrcadel do pochvy je zaveden do čípku tenký měkký katetr, přes který je vstříknut sterilní vodný roztok, a ten je následně zpětně odsát a odeslán k vyšetření. Poté opět podobným katetrem zavedeným do dělohy je proveden odběr vzorku sliznice velikosti několika milimetrů. Celý zákrok trvá 5 - 10 minut.

Odběr krve ze žíly je proveden následně běžným způsobem.

Informovaný souhlas pacientky

Pilotní vědecká studie: TESTOVÁNÍ UTERINNÍCH IMUNOLOGICKÝCH PARAMETRŮ IN SITU

Hlavní řešitel studie: MUDr. Pavel Otevřel²
Spoluřešitelé: MUDr. Karín Maličková¹, Ing. Štěpánka Luxová²

¹ Gennet, Kostelní 9, 170 00 Praha 7, Česká republika
² Reprofit International s.r.o., Hlinky 48/122, 603 00 Brno, Česká republika

1. Potvrzuji tímto, že jsem byla detailně seznámena formou dokumentu s poučením o účelu, povaze a rizicích výše zmíněné vědecké studie. Prohlašuji, že mi byl poskytnut dostatek času si tento dokument prostudovat a měla jsem možnost klást jakékoliv otázky, a tyto dotazy mi byly řádně a srozumitelně zodpovězeny.

2. Rozumím účelu vědecké studie a tomu jak v ní budu zapojena.

3. Potvrzuji, že mé rozhodnutí zúčastnit se vědecké studie je zcela dobrovolné. Rozumím tomu, že rozhodnutí nezúčastnit se by nijak neovlivnilo kvalitu současné či budoucí lékařské péče a můj vztah s klinikou Reprofit International.

4. Jsem si vědoma, že mám právo kdykoli odstoupit ze studie bez udání důvodu, aniž by toto rozhodnutí ovlivnilo kvalitu péče či moje práva.

5. Rozumím tomu, že moje účast ve vědecké studii zahrnuje i poskytnutí základních klinických informací (věk, diagnóza příčiny neplodnosti). Tyto informace budou společně se vzorkem anonymizovány před případnou publikací. Stejně tak budou údaje anonymizována, dříve, než informace ze studie a výsledky budou poskytnuty jinému pracovišti (tzn. mimo Reprofit a Gennet).

6. Souhlasím s účastí v této studii a uděluji tímto svobodný a informovaný souhlas s darováním výplachu z dutiny děložní a vzorku sliznice děložní pro výzkumné účely.

Prosím vyplíte hůlkovým písmem

Jméno pacientky:

Podpis:

Pacientské identifikační číslo:

Souhlas přijal:

Podpis:

Datum:

Protokol o provedení odběru biologického materiálu

Pilotní vědecká studie: TESTOVÁNÍ UTERINNÍCH IMUNOLOGICKÝCH PARAMETRŮ IN SITU

PACIENT:	
DAT. NAROZENÍ	
ID (RČ):	

ZÁKL. DG:	STERILITA (ZAKROUŽKOU)	INFERTILITA
	PRIMÁRNÍ (ZAKROUŽKOU)	SEKUNDÁRNÍ
DALŠÍ DG.		
ANAMNÉZA		
VÝŠKA (CM)		VÁHA (KG)

