Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk

mgr inż. Karolina Piekarska

Rola KIR, ich ligandów HLA-C i HLA-G oraz aminopeptydaz siateczki śródplazmatycznej w nawracających niepowodzeniach implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym

The role of KIR, their ligands HLA-C and HLA-G and endoplasmic reticulum aminopeptidases in recurrent implantation failure following *in vitro* fertilization

Rozprawa doktorska

wykonana
w Laboratorium Immunogenetyki i Immunologii Tkankowej
Zakładu Immunologii Klinicznej

Promotor: dr hab. Izabela Nowak

Wrocław, 2022 r.

Składam serdeczne podziękowania mojej promotor dr hab. Izabeli Nowak za możliwość realizacji badań naukowych, inspirujące rozmowy oraz cierpliwość, wsparcie i zaangażowanie podczas przygotowania niniejszej rozprawy.

Wyrazy wdzięczności składam również lekarzom zaangażowanym w klasyfikację pacjentów: prof. dr. hab. n. med. Andrzejowi Malinowskiemu, prof. dr. hab. n. med. Jackowi Wilczyńskiemu, prof. dr. hab. n. med. Michałowi Radwanowi oraz dr. n. med. Pawłowi Radwanowi.

Dziękuję również Zespołowi Laboratorium Immunogenetyki i Immunologii Tkankowej za wszystkie cenne wskazówki, przyjazną atmosferę pracy i szczerą chęć pomocy w spełnieniu mojego naukowego marzenia.

Chciałabym również podziękować Koleżankom i Kolegom ze Studium Doktoranckiego za życzliwość, optymizm i pomoc.

Moim Najbliższym dziękuję za wyrozumiałość i stale okazywane wsparcie, w szczególności Mężowi i Rodzicom za motywację i wiarę w moje możliwości.

Badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach poniższych projektów grantowych:

GRANT NCN OPUS 7, pt.: „Związek polimorfizmu genów KIR, LILRB oraz ich ligandów – HLA-C i HLA-G z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka po zapłodnieniu *in vitro*", kierownik projektu: dr hab. Izabela Nowak, nr projektu: 2014/13/B/NZ5/00273, projekt realizowano w latach 2015-2020.

GRANT NCN PRELUDIUM 15, pt.: „Rola aminopeptydaz siateczki śródplazmatycznej ERAP1 i ERAP2 w nawracających niepowodzeniach implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro* u pacjentek o różnym statusie immunologicznym", kierownik projektu: Karolina Piekarska, nr projektu: 2018/29/N/NZ5/00940, projekt realizowano w latach 2019-2022.

Część wyników pracy została opublikowana w artykułach:

1. Nowak I, **Wilczyńska K**, Wilczyński JR, Malinowski A, Radwan P, Radwan M, Kuśnierczyk P. KIR, LILRB and their Ligands' Genes as Potential Biomarkers in Recurrent Implantation Failure. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2017 Oct;65(5):391-399. doi: 10.1007/s00005-017-0474-6. **IF=2,991**

2. Nowak I, **Wilczyńska K**, Radwan P, Wiśniewski A, Krasiński R, Radwan M, Wilczyński JR, Malinowski A, Kuśnierczyk P. Association of soluble HLA-G plasma level and HLA-G genetic polymorphism with pregnancy outcome of patients undergoing in vitro fertilization embryo transfer. Front Immunol. 2020 Jan 14;10:2982. doi: 10.3389/fimmu.2019.02982. **IF=7,561**

3. **Wilczyńska K**, Radwan P, Krasiński R, Radwan M, Wilczyński JR, Malinowski A, Barcz E, Nowak I. KIR and HLA-C genes in male infertility. J Assist Reprod Genet. 2020 Aug;37(8):2007-2017. doi: 10.1007/s10815-020-01814-6. **IF=3,412**

4. **Piekarska K**, Radwan P, Tarnowska A, Wiśniewski A, Radwan M, Wilczyński JR, Malinowski A, Nowak I. ERAP, KIR, and HLA-C profile in recurrent implantation failure. Front Immunol. 2021 Oct 22;12:755624. doi: 10.3389/fimmu.2021.755624 **IF=7,561**

5. **Piekarska K**, Radwan P, Tarnowska A, Wiśniewski A, Krasiński R, Radwan M, Wilczyński JR, Malinowski A, Nowak I. The association of HLA-G gene polymorphism and its soluble form with male infertility. Front Immunol. 2022 Jan 17;12:791399. doi:10.3389/fimmu.201.791399. **IF=7,561**

Spis treści

Streszczenie **1**

Summary **3**

Wykaz skrótów **5**

1. Wstęp **9**

1.1. Definicja niepłodności **9**

1.2. Techniki wspomaganego rozrodu **10**

1.3. Nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym **11**

1.4. Etiopatogeneza niepowodzeń implantacji zarodka **12**

1.4.1. Czynniki matczyne 13

1.4.2. Czynniki związane z zarodkiem 14

1.4.3. Czynniki związane z gametami 14

1.4.4. Czynniki genetyczne 16

1.5. Proces implantacji zarodka **17**

1.5.1. Komórki układu odpornościowego 18

1.6. Charakterystyka komórek NK **19**

1.6.1. Maciczne komórki NK 20

1.7. Limfocyty T CD8+ **22**

1.8. Receptory komórek NK **23**

1.8.1. Receptory KIR 23

1.8.2. Geny *KIR* 26

1.8.3. Polimorfizm haplotypowy i alleliczny 27

1.9. Ekspresja HLA na komórkach trofoblastu **29**

1.10. Ligandy receptorów KIR **30**

1.11. Aminopeptydazy siateczki śródplazmatycznej ERAP1 i ERAP2 ..... **35**

1.12. Cytokiny i czynniki wzrostu – ich rola w regulacji matczynej odpowiedzi immunologicznej **39**

2. Założenia i cele pracy **42**

3. Pacjenci, materiały i metody **44**

3.1. Pacjenci **44**

3.1.2. Przygotowanie pacjentek do procedury IVF 45

3.1.3. Zapłodnienie *in vitro* i transfer zarodka 46

3.2. Materiał do badań **46**

3.3. Odczynniki i zestawy **48**

3.4. Metody **49**

3.4.1. Izolacja DNA z krwi obwodowej 49

3.4.2. Oznaczanie stężenia DNA 50

3.4.3. Typowanie genów *KIR* 50

3.4.4. Typowanie genów *HLA-C* 53
3.4.5. Typowanie polimorfizmu 14-nukleotydowej insercji/delecji (rs371194629) w genie *HLA-G* ……55
3.4.6. Oznaczanie polimorfizmów w miejscach rs1632947: c.-964G>A oraz rs1233334: c.-725G>C/T w genie *HLA-G* 56
3.4.7. Oznaczanie polimorfizmów aminopeptydaz siateczki śródplazmatycznej ERAP1 i ERAP2 ……58
3.4.8. Badanie stężenia rozpuszczalnej cząsteczki sHLA-G 60
3.4.8.1. Badanie sHLA-G w osoczu krwi 60
3.4.8.2. Badanie sHLA-G w nasieniach 61
3.4.9. Oznaczanie stężenia ERAP1 i ERAP2 w osoczu krwi 61
3.4.10. Analiza statystyczna 62
4. Wyniki 64
4.1. Ocena związku genów *KIR, HLA-C* i *ERAP* z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka u kobiet……...64
4.1.1. Częstość genów *KIR* oraz genotypów *KIR* i *HLA-C* 64
4.1.2. Kombinacje genotypów *KIR* AA i Bx z *HLA-C* C1 i C2 65
4.1.3. Częstość genotypów *ERAP1* i *ERAP2*..... 67
4.1.4. Kombinacje genotypów *ERAP1* i *ERAP2* z genotypami *HLA-C1* i *C2* oraz *KIR* 68
4.1.4.1. Polimorfizm *ERAP1* rs26653 G>C..... 69
4.1.4.2. Polimorfizm *ERAP1* rs26618 T>C 72
4.1.4.3. Polimorfizm *ERAP1* rs2287987 T>C 74
4.1.4.4. Polimorfizm *ERAP1* rs6861666 A>G 74
4.1.4.5. Polimorfizm *ERAP2* rs2248374 A>G 76
4.1.5. Haplotypy *ERAP1/ERAP2*..... 76
4.2. Rola genów *KIR, HLA-C* i *ERAP* u partnerów kobiet z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka 78
4.2.1. Częstość genów *KIR* oraz genotypów *KIR* i *HLA-C* 78
4.2.2. Kombinacje genotypów *KIR* AA i Bx z *HLA-C* C1 i C2 81
4.2.3. Częstość genotypów i alleli *ERAP1* oraz *ERAP2*..... 81
4.2.4. Kombinacje genotypów *ERAP1* i *ERAP2* z *HLA-C1* i *C2* oraz *KIR* 81
4.3. Geny *KIR, HLA-C* i *ERAP* w kombinacjach kobieta/partner..... 82
4.3.1. Częstość kombinacji *KIR* kobiety i *HLA-C* partnera 83
4.3.2. Częstość kombinacji *ERAP* kobiety i *HLA-C* partnera..... 84
4.3.3. Kombinacje genów *ERAP* i *KIR* kobiety z *HLA-C* jej partnera 86
4.3.4. Kombinacje genów *KIR* i *HLA-C* kobiety z genami *ERAP* partnera..... 89
4.3.5. Kombinacje genów *KIR* kobiety z genami *HLA-C* i *ERAP* partnera..... 90
4.3.6. Kombinacje genów *ERAP* i *HLA-C* kobiety z genami *HLA-C* partnera..... 91
4.3.7. Kombinacje genów *ERAP* i *HLA-C* mężczyzny z genami *HLA-C* kobiety..... 91

4.4. Rola wydzielanego ERAP1 i ERAP2 w niepowodzeniach implantacji zarodka.....92
4.4.1. Stężenie ERAP1 i ERAP2 w osoczu pacjentek i kontroli płodnej.....92
4.4.2. Wpływ ERAP1 na powodzenie ciąży.....96
4.4.3. Wpływ ERAP2 na powodzenie ciąży.....97
4.4.4. Analiza krzywych ROC dla stężenia ERAP2.....99
4.5. Rola HLA-G w nawracających niepowodzeniach implantacji zarodka.....101
4.5.1. Analiza częstości genotypów, haplotypów i diplotypów *HLA-G* w badanych grupach pacjentek i kobiet kontrolnych.....101
4.5.2. Stężenie sHLA-G w osoczu pacjentek i kontroli płodnej.....105
4.5.3. Wpływ haplotypów *HLA-G* na stężenie sHLA-G.....107
4.5.4. Wpływ diplotypów *HLA-G* na stężenie sHLA-G.....118
4.5.5. Stężenie sHLA-G w cyklu IVF świeżym i mrożonym.....124
4.5.6. Stężenie sHLA-G w zależności od protokołu stymulacji owulacji.....129
4.5.7. Analiza krzywych ROC dla stężenia sHLA-G.....134
4.6. HLA-G w niepłodności męskiej.....139
4.6.1. Analiza częstości genotypów, haplotypów i diplotypów *HLA-G* w badanych grupach mężczyzn IVF i mężczyzn z kontroli płodnej.....139
4.6.2. Haplotypy i diplotypy *HLA-G* w zależności od parametrów nasienia.....142
4.6.3. Stężenie sHLA-G w nasieniach mężczyzn uczestniczących w zapłodnieniu *in vitro*..146
5. Dyskusja.....156
6. Wnioski.....188
7. Spis rycin i tabel.....189
8. Literatura.....194
9. Suplement.....220

Streszczenie

Niepłodność jest obecnie uważana za chorobę szeroko rozpowszechnioną, a także problem społeczny, który dotyczy coraz większej liczby par w wieku reprodukcyjnym. Pomimo znacznego postępu w dziedzinie technik wspomaganego rozrodu, do których należy zapłodnienie pozaustrojowe *in vitro* (IVF), kobiety poddające się tym zabiegom, coraz częściej doświadczają nawracających niepowodzeń implantacji zarodka. Nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym (RIF – ang. *recurrent implantation failure*) definiowane są jako brak ciąży po przynajmniej trzech transferach dobrej jakości zarodków u kobiet w wieku poniżej 40 lat. Etiologia RIF jest niejednoznaczna. Do czynników mających wpływ na niepowodzenia implantacji po zabiegu *in vitro* należą zarówno czynniki matczyne, jak również czynniki związane z zarodkiem i komórkami rozrodczymi rodziców (jakość komórki jajowej, jakość nasienia, a także aberracje chromosomowe w tych komórkach). Jednak wciąż przyczyna ponad 50% przypadków RIF pozostaje niewyjaśniona.

Prawidłowa implantacja zależy od tolerancji układu immunologicznego matki wobec płodu, ekspresjonującego obce ojcowskie antygeny, bez utraty zdolności matki do zwalczania infekcji. Unikalną cechą trofoblastu ludzkiego (komórek, z których powstaje łożysko) jest ekspresja cząsteczek HLA-C oraz nieklasycznych HLA-G (ang. *human leukocyte antygen* – ludzkie antygeny leukocytarne). W rozpoznawaniu cząsteczek HLA-C i HLA-G biorą udział immunoglobulinopodobne receptory KIR (ang. *killer immunoglobulin-like receptors*), występujące na komórkach naturalnie cytotoksycznych NK, a także na niektórych limfocytach T. W macicy w czasie implantacji i wczesnej ciąży, dominującą populacją leukocytów jest populacja macicznych komórek NK, które w prawidłowej ciąży są pozbawione aktywności cytolitycznej. W zależności od struktury oraz interakcji z ligandami, receptory KIR mogą aktywować lub hamować komórkę NK do wytwarzania cytokin i czynników wzrostowych, niezbędnych do prawidłowej implantacji zarodka. Polimorfizm genów *KIR* wpływa na aktywność komórek NK i odgrywa rolę w kształtowaniu interakcji z cząsteczkami HLA-C i HLA-G zarodka. W powstawaniu peptydów antygenowych prezentowanych przez HLA, biorą udział aminopeptydazy siateczki śródplazmatycznej ERAP1 i ERAP2 (ang. *endoplasmic reticulum aminopeptidase*). Polimorfizm genów *ERAP1* i *ERAP2* może mieć wpływ na prawidłową prezentację antygenów odpowiednim receptorom.

Głównym celem pracy była ocena związku polimorfizmu genów *KIR* i ich ligandów *HLA-C* i *HLA-G*, a także polimorfizmów *ERAP1* i *ERAP2* z RIF. Analizie zostały poddane również kombinacje polimorfizmu *ERAP, KIR, HLA-C* wśród par, które doświadczyły

nawracających niepowodzeń implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym. Dodatkowo zbadano stężenie aminopeptydaz w osoczu krwi u kobiet z RIF przed i po procedurze IVF. Podjęto również próbę oceny roli rozpuszczalnej formy HLA-G (sHLA-G) w kobiecej oraz męskiej niepłodności.

U kobiet zaobserwowano predyspozycję do RIF, gdy kobieta posiadała geny *KIR* regionu telomerycznego AA w kombinacji z genotypem *HLA-C2C2*. *Z* kolei, geny *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DL2* i *KIR2DL5* gr. 2 z regionu centromerycznego AB i BB mężczyzn były związane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia RIF i niepłodności. Zbadano siedem miejsc polimorficznych w genach kodujących ERAP1 i ERAP2. Polimorfizmy tych enzymów, zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn, mogą brać udział w patogenezie RIF. Największy wpływ na niepłodność i RIF mają polimorfizmy *ERAP1* rs26653 G>C i rs26618 T>C w układzie z allotypem *HLA-C2* kobiet. W układzie mieszanym *ERAP1* kobiety/*HLA-C* partnera istotną rolę w niepowodzeniach implantacji zarodka odgrywają polimorfizmy rs30187 C>T i rs27044 C>G. W układzie *ERAP* partnera i *HLA-C* kobiety polimorfizm rs30187 C>T ma znaczenie. Co więcej, zaobserwowano związek wydzielanego ERAP1 i ERAP2 z niepłodnością u kobiet. Wyznaczono stężenie ERAP2, które związane było z wystąpieniem poronienia u pacjentki. Wykazano również wpływ sHLA-G na nawracające niepowodzenia implantacji zarodka, po raz pierwszy na świecie mierząc stężenie sHLA-G zarówno przed, jak i po transferze zarodka. Kobiety, które nie zachodziły w ciążę lub doświadczyły poronienia, miały znacząco niższe stężenia sHLA-G w osoczu w porównaniu do kobiet, które zachodziły w ciążę po zapłodnieniu *in vitro* oraz kobiet płodnych. W analizach uwzględniono kliniczne uwarunkowania takie jak: protokół stymulacji jajników, czy rodzaj przenoszonego zarodka (świeżego lub zamrożonego). Niektóre haplotypy i diplotypy *HLA-G* rs1632947G>A-rs1233334G>C/T-rs371194629ins/del były związane z niepłodnością, a inne wykazywały efekt ochronny. Wyniki pokazały również, że stężenia sHLA-G były skorelowane z posiadanym haplotypem i diplotypem *HLA-G*. U mężczyzn niskie stężenie sHLA-G w nasieniu było związane z najbardziej niekorzystnym haplotypem G-C-ins oraz diplotypem G-C-ins/G-C-ins, a także z ryzykiem wystąpienia teratozoospermii.

Wyniki w niniejszej pracy ukazują istotną rolę czynników, które mogą wpływać na podatność na nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zabiegu *in vitro*, w zależności od indywidualnych (genetycznych i immunologicznych) predyspozycji par borykających się z problemem niepłodności. Wyniki badań mogą się stać pomocne w diagnostyce nawracających niepowodzeń implantacji zarodka i prognozowaniu wyników terapii oraz wyjaśnić patomechanizm tej choroby.

Summary

Nowadays, infertility is considered as a common disease worldwide as well as a social problem that affects more and more couples in reproductive age. Despite significant advances in assisted reproductive techniques, such as *in vitro* fertilization (IVF), women undergoing these procedures increasingly experience recurrent implantation failure. Recurrent implantation failure (RIF) is defined as the absence of pregnancy after at least three IVF procedures in which good quality embryos were transferred in women under the age of 40. The etiology of RIF is ambiguous. Maternal factors as well as factors related to the embryo and reproductive cells of the parents (egg quality, sperm quality, and chromosomal aberrations in these cells) influence implantation failures after IVF. However, the cause of more than 50% of RIF cases remains unclear.

Proper implantation depends on the tolerance of the maternal immune system to the fetus expressing the foreign paternal antigens without losing the mother's ability to fight infection. A unique feature of the human trophoblast (the cells that form the placenta), is the expression of human leukocyte antigens HLA-C and non-classical HLA-G. Killer immunoglobulin-like receptors (KIR) on natural killer (NK) cells or T cells are involved in the recognition of HLA-C and HLA-G molecules. During implantation and early pregnancy, the dominant population of leukocytes in the uterus is the population of uterine NK cells. In normal pregnancy, NK cells lack cytolytic activity. Due to their structure and interaction with ligands, KIR receptors can activate or inhibit the NK cell to produce cytokines and growth factors necessary for the proper implantation of the embryo. The polymorphism of *KIR* genes influences the activity status of NK cells and therefore may play a role in shaping interactions with HLA-C and HLA-G molecules expressed by the embryo. The antigenic peptides presented by HLA are formed by their cleavage to the appropriate length by endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2. The polymorphism of the *ERAP1* and *ERAP2* genes may affect the correct presentation of antigens to the respective receptors.

The main aim of the study was to assess the association between the polymorphism of *KIR* genes and their *HLA-C* and *HLA-G* ligands, as well as *ERAP1* and *ERAP2* polymorphisms with recurrent implantation failure after *in vitro* fertilization. The combinations of *ERAP*, *KIR*, *HLA-C* polymorphisms among couples suffering from RIF were also analyzed. Additionally, the concentration of aminopeptidases in the blood plasma of women with RIF before and after the IVF procedure was tested. Moreover, the role of the soluble form of HLA-G (sHLA-G) in female and male infertility was examined.

A predisposition to RIF was observed in women with the combination of *KIR* genes AA telomeric region and *HLA-C2C2* genotype. In turn, the genes *KIR2DS2*, *KIR2DS3, KIR2DL2* and *KIR2DL5* gr. 2 from the centromeric region AB and BB in men were associated with an increased risk of RIF and infertility. Seven polymorphic sites in the genes encoding the endoplasmic reticulum aminopeptidases were investigated. *ERAP1* and *ERAP2* polymorphisms, both in women and men, may be involved in the pathogenesis of RIF. The *ERAP1* rs26653 G>C and rs26618 T>C polymorphisms with the *HLA-C2* allotype in women, have the greatest influence on infertility and RIF. In the combination of female *ERAP1/HLA-C* partner, the rs30187 C>T and rs27044 C>G polymorphisms play an important role in the implantation failure. In the combination of partner's *ERAP* and female's *HLA-C*, the rs30187 C>T has an impact on RIF. Moreover, the secreted ERAP1 and ERAP2 has been associated with female infertility. The concentration of ERAP2 associated with the miscarriage in patient was determined. For the first time in the world, the effect of the soluble form of HLA-G before and after embryo transfer on recurrent implantation failure has been shown. Women who did not become pregnant or experienced a miscarriage had significantly lower plasma levels of sHLA-G compared to women who became pregnant after IVF and fertile women. The analyses took into account clinical conditions such as the ovarian stimulation protocol or the cycle of embryo transferred (fresh or frozen/thawed). Some *HLA-G* rs1632947G>A-rs1233334G>C/T-rs371194629ins/del haplotypes and diplotypes were associated with infertility, while others showed a protective effect. The results also showed that sHLA-G concentrations were correlated with the haplotype and diplotype of *HLA-G*. In men, the low concentration of sHLA-G in semen was associated with the most unfavorable haplotype G-C-ins and diplotype G-C-ins/G-C-ins. Low sHLA-G level was also associated with the risk of teratozoospermia.

The results of this study show the important role of factors that may influence the susceptibility to recurrent implantation failure after IVF, depending on the individual (genetic and immunological) predispositions of couples with the infertility problem. The research may be helpful in the diagnosis of recurrent implantation failure and prognosis of therapy outcome, and explain the pathomechanism of this disease.

Wykaz skrótów

ADCC (*antibody-dependent cellular cytotoxicity)* – cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał;

Ang (*angiopoetin*) – angiopoetyna;

APM (*antigen processing machinery*) – maszyneria prezentacji antygenu;

ART (*assisted reproductive technology*) – techniki wspomaganego rozrodu;

AUC (*area under curve*) – pole powierzchni pod wykresem krzywej ROC;

CCL (*CC chemokine*) – chemokina CC;

CCR (*CC chemokine receptor*) – receptor chemokiny CC;

CLP (*common lymphoid progenitor cell*) – wspólna progenitorowa komórka limfopoezy;

CXCL (*CXC chemokine*) – chemokina z rodziny CXC;

DAP12 (*associated protein/DNAX-activating protein of 12 kDa*) – białko adaptorowe;

DET (*double embryo transfer*) – transfer dwóch zarodków;

dNK (*decidual natural killer cell*) – doczesnowa komórka NK;

ERAP (*endoplasmic reticulum aminopeptidase*) – aminopeptydaza siateczki śródplazmatycznej;

ET (*embryo transfer*) – transfer zarodka;

EVT (*extravillous trophoblast*) – trofoblast pozakosmkowy;

FcR – receptor dla fragmentu Fc przeciwciała;

FcεRI (*high-affinity immunoglobulin E receptor*) – receptor o wysokim powinowactwie do IgE;

FET (*frozen-thawed embryo transfer*) – transfer mrożonych zarodków po ich rozmrożeniu;

FISH (*fluorescent in situ hybridization*) – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*;

GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów;

GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*) – gonadoliberyna;

HCG (*human chorionic gonadotropin*) – ludzka gonadotropina kosmówkowa;

HLA (*human leukocyte antygen*) – ludzki antygen leukocytarny;

ICMART (*International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies*) – Międzynarodowy Komitet Monitoringu Technologii Wspomaganego Rozrodu;

ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) – docytoplazmatyczna iniekcja plemnika;

IFN (*interferon*) – interferon;

IL (*interleukin*) – interleukina;

IL-1RII (*interleukin-1 receptor type II*) – receptor dla interleukiny 1 typu II;

IL-6Rα (*interleukin-6α receptor*) – receptor dla interlekiny 6 α;

ILC (*innate lymphoid cells*) – nieswoiste komórki limfoidalne;

IMSI (*intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*) – docytoplazmatyczna iniekcja wyselekcjonowanego morfologicznie plemnika;

ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) – aktywujący motyw immunoreceptorowy oparty o resztę tyrozyny;

ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) – hamujący motyw immunoreceptorowy oparty o resztę tyrozyny;

IUGR (*intrauterine growth restriction*) – wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu;

IUI (*intrauterine insemination*) – inseminacja wewnątrzmaciczna;

IVF (*in vitro fertilization*) – zapłodnienie pozaustrojowe *in vitro*;

KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*) – immunoglobulinopodobne receptory komórek cytotoksycznych;

LD (*linkage disequilibrium*) – niezrównoważenie sprzężeń;

LIF (*leukaemia inhibitory factor*) – czynnik hamujący białaczkę;

LILR (*leukocyte immunoglobulin like receptor)* – immunoglobulinopodobne receptory leukocytów;

LR (*likelihood ratio*) – iloraz wiarygodności;

LRC (*leukocyte receptor complex*) – kompleks receptorów leukocytarnych;

MHC (*major histocompatibility comlpex*) – główny układ zgodności tkankowej;

MSOME (*motile sperm organelle morphology examination*) – ocena morfologii ruchliwych organelli plemników;

N-CAM (*neural cell adhesion molecule*) – neuronalna cząsteczka adhezyjna;

NCRs (*natural cytotoxity receptors*) – receptory naturalnie cytotoksyczne;

NGS (*next-generation sequencing*) – sekwencjonowanie następnej generacji;

NK (*natural killer*) – komórka naturalnie cytotoksyczna;

NKG2D *(receptor natural killer group 2D)* – receptor komórek NK grupy 2D;

OR (*odds ratio*) – iloraz szans;

PCR (*polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy;

PCR-SSP (*sequence-specific primers*) – PCR z wykorzystaniem specyficznych sekwencji starterów;

PGD (*preimplantation genetic diagnosis*) – diagnostyka preimplantacyjna;

PlGF (*placental growth factor*) – łożyskowy czynnik wzrostu;

QF-PCR (*quantitive fluorescent polymerase chain reaction*) – ilościowa fluorescencyjna reakcja polimerazy;

RIF (*recurrent implantation failure*) – nawracające niepowodzenie implantacji zarodka;

ROC (*receiver operating characteristic*) – krzywa oceny jakości klasyfikatora;

RT-PCR (*Real-Time PCR*) – PCR w czasie rzeczywistym;

SDF (*sperm DNA fragmentation*) – fragmentacja DNA plemników;

SET (*single embryo transfer*) – transfer pojedynczego zarodka;

SIVF (*successful pregnancy after IVF-ET*) – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*;

SNP (*single nucleotide polymorphism*) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu;

TAP (*transporter associated with antigen presentation*) – białko transportowe związane z prezentacją antygenu;

TGF-β (*transforming growth factor-β*) – transformujący czynnik wzrostu β;

Th (*T helper*) – limfocyt T pomocniczy;

TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) – receptor czynnika martwicy nowotworu;

TNF-α (*tumor necrosis factor-α*) – czynnik martwicy nowotworu;

uNK (*uterine natural killer cell*) – maciczna komórka NK;

VEGF (*vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego;

WHO (*World Health Organization*) – Światowa Organizacja Zdrowia.

1. Wstęp

1.1. Definicja niepłodności

Niepłodność definiowana jest jako niemożność zajścia w ciążę po 12 miesiącach regularnego współżycia (2-3 razy w tygodniu) bez stosowania środków antykoncepcyjnych. We wcześniejszej definicji niepłodności określonej przez Światową Organizację Zdrowia (WHO – World Health Organization), czas współżycia bez stosowania antykoncepcji wynosił 2 lata [1, 2]. Jeśli ciąża nie pojawiała się w trakcie tych dwóch lat, para była uznawana za niepłodną. Międzynarodowy Komitet Monitoringu Technologii Wspomaganego Rozrodu (ICMART – International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies) oraz WHO zmienili jednak tę definicję skracając czas do 12 miesięcy [3, 4].

Wyróżnia się niepłodność pierwotną oraz wtórną. Niepłodność pierwotna dotyczy kobiet, które nigdy nie miały stwierdzonej klinicznie ciąży. O niepłodności wtórnej można mówić, kiedy kobieta w przeszłości miała już klinicznie stwierdzoną ciążę, ale z jakiś powodów nie może zajść w kolejną [5].

W czasie pojedynczego cyklu menstruacyjnego prawdopodobieństwo zajścia w ciążę w wyniku współżycia wynosi około 15-20%. W ciągu pierwszych sześciu miesięcy współżycia bez stosowania środków antykoncepcyjnych, 80% par doczeka się potomstwa, w ciągu następnych sześciu miesięcy – jedna na dwie pary z pozostałych 20% [6]. Szacuje się, że problem niepłodności dotyczy 15% par na świecie w wieku prokreacyjnym [7, 8, WHO[1]]. Statystyki pokazują, że rocznie 60-80 milionów par na świecie jest diagnozowanych jako niepłodne. Liczby te stale rosną, ponieważ w 1990 roku liczba par zmagających się z niepłodnością wynosiła 42 miliony, natomiast w 2010 roku wzrosła do 48,5 miliona [4, 9]. Ogólnie szacuje się, że w krajach wysoko rozwiniętych, jedna na cztery pary jest niepłodna. Gorsza sytuacja obserwowana jest w krajach południowej Azji, Afryki Subsaharyjskiej, centralnej i zachodniej Europy, gdzie wskaźnik niepłodności może wynosić nawet 30% [5].

W Polsce, po ostatnim wyżu demograficznym, który miał miejsce w pierwszej połowie lat 80. XX wieku, obserwuje się spadek liczby żywych urodzeń o prawie połowę (GUS, Główny Urząd Statystyczny[2]). W porównaniu do krajów Unii Europejskiej, w Polsce liczba urodzeń

[1] Dostępne na oficjalnej stronie WHO pod adresem: https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab_1 (data wejścia: 16.02.2022 r.)

[2] Małżeństwa oraz dzietność w Polsce, GUS, Warszawa 2016, dostępne w sieci: https://stat.gov.pl/files/gfx/portalinformacyjny/pl/defaultaktualnosci/5468/23/1/1/malzenstwa_i_dzietnosc_w_polsce.pdf (data wejścia 16.02.2022 r.)

jest jedną z najniższych. W 2013 roku krajami o niższej dzietności niż Polska (współczynnik dzietności wynosił 1,29) były tylko Portugalia i Hiszpania (współczynniki dzietności: odpowiednio 1,21 i 1,27). Przeciętny wiek kobiet rodzących pierwsze dziecko stale się podwyższa. W roku 2000 w Polsce wynosił około 24 lata, natomiast w 2020 roku – prawie 29 lat (GUS[3]). W niektórych krajach Europy średni wiek kobiet rodzących pierwsze dziecko to aż 30, 35 lat lub nawet więcej [5]. Powszechnie wiadomo, że jakość oocytów wraz z postępującym wiekiem pogarsza się, częściej mogą wystąpić zaburzenia owulacji (np. jej zmniejszona częstotliwość) czy upośledzona faza lutealna prowadząca do zmniejszenia częstości poczęć. Obecnie kobiety opóźniają swoje macierzyństwo ze względu na chęć zdobycia wykształcenia i osiągnięcia stabilizacji ekonomicznej [5]. Biorąc pod uwagę wpływ wieku na płodność, gdy kobieta ma powyżej 35 lat, powinno się rozpocząć diagnostykę niepłodności już po 6 miesiącach nieudanych prób zajścia w ciążę [10].

Około 1,2 mln par w Polsce zmaga się z problemem niepłodności [11]. Światowa Organizacja Zdrowia uznaje niepłodność za chorobę, a także zalicza ją do chorób społecznych, czyli chorób szeroko rozpowszechnionych, przewlekłych, gdzie konieczna jest długotrwała i regularna opieka lekarska [10, 12]. Warto też wspomnieć, że jest to specyficzna choroba, ponieważ zawsze dotyczy dwojga ludzi, a nie pojedynczej osoby.

1.2. Techniki wspomaganego rozrodu

Terapia niepłodności powinna być ukierunkowana na przyczynę niepłodności i być prowadzona przy użyciu metod, które gwarantują najwyższą szansę na ciążę i poród. Obecnie istnieją trzy główne strategie terapeutyczne: leczenie farmakologiczne, postępowanie operacyjne lub techniki wspomaganego rozrodu (ang. *assisted reproductive technology* – ART). Techniki te oznaczają wszystkie metody, które obejmują postępowanie *in vitro* z ludzkimi gametami lub zarodkami w celu zajścia w ciążę. Do tych technik zalicza się głównie:

- zapłodnienie pozaustrojowe *in vitro* (ang. *in vitro fertilization* – IVF) – metoda polegająca na połączeniu komórki jajowej z plemnikiem poza organizmem kobiety [14],
- mikroiniekcja plemnika do komórki jajowej (ang. *intracytoplasmic sperm injection* – ICSI) – polegająca na wprowadzeniu pojedynczego plemnika bezpośrednio do cytoplazmy oocytu,

[3] Dostępne w sieci pod adresem: https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/ludnosc/ludnosc/struktura-ludnosci,16,1.html, tablica „Dzietność kobiet w latach 1960-2020” (data wejścia: 16.02.2022 r.)

- inseminacja wewnątrzmaciczna (ang. *intrauterine insemination* – IUI) – umieszczenie nasienia mężczyzny w jamie macicy w czasie spodziewanej owulacji u kobiety [14],
- transfer zarodka (ang. *embryo transfer* – ET) – kluczowy etap zapłodnienia metodą IVF. Polega na przeniesieniu zarodka do jamy macicy. Zarodki mogą być przeniesione w cyklu świeżym, czyli w tym samym cyklu miesiączkowym, co pobranie komórek jajowych do procedury IVF. Mogą być też zamrożone, w późniejszym czasie odmrożone i przeniesione do macicy – jest to tak zwany cykl mrożony (ang. *frozen-thawed embryo transfer* – FET) [15],
- IMSI (ang. *intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*) – docytoplazmatyczne podanie wyselekcjonowanego morfologicznie plemnika do komórki jajowej. Morfologiczna selekcja plemnika odbywa się przy użyciu specjalnego mikroskopu optycznego, który pozwala na obserwację plemnika przy powiększeniu nawet do 6000 razy (technika MSOME – ang. *motile sperm organelle morphology examination*) [16].

Techniki wspomaganego rozrodu, a zwłaszcza zapłodnienie *in vitro*, dały bezpłodnym parom dużą nadzieję na posiadanie potomstwa. Od czasu urodzenia się pierwszego dziecka poczętego dzięki metodzie zapłodnienia *in vitro* – Louise Brown w 1978 roku – techniki te stały się integralną częścią współczesnej medycyny. W wyniku ART urodziło się co najmniej 8 milionów niemowląt na świecie. Szacuje się, że rocznie około 1,7% wszystkich niemowląt urodzonych w Stanach Zjednoczonych poczętych jest dzięki ART. Dane Międzynarodowego Komitetu Monitoringu Technologii Wspomaganego Rozrodu wskazują, że w latach 2008-2010 technikę ART zastosowano ponad 4 miliony razy, w znacznej większości stosując metodę zapłodnienia ICSI [17-19].

1.3. Nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym

Pomimo rozwoju w dziedzinie technik wspomaganego rozrodu, odsetek udanych implantacji jest wciąż zaskakująco niski. W 2005 i w 2008 roku wskaźnik udanych procedur *in vitro* wynosił odpowiednio 25 i 28%. W roku 2016 wskaźnik ten wzrósł do 32%, co pokazuje, że postęp w tym obszarze był niewielki [20]. Termin „implantacja" odnosi się do przyczepienia zarodka do błony śluzowej macicy. Udana implantacja występuje, gdy wewnątrzmaciczny pęcherzyk ciążowy jest rozpoznawany podczas badania ultrasonograficznego USG.

Niepowodzenie implantacji może wystąpić już na wczesnych etapach migracji lub przyczepiania się zarodka, co skutkuje negatywnym wynikiem testu ciążowego – nie stwierdza się obecności ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (ang. *human chorionic gonadotropin* – HCG) w surowicy. Niepowodzenie może również wystąpić później, po udanej migracji zarodka przez błonę śluzową macicy, gdy zarodek zaczyna wytwarzać HCG (wykrywalne w moczu lub w krwi), jednak pęcherzyka ciążowego nie widać w obrazie ultrasonograficznym – tzw. ciąża biochemiczna [21, 22].

Nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro* są określane w literaturze anglojęzycznej jako *recurrent implantation failure, w* skrócie RIF. Nie ma jednoznacznej i powszechnie przyjętej definicji tego terminu. Brane są pod uwagę następujące parametry: liczba wszystkich wykonanych transferów zarodka, liczba zarodków przenoszonych do macicy w czasie jednego cyklu, a także liczba zarodków przeniesionych do macicy w czasie wszystkich nieudanych cykli [23, 24].

We wcześniejszych definicjach opisywano RIF jako brak ciąży po przynajmniej dwóch transferach [25] lub trzech [26], podczas których przeniesiono do macicy 2 zarodki [27], 6 [28] lub nawet 12 zarodków [29]. Bardziej szczegółowa definicja opisuje ten termin jako brak ciąży po transferze czterech zarodków dobrej jakości i po przeprowadzeniu trzech transferów zarodka (zarówno w świeżych, jak i mrożonych cyklach) u kobiety w wieku poniżej 40 lat [21].

Według najnowszych doniesień literaturowych, określenie RIF oznacza brak ciąży po przynajmniej trzech nieudanych transferach dobrej jakości zarodków [23, 30]. Jakość zarodków ocenia się biorąc pod uwagę ich cechy morfologiczne oraz tempo podziału. Uważa się, że zarodki dobrej jakości to takie, które mają prawidłową liczbę komórek odpowiadającą właściwej fazie rozwoju [21].

1.4. Etiopatogeneza niepowodzeń implantacji zarodka

Etiopatogeneza nawracających niepowodzeń implantacji zarodka jest niejednoznaczna. Czynnikami, które mogą przyczyniać się do wystąpienia RIF, mogą być zarówno czynniki matczyne, szczególnie te związane z różnymi nieprawidłowościami macicy, ale również zaburzenia hormonalne i metaboliczne. W literaturze opisywane są także czynniki związane z zarodkiem i gametami kobiety i mężczyzny (m.in. jakość komórek jajowych i nasienia). Podaje się, że 35-40% przypadków niepłodności u par spowodowanych jest wyłącznie żeńskim czynnikiem, 20-40% wyłącznie czynnikiem męskim, a w 20-30% przypadków oba rodzaje czynników mają znaczenie [4, 31, 32].

Pomimo szczegółowych badań, 15-50% przypadków niepłodności i nawracających niepowodzeń implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym pozostaje wciąż niewyjaśniona [33, 34].

1.4.1. Czynniki matczyne

- **Wrodzone nieprawidłowości anatomiczne macicy** – mogą mieć wpływ na receptywność endometrium, czyli zdolność błony śluzowej macicy na przyjęcie i zagnieżdżenie zarodka. Tym samym mogą wpływać na niepłodność i nawracające niepowodzenia implantacji. Większość wad macicy powstaje w wyniku nieprawidłowego rozwoju lub fuzji przewodów Mullera w trakcie embriogenezy. Do tych wad zalicza się np. macicę przegrodzoną lub macicę dwurożną. Histeroskopowe usunięcie przegrody macicy może zwiększyć szansę na ciążę po procedurze IVF [22, 23].
- **Nabyte wady macicy**:

  - zrosty wewnątrzmaciczne (inaczej zespół Ashermana) – mogą być spowodowane zabiegami ginekologicznymi takimi jak łyżeczkowanie ścian macicy, operacje chirurgiczne, infekcje;

  - mięśniaki – podśluzówkowe, śródścienne – są łagodnymi guzami mięśni gładkich macicy, mogą objawiać się m.in. poprzez obfite miesiączki, bóle podbrzusza i bóle podczas stosunku płciowego. Mogą mieć wpływ na implantację zarodka w wyniku braku równowagi w profilu cytokin, nadmierną kurczliwość macicy i nieprawidłowe unaczynienie [22, 35];

  - polipy endometrialne – ich wpływ na implantację może być związany ze zmniejszoną receptywnością endometrium. Polipy powinny być usunięte przed procedurą IVF [22, 36].
- **Inne czynniki związane z macicą** – w literaturze podawana jest endometrioza, a także wodniaki jajowodów. Endometrioza dotyka 10-13% kobiet miesiączkujących i polega na występowaniu tkanek endometrium, wrażliwych na estrogeny, poza jamą macicy. Najczęściej zmiany w postaci rozległych zrostów i torbieli zlokalizowane są w otrzewnej miednicy, na jajnikach, przestrzeni odbytniczo-pochwowej, ale mogą występować również poza miednicą w obrębie innych narządów (pęcherz moczowy, jelita, przepona, płuca). Ektopowe endometrium podlega zmianom hormonalnym, co powoduje silny ból oraz może mieć wpływ na funkcje czynnościowe jajników, rozwój

zarodka i implantację [6, 22, 37-39]. Wodniaki jajowodów to schorzenie, w którym dochodzi do gromadzenia się płynu zawierającego zasadowe, zapalne związki, prostaglandyny i cytokiny. Prowadzi to do obrzęku jajowodu, a wyciek do jamy macicy może działać jako bariera mechaniczna między zarodkiem a endometrium [40].

1.4.2. Czynniki związane z zarodkiem

Jakość zarodka ma również wpływ na niepowodzenia implantacji. Zarodek dobrej jakości to zarodek posiadający prawidłową liczbę komórek, odpowiadającą dniu jego rozwoju. Jakość zarodka oceniana jest na podstawie kilku parametrów, do których zalicza się morfologia, stopień rozwoju, genetyka i metabolizm. Parametry te obejmują również tempo, kinetykę i synchronizację podziału zarodka. W wyniku bruzdkowania, czyli pierwszego etapu rozwoju zarodka, dochodzi do mitotycznych podziałów i powstają komórki zwane blastomerami. Ich liczba, symetria, rozmieszczenie i stopień fragmentacji również stanowią istotne parametry w ocenie morfologii zarodka. Dodatkowo określa się także obecność wielojądrowości i obecność wakuol w blastomerach [21, 32]. Wielojądrowość może być związana ze słabszym rozwojem zarodków i niskim wskaźnikiem implantacji [41].

Obecnie większość transferów wykonuje się w trzecim dniu rozwoju zarodka na etapie bruzdkowania lub w piątym dniu w stadium blastocysty. Liczba przenoszonych zarodków pozostaje wciąż tematem dyskusyjnym. Bardziej korzystny dla udanej implantacji wydaje się być transfer pojedynczego zarodka (ang. *single embryo transfer* – SET) niż transfer dwóch zarodków (ang. *double embryo transfer* – DET). Nie zaleca się przenoszenia więcej niż dwóch zarodków jednocześnie, aby zminimalizować ryzyko powikłań zarówno u matek, jak i płodów, takich jak: stan przedrzucawkowy, przedwczesna śmiertelność okołoporodowa, niska masa urodzeniowa i powikłania oddechowe, które częściej występują w ciążach mnogich [22, 42].

1.4.3. Czynniki związane z gametami

- **Jakość komórek jajowych** – wraz z wiekiem kobiety zmniejsza się rezerwa jajnikowa. Jest to związane z jakościowymi zmianami w oocytach wynikającymi m.in. z dysfunkcji mitochondriów oraz skróceniem telomerów [43]. Jeśli komórki jajowe są niskiej jakości, dochodzi często do słabej odpowiedzi na stymulację owulacji podczas procedury IVF, liczba uzyskanych oocytów jest mała lub większy odsetek stanowią oocyty niedojrzałe [21]. Istnieją publikacje mówiące również o tym, że zbyt agresywny

protokół stymulacji jajników może prowadzić do złej jakości oocytów i wyższego wskaźnika niepowodzeń w zapłodnieniu [44, 45].

- **Jakość nasienia** – badania oceniające wpływ fragmentacji DNA plemników (ang. *sperm DNA fragmentation* – SDF) na skuteczność metod zapłodnienia pozaustrojowego ART są sprzeczne. Istnieją takie, które pokazują, że fragmentacja DNA plemników wiąże się ze zmniejszoną płodnością mężczyzny i zmniejszonym prawdopodobieństwem zajścia w ciążę naturalną u partnerek tych mężczyzn [46-48]. Zwiększony poziom SDF obserwowany był również u mężczyzn ze zdiagnozowaną niepłodnością idiopatyczną [49]. Simon i wsp. (2017), a także Zini (2011), w swoich metaanalizach wykazali, że SDF ma związek z niższym wskaźnikiem uzyskanych ciąż po zapłodnieniu pozaustrojowym, natomiast Cissen i wsp. (2016) oraz Collins i wsp. (2008) nie wykazali takiego związku [50-53]. Nie wykazano także związku z fragmentacją DNA plemników i nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka [54, 55].

Szeroka grupa czynników może mieć wpływ na fragmentację. Zarówno czynniki wewnętrzne (czynniki genetyczne, apoptoza, nieprawidłowe dojrzewanie plemników), jak i zewnętrzne (zanieczyszczenie środowiska, palenie tytoniu, choroby oraz infekcje i stany zapalne w obrębie narządów płciowych) przyczyniają się do patologicznego wytwarzania reaktywnych form tlenu, które z kolei są uznawane za główne czynniki sprawcze uszkodzenia chromatyny plemników [43, 56].

Komputerowa analiza nasienia dostarcza informacji o koncentracji plemników, czyli ich liczbie wyrażonej w milionach na 1 mililitr (ml) nasienia, liczbie ruchliwych plemników i morfologii [43]. W ostatnich 50 latach widoczny jest spadek liczby plemników i jakości nasienia u mężczyzn [57, 58]. W latach czterdziestych XX wieku dolna granica prawidłowej liczebności plemników wynosiła 60 mln/ml, w 1980 roku – 20 mln/ml, natomiast w 2010 roku – 15 mln/ml [59]. W 2010 roku WHO opracowało nowe wartości referencyjne, które obowiązują dzisiaj i są pomocne w diagnozowaniu parametrów nasienia:

- liczebność: większa bądź równa 15 milionów plemników na 1 ml lub 39 milionów w całej próbce ejakulatu,
- żywotność plemników: większa bądź równa 58% żywych plemników,
- ruchliwość plemników: większa bądź równa 32% plemników o ruchu postępowym,
- morfologia plemników: większa bądź równa 4% plemników o prawidłowej budowie [60].

Odstępstwa od wartości referencyjnych nasienia są określane przedrostkiem:

- Asteno – obniżona ruchliwość plemników,
- Terato – nieprawidłowa morfologia plemników,
- Zoo – nieprawidłowa liczba plemników,
- Azo – całkowity brak plemników w nasieniu [60].

Nazewnictwo dotyczące jakości nasienia w sposób szczegółowy wyjaśniono w **Tabeli 3** w rozdziale **3.2**.

1.4.4. Czynniki genetyczne

Wśród genetycznych przyczyn niepłodności należy wymienić nieprawidłowości chromosomowe (aberracje) gamet lub rozwijających się zarodków takie jak translokacje, mozaicyzm, inwersje i delecje [23, 61, 62]. Zwiększona częstość wystepowania złożonych aberracji obserwowana była wśród kobiet z RIF [63, 64]. U kobiet przystępujących do procedury IVF/ICSI częściej występowały nieprawidłowości chromosomów niż w ogólnej populacji [65]. Aberracje dzielą się na liczbowe lub strukturalne. Do aberracji liczbowych zaliczamy aneuploidie, które odnoszą się do utraty lub nadmiaru chromosomów. Oocyty lub plemniki posiadające aneuploidie mogą prowadzić do powstania zarodka aneuploidalnego. W zależności od tego, w którym chromosomie występuje aberracja, może mieć to wpływ na implantację zarodka lub stać się przyczyną samoistnych poronień, a także urodzenia dziecka z wadami lub niepełnosprawnością [66, 67].

Zastosowanie diagnostyki preimplantacyjnej (ang. *preimplantation genetic diagnosis* – PGD) u par z niepłodnością pozwala na wczesne wykrycie aberracji chromosomowych gamet lub zarodków. W ten sposób można zminimalizować ryzyko podania pacjentce zarodka aneuploidalnego, a tym samym zmniejszyć ryzyko poronienia po IVF [10, 66, 68]. Diagnostykę preimplantacyjną wykonuje się na zarodkach w stadium blastocysty, wykonując biopsję trofoektodermy (komórek, z których rozwija się łożysko) przed przeniesieniem zarodka do macicy. Stosowane metody PGD to również FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, QF-PCR – ilościowa fluorescencyjna łańcuchowa reakcja polimerazy, mikromacierze oraz NGS – sekwencjonowanie następnej generacji [10].

Skuteczność i rutynowe stosowanie PGD w praktyce klinicznej pozostaje obecnie przedmiotem dyskusji, szczególnie w kontekście występowania mozaicyzmu u zarodków. Mozaicyzm polega na obecności dwóch lub więcej populacji komórek z komplementarnymi chromosomami w tym samym zarodku. Poprzez zastosowanie technik NGS wzrosła

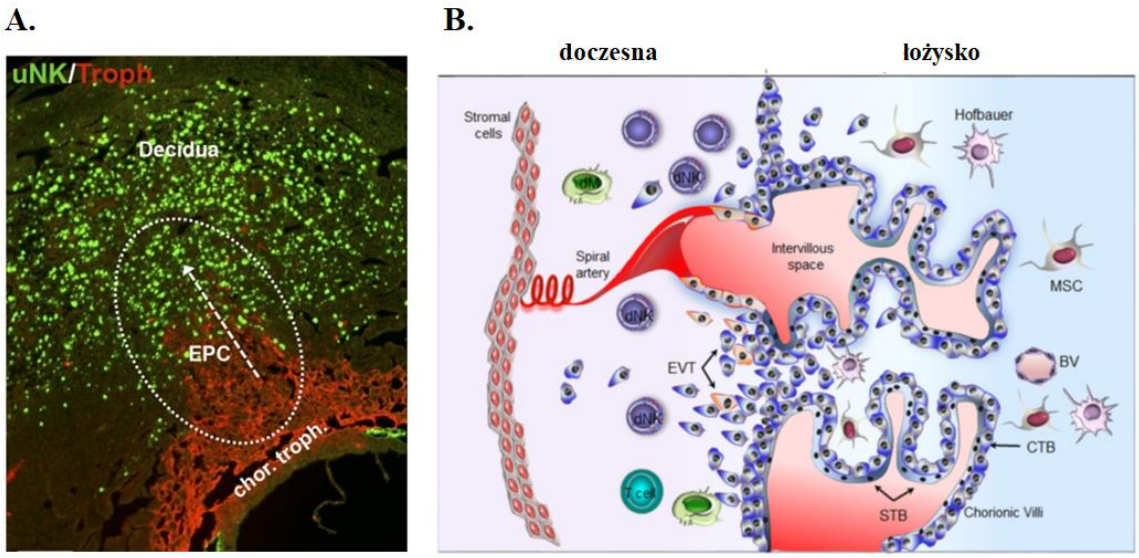
wykrywalność mozaicyzmu w zarodkach. Z reguły nie brano pod uwagę zarodków mozaikowych do transferu, ponieważ uważano je za zarodki nieprawidłowe, a taki transfer wiązał się z ryzykiem poronienia. Jednak ostatnie badania dowiodły, że zarodki mozaikowate mają potencjał implantacyjny i mogą skutkować ciążą i urodzeniem zdrowego dziecka [69-71].

1.5. Proces implantacji zarodka

Prawidłowa implantacja zarodka ma wpływ na rozwój i utrzymanie ciąży. Implantacja jest procesem, w którym zarodek przyczepia się do powierzchni macicy, następnie dochodzi do jego swoistej inwazji poprzez endometrium (błonę śluzową macicy). Implantacja zachodzi wtedy, gdy endometrium jest receptywne, czyli zdolne do tego, żeby zarodek mógł się zagnieździć. Dzieje się to tylko w określonym czasie – u kobiet jest to środkowa faza wydzielnicza, która odpowiada fazie lutealnej cyklu jajnikowego (około 20-24 dnia cyklu). W literaturze określa się ten czas jako okno implantacyjne [72-74]. U kobiet podchodzących do procedury *in vitro* w cyklach stymulowanych, ważne jest więc wykonanie transferu zarodka w czasie optymalnej receptywności endometrium [72].

Blastocysta w momencie implantacji posiada wewnętrzną warstwę komórek, z których rozwija się zarodek, a także zewnętrzną warstwę komórek trofoblastu, które ostatecznie doprowadzą do powstania łożyska. Około 10 dnia po zapłodnieniu, trofoblast zaczyna się różnicować. Komórki zewnętrzne, będące w ścisłym kontakcie z błoną śluzową macicy tworzą nieaktywny mitotycznie, wielojądrowy sycytiotrofoblast. Z kolei wewnętrzna warstwa komórek – cytotrofoblast – namnaża się, tworzy kosmki i zaczyna wnikać w syncytiotrofoblast, aż dotrze do tkanek endometrium (**Rycina 1**). Od tego momentu, trofoblast jest już definiowany jako trofoblast pozakosmkowy (ang. *extravillous trophoblast* – EVT) [75-78]. Komórki trofoblastu pozakosmkowego tracą swoją aktywność proliferacyjną, a nabywają aktywności inwazyjnej w dystalnej części tworzących się kolumn trofoblastu. Część komórek migruje poprzez mięśniówkę macicy – jest to tzw. trofoblast śródmiąższowy. Natomiast te komórki, które migrują do wnętrza tętniczek spiralnych macicy nazywane są trofoblastem wewnątrznaczyniowym [76, 77, 79]. Uważa się, że główną rolą trofoblastu pozakosmkowego jest zapewnienie dobrego ukrwienia łożyska, za które odpowiadają komórki trofoblastu wewnątrznaczyniowego. Komórki te zastępują śródbłonek i przekształcają tętnice spiralne, tak aby miały niski opór i dużą pojemność. Dzięki temu procesowi zwiększa się przepływ krwi pomiędzy matką a łożyskiem, co zapewnia odpowiedni rozwój płodu [79, 80].

W trakcie implantacji, ale także w fazie wydzielniczej cyklu menstruacyjnego zachodzi proces zwany decydualizacją, w którym endometrium przekształca się w tzw. doczesną. Endometrium macicy składa się z dwóch rodzajów komórek: komórek zrębowych i komórek nabłonka. W procesie decydualizacji następuje transformacja komórek zrębowych na wyspecjalizowane komórki doczesnowe, które stanowią wyściółkę niezbędną dla implantującego się zarodka, a także pełnią funkcję odżywczą dla zarodka poprzez gromadzenie glikogenu, lipidów i białek. Dochodzi również do wzrostu i rozwoju gruczołów wydzielniczych, a także różnicowania się komórek układu odpornościowego w macicy. Komórki doczesnowe regulują więc inwazję trofoblastu i zapoczątkowują proces angiogenezy. Czynnikiem wyzwalającym decydualizację jest wzrost poziomu progesteronu oraz lokalna produkcja cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP) [81-83]. Gdy nie dochodzi do zapłodnienia i implantacji, znaczący spadek progesteronu i estradiolu hamuje decydualizację, a endometrium złuszcza się podczas miesiączki.



Rycina 1. Proces implantacji zarodka i komórki na styku matczyno-płodowym. (A) Trofoblast (kolor czerwony) i maciczne komórki NK (kolor zielony) na modelu mysim; zdjęcie z mikroskopu konfokalnego według Madeja i wsp. (2011) [84]. (B) Różnicowanie się trofoblastu na modelu ludzkim według Jebrane-Ferrat (2019) [85].

1.5.1. Komórki układu odpornościowego

W czasie implantacji w doczesnej wzrasta liczba komórek układu odpornościowego, są to głównie komórki NK, makrofagi, komórki dendrytyczne i limfocyty T. Ich rolą jest regulacja proliferacji i różnicowania komórek mezenchymalnych endometrium, co ułatwia transformację

w doczesną. Ponadto, komórki te inicjują powstawanie i przebudowę naczyń krwionośnych w doczesnej oraz odpowiadają za utrzymanie równowagi immunologicznej. Uważa się, że znaczny odsetek nawracających poronień i niepowodzeń implantacji związany jest z czynnikami immunologicznymi [86-88].

Podczas ciąży układ odpornościowy z jednej strony ma chronić matkę i jej przyszłe dziecko przed patogenami, a z drugiej, zezwolić na tolerancję płodu, który jest semiallogeniczny – ekspresjonuje antygeny, z których połowa pochodzi od ojca. Podczas inwazji trofoblastu oraz przy porodzie, w doczesnej dominują czynniki prozapalne, podczas gdy w drugim i trzecim trymestrze ciąży, aby ułatwić wzrost płodu – czynniki przeciwzapalne [89-90]. Szczegółowa charakterystyka wydzielanych w doczesnej cytokin i czynników wzrostowych została opisana w rozdziale **1.12.**

1.6. Charakterystyka komórek NK

Komórki NK (ang. *natural killer cells* – komórki naturalnie cytotoksyczne) to limfocyty powstające w szpiku kostnym i pochodzące od tej samej komórki progenitorowej co limfocyty B i T (CLP – *common lymphoid progenitor cell*). Należą one do grupy I nieswoistych komórek limfoidalnych (ang. *innate lymphoid cells* – ILC), przez wzgląd na swoją produkcję m.in. interferonu ɣ (IFN-ɣ) oraz TNF-α (ang. *tumor necrosis factor* – czynnik martwicy nowotworów). W odróżnieniu od komórek ILC, komórki NK mają silne działanie cytotoksyczne, w czym przypominają limfocyty T cytotoksyczne. Zostały opisane po raz pierwszy jako duże ziarniste limfocyty, które miały zdolność zabijania komórek nowotworowych bez wcześniejszej immunizacji lub aktywacji [91-93]. Komórki NK pełnią również ważną rolę w ochronie przed infekcjami wirusowymi poprzez wydzielanie granzymów i perforyn. Ponadto mają również funkcje immunoregulacyjne – wydzielają czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF), interleukiny (IL-5, IL-10, IL-13) oraz chemokiny CCL3, CCL4, CCL5 (RANTES), CXCL8 (IL-8), przyczyniając się w ten sposób do kształtowania wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej [94-95].

Komórki NK stanowią 10% wszystkich krążących we krwi limfocytów. Podzielone są na różne podtypy w oparciu o ekspresję markerów powierzchniowych. Większość z nich ekspresjonuje CD56 – cząsteczkę adhezyjną N-CAM (ang. *neural cell adhesion molecule*). Na podstawie intensywności ekspresji tego markera, można wyróżnić dwie subpopulacje komórek NK: $CD56^{bright}$ oraz $CD56^{dim}$. We krwi obwodowej zdecydowana większość (90%) to populacja $CD56^{dim}CD16^{+}$, która jest wysoce cytotoksyczna, charakteryzuje się niską ekspresją CD56, ale

wysoką CD16 (lub inaczej – receptora FCγRIII). Receptor ten wiąże fragmenty Fc immunoglobulin G (IgG) i pośredniczy w cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ang. *antibody-dependent cellular cytotoxicity* – ADCC) [94, 96-98]. Komórki $CD56^{bright}$ $CD16^{-}$ są często opisywane jako komórki immunoregulatorowe i mniej cytotoksyczne niż $CD56^{dim}$. Ponadto różnice fenotypowe pomiędzy subpopulacjami pod względem repertuaru receptorów aktywujących i hamujących, receptorów dla cytokin lub chemokin i cząsteczek adhezyjnych powodują różnice funkcjonalne i migracyjne [99].

Populacja $CD56^{bright}$ $CD16^{-}$ charakteryzuje się:

- wydzielaniem prozapalnych cytokin IFN-ɣ, TNF-α i czynników wzrostowych takich jak GM-CSF [100, 101],
- wysoką ekspresją heterotrimerycznego receptora IL-2Rαβγ (receptor dla interleukiny 2),
- ekspresją receptora dla chemokin CC typu 7 (CCR7),
- wysoką ekspresją L-selektyny (CD62L) – cząsteczki adhezyjnej, która pośredniczy w początkowych interakcjach z śródbłonkiem naczyniowym.

Cechy populacji $CD56^{dim}CD16^{+}$ to m.in.:

- wysoka cytotoksyczność oraz zdolność wytwarzania cytokin po odpowiedniej stymulacji *in vitro* [102],
- wydzielanie heterodimerycznego receptora dla interleukiny 2 (IL-2Rβγ),
- brak ekspresji CCR7 i wydzielanie na wysokim poziomie receptorów chemokin typu CXC: CXCR1 i CX_3CR1,
- brak L-selektyny [101, 103-104].

1.6.1. Maciczne komórki NK

Dominującą populacją limfocytów (50–70%) w czasie ciąży w macicy są komórki NK [75]. W przeciwieństwie do komórek NK znajdujących się we krwi obwodowej, które skutecznie zabijają komórki docelowe, maciczne komórki (ang. *uterine natural killer* – uNK) zwykle nie wykazują cytotoksyczności wobec płodu czy łożyska. Istnieją badania, które podkreślają rolę tych komórek w przebudowie tętniczek spiralnych, kontrolowaniu angiogenezy, czyli procesu powstawania nowych naczyń włosowatych, oraz odpowiedzi immunologicznej na antygeny płodu [105-107]. Reakcja immunologiczna matki wobec semiallogenicznego płodu oraz stan zapalny w ciąży mogą prowadzić do tego, że komórki NK uzyskają właściwości cytotoksyczne, a to może skutkować śmiercią płodu lub dysfuknc ją

łożyska [108]. W związku z tym niewłaściwa aktywacja uNK – zbyt duża lub niewystarczająca – może prowadzić do zaburzeń ciąży, takich jak nawracające poronienia, przedwczesne porody, czy stan przedrzucawkowy.

Maciczne komórki NK są obecne w endometrium w ciągu całego cyklu miesiączkowego. W fazie proliferacyjnej, związanej ze wzrostem komórek jajowych w jajniku, oraz we wczesnej fazie wydzielniczej, ich liczba jest niewielka. W połowie fazy lutealnej ich liczba gwałtownie wzrasta, osiąga maksymalny poziom pod koniec fazy wydzielniczej i utrzymuje go również we wczesnej ciąży. W czasie pierwszego trymestru, doczesnowe komórki NK (ang. *decidual NK cells* – dNK) stanowią 70% wszystkich leukocytów. Gromadzą się w doczesnej, szczególnie w miejscu implantacji, w bliskim sąsiedztwie naciekającego trofoblastu i są również widoczne wokół tętniczek spiralnych oraz w błonie podstawnej gruczołów endometrialnych. Po około 20 tygodniu ciąży ich liczba zaczyna spadać [109-112].

Pochodzenie komórek NK w macicy pozostaje niejasne. Badania sugerują, że doczesnowe komórki NK pochodzą z lokalnych samoodnawiających się komórek progenitorowych $CD34^+$. Hematopoetyczne prekursory komórek $CD34^+$ obecne w doczesnej mogą różnicować się w prekursory podobne do dNK, w obecności doczesnowych komórek zrębowych i interleukiny 15 (IL-15) [113]. Komórki dNK mogą również powstawać i dojrzewać z prekursorów komórek NK, a dokładniej $CD34^-CD17^+CD94^-$ występujących w błonie śluzowej macicy. Istnieje również pogląd, że doczesnowe komórki NK mogą pochodzić od rekrutowanych komórek NK znajdujących się we krwi obwodowej. Rekrutacja i konwersja zachodzi w obecności transformującego czynnika wzrostu beta (ang. *transforming growth factor-β* – TGF-β) i IL-15. Procesy te są promowane przez chemokiny takie jak CXCL10, CXCL12, CCL2, CXCL8 i CX3CL1, wydzielane pod wpływem estrogenów i progesteronu przez doczesnowe komórki zrębu i śródbłonka [85, 113-115].

Maciczne komórki NK są fenotypowo i fukcjonalnie odmienne od tych występujących we krwi obwodowej. Główną subpopulację stanowią komórki $CD56^{bright}$ $CD16^-$. Pomimo że wydzielają cytotoksyczne granzymy i perforyny, nie są aktywne cytolitycznie wobec trofoblastu. Różnią się od obwodowych komórek NK, ponieważ mają od nich inny repertuar receptorów na swojej powierzchni oraz są regulowane przez inne czynniki transkrypcyjne. We wczesnej ciąży maciczne komórki NK wydzielają szereg cytokin i czynników wzrostowych, w tym TNF-α, IFN-ɣ, IL-10, GM-CSF, IL-1-β, TGF-β1, czynnik hamujący białaczkę (ang. *leukaemia inhibitory factor* – LIF). Komórki NK w macicy są również istotnym źródłem angiogennych czynników wzrostu we wczesnym stadium ciąży. Wydzielają angiopoetyny (Ang): Ang1 i Ang2, czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *vascular endothelial*

growth factor) VEGF-A i VEGF-C, łożyskowy czynnik wzrostu (ang. *placental growth factor* – PlGF). Wraz z rozwojem ciąży sekrecja angiogennych czynników wzrostu wydaje się zmniejszać, w przeciwieństwie do zwiększającej się sekrecji cytokin. W 8-10 tygodniu ciąży w macicy więcej jest czynników angiogennych, natomiast w 12-14 tygodniu zaczynają przeważać cytokiny. Może to być związane ze zmianami w fenotypie komórek NK [116-117].

Zdolność do wydzielania cytokin i czynników wzrostu wskazuje na to, że doczesnowe komórki NK pełnią ważne funkcje we wzroście i różnicowaniu trofoblastu oraz regulują tzw. remodeling naczyń, czyli przebudowę tętniczek spiralnych, która jest kluczowa w rozwoju zdrowej ciąży. Biorąc pod uwagę lokalizację doczesnowych komórek NK i to, że mają bezpośredni kontakt z implantującym się trofoblastem poprzez odpowiednie receptory, uważa się, że pełnią główną rolę w kontroli inwazji tego trofoblastu [111-112, 118-120].

1.7. Limfocyty T CD8+

Limfocyty T stanowią około 5-20% leukocytów w czasie wczesnej ciąży w doczesnej, a ich liczba wzrasta wraz ze wzrostem i rozwojem ciąży [115, 121-122]. Większość z nich to populacja CD3+ ekspresjonująca receptory αβ. Wśród nich około 45-75% to limfocyty T CD8+, natomiast 30-45% stanowią limfocyty T CD4+ [115-116, 122-123]. Niższy odsetek w doczesnej wykazują limfocyty T γδ. Limfocyty CD8+, podobnie do doczesnowych komórek NK, pełnią również istotną cytolityczną funkcję na styku matczyno-płodowym. Populacja komórek CD8+ wzrasta w drugiej połowie ciąży [124-125]. Doczesnowe limfocyty CD8+ mogą także rozpoznawać antygeny znajdujące się na trofoblaście – są to antygeny leukocytów HLA-C (ang. *human leukocyte antygen C*) [125-126]. Charakterystyczne dla nich jest to, że posiadają pamięć efektorową. Komórki CD8+ pamięci są w większości generowane z komórek efektorowych po kontakcie z antygenem w czasie odpowiedzi immunologicznej. Ma to na celu wywołanie szybszej i bardziej skoncentrowanej odpowiedzi immunologicznej po ponownym kontakcie z antygenem. Jednak w przeciwieństwie do komórek CD8+ znajdujących się na obwodzie, doczesnowe limfocyty CD8+ mają zmniejszoną ekspresję perforyny i granzymu B. Pomimo tego w ciąży zachowują funkcje ochronne przeciwko różnym patogenom zewnątrzkomórkowym lub wewnątrzkomórkowym poprzez ich lokalną aktywację i wydzielanie granulizyny. Wydaje się, że aktywność cytolityczna doczesnowych CD8+ może być regulowana przez blokadę translacji mRNA białek cytolitycznych, co prawdopodobnie zapobiega szkodliwej odpowiedzi immunologicznej matki względem semiallogenicznych komórek łożyska [125, 127].

1.8. Receptory komórek NK

Cytotoksyczność i produkcję cytokin reguluje szereg receptorów na powierzchni komórek NK. Receptory te mogą być aktywujące bądź hamujące, co w rezultacie ma wpływ na funkcjonowanie tych komórek, a także rozróżnianie zdrowych, własnych komórek od tych zmienionych. W warunkach homeostatycznych dzięki receptorom hamującym komórki NK nie zabijają komórek prawidłowych. Obecność receptorów aktywujących skutkuje natomiast wyzwalaniem odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom, które są zakażone wirusem, zmienione nowotworowo lub allogenicznie obce [92].

Ligandami dla receptorów komórek NK są cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej MHC klasy I (ang. *major histocompatibility comlpex*) zarówno klasyczne, jak i nieklasyczne (u ludzi są to antygeny leukocytów HLA – ang. *human leukocyte antigen*). Receptory hamujące rozpoznają cząsteczki MHC-I obecne na komórkach prawidłowych. Zgodnie z hipotezą „*missing self*", w sytuacji kiedy komórki docelowe nie posiadają własnych cząsteczek MHC lub mają obniżony ich poziom brak jest sygnału hamującego. Komórki NK angażują wówczas jedynie receptory aktywujące, co prowadzi do wydzielania cytokin prozapalnych i lizy komórki docelowej. Ponieważ każda komórka NK posiada swój własny repertuar receptorów hamujących i aktywujących, ostateczny efekt cytotoksyczny jest zależny od wypadkowej sygnałów aktywujących i hamujących płynących po związaniu z odpowiednimi ligandami [98, 100, 128-129].

Do najważniejszych receptorów należą:

- naturalnie cytotoksyczne receptory (ang. *natural cytotoxity receptors* – NCRs), m.in. NKp30, NKp46, NKp44;
- receptory immunoglobulinopodone: receptory KIR (ang. *killer immunoglobulin-like receptors*) oraz LILR (ang. *leukocyte immunoglobulin-like receptor*);
- receptory lektynopodobne, np. heterodimeryczny NKG2/CD94 [92, 103, 130].

1.8.1. Receptory KIR

Receptory immunoglobulinopodobne KIR występują na powierzchni komórek NK, ale także limfocytów T: γδ, αβ, CD8, CD4 [131-132]. Nazewnictwo receptorów KIR tworzone jest na podstawie ich struktury:

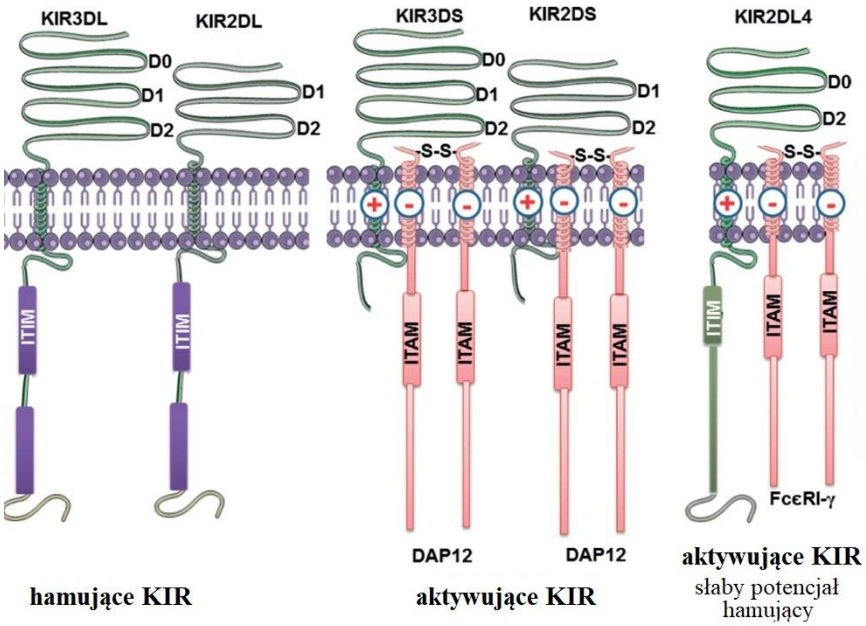
- liczby domen zewnątrzkomórkowych: 2D – oznacza dwie domeny (D1 i D2), 3D – trzy domeny (D0, D1, D2),

- długości ogona cytoplazmatycznego: L – długi ogon cytoplazmatyczny (od ang. *long*), S – krótki (ang. *short*).

Ostatnia cyfra w nazwie każdego z receptorów, wskazuje na numer genu kodującego białko w tej strukturze. W ten sposób KIR2DL1, KIR2DL2 i KIR2DL3 oznaczają receptory mające dwie zewnątrzkomórkowe domeny immunoglobulinopodobne i długie ogony cytoplazmatyczne, natomiast np. KIR3DS to receptor posiadający trzy domeny zewnątrzkomórkowe i krótki ogon cytoplazmatyczny [133-136].

Ze względu na budowę części cytoplazmatycznej receptory KIR mogą być aktywujące lub hamujące (**Rycina 2**). Receptory hamujące posiadają długi ogon cytoplazmatyczny (L) i jeden lub dwa motywy hamujące ITIM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*). Receptory aktywujące mają krótkie ogony cytoplazmatyczne (S), które nie zawierają motywu ITIM. Zamiast tego w regionie transbłonowym mają dodatnio naładowaną resztą aminokwasową (lizynę), która umożliwia wiązanie się z białkiem pomocniczym DAP12 lub FcεRI–γ, połączonym z motywem aktywującym ITAM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Ich interakcja prowadzi do przekazania sygnału aktywującego komórkę NK [134, 137-141].

Nietypowym receptorem pod względem struktury, ekspresji, lokalizacji i funkcji jest KIR2DL4 (**Rycina 2**). W odróżnieniu od pozostałych dwudomenowych KIR, zamiast domeny D1 posiada domenę D0. Pomimo że ma długi ogon cytoplazmatyczny charakterystyczny dla KIR hamujących, zawiera tylko jeden motyw ITIM i wykazuje słabe działanie hamujące. Charakterystyczne dla tego receptora jest to, że w regionie transbłonowym, posiada dodatnio naładowaną argininę, która wiążąc się z łańcuchem γ receptora FcεRI tworzy kompleks zdolny do wysyłania sygnału aktywującego [142-143], czyli KIR2DL4 może mieć zarówno funkcje aktywujące, jak i hamujące komórki NK [144]. Pobudzenie i aktywacja komórki NK przez KIR2DL4 indukuje słabą cytotoksyczność i wydzielanie TNF-α, IFN-γ i interleukin (IL-6, IL-8, IL-1α, IL-1β) niezależnie od motywu ITIM [143, 145].

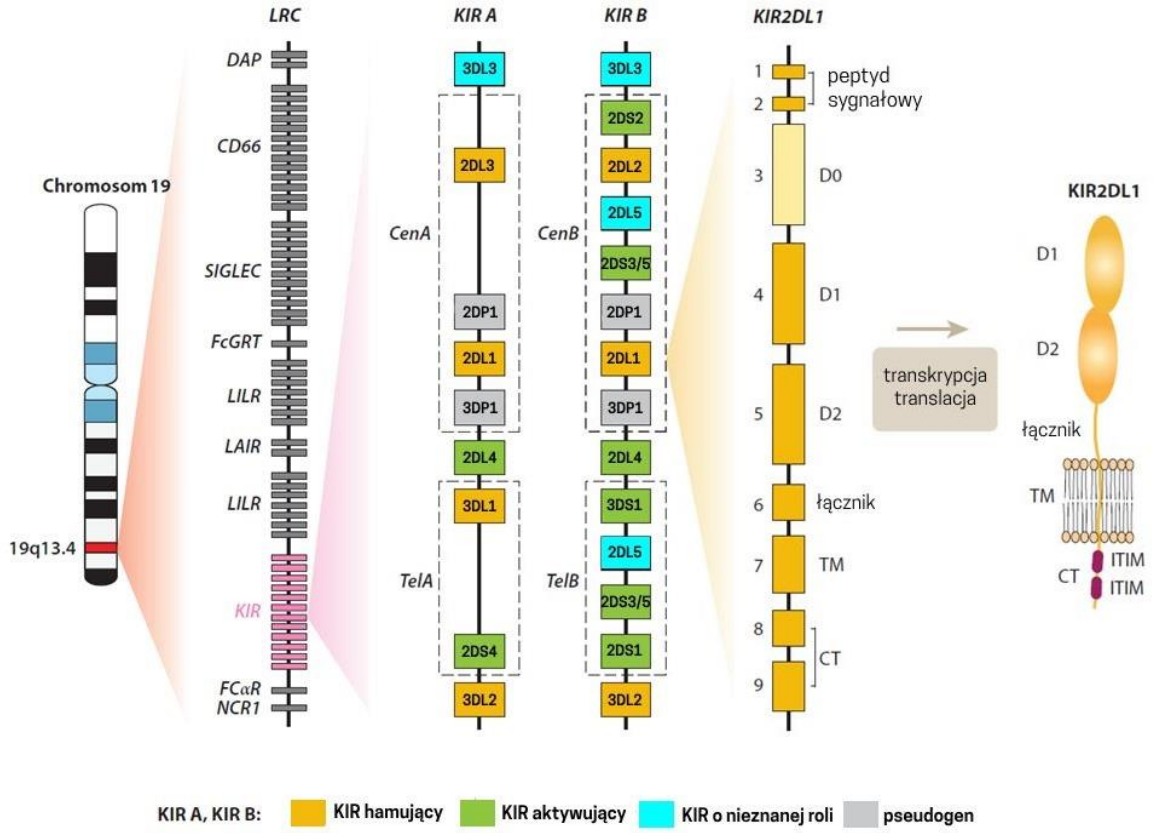


Rycina 2. Struktura receptorów KIR według Aribi (2017) z własnymi modyfikacjami [146].

Receptory KIR wykazują tzw. klonalną ekspresję na dojrzałych komórkach NK. Każda komórka NK posiada określony zestaw KIR, który jest zmienny pod względem liczby i kombinacji receptorów. Pojedyncze klony komórek NK ekspresjonują tylko część genów z całego profilu genów *KIR*, tworząc losowe kombinacje. Ta stochastyczna ekspresja skutkuje powstaniem repertuaru klonów komórek NK, o różnej specyficzności wobec ligandów, co przypuszczalnie ma kluczowe znaczenie dla wykrywania zmniejszonej ekspresji HLA klasy I na komórkach docelowych. Zainicjowany podczas rozwoju komórek NK repertuar KIR utrzymywany jest na powstałych komórkach potomnych oraz przez cały okres życia komórki NK [133, 138]. U ludzi komórki NK wśród swoich receptorów powinny posiadać przynajmniej jeden receptor hamujący KIR lub CD94/NKG2A w celu zapewnienia zabezpieczenia zdrowych komórek przed atakiem komórek NK. Wobec tego pomimo stochastycznego charakteru ekspresji KIR, muszą istnieć pewne powiązania pomiędzy repertuarem HLA i ekspresją KIR [133, 147-148]. Obecność odpowiedniego ligandu HLA klasy I może mieć wpływ na wzrost liczby komórek NK ekspresjonujących specyficzne hamujące KIR [133, 149]. Uważa się również, że mechanizmy epigenetyczne, m.in. metylacja DNA, regulują ekspresję klonalną genów *KIR*, która obejmuje wiele regionów promotorowych w sekwencjach międzygenowych [147, 150]. Proksymalny promotor znajduje się bezpośrednio przed pierwszym eksonem i działa jako przełącznik. Jego transkrypcja jest dwukierunkowa i generuje transkrypty zarówno od końca 3’ do 5’ i odwrotnie, które są skorelowane odpowiednio z aktywacją i hamowaniem transkrypcji genów *KIR* [151-152].

1.8.2. Geny *KIR*

Geny kodujące receptory KIR znajdują się na chromosomie 19 w regionie q13.4 w obrębie kompleksu receptorów leukocytarnych (ang. *leukocyte receptor complex* – LRC) (**Rycina 3**). Kompleks ten koduje również rodzinę receptorów leukocytarnych LILR (ang. *leukocyte immunoglobulin-like receptor*), nazywanych również ILT (ang. *immunoglobulin-like transcript*). Poza nimi kompleks LRC koduje również receptory LAIR (ang. *leukocyte-associated inhibitory receptor*) i receptory Fcα [153-156]. Haplotypy *KIR* mają wielkość 150-350 kilo par zasad (kpz). Geny *KIR* mają długość od 4 do 16 kpz, a pomiędzy genami znajdują się odstępy o wielkości około 1000 par zasad [153-154, 157].



Rycina 3. Organizacja chromosomu 19 przedstawiająca położenie genów *KIR*, ich haplotypy A i B, strukturę genu *KIR2DL1* oraz strukturę receptora KIR2DL1 według Djaoud i Parham (2020) [158].

Każdy gen posiada maksymalnie 9 eksonów. Pierwsze dwa kodują peptyd sygnałowy, kolejne eksony (3, 4 i 5) kodują zewnątrzkomórkowe domeny immunoglobulinopodobne (odpowiednio D0, D1 i D2). Tak zwany łącznik kodowany jest przez ekson 6, region

transbłonowy kodowany jest przez ekson 7, a region cytoplazmatyczny kodują ostatnie eksony (przykładowy rozkład eksonów genu *KIR2DL1* pokazany jest na **Rycinie 3**) [135, 154].

Zidentyfikowano 17 genów *KIR*: 6 aktywujących (*KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DS1*), 8 hamujących (*KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3*), 2 pseudogeny (*KIR2DP1* i *KIR3DP1*) i *KIR2DL4*, który ma potencjał zarówno aktywujący jak i hamujący [154, 159].

Ze względu na strukturę, geny *KIR* podzielone są na dwa typy. Do typu I należą geny *KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3* oraz wszystkie geny *KIR2DS*. W przypadku struktury tych genów ekson 3, kodujący domenę D0, jest pseudoeksonem wycinanym z ramki odczytu [160]. Dlatego geny *KIR* typu I nie kodują domeny D0. Geny typu II nie mają eksonu 4, co skutkuje brakiem domeny D1 w receptorze. Do tego typu zalicza się geny *KIR2DL4* i *KIR2DL5* [135].

1.8.3. Polimorfizm haplotypowy i alleliczny

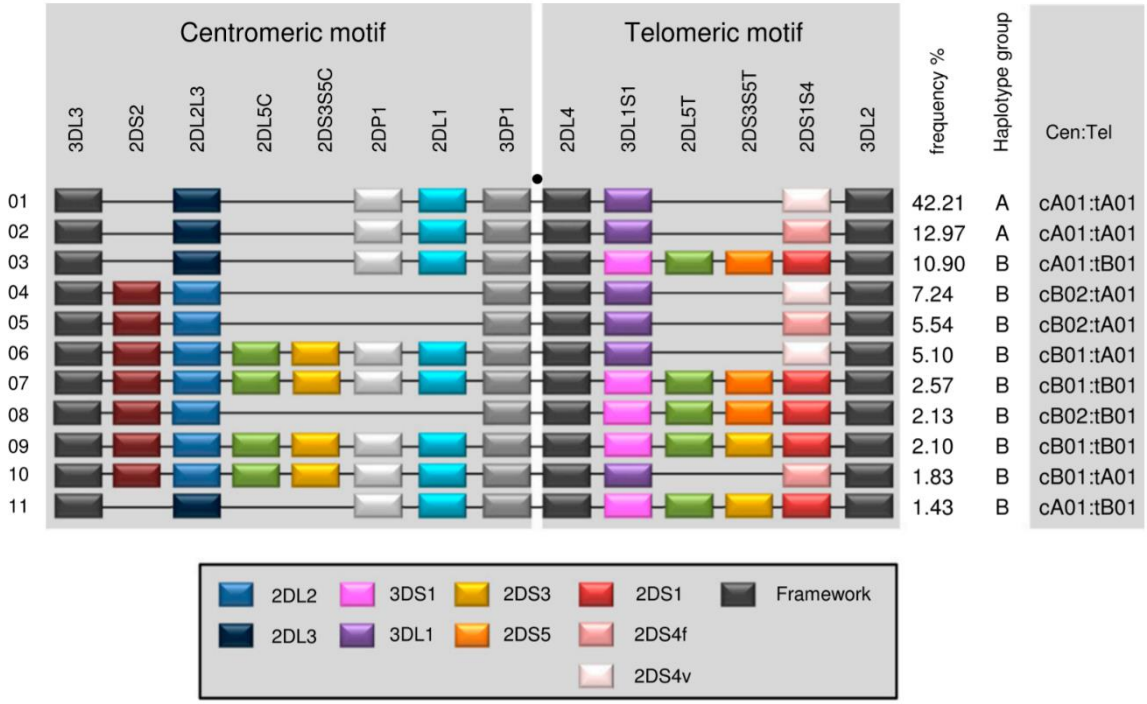
Allele dwóch dowolnych genów *KIR* cechuje bardzo wysokie podobieństwo w sekwencji (85-98%) [133, 161]. Haplotypy *KIR* dzieli się na haplotyp A i B, które różnią się pomiędzy sobą liczbą genów *KIR* oraz ich rodzajem (aktywujące/hamujące). Wyjątek stanowią tzw. „*framework genes*": *KIR3DL3, KIR3DP1, KIR2DL4* i *KIR3DL2*, które występują niemalże u wszystkich osób. Haplotypy A mają stałą zawartość genów i są to geny kodujące wyłącznie receptory hamujące oraz tylko jeden gen kodujący receptor aktywujący KIR2DS4 [136, 157-158]. Jednak gen *KIR2DS4* u 80% Europejczyków występuje w formie delecyjnej (delecja 22 par zasad w eksonie 5). W związku z tym brak jest ekspresji tego receptora na powierzchni komórki, dlatego też wiele osób z haplotypem A nie posiada żadnego aktywującego receptora KIR [138, 162-163].

Haplotypy B, w porównaniu do haplotypów A, są dużo bardziej zróżnicowane pod względem całkowitej liczby genów oraz liczby aktywujących genów *KIR* (posiadają ich więcej niż haplotypy A). Charakterystyczne w haplotypach B jest występowanie przynajmniej jednego z następujących genów: *KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS3, KIR2DS5* i *KIR3DS1* [136, 138, 158].

Haplotypy *KIR* posiadają dwa regiony: centromerowy (Cen) i telomerowy (Tel) (**Rycina 4**). Podział ten jest wynikiem rekombinacji w tzw. punkcie rekombinacji, zlokalizowanym centralnie w obrębie klastra genów *KIR*. Początek i koniec regionów wyznaczają geny „*framework*": *KIR3DL3* i *KIR3DP1* definiują region centromerowy, a *KIR2DL4 i KIR3DL2*

region telomerowy [136, 157]. W skład haplotypu A wchodzą regiony Cen A i Tel A, natomiast haplotypy B obejmują różne kombinacje: Cen A/Tel B, Cen B/Tel A lub Cen B/Tel B [136].

Niektóre geny *KIR* wydają się być silnie powiązane ze sobą w obrębie haplotypu. *KIR2DL5* i *2DS3* lub *2DS5* w haplotypie B są dziedziczone razem, jak allotypy tego samego genu. Geny te wspólnie uległy duplikacji i zróżnicowaniu w czasie ewolucji i widoczne są w regionie centromerowym, telomerowym lub obu regionach równocześnie [164-165]. Podobnie *KIR3DL1* i *3DS1* w regionie telomerycznym oraz *KIR2DL3* i *2DL2* w regionie centromerycznym zachowują się jak allele tego samego locus. W związku z tym regiony te charakteryzują się obecnością jednego z dwóch genów z tych par, ale prawie nigdy nie występują one razem [164, 166]. Zmienność w haplotypie B tworzona jest więc głównie przez obecność lub brak genów, a mniej przez zmienność alleli. Inaczej jest w haplotypie A, w którym większe znaczenie ma zmienność alleli [163].



Rycina 4. Haplotypy genów *KIR* z podziałem na region centromeryczny i telomeryczny. 2DS4f oznacza wariant z pełną długością, a 2DS4v oznacza wariant występujący w formie delecyjnej według Jiang i wsp. (2012) [169].

Rozkład haplotypów A i B różni się pomiędzy grupami etnicznymi. Wśród Europejczyków rozkład haplotypów jest mniej więcej równy. W Polsce większość ludzi posiada haplotyp B (69,9%), natomiast haplotyp A posiada 29,7% Polaków (http://www.allelefrequencies.net/). W populacjach japońskiej i koreańskiej dominuje

haplotyp A. Wśród australijskich Aborygenów, ale także wśród Amerykanów, częściej występuje haplotyp B [133-134, 138, 167-168].

Polimorfizm alleliczny ma wpływ na ekspresję receptorów KIR i ich funkcji. Obecność niektórych reszt aminokwasowych skutkuje nieprawidłowym fałdowaniem i brakiem ekspresji receptorów na powierzchni. Allele typu *null* posiadają przedwczesny kodon terminacyjny, a substytucje, delecje, insercje zmieniają ramkę odczytu syntezy białek [133, 136, 170]. Dodatkowo zmienność sekwencji aminokwasowych może mieć wpływ na powinowactwo KIR do ligandu HLA, np. ekspresja KIR3DL1 i zdolność do rozpoznawania ligandu HLA-Bw4 różni się w zależności od allelu [138-139]. Różnorodność alleli KIR i ich ligandów HLA klasy I wpływa na funkcje komórek NK, ponieważ allele KIR mają zmienną reaktywność na allotypy HLA klasy I [139, 147].

Według bazy Immuno Polymporphism Database do tej pory zidentyfikowano 1535 alleli *KIR*. Najmniej alleli posiada gen *KIR2DS1* (33), najwięcej *KIR3DL3* (228) (https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html).

1.9. Ekspresja HLA na komórkach trofoblastu

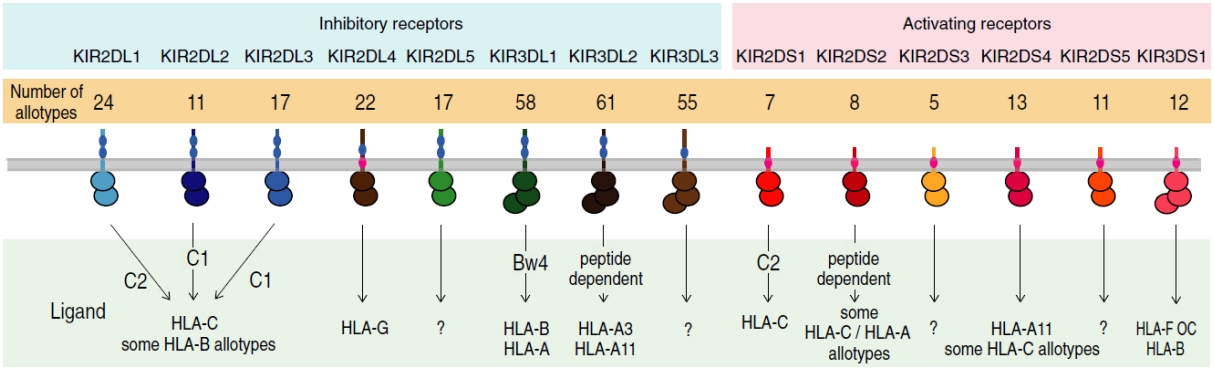
Trofoblast pozakosmkowy posiada unikalny profil HLA, ponieważ nie ekspresjonuje cząsteczek HLA-A oraz HLA-B i cząsteczek HLA klasy II na swojej powierzchni. Na trofoblaście występują allotypy HLA-C jako jedyne polimorficzne cząsteczki HLA klasy I, a także nieklasyczne cząsteczki HLA-G i HLA-E. HLA-E wiąże się z receptorem CD94 (NKG2A) i jego aktywującym odpowiednikiem CD159c (NKG2C). HLA-G poza KIR2DL4, może wiązać się z receptorami z rodziny LILR [171-172]. Ishitani i wsp. wykazali, że w czasie inwazji trofoblastu w głąb doczesnej na trofoblaście może występować również HLA-F [173]. Jednak inne badanie pokazało, że HLA-F ulegało ekspresji na trofoblaście pozakosmkowym dopiero po pierwszym trymestrze ciąży [174]. Z kolei w opublikowanym przez Hackmon i wsp. badaniu wykazano, że HLA-F ulegał ekspresji w pierwszym i drugim trymestrze ciąży, ale nie w trzecim [175]. Antygeny HLA znajdujące się na trofoblaście odgrywają kluczową rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej na styku matczyno-płodowym. Pomimo że antygeny te dziedziczone są w połowie od ojca, a taka ekspresja stanowi cel dla matczynych komórek NK i limfocytów T, płód nie jest odrzucany [172, 176].

1.10. Ligandy receptorów KIR

Receptory KIR rozpoznają ligandy HLA klasy I: HLA-A, -B, -C, a także -G [158, 177]. Cząsteczki HLA klasy I są heterodimerami składającymi się z dwóch polipeptydowych łańcuchów: łańcucha ciężkiego i łańcucha lekkiego, czyli beta2-mikroglobuliny (β2m). Łańcuch ciężki zawiera trzy domeny zewnątrzkomórkowe: α1, α2 i α3. Domeny α1 i α2 są wysoce polimorficzne i znajdują się wokół rowka wiążącego peptyd. Domena α3 nie jest polimorficzna i wchodzi w interakcję z domeną β2m wspomagając przy tym miejsce wiązania antygenu [134, 158, 178-179].

Geny *HLA* są zlokalizowane na krótkim ramieniu chromosomu 6 (6p21.31). Allele HLA-C podzielone są na dwie grupy: HLA-C C1 i HLA-C C2, w zależności od tego, czy w pozycji 80 domeny α1 znajduje się asparagina (HLA-C C1) czy lizyna (HLA-C C2). Do grupy HLA-C C1 należą: HLA-Cw1, Cw3, Cw7, Cw8, Cw12, Cw14 oraz Cw16. Grupa alleli HLA-C C2 zawiera: HLA-Cw2, Cw4, Cw5, Cw6, Cw15, Cw17 i Cw18 [153]. Allele HLA-B różnią się obecnością epitopów serologicznych Bw4 i Bw6, jednak tylko te z motywem Bw4 stanowią ligandy dla receptorów KIR [170-171, 180].

Na **Rycinie 5** przedstawiono aktywujące i hamujące receptory KIR i ich ligandy. Hamujące receptory dwudomenowe KIR wiążą się z HLA-C. Allele HLA-C C1 rozpoznawane są przez hamujące KIR2DL2, 2DL3, których domeny zewnątrzkomórkowe są homologicznie podobne i wiążą podobny zestaw ligandów HLA-C. Te dwa typy receptorów wiążą także HLA-C C2, jednak wiązanie to jest słabsze. Z kolei KIR2DL1 wiąże się z dużą specyficznością i powinowactwem tylko do HLA-C C2 (najwyższe powinowactwo w przypadku HLA-C*15:02, a najniższe z HLA-C*04:01) [181]. KIR2DL3 jest receptorem o większej selektywności peptydowej niż KIR2DL1, dlatego wiązanie KIR2DL3 z HLA-C1 jest słabsze niż wiązanie KIR2DL1 z HLA-C2 [177]. Receptory KIR2DL2 i 2DL3 rozpoznają również allotypy HLA-B (HLA-B*46:01 i HLA-B*73:01). KIR3DL1 wiąże się z HLA-B, a także niektórymi HLA-A zawierającymi epitop Bw4. Dla KIR3DL2 ligandami są allotypy HLA-A (A*03 i A*11) [136, 153].



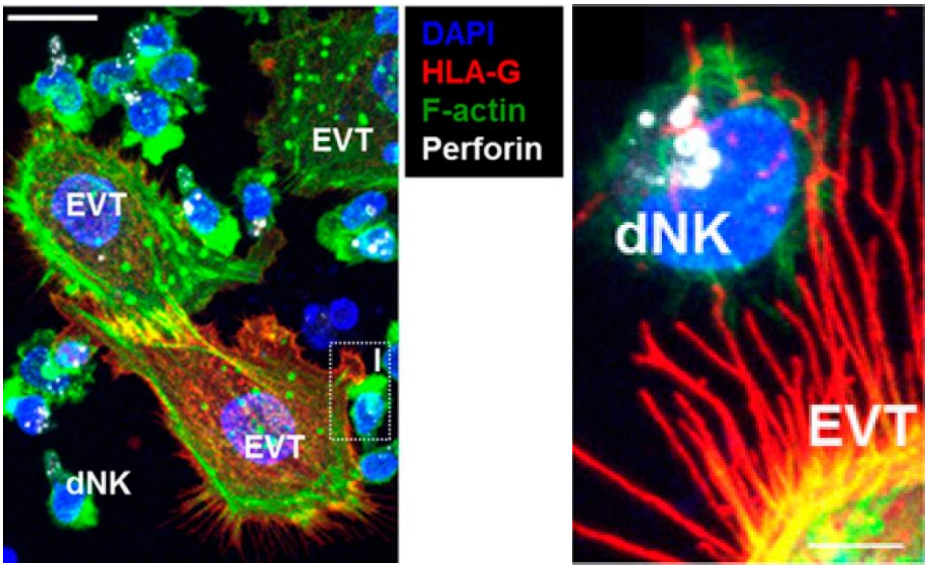
Rycina 5. Receptory KIR i ich ligandy według Beziat i wsp. (2016) [139].

Aktywujące receptory KIR wykazują homologię w swoich domenach zewnątrzkomórkowych z niektórymi hamującymi KIR, mianowicie: KIR2DS1 z KIR2DL1, KIR2DS2 z KIR2DL2 oraz KIR3DS1 z KIR3DL1. Niektóre ligandy aktywujących KIR wciąż nie są znane. Zidentyfikowanie odpowiednich ligandów utrudnione jest przez następujące cechy aktywujących KIR: niskie powinowactwo do HLA klasy I, wąską specyficzność i wysoką selektywność peptydową [139, 182-184]. KIR2DS1 rozpoznaje allele HLA-C C2, ale z niższym powinowactwem niż jego hamujący odpowiednik KIR2DL2. KIR2DS2 słabo wiąże się z HLA-C C1 (16:01 oraz 03:02) oraz z HLA-A*11:01. Interakcja ta jest wysoce zależna od peptydów. Ligandy KIR3DS1 były do niedawna nieznane, jednak prace z ostatnich lat pokazały, że istnieją otwarte konformery (czyli niezwiązane z beta2-mikroglobuliną lub peptydem) nieklasycznych cząsteczek HLA-F jako ligandy dla KIR3DS1 [185-186]. Ligandem dla KIR3DS1 mogą być również cząsteczki powierzchniowe HLA-B*51 [187]. **Tabela 1** przedstawia ligandy i ich allele dla poszczególnych receptorów KIR.

Tabela 1. Ligandy HLA dla receptorów KIR [136, 139, 185, 188].

KIR	Ligandy HLA	Obecność HLA na trofoblaście
2DL1	HLA-C C2: C*02, C*04, C*05, C*06	obecne
2DL2	HLA-C C1: C*01, C*03, C*07, C*08	obecne
	niektóre HLA-C C2: C*05:01, C*02:02, C*04:01	
	niektóre HLA-B: B*46:01, B*73:01	nieobecne
2DL3	HLA-C C1: C*01, C*03, C*07, C*08	obecne
	niektóre HLA-C C2: C*05:01, C*02:02	obecne
	niektóre HLA-B: B*46:01, B*73:01	nieobecne
2DL4	HLA-G	obecne
2DL5A	nieznane	-
2DL5B		
2DS1	HLA-C C2: C*02, C*04, C*05, C*06	obecne
2DS2	HLA-A: A*11:01	nieobecne
	HLA-C C1: C*16:01, C*03:02	obecne
2DS3	nieznane	-
2DS4	niektóre HLA-A: A*11:02,	nieobecne
	niektóre HLA-C: C*05:01, C*16:01, C*02:02	obecne
2DS5	nieznane	-
3DL1	niektóre A i B ekspresjonujące epitop Bw4	nieobecne
	HLA-B: B*08, B*27, B*57, B*58	
	HLA-A: A*24, A*23, A*32	nieobecne
		nieobecne
3DL2	niektóre HLA-A: A*03, A*11	nieobecne
3DL3	nieznane	-
3DS1	HLA-F otwarte konformery	obecne
	HLA-B: B*51	nieobecne

HLA-G występuje na powierzchni trofoblastu, a jego ekspresję odkryto także na zarodkach [189-191]. Na styku matczyno-płodowym wiele doczesnowych komórek NK wchodzi w interakcję z trofoblastem. Na zdjęciu z mikroskopu konfokalnego (**Rycina 6**) pokazano, że trofoblast tworzy filopodia bogate w HLA-G, które rozpoznają doczesnowe komórki NK. Rozpuszczalna forma HLA-G (ang. *soluble HLA-G* – sHLA-G) została wykryta w medium hodowlanym zarodków, krwi i krwi pępowinowej oraz płynie owodniowym [192-196]. Ponadto zaobserwowano ekspresję białka HLA-G w męskim układzie rozrodczym, tj. w jądrach oraz tkance najądrza, a także w nadsączach z nasień [197-199].



Rycina 6. Trofoblast pozakosmkowy (EVT) i bezpośredni kontakt z doczesnowymi komórkami NK (dNK) według Tilburgs i wsp. (2015) [200].

HLA-G wybarwiono kolorem czerwonym. Użyto również barwników takich jak: DAPI (kolor niebieski), F-aktyna (kolor zielony) i perforyna (kolor biały).

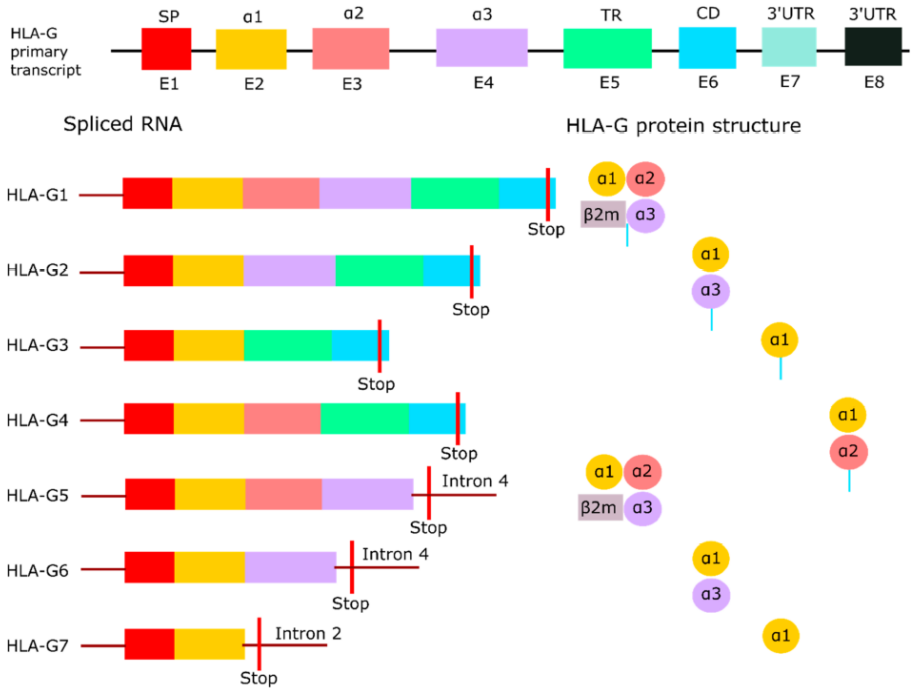
HLA-G jest ligandem dla receptora KIR2DL4, a także CD8. Wiąże się również z receptorami z rodziny LILR: hamującym ILT2 (ang. *immunoglobulin-like transcript 2*), znajdującym się na wszystkich monocytach, limfocytach B, T oraz komórkach NK; a także hamującym ILT4 ekspresjonowanym na komórkach dendrytycznych i monocytach [143, 201]. KIR2DL4 jest receptorem, który może być zarówno aktywujący jak i hamujący, dlatego też interakcja pomiędzy nim a HLA-G może prowadzić do aktywacji komórki NK do wydzielania cytokin, ale może mieć również potencjał hamujący. Oddziaływanie KIR2DL4 z HLA-G polega nie tylko na bezpośrednim kontakcie, ale także możliwe jest przeniesienie HLA-G z trofoblastu na doczesnowe komórki NK poprzez mechanizm trogocytozy. Dzieje się tak dlatego, że KIR2DL4 może mieć lokalizację wewnątrzkomórkową w endosomach i poprzez HLA-G może być transportowane na zewnątrz komórki. W konsekwencji dochodzi do stymulacji, a także podtrzymania sygnalizacji komórek NK za pośrednictwem KIR2DL4, aby umożliwić wydzielanie cytokin i czynników proangiogennych potrzebnych do rozwoju łożyska [200, 202].

Uważa się, że cząsteczka HLA-G spełnia ważne funkcje w przebudowie tętnic spiralnych w czasie implantacji oraz utrzymaniu tolerancji immunologicznej matki wobec płodu. HLA-G opisywane było w kontekście badań związanych z różnymi komplikacjami ciąży. Stwierdzono, że niektóre polimorfizmy genu *HLA-G* oraz obniżony poziom sHLA-G

mogą mieć związek m.in. z nawracającymi spontanicznymi poronieniami oraz stanem przedrzucawkowym [196, 203-205]. U kobiet ciężarnych poziom sHLA-G w osoczu krwi wzrasta w czasie pierwszego trymestru i osiąga wysokie wartości w czasie trzeciego miesiąca ciąży, w porównaniu do kobiet niebędących w ciąży, u których sHLA-G w osoczu również jest wykrywalne, jednak jego stężenie jest niższe [205-207].

Cząsteczka HLA-G różni się od klasycznych cząsteczek HLA klasy I pod względem ekspresji, zróżnicowania genetycznego, struktury i pełnionej funkcji. W przeciwieństwie do genów kodujących inne antygeny HLA klasy I, polimorfizmy w regionie kodującym gen *HLA-G* są rzadkie. Do dziś zidentyfikowano 82 allele *HLA-G*, wśród nich jedynie 22 allele zmieniają sekwencje białek. Istnieją także 4 allele typu *null*, kodujące skrócone formy białka (International Immunogenetics Information System IMGT/HLA Database https://hla.alleles.org).

Pierwotny transkrypt genu *HLA-G*, podobnie do genów kodujących inne HLA klasy I, składa się z ośmiu eksonów i siedmiu intronów (**Rycina 7**). Ekson 1 koduje peptyd sygnałowy, eksony 2-4 kodują trzy domeny zewnątrzkomórkowe (α1, α2 i α3), natomiast eksony 5 i 6 kodują domenę przezbłonową i ogon cytoplazmatyczny. Ze względu na obecność przedwczesnego kodonu stop w eksonie 6, cząsteczka HLA-G posiada krótki ogon cytoplazmatyczny, a ekson 7 nigdy nie występuje w dojrzałym mRNA. Z tego powodu translacja nie dotyczy nigdy eksonu 8, znajdującego się na końcu regionu nieulegającego translacji 3'UTR (ang. *3' untranslated region* – 3'UTR). Transkrypt genu *HLA-G* koduje 7 różnych izoform powstałych w procesie alternatywnego splicingu, czyli składania: 4 związane są z błoną (HLA-G1, -G2, -G3 i -G4) oraz 3 (HLA-G5, -G6, -G7) występujące w formie rozpuszczalnej [171, 196, 201, 208]. Pełnej długości mRNA koduje gen *HLA-G1*. *HLA-G2*, w wyniku splicingu, ma wycięty ekson 3, *HLA-G3* nie posiada eksonu 3 i 4, a *HLA-G4* nie ma eksonu 4. Stąd różnice w liczbie domen zewnątrzkomórkowych: HLA-G1 oraz HLA-G5 mają strukturę kompletną i typową dla HLA klasy I, a łańcuch ciężki związany jest z β2-mikroglobuliną. HLA-G2 nie posiada domeny α2, a HLA-G3 nie ma domen α2 i α3, z kolei HLA-G4 – domeny α3 (**Rycina 7**). HLA-G5 oraz HLA-G6 występują w postaci rozpuszczalnej ze względu na obecność intronu 4, który zawiera przesunięty kodon stop. W ten sposób nie dochodzi do transkrypcji i translacji regionu kodującego domenę przezbłonową (ekson 5). Podobnie HLA-G7 jest również rozpuszczalną izoformą, ale kodon stop determinujący ekspresję rozpuszczalnej formy znajduje się w intronie 2 [143, 196].



Rycina 7. Pełnej długości pierwotny transkrypt *HLA-G* oraz jego 7 izoform powstałych na skutek alternatywnego splicingu według Attia i wsp. (2020) [143].

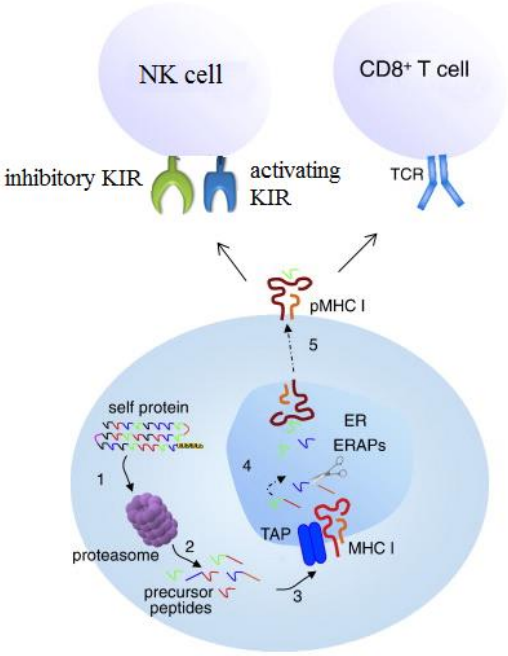
Wyjaśnienie skrótów: β2m – β2-mikroglobulina, CD – domena cytoplazmatyczna, E – ekson, SP – peptyd sygnałowy.

Pomimo że w regionie kodującym genu *HLA-G* zmienność jest niska, to polimorfizmy w regionach regulatorowych, do których należy wyżej wspomniany 3'UTR, a także region promotora 5'URR (ang. *5' upstream regulatory region*), są znacznie częstsze [209-210]. Ich funkcja polega na kontroli poziomu ekspresji białka HLA-G [209-211]. Polimorfizmy w regionie 5'URR znajdują się blisko miejsc zwanych wyspami CpG, dlatego mogą wpływać na metylację promotora oraz na przyłączanie się czynników transkrypcyjnych, a w konsekwencji mogą mieć wpływ na wyciszanie ekspresji genów. Region 3'UTR zawiera elementy regulacyjne, w tym motywy AU bogate w adeninę i uracyl, a także motywy bogate w samą adeninę (Poli-A) i może mieć wpływ na stabilność mRNA [212].

1.11. Aminopeptydazy siateczki śródplazmatycznej ERAP1 i ERAP2

Cząsteczki MHC klasy I prezentują na powierzchni komórek peptydy antygenowe, które są następnie rozpoznawane przez limfocyty T CD8+ oraz komórki NK. Powstawanie tych peptydów ma istotne znaczenie w regulacji odpowiedzi limfocytów T i komórek NK skierowanej przeciwko obcym lub nieprawidłowo zmienionym antygenom [213-215]. Peptydy antygenowe powstają przy udziale maszynerii prezentacji antygenu (ang. *antigen processing*

machinery – APM), który wymaga skoordynowanego działania wielu elementów (**Rycina 8**) [216]. Proces ten rozpoczyna się w cytozolu. Endogenne białka ulegają proteolitycznej degradacji poprzez proteasom, który jest dużym multimerycznym kompleksem proteaz [217]. Niewielka frakcja peptydów (głównie peptydów o długości 8-12 aminokwasów) przedostaje się do siateczki śródplazmatycznej przez transporter związany z prezentacją antygenu (ang. *transporter associated with antigen presentation* – TAP). W siateczce śródplazmatycznej znajdują się aminopeptydazy siateczki śródplazmatycznej ERAP1 i ERAP2 (ang. *endoplasmic reticulum aminopeptidase* – ERAP), które przycinają polipeptydy od N-końca aminokwasu i tym samym tworzą antygeny o optymalnej długości do związania się z cząsteczkami HLA klasy I [213-214, 216, 218-221]. Te dwa enzymy pełnią istotną rolę w kształtowaniu strukturalnie stabilnych peptydów, tworzących kompleks peptyd antygenowy – HLA, który następnie może stymulować komórki NK lub limfocyty T CD8+ [213, 216, 222].



Rycina 8. Powstawanie i prezentacja antygenu przez cząsteczki MHC klasy I według Fierabracci i wsp. (2012) z własnymi modyfikacjami [219].

ERAP1 i ERAP2 są enzymami homologicznymi należącymi do oksytocynaz z podrodziny metaloproteaz M1, które mają wspólne motywy wiążące cynk, niezbędne do ich aktywności enzymatycznej, tj.: GAMEN i HEXXH(X)18E [213, 221, 223]. Obie aminopeptydazy funkcjonalnie się uzupełniają, wiążąc substraty i przycinając je do odpowiedniej długości, a jednocześnie różnią się między sobą specyficznością enzymatyczną. Substraty wiązane są na podstawie N-końcowej reszty aminokwasowej oraz wewnętrznej

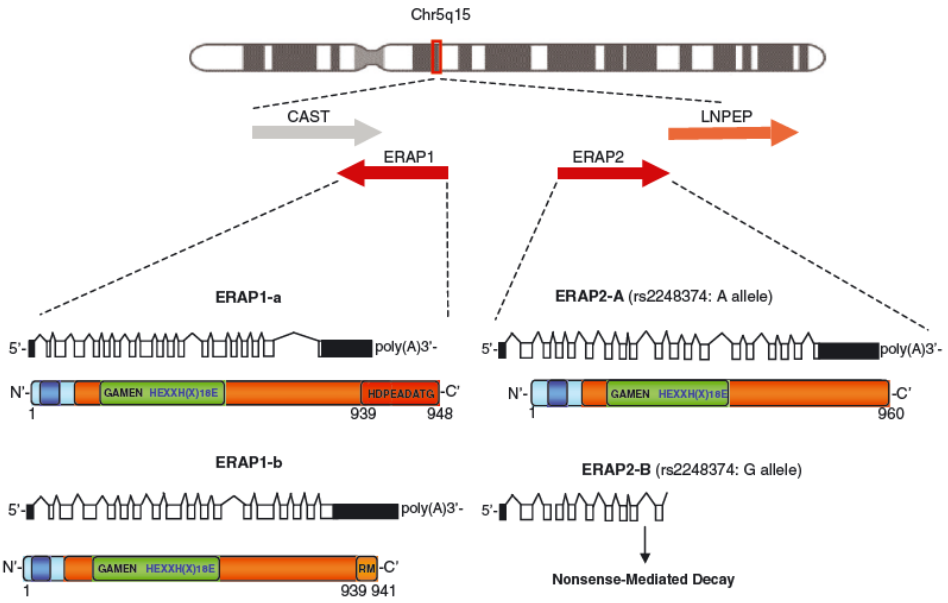
sekwencji. ERAP1 preferuje peptydy o długości 9-16 aminokwasów i przycina je do długości 8-9 aminokwasów, podczas gdy ERAP2 przycina peptydy krótsze o długości 7-8 aminokwasów. ERAP1 generalnie przycina peptydy nie zawierające proliny. Ponadto ERAP1 preferuje peptydy mające na swoim C-końcu duże hydrofobowe reszty aminokwasowe takie jak leucyna i metionina. Z kolei ERAP2 tnie peptydy z N-końcowymi dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi (arginina i lizyna). Mechanizm wyjaśniający preferencję ERAP1 do określonej długości substratów określany jest jako „model linijki molekularnej". Model ten determinują dwie odrębne konformacje ERAP1 – otwarta i zamknięta. Otwarta konformacja jest nieaktywna ze względu na niskie powinowactwo do substratów. Taka sytuacja ma miejsce, gdy substraty są zbyt krótkie, aby dotrzeć do dwóch sąsiednich miejsc enzymu: miejsca aktywnego i kieszeni hydrofobowej. N-końcowa reszta aminokwasowa jest wiązana przez miejsce aktywne, natomiast reszta C-końcowa wiązana jest przez hydrofobową kieszeń. Dłuższe peptydy o długości 9-16 aminokwasów są wiązane na całej swojej długości od hydrofobowej kieszeni do miejsca aktywnego. Dochodzi do zmiany konformacji na zamkniętą i następuje przycinanie peptydu. Po przycięciu i uwolnieniu peptydu, enzym powraca do konformacji otwartej [222, 224-226]. ERAP1 i ERAP2 mogą tworzyć razem heterodimer, wówczas zmieniają się ich właściwości enzymatyczne i zwiększa się efektywność przycinania peptydów. Dzięki temu powstaje zróżnicowany i bardziej immunogenny repertuar dojrzałych epitopów antygenowych [220, 227].

Geny *ERAP1* i *ERAP2* znajdują się na chromosomie 5 w przeciwnej orientacji i prawdopodobnie posiadają dwa wspólne elementy regulacyjne (**Rycina 9**). *ERAP1* zawiera 20 eksonów, a *ERAP2* – 19 [216, 221]. *ERAP1* koduje dwie główne N-glikozylowane izoformy: ERAP1a i ERAP1b, które powstają w wyniku alternatywnego składania. Różnią się one pomiędzy sobą aminokwasami na C-końcu (ERAP1a zawiera 948 aminokwasów i ERAP1b zawiera 941 aminokwasów). Ostatnie badania pokazały, że izoformy te (nazwane odpowiednio ERAP1-19E i ERAP1-20E) charakteryzują się różnymi mechanizmami regulacji potranskrypcyjnej przez ich regiony 3'UTR. Izoforma 19E jest indukowana przez IFN-ɣ, z kolei izoforma 20E występuje częściej, ale nie reaguje na stymulację IFN-ɣ [213, 228].

Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism* – SNP) genów *ERAP1* i *ERAP2* skutkują ekspresją białek o różnych zmianach aminokwasowych, co wpływa na aktywność enzymatyczną i wiązanie substratu. Ponadto SNP-y zlokalizowane są w istotnych strukturalnie pozycjach, które mogą zmieniać konformacje ERAP1 i ERAP2 [214, 229-230]. *ERAP1* charakteryzuje się wysokim polimorfizmem. Polimorfizm rs2287987 (zamiana metioniny na walinę w pozycji 349 – Met349Val) znajduje się w miejscu aktywnym

enzymu i może mieć wpływ na interakcje z substratem. Na wewnętrznej powierzchni wnęki C-końca znajduje się rs27044 (Gln730Glu), który może wpływać na preferencję sekwencji i długości substratu. W połączeniach domen ERAP1 znajdują się rs30187 (Arg528Lys) oraz rs26653 (Arg127Pro), które mogą zmieniać konformację między otwartą a zamkniętą i wpływać na specyficzność i aktywność enzymatyczną [216, 219, 221].

W przeciwieństwie do *ERAP1*, gen *ERAP2* wykazuje ograniczony polimorfizm. Koduje co najmniej trzy izoformy, które również powstają przez alternatywne składanie. Wynika to z polimorfizmu rs2248374 (zamiana A/G) w eksonie 10. Allel A koduje transkrypt pełnej długości i pełnej funkcjonalności (izoforma ERAP2-A). Natomiast allel G koduje izoformę ERAP2-B, która jest degradowana w związku z przedwczesnym kodonem stop w procesie NMD (ang. *nonsense-mediated decay*) (**Rycina 9**). Dlatego ludzie o genotypie AA lub AG w tym miejscu polimorficznym ekspresjonują ERAP2 o pełnej długości, w przeciwieństwie do ludzi o genotypie GG (ok. 25% populacji) [213, 214, 216]. Zaobserwowano jednak, że pomimo procesu NMD, allel G może prowadzić do powstania krótkich izoform ERAP2/ISO3, ERAP2/ISO4, które ulegały trankrypcji po zakażeniu wirusowym [216].



Rycina 9. Schemat organizacji genów *ERAP1* i *ERAP2* i ich izoformy według Fruci i wsp. (2014) [231].

Pomimo że ERAP1 i ERAP2 pełnią główną rolę w powstawaniu i prezentacji antygenów, mogą również mieć inne dodatkowe funkcje. ERAP1 ma bezpośredni wpływ na odporność wrodzoną, może przyczyniać się do powstawania autozapalnych i autoimmunologicznych chorób [232-233]. ERAP1 posiada domenę transbłonową, dlatego

może być zakotwiczony w błonie, natomiast w określonych warunkach może być też wydzielany poza komórkę. Gdy jest związany z błoną, zaangażowany jest w proteolityczne przycinanie receptorów powierzchniowych dla cytokin, w tym receptora dla czynnika martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor receptor 1* – TNFR1), receptora dla interleukiny 6 typu I (IL-6Rα) i receptora dla interleukiny 1 typu II (IL-1RII) [214, 221, 234-236]. Cui i wsp. (2002) wykazali na przykładzie TNFR1, że mechanizm ten zaczyna się od wiązania się ERAP1 z zewnątrzkomórkową domeną TNFR1 [234]. Następnie ERAP1 złuszcza receptor, co potwierdzono w eksperymentach na ludzkich komórkach śródbłonkowych i nabłonkowych. Pozwala to na regulację dostępności receptora na powierzchni komórek [233].

ERAP1 i ERAP2 pełnią ważną rolę w regulacji angiogenezy. Oba enzymy przycinają bioaktywne hormony – angiotensynę i kallidynę. ERAP1 odpowiada za przycinanie angiotensyny II do angiotensyny III i IV. ERAP2 przycina angiotensynę III do angiotensyny IV. Zarówno ERAP1 jak i ERAP2 odpowiadają za konwersję kallidyny do bradykininy [216, 221, 237]. Lokalny szlak przemian renina-angiotensyna obecny w łożysku, wspomaga tworzenie naczyń podczas angiogenezy i odpowiada za unaczynienie płodu oraz inwazję trofoblastu. Udział w szlaku przemian renina-angiotensyna, sugeruje również rolę aminopeptydaz w regulacji ciśnienia krwi [221, 238]. Znaczące zmiany w regulacji tego szlaku, mogą spowodować stan przedrzucawkowy, charakteryzujący się matczynym nadciśnieniem tętniczym, mogącym prowadzić do niedotlenienia płodu [223, 239]. Stwierdzono, że niektóre warianty genetyczne *ERAP1 i ERAP2* mogą być związane z ryzykiem wystąpienia preeklampsji [240-242].

Zwiększenie ekspresji ERAP1 w wyniku stymulacji czynnikiem VEGF koreluje ze zwiększoną angiogenezą [223]. W badaniach wykorzystujących materiał pochodzący z jajników, ekspresja ERAP1 osiągnęła najwyższy poziom w komórkach lutealnych ciałka żółtego u kobiet podczas ciąży, gdzie ułatwiona była również konwersja angiotensyny II pod wpływem VEGF [243]. Natomiast w raku endometrium wykazano, że nadekspresja ERAP1 hamuje angiogenezę poprzez zmniejszenie aktywności VEGF za pośrednictwem angiotensyny II [244].

1.12. Cytokiny i czynniki wzrostu – ich rola w regulacji matczynej odpowiedzi immunologicznej

Cytokiny pośredniczą w sygnałach pomiędzy trofoblastem a endometrium w czasie implantacji zarodka oraz przez całą ciążę. Mogą wspomagać inwazję trofoblastu i tworzenie

łożyska. Utrzymanie właściwej równowagi pomiędzy cytokinami prozapalnymi i przeciwzapalnymi jest konieczne dla rozwoju ciąży, a zaburzenia i infekcje mogą mieć wpływ na zmianę ekspresji cytokin [245]. Cytokiny mogą być wydzielane przez komórki endometrium oraz przez komórki układu odpornościowego rekrutowane do macicy do miejsca implantacji. Są to, jak już wcześniej wspomniano, maciczne komórki NK, makrofagi, komórki dendrytyczne (115, 246-249].

Limfocyty T również wykazują się złożoną i zmienną produkcją cytokin. Limfocyty T CD4+ dzielą się na limfocyty pomocnicze Th1 i Th2, limfocyty T regulatorowe (Treg) i Th17. Limfocyty Th1 biorą udział głównie w eliminacji komórek zakażonych wirusem i patogenami wewnątrzkomórkowymi. Do cytokin Th1 (uważanych za prozapalne) należą IFN-ɣ, TNF-α oraz interleukiny: IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 [250]. Cytokiny Th1 dominują we wczesnych etapach implantacji i uważa się, że wspomagają inwazję trofoblastu. Wykazano, że wyższe poziomy TNF-α przed transferem zarodka związane były z kliniczną ciążą u pacjentów z RIF, co podkreśla, że prozapalne czynniki są potrzebne do implantacji zarodka [251, 252]. Po implantacji zarodka, w drugim trymestrze ciąży, następuje zmiana i w macicy zaczynają przeważać cytokiny Th2 (przeciwzapalne), do których należą: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 oraz czynnik GM-CSF. Cytokiny Th2 odpowiadają za wzrost płodu i utrzymanie ciąży. Przewaga odpowiedzi Th1 nad Th2 może być związana z różnymi powikłaniami ciąży, m.in. nawracającymi poronieniami, stanem przedrzucawkowym oraz niepowodzeniami implantacji zarodka po zapłodnieniu *in vitro* (245, 253-255]. Badania nad paradygmatem „Th1/Th2" zostały poszerzone i obecnie koncentrują się również na innych mediatorach odpowiedzi immunologicznej, w tym komórkach Treg oraz Th17 [250-251, 254, 256]. Charakterystyczne w zdrowej ciąży jest to, że cytokiny Th2 kontrolują prozapalne działanie cytokin Th1, hamując wydzielanie cytokin zarówno Th1, jak i Th17. Cytokiny Th17 to w większości cytokiny z rodziny IL-17 (IL-17A, IL-17B, IL-17F), które są również prozapalne i indukują odporność przeciwko drobnoustrojom zewnątrzkomórkowym w czasie ciąży. W trzecim trymestrze ciąży powraca odpowiedź zapalna typu Th1. Duże znaczenie w tej fazie ma infiltracja komórek układu odpornościowego do mięśniówki macicy, co wspomaga skurcze macicy, poród i oddzielenie się łożyska [115, 122, 254].

Na różnicowanie limfocytów Th mogą wpływać hormony. Niski poziom estradiolu w czasie ciąży sprzyja odpowiedzi Th1, natomiast wysoki poziom promuje odpowiedź Th2. Z kolei podwyższony poziom progesteronu indukuje wydzielanie cytokin Th2, a hamuje wydzielanie cytokin Th1 [90, 250].

Cytokiny mogą mieć wpływ na samą decydualizację, głównie przez to, że promują tworzenie naczyń krwionośnych i zwiększenie przepływu krwi w doczesnej. Maciczne komórki NK, jak już wcześniej opisano, mają zdolność do wydzielania czynników angiogennych, takich jak czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) oraz łożyskowy czynnik wzrostu (ang. *placental growth factor – PlGF*). PlGF może mieć działanie zarówno proangiogenne jak i antyangiogenne, dlatego efektywna decydualizacja wymaga odpowiednich poziomów ekspresji tego czynnika [257]. VEGF może regulować proliferację i przeżycie komórek śródbłonka oraz zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych. W doczesnej wspomaga więc różnicowanie się komórek trofoblastu i odpowiada za angiogenezę [82, 257].

Znaczącą rolę w implantacji zarodka może odgrywać również LIF – czynnik hamujący białaczkę (ang. *leukemia inhibitory factor*). Ekspresjonowany jest w endometrium w czasie implantacji przez maciczne komórki NK, a jego receptor zlokalizowany jest zarówno w endometrium, jak i na trofoblaście [258-259]. LIF poprzez regulację syntezy prostaglandyn może mieć wpływ na implantację zarodka oraz decydualizację. Badania wykazały, że LIF może wzmacniać ekspresję HLA-G w liniach komórek kosmówczaka. Indukcja ta zachodziła w obecności ERAP1 [260].

2. Założenia i cele pracy

Niepłodność oraz trudności z zajściem w ciążę stanowią obecnie coraz większy problem. Techniki wspomaganego rozrodu, w tym zapłodnienie *in vitro*, są często ostatnią szansą pary na posiadanie dziecka. Pomimo znacznego postępu w dziedzinie technik wspomaganego rozrodu, około 10% kobiet przystępujących do zapłodnienia IVF doświadcza nawracających niepowodzeń implantacji zarodka (RIF). Etiologia RIF jest niejednoznaczna. Do czynników mających wpływ na niepowodzenia implantacji po zapłodnieniu *in vitro* należą zarówno czynniki matczyne (wady anatomiczne macicy, endometrioza), jak również czynniki związane z zarodkiem i komórkami rozrodczymi rodziców (jakość komórki jajowej, jakość nasienia, a także aberracje chromosomowe w tych komórkach). Przyczyna w ponad 50% przypadków RIF pozostaje wciąż niewyjaśniona.

Prawidłowy rozwój ciąży zależy od tolerancji układu immunologicznego matki wobec zarodka, a w dalszym etapie zależy od rozwoju płodu, ekspresjonującego obce ojcowskie antygeny, bez utraty zdolności matki do zwalczania infekcji. Właściwe przycinanie peptydów przez aminopeptydazy siateczki śródplazmatycznej ERAP1 i ERAP2, które następnie wiążą się z cząsteczkami HLA-C lub HLA-G na trofoblaście, może odgrywać rolę w prezentacji peptydów antygenowych odpowiednim receptorom znajdującym się na doczesnowych komórkach NK. Wśród tych receptorów są receptory KIR, które mogą aktywować bądź hamować komórkę NK do wydzielania cytokin i czynników wzrostowych, niezbędnych do prawidłowej implantacji zarodka. Ponieważ polimorfizm genów *KIR* wpływa na stan aktywności komórek NK, może więc odgrywać rolę w kształtowaniu interakcji z cząsteczkami HLA-C i HLA-G ekspresjonowanymi przez zarodek, a w konsekwencji może też mieć wpływ na nawracające niepowodzenia implantacji zarodka. Ponieważ antygeny HLA prezentowane na powierzchni trofoblastu pochodzą zarówno od matki, jak i od ojca, polimorfizm genów pochodzenia ojcowskiego może być również ważny w kontekście niepowodzeń implantacji zarodka.

Głównym celem pracy była ocena związku polimorfizmu genów *KIR i* ich ligandów *HLA-C* i *HLA-G* oraz *ERAP1* i *ERAP2* z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym.

Kolejne cele pracy to:

- Zbadanie stężenia aminopeptydaz ERAP1 i ERAP2 w osoczu krwi u kobiet przystępujących do zapłodnienia *in vitro* (przed i po procedurze IVF-ET) oraz u kontrolnych kobiet płodnych.
- Zbadanie stężenia rozpuszczalnego sHLA-G w osoczu krwi kobiet przystępujących do zapłodnienia *in vitro* oraz kontrolnych kobiet płodnych i skorelowanie genotypu *HLA-G* badanych kobiet ze stężeniem jego rozpuszczalnej formy przed i po procedurze IVF-ET.
- Dodatkowo podjęto próbę oceny roli sHLA-G w męskiej niepłodności. W tym celu konieczne było zbadanie stężenia sHLA-G w nasieniu partnerów kobiet przystępujących do zapłodnienia IVF oraz skorelowanie stężenia z parametrami nasienia oraz haplotypami *HLA-G* mężczyzn.

3. Pacjenci, materiały i metody

3.1. Pacjenci

Tabela 2 przedstawia charakterystykę pacjentów oraz kontrolnych par płodnych. Do badań nad polimorfizmem genów *KIR* i ich ligandów oraz *ERAP1* i *ERAP2* zakwalifikowano 881 kobiet oraz 812 partnerów tych kobiet. Grupę badaną stanowiło 496 kobiet oraz ich 491 partnerów, którzy przystąpili do procedury zapłodnienia pozaustrojowego *in vitro* z łączną liczbą przeniesionych zarodków równą 1859. Kwalifikacji dokonywał profesor dr hab. n. med. Andrzej Malinowski z Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi i Przychodni Ginekologiczno-Położniczej Gynemed oraz dr n. med. Paweł Radwan i profesor dr hab. n. med. Michał Radwan, a także profesor dr. hab. n. med. Jacek Wilczyński ze Szpitala Gameta w Rzgowie. Kwalifikacja pacjentów odbywała się w latach 2015-2020. Wśród grupy badanej można było wyróżnić trzy podgrupy:

1. RIF: 283 kobiety oraz ich 278 partnerów, którzy doświadczyli nawracających niepowodzeń implantacji zarodka (średnio doznali 5 niepowodzeń);
2. SIVF (ang. *successful pregnancy after IVF-ET* – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*): 161 par, w których kobiety zaszły w ciążę po zapłodnieniu *in vitro* w co najwyżej 3 procedurze IVF-ET, u których w większości ciążę uzyskano po 2 transferze zarodka. Ciąże te zakończyły się urodzeniem zdrowego dziecka;
3. Grupa niesklasyfikowana – 52 pary, które miały jeden, dwa lub trzy transfery zarodka i w większości doświadczyły poronienia, wobec tego nie mogły być zakwalifikowane ani do grupy RIF, ani do grupy SIVF.

Grupę kontrolną stanowiło 385 płodnych kobiet i ich 321 partnerów. Kobiety z tej grupy zaszły w ciążę naturalnie i urodziły przynajmniej jedno dziecko. Kwalifikacji dokonano w I Klinice Położnictwa i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Warszawie w latach 2006-2014. Warunkiem włączenia do tej grupy było również spełnienie następujących kryteriów: brak stwierdzonych w wywiadzie poronień samoistnych, innych chorób ginekologicznych, immunologicznych, a także zaburzeń endokrynologicznych. Kwalifikacji kontrolnych kobiet płodnych dokonano również w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu w latach 2018-2020. W momencie pobierania materiału do badań, 27 kobiet z kontroli płodnej było w klinicznie potwierdzonej ciąży, a ciąża trwała już od 8 do 37 tygodnia. Średni wiek pacjentek IVF oraz ich partnerów istotnie różnił się od średniego wieku kontroli (odpowiednio: $p=0{,}0001$, $p<0{,}0001$).

Tabela 2. Charakterystyka pacjentów oraz kontroli płodnej.