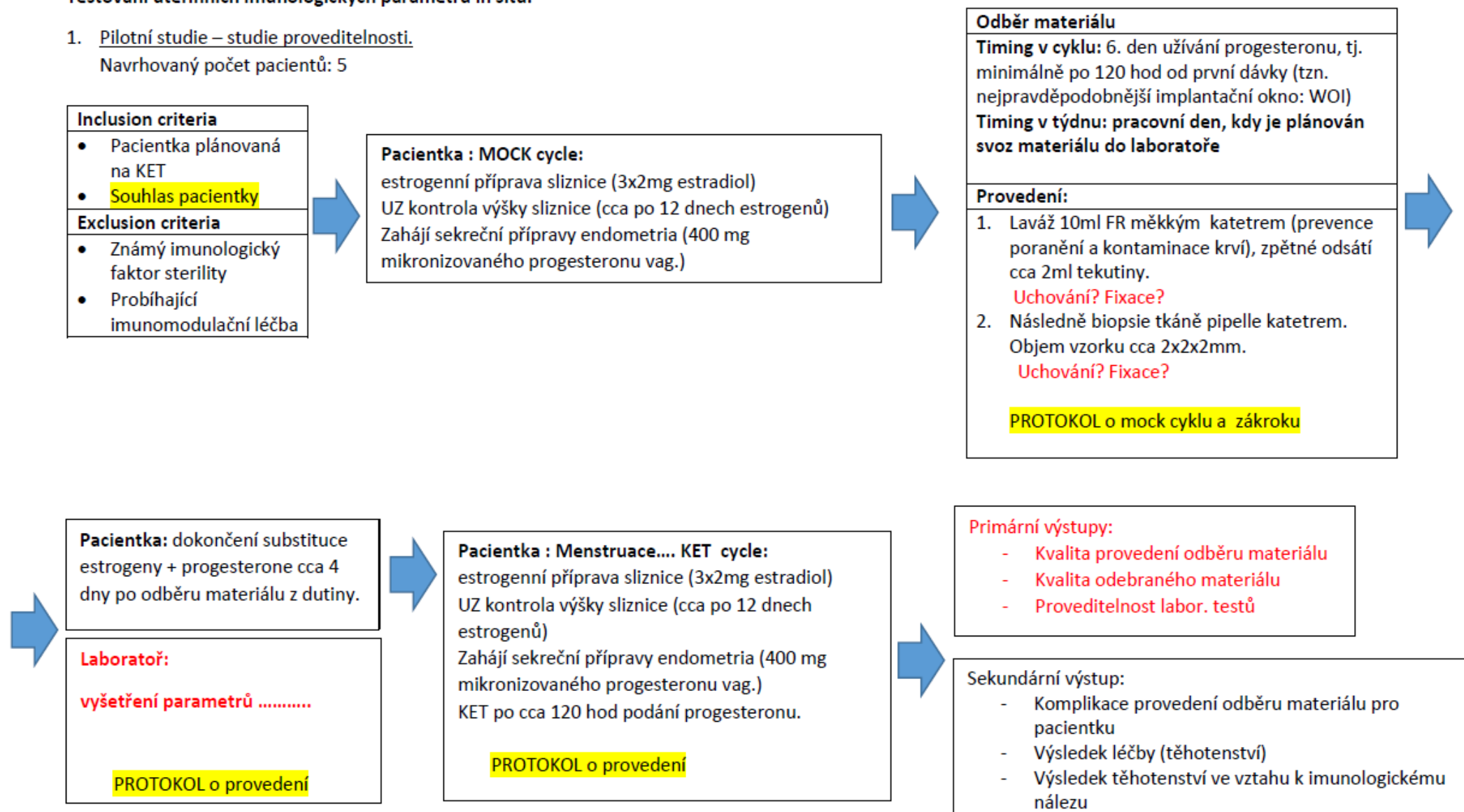
NATIVNÍ CYKLUS	PM:	
POZN:		
PŘÍPRAVA ENDOMETRIA:		
NÁZEV PROTOKOLU		
FORMA A DÁVKU ESTROGENU		
PRVNÍ DEN APLIKACE ESTROGENU		



Testování uterinních imunologických parametrů in situ.

1. Pilotní studie – studie proveditelnosti.

Navrhovaný počet pacientů: 5



Praktické provedení

Laváž

Katetry:

- močová cévka Nelaton
- HyFoSy Kateter
- dvoucestný katetr Medicoplast

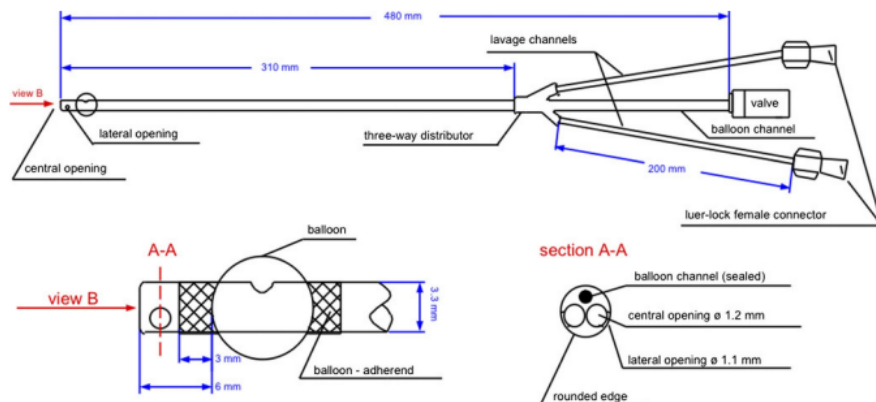
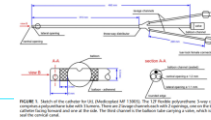


FIGURE 1. Sketch of the catheter for UTL (Medicoplast MF 13005). The 12F flexible polyurethane 3-way catheter comprises a polyurethane tube with 3 lumens. There are 2 lavage channels each with 2 openings, one on the tip of the catheter facing forward and one at the side. The third channel is the balloon tube carrying a valve, which is used to seal the cervical canal.

References	Product	Sales Unit	Length	Sterilisation
EBT01700	HYSOKAT	25 units individually packed	24.5 cm	Ethylene oxide

Praktické provedení

Laváž



Výhody	<ul style="list-style-type: none"> - Jednoduchá manipulace - Malé riziko poranění - Cena 	<ul style="list-style-type: none"> - Jednoduchá manipulace 	<ul style="list-style-type: none"> - Při dobrém zavedení je provedení laváže spolehlivé
Nevýhody	<ul style="list-style-type: none"> - Obtékání v cerv. kanálu - Únik tekutiny do vejcovodů - Netěsnost přechodky 	<ul style="list-style-type: none"> - Obtékání v cerv. kanálu - Únik tekutiny do vejcovodů - Cena 	<ul style="list-style-type: none"> - Nutnost anestezie a dilatace - Riziko poranění a kontaminace krví - Cena

Fyziologický roztok: 10ml instilace a zisk mezi 2-10ml

Praktické provedení

Biopsie endometria



- Pipelle bez CA
- Kyreta v rámci HSK v CA
- Vzorek velikosti cca 3x3mm
- Transportní médium
 - X-VIVO™ 10, Serum free hematopoietic cell medium, with L-Glutamine, gentamicin and phenol red, xenofree

Všechny dopraveny do laboratoře do 5 hodin po odběru.

Odběr periferní krve a logistika transportu

- Imunologický panel Gennet zahrnující
 - koncentrace protilátek IgA, IgG, IgM a IgE
 - Základní parametry buněčné imunity
 - - krevní obraz a počet T, B, NK buněk včetně subpopulací Th, Tc, NKT
 - Regulační T lymfocyty
 - Vyšetření komplementu
 - Autoimunitní onemocnění
 - Antifosfolipidy
 - Buněčné testy:
 - Stanovení aktivity NK buněk (po stimulaci mitogenem, spermii* a trofoblastem)
 - Stanovení embryotoxických/embryoprotektivních cytokinů (po stimulaci mitogenem, spermii* a trofoblastem)

Shrnutí

- Laváž se jeví jako nejméně spolehlivá, technicky náročná varianta
 - kontaminace krví znehodnocuje vzorek
 - únik tekutiny do vejcovodů
 - avšak lze provést bez anestezie, je minimálně invazivní
- Biopsie: spolehlivá, vzorky dostatečné velikosti a buněčnosti
- Periferní krev = kontrolní vzorek sloužící k porovnání populací pbNK/uNK

Další cíle

- přesně specifikovat inclusion criteria, doplnit follow up
- Sjednotit timing odběru ve vztahu k ovulaci
- Doplnit sledování hladin Progesteronu / Estrogeneru v době odběru
- Zkvalitnění a sjednocení provedení laváže
- Mikrobiom
- Najít spolehlivost / nespolehlivost korelace mezi nálezem v laváži a biopsií s cílem nahradit výkon invazivní výkone minimálně invazivním
- Pro futuro: neinvazivní hodnocení stavu děložního prostředí v období před ET a dle toho doporučit ne/provedení ET?
- Zapojení více klinik v rámci FutureLife i jiných



Děkuji za pozornost