Parametr		IVF	RIF	SIVF	Grupa niesklasyfikowana	Kontrola płodna
Liczba kobiet		N=496	N=283	N=161	N=52	N=385
Wiek kobiet	średnia±SD	33,67±4,14	34,51±4,11	32,11±3,82	34,09±3,91	32,81±5,98
	zakres	22-46	23-46	22-41	25-45	19-68
Liczba mężczyzn		N=491	N=278	N=161	N=52	N=322
Wiek mężczyzn	średnia±SD	35,51±4,89	36,27±4,85	34,32±4,72	36,89±4,89	34,15±6,3
	zakres	24-53	25-53	24-53	28-51	25-70
Wskazania do IVF-ET (%)	czynnik męski	145 (29,23)	78 (27,57)	58 (36,02)	9 (17,31)	nie dotyczy
	czynnik żeński	131 (26,41)	70 (24,73)	45 (27,95)	16 (30,77)	nie dotyczy
	oba czynniki	75 (15,13)	49 (17,31)	19 (11,80)	7 (13,46)	nie dotyczy
	czynnik nieznany	145 (29,23)	86 (30,39)	39 (24,23)	20 (38,46)	nie dotyczy
Liczba transferów zarodka	średnia±SD	3,37±2,05	4,64±1,76	1,63±0,71	1,62±0,68	nie dotyczy
	zakres	1-15	3-15	1-3	1-3	nie dotyczy
Liczba przeniesionych zarodków	średnia±SD	3,81±2,55	5,33±2,29	1,69±0,79	1,76±0,65	nie dotyczy
	zakres	1-19	3-19	1-5	1-3	nie dotyczy

Pacjenci z grupy RIF i SIVF kwalifikowani do IVF z powodu czynnika męskiego, żeńskiego, obu czynników oraz czynnika nieznanego nie różnili się istotnie w częstościach występowania tych czynników. Większy odsetek pacjentów z grupy SIVF (36,02%) niż RIF (27,57%) był zakwalifikowany do IVF z powodu czynnika męskiego (p=0,068). To pokazuje, że wśród par, w których mężczyzna miał nieprawidłowe parametry nasienia, poprzez zastosowanie procedury ICSI i wybranie plemnika wyselekcjonowanego morfologicznie, pacjentki zachodziły w ciążę i rodziły zdrowe dzieci. W grupie RIF największy odsetek par był zakwalifikowany z powodu czynnika nieznanego (30,39%) (**Tabela 2**).

3.1.2. Przygotowanie pacjentek do procedury IVF

Pacjentki przed procedurą zapłodnienia pozaustrojowego zostały poddane hormonalnej stymulacji owulacji. U pacjentek zastosowano krótki lub długi protokół stymulacji jajników:

- Protokół krótki z antagonistą – polega na podawaniu gonadotropin (FSH i LH), które mają pobudzić pęcherzyki jajnikowe do wzrostu, już od 2 dnia cyklu miesiączkowego. W kolejnych dniach (od 6 dnia cyklu) podawany jest antagonista gonadoliberyny, czyli hormonu uwalniającego gonadotropinę (GnRH – ang. *gonadotropin-releasing*

hormone). Podanie antagonisty lub agonisty GnRH hamuje naturalną zdolność kobiety do wydzielania hormonów FSH i LH przez przysadkę mózgową;

- Protokół długi z agonistą – podawanie agonisty GnRH rozpoczyna się w cyklu miesiączkowym poprzedzającym planowaną stymulację, a dopiero po miesiączce włączane są gonadotropiny.

Wzrost pęcherzyków jest monitorowany badaniem USG, a ponadto mierzony jest poziom estradiolu we krwi. Gdy średnica pęcherzyków przekracza 17 mm, a poziom estradiolu przypada powyżej 200 pg/ml na jeden pęcherzyk, pacjentkom podawany jest rekombinant gonadotropiny kosmówkowej (HCG – ang. *human chorionic gonadotropin*), który powoduje uwolnienie komórek jajowych. Po 36 godzinach od podania HCG przeprowadzana jest punkcja jajników i pobranie komórek jajowych, które odbywa się w znieczuleniu ogólnym. W celu suplementacji fazy lutealnej, pacjentkom podawano dopochwowo mikronizowany progesteron (2x200 mg) oraz doustnie dydrogesteron (3x10 mg) aż do 12 tygodnia ciąży.

3.1.3. Zapłodnienie *in vitro* i transfer zarodka

Po pobraniu komórki jajowe poddane były denudacji, czyli oddzieleniu ich od otaczających komórek ziarnistych. Następnie były oceniane oraz klasyfikowane według stopnia dojrzałości. Oocyty metafazy II zostały zapłodnione. Drugiego i trzeciego dnia, sprawdzano jakość zarodków na podstawie liczby i rozmiaru blastomerów, stopnia fragmentacji oraz występowania wielojądrowości. Transfer zarodków odbywał się od trzeciego do piątego dnia rozwoju zarodka, jeśli był to cykl świeży. Zarodki mogły być również kriokonserwowane (cykl mrożony) w piątym lub szóstym dniu hodowli w stadium blastocysty i rozmrożone oraz przeniesione do macicy w późniejszym czasie. Transfer zarodków był odraczany w przypadku przedwczesnego wzrostu progesteronu u pacjentki lub ryzyka wystąpienia zespołu hiperstymulacji jajników.

3.2. Materiał do badań

Materiałem do badań było genomowe DNA wyizolowane z krwi obwodowej pacjentek, ich partnerów oraz kontroli płodnej. Badania przeprowadzono wykorzystując również osocze krwi pacjentek poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kontrolnych kobiet płodnych. Osocze od pacjentek zebrano zarówno przed transferem zarodka, jak i po transferze, w momencie pomiaru gonadotropiny kosmówkowej (beta-HCG) w celu potwierdzenia lub wykluczenia

ciąży. Osocze było przechowywane w temperaturze -80°C do momentu przeprowadzenia eksperymentu. Osoby biorące udział w badaniach wyraziły pisemną zgodę na oddanie próbek krwi oraz zostały poinformowane, w jakim celu ich DNA oraz osocze zostanie użyte. Wszystkie badania przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Etyki Badań Naukowych Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi.

Dodatkowo uzyskano nasienie od mężczyzn przystępujących do procedury zapłodnienia pozaustrojowego. **Tabela 3** przedstawia określenia dotyczące jakości nasienia, stosowane w przypadku różnych odstępstw od wartości referencyjnych nasienia.

Tabela 3. Nazewnictwo dotyczące jakości nasienia na podstawie "WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen – 5th ed" [60].

Nazwa	Definicja
normozoospermia	Całkowita liczba plemników w nasieniu oraz odsetek plemników o postępującej ruchliwości i prawidłowej morfologii jest równy lub wyższy od wartości referencyjnych.
astenozoospermia	Odsetek plemników o prawidłowej ruchliwości w nasieniu jest poniżej wartości referencyjnych.
oligozoospermia	Całkowita liczba plemników w nasieniu jest niższa niż dolna granica wartości referencyjnych.
teratozoospermia	Odsetek plemników prawidłowych morfologicznie w nasieniu jest poniżej dolnej granicy wartości referencyjnych.
oligoastenozoospermia	Całkowita liczba plemników oraz odsetek plemników o prawidłowej ruchliwości jest poniżej wartości referencyjnych.
oligoteratozoospermia	Całkowita liczba plemników oraz odsetek plemników prawidłowych morfologicznie jest poniżej wartości referencyjnych.
oligoastenoteratozoospermia	Całkowita liczba plemników oraz odsetek plemników prawidłowych morfologicznie, o prawidłowej ruchliwości, jest poniżej wartości referencyjnych.
astenoteratozoospermia	Odsetek plemników o prawidłowej ruchliwości oraz morfologii jest poniżej wartości referencyjnych.
azoospermia	Brak plemników w nasieniu.

3.3. Odczynniki i zestawy

Odczynniki i zestawy do genotypowań

- Zestawy do izolacji DNA:
  Invisorb Spin Blood Midi Kit — Invitek (Niemcy)
  QIAamp DNA Mini Kit — Qiagen (Niemcy)
- Zestaw KIR Ready-Gene — Inno-train Diagnostics (Niemcy)
- TaqMan SNP Genotyping Assay — Applied Biosystems (USA)
- TaqMan Genotyping Master Mix (2x) — Applied Biosystems (USA)
- Bufor do polimerazy: Taq Buffer z $(NH_4)_2SO_4$ (10x) — Thermo Fisher Scientific (USA)
- Polimeraza Taq DNA (5 U/μl) — Thermo Fisher Scientific (USA)
- Chlorek magnezu ($MgCl_2$ 25 mM) — Thermo Fisher Scientific (USA)
- Deoksynukleotydy (dNTPs: 100 mM dCTP, dATP, dGTP, dTTP) — Thermo Fisher Scientific (USA)
- Startery do typowania HLA-C C1 oraz C2: HLA-CwS, CRP(S), CRP(AS), NK1, NK2 — Genomed (Polska)
- Startery do typowania insercji/delecji w genie HLA-G: HLA-G Indel R, HLA-G Indel F — Genomed (Polska)

Zestawy do badań na osoczu i nasieniach

- Zestaw do oznaczania ludzkiego sHLA-G (ELISA kit) — Exbio/Biovendor (Czechy)
- Zestawy do oznaczania ludzkiego ERAP1 i ERAP2 (Human ERAP1/2 Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1/2 ELISA Kit) — Wuhan EIAab Science Co (Chiny)

Odczynniki do elektroforezy

- Agaroza — EURx (Polska)
- Bromek etydyny ($C_{21}H_{20}BrN_3$, 10 mg/ml) — Sigma-Aldrich (Niemcy)
- Marker masy: Gene Ruler 50 bp DNA Ladder (zakres 50-1000 pz) — Thermo Fisher Scientific (USA)
- Marker masy: Fast Ruler Low Range (500 μl) (zakres 50-1500 pz) — Thermo Fisher Scientific (USA)
- Orange DNA Loading Dye (6x) — Thermo Fisher Scientific (USA)

Bufory

Bufor	Skład
• TBE 5x stężony	Kwas borowy (27,5 g) TRIS (54 g) 0,5 M EDTA pH 8,0 (20 ml) Woda miliQ (do 1000 ml)
• Bufor obciążający (6x)	40% glicerol (7,5 ml) Oranż metylowy (szczypta) Woda miliQ (2,5 ml)

Aparatura

• Termocykler T100	Bio-Rad (Polska)
• 7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems (USA)
• Czytnik Tecan Sunrise	Tecan Trading AG (Szwajcaria)
• Wirówka 5810R	Eppendorf (USA)
• Aparat do elektroforezy poziomej	Polgen (Polska)
• MSI Minishaker IKA	Sigma (Niemcy)
• Transiluminator	Vilber- Lourmat (Francja)
• Pipety automatyczne	Eppendorf (Niemcy)
• Nanodrop 2000 Spectrophotometry	Thermo Fisher Scientific (USA)
• DS-11 Spectrophotometer	DeNovix (USA)

3.4. Metody

3.4.1. Izolacja DNA z krwi obwodowej

Izolacja genomowego DNA została wykonana metodą kolumienkową według protokołu producenta, przy użyciu zestawu Invisorb Spin Blood Midi Kit (Invitek, Niemcy) lub QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Niemcy). W pierwszym etapie przeprowadzono lizę erytrocytów za pomocą buforu SLR. Probówki wirowano przez 10 min przy 1640 rpm w 15°C. Powstały osad przemywano dwukrotnie buforem SLR. Odwirowana frakcja komórek była poddawana lizie enzymatycznej, przy użyciu buforu lizującego oraz proteinazy K (probówki inkubowano w 70°C przez 20 min). Do probówek dodawano buforu wiążącego, a następnie całość

nanoszono na kolumienki ze złożem wiążącym DNA. Inkubowano 1 minutę i wirowano 2 min przy obrotach 11000 rpm. Filtrat wylewano, a kolumienkę przeniesiono do nowej probówki. W kolejnych etapach przemywano DNA za pomocą buforów płuczących (Wash Buffer I i II) w celu zwiększenia czystości DNA. Ostatnim etapem była elucja DNA przy użyciu wody miliQ. Następnie oznaczano stężenie oraz czystość DNA zawieszonego w wodzie metodą spektrofotometryczną.

3.4.2. Oznaczanie stężenia DNA

Stężenie DNA oraz jego czystość oznaczono metodą spektrofotometryczną na aparacie Nanodrop 2000 Spectrophotometry (Thermo Fisher Scientific, USA) oraz DS-11 (DeNovix, USA). Stężenie mierzono przy długości fal 260 nm, natomiast czystość DNA określano przy długościach fal 260/280 nm.

3.4.3. Typowanie genów *KIR*

W celu określenia genotypów *KIR* metodą łańcuchowej reakcji polimerazy PCR-SSP (ang. *sequence specific primer*) użyto zestawu KIR Ready-Gene (Inno-train Diagnostics, Niemcy). Dla każdej próbki przygotowano mieszaninę reakcyjną według składu w poniższej tabeli (**Tabela 4**). Zestaw nie zawierał polimerazy, dlatego zastosowano polimerazę Taq DNA (5 U/µl) firmy Thermo Fisher Scientific (USA). Mieszaninę przenoszono w ilości 10 µl na poszczególne studzienki płytki, zawierające odpowiednie liofilizowane startery dla poszczególnych genów *KIR*. Kontrolę negatywną stanowiła mieszanina reakcyjna bez DNA.

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej dla typowania genów *KIR* dla jednej osoby.

Odczynnik	Objętość [µl]
Woda miliQ	168
Ready PCR zawierający: dNTPs, bufor PCR, czerwony krezol, gliceryna	84
Taq Polimeraza (5 U/µl)	2,2
DNA (25-100 ng/µl)	26
Objętość całkowita	280,2

Reakcję amplifikacji przeprowadzono z użyciem termocyklera T100 (Bio-Rad Polska).

Przebieg reakcji PCR:

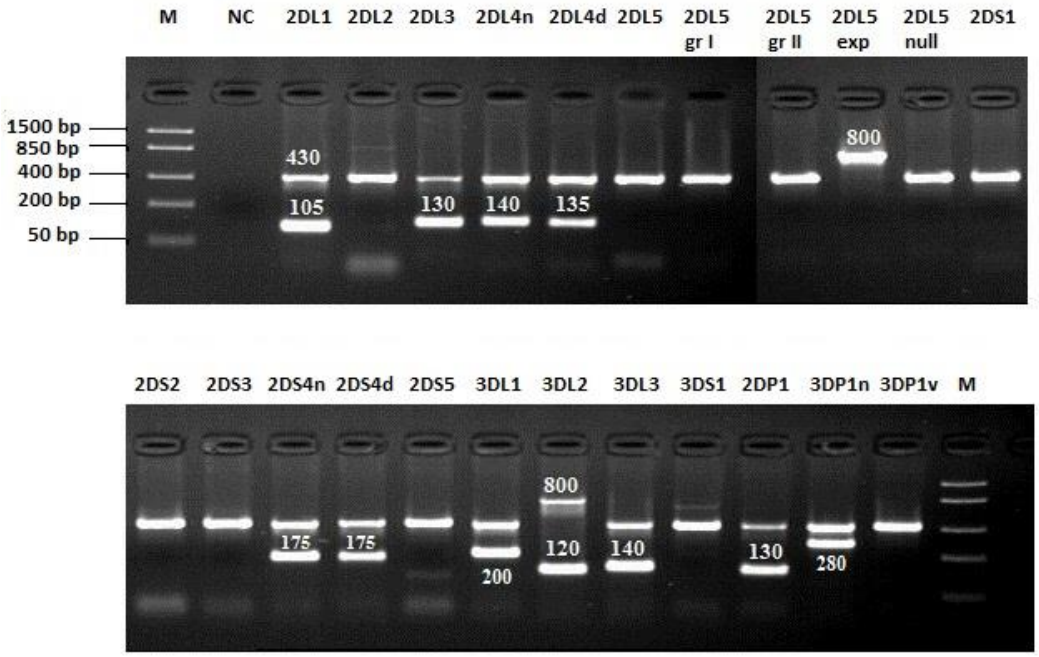
Wstępna denaturacja	96°C	2 min	
Denaturacja	96°C	15 s	10x
Wiązanie starterów	65°C	60 s	
Denaturacja	96°C	15 s	20x
Wiązanie starterów	61°C	50 s	
Wydłużanie końcowe	72°C	30 s	
Zatrzymanie reakcji	4°C		

Po zakończonej reakcji PCR przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym. Do sporządzenia żelu użyto bufor TBE 1x stężony. Żel został wybarwiony bromkiem etydyny (0,5 μg/ml). Rozdział elektroforetyczny prowadzono wobec markera masy Fast Ruler Low Range w ilości 2,5 μl w czasie 20 minut przy napięciu 150 V w aparacie do elektroforezy poziomej. W celu wizualizacji produktów PCR żel obserwowano pod lampą UV. Tabela poniżej przedstawia układ testowania poszczególnych genów, wielkość produktów PCR dla kontroli wewnętrznej oraz sekwencje starterów.

Tabela 5. Warianty polimorficzne *KIR*, wielkości produktów PCR dla testowanych genów i kontroli wewnętrznych oraz sekwencje starterów dla poszczególnych wariantów (według producenta).

Tube No.		Amplified KIR Gene Types	Alleles	Size of PCR Product [bp]	Size of IC [bp]	5' primer(s)[1]	3' primer(s)[1]
1	1H	**Negative Control**	-	430	-		
2	1G	**2DL1**	*001-006	105	430	554 GAC	613 CAC
3	1F	**2DL2**	*001-003,005	200	430	391 TCG	547 TGG
4	1E	**2DL3**	*001-006	130	430	1011 CAC	1091 TGC
5[2]	1D	**2DL4 norm**	*001-006,010	140	430	I7 AGT	I7 CTT
6	1C	**2DL4 deleted**	*007-009,011	135	430	I7 AGT	I7 CTT
7	1B	**2DL5 all**	A*001,005 B*002-004 Xa, Xb	130	430	938 TTC	1011 GAT
8	1A	**2DL5** (group 1)	A*001, B*003,004	190	430	681 TCA	823 ATT
9	2H	**2DL5** (group 2)	A*005, B*002, Xa,Xb	190	430	681 TCA	823 ATC
10[3]	2G	**2DL5 expressed**	A*001,005 (Xa, Xb ?)	315	**800**	-105 CCG	I1 TCC
11[4]	2F	**2DL5 null**	B*002,004 (Xa, Xb ?)	310	430	-98 GTA	I1 TCC
12	2E	**2DS1**	*002,003	105	430	554 GAA	613 CAA
13	2D	**2DS2**	*001-005	195	430	478 GTA	618 AGC
14	2C	**2DS3**	*001	85	430	512 CAT	554 GCC
15	2B	**2DS4 norm**	*001,002	175	430	766 CCA	895 AGC
16	2A	**2DS4 (del-22bp)**	*003,004,006	175	430	766 CCA	895 AGC
17	3H	**2DS5**	*001-005	90	430	512 CAT	545 GTG
18[5]	3G	**3DL1**	*001-008,015-019	200	430	123 CGA	281 ATG
19	3F	**3DL2**	*001-013	120	**800**	812 CAA	896 GGG
20	3E	**3DL3**	*001-004	140	430	563 TGC	652 TAC
21	3D	**3DS1**	*010-014	215	430	1146 AGT	1217 TGA
22	3C	**2DP1**	*001,002	130	430	556 TGG	644 ATG
23[6]	3B	(3DP1 variant) **3DP1 norm**	[*001,002,004 (w)] *003	(1740) 280	430	30 TGT	223 TAC
24[7]	3A	**3DP1 variant**	*001,002,004	975	430	56 GGC	223 TAC

Przykładowy elektroforegram 23 wariantów polimorficznych genów *KIR* przedstawiono na **Rycinie 10.**



Rycina 10. Zdjęcie modelowe z genotypowania zestawem KIR Ready-Gene przedstawiające wielkości produktów PCR.

Osoba, której DNA zostało poddane genotypowaniu jest pozytywna pod względem genów: *KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL4n, KIR2DL4d, KIR2DS4n, KIR2DS4d, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1, KIR3DP1n*. M – marker masy, NC (*negative control*) – kontrola negatywna, bp (*base pair*) – pary zasad. Ze względu na krzyżowe reakcje starterów dla genów KIR2DL5 „expressed" i „null" z KIR3DP1 variant, nie wzięto tych genów pod uwagę podczas analiz statystycznych.

3.4.4. Typowanie genów *HLA-C*

W celu określenia allotypów *HLA-C* C1 i C2 u poszczególnych osób, przeprowadzono reakcję PCR metodą PCR-SSP z użyciem starterów specyficznych do sekwencji. Poniższa **Tabela 6** przedstawia informacje dotyczące użytych starterów, według Frohn i wsp. (1998) [261].

Tabela 6. Sekwencje starterów użytych do genotypowania allotypów *HLA-C*.

Nazwa startera	Sekwencja startera	Produkt PCR	Wielkość produktu (pz)
HLA-CwS*	5'-CGCCGCGAGTCCRAGAGG-3'		
NK1	5'-GTTGTAGTAGCCGCGCAGT-3'	C2	139
NK2	5'-GTTGTAGTAGCCGCGCAGG-3'	C1	139
CRP(S)	5'-CCAGCCTCTCTCATGCTTTTGGCCAGACAG-3'	Kontrola wewnętrzna	440
CRP(AS)	5'-GGGTCGAGGACAGTTCCGTGTAGAAGTGGA-3'		

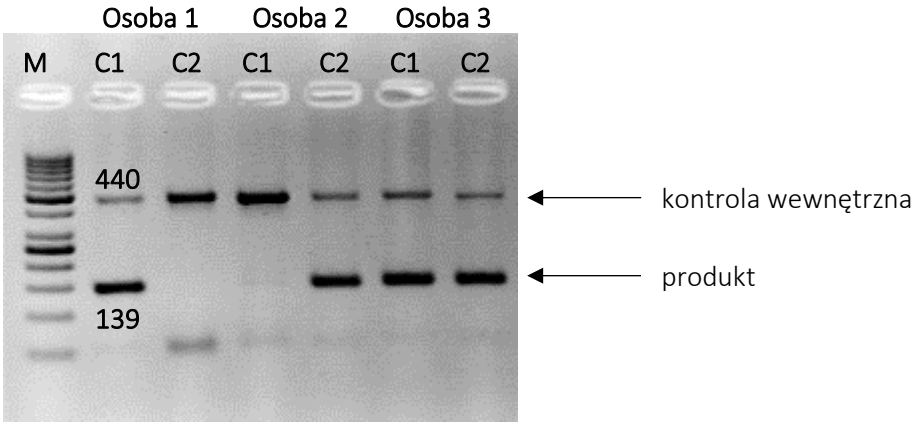
*wspólny starter

Dla każdej próbki przygotowano dwie mieszaniny reakcyjne, które różniły się jedynie starterem NK1/NK2. Mieszanina reakcyjna o całkowitej objętości 10 µl dla jednej próbki zawierała: 1 µl DNA (30 ng/µl), 1 µl buforu do polimerazy Taq 10x, 0,6 µl $MgCl_2$ (25 mM), 0,2 µl dNTPs (10 mM), 0,15 µl CRP(S) (10 µM), 0,15 µl CRP(AS) (10 µM), 0,5 µl HLA-CwS (10 µM), 0,5 µl NK1 lub NK2 (10 µM), 0,08 µl polimerazy Taq (5 U/µl), 5,82 µl wody miliQ. Kontrola negatywna zawierała 1 µl wody miliQ zamiast DNA. Reakcję amplifikacji przeprowadzono ponownie z wykorzystaniem termocyklera T100 Bio-Rad (Polska).

Przebieg reakcji PCR:

Wstępna denaturacja	95°C	10 min	
Denaturacja	95°C	10 s	35x
Wiązanie starterów	59°C	30 s	
Powielanie	72°C	30 s	
Wydłużanie właściwe	72°C	5 min	
Zatrzymanie reakcji	12°C		

Po zakończonej reakcji przeprowadzono elektroforezę w żelu agarozowym o stężeniu 3%. Czas elektroforezy wynosił w tym przypadku 30 min przy napięciu 150 V. Zdjęcie modelowe z typowania *HLA-C* C1 oraz C2 przedstawiono na **rycinie 11**.



Rycina 11. Zdjęcie modelowe z genotypowania *HLA-C* C1 i C2.

Osoba 1 to homozygota *HLA-C* C1C1, osoba 2 to homozygota C2C2, osoba 3 jest heterozygotą C1C2. M – marker masy.

3.4.5. Typowanie polimorfizmu 14-nukleotydowej insercji/delecji (rs371194629) w genie *HLA-G*

Oznaczanie 14-nukleotydowej insercji/delecji w regionie 3'UTR genu *HLA-G* (rs371194629) przeprowadzono metodą PCR-SSP. Mieszanina reakcyjna o objętości 10 µl dla każdej z osób zawierała: 1 µl DNA (100 ng/µl), 1 µl buforu do polimerazy Taq 10x, 0,6 µl $MgCl_2$ (25 mM), 0,4 µl dNTPs (10 mM), 0,6 µl startera Indel F (5 µM), 0,6 µl startera Indel R (5 µM), 0,12 µl polimerazy Taq (5 U/µl) oraz 5,68 µl wody miliQ.

Sekwencje starterów oraz wielkość produktów przedstawiono w **Tabeli 7**.

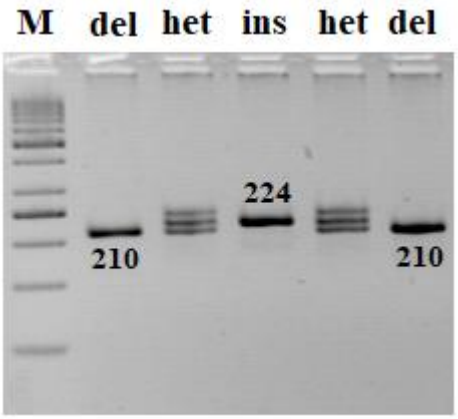
Tabela 7. Sekwencje starterów użytych do genotypowania insercji/delecji w genie *HLA-G*.

Nazwa startera	Sekwencja startera	Wielkość produktu (pz)
HLA-G Indel F	5'-GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC-3'	224 lub 210
HLA-G Indel R	5'-GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA-3'	

Warunki reakcji PCR przeprowadzonej na termocyklerze T100:

Wstępna denaturacja	94°C	4 min	
Denaturacja	95°C	30 s	35x
Wiązanie starterów	64°C	30 s	
Powielanie	72°C	30 s	
Wydłużanie właściwe	72°C	3 min	
Zatrzymanie reakcji	12°C		

Elektroforezę prowadzono przez 1h 20 min przy napięciu 130 V w żelu agarozowym o stężeniu 4%. Zdjęcie modelowe przedstawiające rozdział elektroforetyczny dla 5 osób pokazano na **Rycinie 12**. Dwie z tych osób są homozygotami delecyjnymi (del: -14 pz/-14 pz), dwie są heterozygotami (het: +14 pz/-14 pz), jedna osoba jest homozygotą insercyjną (+14 pz/+14 pz).



Rycina 12. Zdjęcie modelowe z typowania 14-nukleotydowej insercji/delecji w genie *HLA-G*.

del – homozygota delecyjna**,** het – heterozygota**,** ins – homozygota insercyjna

3.4.6. Oznaczanie polimorfizmów w miejscach rs1632947: c.-964G>A oraz rs1233334: c.-725G>C/T w genie *HLA-G*

Polimorfizmy znajdujące się w promotorze genu *HLA-G*, tj.: rs1632947: c.-964G>A oraz rs1233334: c.-725G>C/T genotypowano metodą PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR* – RT-PCR). W tym celu użyto zestawów TaqMan SNP Genotyping Assay firmy Applied Biosystems (USA), które służą do amplifikacji i wykrywania określonych alleli w genomowym DNA. Zestawy te zawierały startery (sensowny i antysensowny) oraz specyficzne do allelu sondy. Sondy znakowane były znacznikami fluorescencyjnymi (VIC i FAM). Użyto również TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, USA), który zawierał polimerazę oraz dNTPs. Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednej próbki podano w tabeli poniżej (**Tabela 8**). Kontrola negatywna stanowiła mieszaninę reakcyjną bez DNA (zamiast tego zastosowano wodę miliQ).

Genotypowanie przeprowadzono używając 96-dołkowych płytek MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific, USA) na aparacie 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

Wszystkie genotypy GG i GT polimorfizmu rs1233334: c.-725G>C/T potwierdzono przez sekwencjonowanie, które wykonano w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej do genotypowania *HLA-G* metodą RT-PCR.

Odczynnik	Objętość [µl]
DNA (4 ng/µl)	4,75
TaqMan Genotyping Master Mix (2x)	5
Sondy TaqMan SNP Genotyping Assay (40x)	0,25
Objętość całkowita	10

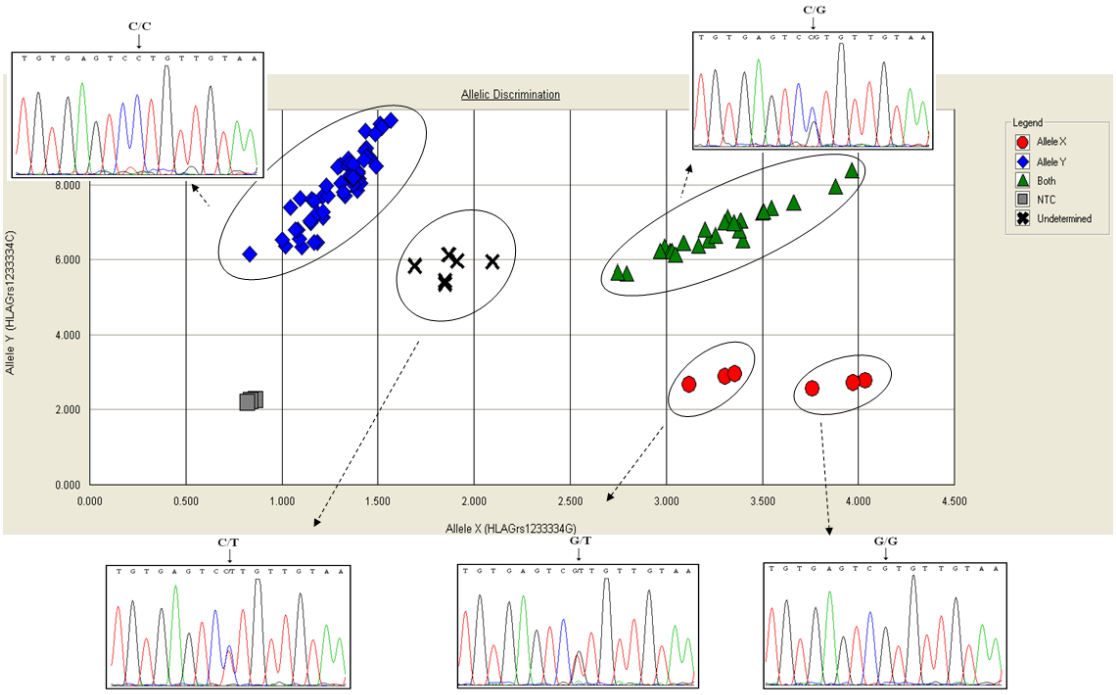
Sekwencje starterów i sond badanych polimorfizmów *HLA-G* przedstawia tabela poniżej (**Tabela 9)**.

Tabela 9. Polimorfizmy *HLA-G* badane metodą RT-PCR oraz ich sondy.

SNP	Sekwencja startera	Sonda
rs1632947 (G>A)	F: 5′-CCACTCACATGTGGATACTTCCTAAA-3′	VIC-5′-AGGCAGTGCGTGAGC A-3′-MGB
	R: 5′-CAGTCACAATGCCCCTCACTAG-3′	FAM-5′-AGGCAGTGCATGAGCA-3′-MGB
rs1233334 (G>C/T)	F: 5′-ACTGTCTGGGAAAGTGAAACTTAAGAG-3′	5′-VIC-CTTTGTGAGTCGTGTTGTA-NFQ-3′
	R: 5′-AATGTGACTTTGGCCTGTTGGTATA-3′	5′-FAM-CTTTGTGAGTCCTGTTGTA-NFQ-3′

F – starter przedni (*forward*)
R – starter wsteczny (*reverse*)

Reakcja PCR na aparacie przebiegała w następujących warunkach: 95°C przez 10 minut (95°C przez 15 s, 60°C przez 1 min) × 40 cykli. **Rycina 13** przedstawia rozkład genotypów po analizie dyskryminacji alleli w polimorfizmie rs1233334 (G>C/T).



Rycina 13. Zdjęcie modelowe z genotypowania *HLA-G* rs1233334 (G>C/T) metodą RT-PCR.

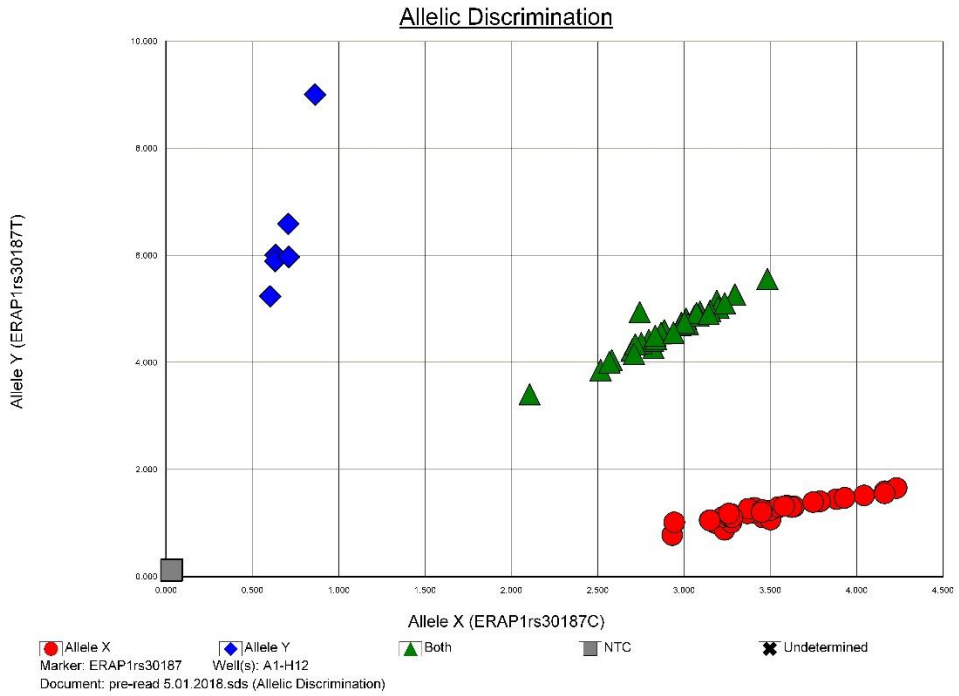
Kolor niebieski – genotyp CC, kolor czarny – genotyp CT, kolor zielony – genotyp CG, kolor czerwony – genotyp GG lub GT

3.4.7. Oznaczanie polimorfizmów aminopeptydaz siateczki śródplazmatycznej ERAP1 i ERAP2

Polimorfizmy genów *ERAP1* i *ERAP2* oznaczono metodą RT-PCR przy użyciu zestawów TaqMan SNP Genotyping Assay firmy Applied Biosystems (USA). Procedura i skład mieszaniny reakcyjnej zostały opisane w podrozdziale **3.4.6**. Reakcję przeprowadzono na aparacie 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) w następujących warunkach: 95°C przez 10 minut (95°C przez 15 s, 60°C przez 1 min) × 40 cykli. Charakterystyka badanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) została przedstawiona w **Tabeli 10**. Na **Rycinie 14** pokazano rozkład genotypów dla *ERAP1* rs30187 (C>T).

Tabela 10. Badane polimorfizmy *ERAP1* i *ERAP2*.

Gen	SNP	Zmiana w DNA	Zmiana w białku	Potencjalny efekt	Numer identyfikacyjny sondy	Sekwencja sondy [VIC/FAM]
ERAP1	rs26653	G>C	Arg127Pro	Aktywność enzymatyczna, poziom ekspresji [219]	C__794818_30	AGCCAGCAGTGCAATTTGCTCCTGA[C/G]GGGGGTGTTCCAGGACCTGCAGGGG
ERAP1	rs2287987	T>C	Met349Val	Interakcja z substratem [219]	C__3056893_20	TGAGCCAGTTCATGGGCCACAGTCA[C/T]TGTGATGCCAAGCTTACTTGATGCA
ERAP1	rs30187	C>T	Arg528Lys	Aktywność enzymatyczna, poziom ekspresji [214]	C__3056885_10	TGTGATGGTTATTAGGGGAAAACCC[C/T]TCTGCAGTGTCCAAGTGTTCATCAT
ERAP1	rs27044	C>G	Gln730Glu	Aktywność enzymatyczna, preferencja do długości substratu [219]	C__3056870_10	TGCACACAGGCGAGGAGTAGTAGTT[C/G]ACTCCGCAGCATTCGCTCTGAGACT
ERAP1	rs26618	T>C	Ile276Met	Wpływ na wydajność przycinania peptydu prekursorowego dla epitopu związanego z HLA-C*05 [262]	C__3056894_10	CATCCAGTGCATAATCTGCTTGATT[C/T]ATCTTGTCTGGCACAGCATAAACAG
ERAP1	rs6861666	A>G	Intron	Niezrównoważenie sprzężeń z rs75862629, który ma wpływ na poziom ekspresji ERAP1 i ERAP2 [263]	C__29091789_20	ATTTGCAGATTTGGAAGAGGAAACC[A/G]AGAGGCAGACTAAGCTTTTGATAGT
ERAP2	rs2248374	A>G	Intron	Brak ekspresji funkcjonalnej formy enzymu [264, 265]	C__25649529_10	ATCCCAAGATGACAAGTAACATGGT[A/G]AGGATAAAGAGAGTCACAGAGTAGA



Rycina 14. Genotypowanie ERAP1 rs30187 (C>T) metodą RT-PCR.

Kolor niebieski – genotyp TT, kolor zielony – genotyp CT, kolor czerwony – genotyp CC

3.4.8. Badanie stężenia rozpuszczalnej cząsteczki sHLA-G

3.4.8.1. Badanie sHLA-G w osoczu krwi

Stężenie rozpuszczalnej formy HLA-G (sHLA-G) w osoczu kobiet przed i po transferze zarodka oraz w osoczu kontrolnych kobiet płodnych oznaczano stosując test immunoenzymatyczny ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*). W tym celu korzystano z komercyjnych zestawów do oznaczania ludzkiego sHLA-G (ELISA kit) firmy Exbio/Biovendor (Czechy). Stężenie oznaczano w międzynarodowej jednostce IU/ml (IU – ang. *international unit*). Krzywa kalibracyjna wyznaczała stężenie izoform HLA-G G1 i G5 w zakresie od 3,91 do 125 IU/ml. Granica wykrywalności w tym teście wynosiła 0,6 IU/ml.

Osocze było przechowywane w temperaturze -80°C i rozmrażane bezpośrednio przed testem. Próbki rozcieńczono buforem do rozcieńczania 2 (Dilution Buffer 2) w stosunku 1:8. Kalibratory odtworzono zgodnie z protokołem producenta, stosując szereg rozcieńczeń i wykorzystując bufor do rozcieńczania 1 (Dilution Buffer 1) oraz liofilizowany Master Calibrator. Rozcieńczone próbki osocza oraz kalibratory nakładano w ilości 100 µl na studzienki płytki 96-dołkowej opłaszczonej monoklonalnym przeciwciałem anty-sHLAG. Płytkę inkubowano w temperaturze 2-8°C przez 16-20 h bez wstrząsania. Po inkubacji próbki

przemywano 5-krotnie przy użyciu bufora płuczącego (Wash Buffer). Następnie do studzienek dodano roztwór koniugatu (Conjugate Diluent), zawierający przeciwciało monoklonalne anty-β2-mikroglobulinę znakowane peroksydazą chrzanową (HRP), w ilości po 100 µl na każdą studzienkę. Płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej (około 25°C) przez 1 h na wytrząsarce o obrotach 300 rpm. Po inkubacji płytkę płukano 5-krotnie. W kolejnym etapie dodano 100 µl roztworu substratu (Substrate Solution) i inkubowano płytkę w temperaturze pokojowej przez 25 minut, bez wytrząsania i chroniąc płytkę przed światłem. Reakcję zatrzymano dodając 100 µl roztworu Stop Solution. Pomiar stężenia i odczyt wyników wykonano na czytniku Tecan Sunrise (Tecan Trading AG, Szwajcaria) przy długości fal 450 nm.

3.4.8.2. Badanie sHLA-G w nasieniach

Próbki nasień zebrane od mężczyzn przystępujących do zapłodnienia metodą *in vitro* poddano wirowaniu przez 15 min. przy 300 rpm. Do badań zebrano górną warstwę (nadsącz) znad osadu plemników. Badanie sHLA-G przeprowadzono metodą ELISA zestawem firmy Exbio/Biovendor (Czechy). Nadsącza z nasień rozcieńczano buforem do rozcieńczania 1 (Dilution Buffer 1) w stosunku 1:4. Dalszy tok procedury wykonano tak, jak w przypadku oznaczania sHLA-G w osoczu kobiet.

3.4.9. Oznaczanie stężenia ERAP1 i ERAP2 w osoczu krwi

Stężenie aminopeptydaz ERAP1 i ERAP2 w osoczu kobiet przed i po transferze zarodka oraz kontrolnych kobiet płodnych oznaczono testem ELISA, korzystając z komercyjnych zestawów do oznaczania ludzkiego ERAP1 oraz ERAP2 (Human ERAP1/2 Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1/2 ELISA Kit) firmy Wuhan EIAab Science Co (Chiny). Poziom ERAP1 i ERAP2 mierzono w ng/ml. Zakres krzywej kalibracyjnej dla ERAP1 wynosił od 0,15 do 10 ng/ml, a dla ERAP2 od 0,31 do 20 ng/ml. Granica wykrywalności testu dla ERAP1 wynosiła 0,085 ng/ml, podczas gdy dla ERAP2 było to mniej niż 0,16 ng/ml.

Próbki osocza przechowywane w -80°C rozmrożono bezpośrednio przed rozpoczęciem procedury badawczej. Przygotowano szereg rozcieńczeń dla kalibratorów wykorzystując bufor do rozcieńczeń (Sample Diluent). Zarówno dla ERAP1 jak i ERAP2 przebieg procedury był ten sam. Próbki i kalibratory nakładano w ilości 100 µl na 96-dołkową płytkę opłaszczoną specyficznym przeciwciałem dla ERAP1 lub ERAP2. Następnie płytki inkubowano przez 2 h w 37°C. Po inkubacji dodano 100 µl roztworu detekcyjnego A (Detection Reagent A),

zawierającego przeciwciało związane z biotyną, swoiste dla danego ERAP. Płytkę inkubowano przez 1 h w 37°C. Następnie próbki 3-krotnie przemywano buforem Wash Buffer. W kolejnym etapie dodawano 100 µl roztworu detekcyjnego B (Detection Reagent B), który stanowiła awidyna związana z peroksydazą chrzanową (HRP). Płytkę inkubowano przez 1 h w 37°C, a następnie 5-krotnie płukano. Do próbek dodano 90 µl substratu i inkubowano przez 15-20 minut w 37°C chroniąc płytkę przed światłem. Po tym czasie rekcję przerwano dodając roztworu Stop Solution w ilości 50 µl. Dokonano pomiaru absorbancji i odczytu stężeń za pomocą czytnika Tecan Sunrise (Tecan Trading AG, Szwajcaria) przy długości fal 450 nm.

3.4.10. Analiza statystyczna

Częstości genów *KIR*, *HLA*, *ERAP* oraz ich kombinacji porównano stosując dwustronny test Fishera w programie R wersji 3.4.3. Za wyniki istotne statystycznie uznawano wartości $p<0,05$. Szacowano również iloraz szans (ang. *odds ratio* – OR) oraz 95% przedział ufności (ang. *confidence interval* – CI), aby zbadać potencjalny wpływ ochronny lub predysponujący badanych polimorfizmów do wystąpienia choroby/zjawiska. Sprawdzano również, czy częstości określonych genotypów zarówno u pacjentów, jak i w grupie kontrolnej, są zgodne z rozkładem oczekiwanym według prawa Hardy'ego-Weinberga (H-W). W tym celu użyto testu Chi-kwadrat (χ^2). Wartość $p>0,05$ oznaczała, że rozkład genotypów był zgodny z prawem równowagi Hardy'ego-Weinberga. Stosowano również poprawkę Bonferroniego dla porównań wielokrotnych. Haplotypy dla genów *HLA-G* oraz *ERAP1/ERAP2* wygenerowano w programie FAMHAP (http://famhap.meb.uni-bonn.de).

Analizę statystyczną dla danych ilościowych (oznaczanie sHLA-G, ERAP1, ERAP2) przeprowadzono w programie GraphPad Prism 5. Zastosowano statystyki opisowe oraz badano normalność rozkładu zmiennych testem D'Agostino-Pearsona. W przypadku rozkładu normalnego stosowano parametryczny test *t* – studenta dla prób niezależnych. Przy braku normalności rozkładu zmiennych stosowano nieparametryczny test Manna-Whitneya. Korelacje pomiędzy zmiennymi oceniano na podstawie współczynnika korelacji rang Spearmana. W przypadku porównań zmiennych co najmniej 3 grup niezależnych, stosowano analizę wariancji testem Kruskala-Wallisa.

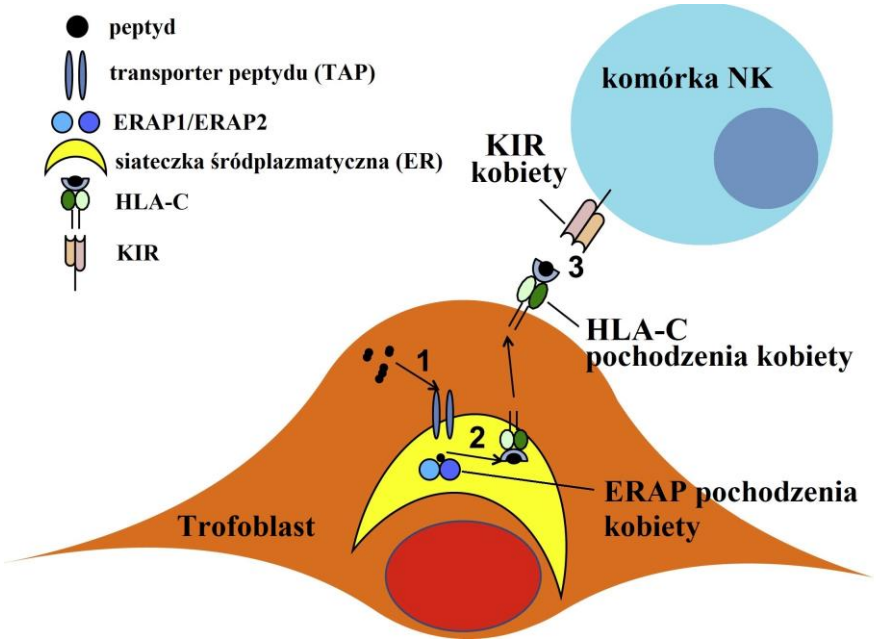
W celu określenia odpowiedniej liczebności badanych grup, przy założeniu mocy testu na poziomie 80%, korzystano z kalkulatora mocy testu. Dla dwustronnego testu Fishera użyto kalkulatora dostępnego online pod adresem:
https://homepage.univie.ac.at/robin.ristl/samplesize.php?test=fishertest.

Aby ocenić zdolność predykcyjną poszczególnych zmiennych, stosowano analizę ROC (ang. *receiver operating characteristic*). W ramach analizy ROC wyznaczano AUC (ang. *area under curve*) – pole powierzchni pod krzywą ROC oraz wartość progową (punkt odcięcia *cut off*) o optymalnej czułości i swoistości testu. Analizę ROC przeprowadzano w programie GraphPad Prism 5.

4. Wyniki

4.1. Ocena związku genów *KIR*, *HLA-C* i *ERAP* z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka u kobiet

Udana implantacja zarodka może zależeć od odpowiedzi komórek NK matki wobec niego. Matczyne komórki NK ekspresjonują receptory KIR. Zarodek dziedzicząc geny w połowie od matki i ojca, ekspresjonuje zarówno matczyne, jak i ojcowskie HLA-C na komórkach trofoblastu oraz ERAP w siateczce śródplazmatycznej. W poniższych analizach badano wpływ genów *KIR*, *ERAP* i *HLA-C* kobiety na niepowodzenia implantacji zarodka. Na **Rycinie 15** przedstawiono rozważane interakcje na styku matczyno-płodowym.



Rycina 15. Schemat ilustrujący testowane *KIR*, *HLA-C* i *ERAP* w kontekście implantacji zarodka. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee (2017) [266].

4.1.1. Częstość genów *KIR* oraz genotypów *KIR* i *HLA-C*

W pierwszym etapie analiz porównano częstość występowania poszczególnych genów *KIR* wśród wszystkich kobiet, które poddały się zapłodnieniu pozaustrojowemu, kobiet z RIF, SIVF oraz kontrolnych kobiet płodnych. Nie stwierdzono istotnych różnic w częstościach pojedynczych genów *KIR* (**Suplement**, **Tabela 1S**). Porównano również częstości genotypów. Genotyp AA charakteryzuje się występowaniem w większości genów dla receptorów hamujących. Osoby o genotypie AA posiadają geny *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DS4*, *KIR3DL1*,

natomiast nie posiadają genów *KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5* i *KIR3DS1*, które są charakterystyczne dla genotypu Bx. Tak więc, osoby o genotypie Bx, czyli BB+AB posiadają zarówno geny dla receptorów hamujących, jak również geny dla receptorów aktywujących w różnych kombinacjach. Geny *KIR* podzielono także według ich obecności w regionie centromerycznym lub telomerycznym haplotypów A i B:

- CenA – posiada KIR2DL3,
- CenB – posiada KIR2DL2 i KIR2DS2,
- TelA – posiada KIR3DL1 i KIR2DS4,
- TelB – posiada KIR2DS1 i KIR3DS1.

Porównanie częstości genotypów u wszystkich badanych grup kobiet oraz kontrolnych kobiet płodnych nie wykazało różnic istotnych statystycznie (**Suplement**, **Tabela 1S**). Analizowano również allotypy *HLA-C*: C1 i C2 i również nie stwierdzono różnic pomiędzy grupami badanych kobiet (**Suplement**, **Tabela 1S**). W kolejnym etapie postanowiono sprawdzić, jaka była częstość występowania klinicznej ciąży lub braku ciąży i poronień u kobiet o genotypie *KIR* AA, *KIR* AB i *KIR* BB i porównać je między sobą. Otrzymano następujące wyniki:

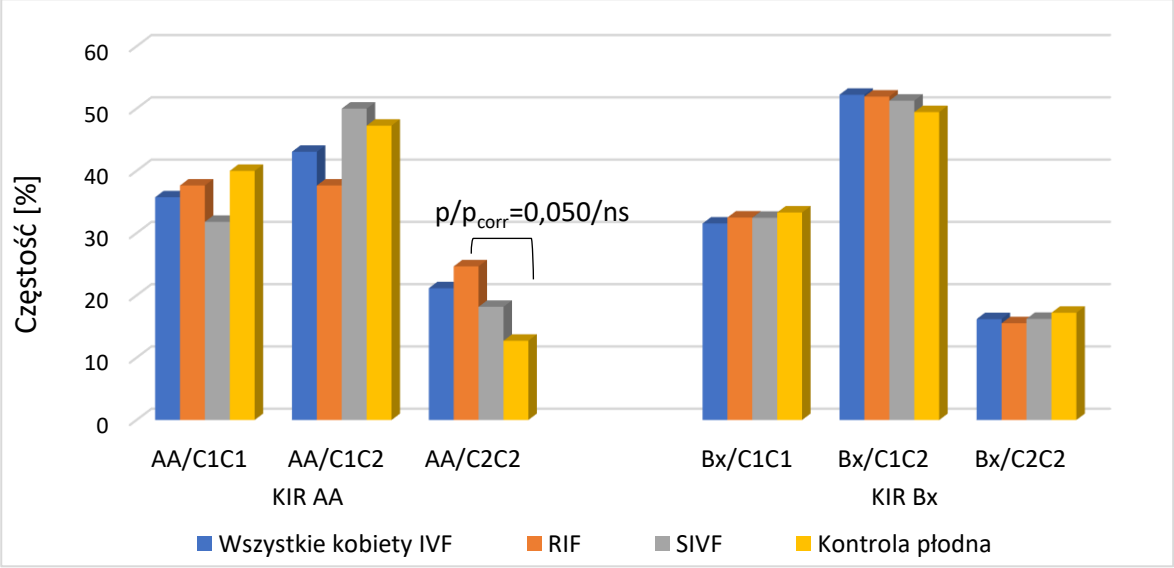
- Liczba kobiet o genotypie *KIR* AA, które zaszły w ciążę po *in vitro* wyniosła 51 (36,96%); liczba kobiet o genotypie *KIR* AA, które nie zaszły w ciążę lub miały poronienie wyniosła 87 (63,04%)
- Liczba kobiet o genotypie *KIR* AB, które zaszły w ciążę po *in vitro* wyniosła 140 (40,35%); liczba kobiet o genotypie *KIR* AB, które nie zaszły w ciążę lub doznały poronienia wyniosła 207 (59,65%)
- Liczba kobiet o genotypie *KIR* BB, które zaszły w ciążę po *in vitro* wyniosła 6 (54,55%); liczba kobiet o genotypie *KIR* BB, które nie zaszły w ciążę lub doświadczyły poronienie wyniosła 5 (45,45%).

Niestety nie uzyskano wyników istotnie statystycznych ($p>0,05$).

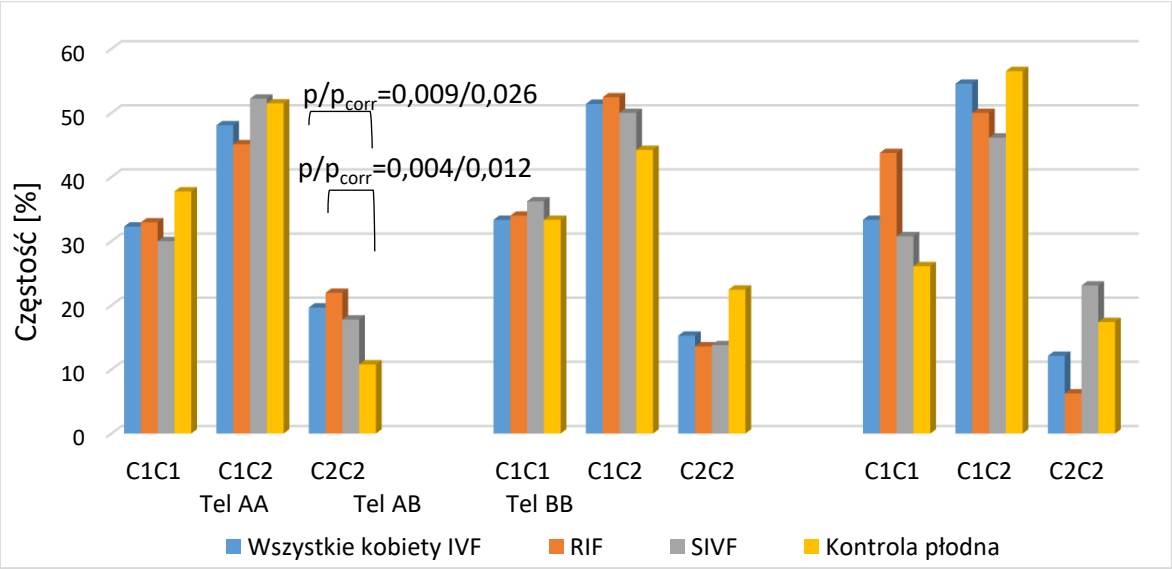
4.1.2. Kombinacje genotypów *KIR* AA i Bx z *HLA-C* C1 i C2

W kolejnym etapie analizowano częstość występowania kombinacji genotypów *KIR* AA i Bx z allotypami HLA-C1 i C2 u wszystkich kobiet IVF, RIF, SIVF i porównywano je z częstościami tych kombinacji u kontrolnych kobiet płodnych. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 2S** (**Suplement**) oraz na **Rycinach 16-18**. Kobiety o genotypie *KIR* AA (Cen AA/Tel

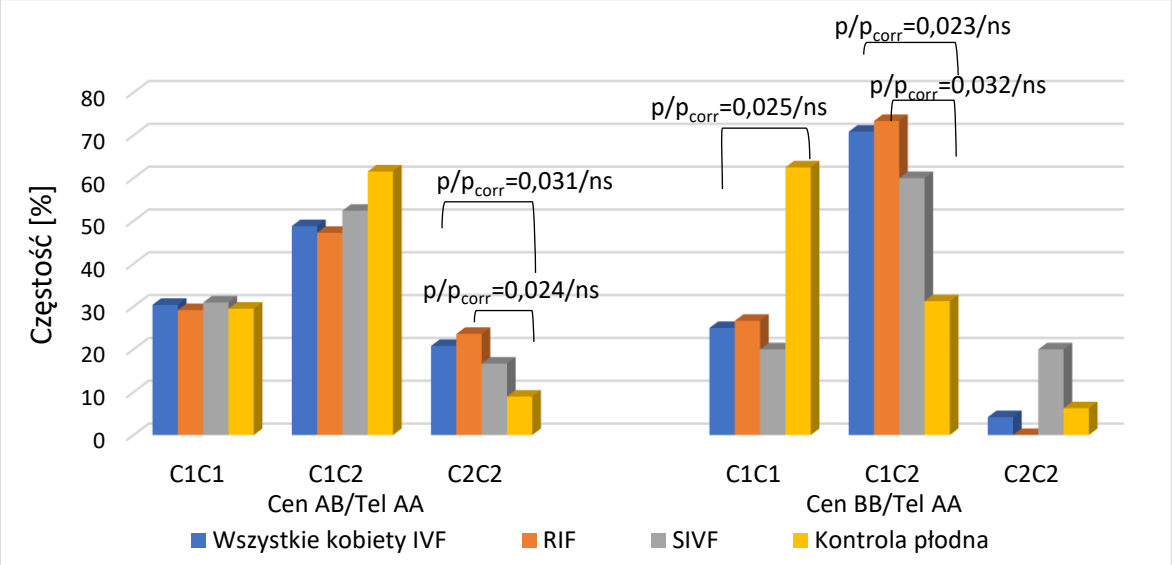
AA), pozytywne pod względem *HLA-C* C2C2, miały ponad dwukrotnie większe ryzyko wystąpienia niepowodzenia implantacji zarodka ($^{a}p/p_{corr.}$=0,050/ns, OR=2,236) niż kobiety nieposiadające takiej kombinacji (**Rycina 16**). W grupie kobiet z RIF 24,68% posiadało taką kombinację, natomiast w grupie kobiet płodnych 12,73%. Kombinacja Tel AA/C2C2 występowała częściej u wszystkich kobiet z IVF (19,65%) niż u kobiet płodnych (10,78%). Różnica ta była istotna statystycznie nawet po zastosowaniu korekty Bonferroniego ($^{b}p/p_{corr}$=0,009/0,026, OR=2,020), co może wskazywać na związek z niepłodnością. Co więcej, układ ten występował również częściej w grupie kobiet z RIF (21,95%) niż w grupie kontrolnej (10,78%) ($^{c}p/p_{corr.}$=0,004/0,012, OR=2,321) (**Rycina 17**). Zaobserwowano, że kombinacja Cen AB/Tel AA/C2C2 występowała częściej u wszystkich kobiet IVF i RIF niż w kontroli płodnej ($^{e}p/p_{corr.}$=0,031/ns, OR=2,652 dla kobiet z IVF; $^{f}p/p_{corr.}$=0,024/ns, OR=3,111 dla kobiet z RIF w porównaniu z kontrolą płodną). Również kombinacja Cen BB/Tel AA/C1C2 jest niekorzystna dla zajścia w ciążę (IVF *vs.* KP: $^{h}p/p_{corr.}$=0,023/ns, OR=5,097; RIF *vs.* KP: $^{i}p/p_{corr.}$=0,032/ns, OR=5,66) (**Rycina 18**). W przeciwieństwie do tego, kombinacja Cen BB/Tel AA/C1C1 była częstsza u kobiet z kontroli płodnej niż u kobiet z IVF ($^{g}p/p_{corr.}$=0,025/ns, OR=0,209) (**Rycina 18**). Jednakże po korekcie wyniki te straciły istotność statystyczną. Z powyższych analiz można wnioskować, że pojedyncze geny *KIR* i *HLA* u kobiet nie mają wpływu na niepowodzenia implantacji zarodka, natomiast w kombinacjach KIR-HLA, allotyp *HLA-C2* z genami *KIR* Tel AA nie jest korzystny do zajścia w ciążę.



Rycina 16. Kominacje *KIR/HLA-C* u kobiet z grup IVF oraz kontroli płodnej.



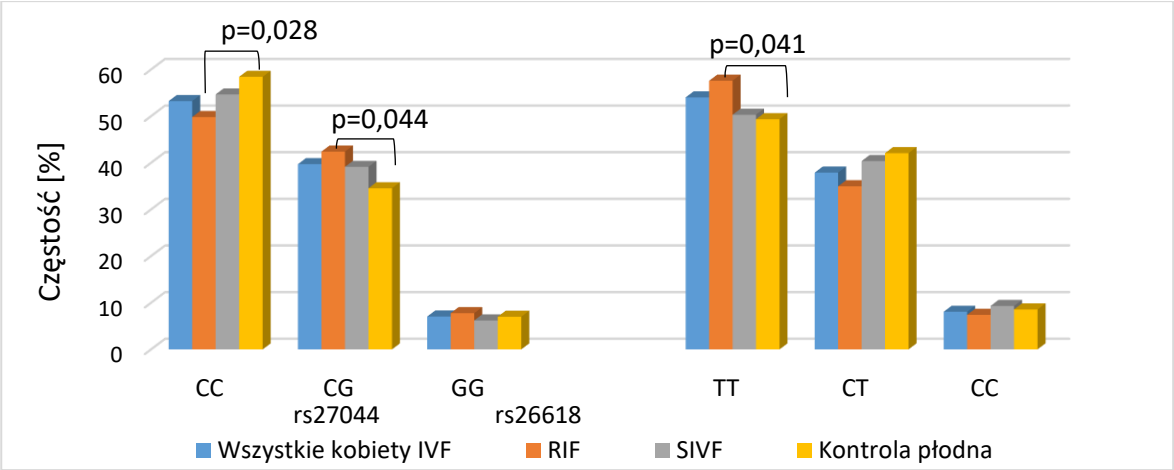
Rycina 17. Kombinacje *KIR* w regionie telomerycznym z *HLA-C* u kobiet z grup IVF oraz kontroli płodnej.



Rycina 18. Kombinacje *KIR* centromeryczny/telomeryczny z *HLA-C* u kobiet z grup IVF i kontroli płodnej.

4.1.3. Częstość genotypów *ERAP1* i *ERAP2*

W przypadku genów *ERAP1* i *ERAP2* zaobserwowano słabe różnice w częstościach genotypów wśród polimorfizmów *ERAP1* rs27044 C>G i *ERAP1* rs26618 T>C. Genotyp CC w miejscu polimorficznym rs27044 był częstszy wśród kobiet kontrolnych niż wśród kobiet z RIF (^{a}p=0,028, OR=0,706), natomiast genotyp CG odwrotnie (^{b}p=0,044, OR=1,394). Genotyp TT w miejscu polimorficznym rs26618 częściej posiadały kobiety z RIF w porównaniu do kobiet z kontroli płodnej (^{c}p=0,041, OR=1,393) (**Suplement**, **Tabela 3S** i **Rycina 19**).



Rycina 19. Częstość genotypów *ERAP1* rs27044 i *ERAP1* rs26618 u kobiet z grup IVF i kontroli płodnej.

4.1.4. Kombinacje genotypów *ERAP1* i *ERAP2* z genotypami *HLA-C1* i *C2* oraz *KIR*

W kolejnym etapie analiz porównano częstości poszczególnych genotypów w polimorfizmach *ERAP1* i *ERAP2* w kombinacjach z *HLA-C C1* i *C2* lub z genotypami *KIR* AA i Bx, a także w potrójnych kombinacjach *ERAP/HLA-C/KIR*. Z uwagi na wiele zaobserwowanych istotności statystycznych, które miały słaby efekt istotności, wyniki umieszczono w tabelach suplementarnych (**Suplement: 4S-12S**). Najbardziej istotne wyniki umieszczono w zbiorczej **Tabeli 11** i omówiono poniżej.

Tabela 11. Kombinacje *ERAP/HLA-C* i *KIR* u pacjentek i kobiet z kontroli.

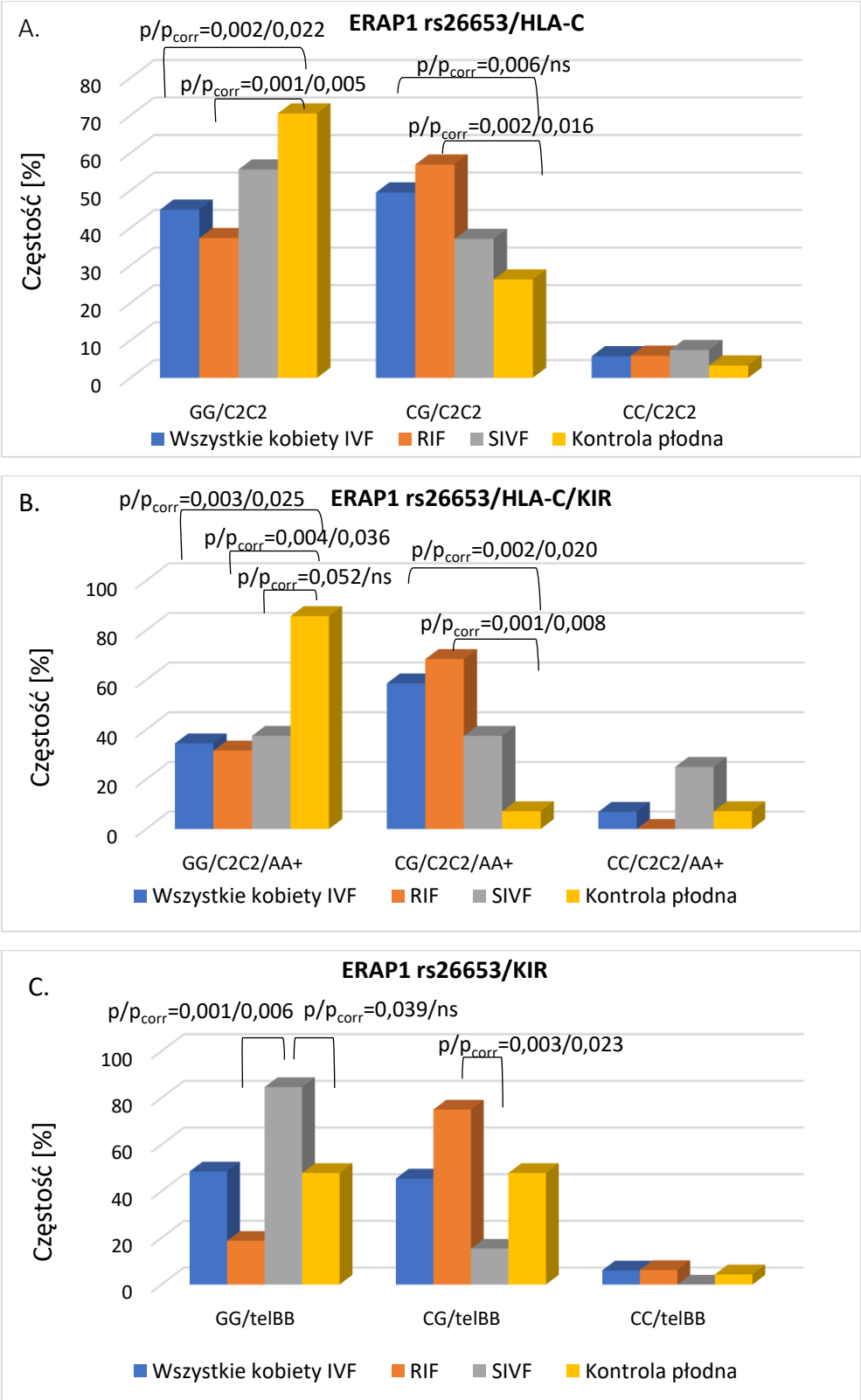
Rodzaj kombinacji ERAP, HLA-C, KIR	Kombinacja	Porównanie	p	$p_{corr.}$	OR	95% CI	Efekt	Tabela
ERAP1 rs26653 G>C/HLA-C	GG/C2C2	IVF *vs.* KP	0,002	0,022	0,343	0,16-0,72	↓	4S
	GG/C2C2	RIF *vs.* KP	0,001	0,005	0,252	0,10-0,59	↓	4S
	CG/C2C2	RIF *vs.* KP	0,002	0,016	3,661	1,56-8,89	↑	4S
ERAP1 rs26653 G>C/KIR	GG/telBB	RIF *vs.* SIVF	0,001	0,006	0,049	0,00-0,38	↓	6S
	CG/telBB	RIF *vs.* SIVF	0,003	0,023	14,54	2,00-191,36	↑	6S
ERAP1 rs26653 G>C/HLA-C/KIR	GG/C2C2/AA	IVF *vs.* KP	0,003	0,025	0,093	0,01-0,54	↓	5S
	GG/C2C2/AA	RIF *vs.* KP	0,004	0,036	0,084	0,01-0,55	↓	5S
	CG/C2C2/AA	IVF *vs.* KP	0,002	0,02	17,289	2,08-823,60	↑	5S
	CG/C2C2/AA	RIF *vs.* KP	0,001	0,008	25,017	2,69-1275,24	↑	5S
ERAP1 rs26618 T>C/HLA-C	TT/C2+	RIF *vs.* KP	0,005	0,029	1,741	1,16-2,61	↑	4S
ERAP1 rs26618 T>C/KIR	TT/cenBB	RIF *vs.* KP	0,005	0,045	0,239	0,07-0,72	↓	7S
ERAP1 rs26618 T>C/HLA-C/KIR	CC/C2+/AA	IVF *vs.* KP	0,005	0,031	0,084	0,00-0,66	↓	5S
ERAP1 rs2287987 T>C/KIR	CT/telBB	IVF *vs.* KP	0,001	0,007	0,111	0,02-0,46	↓	8S
	CT/telBB	RIF *vs.* KP	0,002	0,016	0,055	0,00-0,47	↓	8S
ERAP1 rs6861666 A>G/KIR	AA/cenBB	IVF *vs.* KP	0,001	0,01	7,435	1,87-43,47	↑	9S
	AA/cenBB	RIF *vs.* KP	0,003	0,029	12,373	1,68-553,07	↑	9S
	AG/cenBB	IVF *vs.* KP	0,002	0,02	0,149	0,03-0,60	↓	9S
ERAP2 rs2248374 A>G/KIR	GG/cenAB/telAB	RIF *vs.* SIVF	0,002	0,051	6,262	1,66-35,58	↑	10S

↑ – predyspozycja do choroby; ↓ – ochrona; IVF – wszystkie kobiety poddające się zapłodnieniu *in vitro*; RIF – kobiety z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka po zapłodnieniu *in vitro*; SIVF – kobiety z klinicznie zaawansowaną ciążą po zapłodnieniu *in vitro*; KP – kobiety z kontroli płodnej; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań; OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności. Do analiz zastosowano dwustronny test Fishera.

4.1.4.1. Polimorfizm *ERAP1* rs26653 G>C

W miejscu polimorficznym rs26653 G>C *ERAP1* genotyp GG w kombinacji z *HLA-C* C2C2 występował znacznie częściej u kobiet płodnych niż u wszystkich kobiet IVF oraz kobiet z RIF (odpowiednio: $^{f}p/p_{corr.}$=0,002/0,022, OR=0,343 oraz $^{g}p/p_{corr.}$=0,001/0,005, OR=0,252). Z kolei kombinacja CG/HLA-C2C2 obserwowana była częściej u wszystkich kobiet IVF ($^{h}p/p_{corr.}$=0,006/ns, OR=2,730) oraz kobiet RIF ($^{i}p/p_{corr.}$=0,002/0,016, OR=3,661) w porównaniu do kobiet płodnych (**Suplement**, **Tabela 4S** i **Rycina 20A**). Co więcej, te same kombinacje dawały podobny efekt wśród kobiet pozytywnych pod względem *KIR* AA (**Suplement**, **Tabela 5S**). Odsetek kobiet z kombinacją GG/HLA-C2C2/KIR AA był większy wśród kobiet płodnych w porównaniu do kobiet IVF, RIF i SIVF (odpowiednio: $^{i}p/p_{corr.}$=0,003/0,025, OR=0,093; $^{j}p/p_{corr.}$=0,004/0,036, OR=0,084; $^{k}p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=0,114). Natomiast kobiety z grupy IVF i RIF posiadały częściej niż kobiety płodne kombinację CG/HLA-C2C2/KIR AA (odpowiednio: $^{l}p/p_{corr.}$=0,002/0,020, OR=17,289

i $^{m}p/p_{corr.}$=0,001/0,008, OR=25,017) (**Suplement**, **Tabela 5S** i **Rycina 20B**). Genotyp GG *ERAP1* w kombinacji tylko z genami *KIR* z regionu telomerycznego BB chronił przed RIF (RIF *vs.* SIVF $^{b}p/p_{corr.}$=0,001/0,006, OR=0,049), a genotyp CG predysponował do RIF ($^{d}p/p_{corr.}$=0,003/0,023, OR=14,540). Kombinacja GG/telBB występowała również częściej u kobiet z SIVF niż w kontroli płodnej, ale różnica ta straciła istotność po korekcie Bonferroniego ($^{c}p/p_{corr.}$=0,039/ns, OR=5,712) (**Suplement**, **Tabela 6S** i **Rycina 20C**).



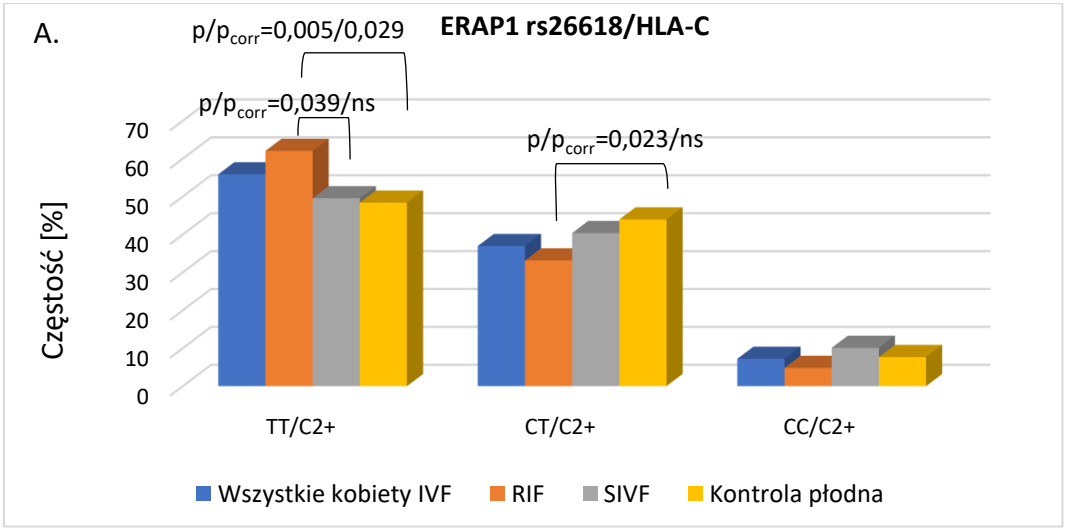
Rycina 20. Porównania częstości genotypów *ERAP1 rs*26653 u kobiet z grup IVF i kontroli płodnej w kombinacjach z *HLA-C* (A), z *HLA-C* i *KIR* (B) oraz z *KIR* (C).

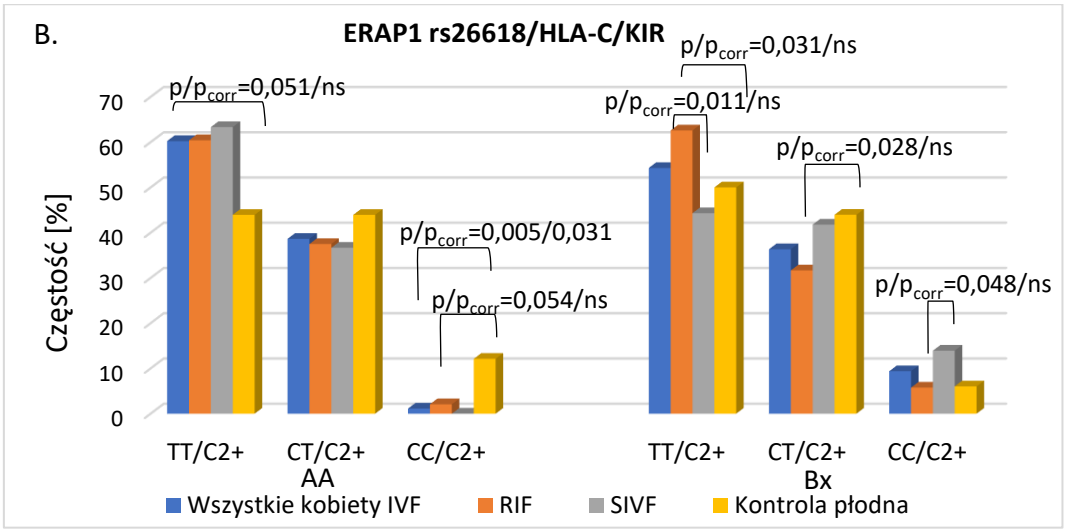
4.1.4.2. Polimorfizm *ERAP1* rs26618 T>C

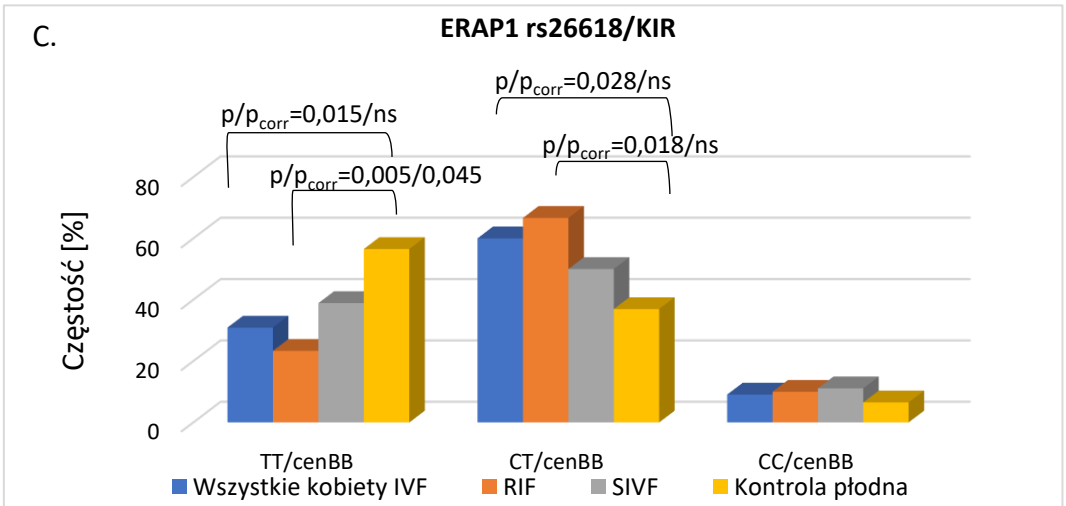
Biorąc pod uwagę genotypy *ERAP1* rs26618 T>C w kombinacji z genotypami *HLA-C*, zaobserwowano związek genotypu TT z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka po *in vitro* wśród kobiet posiadających allotyp *HLA-C* C2. Częstość kombinacji rs26618 TT/HLA-C2+ wśród kobiet z RIF wynosiła 62,03%, natomiast wśród kobiet kontrolnych – 48,39%. Porównanie tych grup dało istotny wynik: $^{j}p/p_{corr.}$=0,005/0,029, OR=1,741 (**Suplement**, **Tabela 4S** i **Rycina 21A**). Kombinacja ta występowała częściej również w grupie kobiet z RIF w porównaniu do grupy kobiet, które zaszły w ciążę po *in vitro* ($^{k}p/p_{corr.}$=0,039/ns, OR=1,661), jednak wynik ten stracił istotność po zastosowaniu korekty na wielokrotność porównań. Odwrotny efekt zaobserwowano w przypadku genotypu CT w kombinacji z HLA-C2+, który obserwowano częściej wśród kobiet kontrolnych ($^{l}p/p_{corr.}$=0,023/ns, OR=0,633) (**Suplement**, **Tabela 4S** i **Rycina 21A**). W potrójnych kombinacjach kobiety TT/HLA-C2+ z KIR AA lub z KIR Bx z grupy IVF, RIF, miały większe ryzyko niepłodności niż kobiety nieposiadające takiej kombinacji (odpowiednio: $^{p}p/p_{corr.}$=0,051/ns, OR=1,924; $^{s}p/p_{corr.}$=0,031/ns, OR=1,670) (**Suplement**, **Tabela 5S** i **Rycina 21B**). Różnica w częstościach kombinacji TT/HLA-C2+/Bx była istotna również w przypadku porównania grupy RIF z SIVF i częściej występowała w grupie kobiet RIF ($^{t}p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=2,096). W przypadku kombinacji CT/HLA-C2+ zachowany był efekt ochronny przed RIF, dla kobiet posiadających genotyp KIR Bx ($^{u}p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=0,592). Jednakże wszystkie te istotności straciły ważność po korekcie.

Z kolei kobiety posiadające kombinację rs26618 CC z HLA-C2+ częściej występowały w kontroli płodnej niż w grupie kobiet IVF pomimo że miały hamujący genotyp KIR AA ($^{q}p/p_{corr.}$=0,005/0,031, OR=0,084). Pozostałe różnice w przypadku kombinacji rs26618/HLA-C/KIR były na granicy istotności (**Suplement**, **Tabela 5S** i **Rycina 21B**).

Kiedy analizowano kombinacje genotypów rs26618 *ERAP1* tylko z genotypami *KIR*, zaobserwowano, że genotyp TT z genami *KIR* w regionie centromerycznym BB wykazywał efekt ochronny, ponieważ jego częstość była większa wśród kobiet płodnych niż wszystkich kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kobiet RIF (odpowiednio: $^{h}p/p_{corr.}$=0,015/ns, OR=0,348; $^{i}p/p_{corr.}$=0,005/0,045, OR=0,239). Natomiast genotyp CT wśród kobiet pozytywnych pod względem *KIR* cen BB predysponował do niepłodności i do RIF. Różnica z kontrolą wyniosła odpowiednio: $^{j}p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=2,534; $^{k}p/p_{corr.}$=0,018/ns, OR=3,354 (**Suplement**, **Tabela 7S** i **Rycina 21C**).



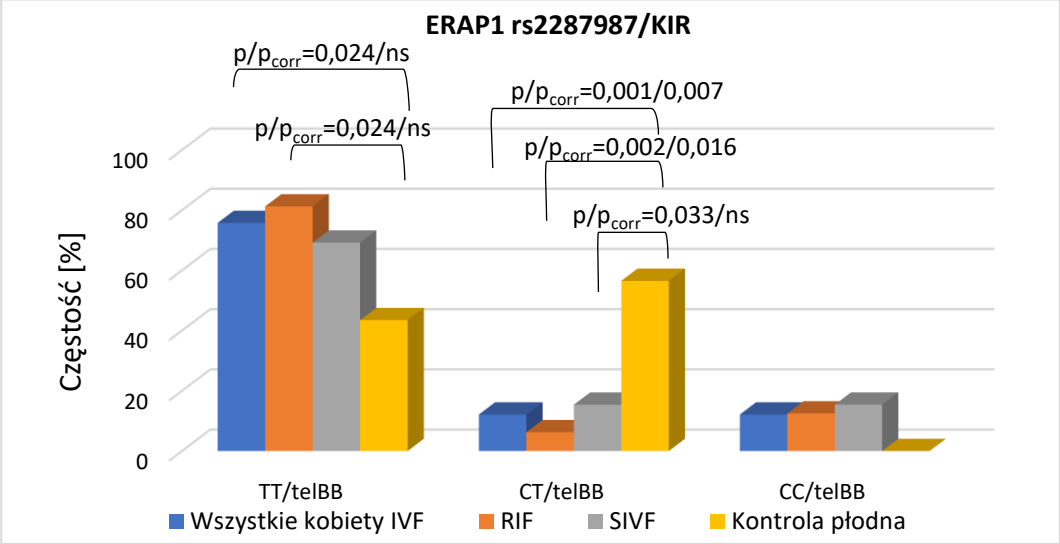




Rycina 21. Porównania częstości genotypów *ERAP1 rs*26618 u kobiet z grup IVF i kontroli płodnej w kombinacjach z *HLA-C* (A), z *HLA-C* i *KIR* (B) oraz z *KIR* (C).

4.1.4.3. Polimorfizm *ERAP1* rs2287987 T>C

Największe różnice dotyczące polimorfizmu *ERAP1* w miejscu rs2287987 T>C, które zachowały istotność po korekcie Bonferroniego, występują w porównaniach częstości w kombinacji z *KIR* wśród badanych grup pacjentek. Zaobserwowano związek genotypu CT z genami *KIR w* regionie telomerycznym BB z ochroną przed niepłodnością i RIF, ponieważ większy procent kobiet, posiadających taką kombinację, był w grupie kobiet płodnych niż grupie wszystkich kobiet IVF i kobiet RIF (odpowiednio: $^{c}p/p_{corr.}$=0,001/0,007, OR=0,111; $^{d}p/p_{corr.}$=0,002/0,016, OR=0,055). Pacjentki, które zaszły w ciążę po *in vitro* różniły się również częstością tej kombinacji z kobietami z kontroli płodnej, jednak wynik ten stracił istotność po korekcie ($^{e}p/p_{corr.}$=0,033/ns, OR=0,148). Z kolei układ TT rs2287987/KIR Tel BB słabo predysponował do niepłodności i RIF. Różnica z kontrolą płodną wyniosła odpowiednio: $^{a}p/p_{corr.}$=0,024/ns, OR=3,952; $^{b}p/p_{corr.}$=0,024/ns, OR=5,377, ale wyniki po korekcie nie były istotne statystycznie (**Suplement**, **Tabela 8S** i **Rycina 22**).

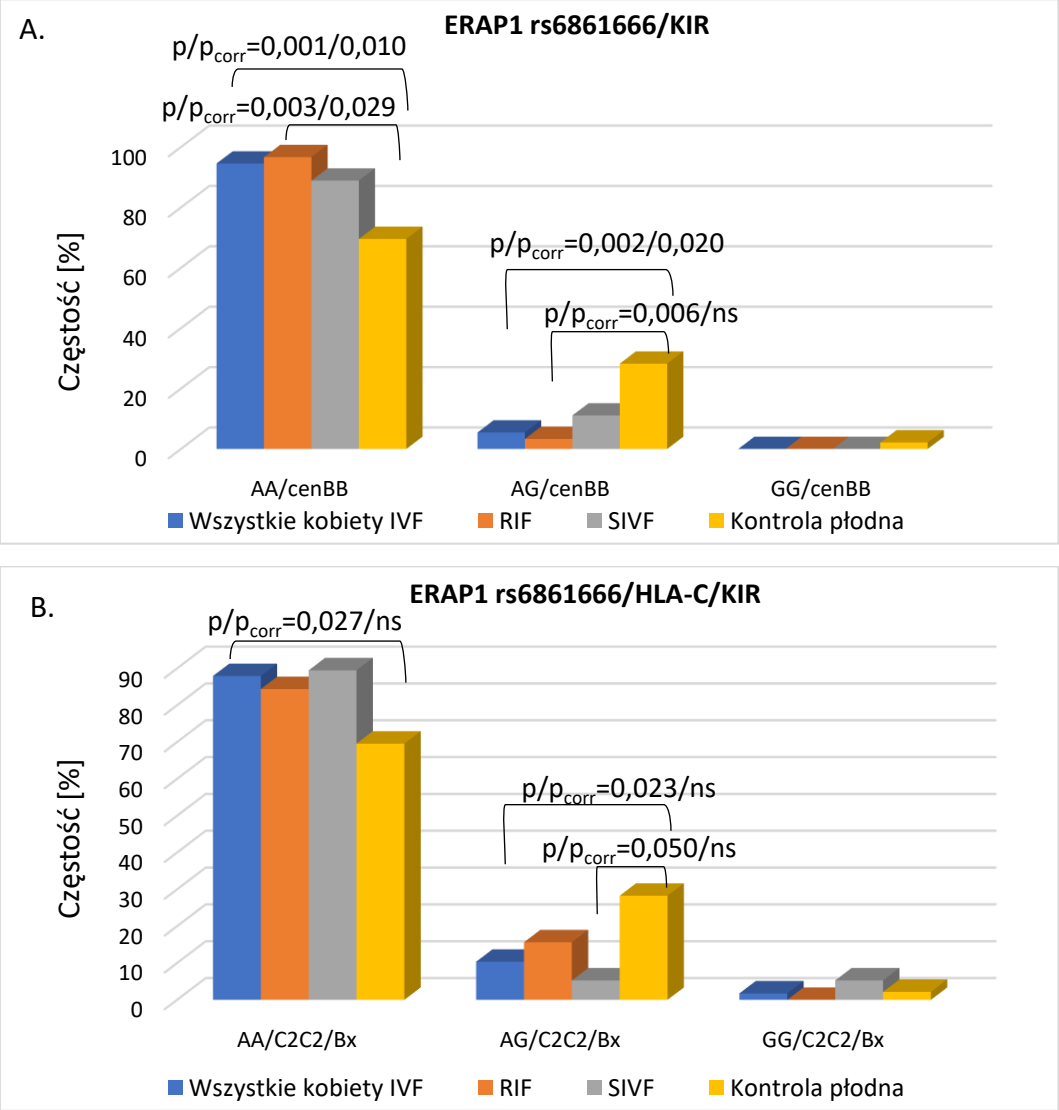


Rycina 22. Porównanie częstości genotypów *ERAP1 rs*2287987 u kobiet z grup IVF i kontroli płodnej w kombinacjach z genami *KIR* w regionie telomerycznym BB.

4.1.4.4. Polimorfizm *ERAP1* rs6861666 A>G

W przypadku polimorfizmu *ERAP1* rs6861666 A>G, który wpływa na poziom ekspresji zarówno ERAP1, jak i ERAP2, zaobserwowano, że genotyp AA *ERAP1* u kobiet posiadających geny *KIR* w regionie centromerycznym BB, wydaje się być niekorzystny do zajścia w ciążę. Częstość tej kombinacji u kobiet płodnych była o około 25% niższa niż u wszystkich kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* ($^{a}p/p_{corr.}$=0,001/0,010, OR=7,435) oraz o około

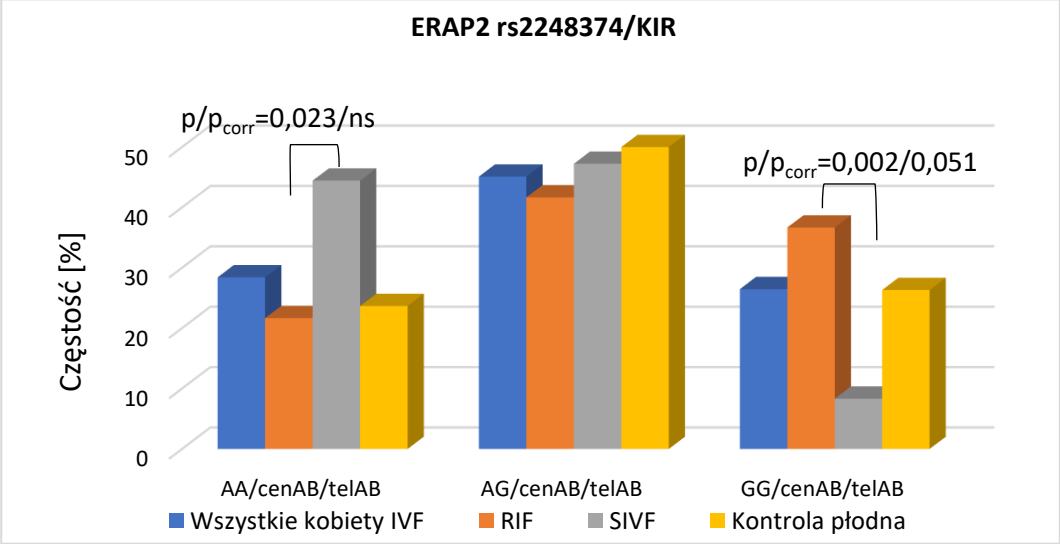
27% niższa niż u kobiet RIF ([b]p/p$_{corr.}$=0,003/0,029, OR=12,373) (**Suplement**, **Tabela 9S** i **Rycina 23A**). Kobiety z kombinacją AG ERAP1 rs6861666/*KIR* cen BB cechowało mniejsze prawdopodobieństwo niepłodności i RIF niż pozostałe kobiety (odpowiednio: [c]p/p$_{corr.}$=0,002/0,020, OR=0,149; [d]p/p$_{corr.}$=0,006/ns, OR=0,090). Podobny efekt (który jednak nie utrzymał się po korekcie Bonferroniego) obserwowano w kombinacjach potrójnych *ERAP1* z *HLA-C* C2C2 *i KIR* Bx, gdzie układ AA/HLA-C2C2/KIR Bx występował częściej w grupie kobiet IVF niż kontroli ([ae]p/p$_{corr.}$=0,027/ns, OR=3,151). Ta sama kombinacja z genotypem AG ERAP1 rs6861666 była częstsza u kobiet płodnych niż kobiet IVF i SIVF (odpowiednio: [af]p/p$_{corr.}$=0,023/ns, OR= 0,296; [ag]p/p$_{corr.}$=0,050/ns, OR=0,144) (**Suplement**, **Tabela 5S** i **Rycina 23B**).



Rycina 23. Porównanie częstości genotypów *ERAP1 rs*6861666 u kobiet z grup IVF i kontroli płodnej w kombinacjach z genami *KIR* (A) oraz *KIR/HLA-C* (B).

4.1.4.5. Polimorfizm *ERAP2* rs2248374 A>G

Kombinacja genotypu GG *ERAP2* z genami *KIR* w regionie centromerycznym AB i telomerycznym AB występowała istotnie częściej w grupie kobiet z RIF niż w grupie kobiet, które zaszły w ciążę po zapłodnieniu *in vitro* ($^{e}p/p_{corr.}$=0,002/0,051, OR=6,262). Genotyp AA *ERAP2* – odwrotnie, jednakże po korekcie wynik ten stracił istotność ($^{c}p/p_{corr.}$=0,023/ns, OR=0,350). Dla wyżej wymienionych kombinacji *ERAP2* z genami *KIR*, wykazano również słabsze różnice pomiędzy kobietami SIVF a kontrolą płodną (**Suplement**, **Tabela 10S** i **Rycina 24**).



Rycina 24. Porównanie częstości genotypów *ERAP2 rs*2248374 u kobiet z grup IVF i kontroli płodnej w kombinacjach z genami *KIR*.

4.1.5. Haplotypy *ERAP1/ERAP2*

W kolejnym etapie analiz wyznaczono 27 haplotypów *ERAP1* i *ERAP2* w następującej kolejności miejsc polimorficznych: rs2248374-rs6861666-rs26653-rs26618-rs2287987-rs30187-rs27044 (**Tabela 12**). Różnice w częstościach pomiędzy badanymi grupami kobiet były istotne w przypadku trzech z nich. Haplotyp A-A-G-C-T-C-C był częstszy w grupie kobiet SIVF niż w grupie kobiet z RIF ($^{a}p/p_{corr.}$=0,045/ns, OR=0,714), natomiast haplotyp H4 – odwrotnie ($^{b}p/p_{corr.}$=0,040/ns, OR=1,737). Haplotyp G-A-C-T-T-T-C częściej występował wśród wszystkich kobiet poddających się *in vitro* w porównaniu do kobiet płodnych ($^{c}p/p_{corr.}$=0,046/ns, OR=2,247) (**Tabela 12**). Jednak po korekcie Bonferroniego różnice te straciły swoją istotność.

Tabela 12. Haplotypy *ERAP1/ERAP2* u pacjentek i kobiet z kontroli płodnej.

Haplotyp ERAP	Kolejność SNP	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
		N=990 (%)	N=564 (%)	N=322 (%)	N=764 (%)
H1	A-A-G-C-T-C-C	224 (22,63)	**115 (20,39)[a]**	85 (26,41)	184 (24,09)
H2	A-A-G-T-C-C-C	110 (11,11)	57 (10,11)	42 (13,04)	91 (11,92)
H3	G-A-C-T-T-T-G	109 (11,01)	65 (11,52)	36 (11,18)	78 (10,21)
H4	G-A-G-T-C-C-C	95 (9,60)	**61 (10,82)[b]**	21 (6,52)	73 (9,55)
H5	G-A-G-T-T-C-C	76 (7,68)	43 (7,62)	26 (8,07)	62 (8,12)
H6	G-A-G-T-T-T-G	89 (8,99)	51 (9,04)	30 (9,32)	59 (7,72)
H7	G-A-G-C-T-C-C	44 (4,44)	26 (4,61)	10 (3,11)	40 (5,24)
H8	A-A-C-T-T-T-C	45 (4,55)	26 (4,61)	14 (4,35)	39 (5,10)
H9	A-A-G-T-T-C-C	42 (4,24)	24 (4,26)	12 (3,73)	24 (3,14)
H10	A-A-C-T-T-C-C	22 (2,22)	13 (2,30)	7 (2,17)	24 (3,14)
H11	G-G-C-T-T-C-C	32 (3,23)	20 (3,55)	11 (3,42)	21 (2,75)
H12	G-G-G-T-T-T-G	18 (1,82)	12 (2,13)	6 (1,86)	16 (2,09)
H13	A-G-G-T-T-T-G	15 (1,52)	11 (1,95)	3 (0,93)	11 (1,44)
H14	A-A-G-T-T-T-G	19 (1,92)	13 (2,30)	6 (1,86)	10 (1,31)
H15	G-A-C-T-T-C-C	7 (0,71)	3 (0,53)	2 (0,62)	9 (1,18)
H16	G-A-C-T-T-T-C	**23 (2,32)[c]**	12 (2,13)	6 (1,86)	8 (1,05)
H17	A-A-C-T-T-T-G	7 (0,71)	7 (1,24)	0 (0,00)	4 (0,52)
H18	G-G-C-T-T-T-G	4 (0,40)	1 (0,18)	1 (0,31)	4 (0,52)
H19	G-A-G-T-C-C-G	3 (0,30)	1 (0,18)	1 (0,31)	1 (0,13)
H20	A-A-G-T-C-C-G	2 (0,20)	2 (0,35)	0 (0,00)	1 (0,13)
H21	A-G-C-T-T-T-C	1 (0,10)	1 (0,18)	0 (0,00)	1 (0,13)
H22	A-A-G-T-T-T-C	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,13)
H23	A-G-G-C-T-C-G	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,13)
H24	A-G-G-T-C-C-G	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,13)
H25	A-G-G-T-C-T-C	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,13)
H26	A-G-G-T-C-C-C	2 (0,20)	0 (0,00)	2 (0,62)	0 (0,00)
H27	A-G-C-T-T-C-C	1 (0,10)	0 (0,00)	1 (0,31)	0 (0,00)

RIF – kobiety z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka po zapłodnieniu *in vitro*; SIVF – kobiety z klinicznie zaawansowaną ciążą po zapłodnieniu *in vitro*; SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla 27 możliwych haplotypów; OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności. Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice. Do analiz zastosowano dwustronny test Fishera. Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs2248374-rs6861666-rs26653-rs26618-rs2287987-rs30187-rs27044.

RIF *vs.* SIVF: [a]$p/p_{corr.}$=0,045/ns, OR=0,714, 95% CI (0,51-1,00); [b]$p/p_{corr.}$=0,040/ns, OR=1,737, 95% CI (1,02-3,07);
Wszystkie kobiety IVF *vs.* kontrola płodna: [c]$p/p_{corr.}$=0,046/ns, OR=2,247, 95% CI (0,96-5,84)

4.2. Rola genów *KIR, HLA-C* i *ERAP* u partnerów kobiet z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka

4.2.1. Częstość genów *KIR* oraz genotypów *KIR* i *HLA-C*

Zbadano częstości genów *KIR* oraz genotypów *KIR* AA oraz Bx z podziałem na region centromeryczny i telomeryczny oraz genotypów *HLA-C* u partnerów kobiet przystępujących do zapłodnienia *in vitro* oraz u partnerów kobiet płodnych i porównano je ze sobą, tak jak w przypadku analiz u kobiet. Mężczyźni przystępujący do IVF zostali również podzieleni na tych, którzy wraz z partnerkami zakwalifikowani byli do grupy nawracających niepowodzeń implantacji zarodka (RIF) oraz do grupy SIVF, u których uzyskano kliniczną ciążę po *in vitro*. Wykazano silnie istotne statystycznie różnice w rozkładzie genów i genotypów *KIR* głównie pomiędzy wszystkimi mężczyznami IVF i mężczyznami z kontroli płodnej oraz mężczyznami RIF i kontrolą płodną (**Tabela 13**). Najsilniejsze różnice, które były istotne także po zastosowaniu korekty Bonferroniego, dotyczyły genów *KIR2DL2*, *KIR2DL5* gr.2, *KIR2DS2* i *KIR2DS3*. Częstość tych genów była podobna w grupie mężczyzn IVF i RIF i była większa niż u mężczyzn z kontroli płodnej. Wartości p dla porównań wszystkich mężczyzn IVF *vs.* kontrola płodna wynosiły odpowiednio: $^{a}p/p_{corr.}$=0,00052/0,011, OR=1,658 dla genu *KIR2DL2*; $^{e}p/p_{corr.}$=0,0017/0,04, OR=1,632 dla genu *KIR2DL5* gr.2; $^{g}p/p_{corr.}$=0,00068/0,01, OR=1,637 dla genu *KIR2DS2*; $^{j}p/p_{corr.}$=0,001/0,03, OR=1,663 dla genu *KIR2DS3*; dla porównań RIF *vs.* kontrola płodna: $^{b}p/p_{corr.}$=0,00019/0,004, OR=1,857 dla genu *KIR2DL2*; $^{f}p/p_{corr.}$=0,001/0,02, OR=1,785 dla genu *KIR2DL5* gr.2; $^{h}p/p_{corr.}$=0,00083/0,02, OR=1,737 dla genu *KIR2DS2*; $^{k}p/p_{corr.}$=0,00057/0,01, OR=1,856 dla genu *KIR2DS3*) (**Tabela 13**). Częstość genu *KIR2DL2* oraz *KIR2DS2* była również istotnie większa wśród partnerów kobiet, które zaszły w ciążę po *in vitro* w porównaniu do partnerów kobiet płodnych (odpowiednio: $^{c}p/p_{corr.}$=0,003/ns, OR=1,780; $^{i}p/p_{corr.}$=0,007/ns, OR=1,691). Jednakże wyniki te po korekcie straciły istotność statystyczną. Pozostałe różnice pomiędzy grupami mężczyzn były słabsze i również straciły istotność statystyczną. Większy odsetek mężczyzn posiadających gen *KIR2DL5 all* był w grupie mężczyzn przystępujących wraz z partnerkami do zapłodnienia *in vitro* niż w grupie mężczyzn z kontroli płodnej ($^{d}p/p_{corr.}$=0,044/ns, OR=1,344). Gen *KIR2DS4 norm* występował częściej w grupie RIF niż w kontroli płodnej ($^{l}p/p_{corr.}$=0,017/ns, OR=1,514), podobnie mężczyźni posiadający wariant genu *KIR3DP1* (*KIR3DP1 var*) częściej byli w grupie RIF i SIVF niż w kontroli płodnej ($^{m}p/p_{corr.}$=0,016/ns, OR=1,534; $^{n}p/p_{corr.}$=0,050/ns, OR=1,491) (**Tabela 13**).

Mężczyźni posiadający genotyp *KIR* Bx, stanowili 75% wszystkich mężczyzn przystępujących wraz z partnerkami do zapłodnienia *in vitro*, natomiast w grupie kontrolnej płodnej genotyp Bx posiadało 68% mężczyzn. Już różnica około 7% pomiędzy nimi okazała się być istotna statystycznie (^{p}p=0,030, OR=1,424). Z kolei genotyp *KIR* AA posiadało 25% mężczyzn przystępujących do IVF oraz 32% mężczyzn z kontroli płodnej (^{o}p=0,030, OR=0,702). Rozpatrując tylko geny *KIR* z regionu centromerycznego AA zaobserwowano różnice istotne statystycznie pomiędzy mężczyznami z grupy IVF, RIF i SIVF a mężczyznami z kontroli płodnej (odpowiednio: $^{q}p/p_{corr.}$=0,004/0,015, OR=0,653; $^{r}p/p_{corr.}$=0,010/0,042, OR=0,651; $^{s}p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=0,671) (**Tabela 13**). Wykazano również, że suma genów regionu centromerycznego AB oraz centromerycznego BB stanowi większy procent liczebności mężczyzn z grupy IVF, RIF, SIVF niż mężczyzn z kontroli płodnej (odpowiednio: $^{t}p/p_{corr.}$=0,004/0,015, OR=1,530; $^{u}p/p_{corr.}$=0,010/0,042, OR=1,537; $^{v}p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=1,490). Dodatkowo kombinacja genów w regionie centromerycznym BB i telomerycznym AA występowała częściej u mężczyzn z grupy SIVF niż u mężczyzn z grupy RIF ($^{w}p/p_{corr.}$ =0,036/ns, OR=0,301).

Tabela 13. Rozkład częstości genów i genotypów *KIR* oraz genotypów *HLA-C* u partnerów kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz partnerów kobiet płodnych.

KIR/genotyp KIR/ genotyp HLA-C	IVF		RIF		SIVF		Kontrola	
	N	n (%)	N	n (%)	N	n (%)	N	n (%)
2DL1	490	467 (95,31)	278	266 (95,68)	161	152 (94,41)	322	312 (96,89)
2DL2	491	**302 (61,51)[a]**	278	**172 (61,87)[b]**	161	**98 (60,87)[c]**	322	158 (49,07)
2DL3	490	424 (86,53)	277	241 (87,00)	161	137 (85,09)	322	291 (90,37)
2DL4 norm.	490	338 (68,98)	277	195 (70,40)	161	111 (68,94)	321	213 (66,36)
2DL4 del.	488	378 (77,46)	276	216 (78,26)	160	124 (77,50)	322	251 (77,95)
2DL5 all	491	**258 (52,55)[d]**	278	145 (52,16)	161	82 (50,93)	321	145 (45,17)
2DL5 gr.1	491	134 (27,29)	273	75 (27,47)	161	42 (26,09)	322	78 (24,22)
2DL5 gr.2	490	**181 (36,94)[e]**	277	**106 (38,27)[f]**	161	54 (33,54)	322	85 (26,40)
2DS1	491	192 (39,10)	278	107 (38,49)	161	62 (38,51)	322	118 (36,65)
2DS2	491	**302 (61,51)[g]**	278	**171 (61,51)[h]**	161	**98 (60,87)[i]**	322	159 (49,38)
2DS3	491	**178 (36,25)[j]**	278	**105 (37,77)[k]**	161	53 (32,92)	322	82 (25,47)
2DS4 norm.	490	177 (36,12)	277	**102 (36,82)[l]**	161	56 (34,78)	322	105 (32,61)
2DS4 del.	491	400 (81,47)	278	228 (82,01)	161	131 (81,37)	322	272 (84,47)
2DS5	491	132 (26,88)	278	74 (26,62)	161	41 (25,47)	321	78 (24,30)
3DL1	491	459 (93,48)	278	257 (92,45)	161	152 (94,41)	322	304 (94,41)
3DL2	491	489 (99,59)	278	278 (100,00)	161	160 (99,38)	322	322 (100,00)
3DL3	491	491 (100,00)	278	278 (100,00)	161	161 (100,00)	322	322 (100,00)
3DS1	491	184 (37,47)	278	106 (38,13)	161	59 (36,65)	322	108 (33,54)
2DP1	491	469 (95,52)	278	267 (96,04)	161	153 (95,03)	321	314 (97,82)
3DP1 norm.	491	467 (95,11)	278	266 (95,68)	161	152 (94,41)	321	314 (97,82)

KIR/genotyp KIR/ genotyp HLA-C	IVF		RIF		SIVF		Kontrola	
	N	n (%)	N	n (%)	N	n (%)	N	n (%)
3DP1 var.	491	173 (35,23)	278	**102 (36,69)^{m}**	161	**58 (36,02)^{n}**	317	97 (30,60)
AA	491	**121 (24,64)^{o}**	278	73 (26,26)	161	39 (24,22)	321	102 (31,78)
Bx	491	**370 (75,36)^{p}**	278	205 (73,74)	161	122 (75,78)	321	219 (68,22)
cenAA	491	**186 (37,88)^{q}**	278	**105 (37,77)^{r}**	161	**62 (38,51)^{s}**	321	155 (48,29)
cenAB	491	239 (48,68)	278	137 (49,28)	161	75 (46,58)	321	135 (42,06)
cenBB	491	66 (13,44)	278	36 (12,95)	161	24 (14,91)	321	31 (9,66)
cenAB+cenBB	491	**305 (62,12)^{t}**	278	**173 (62,23)^{u}**	161	**99 (61,49)^{v}**	321	166 (51,71)
telAA	491	285 (58,04)	278	161 (57,91)	161	95 (59,01)	321	197 (61,37)
telAB	491	178 (36,25)	278	99 (35,61)	161	58 (36,02)	321	111 (34,58)
telBB	491	28 (5,70)	278	18 (6,47)	161	8 (4,97)	321	13 (4,05)
telAB+telBB	491	206 (41,96)	278	117 (42,09)	161	66 (40,99)	321	124 (38,63)
cenAA/telAA	186	120 (64,52)	105	73 (69,52)	62	38 (61,29)	155	102 (65,81)
cenAA/telAB	186	62 (33,33)	105	30 (28,57)	62	23 (37,10)	155	49 (31,61)
cenAA/telBB	186	4 (2,15)	105	2 (1,90)	62	1 (1,61)	155	4 (2,58)
cenAB/telAA	239	128 (53,56)	137	73 (53,28)	75	40 (53,33)	135	80 (59,26)
cenAB/telAB	239	91 (38,08)	137	52 (37,96)	75	28 (37,33)	135	50 (37,04)
cenAB/telBB	239	20 (8,37)	137	12 (8,76)	75	7 (9,33)	135	5 (3,70)
cenBB/telAA	66	37 (56,06)	36	**15 (41,67)^{w}**	24	17 (70,83)	31	15 (48,39)
cenBB/telAB	66	25 (37,88)	36	17 (47,22)	24	7 (29,17)	31	12 (38,71)
cenBB/telBB	66	4 (6,06)	36	4 (11,11)	24	0 (0,00)	31	4 (12,90)
C1	982	590 (60,08)	556	334 (60,07)	322	187 (58,07)	644	384 (59,63)
C2	982	392 (39,92)	556	222 (39,93)	322	135 (41,93)	644	260 (40,37)
C1C1	491	171 (34,83)	278	98 (35,25)	161	51 (31,68)	322	112 (34,78)
C1C2	491	248 (50,51)	278	138 (49,64)	161	85 (52,80)	322	160 (49,69)
C2C2	491	72 (14,66)	278	42 (15,11)	161	25 (15,53)	322	50 (15,53)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*. N – całkowita liczba osób przebadanych; n – liczba osób posiadających dany gen/genotyp/kombinację. p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x21 dla możliwych wariantów genów KIR, x4 dla wariantów centromerycznych lub telomerycznych KIR lub x3 dla kombinacji cen/tel); ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice. Dla genotypów AA i Bx nie stosowano korekty Bonferroniego.

Mężczyźni IVF *vs.* kontrola płodna: $^{a}p/p_{corr.}$=0,00052/0,011, OR=1,658, 95% CI (1,24-2,23); $^{d}p/p_{corr.}$=0,044/ns, OR=1,344, 95% CI (1,00-1,80); $^{e}p/p_{corr.}$=0,0017/0,04, OR=1,632, 95% CI (1,19-2,25); $^{g}p/p_{corr.}$=0,00068/0,01, OR=1,637, 95% CI (1,22-2,20); $^{j}p/p_{corr.}$=0,001/0,03, OR=1,663, 95% CI (1,21-2,30); ^{o}p=0,030, OR=0,702, 95% CI (0,51-0,97); ^{p}p=0,030, OR=1,424, 95% CI (1,03-1,97); $^{q}p/p_{corr.}$=0,004/0,015, OR=0,653, 95% CI (0,49-0,88); $^{t}p/p_{corr.}$=0,004/0,015, OR=1,530, 95% CI (1,14-2,06);

RIF *vs.* kontrola płodna: $^{b}p/p_{corr.}$=0,00019/0,004, OR=1,857, 95% CI (1,33-2,60); $^{f}p/p_{corr.}$=0,001/0,02, OR=1,785, 95% CI (1,25-2,56); $^{h}p/p_{corr.}$=0,00083/0,02, OR=1,737, 95% CI (1,24-2,44); $^{k}p/p_{corr.}$=0,00057/0,01, OR=1,856, 95% CI (1,29-2,67); $^{l}p/p_{corr.}$=0,017/ns, OR=1,514, 95% CI (1,07-2,14); $^{m}p/p_{corr.}$=0,016/ns, OR=1,534, 95% CI (1,08-2,18); $^{r}p/p_{corr.}$=0,010/0,042, OR=0,651, 95% CI (0,46-0,91); $^{u}p/p_{corr.}$=0,010/0,042, OR=1,537, 95% CI (1,10-2,16);

SIVF *vs.* kontrola płodna: $^{c}p/p_{corr.}$=0,003/ns, OR=1,780, 95% CI (1,20-2,66); $^{i}p/p_{corr.}$=0,007/ns, OR=1,691, 95% CI (1,13-2,53); $^{n}p/p_{corr.}$=0,050/ns, OR=1,491, 95% CI (0,98-2,26); $^{s}p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=0,671, 95% CI (0,45-1,00); $^{v}p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=1,490, 95% CI (1,00-2,24);

RIF *vs.* SIVF: $^{w}p/p_{corr.}$=0,036/ns, OR=0,301, 95% CI (0,08-1,00)

4.2.2. Kombinacje genotypów *KIR* AA i Bx z *HLA-C* C1 i C2

Przeprowadzono analizę porównawczą częstości kombinacji genotypów *KIR* z genotypami *HLA-C* u wszystkich partnerów pacjentek oraz partnerów kobiet z kontroli płodnej. Wyniki umieszczono w **Tabeli Suplementarnej 13S**. Zaobserwowane trzy różnice straciły istotność statystyczną po korekcie Bonferroniego. Mężczyźni posiadający kombinację *KIR* Cen AA/Tel AB/HLA-C1C2 częściej byli w grupie płodnej niż w grupie SIVF ($^{b}p/p_{corr.}$ =0,045/ns, OR=0,343), ale też częściej w grupie RIF niż SIVF ($^{a}p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=3,650). Na granicy istotności znalazł się również wynik dotyczący kombinacji *KIR* Cen BB/Tel AA/HLA-C2C2 ($^{c}p/p_{corr.}$=0,050/ns, OR=0,164). Większa częstość tego układu występowała u mężczyzn z kontroli płodnej niż u mężczyzn z grupy IVF.

4.2.3. Częstość genotypów i alleli *ERAP1* oraz *ERAP2*

W kolejnym etapie analiz sprawdzono częstości genotypów i alleli *ERAP1* i *ERAP2* wśród badanych grup mężczyzn. Zaobserwowano, że mężczyźni posiadający genotyp GG czy też posiadający jeden allel G w miejscu polimorficznym *ERAP1* rs27044 częściej występowali w grupie SIVF niż w grupie RIF (odpowiednio, ^{a}p=0,022, OR=0,422 i ^{b}p=0,023, OR=0,693). Mężczyźni z genotypem CC *ERAP1* rs2287987 częściej znajdowali się w grupie RIF niż w kontroli płodnej (^{c}p=0,030, OR=2,270). Dodatkowo częstość allelu G w genie *ERAP2* *rs*2248374 była istotnie wyższa wśród mężczyzn z kontroli płodnej (54,25%) niż wśród wszystkich mężczyzn IVF (49,18%) oraz RIF (47,84%) (odpowiednio: ^{d}p=0,047, OR=0,816; ^{e}p=0,032, OR=0,774) (**Suplement**, **Tabela 14S**).

4.2.4. Kombinacje genotypów *ERAP1* i *ERAP2* z *HLA-C1* i *C2* oraz *KIR*

W kombinacjach genotypów *ERAP* z genotypami *HLA-C* u mężczyzn (**Suplement**, **Tabela 15S**) zaobserwowano kilka słabo istotnych statystycznie różnic w przypadku trzech polimorfizmów *ERAP*: *ERAP1* rs27044, *ERAP1* rs2287987, *ERAP2* rs2248374. Porównano także częstości potrójnych kombinacji *ERAP/HLA-C/KIR* u wszystkich badanych mężczyzn (**Suplement**, **Tabela 16S**). Z uwagi na to, że uzyskano wyniki słabo istotne, które po korekcie Bonferroniego straciły ważność, umieszczono je w tabelach suplementarnych.

Mężczyźni pozytywni pod względem *HLA-C* C1+ oraz posiadający genotyp GG *ERAP1* *rs*27044, byli częściej obserwowani w kontroli płodnej i grupie SIVF niż w grupie RIF (odpowiednio: $^{a}p/p_{corr.}$=0,023/ns, OR=0,413; $^{b}p/p_{corr.}$=0,010/ns, OR=0,333) (**Suplement**,

Tabela 15S). W potrójnych kombinacjach, mężczyźni GG/HLA-C1+ z genotypem *KIR* Bx byli częściej w kontroli płodnej niż w grupie wszystkich mężczyzn IVF oraz RIF (odpowiednio: $^{c}p/p_{corr.}$=0,047/ns, OR=0,490; $^{d}p/p_{corr.}$=0,012/ns, OR=0,306) (**Suplement**, **Tabela 16S**). Ten sam układ, ale z genotypem *KIR* AA częstszy był w grupie mężczyzn SIVF niż RIF ($^{b}p/p_{corr.}$=0,037/ns, OR=0,237).

Mężczyźni posiadający HLA-C1+ w układzie z genotypem CC genu *ERAP1* rs2287987, częściej występowali w grupie RIF niż kontroli płodnej, ale różnica ta była na granicy istotności ($^{c}p/p_{corr.}$=0,054/ns, OR=2,247) (**Suplement**, **Tabela 15S**). Ten sam układ w potrójnej kombinacji CC/HLA-C1+/*KIR* Bx był częstszy w grupie partnerów kobiet z RIF niż wśród partnerów kobiet SIVF ($^{q}p/p_{corr.}$=0,034/ns, OR=4,529) (**Suplement**, **Tabela 16S**). Podobny efekt uzyskano, gdy uwzględniono podział *HLA-C* na poszczególne genotypy: układ CC *ERAP1* rs2287987/HLA-C1C2 z *KIR* Bx częstszy był w grupie RIF niż SIVF ($^{t}p/p_{corr.}$=0,049/ns, OR=6,667).

Zauważono różnice w częstościach dla kombinacji genotypu AA w rs2248374 *ERAP2* z HLA-C2+ lub z HLA-C1C2 pomiędzy mężczyznami IVF i mężczyznami z kontroli: $^{d}p/p_{corr.}$=0,046/ns, OR=1,545 dla kombinacji z HLA-C2+; $^{e}p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=1,652 dla kombinacji z HLA-C1C2 (**Suplement**, **Tabela 15S**). W kombinacjach potrójnych (**Suplement**, **Tabela 16S**), genotyp AA *ERAP2* rs2248374 w układzie z *KIR* Bx oraz zarówno z HLA-C1+, jak i z HLA-C2+ występował częściej u wszystkich mężczyzn IVF (dla kombinacji z C1+: $^{w}p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=1,680; z C2+: $^{y}p/p_{corr.}$=0,016/ns, OR=1,928) oraz RIF (dla C1+: $^{x}p/p_{corr.}$=0,017/ns, OR=1,860; dla C2+: $^{z}p/p_{corr.}$=0,027/ns, OR=1,983) w porównaniu do mężczyzn z kontroli. Efekt ten był również widoczny, gdy mężczyźni posiadali układ AA *ERAP2* rs2248374/HLA-C1C2/*KIR* Bx (IVF *vs.* KP: $^{ac}p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=2,230; RIF *vs.* KP: $^{ad}p/p_{corr.}$=0,014/ns, OR=2,345). Odwrotny, ochronny efekt zaobserwowano w przypadku mężczyzn z układem GG/HLA-C1C2/*KIR* Bx (IVF *vs.* KP: $^{ae}p/p_{corr.}$=0,035/ns, OR=0,568; RIF *vs.* KP: $^{af}p/p_{corr.}$=0,039/ns, OR=0,529).

4.3. Geny *KIR*, *HLA-C* i *ERAP* w kombinacjach kobieta/partner

Częstości genotypów *KIR*, *HLA-C i ERAP* analizowano w kombinacjach kobieta/partner. Wyniki omówiono w kolejnych rozdziałach, a te najbardziej istotne podsumowano w **Tabeli 14**.

Tabela 14. Kombinacje *ERAP/HLA-C* i *KIR* u kobiet i ich partnerów.

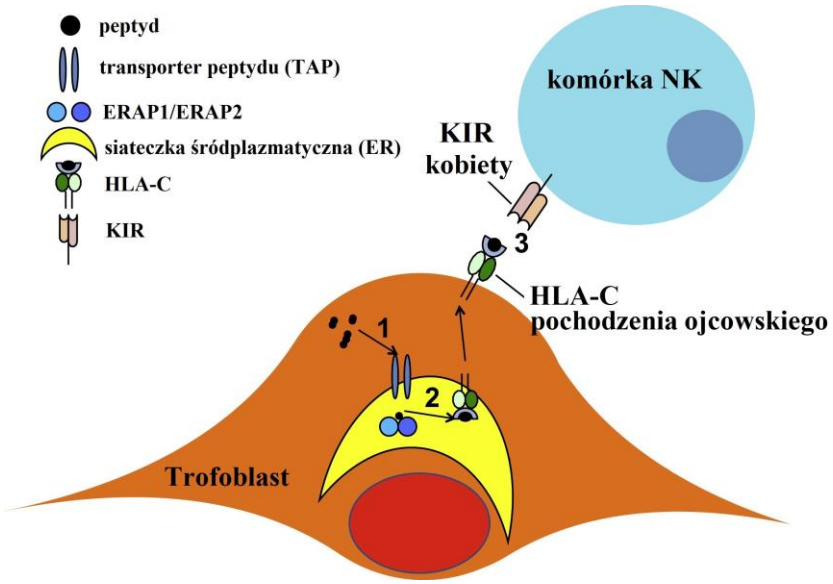
Rodzaj kombinacji ERAP, HLA-C, KIR	Kombinacja	Grupy	p	$p_{corr.}$	OR	95% CI	Efekt	Tabela
ERAP kobiety/HLA-C partnera								
ERAP1 rs30187 C>T/HLA-C	TT/C1C2	IVF *vs.* KP	0,006	0,050	2,843	1,30-6,92	↑	18S
ERAP1 rs27044 C>G/HLA-C	CC/C1C1	RIF *vs.* SIVF	0,005	0,044	0,343	0,15-0,75	↓	18S
ERAP1 rs27044 C>G/HLA-C	CC/C1C2	SIVF *vs.* KP	0,003	0,027	0,442	0,25-0,78	↓	18S
ERAP kobiety/HLA-C partnera/KIR kobiety								
ERAP1 rs27044 C>G/HLA-C/KIR	CC/C1C2/Bx	RIF *vs.* KP	0,004	0,037	0,428	0,23-0,78	↓	19S
ERAP1 rs27044 C>G/HLA-C/KIR	CG/C1C2/Bx	RIF *vs.* KP	0,006	0,050	2,313	1,25-4,33	↑	19S
ERAP partnera/HLA-C kobiety/KIR kobiety								
ERAP1 rs30187 C>T/HLA-C/KIR	CT/C2C2/AA	RIF *vs.* SIVF	0,005	0,049	24,000	1,76-1549,16	↑	20S
ERAP partnera/HLA-C partnera/KIR kobiety								
ERAP1 rs27044 C>G/HLA-C/KIR	GG/C1+/AA	RIF *vs.* SIVF	0,005	0,031	0,114	0,01-0,66	↓	21S
ERAP1 rs27044 C>G/HLA-C/KIR	CG/C2C2/Bx	RIF *vs.* SIVF	0,004	0,033	0,096	0,01-0,56	↓	21S

↑ – predyspozycja do choroby; ↓ – ochrona; IVF – wszystkie pary poddające się zapłodnieniu *in vitro*; RIF – pary z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka po zapłodnieniu *in vitro*; SIVF – pary z klinicznie zaawansowaną ciążą po zapłodnieniu *in vitro*; KP – pary z kontroli płodnej; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań; OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności. Do analiz zastosowano dwustronny test Fishera.

4.3.1. Częstość kombinacji *KIR* kobiety i *HLA-C* partnera

Podobnie jak w rozdziale 4.1, poniższy schemat będzie wprowadzeniem do omówienia wyników, aby ułatwić zrozumienie rozpatrywanych w analizie kombinacji genów kobiety i jej partnera.

W pierwszym etapie badano wpływ kombinacji genów *KIR* kobiety i *HLA-C* partnera (**Rycina 25**) wśród par poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz par płodnych.



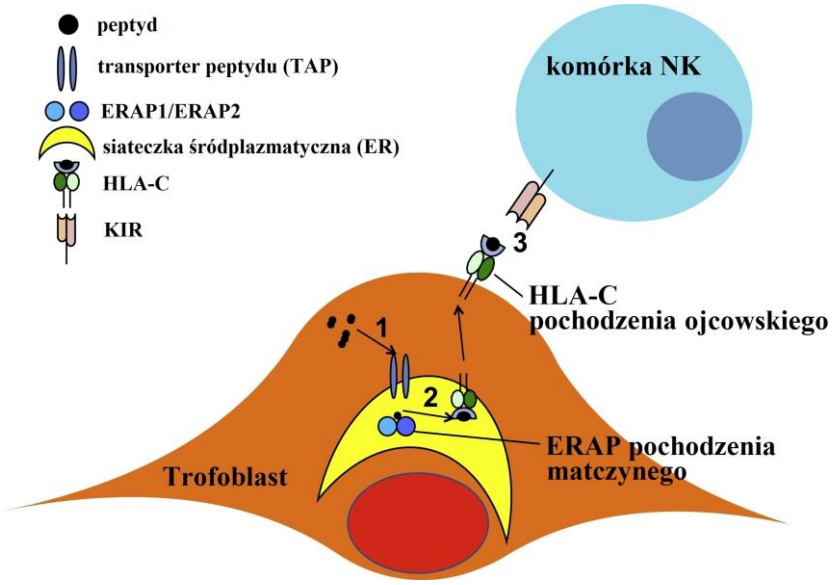
Rycina 25. Schemat ilustrujący badaną kombinację *KIR* i *HLA-C*. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee (2017) [266].

Ponieważ wykryte różnice były niewielkie i wszystkie straciły swoją istotność po korekcie Bonferroniego, wyniki umieszczono w tabeli suplementarnej (**Suplement**, **Tabela 17S**). Wśród wykrytych różnic, najniższą wartość p=0,015 miało porównanie częstości kombinacji *KIR* Tel BB kobiety i *HLA-C* C1C2 partnera u par z RIF oraz par kontrolnych. Kombinacja ta występowała częściej wśród par płodnych ($^{f}p/p_{corr.}$=0,015/ns, OR=0,149). Podobnie pary, które posiadały tą kombinację, częściej były w grupie SIVF niż RIF ($^{g}p/p_{corr.}$=0,027/ns, OR=0,160). W najbardziej heterozygotycznym układzie, kiedy kobieta posiadała geny *KIR* w regionie centromerycznym AB i telomerycznym AB, a jej partner miał *HLA-C* C1C2, pary występowały częściej w grupie SIVF niż RIF ($^{j}p/p_{corr.}$=0,032/ns, OR=0,380), wobec tego taka kombinacja wydaje się być korzystna w zajściu i utrzymaniu ciąży. Zaobserwowano również, że układ kiedy kobieta posiadała geny *KIR* w regionie centromerycznym BB i telomerycznym BB, a jej partner był heterozygotą C1C2 nie występował u żadnej z par z grupy RIF. Natomiast 71,43% par, posiadających taką kombinację, stanowiło kontrolę płodną (RIF *vs.* KP: $^{m}p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=0,000) (**Suplement**, **Tabela 17S**).

4.3.2. Częstość kombinacji *ERAP* kobiety i *HLA-C* partnera

W następnym etapie sprawdzano częstości genów *ERAP* i *HLA-C* w podwójnych kombinacjach wśród par IVF i kontroli płodnej. Należało zweryfikować, jaki wpływ na

nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu *in vitro,* będą miały geny *ERAP* pochodzenia matczynego w kombinacji z *HLA-C* pochodzenia ojcowskiego (**Rycina 26**).



Rycina 26. Schemat ilustrujący badaną kombinację genów *ERAP* pochodzenia matczynego i *HLA-C* pochodzenia ojcowskiego. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee (2017) [266].

Z uwagi na dużą liczbę słabych istotności statystycznych, uzyskane wyniki przedstawiono w **Tabeli 18S** w **Suplemencie**. Zaobserwowane różnice statystyczne dotyczyły w większości *ERAP1* rs30187 oraz *ERAP1* rs27044, natomiast jeden wynik, który dotyczył *ERAP1* rs2287987 był na granicy istotności. W przypadku *ERAP1* rs30187, kiedy kobieta posiadała genotyp TT, a partner był pozytywny pod względem *HLA-C* C2+, taka kombinacja występowała częściej wśród wszystkich par IVF niż w kontroli oraz częściej wśród par z RIF niż w kontroli (odpowiednio: $^{a}p/p_{corr.}$=0,032/ns, OR=1,962; $^{b}p/p_{corr.}$=0,041/ns, OR=2,062). Tak samo genotyp TT rs30187 *ERAP1* kobiety w kombinacji z *HLA-C1C2* mężczyzny, występował istotnie częściej wśród całej grupy par IVF oraz par z RIF i SIVF niż w kontroli płodnej (odpowiednio: $^{g}p/p_{corr.}$=0,006/0,050, OR=2,843; $^{h}p/p_{corr.}$=0,010/ns, OR=2,907; $^{i}p/p_{corr.}$=0,010/ns, OR=3,290). Porównanie wszystkich par IVF i par z kontroli w tej kombinacji zachowało istotność nawet po korekcie Bonferroniego.

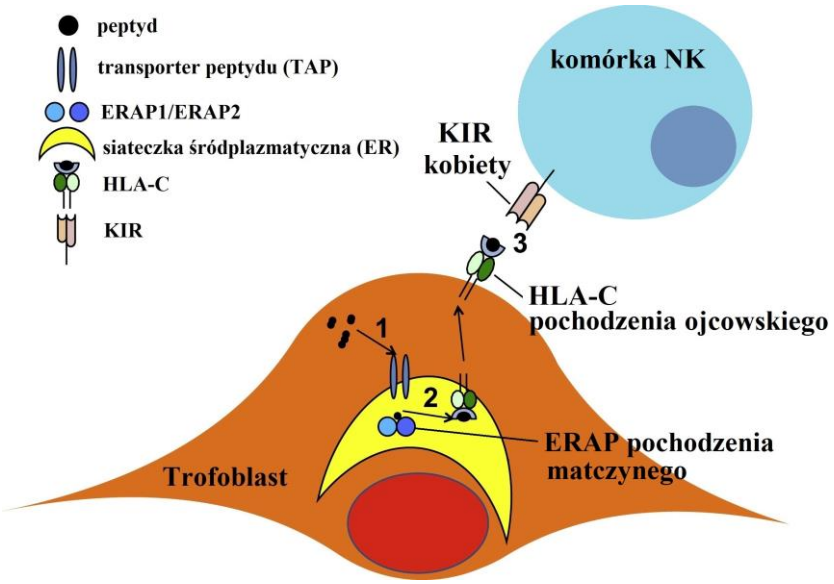
Genotyp CC *ERAP1* rs27044 u kobiet w kombinacji *HLA-C2+* u mężczyzn, występował w głównej mierze w grupie kontrolnej niż wśród wszystkich par IVF, par z RIF oraz z SIVF (odpowiednio: $^{k}p/p_{corr.}$=0,016/ns, OR=0,647; $^{l}p/p_{corr.}$=0,031/ns, OR=0,638; $^{m}p/p_{corr.}$=0,009/ns, OR=0,534). Kobiety mające genotyp CC w miejscu polimorficznym *ERAP1* rs27044 i ich partnerzy posiadający genotyp *HLA-C1C2* również częściej byli w grupie kontrolnej niż

w grupie wszystkich par IVF oraz par RIF i SIVF (odpowiednio: $^{s}p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=0,591; $^{t}p/p_{corr.}$=0,034/ns, OR=0,592; $^{u}p/p_{corr.}$=0,003/0,027; OR=0,442). Dodatkowo układ CC kobiety/*HLA-C1C1* mężczyzny wykazywał efekt ochronny, ponieważ porównanie par z RIF i SIVF dało istotny statystycznie wynik ($^{p}p/p_{corr.}$=0,005/0,044, OR=0,343). Z kolei genotyp CG rs27044 kobiety w kombinacjach z genotypem *HLA-C C2+* partnera okazał się być bardziej powszechny u par przystępujących do *in vitro*, jak również par, które zaszły w ciążę po *in vitro*, niż u par kontrolnych (odpowiednio: $^{n}p/p_{corr.}$=0,043/ns, OR=1,472; $^{o}p/p_{corr.}$=0,015/ns, OR=1,821). Z kolei, kobiety z genotypem CG *ERAP1* rs27044 i ich heterozygotyczni partnerzy (*HLA-C1C2*) częściej byli w grupie SIVF niż płodnej ($^{w}p/p_{corr.}$=0,026/ns, OR=1,895), natomiast, gdy partnerzy posiadali genotyp *HLA-C* C1C1, pary występowały częściej w grupie RIF niż SIVF ($^{r}p/p_{corr.}$=0,020/ns, OR=2,474) (**Suplement**, **Tabela 18S**).

Na granicy istotności znalazł się również wynik wskazujący na to, że kobiety posiadające genotyp CT w genie *ERAP1* rs2287987 i ich partnerzy posiadający przynajmniej jeden allel C2 genu *HLA-C* mają mniejsze ryzyko niepłodności niż pary nieposiadające takiej kombinacji (IVF *vs.* KP: $^{x}p/p_{corr.}$=0,049/ns, OR=0,690) (**Suplement**, **Tabela 18S**).

4.3.3. Kombinacje genów *ERAP* i *KIR* kobiety z *HLA-C* jej partnera

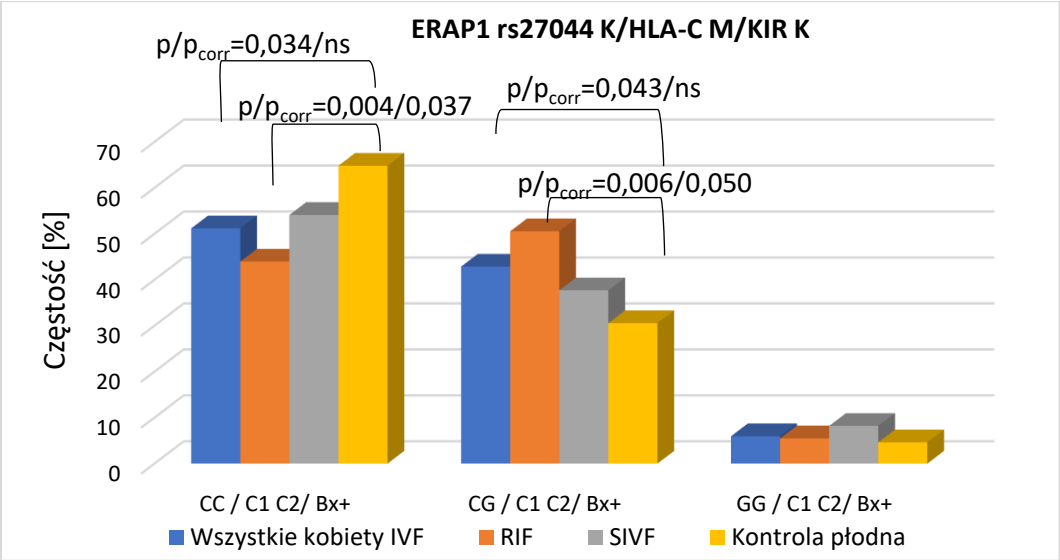
W tym podrozdziale analizowano, jaki będzie rozkład kombinacji pomiędzy parami IVF a kontrolą, kiedy geny *ERAP* i *KIR* będą pochodziły od kobiety, a *HLA-C* od jej partnera (**Rycina 27**). Wyniki umieszczono w **Suplemencie** w **Tabeli 19S**.



Rycina 27. Schemat ilustrujący badaną kombinację genów *KIR* kobiety i *ERAP* pochodzenia matczynego oraz *HLA-C* pochodzenia ojcowskiego. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee (2017) [266].

Genotyp TT *ERAP1* rs30187 w kombinacji z genotypem *KIR* AA kobiety wykazał predysponujący efekt do RIF wtedy, gdy partner posiadał genotyp *HLA-C1C2*. Różnica w częstościach tych kombinacji pomiędzy pacjentami z RIF a kontrolą oraz pomiędzy pacjentami z RIF a pacjentami, u których transfer skutkował ciążą, wynosiła odpowiednio: $^{a}p/p_{corr.}$=0,047/ns, OR=3,620 i $^{b}p/p_{corr.}$=0,049/ns, OR=6,886. Co ciekawe, gdy kobiety były nosicielkami genotypu CT w miejscu polimorficznym *ERAP1* rs30187, a ich partner posiadał genotyp *HLA-C2C2*, efekt tej kombinacji zależał od *KIR* kobiety. Kombinacja CT kobiety/*HLA-C2C2* partnera z *KIR* AA kobiety predysponowała do niepłodności (IVF *vs.* KP: $^{c}p/p_{corr.}$=0,040/ns, OR=5,425), natomiast z *KIR* Bx kobiety – chroniła przed RIF (RIF *vs.* KP: $^{f}p/p_{corr.}$=0,047/ns, OR=0,337). Jednak po korekcie Bonferroniego wyniki straciły istotność.

Zaobserwowano, że u kobiet, których partner był heterozygotą pod względem genu *HLA-C* (C1C2), genotyp CC w genie *ERAP1* rs27044 w kombinacji z *KIR* Bx kobiety, wykazywał efekt ochronny, ponieważ pary o takiej kombinacji genów częściej występowały w kontroli płodnej niż w grupie RIF ($^{k}p/p_{corr.}$=0,004/0,037, OR=0,428) oraz w całej grupie pacjentów poddających się *in vitro* ($^{j}p/p_{corr.}$=0,034/ns, OR=0,570) (**Rycina 28 i Suplement**, **Tabela 19S**). Genotyp CG *ERAP1* rs27044 wykazywał efekt odwrotny – w tym układzie większa częstość par była w grupie RIF ($^{m}p/p_{corr.}$=0,006/0,050, OR=2,313) oraz wśród wszystkich par IVF ($^{l}p/p_{corr.}$=0,043/ns, OR=1,701) niż w kontroli. Wyniki dotyczące par z RIF były istotne nawet po zastosowaniu korekty Bonferroniego.



Rycina 28. Porównanie częstości kombinacji *ERAP1* rs27044 kobiety/*HLA-C* mężczyzny/*KIR* kobiety wśród par z grup IVF i kontroli płodnej.

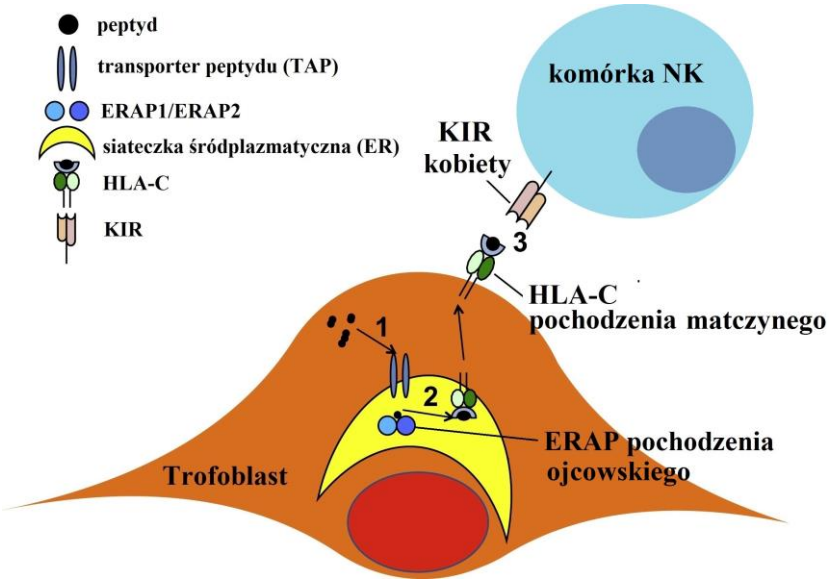
Genotypy genu *ERAP1 rs*26653 dały istotne wyniki u par z układem GG rs26653 kobiety/*HLA-C2C2* partnera/*KIR* AA kobiety. Taka kombinacja występowała częściej w kontroli płodnej niż u par IVF ($^{n}p/p_{corr.}$=0,045/ns, OR=0,223). Kombinacja CG rs26653 kobiety/*HLA-C2C2* partnera/*KIR* AA kobiety dała efekt odwrotny i zwiększała ryzyko niepłodności ($^{o}p/p_{corr.}$=0,017/ns, OR=6,490) (**Suplement**, **Tabela 19S**), jednak wyniki straciły istotność po korekcie Bonferroniego.

Kombinacja CC rs26618 *ERAP1* z genotypem *KIR* AA u kobiet była częstsza w kontroli płodnej niż w grupie pacjentów IVF, gdy partner kobiety posiadał przynajmniej jeden allel *HLA-C2+* ($^{p}p/p_{corr.}$=0,035/ns, OR=0,258). Wykazano, że kobiety o tej samej kombinacji *ERAP1* i *KIR* z partnerami homozygotycznymi pod względem *HLA-C2C2* również cechowały się mniejszym ryzykiem znalezienia się w grupie IVF niż pozostałe kobiety ($^{r}p/p_{corr.}$=0,047/ns, OR=0,000). Mężczyźni posiadający *HLA-C1C2* z partnerkami z kombinacją genotypu TT rs26618 *ERAP1* oraz *KIR* Bx, częściej byli w grupie pacjentów z RIF niż SIVF ($^{s}p/p_{corr.}$=0,021/ns, OR=2,191) (**Suplement**, **Tabela 19S**).

Kombinacja genotypu AA w genie *ERAP1* 6861666 u kobiet pozytywnych pod względem *KIR* Bx z genotypem *HLA-C2C2* partnerów, wykazała predyspozycję do niepłodności, ponieważ taką kombinację posiadał większy odsetek par IVF niż par płodnych ($^{w}p/p_{corr.}$=0,046/ns, OR=3,334) (**Suplement**, **Tabela 19S**). Po korekcie Bonferroniego wynik ten stracił istotność.

4.3.4. Kombinacje genów *KIR* i *HLA-C* kobiety z genami *ERAP* partnera

W kolejnym etapie analizowano kombinacje *KIR* i *HLA-C* pochodzenia matczynego z *ERAP* pochodzenia ojcowskiego.



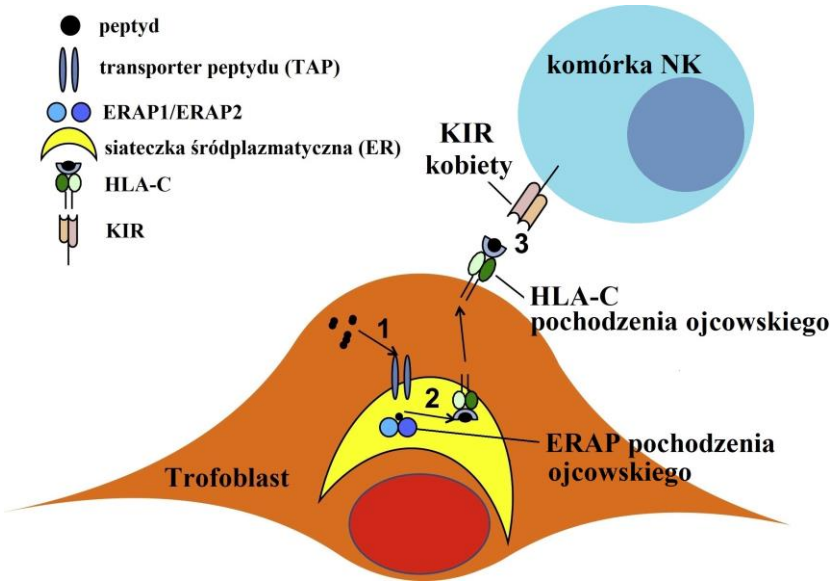
Rycina 29. Schemat ilustrujący badaną kombinację genów *KIR* kobiety i *HLA-C* pochodzenia matczynego oraz *ERAP* pochodzenia ojcowskiego. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee 2017 [266].

W tej analizie niemal wszystkie wyniki nie zachowały istotności po korekcie Bonferroniego (**Suplement**, **Tabela 20S**). Jedynie w układzie, gdzie genotyp CT rs30187 *ERAP1* mężczyzny był w kombinacji z *HLA-C2C2* i *KIR* AA kobiety, znacznie więcej par znajdowało się w grupie RIF niż w grupie SIVF ($^{c}p/p_{corr.}$=0,005/0,049, OR=24,000). Jednak przedział ufności dla tej analizy miał zbyt szeroki zakres, by można go było uznać za wiarygodny. Genotyp TT *ERAP1* rs30187 mężczyzn w kombinacji z *HLA-C1+* i *KIR* AA u kobiet wykazywał efekt ochronny – prawdopodobieństwo, które potwierdziło różnicę pomiędzy parami z RIF i kontroli wyniosło $^{a}p/p_{corr.}$=0,043/ns, OR=0,210. Natomiast wartości p i OR potwierdzające różnicę pacjentów RIF i SIVF wyniosły $^{b}p/p_{corr.}$=0,025/ns, OR=0,154. Podobny efekt wykazywał genotyp GG *ERAP1* rs27044 u mężczyzn w kombinacji z *HLA-C1+*/*KIR* AA kobiet (RIF *vs.* SIVF: $^{d}p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=0,087) oraz genotyp CC *ERAP1* rs26653 mężczyzn w kombinacji z *HLA-C1+*/*KIR* AA kobiet (RIF *vs.* KP: $^{g}p/p_{corr.}$=0,015/ns, OR=0,114; RIF *vs.* SIVF: $^{h}p/p_{corr.}$=0,020/ns, OR=0,098). Zwrócono uwagę również na wynik dotyczący *ERAP2* rs2248374 u mężczyzn. Mężczyźni posiadający genotyp AG w tym miejscu polimorficznym, których partnerki posiadały kombinację *HLA-C1C1*/*KIR* Bx, częściej znajdowali się w grupie IVF niż kontroli ($^{t}p/p_{corr.}$=0,035/ns, OR=1,964). Odwrotnie, mężczyźni

z genotypem GG wraz z partnerkami mającymi *HLA-C1C1*/*KIR* Bx byli częściej w kontroli płodnej niż grupie IVF ($^{u}p/p_{corr.}$=0,020/ns, OR=0,426) oraz RIF ($^{w}p/p_{corr.}$=0,030/ns, OR=0,397).

4.3.5. Kombinacje genów *KIR* kobiety z genami *HLA-C* i *ERAP* partnera

W ostatniej analizie badano różnice pomiędzy parami IVF i kontrolą, kiedy geny *ERAP* i *HLA-C* były pochodzenia ojcowskiego, a jedynie geny *KIR* należały do kobiety.

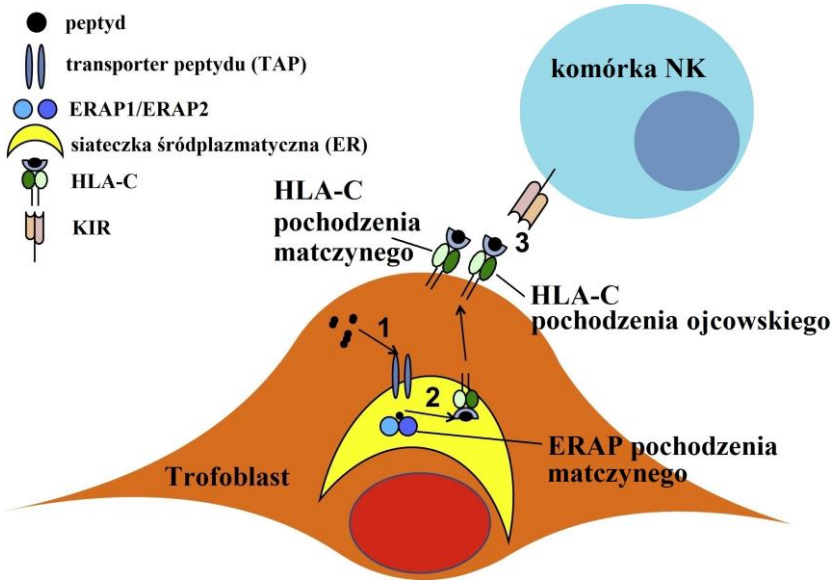


Rycina 30. Schemat ilustrujący badaną kombinację genów *KIR* kobiety i *HLA-C* oraz *ERAP* pochodzenia ojcowskiego. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee 2017 [266].

Uzyskano słabo istotne wyniki, które przedstawiono w **Tabeli 21S** w **Suplemencie**. Wyniki, które zachowały istotność po korekcie na wielokrotność porównań, dotyczyły *ERAP1* rs27044. Genotyp GG w tym miejscu polimorficznym *ERAP1* w kombinacji z *HLA-C1+* u mężczyzn wykazał efekt ochronny jeśli ich partnerki posiadały genotyp *KIR* AA (RIF *vs.* SIVF: $^{c}p/p_{corr.}$=0,005/0,031, OR=0,114). Efekt ten utrzymywał się, gdy mężczyzna był homozygotą *HLA-C1C1*, jednak istotność była mniejsza ($^{d}p/p_{corr.}$=0,046/ns, OR=0,000). Porównanie par z RIF i SIVF ujawniło, że więcej par z RIF niż par z SIVF posiadało kombinację CC rs27044 *ERAP1* mężczyzny/*HLA-C2C2* mężczyzny/*KIR* Bx kobiety ($^{e}p/p_{corr.}$=0,014/ns, OR=7,501). W przeciwieństwie do tego, genotyp CG w tym miejscu polimorficznym *ERAP1* w kombinacji z *HLA-C2C2* mężczyzny i *KIR* Bx kobiety, okazał się być ochronny (RIF *vs.* SIVF: $^{g}p/p_{corr.}$=0,004/0,033, OR=0,096).

4.3.6. Kombinacje genów *ERAP* i *HLA-C* kobiety z genami *HLA-C* partnera

W ostatnich etapach analizowano potrójne kombinacje: genów *ERAP* kobiety lub mężczyzny z genami *HLA-C* pochodzenia zarówno matczynego, jak i ojcowskiego. Na początku sprawdzono częstości układu *ERAP* kobiety/*HLA-C* kobiety/*HLA-C* mężczyzny (**Rycina 31**).

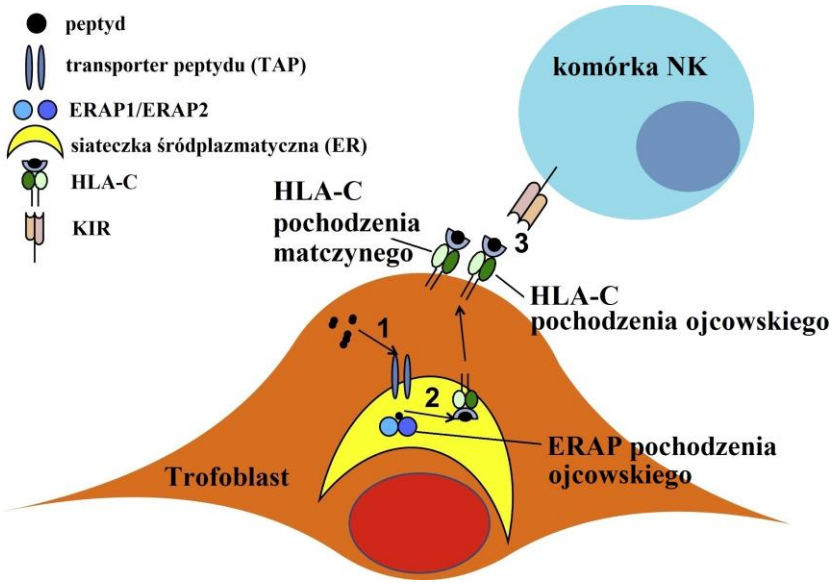


Rycina 31. Schemat ilustrujący badaną kombinację genów *ERAP* i *HLA-C* pochodzenia matczynego oraz *HLA-C* pochodzenia ojcowskiego. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee (2017) [266].

Ze względu na słabo istotne wyniki, umieszczono je w **Suplemencie** w **Tabeli 22S**. Istotny wynik stwierdzono w sytuacji, gdy kobieta posiadała genotyp TT w miejscu rs30187 *ERAP1* oraz była pozytywna pod względem *HLA-C2+*, natomiast partner posiadał *HLA-C1+*. Pary z taką kombinacją występowały częściej w grupie RIF niż w kontroli płodnej ($^{a}p/p_{corr.}$=0,008/ns, OR=2,906). Gdy partner posiadał *HLA-C2+* w tym układzie, również obserwowany był efekt predysponujący do RIF, jednak był on słabszy ($^{b}p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=2,537).

4.3.7. Kombinacje genów *ERAP* i *HLA-C* mężczyzny z genami *HLA-C* kobiety

Podobnie jak w poprzednim podrozdziale sprawdzono potrójne kombinacje rozpatrując *HLA-C* kobiety i partnera równocześnie, ale geny *ERAP* pochodziły od mężczyzny (**Rycina 32**). Wyniki umieszczono w **Suplemencie w Tabeli 23S**.



Rycina 32. Schemat ilustrujący badaną kombinację genów *ERAP i HLA-C* pochodzenia ojcowskiego oraz *HLA-C* pochodzenia matczynego. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee (2017) [266].

Genotyp CC w miejscu polimorficznym rs30187 *ERAP1* wraz *HLA-C2+* u mężczyzn w kombinacji z *HLA-C1+* kobiet, wykazywał efekt predysponujący do RIF ($^{b}p/p_{corr.}$=0,042/ns, OR=1,608). Taki sam układ genów *HLA-C* kobiet i mężczyzn w kombinacji z genotypem CC rs27044 *ERAP1* mężczyzny również wykazywał efekt predysponujący (RIF *vs.* kontrola płodna: $^{d}p/p_{corr.}$=0,030/ns, OR=1,655; RIF *vs.* SIVF: $^{e}p/p_{corr.}$=0,020/ns, OR=1,914). Predyspozycję do niepłodności i RIF zaobserwowano także wśród par, w których mężczyzna posiadał genotyp AA w genie *ERAP2* rs2248374 niezależnie czy miał *HLA-C1+* (IVF *vs.* KP: $^{g}p/p_{corr.}$=0,047/ns, OR=1,507) czy *HLA-C2+* (IVF *vs.* KP: $^{h}p/p_{corr.}$=0,018/ns, OR=1,753; RIF *vs.* KP: $^{i}p/p_{corr.}$=0,033/ns, OR=1,786), a jego partnerka posiadała *HLA-C1+* (**Suplement**, **Tabela 23S**).

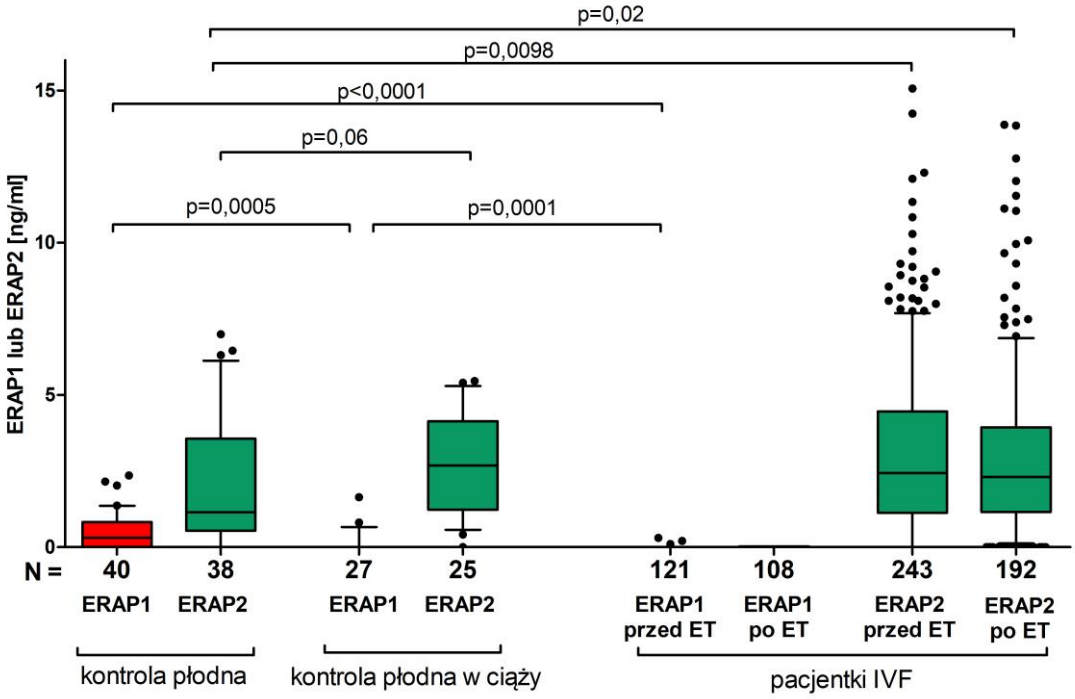
4.4. Rola wydzielanego ERAP1 i ERAP2 w niepowodzeniach implantacji zarodka

4.4.1. Stężenie ERAP1 i ERAP2 w osoczu pacjentek i kontroli płodnej

Stężenie ERAP1 i ERAP2 w osoczu krwi zmierzono u wszystkich pacjentek poddających się zapłodnieniu *in vitro*, zarówno przed, jak i po transferze zarodka, a także u kobiet, które zaszły w ciążę naturalnie. Stężenie ERAP1 określono u 67 kobiet kontrolnych, natomiast ERAP2 u 63. Liczba pacjentek IVF, u których zmierzono stężenie ERAP1 przed

transferem zarodka wynosiła 121, natomiast po transferze zarodka – 108. Stężenie ERAP2 wyznaczono u 243 pacjentek przed transferem zarodka, a wśród nich 192 kobiety miały oznaczone stężenie również po transferze (**Rycina 33**).

Zaobserwowano, że kobiety z grupy kontrolnej, które urodziły dziecko w przeszłości wydzielały istotnie więcej ERAP1 niż pacjentki IVF oraz kobiety z tej grupy, które były w ciąży w momencie pobrania osocza (odpowiednio: p<0,0001, mediana 0,32 *vs.* 0,00 ng/ml; p=0,0005, mediana 0,32 *vs.* 0,00 ng/ml). Z kolei w przypadku ERAP2 zauważono przeciwny efekt. Kobiety z grupy IVF niezależnie czy były przed transferem czy po, wydzielały więcej ERAP2 niż kobiety z kontroli (odpowiednio: p=0,0098, mediana 2,44 *vs.* 1,15 ng/ml; p=0,02, mediana 2,31 *vs.* 1,15 ng/ml). Stężenie ERAP2 było również wyższe u kobiet płodnych w ciąży, w porównaniu do kobiet płodnych niebędących w ciąży, ale wynik ten był na granicy istotności (p=0,06, mediana 2,69 *vs.* 1,15 ng/ml) (**Rycina 33, Tabela 15**).



Rycina 33. Stężenie ERAP1 i ERAP2 w osoczu kobiet kontrolnych i kobiet IVF.

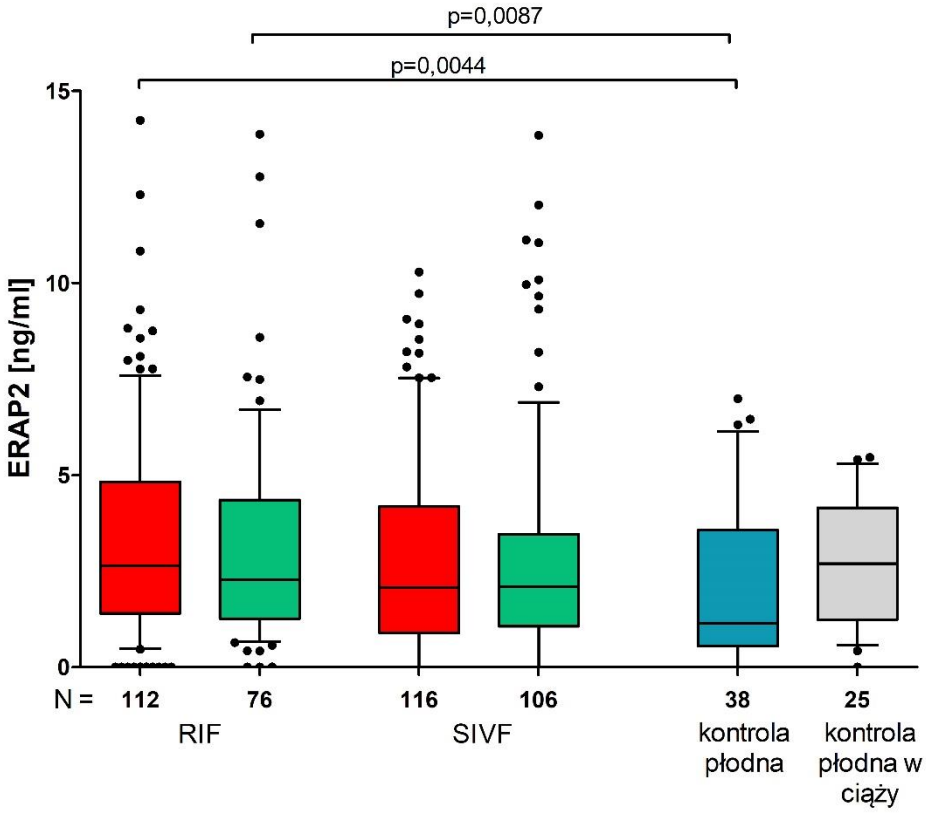
N – liczba kobiet, ET – transfer zarodka, p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl.

Tabela 15. Stężenie ERAP1 i ERAP2 w osoczu kobiet kontrolnych i kobiet IVF – statystyka opisowa.

Grupa	ERAP1 lub ERAP2	Przed lub po transferze zarodka (ET)	Liczba pacjentek	ERAP1 lub ERAP2 (ng/ml)						
				Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
kontrola płodna	ERAP1	-	40	0,00	0,00	0,32[a, b]	0,84	2,36	0,51	0,65
	ERAP2		38	0,00	0,55	1,15[c, d, e]	3,57	6,99	2,13	2,20
kontrola płodna w ciąży	ERAP1	-	27	0,00	0,00	0,00[f]	0,00	1,65	0,13	0,36
	ERAP2		25	0,00	1,24	2,69	4,15	5,46	2,73	1,65
pacjentki IVF	ERAP1	przed	121	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31	0,01	0,04
	ERAP1	po	108	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	ERAP2	przed	243	0,00	1,13	2,44	4,46	15,07	3,25	2,92
	ERAP2	po	192	0,00	1,16	2,31	3,95	13,87	3,11	2,88

Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya:
ERAP1: a kontrola płodna *vs.* kontrola płodna w ciąży: p=0,0005; [b] kontrola płodna *vs.* pacjentki IVF przed ET: p<0,0001; [f] kontrola płodna w ciąży *vs.* pacjentki IVF przed ET: p=0,0001
ERAP2: [c] kontrola płodna *vs.* pacjentki IVF przed ET: p=0,0098; [d] kontrola płodna *vs.* pacjentki IVF po ET: p=0,02; [e] kontrola płodna *vs.* kontrola płodna w ciąży: p=0,06

W następnym etapie analiz porównano stężenia ERAP2 u pacjentek RIF i SIVF z kobietami z kontroli (**Rycina 34** i **Tabela 16**). Okazało się, że pacjentki z RIF wydzielały istotnie więcej ERAP2 niż kobiety z kontroli, które urodziły w przeszłości. Zarówno przed jak i po transferze zarodka kobiety z RIF miały ERAP2 na poziomie 2,64 i 2,28 ng/ml, natomiast kobiety z kontroli miały stężenie ERAP2 na poziomie 1,15 ng/ml (odpowiednio p=0,0044; p=0,0087). Nie wykazano różnic pomiędzy kobietami w ciąży z kontroli, a kobietami RIF i SIVF.



Rycina 34. Stężenie ERAP2 w osoczu kobiet RIF, SIVF i kontroli.

Kolor czerwony oznacza osocze pobrane przed transferem zarodka; kolor zielony oznacza osocze pobrane po transferze; p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba pacjentek.

Tabela 16. Stężenie ERAP2 w osoczu kobiet RIF, SIVF i kontroli – statystyka opisowa.

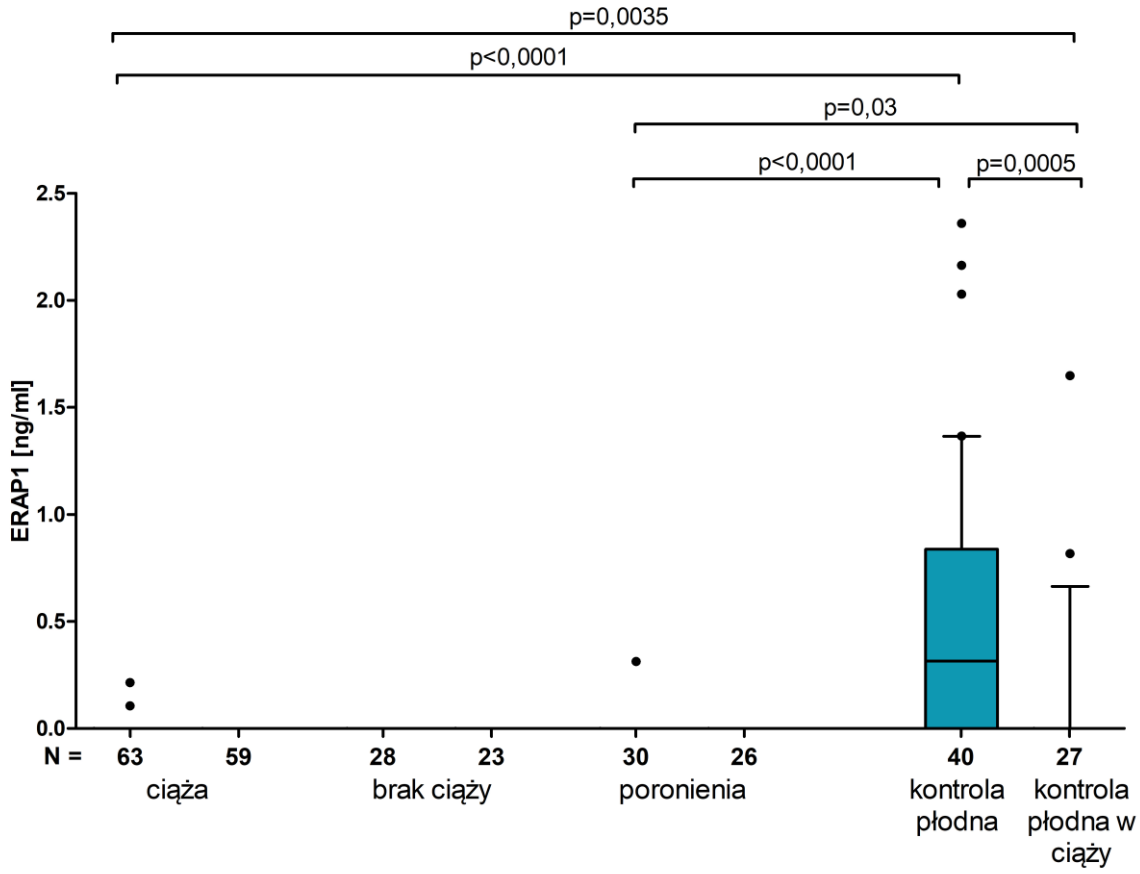
Grupa	Przed lub po transferze (ET)	Liczba pacjentek	ERAP2 (ng/ml)						
			Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
kontrola płodna	-	38	0,00	0,55	**1,15**[a, b]	3,57	6,99	2,13	2,20
kontrola płodna w ciąży	-	25	0,00	1,24	2,69	4,15	5,46	2,73	1,65
RIF	przed	112	0,00	1,40	2,64	4,82	14,24	3,38	2,81
	po	76	0,00	1,26	2,28	4,35	13,87	3,21	2,85
SIVF	przed	116	0,00	0,89	2,07	4,18	15,07	2,89	2,81
	po	106	0,00	1,07	2,10	3,46	13,85	2,96	2,93

Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya:
[a] kontrola płodna *vs.* RIF przed ET: p=0,0044; [b] kontrola płodna *vs.* RIF po ET: p=2,28

Z uwagi na to, że pacjentki IVF nie wydzielały ERAP1, nie wykonano analizy porównawczej grup RIF i SIVF. Jednak w kolejnym podrozdziale dokonano analizy wpływu wydzielania ERAP1 na powodzenie ciąży.

4.4.2. Wpływ ERAP1 na powodzenie ciąży

Pacjentki poddające się zapłodnieniu *in vitro* podzielono na trzy grupy w zależności od tego, czy transfer zarodka skutkował ciążą, brakiem ciąży, czy wystąpiło poronienie. Sprawdzono u nich stężenia ERAP1 i porównano je z kobietami z grupy kontrolnej, które były w ciąży w momencie testu oraz kobietami z tej grupy, które urodziły w przeszłości. Zastosowano test Manna-Whitneya i odnotowano istotne statystycznie różnice. Stężenie ERAP1 było niewykrywalne w osoczu pacjentek IVF. Pacjentki, które zaszły w ciążę po *in vitro* różniły się od kobiet z grupy kontrolnej, które urodziły w przeszłości (p<0,0001, mediana 0,00 *vs.* 0,32 ng/ml) oraz od kobiet z tej grupy, które były w ciąży (p=0,0035, mediana 0,00 *vs.* 0,00 ng/ml) (**Rycina 35 i Tabela 17**). U pacjentek, które doznały poronienia po transferze zarodka, również widoczny był brak wydzielania ERAP1 w porównaniu do kobiet z kontroli płodnej niebędącej w ciąży (p<0,0001, mediana 0,00 *vs.* 0,32 ng/ml) oraz kobiet z kontroli, które były w ciąży (p=0,03, mediana 0,00 *vs.* 0,00).



Rycina 35. Stężenie ERAP1 w osoczu pacjentek IVF oraz kontroli płodnej.

N – liczba kobiet, p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl.

Tabela 17. Stężenie ERAP1 w osoczu pacjentek IVF i kontroli – statystyka opisowa.

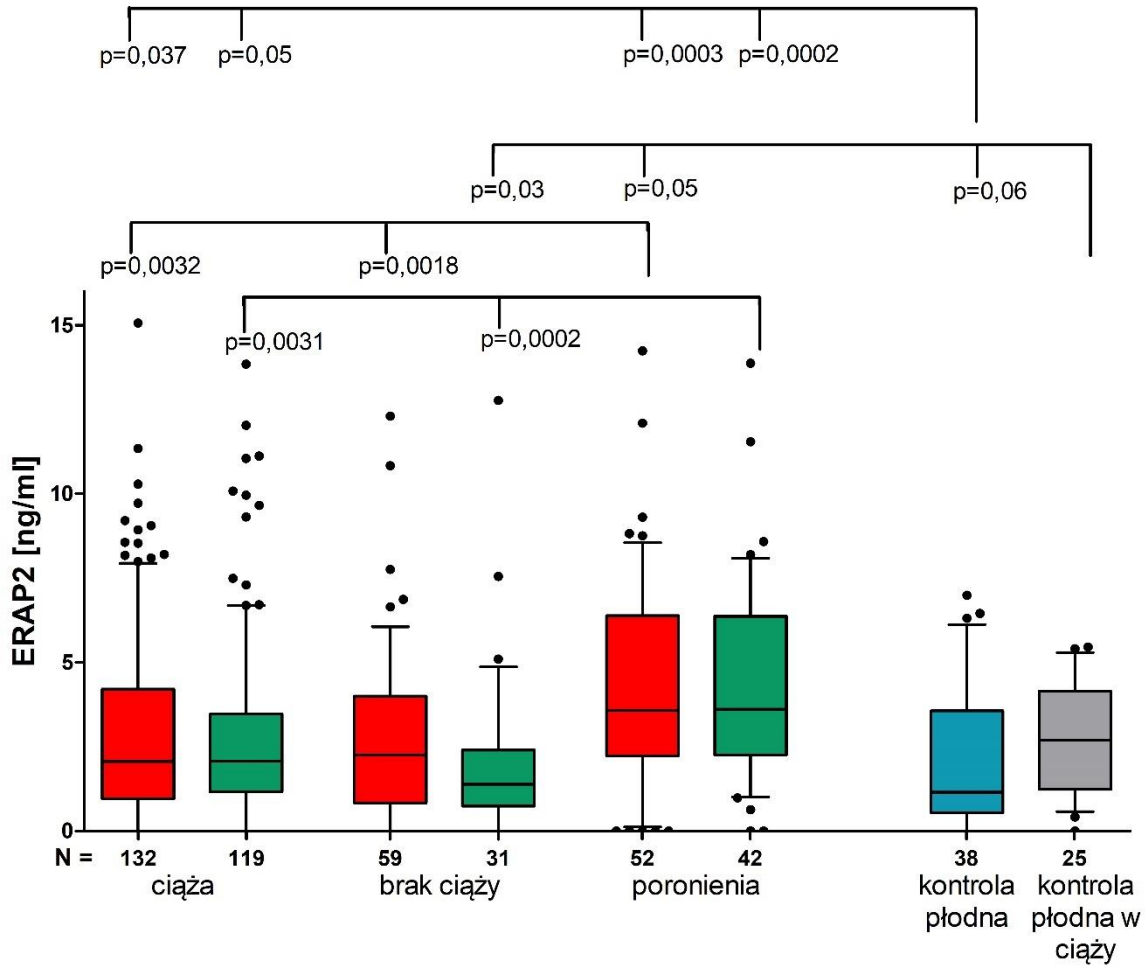
Grupa	Przed lub po transferze (ET)	Liczba pacjentek	ERAP1 (ng/ml)						
			Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
kontrola płodna	-	40	0,00	0,00	0,32[a, b, c]	0,84	2,36	0,51	0,65
kontrola płodna w ciąży	-	27	0,00	0,00	0,00[d, e]	0,00	1,65	0,13	0,36
pacjentki IVF (ciąża)	przed	63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,01	0,03
	po	59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
pacjentki IVF (brak ciąży)	przed	28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	po	23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
pacjentki IVF (poronienia)	przed	30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31	0,01	0,06
	po	26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya:
[a] kontrola płodna *vs.* kontrola płodna w ciąży: p=0,0005; [b] kontrola płodna *vs.* pacjentki IVF (ciąża) przed ET: p<0,0001; [c] kontrola płodna *vs.* pacjentki IVF (poronienia) przed ET: p<0,0001; [d] kontrola płodna w ciąży *vs.* pacjentki IVF (ciąża) przed ET: p=0,0035; [e] kontrola płodna w ciąży *vs.* pacjentki IVF (poronienia) przed ET: p=0,03

4.4.3. Wpływ ERAP2 na powodzenie ciąży

Stężenie ERAP2 w osoczu przed i po transferze zarodka nie różniło się u pacjentek, które zaszły w ciążę po *in vitro* lub miały poronienie. U pacjentek, które nie zaszły w ciążę po IVF, pomimo iż widoczny był spadek stężenia ERAP2 po transferze, ta różnica nie była istotna statystycznie (mediana: 2,26 *vs.* 1,39 ng/ml). Kobiety, które doświadczyły poronienia po transferze zarodka, charakteryzowały się wyraźnie wyższymi stężeniami ERAP2. Silne różnice w medianach zauważono pomiędzy pacjentkami, które zaszły w ciążę po *in vitro* a pacjentkami, które doświadczyły poronienia (p=0,0032, mediana 2,07 *vs.* 3,58 ng/ml – osocze przed transferem; p=0,0031, mediana 2,08 *vs.* 3,61 ng/ml – osocze po transferze) (**Rycina 36 i Tabela 18**). Podobnie pacjentki z grupy IVF, które nie zaszły w ciążę, wydzielały mniejsze ilości ERAP2 niż pacjentki po poronieniu (p=0,0018, mediana 2,26 *vs.* 3,58 ng/ml – osocze przed transferem; p=0,0002, mediana 1,39 *vs.* 3,61 ng/ml). Stężenie ERAP2 u kobiet z kontroli, które urodziły w przeszłości, wynosiło 1,15 ng/ml i znacząco różniło się od stężenia obserwowanego u pacjentek dotkniętych poronieniem już przed transferem zarodka (mediana 3,58 ng/ml, p=0,0003) oraz po transferze (mediana 3,61 ng/ml, p=0,0002). Stężenie ERAP2 u kobiet z kontroli (1,15 ng/ml) było także niższe niż u pacjentek, które zaszły w ciążę po *in vitro* (p=0,037 przed transferem oraz p=0,05 po transferze). Kobiety z kontroli, które były w ciąży

w momencie testu, miały wyższe stężenie ERAP2 (mediana 2,69 ng/ml) niż kobiety z kontroli niebędące w ciąży (1,15 ng/ml), jednak różnica nie była istotna (p=0,06).



Rycina 36. Stężenie ERAP2 w osoczu pacjentek IVF oraz kontroli.

Kolor czerwony oznacza osocze pobrane przed transferem zarodka; kolor zielony oznacza osocze pobrane po transferze; p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba pacjentek.

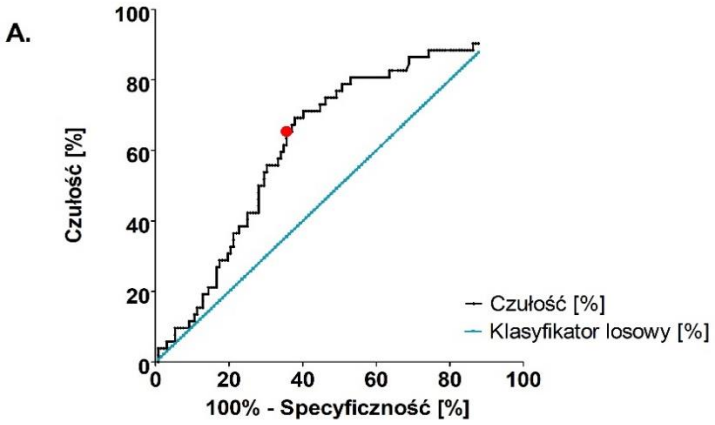
Tabela 18. Stężenie ERAP2 w osoczu pacjentek IVF i kontroli – statystyka opisowa.

Grupa	Przed lub po ET	Liczba pacjentek	ERAP2 (ng/ml)						
			Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
kontrola płodna	-	38	0,00	0,55	**1,15**[a, b, c, d]	3,57	6,99	2,13	2,20
kontrola płodna w ciąży	-	25	0,00	1,24	**2,69**[e, f, g]	4,15	5,46	2,73	1,65
pacjentki IVF (ciąża)	przed	132	0,00	0,96	2,07	4,21	15,07	3,07	2,93
	po	119	0,00	1,17	2,08	3,47	13,85	2,96	2,82
pacjentki IVF (brak ciąży)	przed	59	0,00	0,84	2,26	4,01	12,30	2,73	2,56
	po	31	0,00	0,74	1,39	2,41	12,77	2,15	2,54
pacjentki IVF (poronienia)	przed	52	0,00	2,24	**3,58**[h, i]	6,39	14,24	4,28	3,10
	po	42	0,00	2,26	**3,61**[j, k]	6,37	13,87	4,23	2,99

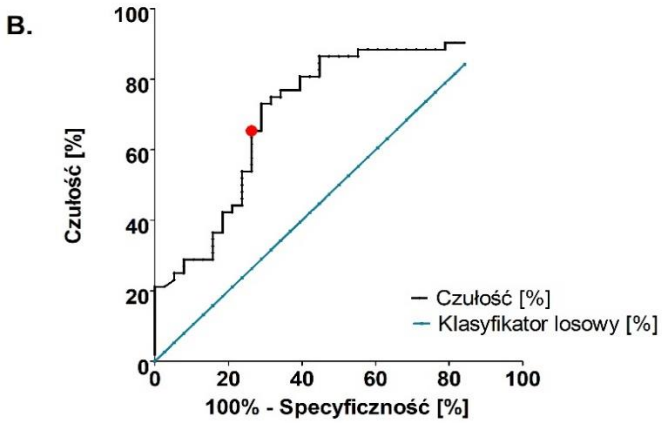
Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya:
[a] kontrola płodna *vs.* pacjentki IVF (ciąża) przed ET: p=0,037; [b] kontrola płodna *vs.* pacjentki IVF (ciąża) po ET: p=0,05; [c] kontrola płodna *vs.* pacjentki IVF (poronienia) przed ET: p=0,0003; [d] kontrola płodna *vs.* pacjentki IVF (poronienia) po ET: p=0,0002; [e] kontrola płodna w ciąży *vs.* pacjentki IVF (brak ciąży) po ET: p=0,03; [f] kontrola płodna w ciąży *vs.* pacjentki IVF (poronienia) przed ET: p=0,05; [g] kontrola płodna w ciąży *vs.* kontrola płodna: p=0,06; [h] pacjentki IVF (poronienia) przed ET *vs.* pacjentki IVF (ciąża) przed ET: p=0,0032; i pacjentki IVF (poronienia) przed ET *vs.* pacjentki IVF (brak ciąży) przed ET: p=0,0018; [j] pacjentki IVF (poronienia) po ET *vs.* pacjentki IVF (ciąża) po ET: p=0,0031; [k] pacjentki IVF (poronienia) po ET *vs.* pacjentki IVF (brak ciąży) po ET: p=0,0002.

4.4.4. Analiza krzywych ROC dla stężenia ERAP2

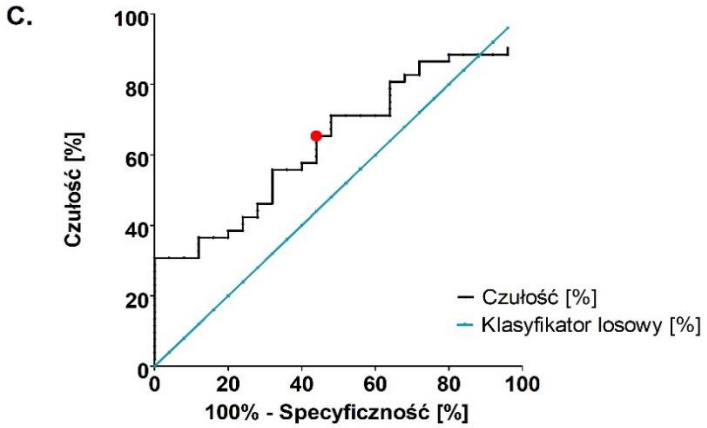
Przeprowadzono analizę krzywych ROC dla stężenia ERAP2 w celu znalezienia wartości progowej, która pozwoliłaby odróżnić pacjentki z poronieniami od kobiet, które zaszły w ciążę po *in vitro* oraz kobiet płodnych. Na **Rycinie 37** przedstawiono krzywe ROC, dla których uzyskano istotne wyniki. Wszystkie analizy dotyczą osocza pacjentek pobranego po transferze zarodka. Z badań wynika, że wartość progowa stężenia ERAP2, odróżniająca pacjentki, które zaszły w ciążę po *in vitro* od pacjentek, które miały poronienie po transferze zarodka, wynosi 2,92 ng/ml przy czułości 65,38% i specyficzności 64,39% (p=0,003; AUC=0,64; LR=1,84) (**Rycina 37 A**). Gdy porównano ze sobą kobiety z kontroli, które zaszły w ciążę naturalnie i urodziły dziecko w przeszłości oraz pacjentki po poronieniu, to analiza ROC wykazała silniejsze różnice (p=0,00028; AUC=0,72; LR=2,48), ale wartość graniczna ERAP2 pozostawała na tym samym poziomie (2,91 ng/ml przy czułości 65,38% i specyficzności 73,68%) (**Rycina 37 B**). Analiza ROC wykazała mniejsze różnice i mniejsze pole pod krzywą (AUC), gdy zestawiono stężenia ERAP2 kobiet z kontroli, które w momencie testu były w ciąży ze stężeniami pacjentek, które doznały poronienia (**Rycina 37 C**). Punkt progowy ERAP2 wyniósł 2,89 ng/ml (p=0,05; AUC=0,64; LR=1,49). Czułość i specyficzność testu dla tego punktu osiągnęły wartości odpowiednio 65,38% i 56%.



AUC=0,64; p=0,0033; punkt odcięcia (na czerwono)=2,92; czułość (65,38%); specyficzność (64,39%); LR=1,84



AUC=0,72; p=0,00028; punkt odcięcia (na czerwono)=2,91; czułość (65,38%); specyficzność (73,68%); LR=2,48



AUC=0,64; p=0,05; punkt odcięcia (na czerwono)=2,89; czułość (65,38%); specyficzność (56%); LR=1,49

Rycina 37. Analizy ROC dla stężenia ERAP2 u pacjentek, które doznały poronienia i kobiet z kontroli płodnej.

(A) Pacjentki, które doświadczyły poronienia (osocze pobrane po transferze zarodka) *vs.* pacjentki, które zaszły w ciążę po IVF (osocze pobrane po transferze); (B) Pacjentki, które poroniły (osocze pobrane po transferze zarodka) *vs.* kobiety z kontroli płodnej, które urodziły w przeszłości; (C) Pacjentki po poronieniu (osocze pobrane po transferze zarodka) *vs.* kobiety z kontroli płodnej, które w momencie testu były w ciąży.
AUC – pole pod krzywą (ang. *area under curve*); p – istotność statystyczna; LR – iloraz wiarygodności (ang. *likelihood ratio*).

4.5. Rola HLA-G w nawracających niepowodzeniach implantacji zarodka

4.5.1. Analiza częstości genotypów, haplotypów i diplotypów *HLA-G* w badanych grupach pacjentek i kobiet kontrolnych

Częstości badanych genotypów *HLA-G* porównano u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kobiet płodnych. Genotypy sprawdzano w trzech miejscach polimorficznych: rs1632947:-964G>A, rs1233334:-725G>C/T i 14-nukleotydowej insercji/delecji w regionie 3'UTR. Wyniki umieszczono w **Tabeli 19**.

Tabela 19. Rozkład częstości genotypów i alleli *HLA-G* u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kobiet kontrolnych.

Genotyp HLA-G	Kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
rs1632947:-964G>A	N=496 (%)	N=283 (%)	N=161 (%)	N=384 (%)
AA	126 (25,40)	74 (26,15)	42 (26,09)	78 (20,31)
AG	254 (51,21)	138 (48,76)	90 (55,90)	193 (50,26)
GG	**116 (23,39)[a]**	71 (25,09)	**29 (18,01)[b]**	113 (29,43)
allel A	**506 (51,01)[c]**	286 (50,53)	**174 (54,04)[d]**	349 (45,44)
H-W	p=0,58	p=0,68	p=0,11	p=0,79
rs1233334:-725G>C/T	N=496 (%)	N=283 (%)	N=161 (%)	N=384 (%)
CC	351 (70,77)	207 (73,14)	107 (66,46)	262 (68,23)
CG	117 (23,59)	62 (21,91)	42 (26,09)	100 (26,04)
GG	6 (1,21)	4 (1,41)	2 (1,24)	8 (2,08)
GT	3 (0,60)	2 (0,71)	1 (0,62)	1 (0,26)
CT	19 (3,83)	8 (2,83)	9 (5,59)	13 (3,39)
TT	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
allel T	22 (2,22)	10 (1,77)	10 (3,11)	14 (1,82)
H-W	p=0,31	p=0,98	p=0,27	p=0,43
rs371194629: ins ATTTGTTCATGCCT/del	N=495 (%)	N=283 (%)	N=160 (%)	N=383 (%)
Del/del	164 (33,13)	94 (33,22)	50 (31,25)	138 (36,03)
Ins/del	253 (51,11)	146 (51,59)	85 (53,13)	180 (47,00)
Ins/ins	78 (15,76)	43 (15,19)	25 (15,63)	65 (16,97)
allel ins	409 (41,31)	232 (40,99)	135 (42,19)	310 (40,47)
H-W	p=0,23	p=0,26	p=0,26	p=0,63

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*. N – całkowita liczba osób przebadanych; H-W – rozkład Hardy'ego-Weinberga; p – istotność statystyczna; OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności. Wartości pogrubione wskazują na istotne statystycznie różnice.

Kobiety IVF *vs.* kontrola płodna: [a]p=0,044, OR=0,732, 95% CI (0,54-1,00); [c]p=0,021, OR=1,250, 95% CI (1,03-1,52);

SIVF *vs.* kontrola płodna: [b]p=0,005, OR=0,527, 95% CI (0,32-0,85); [d]p=0,012, OR=1,411, 95% CI (1,08-1,85)

Zaobserwowane różnice dotyczyły jedynie polimorfizmu rs1632947. Odsetek kobiet o genotypie GG w kontroli płodnej wyniósł 29,43% i okazał się być większy niż u kobiet z genotypem GG, które poddały się zapłodnieniu *in vitro* (23,39%) oraz kobiet, które zaszły w ciążę po *in vitro* (18,01%). Różnice te były statystycznie znaczące (odpowiednio: [a]p=0,044, OR=0,732; [b]p=0,005, OR=0,527). Odwrotnie allel A, który jest allelem rzadszym w populacji, w miejscu polimorficznym rs1632947 występował częściej u wszystkich kobiet IVF ([c]p=0,021, OR=1,250) i kobiet SIVF ([d]p=0,012, OR=1,411) niż u kobiet kontrolnych.

Dla pacjentek i kontroli płodnej wyznaczono 10 haplotypów w kolejności polimorficznej: rs1632947–rs1233334–rs371194629. **Tabela 20** pokazuje rozkład haplotypów w przebadanych grupach kobiet.

Tabela 20. Rozkład częstości haplotypów *HLA-G* u kobiet z grup IVF i kobiet z kontroli.

Haplotypy HLA-G	Kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	2N=990 (%)	2N=778 (%)	2N=655 (%)	2N=766 (%)
A-C-del	**178 (17,98)[a]**	**119 (15,30)[b]**	**106 (16,18)[c]**	74 (9,66)
A-C-ins	**281 (28,38)[d]**	**210 (26,99)[e]**	**149 (22,75)[f]**	264 (34,46)
A-G-del	**39 (3,94)[g]**	**36 (4,63)[h]**	**36 (5,50)[i]**	8 (1,04)
A-T-del	6 (0,61)	6 (0,77)	5 (0,76)	2 (0,26)
A-T-ins	1 (0,10)	1 (0,13)	1 (0,15)	0 (0,00)
G-C-del	**267 (26,97)[j]**	252 (32,39)	225 (34,35)	266 (34,73)
G-C-ins	**110 (11,11)[k]**	**84 (10,80)[l]**	**85 (12,98)[m]**	31 (4,05)
G-G-del	**91 (9,19)[n]**	**60 (7,71)[o]**	**42 (6,41)[p]**	106 (13,84)
G-G-ins	1 (0,10)	1 (0,13)	1 (0,15)	3 (0,39)
G-T-ins	16 (1,62)	9 (1,16)	5 (0,76)	12 (1,57)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*. 2N – liczba wszystkich haplotypów; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x10 możliwych haplotypów); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności. Wartości pogrubione wskazują na istotne statystycznie różnice. Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947: 964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del

Kobiety IVF *vs.* kontrola płodna: [a]$p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=2,049, 95% CI (1,52-2,78); [d]$p/p_{corr.}$=0,007/ns, OR=0,754, 95% CI (0,61-0,93); [g]$p/p_{corr.}$<0,0001/0,0001, OR=3,883, 95% CI (1,78-9,68); [j]$p/p_{corr.}$=0,0005/0,005, OR=0,694, 95% CI (0,56-0,86); [k]$p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=2,962, 95% CI (1,95-4,62); [n]$p/p_{corr.}$=0,003/0,03, OR=0,630, 95% CI (0,46-0,86);

RIF *vs.* kontrola płodna: [b]$p/p_{corr.}$=0,0009/0,009, OR=1,688, 95% CI (1,23-2,33); [e]$p/p_{corr.}$=0,002/0,02, OR=0,703, 95% CI (0,56-0,88); [h]$p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=4,593, 95% CI (2,08-11,52); [l]$p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=2,868, 95% CI (1,85-4,54); [o]$p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=0,521, 95% CI (0,37-0,73);

SIVF *vs.* kontrola płodna: [c]$p/p_{corr.}$=0,0003/0,003, OR=1,805, 95% CI (1,30-2,52); [f]$p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=0,560, 95% CI (0,44-0,71); [i]$p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=5,504, 95% CI (2,49-13,82); [m]$p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=3,533, 95% CI (2,28-5,60); [p]$p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=0,427, 95% CI (0,29-0,63)

Porównanie częstości haplotypów *HLA-G* pomiędzy kobietami poddającymi się zapłodnieniu *in vitro* a kobietami z kontroli, dało bardzo istotne wyniki. Kobiety z IVF dużo częściej były nosicielkami haplotypów A-C-del ($^{a}p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=2,049), A-G-del ($^{g}p/p_{corr.}$<0,0001/0,0001, OR=3,883) i G-C-ins ($^{k}p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=2,962) niż kobiety z kontroli. Z kolei kobiety z kontroli częściej posiadały haplotypy A-C-ins ($^{d}p/p_{corr.}$=0,007/ns, OR=0,754), G-C-del ($^{j}p/p_{corr.}$=0,0005/0,005, OR=0,694) i G-G-del ($^{n}p/p_{corr.}$=0,003/0,03, OR=0,630) niż kobiety z IVF. Dla tych samych haplotypów (z wyjątkiem G-C-del) zaobserwowano podobne różnice o tym samym efekcie, pomiędzy kobietami RIF i SIVF a kobietami z kontroli. Uzyskane wyniki były silnie istotne i w większości przypadków zostały zachowane po poprawce Bonferroniego.

Diplotypy *HLA-G* wyznaczono według kolejności polimorfizmów takiej jak w przypadku haplotypów. Częstości diplotypów u kobiet zostały przedstawione w **Tabeli 21**.

Tabela 21. Rozkład częstości diplotypów *HLA-G* u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kobiet płodnych.

Diplotypy HLA-G	Kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=495 (%)	N=283 (%)	N=160 (%)	N=383 (%)
A-C-del/A-C-del	**44 (8,89)[a]**	**21 (7,42)[b]**	**16 (10,00)[c]**	7 (1,83)
A-C-del/A-G-del	**28 (5,66)[d]**	13 (4,59)	**12 (7,50)[e]**	8 (2,09)
A-C-del/G-C-del	29 (5,86)	16 (5,65)	10 (6,25)	26 (6,79)
A-C-del/G-G-del	15 (3,03)	7 (2,47)	6 (3,75)	7 (1,83)
A-C-ins/A-C-del	13 (2,63)	10 (3,53)	3 (1,88)	17 (4,44)
A-C-ins/A-C-ins	**29 (5,86)[f]**	**25 (8,83)[g]**	**4 (2,50)[h]**	44 (11,49)
A-C-ins/A-T-del	5 (1,01)	1 (0,35)	**4 (2,50)[i]**	1 (0,26)
A-C-ins/G-C-del	142 (28,69)	82 (28,98)	46 (28,75)	103 (26,89)
A-G-del/A-G-del	5 (1,01)	3 (1,06)	2 (1,25)	0 (0,00)
A-G-del/A-T-ins	1 (0,20)	0 (0,00)	1 (0,63)	0 (0,00)
A-T-del/A-C-del	1 (0,20)	1 (0,35)	0 (0,00)	1 (0,26)
G-C-del/G-C-del	**25 (5,05)[j]**	**19 (6,71)[k,l]**	**3 (1,88)[m]**	46 (12,01)
G-C-del/G-C-ins	**27 (5,45)[n]**	**18 (6,36)[o]**	7 (4,38)	6 (1,57)
G-C-ins/G-C-ins	**41 (8,28)[p]**	16 (5,65)	**17 (10,63)[q]**	12 (3,13)
G-C-ins/G-G-ins	1 (0,20)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,26)
G-G-del/A-C-ins	56 (11,31)	28 (9,89)	23 (14,38)	48 (12,53)
G-G-del/G-C-del	**16 (3,23)[r]**	**13 (4,59)[s,t]**	**1 (0,63)[u]**	36 (9,40)
G-G-del/G-G-del	**1 (0,20)[v]**	1 (0,35)	0 (0,00)	7 (1,83)
G-G-ins/G-G-ins	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,26)
G-T-ins/A-C-del	4 (0,81)	3 (1,06)	0 (0,00)	1 (0,26)
G-T-ins/A-C-ins	7 (1,41)	2 (0,71)	4 (2,50)	7 (1,83)
G-T-ins/G-C-del	3 (0,61)	2 (0,71)	1 (0,63)	3 (0,78)
G-T-ins/G-G-del	2 (0,40)	2 (0,71)	0 (0,00)	1 (0,26)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*. N – liczba wszystkich diplotypów; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x23 możliwe diplotypy); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności. Wartości pogrubione wskazują na istotne statystycznie różnice. Kolejność polimorfizmów w diplotypie: rs1632947: 964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del. Test chi-kwadrat dla trendu dla G-C-del/G-C-del *vs.* G-C-del/G-C-ins *vs.* G-C-ins/G-C-ins: p<0,0001.

Kobiety IVF *vs.* kontrola płodna: $^{a}p/p_{corr.}$<0,0001/0,0001, OR=5,232, 95% CI (2,30-13,94); $^{d}p/p_{corr.}$=0,009/ns, OR=2,807, 95% CI (1,23-7,22); $^{f}p/p_{corr.}$=0,003/ns, OR=0,480, 95% CI (0,28-0,80); $^{j}p/p_{corr.}$<0,0001/0,01, OR=0,390, 95% CI (0,22-0,66); $^{n}p/p_{corr.}$=0,002/0,05, OR=3,620, 95% CI (1,44-10,84); $^{p}p/p_{corr.}$=0,001/0,03, OR=2,789, 95% CI (1,41-5,92); $^{r}p/p_{corr.}$<0,0001/0,0001, OR=0,322, 95% CI (0,16-0,61); $^{v}p/p_{corr.}$=0,024/ns, OR=0,109, 95% CI (0,00-0,85);
RIF *vs.* kontrola płodna: $^{b}p/p_{corr.}$=0,006/0,01, OR=4,296, 95% CI (1,73-12,14); $^{k}p/p_{corr.}$=0,025/ns, OR=0,528, 95% CI (0,28-0,94); $^{o}p/p_{corr.}$=0,001/0,03, OR=4,259, 95% CI (1,59-13,29); $^{s}p/p_{corr.}$=0,024/ns, OR=0,465, 95% CI (0,22-0,92);

SIVF *vs.* kontrola płodna: $^{c}p/p_{corr.}$<0,0001/0,0001, OR=5,945, 95% CI (2,26-17,46); $^{e}p/p_{corr.}$=0,005/ns, OR=3,790, 95% CI (1,39-10,92); $^{h}p/p_{corr.}$=0,0004/0,01, OR=0,198, 95% CI (0,05-0,56); $^{i}p/p_{corr.}$=0,028/ns,

OR=9,750, 95% CI (0,96-482,31); $^{m}p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=0,140, 95% CI (0,03-0,45); $^{q}p/p_{corr.}$=0,001/0,03, OR=3,665, 95% CI (1,60-8,64); $^{u}p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=0,061, 95% CI (0,00-0,37);

RIF *vs.* SIVF: $^{g}p/p_{corr.}$=0,009/ns, OR=3,770, 95% CI (1,27-15,18); $^{l}p/p_{corr.}$=0,024/ns, OR=3,758, 95% CI (1,08-20,14); $^{t}p/p_{corr.}$=0,023/ns, OR=7,634, 95% CI (1,13-326,90)

Diplotypy A-C-del/A-C-del, A-C-del/A-G-del, G-C-del/G-C-ins oraz G-C-ins/G-C-ins występowały istotnie rzadziej u kobiet z kontroli niż u wszystkich pacjentek IVF ($^{a}p/p_{corr.}$<0,0001/0,0001, OR=5,232; $^{d}p/p_{corr.}$=0,009/ns, OR=2,807; $^{n}p/p_{corr.}$=0,002/0,05, OR=3,620; $^{p}p/p_{corr.}$=0,001/0,03, OR=2,789). Natomiast diplotypy A-C-ins/A-C-ins, G-C-del/G-C-del, G-G-del/G-C-del, G-G-del/G-G-del były rzadsze w grupie pacjentek IVF niż w kontroli ($^{f}p/p_{corr.}$=0,003/ns, OR=0,480; $^{j}p/p_{corr.}$<0,0001/0,01, OR=0,390, $^{r}p/p_{corr.}$<0,0001/0,0001, OR=0,322; $^{v}p/p_{corr.}$=0,024/ns, OR=0,109). Diplotyp A-C-ins/A-C-ins obserwowany był również rzadziej w grupie kobiet SIVF niż w kontroli ($^{h}p/p_{corr.}$=0,0004/0,01, OR=0,198).

Kobiety z grupy RIF i SIVF częściej były nosicielkami diplotypu A-C-del/A-C-del niż kobiety z kontroli ($^{b}p/p_{corr.}$=0,006/0,01, OR=4,296 dla RIF; $^{c}p/p_{corr.}$<0,0001/0,0001, OR=5,945 dla SIVF), natomiast odwrotnie było w przypadku diplotypów G-C-del/G-C-del ($^{k}p/p_{corr.}$=0,025/ns, OR=0,528 dla RIF; $^{m}p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=0,140 dla SIVF), G-G-del/G-C-del ($^{s}p/p_{corr.}$=0,024/ns, OR=0,465 dla RIF; $^{u}p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0001, OR=0,061 dla SIVF). Diplotyp G-C-del/G-C-ins był rzadszy w kontroli niż u kobiet RIF ($^{o}p/p_{corr.}$=0,001/0,03, OR=4,259). Kobiety z grupy SIVF charakteryzowały się większym odsetkiem A-C-del/A-G-del, A-C-ins/A-T-del oraz G-C-ins/G-C-ins niż kobiety z kontroli ($^{e}p/p_{corr.}$=0,005/ns, OR=3,790; $^{i}p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=9,750; $^{q}p/p_{corr.}$=0,001/0,03, OR=3,665).

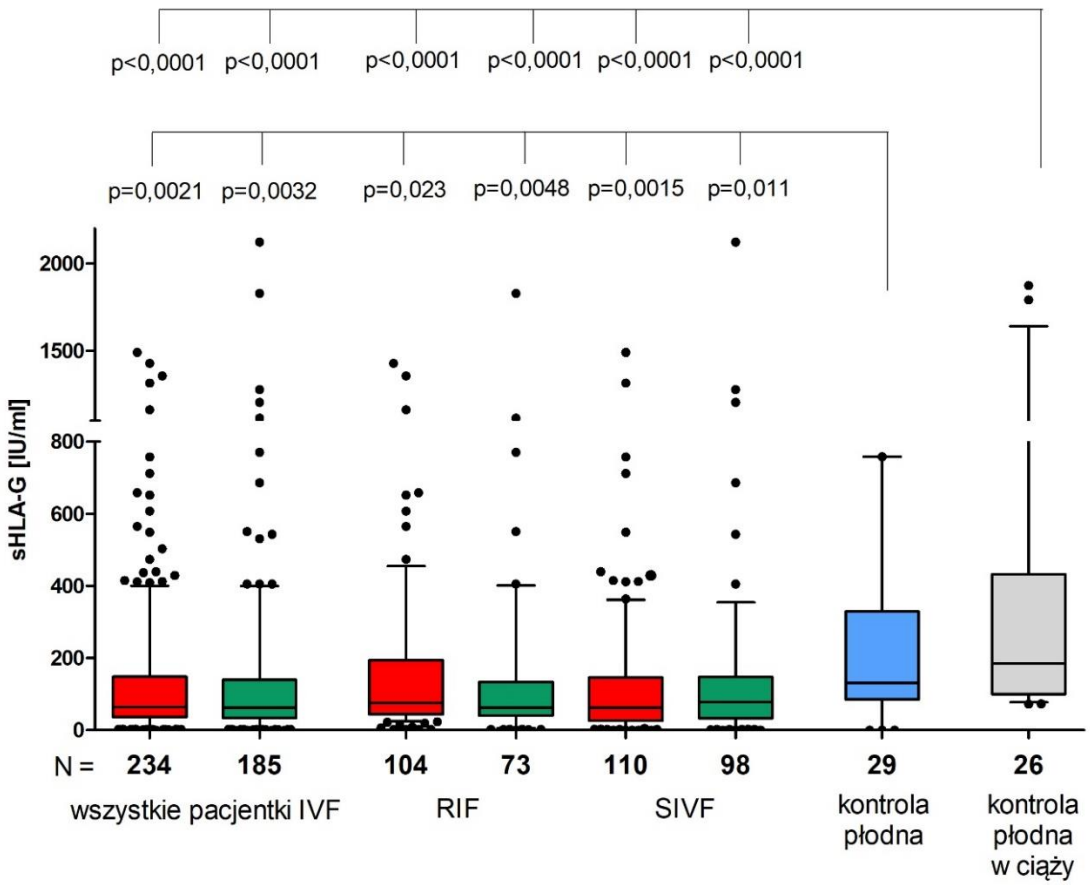
Kiedy porównano ze sobą diplotypy, które różniły się tylko allelem insercyjnym w miejscu polimorficznym rs371194629 (G-C-del/G-C-del *vs.* G-C-del/G-C-ins *vs.* G-C-ins/G-C-ins), zaobserwowano zależność pomiędzy występowaniem allelu insercyjnego a ryzykiem niepłodności, ponieważ kobiety z grupy IVF znacznie różniły się częstością tych diplotypów od kobiet z kontroli (test chi-kwadrat dla trendu wyniósł p<0,0001). Allel insercyjny był niekorzystny, ponieważ przeważał u kobiet z grupy IVF (diplotypy G-C-del/G-C-ins oraz G-C-ins/G-C-ins) w porównaniu do kontroli, natomiast diplotyp G-C-del/G-C-del częstszy był u kobiet kontrolnych.

4.5.2. Stężenie sHLA-G w osoczu pacjentek i kontroli płodnej

Stężenie rozpuszczalnej formy HLA-G (sHLA-G) zmierzono w osoczu kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz w osoczu kobiet płodnych. Od 234 kobiet przed

transferem zarodka pobrano osocze do badań, a od 185 z nich pobrano osocze także po transferze zarodka w momencie wykonywania testu ciążowego. Wśród pobranych próbek osocza 104 pochodziły od kobiet z grupy RIF przed transferem i 73 od kobiet z RIF po transferze. Zbadano również 110 próbek od kobiet z grupy SIVF przed transferem i 98 po transferze zarodka. Stężenie sHLA-G określono również w 55 próbkach osocza kontrolnych kobiet płodnych, wśród których 29 urodziło dzieci w przeszłości, natomiast 26 w momencie pobrania materiału do badań było w naturalnie poczętej ciąży. Wyniki i liczebności grup przedstawiono na **Rycinie 38**.

Zaobserwowano, że kobiety z kontroli płodnej, które nie były w ciąży, różniły się istotnie stężeniami wydzielanego sHLA-G od wszystkich grup pacjentek z IVF i wydzielały więcej sHLA-G niż kobiety z IVF. Mediana sHLA-G u kobiet płodnych wynosiła 130,80 IU/ml, natomiast u pacjentek IVF, RIF i SIVF przed transferem zarodka na poziomie odpowiednio: 64,09; 75,98; 61,95 IU/ml (IVF *vs.* KP: p=0,0021; RIF *vs.* KP: p=0,023; SIVF *vs.* KP: p=0,0015). Po transferze zarodka mediany sHLA-G u wszystkich pacjentek IVF, RIF i SIVF wynosiły odpowiednio: 62,90; 62,38; 78,09 IU/ml (IVF *vs.* KP: p=0,0032; RIF *vs.* KP: p=0,0048, SIVF *vs.* KP: p=0,011) (**Rycina 38** i **Tabela 22**). Kobiety płodne, które były w ciąży (w momencie pobrania osocza) miały znacząco wyższe stężenie sHLA-G (mediana 184,20 IU/ml) niż kobiety z IVF, kobiety RIF i SIVF, niezależnie czy osocze badane było przed, czy po transferze zarodka (p<0,0001) (**Rycina 38 i Tabela 22**).



Rycina 38. Stężenie sHLA-G (IU/ml) w osoczu pacjentek i kontroli płodnej.

Kolor czerwony oznacza osocze pobrane przed transferem zarodka; kolor zielony oznacza osocze pobrane po transferze; p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba pacjentek.

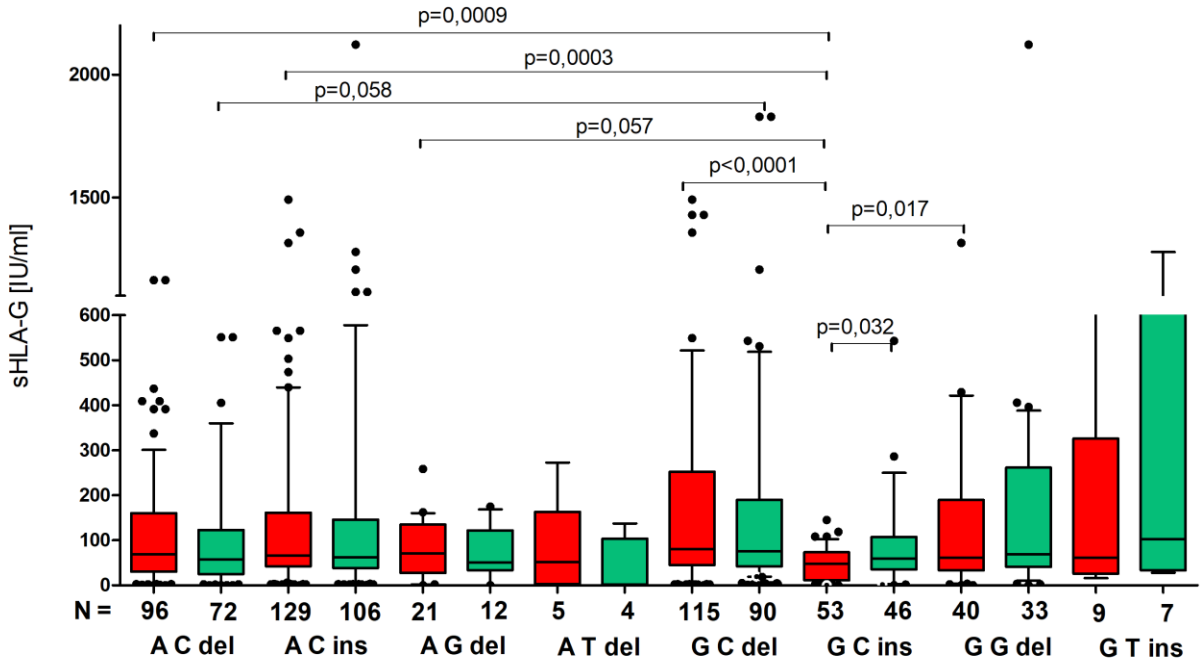
Tabela 22. Mediany stężenia sHLA-G u kobiet z grupy IVF oraz kobiet z kontroli.

Grupa	sHLA-G Przed transferem Mediana (IU/ml)	sHLA-G Po transferze Mediana (IU/ml)
Wszystkie pacjentki IVF	64,09	62,90
RIF	75,98	62,38
SIVF	61,95	78,09
	sHLA-G Mediana (IU/ml)	
Kontrola płodna		130,80
Kontrola płodna w ciąży		184,20

4.5.3. Wpływ haplotypów *HLA-G* na stężenie sHLA-G

U pacjentek poddających się zapłodnieniu *in vitro* sprawdzono wydzielanie sHLA-G w zależności od posiadanego haplotypu *HLA-G*. Zaobserwowano, że największa różnica w wydzielaniu sHLA-G do osocza jest pomiędzy pacjentkami o haplotypie G-C-del, a G-C-ins

i pomiary te dotyczyły osocza pobranego przed transferem zarodka (p<0,0001, mediany odpowiednio: 79,95 *vs.* 47,34 IU/ml) (**Rycina 39** i **Tabela 23**). Również pacjentki o haplotypie A-C-del (mediana 69,02 IU/ml), A-C-ins (mediana 65,72 IU/ml) i G-G-del (mediana 61,50 IU/ml) wydzielały do osocza przed transferem zarodka znacznie więcej sHLA-G niż pacjentki o haplotypie G-C-ins (mediana 47,34 IU/ml). Różnice te wynosiły odpowiednio: p=0,0009; p=0,0003; p=0,017. Takich różnic nie stwierdzono pomiędzy stężeniami sHLA-G w osoczu pobranego po transferze zarodka u tych pacjentek (**Rycina 39** i **Tabela 23)**.



Rycina 39. Stężenie sHLA-G (IU/ml) mierzone przed i po transferze zarodka u wszystkich pacjentek IVF w zależności od haplotypu *HLA-G*.

Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del; kolor czerwony oznacza osocze pobrane przed transferem zarodka; kolor zielony oznacza osocze pobrane po transferze; p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba pacjentek.

Tabela 23. Stężenie sHLA-G (IU/ml) mierzone przed i po transferze zarodka u wszystkich pacjentek IVF w zależności od haplotypu *HLA-G* – statystyka opisowa.

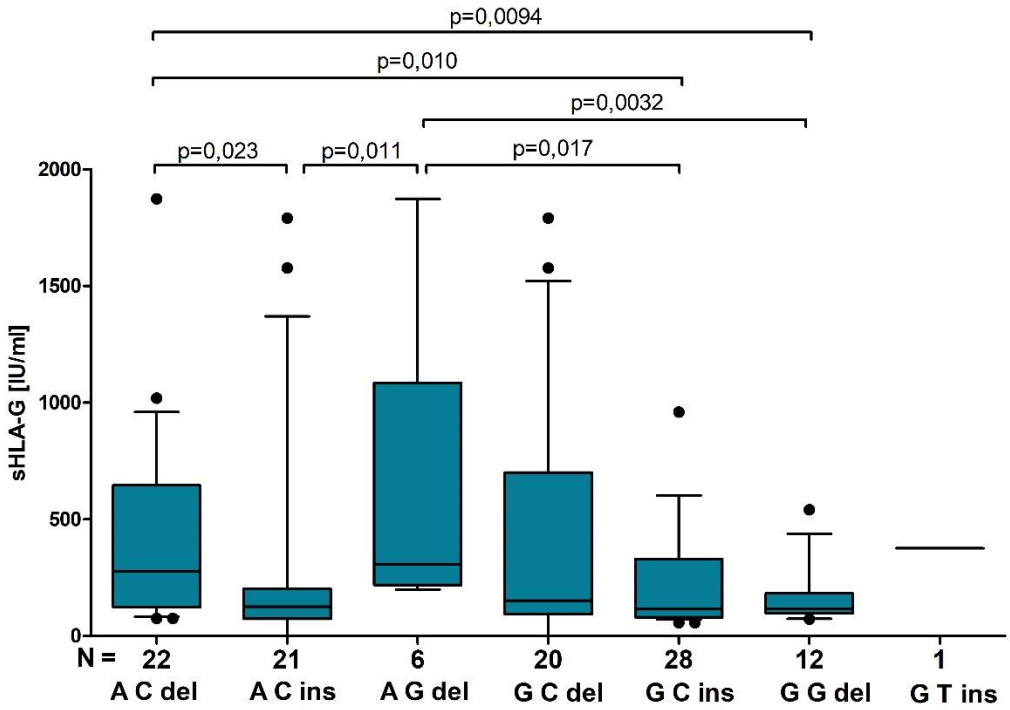
Haplotyp*	Przed lub po ET	Liczba pacjentek	sHLA-G (IU/ml)						
			Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
A-C-del	przed	96	0,00	30,58	69,02	160,20	1163,00	131,40	185,60
	po	72	0,00	25,14	**57,36[a]**	123,10	876,90	129,90	193,20
A-C-ins	przed	129	0,00	42,36	65,72	161,40	1492,00	163,90	256,90
	po	106	0,00	38,55	62,53	146,00	2122,00	185,60	330,50
A-G-del	przed	21	0,00	27,69	70,66	135,10	258,50	80,05	65,69
	po	12	0,00	33,70	50,78	122,30	174,80	72,23	57,58
A-T-del	przed	5	2,26	2,59	51,39	163,20	272,70	76,61	112,40
	po	4	2,04	2,07	2,36	103,60	137,30	36,00	67,50
G-C-del	przed	115	0,00	45,20	79,95	252,30	1492,00	202,00	305,60
	po	90	0,00	42,11	75,43	189,80	1828,00	197,80	330,60
G-C-ins	przed	53	0,00	11,18	**47,34[b, c, d, e, f, g]**	73,59	658,80	57,61	91,53
	po	46	0,00	34,91	59,44	107,50	968,90	102,70	160,60
G-G-del	przed	40	0,00	33,05	61,50	189,40	1315,00	166,00	275,20
	po	33	0,00	41,30	69,29	261,30	2122,00	190,10	369,30
G-T-ins	przed	9	16,23	26,28	61,49	326,00	758,10	201,80	245,20
	po	7	27,88	33,92	102,60	831,10	1278,00	387,20	488,70

*Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947: 964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del;

Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya:

[a]A-C-del po ET *vs.* G-C-del po ET: p=0,058; [b]A-C-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,0009; [c]A-C-ins przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,0003; [d]A-G-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,057; [e]G-C-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p<0,0001; [f] G-G-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,017; [g]G-C-ins przed ET *vs.* po ET: p=0,032.

Kobiety z kontroli płodnej także różniły się wydzielaniem sHLA-G do osocza w zależności od haplotypu *HLA-G*. Niskie stężenia sHLA-G były charakterystyczne dla kobiet o haplotypie G-C-ins (mediana 114,70 IU/ml), G-G-del (mediana 116,30 IU/ml) i A-C-ins (mediana 124,90 IU/ml). W porównaniu do nich kobiety o haplotypach A-C-del (mediana 275,70 IU/ml) lub A-G-del (mediana 307,50 IU/ml) miały znacząco wyższe stężenia sHLA-G w osoczu (A-C-del *vs.* G-C-ins: p=0,010; G-G-del *vs.* G-C-ins: p=0,0094; A-C-ins *vs.* G-C-ins: p=0,023). Natomiast dla kobiet z haplotypem A-G-del w porównaniu do kobiet z G-C-ins, G-G-del, A-C-ins odpowiednio: p=0,017; p=0,0032; p=0,011 (**Rycina 40** i **Tabela 24**).



Rycina 40. Zależność stężenia sHLA-G od haplotypu u wszystkich kobiet kontrolnych.

Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947: 964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del; p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba kobiet.

Tabela 24. Stężenie sHLA-G (IU/ml) mierzone u wszystkich kobiet kontrolnych – statystyka opisowa.

Haplotyp*	Liczba pacjentek	sHLA-G (IU/ml)						
		Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
A-C-del	22	75,76	123,00	**275,70**[a, b, c]	645,40	1874,00	434,70	427,00
A-C-ins	21	0,00	73,16	**124,90**[d]	202,30	1791,00	292,70	480,20
A-G-del	6	198,70	218,30	**307,50**[e, f]	1085,00	1874,00	622,30	655,70
G-C-del	20	0,00	92,91	151,00	700,50	1791,00	422,20	533,40
G-C-ins	28	57,13	79,77	114,70	330,10	959,60	213,30	212,50
G-G-del	12	72,91	97,51	116,30	182,80	540,70	158,70	126,90
G-T-ins	1	375,60	375,60	375,60	375,60	375,60	375,60	0,00

*Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del;

Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya: [a]A-C-del *vs.* A-C-ins: p=0,023; [b]A-C-del *vs.* G-C-ins: p=0,010; [c]A-C-del *vs.* G-G-del: p=0,0094; [d]A-C-ins *vs.* A-G-del: p=0,011; [e]A-G-del *vs.* G-C-ins: p=0,017; [f]A-G-del *vs.* G-G-del: p=0,0032

Kobiety z grupy kontrolnej porównano z kobietami IVF pod względem wydzielania sHLA-G, uwzględniając poszczególne haplotypy HLA-G. Wyniki umieszczono w **Tabeli 25**.

Tabela 25. Stężenie sHLA-G u kobiet IVF i kobiet z grupy kontrolnej w zależności od haplotypu *HLA-G.*

Haplotyp*	Przed lub po transferze (ET)	Kobiety IVF		Kontrola płodna	
		Liczba pacjentek	Mediana (IU/ml)	Liczba pacjentek	Mediana (IU/ml)
A-C-del	przed	96	**69,02[a]**	22	275,70
	po	72	**57,36[b]**		
A-C-ins	przed	129	**65,72[c]**	21	124,90
	po	106	**62,53[d]**		
A-G-del	przed	21	**70,66[e]**	6	307,50
	po	12	**50,78[f]**		
A-T-del	przed	5	51,39	-	-
	po	4	2,36		
G-C-del	przed	115	**79,95[g]**	20	151,00
	po	90	**75,43[h]**		
G-C-ins	przed	53	**47,34[i]**	28	114,70
	po	46	**59,44[j]**		
G-G-del	przed	40	61,50	12	116,30
	po	33	69,29		
G-T-ins	przed	9	61,49	1	375,60
	po	7	102,6		

*Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del; ns – brak istotności. Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya.

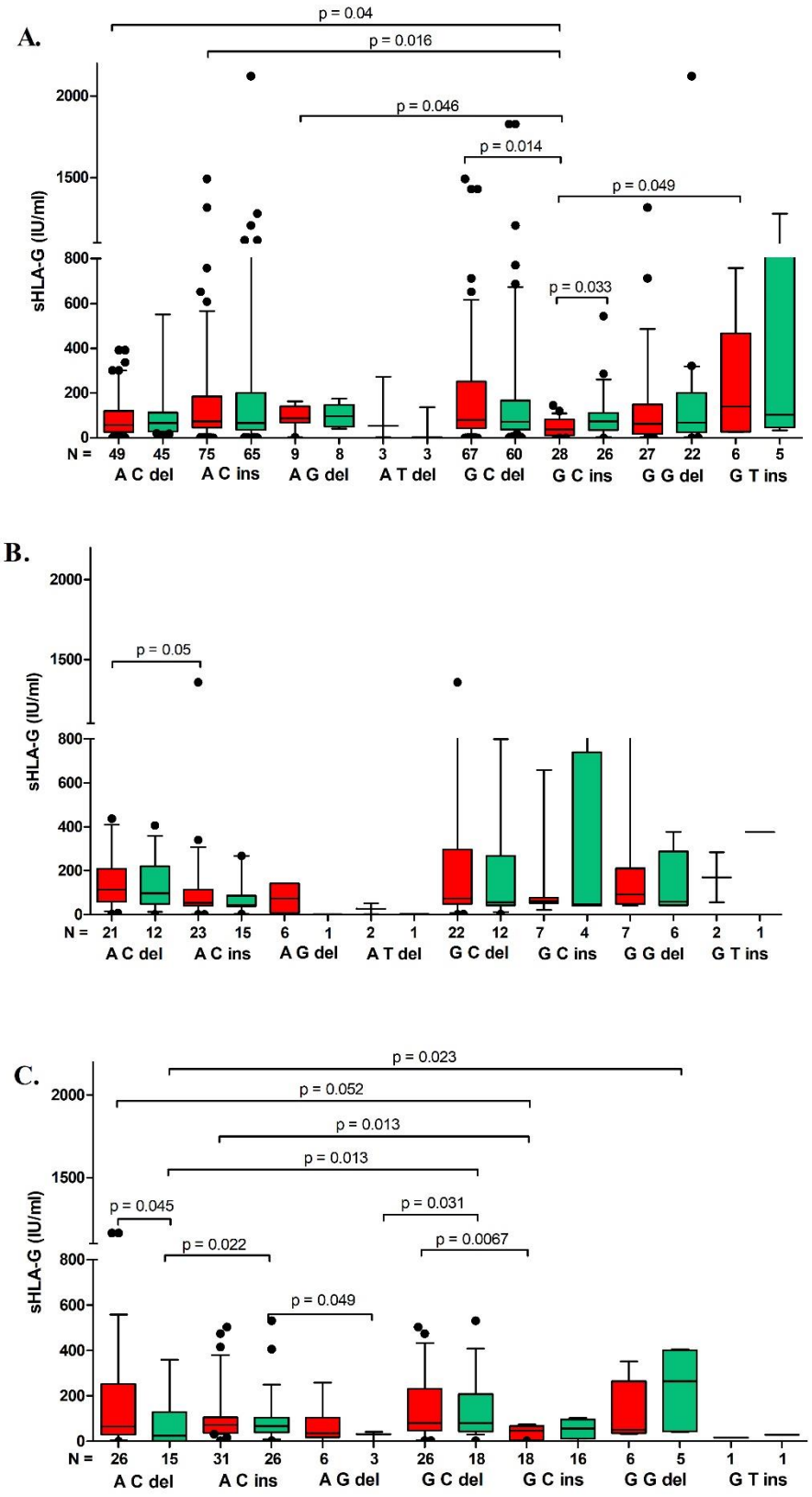
Kobiety IVF przed ET *vs.* kontrola płodna: [a]A-C-del: p<0,0001; [c]A-C-ins: p=0,04; [e]A-G-del: p=0,0005; [g]G-C-del: p=0,04; [i]G-C-ins: p<0,0001;

Kobiety IVF po ET *vs.* kontrola płodna: [b]A-C-del: p<0,0001; [d]A-C-ins: p=0,05; [f]A-G-del: p=0,0009; [h]G-C-del: p=0,04; [j]G-C-ins: p=0,0001

Istotne statystycznie różnice w wydzielaniu sHLA-G pomiędzy kobietami IVF a kobietami z kontroli dotyczyły prawie wszystkich haplotypów *HLA-G*. Kobiety poddające się zapłodnieniu *in vitro* miały znacząco niższe poziomy sHLA-G (mediany w przedziale 2,36-102,60 IU/ml) niż kobiety z kontroli (mediany 116,30-375,60 IU/ml). Największe różnice zaobserwowano w przypadku haplotypu A-C-del (IVF *vs.* kontrola zarówno przed, jak i po transferze: p<0,0001) oraz G-C-ins (IVF przed transferem *vs.* kontrola: p<0,0001; IVF po transferze *vs.* kontrola: p=0,0001). Kobiety z grupy kontrolnej o haplotypie G-C-ins wydzielały znacząco więcej sHLA-G (mediana 114,70 IU/ml) niż kobiety G-C-ins z grupy IVF (przed transferem – mediana 47,34 IU/ml, po transferze – mediana 59,44 IU/ml), jednak wśród kobiet kontrolnych stężenie to okazało się być najmniejsze. Najwięcej sHLA-G wydzielały kobiety z kontroli, które posiadały haplotypy A-G-del (mediana 307,50 IU/ml) i A-C-del (mediana 275,70 IU/ml). O tym, ile wydzielają sHLA-G kobiety pozytywne pod względem haplotypu G-T-ins, nie możemy wnioskować z uwagi na zbyt małą liczbę kobiet o tym haplotypie. Największe ilości sHLA-G wśród wszystkich pacjentek IVF, były wydzielane do osocza przed

transferem zarodka w przypadku kobiet o haplotypie A-G-del (mediana 70,66 IU/ml), A-C-del (mediana 69,02 IU/ml) oraz G-C-del (mediana 79,95 IU/ml).

W kolejnym etapie postanowiono sprawdzić, czy istnieje zależność wydzielania sHLA-G od haplotypów HLA-G u pacjentek IVF uwzględniając efekt po transferze zarodka. W tym celu pacjentki podzielono na trzy grupy w zależności od tego, czy transfer zarodka skutkował klinicznie potwierdzoną ciążą, brakiem ciąży, czy poronieniem (**Rycina 41**). Gdy transfer zarodka skutkował ciążą, nosicielki haplotypu G-C-ins wydzielały niższe stężenie sHLA-G niż kobiety o haplotypie G-C-del (p=0,014; mediana 37,21 *vs.* 79,95 IU/ml) oraz A-C-del (p=0,04; mediana 37,21 *vs.* 58,95 IU/ml) i A-C-ins (p=0,016; mediana 37,21 *vs.* 74,56 IU/ml) (**Rycina 41 A** i **Tabela 26**). Mniej istotne różnice zaobserwowano pomiędzy kobietami z haplotypami G-C-ins a kobietami mającymi haplotypy: G-T-ins (p=0,049; mediana 37,21 *vs.* 139,90 IU/ml) lub A-G-del (p=0,046; mediana 37,21 *vs.* 87,74). Podobnie było w przypadku, gdy transfer zarodka kończył się poronieniem. Kobiety o haplotypie G-C-ins, które doświadczyły poronienia, wyróżniały się niższym stężeniem od kobiet o haplotypach G-C-del (p=0,0067; mediana 46,76 *vs.* 80,77 IU/ml) oraz A-C-del (p=0,052; mediana 46,76 *vs.* 64,10 IU/ml) i A-C-ins (p=0,013; mediana 46,76 *vs.* 71,83 IU/ml) (**Rycina 41 C** i **Tabela 28**). Wśród kobiet, które nie zaszły w ciążę po transferze zarodka, generalnie obserwowano spadki stężenia sHLA-G po transferze zarodka, co było widoczne w medianach i średnich sHLA-G (**Rycina 41 B** i **Tabela 27**). Gdy transfer skutkował poronieniem, widoczne były spadki stężenia sHLA-G po transferze zarodka u kobiet o haplotypach A-C-del, A-C-ins i A-G-del, natomiast wzrost stężenia po transferze dotyczył kobiet o haplotypach G-C-ins, G-G-del i G-T-ins. Jedynie dla haplotypu G-C-del stężenie sHLA-G utrzymało się na tym samym poziomie po transferze (**Tabela 28**).



Rycina 41. Stężenie sHLA-G w osoczu (IU/ml) w zależności od haplotypów *HLA-G* wśród pacjentek IVF, które zaszły w ciążę (A), nie zaszły w ciążę (B) lub doznały poronienia (C) po transferze zarodka.

Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947: 964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del; kolor czerwony oznacza osocze pobrane przed transferem zarodka; kolor zielony oznacza osocze pobrane po transferze; p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba pacjentek.

Tabela 26. Stężenie sHLA-G (IU/ml) w zależności od haplotypu *HLA-G* u pacjentek IVF, które zaszły w ciążę po transferze – statystyka opisowa.

Haplotyp*	Przed lub po ET	Liczba pacjentek	sHLA-G (IU/ml)						
			Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
A-C-del	przed	49	0,00	26,46	58,95	120,20	391,50	95,99	100,70
	po	45	0,00	28,35	66,78	113,10	876,90	145,90	224,10
A-C-ins	przed	75	0,00	45,44	74,56	184,70	1492,00	191,70	286,90
	po	65	0,00	35,53	66,21	199,80	2122,00	242,90	403,70
A-G-del	przed	9	2,20	67,91	87,74	140,80	162,20	92,09	49,71
	po	8	40,72	50,78	97,22	147,20	174,80	99,01	50,60
A-T-del	przed	3	2,93	2,93	53,77	272,70	272,70	109,80	143,30
	po	3	2,04	2,04	2,18	137,30	137,30	47,16	78,02
G-C-del	przed	67	0,00	43,24	79,95	251,40	1492,00	212,70	333,10
	po	60	0,00	37,63	71,17	167,20	1828,00	215,00	378,80
G-C-ins	przed	28	0,00	11,18	**37,21**[a, b, c, d, e, f]	82,72	145,10	47,67	42,44
	po	26	0,00	35,01	73,47	111,40	543,00	105,90	116,60
G-G-del	przed	27	0,00	17,38	63,38	149,30	1315,00	155,10	278,10
	po	22	0,00	25,57	68,44	200,80	2122,00	194,70	442,40
G-T-ins	przed	6	24,90	26,96	139,90	466,10	758,10	243,20	285,90
	po	5	33,92	47,27	102,60	1055,00	1278,00	461,40	564,90

*Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947: 964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del;

Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya: [a]A-C-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,04; [b]A-C-ins przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,016; [c]A-G-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,046; [d]G-C-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,014; [e]G-T-ins przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,049; [f]G-C-ins przed ET *vs.* po ET: p=0,033

Tabela 27. Stężenie sHLA-G (IU/ml) w zależności od haplotypu *HLA-G* u pacjentek IVF, które nie zaszły w ciążę po transferze – statystyka opisowa.

Haplotyp*	Przed lub po ET	Liczba pacjentek	sHLA-G (IU/ml)						
			Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
A-C-del	przed	21	2,67	59,38	**113,90**[a]	208,00	436,80	153,20	127,30
	po	12	1,53	48,78	98,25	220,60	405,30	128,70	116,40
A-C-ins	przed	23	2,11	42,36	53,59	113,90	1357,00	142,60	278,30
	po	15	2,54	39,02	42,84	87,08	268,10	85,67	94,83
A-G-del	przed	6	2,67	7,09	74,45	142,90	142,90	74,32	61,42
	po	1	1,53	1,53	1,53	1,53	1,53	1,53	0,00
A-T-del	przed	2	2,26	2,26	26,82	51,39	51,39	26,82	34,74
	po	1	2,54	2,54	2,54	2,54	2,54	2,54	0,00
G-C-del	przed	22	2,11	48,87	73,49	297,30	1357,00	240,40	355,00
	po	12	2,72	42,93	56,04	267,60	968,90	194,10	274,10
G-C-ins	przed	7	21,91	52,29	61,20	78,60	658,80	144,70	227,50
	po	4	39,88	39,88	46,32	739,90	968,90	275,40	462,40
G-G-del	przed	7	39,64	48,87	92,16	211,00	1054,00	242,00	364,70
	po	6	42,39	43,00	58,48	288,40	376,10	139,60	143,10
G-T-ins	przed	2	57,19	57,19	170,30	283,40	283,40	170,30	159,90
	po	1	376,10	376,10	376,10	376,10	376,10	376,10	0,00

*Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del;

Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya: [a]A-C-del przed ET *vs.* A-C-ins przed ET: p=0,05

Tabela 28. Stężenie sHLA-G (IU/ml) w zależności od haplotypu *HLA-G* u pacjentek IVF, które poroniły po transferze – statystyka opisowa.

Haplotyp*	Przed lub po ET	Liczba pacjentek	sHLA-G (IU/ml)						
			Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
A-C-del	przed	26	0,00	29,94	**64,10[a]**	253,20	1163,00	180,50	305,00
	po	15	0,00	2,16	25,01	127,60	359,80	82,85	132,50
A-C-ins	przed	31	2,11	37,01	71,83	105,70	503,40	112,30	128,90
	po	26	2,71	39,19	**67,46[b, c]**	104,10	531,10	100,10	120,30
A-G-del	przed	6	0,00	17,40	35,87	104,20	258,50	67,71	95,14
	po	3	0,00	0,00[e]	31,36	41,80	41,80	24,39	21,76
G-C-del	przed	26	2,11	47,32	80,77	230,90	503,40	141,90	147,00
	po	18	2,71	43,18	**80,73[d, e, f]**	208,00	531,10	142,90	145,50
G-C-ins	przed	18	2,11	2,46	**46,76[g, h, i]**	66,11	74,30	39,23	29,18
	po	16	1,78	11,60	56,50	95,28	102,80	54,44	38,51
G-G-del	przed	6	31,85	35,45	49,70	265,00	352,20	126,00	135,50
	po	5	40,22	44,25	263,60	400,90	405,70	230,8	179,30
G-T-ins	przed	1	16,23	16,23	16,23	16,23	16,23	16,23	0,00
	po	1	27,88	27,88	27,88	27,88	27,88	27,88	0,00

*Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947: 964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del;

Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya: [a]A-C-del przed ET *vs.* A-C-del po ET: p=0,045; [b]A-C-del po ET *vs.* A-C-ins po ET: p=0,022; [c]A-C-ins po ET *vs.* A-G-del po ET: p=0,049; [d]A-G-del po ET *vs.* G-C-del po ET: p=0,031; [e]A-C-del po ET *vs.* G-C-del po ET: p=0,013; [f]A-C-del po ET *vs.* G-G-del po ET: p=0,023; [g]G-C-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,0067; [h]A-C-ins przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,013; [i]A-C-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,052

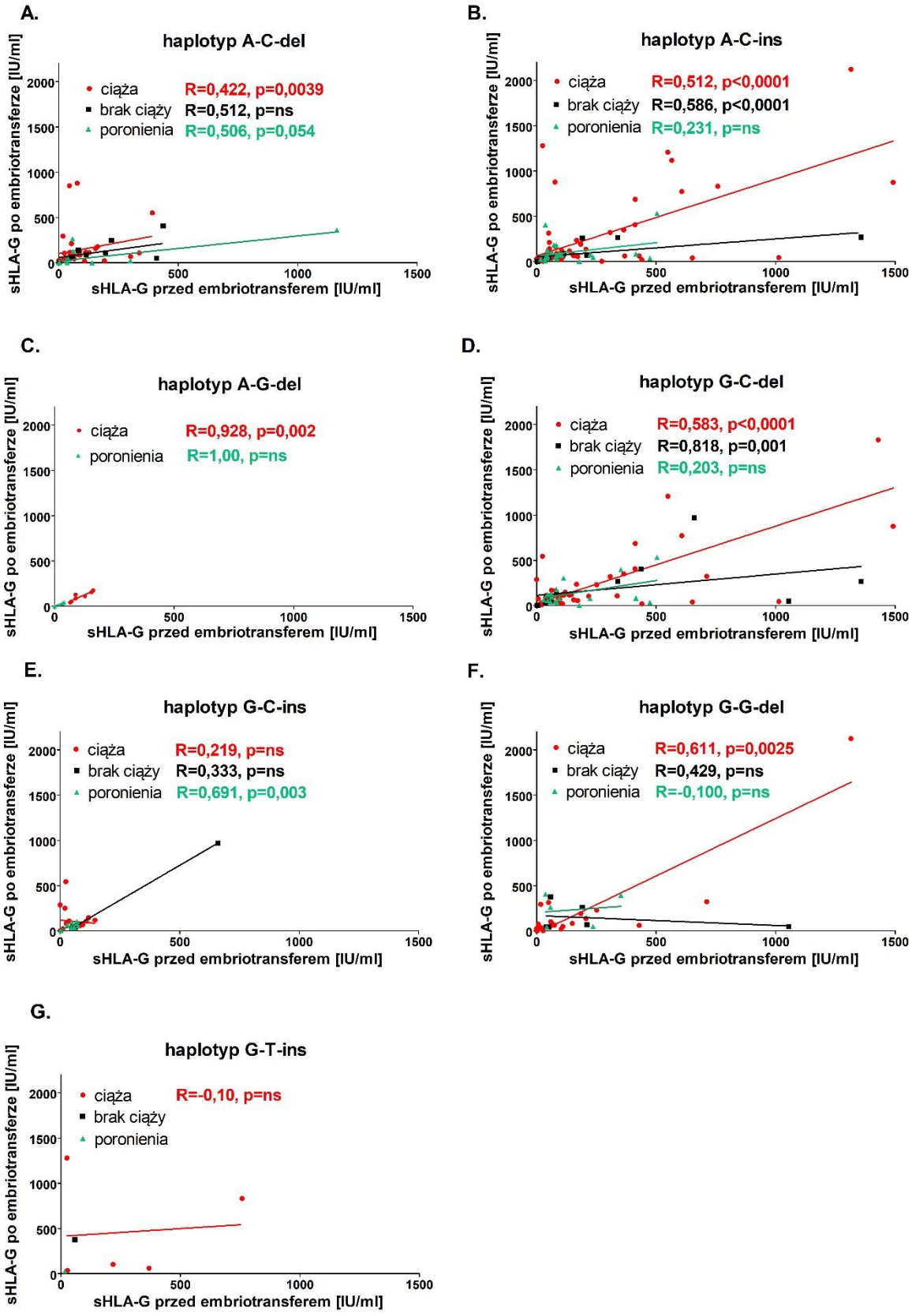
Analizując wydzielanie sHLA-G u kobiet, które zaszły w ciążę po zapłodnieniu *in vitro* (**Tabela 26**), zauważono, że w przypadku wszystkich haplotypów mediana lub średnia stężeń sHLA-G była wyższa po transferze (z wyjątkiem A-T-del, którego liczebność była za mała do analiz). Odrzucono wartości sHLA-G poniżej 25 i powyżej 75 percentyla, a mediany stężeń sHLA-G uszeregowano od najwyższej do najniższej (**Tabela 29**). Pokazano, że minimalna mediana stężenia sHLA-G, przy której pacjentki zachodzą w ciążę, wynosi 37,21 IU/ml dla haplotypu G-C-ins. Pacjentki utrzymywały ciążę, kiedy mediana stężenia sHLA-G po transferze wynosiła co najmniej 61,10 IU/ml.

Tabela 29. Stężenie sHLA-G w zależności od haplotypów *HLA-G* u kobiet, które zaszły w ciążę po zapłodnieniu *in vitro*.

Haplotyp*	Mediana sHLA-G (IU/ml)	
	Przed transferem	Po transferze
G-C-del	73,80	71,17
A-C-ins	67,67	66,21
G-G-del	63,38	68,44
A-C-del	58,95	61,10
G-C-ins	37,21	67,64

*Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del; mediany wyznaczono po odrzuceniu wartości skrajnych poniżej 25 percentyla i 75 percentyla.

W kolejnym etapie analizowano poziom sHLA-G wydzielanego przez pacjentki w zależności od haplotypu *HLA-G* stosując korelacje Spearmana (**Rycina 42**). Stężenia sHLA-G umieszczono na osiach x i y, gdzie x oznaczało sHLA-G przed transferem zarodka, a y – po transferze. Wyznaczono współczynniki korelacji Spearmana oraz wartości prawdopodobieństwa testowego u pacjentek, które zaszły w ciążę, poroniły lub nie zaszły w ciążę po transferze zarodka (**Rycina 42 A-G**).



Rycina 42. Korelacje sHLA-G przed i po transferze zarodka w zależności od haplotypu *HLA-G*.

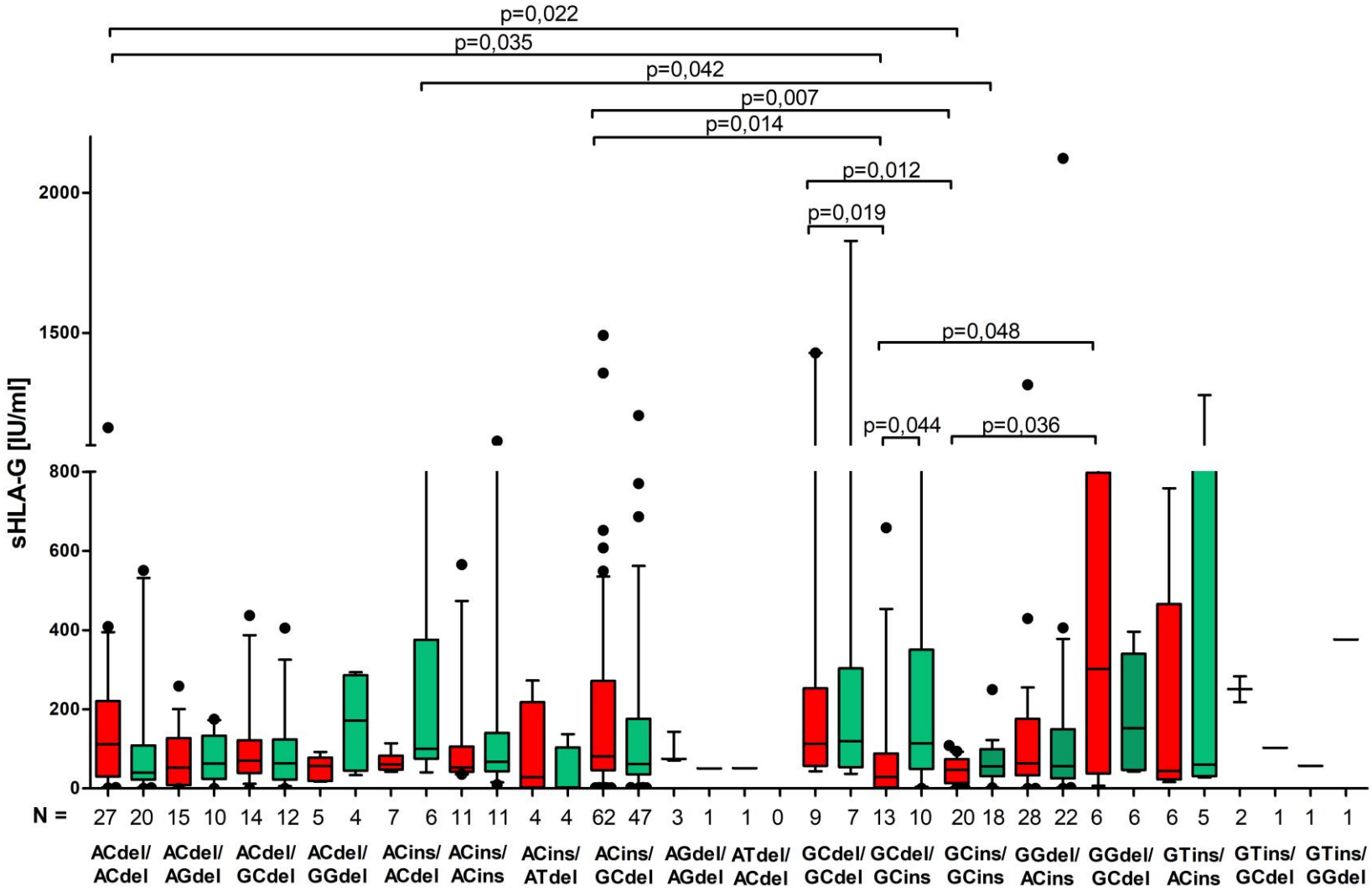
Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del; haplotypy przedstawione na rycinie to: (A) A-C-del, (B) A-C-ins, (C) A-G-del, (D) G-C-del, (E) G-C-ins, (F) G-G-del, (G) G-T-ins. Ciąża oznaczona jest linią czerwoną, brak ciąży – linią czarną, poronienia – linią zieloną. Korelacje wyznaczono stosując korelacje Spearmana (R – współczynnik korelacji Spearmana, p – istotność statystyczna, ns – brak istotności). Na osiach x i y zaznaczono wartości stężenia sHLA-G przed i po transferze zarodka.

Prawie we wszystkich haplotypach zaobserwowano znaczącą dodatnią korelację pomiędzy stężeniem sHLA-G przed i po transferze zarodka w przypadku kobiet, które zaszły w ciążę (p=0,0039, współczynnik korelacji Spearmana R=0,422 dla haplotypu A-C-del; p<0,0001, R=0,512 dla A-C-ins; p=0,002, R=0,928 dla A-G-del; p<0,0001, R=0,583 dla G-C-del; p=0,0025, R=0,611 dla G-G-del) (**Rycina 42**). Pacjentki z haplotypami G-C-ins i G-T-ins nie wykazały takiej korelacji. Haplotyp G-C-ins okazał się być najbardziej niekorzystny do zajścia w ciążę, ponieważ widoczna była istotna korelacja stężeń sHLA-G przed i po transferze u pacjentek, które poroniły (p=0,003, R=0,691). W haplotypach A-C-ins i G-C-del pacjentki, które nie zaszły w ciążę wykazywały również dodatnią korelację sHLA-G przed i po transferze zarodka (p<0,0001, R=0,586 dla A-C-ins; p=0,0001, R=0,818 dla G-C-del), jednak kobiety, które w ciążę zachodziły osiągały wyższe stężenia sHLA-G zarówno przed, jak i po transferze zarodka.

4.5.4. Wpływ diplotypów *HLA-G* na stężenie sHLA-G

Stężenia sHLA-G mierzone przed i po transferze zarodka analizowano w zależności od diplotypów *HLA-G* pacjentek. Wyniki przedstawiono na **Rycinie 43** oraz **w Tabeli 30**. Największą różnicę w stężeniach sHLA-G odnotowano w osoczu pacjentek posiadających diplotyp A-C-ins/G-C-del w porównaniu do pacjentek posiadających G-C-ins/G-C-ins (p=0,007; mediany odpowiednio: 81,20 *vs.* 47,50 IU/ml). Diplotyp A-C-ins/G-C-del różnił się również stężeniem sHLA-G od diplotypu G-C-del/G-C-ins (p=0,014; mediany odpowiednio: 81,20 *vs.* 28,90 IU/ml). Pacjentki z diplotypem A-C-del/A-C-del wydzielały więcej sHLA-G niż pacjentki posiadające diplotypy G-C-del/G-C-ins (p=0,035; mediany odpowiednio: 112,10 *vs.* 28,90 IU/ml) oraz G-C-ins/G-Cins (p=0,022; mediany odpowiednio: 112,10 *vs.* 47,50 IU/ml). Diplotyp G-C-del/G-C-del charakteryzował się wyższym stężeniem sHLA-G niż G-C-del/G-C-ins (p=0,019; mediany odpowiednio: 112,90 *vs.* 28,90 IU/ml) oraz G-C-ins/G-C-ins (p=0,012; mediany odpowiednio: 112,90 *vs.* 47,50 IU/ml). Zaobserwowano także różnicę w stężeniach sHLA-G pomiędzy pacjentkami o diplotypie G-G-del/G-C-del, a G-C-ins/G-C-ins (p=0,036; mediany odpowiednio: 301,80 *vs.* 47,50 IU/ml) oraz G-C-del/G-C-ins (p=0,048; mediany odpowiednio: 301,80 *vs.* 28,90 IU/ml). Dodatkowo pacjentki pozytywne pod względem A-C-ins/A-C-del wydzielały więcej sHLA-G niż pacjentki posiadające diplotyp G-C-ins/G-C-ins (p=0,042; mediany odpowiednio: 100,20 *vs.* 56,30 IU/ml). Tylko w przypadku diplotypu G-C-del/G-C-ins zauważono różnicę pomiędzy stężeniem sHLA-G przed i po transferze zarodka (p=0,044; mediany: 28,90 *vs.* 113,90 IU/ml).

Porównano także wydzielanie sHLA-G u pacjentek z diplotypami różniącymi się allelem insercyjnym (rs371194629) i posiadających allel G w miejscu polimorficznym rs1632947 oraz allel C w miejscu polimorficznym rs1233334 (G-C-del/G-C-del *vs.* G-C-del/G-C-ins *vs.* G-C-ins/G-C-ins). W tym celu zastosowano test Kruskala-Wallisa, który pokazał istotną różnicę pomiędzy stężeniem sHLA-G w tych diplotypach (p=0,0079). Podobnie porównano diplotypy A-C-del/A-C-del *vs.* A-C-ins/A-C-del *vs.* A-C-ins/A-C-ins, ale różnica nie była istotna statystycznie (p=0,43).



Rycina 43. Stężenie sHLA-G (IU/ml) mierzone przed i po transferze zarodka u wszystkich pacjentek IVF w zależności od diplotypu *HLA-G*.

Kolejność polimorfizmów w diplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del; kolor czerwony oznacza osocze pobrane przed transferem zarodka; kolor zielony oznacza osocze pobrane po transferze; p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba pacjentek. Test Kruskala-Wallisa dla diplotypów G-C-del/G-C-del *vs.* G-C-del/G-C-ins *vs.* G-C-ins/G-C-ins: p=0,0079.

Tabela 30. Stężenie sHLA-G (IU/ml) mierzone przed i po transferze zarodka u wszystkich pacjentek IVF w zależności od diplotypu *HLA-G* – statystyka opisowa.

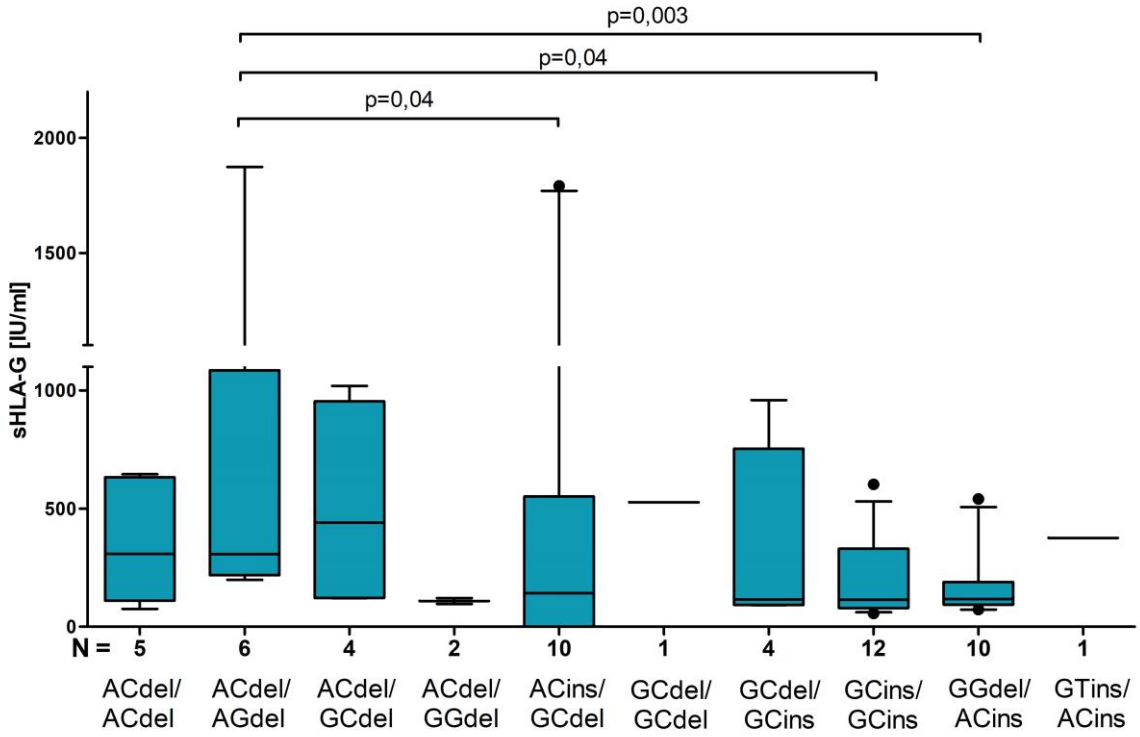
Diplotyp	Przed lub po ET	Liczba pacjentek	sHLA-G (IU/ml)						
			Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
A-C-del/A-C-del	przed	27	1,30	30,00	112,10[a, b]	220,60	1163,00	169,70	231,30
	po	20	0,00	22,40	40,30	108,60	849,50	134,00	218,20
A-C-del/A-G-del	przed	15	0,00	8,60	52,80	127,20	258,50	73,70	74,40
	po	10	0,00	23,90	63,10	133,40	174,80	76,50	62,70
A-C-del/G-C-del	przed	14	0,00	39,30	70,20	121,90	436,80	111,80	124,60
	po	12	0,00	22,30	63,80	124,00	405,30	95,16	107,90
A-C-del/G-G-del	przed	5	17,40	18,70	57,50	77,80	92,20	50,10	31,50
	po	4	33,80	45,20	171,50	286,00	293,50	167,60	130,00
A-C-ins/A-C-del	przed	7	42,50	47,70	61,20	83,10	113,90	68,40	25,00
	po	6	40,76	75,50	100,20[c]	375,90	876,90	235,70	319,00
A-C-ins/A-C-ins	przed	11	35,70	42,40	53,50	105,70	565,40	108,70	153,70
	po	11	9,60	43,70	67,50	140,30	1115,00	172,50	317,00
A-C-ins/A-T-del	przed	4	2,30	2,40	28,40	218,00	272,70	82,90	128,80
	po	4	2,10	2,10	2,40	103,60	137,30	36,00	67,50
A-C-ins/G-C-del	przed	62	1,80	46,40	81,20[d, e]	271,50	1492,00	206,10	299,90
	po	47	1,30	36,10	62,20	176,10	1206,00	169,70	254,60
A-G-del/A-G-del	przed	3	70,70	70,70	74,50	142,90	142,90	96,00	40,70
	po	1	50,80	50,80	50,80	50,80	50,80	50,80	0,00
A-T-del/A-C-del	przed	1	51,40	51,40	51,40	51,40	51,40	51,40	0,00
	po	0	-	-	-	-	-	-	-
G-C-del/G-C-del	przed	9	43,20	57,30	112,90[f, g]	252,80	1429,00	267,40	443,00
	po	7	36,90	53,70	119,30	303,60	1828,00	367,30	650,90
G-C-del/G-C-ins	przed	13	0,00	2,40	28,90[h, i]	88,20	658,80	88,50	177,20
	po	10	0,00	49,70	113,90	350,30	968,90	232,70	303,60
G-C-ins/G-C-ins	przed	20	2,40	13,40	47,50[j]	73,90	108,50	47,60	33,40
	po	18	1,80	31,20	56,30	99,50	249,90	66,60	58,10
G-G-del/A-C-ins	przed	28	0,00	33,10	63,70	175,80	1315,00	139,50	249,70
	po	22	0,00	25,60	56,70	149,60	2122,00	187,00	445,10
G-G-del/G-C-del	przed	6	6,60	38,30	301,80	797,50	1054,00	404,20	406,90
	po	6	43,20	46,60	152,40	340,10	396,10	185,60	152,70
G-T-ins/A-C-ins	przed	6	16,20	22,70	44,60	466,10	758,10	209,50	300,90
	po	5	27,90	30,90	60,60	1055,00	1278,00	446,40	577,60
G-T-ins/G-C-del	przed	2	218,30	218,30	250,90	283,40	283,40	250,90	46,00
	po	1	102,60	102,60	102,60	102,60	102,60	102,60	0,00
G-G-ins/G-G-del	przed	1	57,20	57,20	57,20	57,20	57,20	57,20	0,00
	po	1	376,10	376,10	376,10	376,10	376,10	376,10	0,00

Kolejność polimorfizmów w diplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del;

Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya: [a]A-C-del/A-C-del przed ET *vs.* G-C-del/G-C-ins przed ET: p=0,035; [b]A-C-del/A-C-del przed ET *vs.* G-C-ins/G-C-ins przed ET: p=0,022; [c]A-C-ins/A-C-del po ET *vs.* G-C-ins/G-C-ins po ET: p=0,042; [d]A-C-ins/G-C-del przed ET *vs.* G-C-del/G-C-ins przed ET: p=0,014; [e]A-C-ins/G-C-del przed ET *vs.* G-C-ins/G-C-ins przed ET: p=0,007; [f]G-C-del/G-C-del przed ET *vs.* G-C-del/G-C-ins przed ET: p=0,019; [g]G-C-del/G-C-del przed ET *vs.* G-C-ins/G-C-ins: p=0,012; [h]G-C-del/G-C-ins przed ET *vs.* G-C-del/G-C-ins po ET: p=0,044; [i]G-C-del/G-C-ins przed ET *vs.* G-G-del/G-C-del przed ET: p=0,048; [j]G-C-ins/G-C-ins przed ET *vs.* G-G-del/G-C-del przed ET: p=0,036

Analizę stężeń sHLA-G przeprowadzono również dla diplotypów u kobiet z kontroli płodnej. Zaobserwowano trzy istotne różnice w stężeniach sHLA-G pomiędzy kobietami

z diplotypem A-C-del/A-G-del, a kobietami posiadającymi diplotyp A-C-ins/G-C-del, G-C-ins/G-C-ins i G-G-del/A-C-ins (**Rycina 44** i **Tabela 31**). U kobiet o diplotypie A-C-del/A-G-del stężenie sHLA-G na poziomie mediany wynosiło 307,50 IU/ml. Z kolei kobiety mające diplotypy A-C-ins/G-C-del, G-C-ins/G-C-ins i G-G-del/A-C-ins wydzielały znacząco mniejsze ilości sHLA-G (odpowiednio: p=0,04; mediana: 142,10 IU/ml; p=0,04; mediana: 114,70 IU/ml; p=0,003; mediana: 117,90 IU/ml).



Rycina 44. Stężenie sHLA-G (IU/ml) kobiet z kontroli płodnej w zależności od diplotypu *HLA-G*.

Kolejność polimorfizmów w diplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del; p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba kobiet.

Tabela 31. Stężenie sHLA-G (IU/ml) kobiet z kontroli płodnej w zależności od diplotypu *HLA-G* – statystyka opisowa.

Diplotyp	Liczba pacjentek	sHLA-G (IU/ml)						
		Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
A-C-del/A-C-del	5	75,76	110,60	308,10	632,70	645,40	358,90	263,90
A-C-del/A-G-del	6	198,70	218,30	307,50[a, b, c]	1085,00	1874,00	622,30	655,70
A-C-del/G-C-del	4	121,80	122,20	440,90	954,00	1019,00	505,70	455,00
A-C-del/G-G-del	2	96,37	96,37	109,10	121,80	121,80	109,10	17,97
A-C-ins/G-C-del	10	0,00	0,00	142,10	551,50	1791,00	408,50	678,70
G-C-del/G-C-del	1	526,80	526,80	526,80	526,80	526,80	526,80	0,00
G-C-del/G-C-ins	4	91,80	92,91	115,60	753,40	959,60	320,60	426,40
G-C-ins/G-C-ins	12	57,13	79,30	114,70	330,10	602,50	195,50	167,90
G-G-del/A-C-ins	10	72,91	94,04	117,90	189,30	540,70	168,60	137,80
G-T-ins/A-C-ins	1	375,60	375,60	375,60	375,60	375,60	375,60	0,00

Kolejność polimorfizmów w diplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del;
Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya: [a]A-C-del/A-G-del *vs.* A-C-ins/G-C-del: p=0,04; [b]A-C-del/A-G-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins: p=0,04; [c]A-C-del/A-G-del *vs.* G-G-del/A-C-ins: p=0,003

Gdy porównano stężenia sHLA-G pomiędzy kontrolą a pacjentkami w zależności od diplotypów, okazało się, że najbardziej różnią się kobiety posiadające diplotyp G-C-ins/G-C-ins. Pacjentki przed i po transferze zarodka miały sHLA-G na poziomie 47,46 i 56,32 IU/ml, a kobiety z kontroli miały sHLA-G na poziomie 114,70 IU/ml (pacjentki IVF przed transferem *vs.* kontrola: p=0,0002; pacjentki IVF po transferze *vs.* kontrola: p=0,004) (**Tabela 32**). Duże różnice były także wśród kobiet posiadających diplotyp A-C-del/A-G-del: pacjentki przed i po transferze miały stężenia równe 52,78 i 63,08 IU/ml, a kobiety z kontroli miały sHLA-G na poziomie 307,50 IU/ml (pacjentki IVF przed transferem *vs.* kontrola: p=0,0012; pacjentki IVF po transferze *vs.* kontrola: p=0,0002). Mniej istotne różnice pomiędzy kontrolą a pacjentkami zaobserwowano wśród kobiet o diplotypach: A-C-del/A-C-del, A-C-del/G-C-del, G-C-del/G-C-ins oraz G-G-del/A-C-ins (**Tabela 32**).

Tabela 32. Stężenie sHLA-G u kobiet IVF i kobiet płodnych w zależności od diplotypu *HLA-G*.

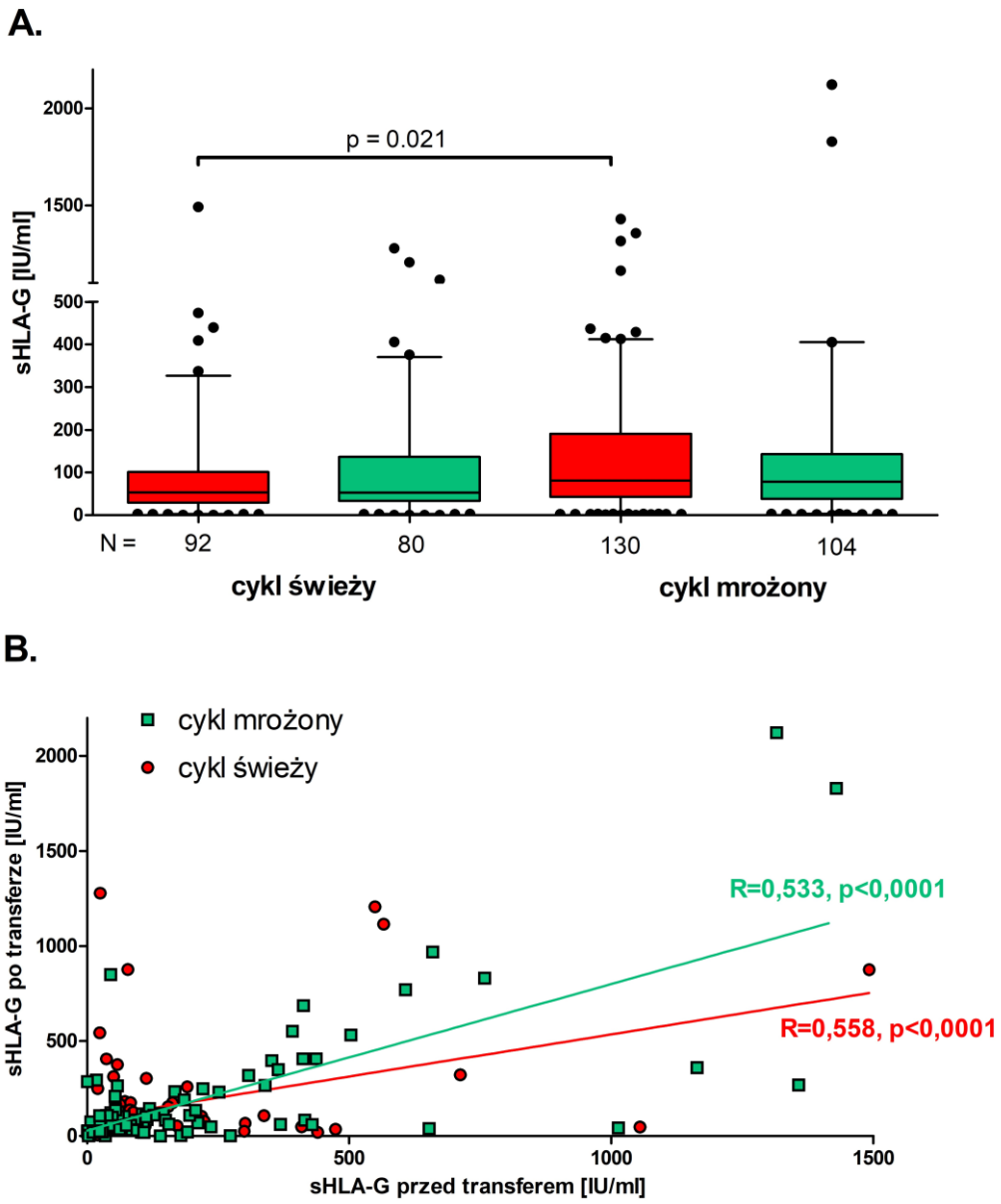
Diplotyp	Przed lub po ET	Kobiety IVF		Kontrola płodna	
		Liczba pacjentek	Mediana (IU/ml)	Liczba pacjentek	Mediana (IU/ml)
A-C-del/A-C-del	przed	27	112,10	5	308,10
	po	20	**40,32[a]**		
A-C-del/A-G-del	przed	15	**52,78[b]**	6	307,50
	po	10	**63,08[c]**		
A-C-del/G-C-del	przed	14	**70,22[d]**	4	440,90
	po	12	**63,84[e]**		
A-C-del/G-G-del	przed	5	57,45	2	109,10
	po	4	171,50		
A-C-ins/G-C-del	przed	62	81,19	10	142,10
	po	47	62,17		
G-C-del/G-C-del	przed	9	112,90	1	526,80
	po	7	119,30		
G-C-del/G-C-ins	przed	13	**28,86[f]**	4	115,60
	po	10	113,90		
G-C-ins/G-C-ins	przed	20	**47,46[g]**	12	114,70
	po	18	**56,32[h]**		
G-G-del/A-C-ins	przed	28	63,65	10	117,90
	po	22	**56,67[i]**		
G-T-ins/A-C-ins	przed	6	44,57	1	375,60
	po	5	60,61		

*Kolejność polimorfizmów w diplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del; ns – brak istotności. Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya.
Kobiety IVF przed ET *vs.* kontrola płodna: [b]A-C-del/A-G-del: p=0,0012; [d]A-C-del/G-C-del: p=0,02; [f]G-C-del/G-C-ins: p=0,05; [g]G-C-ins/G-C-ins: p=0,0002;
Kobiety IVF po ET *vs.* kontrola płodna: [a]A-C-del/A-C-del: p=0,02; [c]A-C-del/A-G-del: p=0,0002; [e]A-C-del/G-C-del: p=0,03; [h]G-C-ins/G-C-ins: p=0,004; [i]G-G-del/A-C-ins: p=0,03

4.5.5. Stężenie sHLA-G w cyklu IVF świeżym i mrożonym

Pacjentki, które poddały się zapłodnieniu IVF podzielono ze względu na to, czy transfer zarodka odbył się w cyklu świeżym, czy w cyklu mrożonym i przeanalizowano u nich stężenie sHLA-G (**Rycina 45**). Kobiety, które miały transfer w cyklu mrożonym wydzielały znacznie więcej sHLA-G przed transferem zarodka (mediana 80,91 IU/ml) niż kobiety w cyklu świeżym (mediana 53,53 IU/ml). Różnica pomiędzy nimi była istotna statystycznie i wynosiła p=0,021 (**Rycina 45 A**). Dodatkowo zaobserwowano także dodatnią korelację stężenia sHLA-G przed i po transferze zarodka zarówno w cyklu świeżym, jak i mrożonym (**Rycina 45 B**). Jednak bardziej korzystny wydawał się cykl mrożony (linia zielona), ponieważ stężenie sHLA-G

osiągało u pacjentek wyższe wartości zarówno przed, jak i po transferze w porównaniu do cyklu świeżego (linia czerwona). Współczynniki korelacji i wartości p wyniosły dla cyklu mrożonego: R=0,533; p<0,0001; dla cyklu świeżego: R=0,558; p<0,0001.

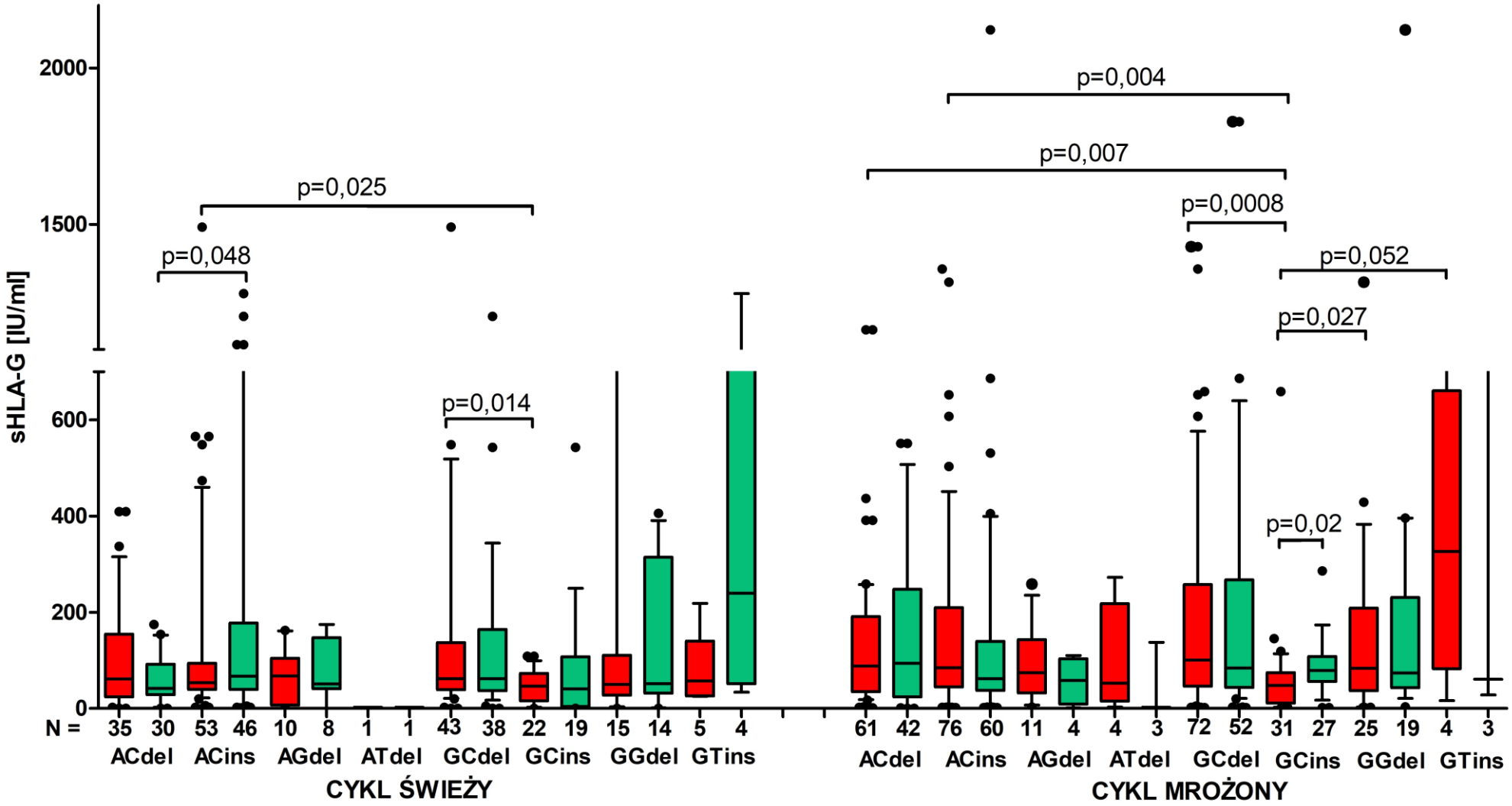


Rycina 45. Stężenie sHLA-G u pacjentek IVF (A) oraz korelacja sHLA-G przed i po transferze zarodka (B) w cyklu świeżym i mrożonym.

(A) Kolor czerwony oznacza osocze pobrane przed transferem zarodka; kolor zielony oznacza osocze pobrane po transferze; p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba kobiet. Wartości median sHLA-G kolejno: cykl świeży (przed transferem) – 53,53 IU/ml; cykl świeży (po transferze) – 52,98 IU/ml; cykl mrożony (przed transferem) – 80,91 IU/ml; cykl mrożony (po transferze) – 78,57 IU/ml

(B) Cykl mrożony oznaczony jest linią zieloną, cykl świeży – linią czerwoną. Korelacje wyznaczono stosując korelacje Spearmana (R – współczynnik korelacji Spearmana, p – istotność statystyczna). Na osiach x i y zaznaczono wartości stężenia sHLA-G przed i po transferze zarodka.

W kolejnych analizach porównano stężenie sHLA-G u pacjentek, które miały transfer w cyklu świeżym i mrożonym w zależności od haplotypu *HLA-G* (**Rycina 46 i Tabela 33**). Większe różnice istotne statystycznie zostały zaobserwowane wśród pacjentek, które miały transfer w cyklu mrożonym. Kobiety z haplotypem G-C-ins wydzielały mniejsze ilości sHLA-G (mediana 47,58 IU/ml) niż kobiety z haplotypami A-C-del (mediana 88,64 IU/ml), A-C-ins (mediana 84,61 IU/ml), G-C-del (mediana 100,9 IU/ml), G-G-del (mediana 84,02 IU/ml) i G-T-ins (mediana 326,0 IU/ml). Różnice te wynosiły odpowiednio: p=0,007; p=0,004; p=0,0008; p=0,027; p=0,052. Kobiety, które miały transfer zarodka w cyklu świeżym i posiadały haplotyp G-C-ins, różniły się pod względem wydzielania sHLA-G od kobiet posiadających haplotyp A-C-ins oraz G-C-del (odpowiednio: p=0,025, mediany: 45,94 *vs.* 53,59 IU/ml; p=0,014, mediany: 45,94 *vs.* 61,65 IU/ml). Porównanie sHLA-G w zależności od haplotypów różniących się allelem insercyjnym rs371194629: G-C-del i G-C-ins dało istotną statystycznie różnicę pomiędzy cyklem świeżym a mrożonym zarówno przed, jak i po transferze zarodka (p=0,0001 wyznaczone testem Kruskala-Wallisa).



Rycina 46. Stężenie sHLA-G u pacjentek IVF o różnych haplotypach *HLA-G* w zależności od cyklu świeżego lub mrożonego.

Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del; kolor czerwony oznacza osocze pobrane przed transferem zarodka; kolor zielony oznacza osocze pobrane po transferze; p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba pacjentek. Test Kruskala-Wallisa dla haplotypów G-C-del i G-C-ins (cykl świeży *vs.* mrożony): p=0,0001

Tabela 33. Stężenie sHLA-G u pacjentek IVF o różnych haplotypach *HLA-G* w zależności od cyklu świeżego lub mrożonego – statystyka opisowa.

Haplotyp*	Przed lub po ET	Liczba pacjentek	sHLA-G (IU/ml)						
			Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
CYKL ŚWIEŻY									
A-C-del	przed	35	0,00	23,73	61,21	154,30	409,20	110,00	124,10
	po	30	0,00	28,62	**41,28[a]**	92,24	876,90	84,72	156,70
A-C-ins	przed	53	0,00	39,29	**53,59[b]**	94,38	1492,00	132,40	237,50
	po	46	0,00	39,60	67,46	177,80	1278,00	214,60	352,10
A-G-del	przed	10	0,00	6,98	67,91	104,40	162,20	66,10	57,72
	po	8	0,00	40,99	50,78	147,20	174,80	79,93	62,96
A-T-del	przed	1	2,26	2,26	2,26	2,26	2,26	2,26	0,00
	po	1	2,54	2,54	2,54	2,54	2,54	2,54	0,00
G-C-del	przed	43	0,00	38,93	**61,65[c]**	137,10	1492,00	171,80	295,00
	po	38	0,00	36,90	61,61	164,10	1206,00	150,40	242,10
G-C-ins	przed	22	0,00	15,94	45,94	72,88	108,50	42,85	33,53
	po	19	0,00	3,94	40,58	107,50	543,00	87,50	132,40
G-G-del	przed	15	0,00	27,62	49,98	110,40	1054,00	164,90	302,20
	po	14	0,00	31,61	51,16	314,70	405,70	143,40	152,80
G-T-ins	przed	5	24,90	26,28	57,19	139,90	218,30	77,91	80,24
	po	4	33,92	51,09	239,40	1053,00	1278,00	447,80	573,20
CYKL MROŻONY									
A-C-del	przed	61	1,31	34,66	88,64	191,00	1163,00	143,70	213,00
	po	42	0,00	24,24	93,94	248,10	849,50	162,20	211,40
A-C-ins	przed	76	0,00	44,81	84,61	209,90	1357,00	185,80	268,90
	po	60	1,34	37,61	61,39	139,50	2122,00	163,40	314,10
A-G-del	przed	11	2,67	32,18	74,45	142,90	258,50	92,72	72,53
	po	4	1,53	8,99	57,86	103,70	110,10	56,83	49,33
A-T-del	przed	4	2,93	15,04	52,58	218,00	272,70	95,20	120,60
	po	3	2,04	2,04	2,18	137,30	137,30	47,16	78,02
G-C-del	przed	72	0,00	46,00	100,90	257,80	1429,00	220,10	312,30
	po	52	1,34	43,41	84,41	267,60	1828,00	232,40	381,20
G-C-ins	przed	31	0,00	11,18	**47,58[d, e, f, g, h, i]**	74,30	658,80	68,08	116,00
	po	27	1,78	56,14	79,30	108,10	968,90	113,50	179,50
G-G-del	przed	25	0,00	36,90	84,02	208,80	1315,00	166,60	264,20
	po	19	3,55	43,20	73,97	230,90	2122,00	224,60	471,90
G-T-ins	przed	4	16,23	83,02	326,00	660,80	758,10	356,60	306,90
	po	3	27,88	27,88	60,61	831,10	831,10	306,50	454,60

*Kolejność polimorfizmów w diplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del;

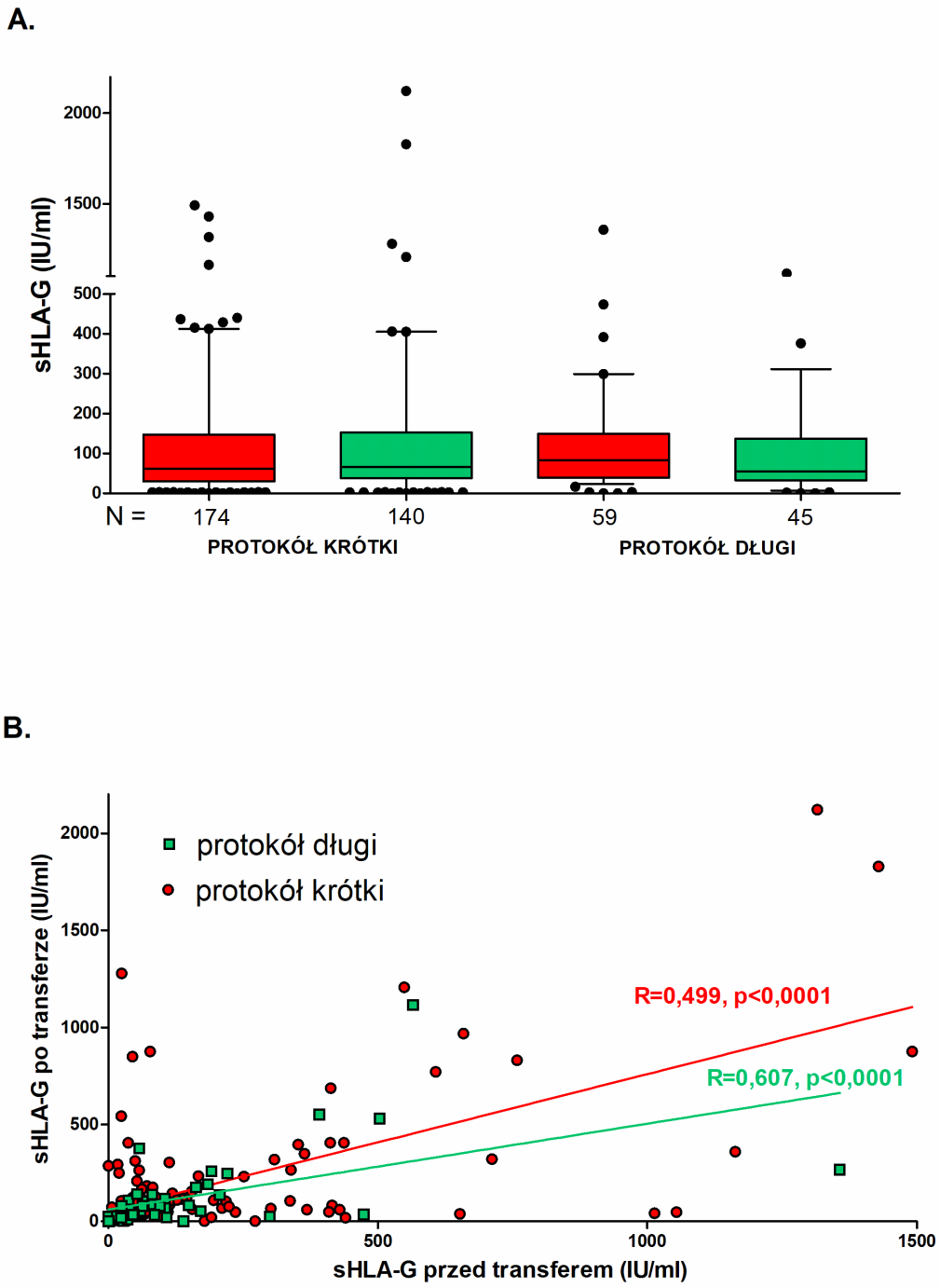
Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya:

Dla cyklu świeżego: [a]A-C-del po ET *vs.* A-C-ins po ET: p=0,048; [b]A-C-ins przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,025; [c] G-C-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,014;

Dla cyklu mrożonego: [d]G-C-ins przed ET *vs.* G-C-ins po ET: p=0,02; [e]A-C-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET; [f]A-C-ins przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,004; [g]G-C-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,0008; [h]G-C-ins przed ET *vs.* G-G-del przed ET: p=0,027; [i]G-C-ins przed ET *vs.* G-T-ins przed ET: p=0,052.

4.5.6. Stężenie sHLA-G w zależności od protokołu stymulacji owulacji

Stężenia sHLA-G u pacjentek IVF porównano biorąc pod uwagę protokół stymulacji owulacji – krótki z antagonistą gonadoliberyny (GnRH) lub długi z agonistą GnRH. Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy stężeniem sHLA-G u pacjentek IVF (**Rycina 47 A**). Jednak analizując mediany stężeń w długim protokole stymulacji widać wyraźny spadek stężenia sHLA-G po transferze zarodka w stosunku do stężenia przed transferem (mediany: 83,11 IU/ml oraz 55,42 IU/ml). Stężenie sHLA-G w przypadku krótkiego protokołu było niższe przed transferem zarodka i wzrosło po transferze (mediany: 61,63 IU/ml oraz 66,50 IU/ml). Korelacja stężenia sHLA-G przed i po transferze zarodka była dodatnia i istotna statystycznie zarówno w protokole krótkim, jak i długim. Współczynniki korelacji oraz wartości p wynosiły dla protokołu krótkiego: $R=0,499$, $p<0,0001$; dla protokołu długiego: $R=0,607$, $p<0,0001$ (**Rycina 47 B**). Protokół krótki (linia czerwona) wydaje się być bardziej korzystny niż długi (linia zielona), ze względu na osiągnięcie wyższych stężeń sHLA-G po transferze zarodka.

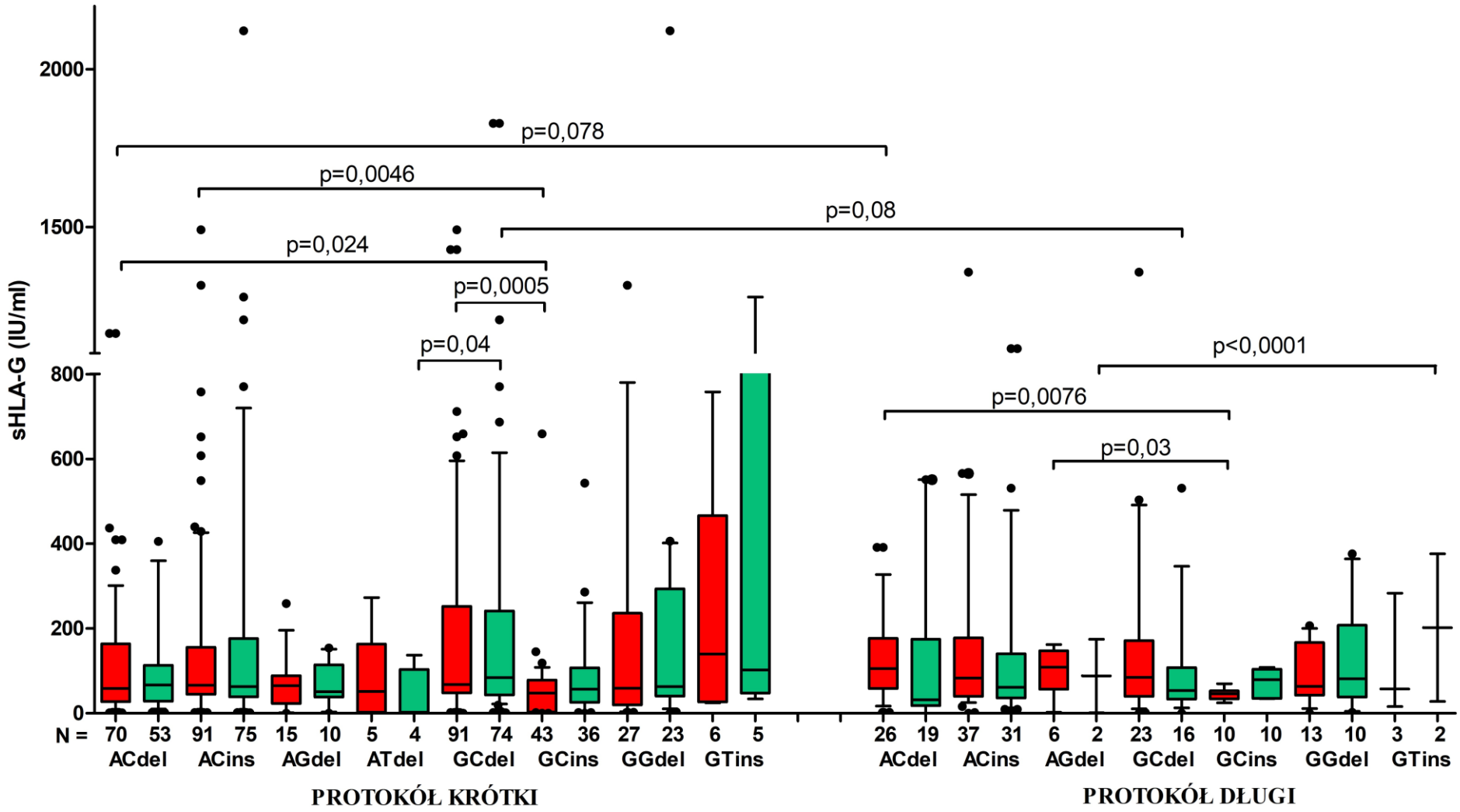


Rycina 47. Stężenie sHLA-G u pacjentek IVF (A) oraz korelacja sHLA-G przed i po transferze zarodka (B) w zależności od krótkiego i długiego protokołu stymulacji.

(A) Kolor czerwony oznacza osocze pobrane przed transferem zarodka; kolor zielony oznacza osocze pobrane po transferze zarodka; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba kobiet. Wartości median sHLA-G kolejno: krótki protokół (przed transferem) – 61,63 IU/ml; krótki protokół (po transferze) – 66,50 IU/ml; długi protokół (przed transferem) – 83,11 IU/ml; długi protokół (po transferze) – 55,42 IU/ml

(B) Długi protokół stymulacji jest linią zieloną, krótki protokół stymulacji – linią czerwoną. Korelacje wyznaczono stosując korelacje Spearmana (R – współczynnik korelacji Spearmana, p – istotność statystyczna). Na osiach x i y zaznaczono wartości stężenia sHLA-G przed i po transferze zarodka.

Kobiety, które zostały poddane krótkiemu i długiemu protokołowi stymulacji owulacji porównano pod względem wydzielania sHLA-G w zależności od haplotypów *HLA-G* (**Rycina 48** i **Tabela 34**). U kobiet, po krótkim protokole i pozytywnych pod względem haplotypu G-C-ins zauważono mniejsze stężenie sHLA-G niż w haplotypach: A-C-del, A-C-ins i G-C-del (odpowiednio: p=0,024, mediany 47,58 *vs.* 58,25 IU/ml; p=0,0046, mediany 47,58 *vs.* 65,72 IU/ml; p=0,0005, mediany 47,58 *vs.* 67,66 IU/ml). W protokole długim, widoczna była istotna różnica w stężeniach sHLA-G pomiędzy pacjentkami G-C-ins, które wydzielały mniej sHLA-G oraz pacjentkami A-C-del (p=0,0076, mediany 45,94 *vs.* 105,70 IU/ml). Pozostałe różnice dotyczyły zbyt małej liczby pacjentek lub nie były znaczące statystycznie. Test Kruskala-Wallisa dla haplotypów G-C-del i G-C-ins pomiędzy protokołem długim i krótkim wykazał istotną różnicę w wydzielaniu sHLA-G zarówno przed, jak i po transferze zarodka (p=0,0001).



Rycina 48. Stężenie sHLA-G u pacjentek IVF według haplotypów *HLA-G* w zależności od krótkiego lub długiego protokołu stymulacji.

Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del; kolor czerwony oznacza osocze pobrane przed transferem zarodka; kolor zielony oznacza osocze pobrane po transferze; p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba pacjentek. Test Kruskala-Wallisa dla haplotypów G-C-del i G-C-ins (krótki protokół *vs.* długi): p=0,0001

Tabela 34. Stężenie sHLA-G u pacjentek IVF według haplotypów *HLA-G* w zależności od krótkiego lub długiego protokołu stymulacji – statystyka opisowa.

Haplotyp*	Przed lub po ET	Liczba pacjentek	sHLA-G (IU/ml)						
			Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
PROTOKÓŁ KRÓTKI									
A-C-del	przed	70	0,00	27,68	**58,25[a, b]**	163,50	1163,00	129,70	207,70
	po	53	0,00	28,35	66,78	113,10	876,90	133,30	202,00
A-C-ins	przed	91	0,00	44,68	**65,72[c]**	155,70	1492,00	164,50	261,10
	po	75	0,00	39,10	62,90	176,10	2122,00	196,20	351,90
A-G-del	przed	15	0,00	23,20	65,16	88,64	258,50	72,10	67,96
	po	10	0,00	38,38	50,78	114,20	154,20	69,05	48,14
A-T-del	przed	5	2,26	2,59	51,39	163,20	272,70	76,61	112,40
	po	4	2,04	2,07	**2,363[d]**	103,60	137,30	36,00	67,50
G-C-del	przed	91	0,00	47,82	**67,66[e]**	252,30	1492,00	209,20	311,90
	po	74	0,00	43,11	**84,41[f]**	241,60	1828,00	219,60	356,30
G-C-ins	przed	43	0,00	3,24	47,58	78,60	658,80	60,54	101,40
	po	36	0,00	25,66	56,50	107,50	968,90	111,30	180,30
G-G-del	przed	27	0,00	20,03	58,93	235,90	1315,00	199,30	328,40
	po	23	0,00	40,22	62,90	293,50	2122,00	218,50	435,80
G-T-ins	przed	6	24,90	26,96	139,90	466,10	758,10	243,20	285,90
	po	5	33,92	47,27	102,60	1055,00	1278,00	461,40	564,90
PROTOKÓŁ DŁUGI									
A-C-del	przed	26	0,00	58,64	**105,70[g]**	176,80	391,50	136,10	108,60
	po	19	0,00	18,43	31,86	174,80	551,00	120,40	170,90
A-C-ins	przed	37	0,00	39,73	83,11	178,00	1357,00	165,30	252,60
	po	31	2,33	36,10	61,12	140,30	1115,00	160,00	275,50
A-G-del	przed	6	2,67	56,50	**108,7[h]**	147,70	162,20	99,92	60,54
	po	2	1,53	1,53	**88,17[i]**	174,80	174,80	88,17	122,50
G-C-del	przed	23	0,00	39,81	85,20	171,30	1357,00	180,00	290,00
	po	16	0,00	33,61	53,66	107,70	531,10	97,02	132,20
G-C-ins	przed	10	24,46	34,03	45,94	53,01	70,02	45,00	15,74
	po	10	34,60	34,91	79,30	104,20	108,10	71,97	33,58
G-G-del	przed	13	0,00	42,54	63,38	167,00	206,70	96,63	69,15
	po	10	2,33	38,24	81,53	207,80	376,10	124,90	118,40
G-T-ins	przed	3	16,23	16,23	57,19	283,40	283,40	118,90	143,90
	po	2	27,88	27,88	202,00	376,10	376,10	202,00	246,20

*Kolejność polimorfizmów w diplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del;

Wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya:

Dla krótkiego protokołu: [a]A-C-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,024; [c]A-C-ins przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,0046; [d]A-T-del po ET *vs.* G-C-del po ET: p=0,04; [e]G-C-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,0005;

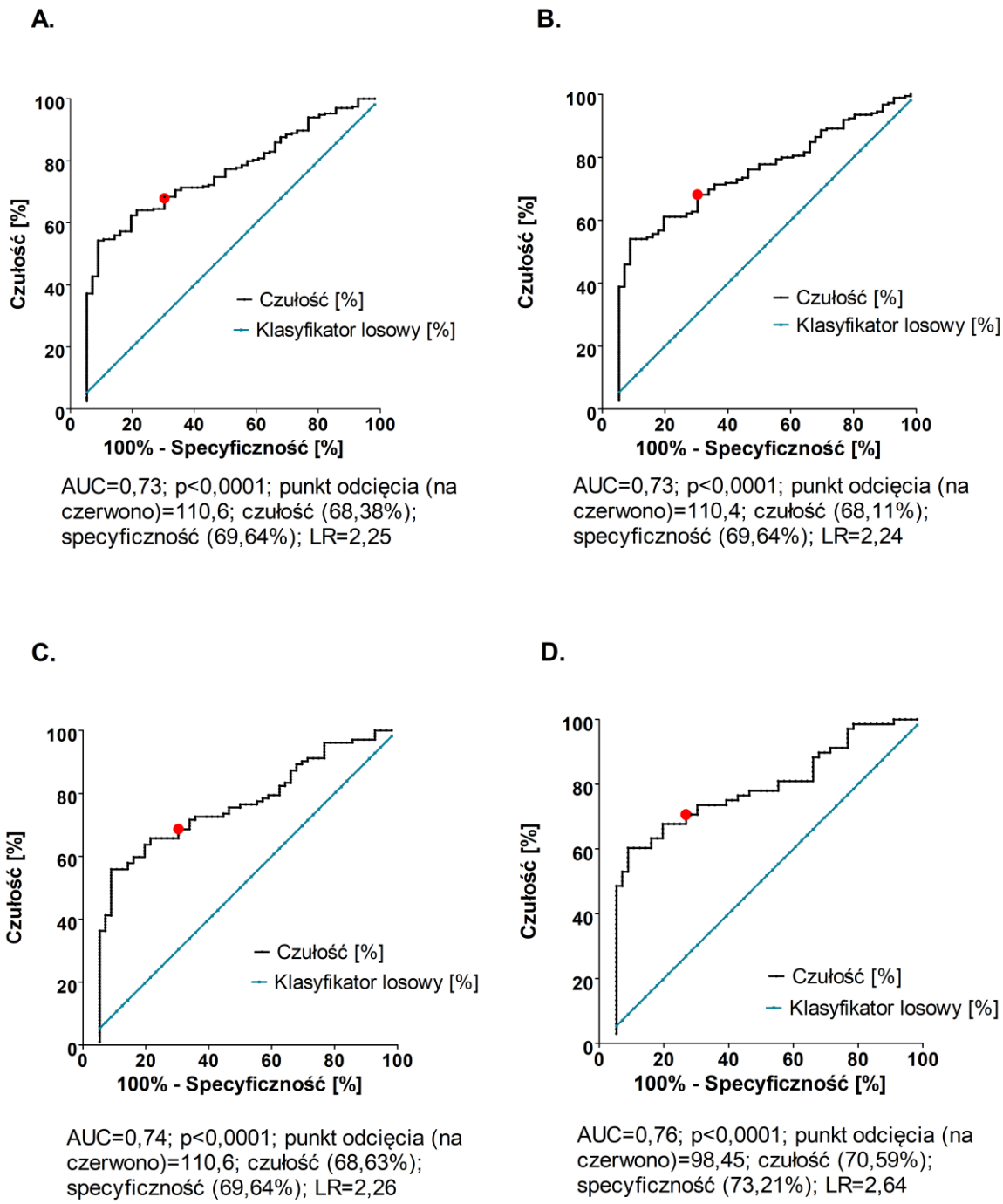
Protokół krótki *vs.* długi: [b]A-C-del przed ET: p=0,078; [f]G-C-del po ET: p=0,08;

Dla długiego protokołu: [g]A-C-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,0076; [h]A-G-del przed ET *vs.* G-C-ins przed ET: p=0,03; [i]A-G-del po ET *vs.* G-T-ins po ET: p<0,0001

4.5.7. Analiza krzywych ROC dla stężenia sHLA-G

W celu oceny sHLA-G jako potencjalnego czynnika prognostycznego niepowodzeń implantacji zarodka, przeprowadzono analizę ROC z oceną pola pod krzywą (AUC). Dla każdej krzywej ROC wyznaczono punkt odcięcia dla stężenia sHLA-G, jako wartość progową potrzebną do oceny ryzyka wystąpienia niepowodzeń implantacji zarodka i w konsekwencji braku ciąży. Punkt odcięcia wyznaczano przy możliwie najlepszej czułości i specyficzności badania. Analizy przeprowadzono dla pacjentek IVF oraz w podgrupach: pacjentek, które nie zaszły w ciążę lub doznały poronienia po zapłodnieniu *in vitro*. Na **Rycinie 49** przedstawiono analizy ROC dla wszystkich kobiet z kontroli (niezależnie czy urodziły dziecko w przeszłości, czy były w ciąży w momencie pobrania osocza) oraz pacjentek IVF w zależności od tego, czy osocze było pobrane przed, czy po transferze zarodka (**Rycina 49 A** i **B**). Porównano także kobiety z kontroli z pacjentkami, które nie zaszły w ciążę lub miały poronienie po zapłodnieniu IVF (**Rycina 49 C** i **D**). Wartości AUC, istotności p, punkt odcięcia przy najlepszej czułości i specyficzności oraz iloraz wiarygodności przedstawiono pod każdym z wykresów.

Dla wszystkich poniższych analiz uzyskano bardzo istotne statystycznie wyniki ($p<0,0001$). Wartość progowa sHLA-G pozwalająca odróżnić kobiety, które zaszły w ciążę naturalnie od pacjentek, które poddały się zapłodnieniu *in vitro* wynosiła 110,6 IU/ml lub 110,4 IU/ml (w zależności od tego, czy badano osocze pacjentek pobrane przed, czy po transferze zarodka) (**Rycina 49 A** i **B**). Czułość wynosiła 68,38%, a specyficzność 69,64% dla wartości 110,6 IU/ml (AUC=0,73; osocze pacjentek pobrane przed transferem), natomiast dla wartości 110,4 IU/ml czułość wynosiła 68,11% i specyficzność – 69,64% (AUC=0,73; osocze pacjentek pobrane po transferze). Podobną wartość progową stężenia sHLA-G (110,6 IU/ml), zaobserwowano dla pacjentek, których transfer skutkował brakiem ciąży lub poronieniem w porównaniu do kobiet, które zaszły w ciążę naturalnie (AUC=0,74; czułość 68,63%; specyficzność 69,64%; analizowano osocze pacjentek pobrane przed transferem) (**Rycina 49 C**). Gdy zbadano osocze pacjentek pobrane po transferze zarodka w stosunku do osocza kobiet płodnych, wartość progowa sHLA-G wynosiła 98,45 IU/ml (AUC=0,76; czułość 70,59%; specyficzność 73,21%) (**Rycina 49 D**).

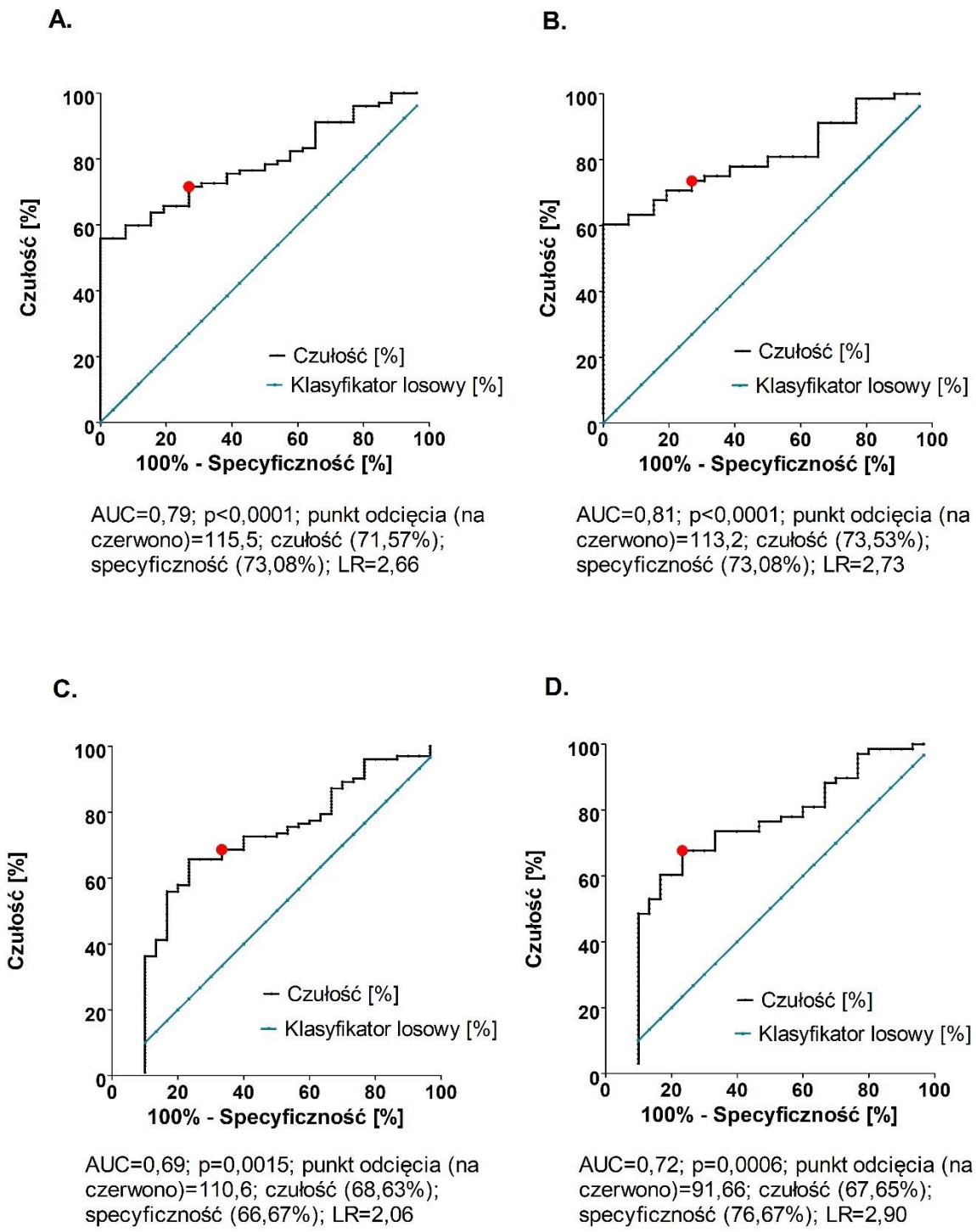


Rycina 49. Analizy ROC dla stężenia sHLA-G u pacjentek IVF i kontroli płodnej.

(A) Kontrola płodna *vs.* pacjentki IVF przed transferem zarodka; (B) kontrola płodna *vs.* pacjentki IVF po transferze zarodka; (C) kontrola płodna *vs.* pacjentki, które nie zaszły w ciążę lub miały poronienia – osocze pobrane przed transferem; (D) kontrola płodna *vs.* pacjentki, które nie zaszły w ciążę lub miały poronienia – osocze pobrane po transferze.
AUC – pole pod krzywą (ang. *area under curve*); p – istotność statystyczna; LR – iloraz wiarygodności (ang. *likelihood ratio*).

W następnym etapie kobiety z kontroli płodnej podzielono na dwie grupy: te, które w momencie pobrania osocza były w ciąży oraz te, które urodziły dziecko w przeszłości.

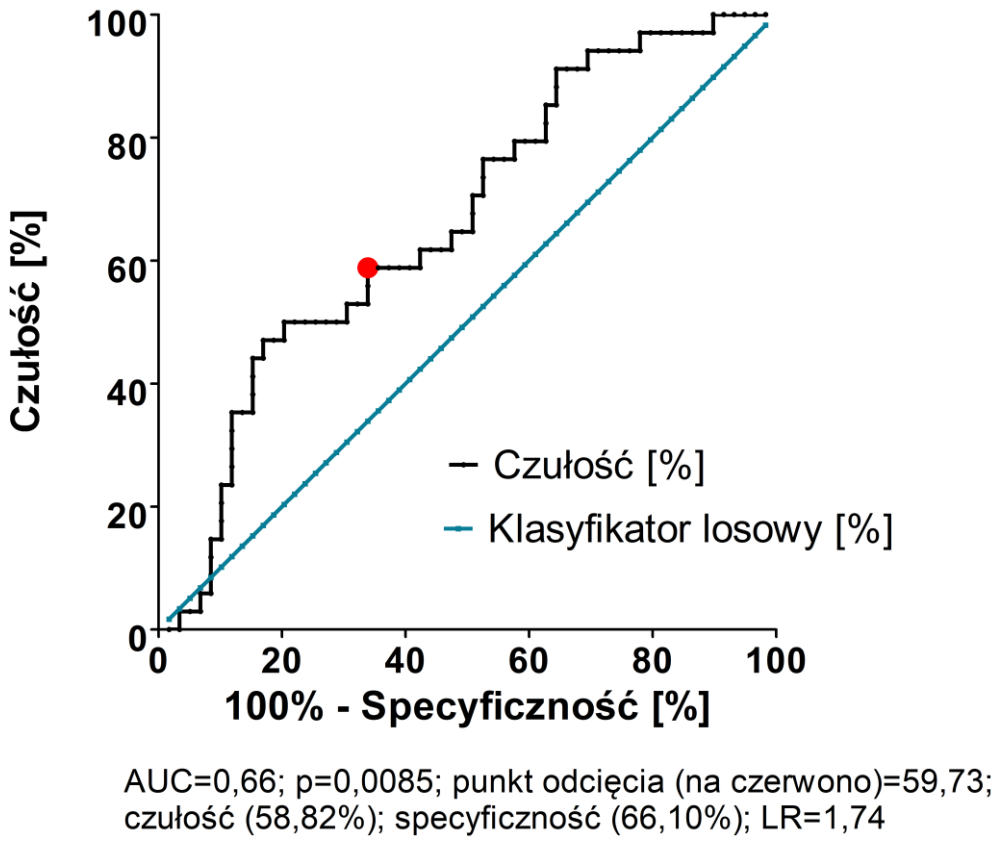
Kobiety z kontroli porównano z pacjentkami IVF, które nie zaszły w ciążę lub miały poronienie pod względem wydzielanego sHLA-G i skonstruowano dla nich krzywe ROC (**Rycina 50**). Wartość graniczna (punkt odcięcia) stężenia sHLA-G odróżniająca kobiety, które zaszły w ciążę naturalnie i były w ciąży w momencie badania od pacjentek, które nie zaszły w ciążę lub doświadczyły poronienia po IVF, była na poziomie 115,5 IU/ml ($p<0,0001$; AUC=0,79; czułość 71,57%; specyficzność 73,08%; osocze pacjentek pobrane przed transferem) (**Rycina 50 A**). Gdy analizowano osocze pacjentek po transferze zarodka, wartość graniczna sHLA-G wynosiła nieznacznie mniej (113,2 IU/ml), ale analiza wykazała silniejsze różnice, ponieważ AUC wzrosło do 0,81 ($p<0,0001$; czułość 73,53%; specyficzność 73,08%) (**Rycina 50 B**). Porównując kobiety z kontroli, które rodziły w przeszłości i pacjentki IVF (które nie zaszły w ciążę lub doświadczyły poronienia), wykazano, że wartość progowa sHLA-G wyniosła 110,6 IU/ml, natomiast analiza ta wykazała mniejszą istotność niż poprzednia ($p=0,0015$; AUC=0,69; czułość 68,63%; specyficzność 66,67%; osocze pacjentek pobrane przed transferem) (**Rycina 50 C**). Jednak gdy analizowano osocze tych samych pacjentek pobrane po transferze zarodka, punkt progowy sHLA-G, który odróżniał pacjentki doświadczone poronieniem lub brakiem ciąży od kobiet z kontroli, wyniósł 91,66 IU/ml ($p=0,0006$; AUC=0,72; czułość 67,65%; specyficzność 76,67%) (**Rycina 50 D**).



Rycina 50. Analizy ROC dla stężenia sHLA-G u pacjentek z brakiem ciąży lub poronieniami po IVF i kobiet z kontroli płodnej.

(A) Kobiety płodne (w ciąży) *vs.* pacjentki IVF, które nie zaszły w ciążę lub doznały poronienia (osocze pobrane przed transferem zarodka); (B) kontrola płodna (w ciąży) *vs.* pacjentki IVF, które nie zaszły w ciążę lub doświadczyły poronienia (osocze pobrane po transferze zarodka); (C) kobiety płodne (urodziły w przeszłości) *vs.* pacjentki, które nie zaszły w ciążę lub doznały poronienia (osocze pobrane przed transferem); (D) kobiety płodne (urodziły w przeszłości) *vs.* pacjentki, które nie zaszły w ciążę lub doznały poronienia (osocze pobrane po transferze). AUC – pole pod krzywą (ang. *area under curve*); p – istotność statystyczna; LR – iloraz wiarygodności (ang. *likelihood ratio*).

Dodatkowo przeprowadzono analizę ROC w celu wyznaczenia wartości granicznej stężenia sHLA-G odróżniającej pacjentki IVF, które zaszły w ciążę po zapłodnieniu *in vitro* od tych, które nie zaszły w ciążę bądź doznały poronienia (**Rycina 51**). Istotny statystycznie wynik uzyskano jedynie w przypadku osocza pacjentek pobranego po transferze zarodka. Zaobserwowane stężenie progowe sHLA-G osiągnęło wartość 59,73 IU/ml, która była znacząco niższa niż w analizach ROC z kontrolą płodną. Czułość i specyficzność przy takim punkcie progowym wynosiły odpowiednio 58,82% i 66,10%, a pole pod wykresem wyniosło AUC=0,66 (p=0,0085).



Rycina 51. Analiza ROC dla stężenia sHLA-G mierzonego po transferze zarodka u pacjentek, które zaszły w ciążę po *in vitro* oraz pacjentek, które nie zaszły w ciążę lub miały poronienie.

AUC – pole pod krzywą (ang. *area under curve*); p – istotność statystyczna; LR – iloraz wiarygodności (ang. *likelihood ratio*).

4.6. HLA-G w niepłodności męskiej

4.6.1. Analiza częstości genotypów, haplotypów i diplotypów *HLA-G* w badanych grupach mężczyzn IVF i mężczyzn z kontroli płodnej

Genotypy *HLA-G* sprawdzono w trzech miejscach polimorficznych: rs1632947:-964G>A, rs1233334:-725G>C/T i 14-nukleotydowej insercji/delecji w regionie 3'UTR u partnerów kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz partnerów kobiet płodnych. DNA wyizolowano z 480 próbek krwi obwodowej oraz ze 183 próbek nasienia partnerów kobiet poddanych procedurze IVF (w sumie 663 mężczyzn). Liczba mężczyzn z kontroli płodnej wyniosła 320. Wyniki porównania częstości genotypów *HLA-G* przedstawiono w **Tabeli 24S** w **Suplemencie**, ponieważ nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy grupą mężczyzn IVF a grupą kontrolną.

Istotne różnice zauważono w analizie porównawczej haplotypów *HLA-G*. Dla partnerów pacjentek IVF i kontroli płodnej wyznaczono 9 haplotypów w kolejności polimorficznej: rs1632947–rs1233334–rs371194629 (**Tabela 35**). Haplotypy A-G-del oraz G-C-ins obserwowane były znacznie częściej u mężczyzn IVF w porównaniu do mężczyzn z kontroli ($^{b}p/p_{corr.}$=0,0001/0,0001, OR=3,535; $^{c}p/p_{corr.}$<0,0001/0,0001, OR=3,035). Odwrotnie, haplotypy A-C-ins i G-G-del występowały częściej u mężczyzn z kontroli niż u mężczyzn z grupy IVF ($^{a}p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0004, OR=0,653; $^{d}p/p_{corr.}$=0,005/0,042, OR=0,648) (**Tabela 35**).

Tabela 35. Rozkład częstości haplotypów *HLA-G* u partnerów kobiet IVF i kobiet z kontroli płodnej.

Haplotypy HLA-G	Mężczyźni IVF	Kontrola płodna
	2N=1308 (%)	2N=638 (%)
A-C-del	216 (16,51)	90 (14,11)
A-C-ins	**350 (26,76)[a]**	229 (35,89)
A-G-del	**63 (4,82)[b]**	9 (1,41)
A-T-del	9 (0,69)	1 (0,16)
G-C-del	315 (24,08)	170 (26,65)
G-C-ins	**211 (16,13)[c]**	38 (5,96)
G-G-del	**120 (9,17)[d]**	86 (13,48)
G-G-ins	3 (0,23)	0 (0,00)
G-T-ins	21 (1,61)	15 (2,35)

2N – liczba wszystkich haplotypów; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x9 możliwych haplotypów); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności. Wartości pogrubione wskazują na istotne statystycznie różnice. Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del

Mężczyźni IVF *vs.* kontrola płodna: [a]$p/p_{corr.}$<0,0001/<0,0004, OR=0,653, 95% CI (0,53-0,80); [b]$p/p_{corr.}$=0,0001/0,0001, OR=3,535, 95% CI (1,73-8,14); [c]$p/p_{corr.}$<0,0001/0,0001, OR=3,035, 95% CI (2,11-4,47); [d]$p/p_{corr.}$=0,005/0,042, OR=0,648, 95% CI (0,48-0,88)

Na podstawie haplotypów wyznaczono 23 diplotypy *HLA-G* u mężczyzn. Dla 4 diplotypów wykryto istotne różnice pomiędzy mężczyznami z grupy IVF i kontrolą, które zachowały istotność nawet po korekcie Bonferroniego. Diplotypy A-C-del/A-G-del oraz G-C-ins/G-C-ins były obecne częściej u mężczyzn z grupy IVF niż w kontroli ([a]$p/p_{corr.}$=0,0001/<0,002, OR=4,857; [f]$p/p_{corr.}$<0,0001/0,001, OR=3,066), podczas gdy A-C-ins/A-C-ins oraz G-G-del/G-C-del częstsze były w kontroli niż u mężczyzn IVF ([c]$p/p_{corr.}$<0,0001/0,0001, OR=0,273; [d]$p/p_{corr.}$ <0,0001/0,0001, OR=0,191) (**Tabela 36**). Dodatkowo zauważono również większą częstość diplotypów A-C-ins/A-C-del, G-C-del/G-C-ins i G-T-ins/A-C-del w kontroli niż u mężczyzn IVF, jednak wyniki straciły istotność po korekcie Bonferroniego ([b]$p/p_{corr.}$=0,039/ns, OR=0,474; [e]$p/p_{corr.}$= 0,024/ns, OR=2,396; [g]$p/p_{corr.}$=0,035/ns, OR=0,000).

Tabela 36. Rozkład częstości diplotypów *HLA-G* u partnerów kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz partnerów kobiet płodnych.

Diplotypy HLA-G	Mężczyźni IVF	Kontrola płodna
	N=654 (%)	N=319 (%)
A-G-del/A-G-del	8 (1,22)	2 (0,63)
A-C-del/A-G-del	**47 (7,19)[a]**	5 (1,57)
A-C-del/A-C-del	45 (6,88)	15 (4,70)
A-C-ins/A-C-del	**17 (2,60)[b]**	17 (5,33)
A-C-ins/A-C-ins	**28 (4,28)[c]**	45 (14,11)
G-G-del/G-G-del	3 (0,46)	5 (1,57)
G-G-del/G-C-del	**10 (1,53)[d]**	24 (7,52)
G-C-del/G-C-del	28 (4,28)	20 (6,27)
G-C-del/G-C-ins	**38 (5,81)[e]**	8 (2,51)
G-C-ins/G-C-ins	**86 (13,15)[f]**	15 (4,70)
A-C-del/G-C-del	45 (6,88)	22 (6,90)
A-C-del/G-G-del	16 (2,45)	13 (4,08)
A-C-ins/A-T-del	8 (1,22)	1 (0,31)
A-C-ins/G-C-del	164 (25,08)	75 (23,51)
A-T-del/A-C-del	1 (0,15)	0 (0,00)
G-C-ins/A-C-ins	1 (0,15)	0 (0,00)
G-G-del/A-C-ins	87 (13,30)	37 (11,60)
G-G-del/G-G-ins	1 (0,15)	0 (0,00)
G-G-ins/G-T-ins	2 (0,31)	0 (0,00)
G-T-ins/A-C-del	**0 (0,00)[g]**	3 (0,94)
G-T-ins/A-C-ins	17 (2,60)	9 (2,82)
G-T-ins/G-C-del	2 (0,31)	1 (0,31)
G-T-ins/G-G-del	0 (0,00)	2 (0,63)

N – liczba wszystkich diplotypów; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x23 możliwe diplotypy); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności. Wartości pogrubione wskazują na istotne statystycznie różnice. Kolejność polimorfizmów w diplotypie: rs1632947: 964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del. Test chi-kwadrat dla trendu: dla G-C-del/G-C-del *vs.* G-C-del/G-C-ins *vs.* G-C-ins/G-C-ins: p=0,0005; dla A-C-del/A-C-del *vs.* A-C-ins/A-C-del *vs.* A-C-ins/A-C-ins: p<0,0001.

Mężczyźni IVF *vs.* kontrola płodna: [a]$p/p_{corr.}$=0,0001/<0,002, OR=4,857, 95% CI (1,91-15,81); [b]$p/p_{corr.}$=0,039/ns, OR=0,474, 95% CI (0,22-1,00); [c]$p/p_{corr.}$<0,0001/0,0001, OR=0,273, 95% CI (0,16-0,46); [d]$p/p_{corr.}$ <0,0001/0,0001, OR=0,191, 95% CI (0,08-0,42); [e]$p/p_{corr.}$= 0,024/ns, OR=2,396, 95% CI (1,08-6,02); [f]$p/p_{corr.}$<0,0001/0,001, OR=3,066, 95% CI (1,72-5,82); [g]$p/p_{corr.}$=0,035/ns, OR=0,000, 95% CI (0,00-1,18)

Porównano także diplotypy, które różniły się występowaniem allelu insercyjnego w miejscu polimorficznym rs371194629 (G-C-del/G-C-del *vs.* G-C-del/G-C-ins *vs.* G-C-ins/G-C-ins) i wykryto zależność pomiędzy występowaniem allelu insercyjnego a ryzykiem niepłodności u mężczyzn. Mężczyźni z grupy IVF różnili się częstością występowania tych diplotypów od mężczyzn z kontroli, gdzie diplotyp G-C-ins/G-C-ins oraz G-C-del/G-C-ins występował częściej u mężczyzn z grupy IVF. Natomiast diplotyp G-C-del/G-C-del częstszy

był u mężczyzn z kontroli w porównaniu do mężczyzn, którzy wraz z partnerkami poddali się procedurze IVF (**Tabela 36**). Test chi-kwadrat dla trendu dla tych diplotypów wyniósł p=0,0005. Ten sam allel insercyjny wykazywał przeciwny efekt dla diplotypów A-C-del/A-C-del *vs.* A-C-ins/A-C-del *vs.* A-C-ins/A-C-ins. Mężczyźni posiadający diplotypy A-C-ins/A-C-del i A-C-ins/A-C-ins częściej byli w grupie kontrolnej niż w grupie IVF, a mężczyźni mający diplotyp A-C-del/A-C-del częściej stanowili grupę IVF niż grupę kontrolną. Test chi-kwadrat dla trendu dla tych diplotypów wyniósł p<0,0001.

4.6.2. Haplotypy i diplotypy *HLA-G* w zależności od parametrów nasienia

Mężczyźni, którzy wraz z partnerkami poddali się zapłodnieniu *in vitro*, zostali podzieleni na grupy według liczby plemników, jaka występowała w ich ejakulacie. Częstości haplotypów *HLA-G* porównano u meżczyzn z normozoospermią oraz u mężczyzn, którzy mieli obniżoną liczbę plemników w ejakulacie (**Tabela 37**). Wyodrębniono mężczyzn, którzy mieli średnią oligozoospermię (5-15 mln plemników na 1 ml w próbce) oraz oligozoospermię ciężką (1-5 mln plemników na 1 ml), bardzo ciężką (<1 mln plemników na 1 ml) lub azoospermię (brak plemników w ejakulacie) i również porównano ich do mężczyzn z normozoospermią. Nie zaobserwowano istotnych różnic, z wyjątkiem haplotypu G-T-ins, który był częstszy u mężczyzn z obniżoną liczbą plemników w porównaniu do mężczyzn z normozoospermią ($^{a}p/p_{corr.}$=0,013/ns, OR=3,140), jak również występował częściej u mężczyzn z ciężką, bardzo ciężką oligozoospermią lub azoospermią niż u mężczyzn z normozoospermią ($^{b}p/p_{corr.}$=0,006/ns, OR=4,068) (**Tabela 37**).

Tabela 37. Rozkład częstości haplotypów *HLA-G u* mężczyzn IVF według liczby plemników w nasieniu.

Haplotypy HLA-G	Prawidłowa liczba plemników	Obniżona liczba plemników	Umiarkowana OS	Ciężka, bardzo ciężka OS i AS
	2N=752 (%)	2N=488 (%)	2N=244 (%)	2N=244 (%)
A-C-del	119 (15,82)	89 (18,24)	44 (18,03)	45 (18,44)
A-C-ins	201 (26,73)	126 (25,82)	60 (24,59)	66 (27,05)
A-G-del	41 (5,45)	20 (4,10)	8 (3,28)	12 (4,92)
A-T-del	4 (0,53)	4 (0,82)	1 (0,41)	3 (1,23)
G-C-del	180 (23,94)	112 (22,95)	64 (26,23)	48 (19,67)
G-C-ins	124 (16,49)	80 (16,39)	40 (16,39)	40 (16,39)
G-G-del	74 (9,84)	42 (8,61)	22 (9,02)	20 (8,20)
G-G-ins	2 (0,27)	1 (0,20)	0 (0,00)	1 (0,41)
G-T-ins	**7 (0,93)^{a,b}**	14 (2,87)	5 (2,05)	9 (3,69)

Prawidłowa liczba plemników (≥15 mln/ml); OS – oligozoospermia; umiarkowana OS (5-15 mln/ml); ciężka OS (1-5 mln/ml); bardzo ciężka OS (<1 mln/ml); AS – azoospermia (brak plemników w ejakulacie); 2N – liczba wszystkich haplotypów; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x9 możliwych haplotypów); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności. Wartości pogrubione wskazują na istotne statystycznie różnice. Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947: 964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del.

Prawidłowa liczba plemników *vs.* obniżona liczba plemników: [a]$p/p_{corr.}$=0,013/ns, OR=3,140, 95% CI (1,18-9,26);
Prawidłowa liczba plemników *vs.* ciężka, bardzo ciężka OS i AS: [b]$p/p_{corr.}$=0,006/ns, OR=4,068, 95% CI (1,33-13,01)

Częstości haplotypów *HLA-G* sprawdzono także u mężczyzn, którzy mieli nieprawidłowe parametry nasienia (w tym ruchliwość i morfologię plemników) i porównano je z haplotypami mężczyzn o prawidłowej ruchliwości i morfologii plemników. Haplotyp G-C-ins częściej występował w grupie wszystkich mężczyzn posiadających obniżone parametry nasienia niż w grupie mężczyzn z normozoospermią ([a]$p/p_{corr.}$=0,009/ns, OR=1,525). Częstość haplotypu G-C-ins była także większa u mężczyzn z teratozoospermią niż u mężczyzn z normozoospermią ([b]$p/p_{corr.}$=0,0005/0,004, OR=2,000).

Tabela 38. Rozkład częstości haplotypów *HLA-G* u mężczyzn IVF według ruchliwości i morfologii plemników w nasieniu.

Haplotypy HLA-G	Normozoospermia	Nieprawidłowe parametry nasienia	Astenozoospermia	Teratozoospermia
	2N=536 (%)	2N=704 (%)	2N=328 (%)	2N=252 (%)
A-C-del	86 (16,04)	122 (17,33)	62 (18,90)	49 (19,44)
A-C-ins	152 (28,36)	175 (24,86)	83 (25,30)	55 (21,83)
A-G-del	30 (5,60)	31 (4,40)	17 (5,18)	11 (4,37)
A-T-del	4 (0,75)	4 (0,57)	0 (0,00)	0 (0,00)
G-C-del	132 (24,63)	160 (22,73)	80 (24,39)	52 (20,63)
G-C-ins	**71 (13,25)[a,b]**	133 (18,89)	46 (14,02)	59 (23,41)
G-G-del	53 (9,89)	63 (8,95)	32 (9,76)	21 (8,33)
G-G-ins	2 (0,37)	1 (0,14)	1 (0,30)	0 (0,00)
G-T-ins	6 (1,12)	15 (2,13)	7 (2,13)	5 (1,98)

Normozoospermia – całkowita liczba plemników w nasieniu oraz odsetek plemników o postępującej ruchliwości i prawidłowej morfologii jest równy lub wyższy od wartości referencyjnych; nieprawidłowe parametry nasienia – przynajmniej jeden parametr nasienia jest niższy od wartości referencyjnych; astenozoospermia – liczba plemników o prawidłowej ruchliwości w nasieniu jest poniżej wartości referencyjnych; teratozoospermia – liczba plemników prawidłowych morfologicznie w nasieniu jest poniżej wartości referencyjnych. 2N – liczba wszystkich haplotypów; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x9 możliwych haplotypów); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności. Wartości pogrubione wskazują na istotne statystycznie różnice. Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del.

Normozoospermia *vs.* nieprawidłowe parametry nasienia: [a]$p/p_{corr.}$=0,009/ns, OR=1,525, 95% CI (1,10-2,12);
Normozoospermia *vs.* teratozoospermia: [b]$p/p_{corr.}$=0,0005/0,004, OR=2,000, 95% CI (1,34-2,99)

W następnym etapie porównano częstości diplotypów u mężczyzn według liczebności plemników w ich nasieniu. Tylko diplotyp G-T-ins/A-C-ins występował częściej u mężczyzn, którzy mieli obniżoną ilość plemników oraz mężczyzn z ciężką i bardzo ciężką oligozoospermią oraz azoospermią niż u mężczyzn mających prawidłową liczbę plemników (odpowiednio: [a]$p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=3,829; [b]$p/p_{corr.}$=0,012/ns, OR=4,500).

Tabela 39. Rozkład częstości diplotypów *HLA-G u* mężczyzn IVF według liczby plemników w nasieniu.

Diplotypy HLA-G	Prawidłowa liczba plemników	Obniżona liczba plemników	Umiarkowana OS	Ciężka, bardzo ciężka OS i AS
	N=376 (%)	N=244 (%)	N=122 (%)	N=122 (%)
A-C-del/A-C-del	24 (6,38)	20 (8,20)	8 (6,56)	12 (9,84)
A-C-del/A-G-del	31 (8,24)	14 (5,74)	8 (6,56)	6 (4,92)
A-C-del/G-C-del	24 (6,38)	19 (7,79)	12 (9,84)	7 (5,74)
A-C-del/G-G-del	9 (2,39)	7 (2,87)	5 (4,10)	2 (1,64)
A-C-ins/A-C-del	7 (1,86)	8 (3,28)	2 (1,64)	6 (4,92)
A-C-ins/A-C-ins	16 (4,26)	8 (3,28)	5 (4,10)	3 (2,46)
A-C-ins/A-T-del	4 (1,06)	3 (1,23)	0 (0,00)	3 (2,46)
A-C-ins/G-C-del	96 (25,53)	58 (23,77)	29 (23,77)	29 (23,77)
A-G-del/A-G-del	5 (1,33)	3 (1,23)	0 (0,00)	3 (2,46)
A-T-del/A-C-del	0 (0,00)	1 (0,41)	1 (0,82)	0 (0,00)
G-C-del/G-C-del	17 (4,52)	8 (3,28)	6 (4,92)	2 (1,64)
G-C-del/G-C-ins	20 (5,32)	15 (6,15)	10 (8,20)	5 (4,10)
G-C-ins/G-C-ins	52 (13,83)	32 (13,11)	15 (12,30)	17 (13,93)
G-C-ins/A-C-ins	0 (0,00)	1 (0,41)	0 (0,00)	1 (0,82)
G-G-del/A-C-ins	57 (15,16)	28 (11,48)	14 (11,48)	14 (11,48)
G-G-del/G-C-del	5 (1,33)	3 (1,23)	1 (0,82)	2 (1,64)
G-G-del/G-G-del	1 (0,27)	2 (0,82)	1 (0,82)	1 (0,82)
G-G-del/G-G-ins	1 (0,27)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
G-T-ins/A-C-ins	**5 (1,33)[a,b]**	12 (4,92)	5 (4,10)	7 (5,74)
G-T-ins/G-C-del	1 (0,27)	1 (0,41)	0 (0,00)	1 (0,82)
G-G-ins/G-T-ins	1 (0,27)	1 (0,41)	0 (0,00)	1 (0,82)

Prawidłowa liczba plemników (≥15 mln/ml); OS – oligozoospermia; umiarkowana OS (5-15 mln/ml); ciężka OS (1-5 mln/ml); bardzo ciężka OS (<1 mln/ml); AS – azoospermia (brak plemników w ejakulacie); 2N – liczba wszystkich diplotypów; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x23 możliwe diplotypy); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności. Wartości pogrubione wskazują na istotne statystycznie różnice. Kolejność polimorfizmów w diplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del.

Prawidłowa liczba plemników *vs.* obniżona liczba plemników: [a]$p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=3,829, 95% CI (1,24-14,06);
Prawidłowa liczba plemników *vs.* ciężka, bardzo ciężka OS i AS: [b]$p/p_{corr.}$=0,012/ns, OR=4,500, 95% CI (1,20-18,35)

Analizowano również częstości diplotypów *HLA-G* u mężczyzn, którzy mieli nieprawidłową ruchliwość i morfologię plemników. Diplotypy A-C-ins/A-C-ins oraz G-C-del/G-C-del występowały częściej u mężczyzn posiadających prawidłowe parametry nasienia niż u mężczyzn z teratozoospermią (odpowiednio: $^{a}p/p_{corr.}$=0,026/ns, OR=0,135; $^{b}p/p_{corr.}$= 0,044/ns, OR=0,157). Natomiast większy odsetek mężczyzn posiadających diplotyp G-C-ins/G-C-ins występował w grupie mężczyzn z teratozoospermią niż w grupie mężczyzn o prawidłowych parametrach nasienia ($^{c}p/p_{corr.}$=0,008/ns, OR= 2,224) (**Tabela 40**).

Tabela 40. Rozkład częstości diplotypów *HLA-G u* mężczyzn IVF według ruchliwości i morfologii plemników w nasieniu.

Diplotypy HLA-G	Normozoospermia	Nieprawidłowe parametry nasienia	Astenozoospermia	Teratozoospermia
	N=268 (%)	N=352 (%)	N=164 (%)	N=126 (%)
A-C-del/A-C-del	17 (6,34)	27 (7,67)	13 (7,93)	12 (9,52)
A-C-del/A-G-del	22 (8,21)	23 (6,53)	13 (7,93)	9 (7,14)
A-C-del/G-C-del	18 (6,72)	25 (7,10)	12 (7,32)	10 (7,94)
A-C-del/G-G-del	7 (2,61)	9 (2,56)	4 (2,44)	5 (3,97)
A-C-ins/A-C-del	5 (1,87)	10 (2,84)	7 (4,27)	1 (0,79)
A-C-ins/A-C-ins	**15 (5,60)[a]**	9 (2,56)	3 (1,83)	1 (0,79)
A-C-ins/A-T-del	4 (1,49)	3 (0,85)	0 (0,00)	0 (0,00)
A-C-ins/G-C-del	69 (25,75)	85 (24,15)	44 (26,83)	32 (25,40)
A-G-del/A-G-del	4 (1,49)	4 (1,14)	2 (1,22)	1 (0,79)
A-T-del/A-C-del	0 (0,00)	1 (0,28)	0 (0,00)	0 (0,00)
G-C-del/G-C-del	**13 (4,85)[b]**	12 (3,41)	6 (3,66)	1 (0,79)
G-C-del/G-C-ins	15 (5,60)	20 (5,68)	6 (3,66)	7 (5,56)
G-C-ins/G-C-ins	**28 (10,45)[c]**	56 (15,91)	20 (12,20)	26 (20,63)
G-C-ins/A-C-ins	0 (0,00)	1 (0,28)	0 (0,00)	0 (0,00)
G-G-del/A-C-ins	39 (14,55)	46 (13,07)	22 (13,41)	15 (11,90)
G-G-del/G-C-del	4 (1,49)	4 (1,14)	4 (2,44)	1 (0,79)
G-G-del/G-G-del	1 (0,37)	2 (0,57)	1 (0,61)	0 (0,00)
G-G-del/G-G-ins	1 (0,37)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
G-T-ins/A-C-ins	5 (1,87)	12 (3,41)	4 (2,44)	5 (3,97)
G-T-ins/G-C-del	0 (0,00)	2 (0,57)	2 (1,22)	0 (0,00)
G-G-ins/G-T-ins	1 (0,37)	1 (0,28)	1 (0,61)	0 (0,00)

Normozoospermia – całkowita liczba plemników w nasieniu oraz odsetek plemników o postępującej ruchliwości i prawidłowej morfologii jest równy lub wyższy od wartości referencyjnych; nieprawidłowe parametry nasienia – przynajmniej jeden parametr nasienia jest niższy od wartości referencyjnych; astenozoospermia – liczba plemników o prawidłowej ruchliwości w nasieniu jest poniżej wartości referencyjnych; teratozoospermia – liczba plemników prawidłowych morfologicznie w nasieniu jest poniżej wartości referencyjnych. N – liczba wszystkich diplotypów; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x23 możliwe diplotypy); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności. Wartości pogrubione wskazują na istotne statystycznie różnice. Kolejność polimorfizmów w diplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del.

Normozoospermia *vs.* teratozoospermia: $^{a}p/p_{corr.}$=0,026/ns, OR=0,135, 95% CI (0,00-0,90); $^{b}p/p_{corr.}$= 0,044/ns, OR=0,157, 95% CI (0,00-1,07); $^{c}p/p_{corr.}$= 0,008/ns, OR= 2,224, 95% CI (1,19-4,15)

4.6.3. Stężenie sHLA-G w nasieniach mężczyzn uczestniczących w zapłodnieniu *in vitro*

Stężenie sHLA-G sprawdzono w 183 próbkach nasienia mężczyzn. W **Tabeli 41** przedstawiono stężenia sHLA-G u mężczyzn z prawidłowymi lub obniżonymi parametrami nasienia, niezależnie od haplotypów *HLA-G*. Pomimo tego, że nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic, mężczyźni z normozoospermią mieli więcej sHLA-G w nasieniu (288,90 IU/ml) niż mężczyźni z nieprawidłowymi parametrami nasienia (227,90 IU/ml).

Tabela 41. Stężenie sHLA-G w nasieniu mężczyzn IVF w zależności od parametrów nasienia – statystyka opisowa.

Parametr	Liczba mężczyzn	sHLA-G (IU/ml)						
		Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
Normozoospermia	60	22,00	85,10	288,90	574,90	1260,00	418,80	390,60
Nieprawidłowe parametry nasienia	123	15,00	78,50	227,90	594,90	1260,00	385,90	394,00
Astenozospermia	40	26,60	81,80	261,70	781,80	1260,00	457,30	436,50
Teratozoospermia	95	15,00	72,60	201,30	678,10	1260,00	398,00	425,40
Prawidłowa liczba plemników w nasieniu	121	22,00	78,00	259,70	648,80	1260,00	413,90	405,80
Umiarkowana OS	33	15,00	99,80	196,30	352,00	1260,00	322,30	356,40
Ciężka, bardzo ciężka OS, AS	29	26,60	85,40	258,30	683,00	1260,00	409,70	374,70

Normozoospermia – całkowita liczba plemników w nasieniu oraz odsetek plemników o postępującej ruchliwości i prawidłowej morfologii jest równy lub wyższy od wartości referencyjnych; nieprawidłowe parametry nasienia – przynajmniej jeden parametr nasienia jest niższy od wartości referencyjnych; astenozoospermia – liczba plemników o prawidłowej ruchliwości w nasieniu jest poniżej wartości referencyjnych; teratozoospermia – liczba plemników prawidłowych morfologicznie w nasieniu jest poniżej wartości referencyjnych; prawidłowa liczba plemników (≥15 mln/ml); OS – oligozoospermia; umiarkowana OS (5-15 mln/ml); ciężka OS (1-5 mln/ml); bardzo ciężka OS (<1 mln/ml); AS – azoospermia (brak plemników w ejakulacie).

Wyznaczono stężenia sHLA-G u mężczyzn w nasieniach o prawidłowych parametrach oraz u mężczyzn, którzy mieli przynajmniej jeden parametr nasienia poniżej wartości referencyjnych według haplotypów i diplotypów *HLA-G* (**Tabela 42**). Z uwagi na zbyt małą liczbę mężczyzn z haplotypami A-T-del i G-T-ins nie można wnioskować, jakie było stężenie sHLA-G dla tych haplotypów. Najwięcej sHLA-G w nasieniu mężczyzn normozoospermicznych zauważono w przypadku haplotypu A-C-del (574,10 IU/ml), najmniej w przypadku G-C-ins (80,80 IU/ml). W rozkładzie diplotypów największe stężenie sHLA-G w nasieniu mieli mężczyźni o diplotypie A-C-del/A-C-del z prawidłowym nasieniem (1047,00 IU/ml), a najmniejsze – mężczyźni o diplotypie G-C-ins/G-C-ins (75,70 IU/ml).

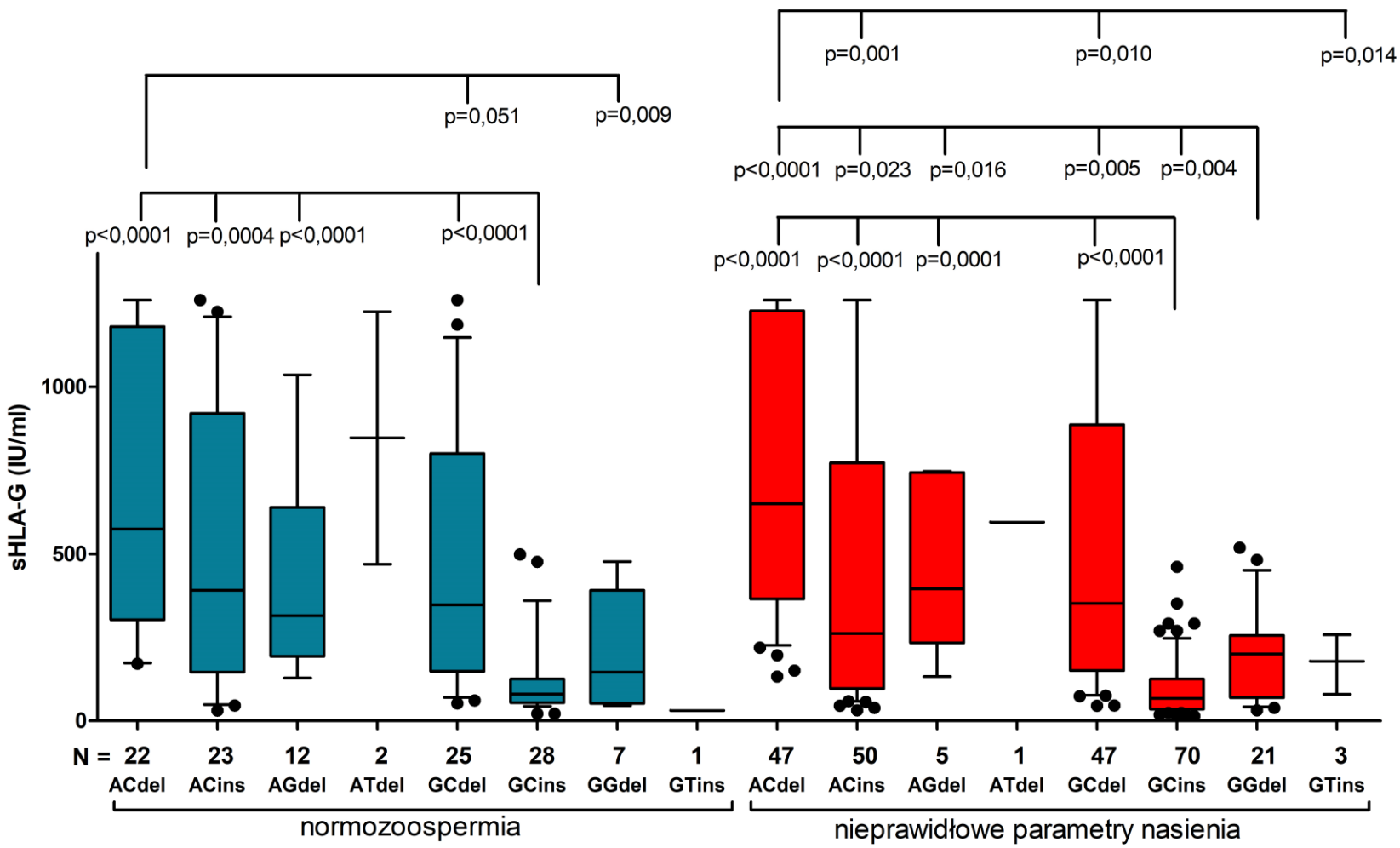
Tabela 42. Stężenie sHLA-G w nasieniach u mężczyzn z normozoospermią i nieprawidłowymi parametrami nasienia w zależności od haplotypów i diplotypów *HLA-G*.

Haplotyp/diplotyp	Normozoospermia		Nieprawidłowe parametry nasienia	
	N	mediana (IU/ml)	N	mediana (IU/ml)
A-T-del	2	847,10	1	594,90
A-C-del	22	574,10	47	650,00
A-C-ins	23	391,20	50	261,70
G-C-del	25	347,70	47	351,50
A-G-del	12	315,20	5	395,30
G-G-del	7	145,90	21	200,70
G-C-ins	28	80,80	70	67,50
G-T-ins	1	31,30	3	178,80
A-C-del/A-C-del	6	1 047,00	16	743,40
A-C-ins/A-T-del	2	847,10	1	594,90
A-C-ins/G-C-del	13	720,10	29	495,90
A-G-del/A-G-del	2	582,20	0	-
A-C-del/G-C-del	2	537,90	6	459,40
A-C-del/A-G-del	8	315,20	5	395,30
G-C-del/G-C-del	1	160,60	1	91,10
G-G-del/A-C-ins	7	145,90	17	99,80
G-C-del/G-C-ins	8	112,50	10	149,70
G-C-ins/G-C-ins	10	75,70	30	59,60
G-T-ins/A-C-ins	1	31,30	3	178,80
A-C-del/G-G-del	0	-	4	282,80

Normozoospermia – całkowita liczba plemników w nasieniu oraz odsetek plemników o postępującej ruchliwości i prawidłowej morfologii jest równy lub wyższy od wartości referencyjnych; nieprawidłowe parametry nasienia – przynajmniej jeden parametr nasienia jest niższy od wartości referencyjnych; kolejność polimorfizmów w haplotypie i diplotypie: rs1632947: 964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del; N – liczba wszystkich haplotypów lub diplotypów.

Porównano stężenia sHLA-G z nasień mężczyzn z prawidłowymi oraz nieprawidłowymi parametrami nasienia w zależności od haplotypów *HLA-G*. Wyniki przedstawiono na **Rycinie 52** i w **Tabeli 43**. Największe różnice w wydzielaniu sHLA-G u mężczyzn z normozoospermią zaobserwowano w porównaniach z haplotypem G-C-ins. Mężczyźni posiadający ten haplotyp mieli niższe stężenia sHLA-G niż mężczyźni posiadający pozostałe haplotypy *HLA-G* (G-C-ins *vs.* A-C-del: p<0,0001; G-C-ins *vs.* A-C-ins: p=0,0004; G-C-ins *vs.* A-G-del: p<0,0001; G-C-ins *vs.* G-C-del: p<0,0001). Dodatkowo obserwowano różnice pomiędzy haplotypem A-C-del a haplotypami G-C-del (p=0,051) oraz G-G-del (p=0,009). U mężczyzn z nieprawidłowymi parametrami nasienia również widoczne były różnice z haplotypem G-C-ins (G-C-ins *vs.* A-C-del: p<0,0001; G-C-ins *vs.* A-C-ins: p<0,0001;

G-C-ins *vs.* A-G-del: p=0,0001; G-C-ins *vs.* G-C-del: p<0,0001; G-C-ins *vs.* G-G-del: p=0,004). Mężczyźni z haplotypem G-G-del także mieli niższe stężenia sHLA-G w porównaniu do mężczyzn o haplotypach A-C-del (p<0,0001), A-C-ins (p=0,023), A-G-del (p=0,016) i G-C-del (p=0,005) (**Rycina 52, Tabela 43**). Nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniach sHLA-G pomiędzy haplotypami mężczyzn z normozoospermią a haplotypami mężczyzn o nieprawidłowych parametrach nasienia. Mężczyźni z normozoospermią nie różnili się wydzielaniem sHLA-G z mężczyznami z astenozoospermią lub teratozoospermią z wyjątkiem haplotypu G-C-ins (**Tabela 43, Rycina 53**). Stężenie sHLA-G u mężczyzn z normozoospermią pozytywnych pod względem haplotypu G-C-ins było istotnie wyższe niż mężczyzn z teratozoospermią (p=0,009) (**Rycina 53**). Mężczyźni o haplotypie G-C-ins z astenozoospermią także mieli mniej sHLA-G w nasieniu w porównaniu do mężczyzn z normozoospermią, jednak ta różnica była na granicy istotności (p=0,058).



Rycina 52. Stężenie sHLA-G w nasieniu mężczyzn w zależności od haplotypów *HLA-G* i parametrów nasienia.

Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del; kolor niebieski oznacza stężenie sHLA-G (IU/ml) u mężczyzn z normozoospermią; kolor czerwony oznacza stężenie sHLA-G (IU/ml) u mężczyzn z nieprawidłowymi parametrami nasienia; p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba mężczyzn

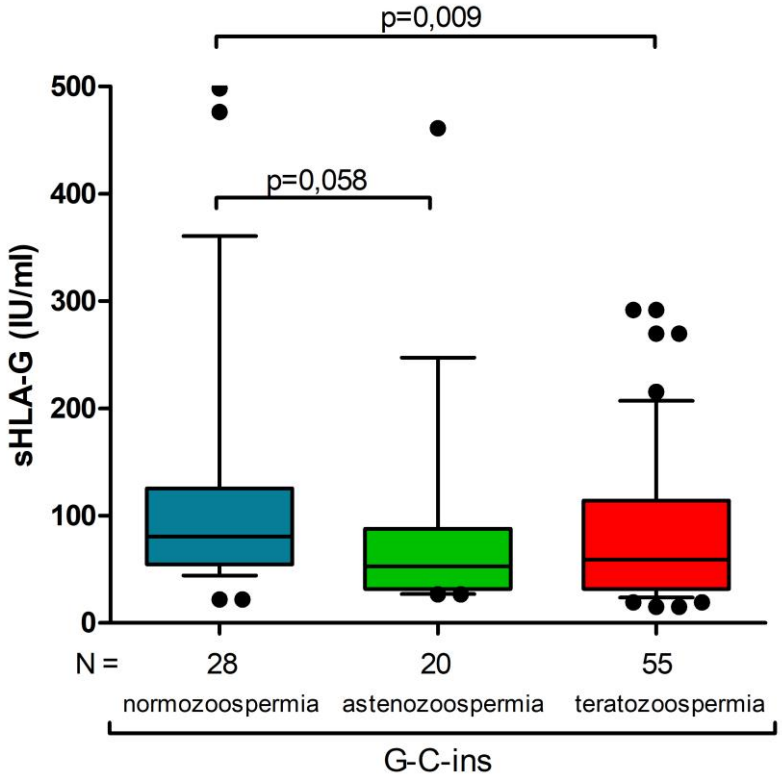
Tabela 43. Stężenie sHLA-G w nasieniu mężczyzn w zależności od haplotypów *HLA-G* i parametrów nasienia – statystyka opisowa.

Haplotyp	Liczba mężczyzn	sHLA-G (IU/ml)						
		Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
Normozoospermia								
A-C-del	22	171,30	303,40	**574,10** [a, b, c]	1180,00	1260,00	666,20	410,70
A-C-ins	23	31,30	145,90	**391,20** [d]	920,50	1260,00	519,20	423,30
A-G-del	12	128,30	193,80	**315,20** [e]	639,70	1036,00	431,90	321,90
A-T-del	2	469,40	469,40	847,10	1225,00	1225,00	847,10	534,20
G-C-del	25	52,50	148,70	**347,70** [f]	800,30	1260,00	472,70	384,80
G-C-ins	28	22,00	54,60	**80,80** [g, h]	125,30	498,30	120,80	121,40
G-G-del	7	46,20	52,60	145,90	391,20	476,90	221,40	186,10
G-T-ins	1	31,30	31,30	31,30	31,30	31,30	31,30	0,00
Nieprawidłowe parametry nasienia								
A-C-del	47	132,70	365,40	**650,00** [i, j, k, l, m]	1228,00	1260,00	688,60	392,00
A-C-ins	50	31,700	97,30	**261,70** [n, o]	772,50	1260,00	455,10	425,70
A-G-del	5	132,7	233,40	**395,30** [p, q]	744,30	747,90	470,10	268,50
A-T-del	1	594,90	594,90	594,90	594,90	594,90	594,90	0,00
G-C-del	47	45,70	150,60	**351,50** [r, s]	886,90	1260,00	509,80	432,50
G-C-ins	70	15,00	35,10	**67,50** [t]	125,50	461,00	102,30	93,40
G-G-del	21	31,70	69,50	200,70	255,70	518,70	190,40	140,70
G-T-ins	3	79,70	79,70	178,80	258,30	258,30	172,30	89,50
Astenozoospermia								
A-C-del	21	395,30	441,50	**820,20** [u, v, w]	1228,00	1260,00	808,40	336,90
A-C-ins	15	31,70	90,00	**246,40** [x]	995,60	1260,00	457,20	476,90
A-G-del	1	395,30	395,30	395,30	395,30	395,30	395,30	0,00
G-C-del	12	77,40	109,80	**475,80** [y]	1212,00	1260,00	620,40	507,30
G-C-ins	20	26,60	31,80	**53,00** [z]	88,00	461,00	94,90	109,40
G-G-del	7	31,70	90,00	209,90	265,00	481,80	205,10	149,50
G-T-ins	2	79,7	79,70	169,00	258,30	258,30	169,00	126,30
Teratozoospermia								
A-C-del	39	132,70	365,40	**666,60** [aa, ab, ac, ad]	1255,00	1260,00	720,30	411,50
A-C-ins	37	39,40	87,80	**233,10** [ae]	898,50	1260,00	479,90	464,50
A-G-del	5	132,70	233,40	395,30 [af, ag]	744,30	747,90	470,10	268,50
G-C-del	35	45,70	166,00	365,40 [ah, ai]	995,60	1260,00	558,80	460,90
G-C-ins	55	15,00	31,80	59,20 [aj, ak]	113,90	291,60	80,50	71,80
G-G-del	16	39,40	66,40	105,40	241,00	518,70	182,20	150,80
G-T-ins	3	79,70	79,70	178,80	258,30	258,30	172,30	89,50

Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del; normozoospermia – całkowita liczba plemników w nasieniu oraz odsetek plemników o postępującej ruchliwości i prawidłowej morfologii jest równy lub wyższy od wartości referencyjnych; nieprawidłowe parametry nasienia – przynajmniej jeden parametr nasienia jest niższy od wartości referencyjnych; astenozoospermia – liczba plemników o prawidłowej ruchliwości w nasieniu jest poniżej wartości

referencyjnych; teratozoospermia – liczba plemników prawidłowych morfologicznie w nasieniu jest poniżej wartości referencyjnych; wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya.

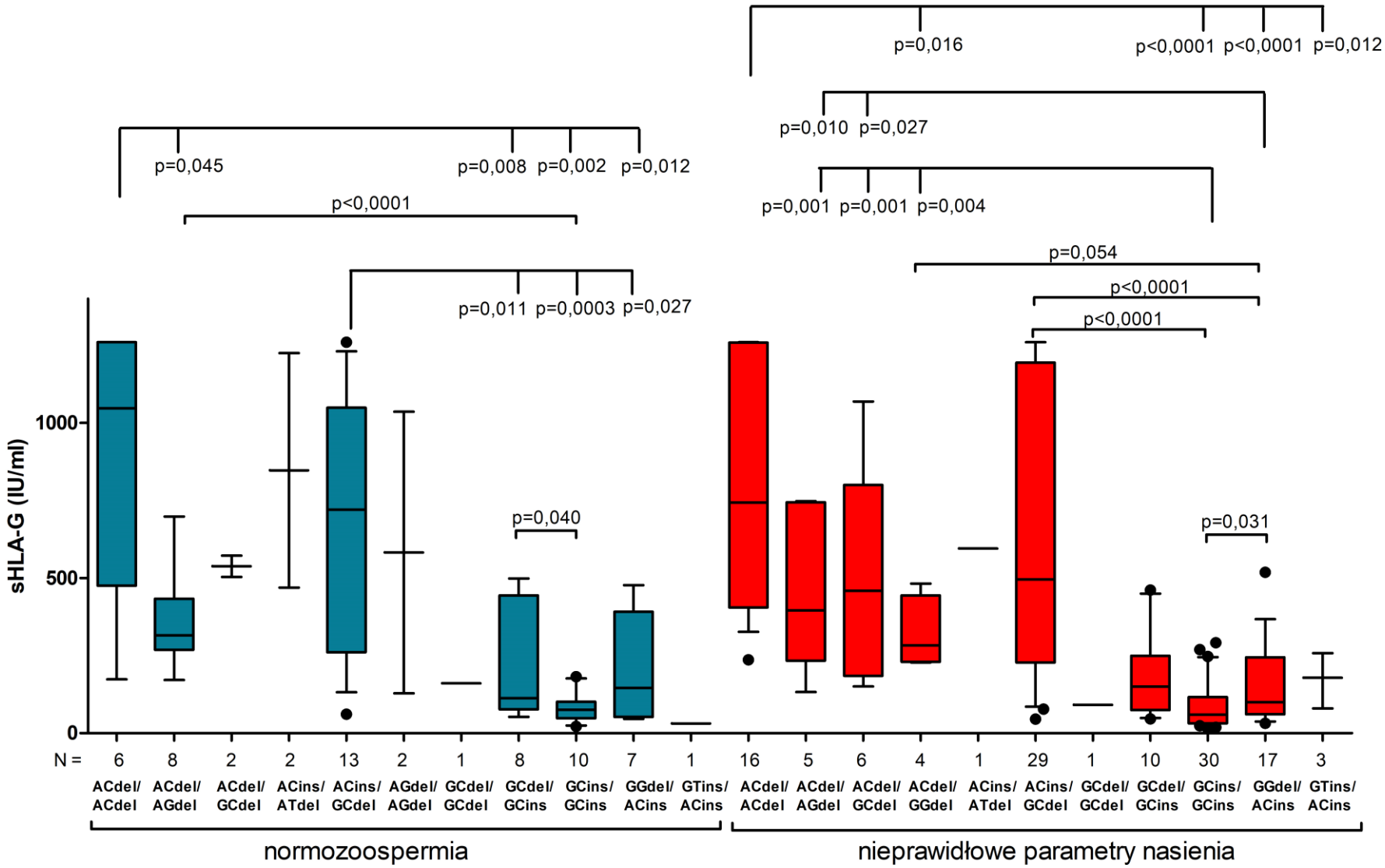
Normozoospermia *vs.* normozoospermia: [a]p=0,051 A-C-del *vs.* G-C-del; [b]p<0,0001 A-C-del *vs.* G-C-ins; [c]p=0,009 A-C-del *vs.* G-G-del; [d]p=0,0004 A-C-ins *vs.* G-C-ins; [e]p<0,0001 A-G-del *vs.* G-C-ins; [f]p<0,0001 G-C-del *vs.* G-C-ins;
Normozoospermia *vs.* teratozoospermia: [g]p=0,009 G-C-ins *vs.* G-C-ins;
Normozoospermia *vs.* astenozoospermia: [h]p=0,058 G-C-ins *vs.* G-C-ins;
Nieprawidłowe parametry nasienia *vs.* nieprawidłowe parametry nasienia: [i]p=0,001 A-C-del *vs.* A-C-ins; [j]p=0,010 A-C-del *vs.* G-C-del; [k]p<0,0001 A-C-del *vs.* G-C-ins; [l]p<0,0001 A-C-del *vs.* G-G-del; [m]p=0,014 A-C-del *vs.* G-T-ins; [n]p<0,0001 A-C-ins G-C-ins; [o]p=0,023 A-C-ins *vs.* G-G-del; [p]p=0,001 A-G-del *vs.* G-C-ins; [q]p=0,016 A-G-del *vs.* G-G-del; [r]p<0,0001 G-C-del *vs.* G-C-ins; [s]p=0,005 G-C-del *vs.* G-G-del; [t]p=0,004 G-C-ins *vs.* G-G-del;
Astenozoospermia *vs.* astenozoospermia: [u]p=0,010 A-C-del *vs.* A-C-ins; [v]p<0,0001 A-C-del *vs.* G-C-ins; [w]p=0,0003 A-C-del *vs.* G-G-del; [x]p=0,0006 A-C-ins *vs.* G-C-ins; [y]p=0,0001 G-C-del *vs.* G-C-ins; [z]p=0,0329 G-C-ins *vs.* G-G-del;
Teratozoospermia *vs.* teratozoospermia: [aa]p=0,006 A-C-del *vs.* A-C-ins; [ab]p<0,0001 A-C-del *vs.* G-C-ins; [ac]p<0,0001 A-C-del *vs.* G-G-del; [ad]p=0,014 A-C-del *vs.* G-T-ins; [ae]p<0,0001 A-C-ins *vs.* G-C-ins; [af]p=0,001 A-G-del *vs.* G-C-ins; [ag]p=0,019 A-G-del *vs.* G-G-del; [ah]p<0,0001 G-C-del *vs.* G-C-ins; [ai]p=0,007 G-C-del *vs.* G-G-del; [aj]p=0,002 G-C-ins *vs.* G-G-del; [ak]p=0,042 G-C-ins *vs.* G-T-ins



Rycina 53. Stężenie sHLA-G w nasieniu mężczyzn o haplotypie G-C-ins.

Kolejność polimorfizmów w haplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629: insATTTGTTCATGCCT/del; kolor niebieski oznacza stężenie sHLA-G (IU/ml) u mężczyzn z normozoospermią; kolor zielony oznacza sHLA-G mężczyzn z astenozoospermią; kolor czerwony oznacza sHLA-G mężczyzn z teratozoospermią; p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba mężczyzn.

Dla większości diplotypów *HLA-G* u mężczyzn nie można było wnioskować, jakie było stężenie sHLA-G, ponieważ liczba testowanych mężczyzn była zbyt mała (**Rycina 54**). Zaobserwowane różnice dotyczyły diplotypów mężczyzn z normozoospermią i mężczyzn z nieprawidłowymi parametrami nasienia, ale pomiędzy normozoospermią a nieprawidłowymi parametrami nasienia nie było różnic istotnych statystycznie (**Rycina 54 i Tabela 44**). Test Kruskala-Wallisa pokazał, że mężczyźni z nieprawidłowymi parametrami nasienia różniący się allelem insercyjnym rs371194629, wykazują istotne różnice w stężeniach sHLA-G w nasieniu w przypadku diplotypów: G-C-del/G-C-del *vs.* G-C-del/G-C-ins *vs.* G-C-ins/G-C-ins (p=0,031). Takiej istotności nie obserwowano w przypadku porównania diplotypów A-C-del/A-C-del *vs.* A-Cins/A-C-del *vs.* A-C-ins/A-C-ins.



Rycina 54. Stężenie sHLA-G w nasieniu mężczyzn w zależności od diplotypów *HLA-G* i parametrów nasienia.

Kolejność polimorfizmów w diplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del; kolor niebieski oznacza stężenie sHLA-G (IU/ml) mężczyzn z normozoospermią; czerwony – u mężczyzn z nieprawidłowymi parametrami nasienia; p – istotność statystyczna wyznaczona testem Manna-Whitneya; granice pudełek na wykresie pokazują pierwszy i trzeci kwartyl; odcinki poziome wewnątrz pudełek wskazują na medianę; końce wąsów wyznaczają 10-90 percentyl; N – liczba mężczyzn.

Tabela 44. Stężenie sHLA-G w nasieniu mężczyzn w zależności od diplotypów *HLA-G* i parametrów nasienia – statystyka opisowa.

Diplotypy	Liczba mężczyzn	sHLA-G (IU/ml)						
		Minimum	25 percentyl	Mediana	75 percentyl	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
Normozoospermia								
ACdel/ACdel	6	173,90	475,30	1047,00 [a, b, c, d]	1260,00	1260,00	893,80	440,50
ACdel/AGdel	8	171,30	268,70	315,20 [e]	433,40	697,90	356,80	160,30
ACdel/GCdel	2	503,20	503,20	537,90	572,50	572,50	537,90	49,00
ACins/ATdel	2	469,40	469,40	847,10	1225,00	1225,00	847,10	534,20
ACins/GCdel	13	61,30	260,70	720,10 [f, g, h]	1049,00	1260,00	666,70	417,60
AGdel/AGdel	2	128,30	128,30	582,20	1036,00	1036,00	582,20	641,90
GCdel/GCdel	1	160,60	160,60	160,60	160,60	160,60	160,60	0,00
GCdel/GCins	8	52,50	76,80	112,50 [i]	444,10	498,30	219,20	190,00
GCins/GCins	10	22,00	48,20	75,70	101,50	181,90	81,50	45,40
GGdel/ACins	7	46,20	52,60	145,90	391,20	476,90	221,40	186,10
GTins/ACins	1	31,30	31,30	31,30	31,30	31,30	31,30	0,00
Nieprawidłowe parametry nasienia								
ACdel/ACdel	16	236,90	405,50	743,40 [j, k, l, m]	1259,00	1260,00	802,90	393,20
ACdel/AGdel	5	132,70	233,40	395,30 [n, o]	744,30	747,90	470,10	268,50
ACdel/GCdel	6	150,60	184,80	459,40 [p, q]	800,00	1069,00	507,50	374,30
ACdel/GGdel	4	227,90	229,80	282,80 [r, s]	443,90	481,80	318,80	118,20
ACins/ATdel	1	594,90	594,90	594,90	594,90	594,90	594,90	0,00
ACins/GCdel	29	45,70	228,00	495,90 [t, u]	1194,00	1260,00	652,50	452,00
GCdel/GCdel	1	91,10	91,10	91,10 [v]	91,10	91,10	91,10	0,00
GCdel/GCins	10	46,50	75,10	149,70	249,50	461,00	180,90	134,00
GCins/GCins	30	15,00	32,10	59,60 [w]	116,70	291,60	89,20	79,60
GGdel/ACins	17	31,70	61,10	99,80	244,60	518,70	160,10	130,50
GTins/ACins	3	79,70	79,70	178,80	258,30	258,30	172,30	89,50
Astenozoospermia								
ACdel/ACdel	9	399,30	525,60	820,20 [x, y]	1244,00	1260,00	835,00	345,70
ACdel/AGdel	1	395,30	395,30	395,30 [z, aa]	395,30	395,30	395,30	0,00
ACdel/GCdel	1	1069,00	1069,00	1069,00	1069,00	1069,00	1069,00	0,00
ACdel/GGdel	1	481,80	481,80	481,80	481,80	481,80	481,80	0,00
ACins/GCdel	7	77,36	222,90	995,60	1260,00	1260,00	795,20	520,30
GCdel/GCdel	1	91,11	91,11	91,11	91,11	91,11	91,11	0,00
GCdel/GCins	2	166,00	166,00	313,50	461,00	461,00	313,50	208,60
GCins/GCins	9	26,62	31,39	45,99	80,30	247,40	70,62	69,60
GGdel/ACins	6	31,65	75,44	160,40	251,00	265,00	159,00	94,61
GTins/ACins	2	79,74	79,74	169,00	258,30	258,30	169,00	126,30
Teratozoospermia								
ACdel/ACdel	12	365,40	434,80	1024,00 [ab, ac, ad, ae, af, ag]	1260,00	1260,00	892,60	396,60
ACdel/AGdel	5	132,70	233,40	395,30 [ah, ai, aj]	744,30	747,90	470,10	268,50
ACdel/GCdel	6	150,60	184,80	459,40 [ak, al]	800,00	1069,00	507,50	374,30
ACdel/GGdel	4	227,90	229,80	282,80 [am, an, ao]	443,90	481,80	318,80	118,20
ACins/GCdel	22	45,71	211,90	776,90 [ap, aq ar]	1260,00	1260,00	709,10	473,00

GCdel/GCins	7	46,48	74,27	**133,30** [as]	201,30	215,50	130,30	66,79
GCins/GCins	24	15,00	31,18	**46,21** [at, au]	77,03	291,60	73,23	70,91
GGdel/ACins	12	39,35	59,95	86,06	178,30	518,70	136,60	134,60
GTins/ACins	3	79,74	79,74	178,80	258,30	258,30	172,30	89,47

Kolejność polimorfizmów w diplotypie: rs1632947:964G>A; rs1233334:725G>C/T; rs371194629:insATTTGTTCATGCCT/del; normozoospermia – całkowita liczba plemników w nasieniu oraz odsetek plemników o postępującej ruchliwości i prawidłowej morfologii jest równy lub wyższy od wartości referencyjnych; nieprawidłowe parametry nasienia – przynajmniej jeden parametr nasienia jest niższy od wartości referencyjnych; astenozoospermia – liczba plemników o prawidłowej ruchliwości w nasieniu jest poniżej wartości referencyjnych; teratozoospermia – liczba plemników prawidłowych morfologicznie w nasieniu jest poniżej wartości referencyjnych; wartości p wyznaczono stosując test Manna-Whitneya.

Normozoospermia *vs.* normozoospermia: [a]p=0,045 A-C-del/A-C-del *vs.* A-C-del/A-G-del; [b]p=0,008 A-C-del/A-C-del *vs.* G-C-del/G-C-ins; [c]p=0,002 A-C-del/A-C-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [d]p=0,012 A-C-del/A-C-del *vs.* G-G-del/A-C-ins; [e]p<0,0001 A-C-del/A-G-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [f]p=0,011 A-C-ins/G-C-del *vs.* G-C-del/G-C-ins; [g]p=0,0003 A-C-ins/G-C-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [h]p=0,027 A-C-ins/G-C-del *vs.* G-G-del/A-C-ins; [i]p=0,040 G-C-del/G-C-ins *vs.* G-C-ins/G-C-ins;
Nieprawidłowe parametry nasienia *vs.* nieprawidłowe parametry nasienia: [j]p=0,016 A-C-del/A-C-del *vs.* A-C-del/G-G-del; [k]p<0,0001 A-C-del/A-C-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [l]p<0,0001 A-C-del/A-C-del *vs.* G-G-del/A-C-ins; [m]p=0,012 A-C-del/A-C-del *vs.* G-T-ins/A-C-ins; [n]p=0,001 A-C-del/A-G-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [o]p=0,010 A-C-del/A-G-del *vs.* G-G-del/A-C-ins; [p]p=0,001 A-C-del/G-C-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [q]p=0,027 A-C-del/G-C-del *vs.* G-G-del/A-C-ins; [r]p=0,004 A-C-del/G-G-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [s]p=0,054 A-C-del/G-G-del *vs.* G-G-del/A-C-ins; [t]p<0,0001 A-C-ins/G-C-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [u]p<0,0001 A-C-ins/G-C-del *vs.* G-G-del/A-C-ins; [w]p=0,031 G-C-ins/G-C-ins *vs.* G-G-del/A-C-ins;
Nieprawidłowe parametry nasienia: [v]p=0,0313 G-C-del/G-C-del *vs.* G-C-del/G-C-ins *vs.* G-C-ins/G-C-ins *vs.* (test Kruskala-Wallisa);
Astenozoospermia *vs.* astenozoospermia: [x]p=0,0004 A-C-del/A-C-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [y]p=0,002 A-C-del/A-C-del *vs.* G-G-del/A-C-ins; [z]p=0,003 A-C-ins/G-C-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [aa]p=0,053 A-C-ins/G-C-del *vs.* G-G-del/A-C-ins;
Teratozoospermia *vs.* teratozoospermia: [ab]p=0,050 A-C-del/A-C-del *vs.* A-C-del/A-G-del; [ac]p=0,012 A-C-del/A-C-del *vs.* A-C-del/G-G-del; [ad]p=0,0004 A-C-del/A-C-del *vs.* G-C-del/G-C-ins; [ae]p<0,0001 A-C-del/A-C-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [af]p<0,0001 A-C-del/A-C-del *vs.* G-G-del/A-C-ins; [ag]p=0,011 A-C-del/A-C-del *vs.* G-T-ins/A-C-ins; [ah]p=0,030 A-C-del/A-G-del *vs.* G-C-del/G-C-ins; [ai]p=0,001 A-C-del/A-G-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [aj]p=0,010 A-C-del/A-G-del *vs.* G-G-del/A-C-ins; [ak]p=0,022 A-C-del/G-C-del *vs.* G-C-del/G-C-ins; [al]p=0,010 A-C-del/G-C-del *vs.* G-G-del/A-C-ins; [am]p=0,006 A-C-del/G-G-del *vs.* G-C-del/G-C-ins; [an]p=0,004 A-C-del/G-G-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [ao]p=0,034 A-C-del/G-G-del *vs.* G-G-del/A-C-ins; [ap]p=0,003 A-C-ins/G-C-del *vs.* G-C-del/G-C-ins; [aq]p<0,0001 A-C-ins/G-C-del *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [ar]p=0,0004 A-C-ins/G-C-del *vs.* G-G-del/A-C-ins; [as]p=0,013 G-C-del/G-C-ins *vs.* G-C-ins/G-C-ins; [at]p=0,026 G-C-ins/G-C-ins *vs.* G-G-del/A-C-ins; [au]p=0,041 G-C-ins/G-C-ins *vs.* G-T-ins/A-C-ins

Podsumowując tę część wyników: mężczyźni z kontroli płodnej oraz mężczyźni IVF różnili się profilem haplotypów i diplotypów *HLA-G*. Dodatkowo obserwowano różnice w częstości badanych polimorfizmów *HLA-G* między mężczyznami z prawidłowymi oraz nieprawidłowymi i obniżonymi parametrami nasienia. Stężenie sHLA-G w nasieniu było odmienne w zależności od haplotypów i diplotypów *HLA-G* zarówno u mężczyzn z normozoospermią, jak i z nieprawidłowymi parametrami nasienia. Największe zaobserwowane różnice dotyczyły haplotypu G-C-ins, którego obecność związana była z niższym wydzielaniem sHLA-G w nasieniu w porównaniu do innych haplotypów.

5. Dyskusja

Obecnie niepłodność dotyczy 15% par w wieku reprodukcyjnym [7, 8, WHO[4]]. Uważa się, że jest to znaczny problem nie tylko medyczny, ale także społeczny na skalę globalną. Jego konsekwencją jest spadek urodzeń i spadek przyrostu naturalnego. Według europejskiej organizacji Fertility Europe, ponad 25 mln par w Europie jest niepłodnych (European Atlas of Fertility Treatment Policies[5]). Polskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu i Embriologii ocenia, że w Polsce niepłodnych par jest około 1,2 mln [11]. Kobiety coraz później zachodzą w ciążę. Średni wiek kobiet rodzących pierwsze dziecko wynosi 29 lat (GUS[6]), co również opóźnia diagnostykę niepłodności i leczenie. W 60-85% przypadków udaje się znaleźć przyczynę niepłodności, jednak w pozostałych 15% do nawet 50% niepłodność określana jest jako idiopatyczna [267-271]. Światowa Organizacja Zdrowia uznaje leczenie niepłodności i badanie jej przyczyn za niezbędne dla zdrowia reprodukcyjnego. Jedną z najskuteczniejszych metod leczenia niepłodności jest zapłodnienie pozaustrojowe. Pary, które mają problemy z zajściem w ciążę, decydują się na zapłodnienie *in vitro* najczęściej w ostatniej kolejności, po wykorzystaniu wszystkich innych możliwych metod leczenia. Pomimo tego, że IVF daje szansę na urodzenie dziecka, w wielu przypadkach transfery zapłodnionego zarodka kończą się niepowodzeniem. Kilkukrotne próby zajścia w ciążę poprzez IVF, wielokrotne transfery zarodków i pobieranie komórek jajowych są dla pacjentów kosztowne, a także psychicznie i fizycznie obciążające. Patogeneza nawracających niepowodzeń implantacji zarodka (RIF) jest niejasna i wieloczynnikowa. Przyczyną mogą być zarówno czynniki żeńskie, jak i męskie, między innymi: nieprawidłowości i słaba receptywność endometrium, zaburzenia hormonalne i metaboliczne, aberracje chromosomowe. Znaczenie ma również jakość komórek jajowych oraz jakość nasienia. Jednak wciąż w wielu przypadkach przyczyny RIF pozostają niewyjaśnione. Dlatego szczególnie istotne jest poszukiwanie tych przyczyn, aby ułatwić diagnostykę i wyjaśnienie patomechanizmu RIF.

W prawidłowej implantacji zarodka, coraz większe znaczenie przypisuje się czynnikom immunologicznym [87, 90, 272]. Komórki NK, które znajdują się w macicy pełnią kluczową rolę w implantacji zarodka. Kontrolują inwazję trofoblastu i przebudowę tętniczek spiralnych macicy [106, 107]. Pośredniczą w utrzymaniu tolerancji immunologicznej matki wobec płodu,

[4] Dostępne na oficjalnej stronie WHO pod adresem: https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab_1 (data wejścia: 16.02.2022 r.)
[5] Dostępne w sieci pod adresem: https://fertilityeurope.eu/european-atlas-of-fertility-treatment-policies/ (data wejścia: 16.02.2022 r.)
[6] Dostępne w sieci pod adresem: https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/ludnosc/ludnosc/struktura-ludnosci,16,1.html, tablica „Dzietność kobiet w latach 1960-2020" (data wejścia: 16.02.2022 r.)

wchodząc w interakcje z ligandami HLA znajdującymi się na trofoblaście, przy zachowaniu cytotoksyczności wobec infekcji. Przede wszystkim maciczne komórki NK wydzielają cytokiny, czynniki wzrostowe i angiogenne, niezbędne do prawidłowego rozwoju płodu, a ich funkcja zależna jest od receptorów znajdujących się na ich powierzchni [116-118]. Receptory KIR są najbardziej zmiennymi receptorami macicznych komórek NK. Zmienność ta wynika nie tylko z liczby kodujących je genów, ale także z polimorfizmu haplotypowego i allelicznego *KIR* [273, 274]. Badania nad polimorficznymi genami *KIR*, jak również ich ligandami *HLA-C*, które także są zmienne, są zatem zasadne w kontekście ciąży i RIF.

Pomimo że rola macicznych komórek NK oraz receptorów KIR i poszukiwanie ich związku z prawidłowym rozwojem płodu oraz różnymi komplikacjami ciąży stanowią coraz większe zainteresowanie badaczy, niewiele jest publikacji odnośnie związku genów *KIR* i nawracających niepowodzeń implantacji po *in vitro*. Istnieją jednak publikacje, w których autorzy przedstawiają rolę genów *KIR* w nawracających poronieniach, preeklampsji i wewnątrzmacicznym zahamowaniu wzrostu płodu (ang. *intrauterine growth restriction* – IUGR) [275-279]. Różnorodność matczynych KIR oraz HLA-C zlokalizowanych na trofoblaście sprawia, że niektóre kombinacje mogą być bardziej korzystne dla implantacji zarodka i utrzymania ciąży ze względu na sygnał, jaki otrzymuje komórka NK.

Polimorfizmy KIR i HLA-C

W pierwszym etapie badań własnych, w którym sprawdzano częstości poszczególnych genów *KIR*, nie wykazano ich związku z RIF lub niepłodnością. Podobnie Vargas i wsp. (2009) nie odnotowali różnic w częstościach poszczególnych genów *KIR* pomiędzy pacjentkami dotkniętymi nawracającymi poronieniami i kontrolą [277]. Należy podkreślić, że badania te dotyczyły poronień po zapłodnieniu naturalnym. Akbari i wsp. (2019) w swojej metaanalizie pokazali badania innych naukowców zajmujących się analizą genów *KIR* w poronieniach po zapłodnieniu naturalnym [280]. Gen *KIR3DL1* miał efekt ochronny, a *KIR2DS2* i *KIR2DS3* związane były z ryzykiem poronienia, jednak po korekcie żaden z wyników nie zachował istotności [281]. Wang i wsp. (2007) znaleźli związek genu *KIR2DS1* z ryzykiem poronienia w populacji chińskiej, co kontrastowało z wynikami Hiby i wsp. (2008) przeprowadzonymi na populacji kaukaskiej, gdzie *KIR2DS1* wykazywał efekt ochronny [275, 282]. W badaniach własnych rozpatrując kombinacje z *HLA-C* u kobiet, wykazano związek genów *KIR* w regionie telomerycznym AA w kombinacji z *HLA-C* C2C2 z niepłodnością oraz z RIF. Wobec tego ważny jest raczej układ wielu genów *KIR*, a nie poszczególne geny. Taką zależność

obserwowano również u kobiet, które oprócz wspomnianej wyżej kombinacji posiadały także geny *KIR* z regionu centromerycznego AA lub centromerycznego AB. Niestety wyniki wskazywały na mniejszą istotność niż Tel AA/C2C2, a po korekcie Bonferroniego straciły istotność. Powodem może być zbyt mała liczba przebadanych kobiet, po zwiększeniu grupy badanej być może istotności dotyczące kobiet Cen AA/Tel AA/C2C2 i Cen AB/Tel AA/C2C2 byłyby zachowane. Obliczono, że aby moc testu była na poziomie 80%, całkowita liczba kobiet posiadających geny *KIR* z układu Cen AA/Tel AA powinna wynosić 404, podczas gdy w rzeczywistości wynosi 77 dla kobiet z RIF i 110 dla kobiet z kontroli (**Suplement**, **Tabela 2S**). Należałoby zatem przebadać 330 kobiet posiadających układ genów *KIR* Cen AB/Tel AA, aby osiągnąć moc testu na poziomie 80%.

W regionie telomerycznym A znajdują się takie geny *KIR* jak: *KIR2DL4, KIR3DL1, KIR2DS4* i *KIR3DL2*. Dwa z nich – *KIR2DL4* i *KIR3DL2* – to geny „*framework*", stanowiące początek i koniec regionu telomerycznego [169]. Receptor KIR3DL1 nie spełnia funkcji w odniesieniu do prawidłowej implantacji i rozwoju zarodka, ponieważ ligandami dla niego są cząsteczki HLA-A i HLA-B, które są nieobecne na trofoblaście. Jedyny gen kodujący receptor aktywujący KIR2DS4 występuje w 80% populacji polskiej w formie delecyjnej kodującej białko rozpuszczalne, a nie związane z błoną [283]. Brak jest zatem genów aktywujących w regionie telomerycznym haplotypu A, włącznie z *KIR2DS1*, który jest obecny w regionie telomerycznym haplotypu B, w związku z tym pacjentki posiadające kombinację Cen AA/Tel AA oraz Cen AB/Tel AA, również nie miały genu *KIR2DS1*. Brak genów dla receptorów aktywujących oznacza brak aktywacji komórek NK do wydzielania cytokin i czynników wzrostowych niezbędnych do prawidłowego rozwoju płodu. Xiong i wsp. (2013) pokazali w swoich badaniach, że czynnik GM-CSF, ale także IFN-γ oraz chemokiny XCL2 i CCL3L3, które promują inwazję trofoblastu, były wydzielane pod wpływem doczesnowych komórek NK pozytywnych pod względem *KIR2DS1* i komórek docelowych posiadających cząsteczkę HLA-C2 [284]. Wzmacniało to migrację pierwotnych komórek trofoblastu, więc badania te podkreśliły jak bardzo korzystna dla tworzenia łożyska jest interakcja KIR2DS1-HLA-C2. W badaniach Hiby i wsp. (2010) wykazano, że obecność genu *KIR2DS1* w haplotypie B zapewnia ochronę przed zaburzeniami ciąży, takimi jak nawracające poronienia, preeklampsja czy wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu [279]. Dodatkowo potwierdzono, że z występowaniem zaburzeń ciąży związana była większa częstość genotypu *KIR* AA u kobiet w porównaniu do kobiet kontrolnych. Ponadto we wszystkich grupach badanych, w których kobiety doświadczały zaburzeń ciąży, zarówno matka, jak i płód posiadali większą częstość

HLA-C2 w porównaniu do grupy kontrolnej. To sugeruje, że u kobiet z genotypem *KIR* AA zachodzi większe ryzyko komplikacji ciąży, zwłaszcza, gdy płód posiadał grupę *HLA-C2*.

Alecsandru i wsp. (2014) odnotowali, że najwyższy wskaźnik wczesnych poronień po transferze dwóch zarodków – w którym wykorzystano własne komórki jajowe pacjentki – występował u pacjentek z genotypem *KIR* AA (22,8%), a w następnej kolejności u pacjentek z genotypem *KIR* AB (16,7%), w porównaniu do kobiet *KIR* BB (11,1%) [285]. Kobiety, które miały transfer dwóch zarodków powstałych z komórek jajowych dawczyń i dodatkowo posiadały genotyp *KIR* AA, miały także znacznie zmniejszony wskaźnik żywych urodzeń dziecka po zapłodnieniu *in vitro* w porównaniu do kobiet z *KIR* AB i *KIR* BB. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach poronienia i brak ciąży zdarzały się również częściej u pacjentek z genotypem *KIR* AA (63,0%), następnie u pacjentek z genotypem *KIR* AB (59,7%) w stosunku do pacjentek z *KIR* BB (45,5%), jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Należy podkreślić, że w badanich własnych transferowane zarodki pochodziły z komórek jajowych pacjentek, a nie pochodzących od dawczyń. Pacjentki o genotypie *KIR* AA, podobnie jak w pracy Alecsandru, miały niższy wskaźnik żywych urodzeń niż kobiety o pozostałych genotypach *KIR* Bx (**podrozdział 4.1.1**). W 2020 roku ci sami badacze opublikowali pracę, w której przebadali kobiety, ich partnerów, dawców nasienia lub dawczynie komórek jajowych pod względem *HLA-C* [286]. Na tej podstawie oszacowano teoretyczną liczbę dodatkowych alleli *HLA-C2* zarodka względem matki, aby sprawdzić jakie mogą być skutki nadmiernej obecności alleli *HLA-C2* w macicy. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem liczby alleli *HLA-C2* zarodka u pacjentek z *KIR* AA po zapłodnieniu *in vitro* znacząco wzrastało ryzyko poronień i zmniejszał się wskaźnik żywych urodzeń. Badania te pokazały, że matczyny genotyp *KIR* i płodowy genotyp *HLA-C* mają wpływ na wskaźnik żywych urodzeń po zapłodnieniu *in vitro*, szczególnie po transferze do macicy dwóch zarodków oraz wtedy, gdy komórki jajowe pochodziły z dawstwa. Autorzy tłumaczą ten efekt właśnie zwiększoną ekspresją HLA-C2 zarodka, który jest w pełni obcy dla matki, a nie semialogeniczny, tak jak w przypadku naturalnego zapłodnienia. Wszczepienie dwóch zarodków zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia przynajmniej jednej cząsteczki HLA-C2 na zarodku. Wzrasta więc ryzyko większego hamowania komórek NK matki, niż gdyby kobieta otrzymała własny pojedynczy zarodek. Badania sugerują, że powinno się raczej wykonywać transfer pojedynczego zarodka z własnej komórki jajowej i plemników znanego pod względem *HLA-C* partnera.

Podsumowując: posiadanie przez matkę genów *KIR* z haplotypu A jest niekorzystne dla implantacji zarodka, ponieważ po rozpoznaniu ligandu jakim jest HLA-C2 na trofoblaście

receptory KIR kodowane przez te geny będą hamować komórki NK. Wskutek tego nie będą wydzielane cytokiny i czynniki wzrostu niezbędne do rozwoju łożyska. Ryzyko komplikacji ciąży będzie jeszcze większe, jeśli zarodek odziedziczy *HLA-C2* po ojcu. Niestety badania własne tego nie potwierdzają. Nie udało się uzyskać istotnych różnic, gdy kobieta posiadała genotyp *KIR* AA, a partner był nosicielem allotypu *HLA-C2*.

Natomiast geny *KIR* w regionie telomerycznym BB u kobiet w kombinacji z genami *HLA-C1C2* partnera, występowały częściej w kontroli płodnej oraz w grupie SIVF niż w grupie RIF. Co więcej układ, gdy kobieta posiadała genotyp BB (miała geny *KIR* Cen BB/Tel BB) w kombinacji z genotypem *HLA-C1C2* partnera, nie występował w ogóle u osób z grupy RIF. Posiadanie przez kobietę heterozygotycznego układu Cen AB/Tel AB, gdy partner był heterozygotą pod względem *HLA-C1C2* sprzyjało zajściu w ciążę po zapłodnieniu *in vitro* (**Suplement**, **Tabela 17S**). Tak jak wcześniej wspomniano, genotyp *KIR* AA matki stanowi czynnik ryzyka, gdy płód posiada allel *HLA-C2*, gdyż może dojść do silnego hamowania komórek NK. Dzieje się tak, ponieważ KIR2DL1 wiąże się z epitopem HLA-C2, a ich interakcja jest silniejsza niż interakcja KIR2DL2 lub KIR2DL3 z HLA-C1 [287, 288]. Z kolei, odwrotna sytuacja zachodzi u kobiet posiadających genotyp Bx (BB lub AB). Haplotyp B charakteryzuje się występowaniem w większości genów dla aktywujących KIR. Nawet jeśli zarodek odziedziczy HLA-C2 po ojcu, to silne hamowanie, które wynika z interakcji KIR2DL1 i HLA-C2, zostanie zrównoważone poprzez sygnały aktywujące pochodzące z receptorów aktywujących KIR, co będzie skutkowało lepszą inwazją trofoblastu. Zamiast KIR2DL1, z cząsteczką HLA-C2 może połączyć się KIR2DS1 (który jest częsty w populacji polskiej, ok 50%) [289]. Jednakże to receptor hamujący ma większe powinowactwo do ligandu niż KIR2DS1 [137]. Wszystko zależy od tego, jaki receptor ulegnie ekspresji na powierzchni komórki. Oprócz receptorów KIR na powierzchni komórek NK znajdują się też inne receptory o funkcji aktywującej lub hamującej takie jak: CD94/NKG2, NKG2D oraz naturalnie cytotoksyczne NCRs (NKp30, NKp46, NKp44) [290].

Hiby i wsp. (2004) opisali podobny efekt w odniesieniu do preeklampsji [287]. Im więcej kobieta posiadała genów dla receptorów aktywujących KIR, tym mniejszą miała szansę, że wystąpi u niej stan przedrzucawkowy. Przeciwną zależność opisał Wang i wsp. (2007), gdy większa częstość genów aktywujących, takich jak *KIR2DS1* i *KIR2DS5* związany była z nawracającymi poronieniami po zapłodnieniu naturalnym, jednak badania te były przeprowadzone na populacji Chińczyków, którzy mają odmienny repertuar KIR w porównaniu do populacji europejskiej [282, 291]. Badacze tłumaczą to tym, że zbyt duża aktywacja komórek NK spowodowana zwiększoną liczbą receptorów aktywujących może prowadzić do

wzrostu cytotoksyczności, co w konsekwencji może być szkodliwe dla trofoblastu i prowadzić do poronienia. Jednak jak wskazują doniesienia, komórki NK w prawidłowej ciąży nie są cytotoksyczne, a ich funkcja jest przekierowana na produkcję cytokin i czynników wzrostowych promujących rozwój ciąży poprzez regulację inwazji trofoblastu, angiogenezę i przebudowę tętniczek spiralnych w macicy [292].

Badania własne pokazały również, że mężczyźni przystępujący do procedury IVF różnią się profilem genów *KIR* od mężczyzn płodnych, którzy mają urodzone dzieci z zapłodnienia naturalnego. Inaczej niż u kobiet, poszczególne geny *KIR* mężczyzn wykazywały efekt ochronny lub predysponujący w odniesieniu do niepłodności i występowania RIF u par. W kombinacjach genów *KIR* i *HLA-C* u mężczyzn również odnotowano istotne zależności, jednak straciły one znaczenie po zastosowaniu korekty Bonferroniego. Łącznie przebadano 813 mężczyzn, co stanowiło dość dużą grupę, wystarczającą do analizy zależności pomiędzy genami *KIR*. Badania te po raz pierwszy na świecie dowiodły związku genów *KIR* partnerów kobiet przystępujących do *in vitro* z niepłodnością pary. Istnieje jedna praca ukazująca potencjalną rolę genów *KIR* we wnętrostwie u mężczyzn [293]. Wnętrostwo, inaczej niezstąpienie jąder, to stan, w którym jądra, które powinny schodzić na dno moszny, pozostają w niewłaściwym miejscu, np. w jamie brzusznej. Jest to jedna z najczęstszych patologii we wczesnym dzieciństwie u mężczyzn. Geny *KIR2DL2* i *KIR2DS2* przypuszczalnie mogły chronić przed wnętrostwem [293]. Jednak ograniczeniem w tych badaniach była stosunkowo mała liczba przebadanych chłopców w okresie przedpokwitaniowym z wnętrostwem (n=109) oraz młodych mężczyzn kontrolnych (n=136).

Na podstawie wyników badań własnych, najsilniejsze związki z RIF i niepłodnością wskazano dla genów aktywujących *KIR2DS2* i *KIR2DS3*, które były częstsze u mężczyzn IVF i RIF niż u mężczyzn z kontroli płodnej (**Tabela 13**). Geny *KIR2DL2* i *KIR2DL5* gr.2 znajdowały się również znacznie częściej u mężczyzn IVF i RIF niż u mężczyzn z kontroli, z uwagi na wysokie niezrównoważenie sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium* – LD) z ich aktywującymi odpowiednikami *KIR2DS2* i *KIR2DS5*. Pomimo że *KIR2DL2* i *KIR2DL5* gr.2 to geny hamujące, to znajdują się one w haplotypie B, gdzie jest przewaga genów aktywujących. Z kolei genotyp *KIR* AA okazał się być ochronny – jego obecność była istotnie większa u mężczyzn z kontroli płodnej niż u mężczyzn uczestniczących w zapłodnieniu *in vitro* ze swoimi partnerkami. Obserwowany efekt był zupełnie przeciwny do tego, co zaobserwowano u kobiet, gdzie geny *KIR* z regionu telomerycznego AA były predysponujące do RIF. Wyjaśnieniem tego może być hipoteza, że w czasie reakcji zapalnej w jądrach, nasieniowodach i najądrzach, aktywujące receptory KIR mogą stymulować reakcję cytotoksyczną, w której

główną rolę odgrywają komórki NK i limfocyty T. Taka sytuacja może się zdarzyć podczas infekcji układu moczowo-płciowego, która często przebiega bezobjawowo. Oddziaływanie patogenów i aktywowane procesy odpowiedzi immunologicznej mogą powodować pogorszenie spermatogenezy, niedrożność przewodu nasiennego, zakłócać żywotność plemników i wpływać na dostępność różnych składników nasienia [294-296]. Generalnie, bakteriospermie mogą obniżać jakość nasienia i upośledzać spermatogenezę [297]. Ponadto wirusy takie jak HIV, HPV i HBV mogą być internalizowane przez plemniki, przyczyniając się do uszkodzeń DNA. Ma to wpływ na liczbę plemników, ich ruchliwość i morfologię. W przypadku wirusa zapalenia wątroby (HBV), może dojść również do zapoczątkowania produkcji przeciwciał przeciwplemnikowych [296, 298]. Komórki układu odpornościowego aktywowane przez patogeny, oprócz tego, że niszczą patogeny, mogą również niszczyć własne tkanki, w tym przypadku plemniki lub tkanki biorące udział w prawidłowym rozwoju i różnicowaniu plemników. Aktywujące receptory KIR mogą wiązać się ze składnikami patogenów prezentowanych przez cząsteczki HLA klasy I. Receptory KIR, które są specyficzne dla peptydów własnych, wykazują selektywność dla peptydów pochodzących z patogenów. Krzyżowa prezentacja peptydów własnych i tych pochodzących od patogenów przez własne cząsteczki HLA, może prowadzić do autoimmunizacji. Badania Sima i wsp. (2019) pokazały, że KIR2DS4 wykazuje selektywne wiązanie z peptydem prezentowanym przez HLA-C [299]. Zidentyfikowali oni wysoce konserwatywną sekwencję peptydową w bakteryjnej rekombinazie A, która wiązała się z HLA-C*05:01 i stymulowała komórki pozytywne pod względem KIR2DS4. Na podstawie tych badań, badacze sądzą, że ponad 1000 gatunków bakterii może aktywować komórki NK właśnie przez receptor KIR2DS4 i poprzez rozpoznanie przez komórki NK konserwatywnego epitopu prezentowanego przez HLA-C*05:01. Odkrycie to może być również ważne w kontekście odpowiedzi komórek NK na infekcje wirusowe. Z badań Naiyera i wsp. (2019) wynika, że wysoce konserwatywny epitop w helikazie flawiwirusów jest prezentowany przez HLA-C*0102 i wiąże się z KIR2DS2 indukując degranulację i cytotoksyczność komórek NK [300]. Jednak należy zaznaczyć, że w przypadku naszej grupy mężczyzn infekcje na etapie starania się o dziecko były stwierdzane sporadycznie i leczono je przed zastosowaniem procedury IVF. Analiza bazy danych klinicznych wskazała również na przebycie infekcji u kilku mężczyzn, co nie wyklucza, że część mężczyzn nie mogła przejść infekcji w przeszłości w sposób bezobjawowy. Nasze wyniki dotyczące tej części badań zostały opublikowane w 2020 r. w Journal of Assisted Reproduction and Genetics (37:2007-2017) [301].

Polimorfizmy ERAP1 i ERAP2

Geny *ERAP1* i *ERAP2* kodują aminopeptydazy siateczki śródplazmatycznej, które z kolei odgrywają istotną rolę w przycinaniu peptydów, tworzących strukturalnie stabilne antygeny o odpowiednich wielkościach, wiążących się z HLA klasy I. Polimorfizmy tych genów mają wpływ na różną aktywność aminopeptydaz, w związku z tym mają wpływ na kształtowanie kompleksów HLA-antygen. Niezdolność do tworzenia prawidłowych kompleksów może skutkować brakiem odpowiedzi immunologicznej przez komórki NK i limfocyty CD8+. Tym samym, polimorfizmy *ERAP1* i *ERAP2* mogą mieć wpływ na interakcję KIR-HLA-C na styku matczyno-płodowym.

Obecnie nie ma na świecie publikacji pokazujących badania nad polimorfizmami *ERAP* i nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka. Istnieje kilka artykułów, w których badania wykazały, że różne polimorfizmy pojedynczego nukleotydu *ERAP1* i *ERAP2* są związane z ryzykiem stanu przedrzucawkowego w różnych populacjach etnicznych. Johnson i wsp. (2009) w swoich badaniach odnotowali związek genu *ERAP1* (rs3734016) oraz *ERAP2* (rs2549782) z preeklampsją w populacji australijskiej. Z kolei w populacji norweskiej, związek z preeklampsją miały: rs34750 *ERAP1* oraz 17408150 *ERAP2* [241]. W pracy Hill i wsp. (2011) zaobserwowano, że obecność allelu G polimorfizmu rs25497822 w genie *ERAP2* płodu była związana z większym ryzykiem preeklampsji u Afroamerykanek, natomiast u kobiet z Chile takiego związku nie było [240].

W niniejszej pracy pokazano, że niektóre kombinacje *ERAP, KIR* i *HLA-C* u kobiet mogą predysponować do RIF i niepłodności. Wykryte zależności dotyczyły polimorfizmów *ERAP1: rs*26653 (G>C; Arg127Pro), rs26618 (T>C; Ile276Met), rs2287987 (T>C; Met349Val) oraz *ERAP2*: rs6861666 (A>G; intron) i rs2248374 (A>G; intron). Są to pierwsze na świecie badania o tak szerokim zakresie analiz dotyczących *ERAP w* kontekście genów *KIR i HLA-C* u kobiet. Zostały one również opublikowane we Frontiers in Immunology w 2021 roku [302].

Silny efekt ochronny przed niepłodnością i RIF wykazała kombinacja genotypu GG w rs26653 *ERAP1* (G>C; Arg127Pro) z genotypem *HLA-C2C2* u kobiet, natomiast kombinacja GC/HLA-C2C2 predysponowała do RIF (**Tabela 11**). Podobny efekt dla polimorfizmu rs26653 *ERAP1* zaobserwowano u kobiet homozygotycznych pod względem *KIR* AA i *HLA-C2C2*. Polimorfizm rs26653 *ERAP1* znajduje się w miejscu połączenia domen ERAP1, dlatego bezpośrednio wpływa na jego aktywność i specyficzność do wiązania substratu, a także może zmieniać konformację enzymu na zamkniętą (katalitycznie aktywną, ale niezdolną do wiązania

substratu) lub otwartą (katalitycznie nieaktywną, ale zdolną do wiązania substratu) [219, 303]. Giastas i wsp. (2019) analizowali strukturę ERAP1 metodą krystalografii rentgenowskiej. W swojej pracy wykazali, że arginina w pozycji 127 (Arg127) znajduje się w domenie I, na powierzchni ERAP1, na końcu elastycznej pętli, która wystaje ponad kieszeń S1 specyficznie wiążącą substraty [304]. Co istotne, arginina zlokalizowana jest w pobliżu domniemanego kanału wyjściowego hydrolizowanych substratów w enzymie. Kanał ten jest położony obok kieszeni S1. Po związaniu substratu niezbędna jest zmiana konformacji z otwartej na zamkniętą, aby doszło do przycinania N-końca aminokwasu polipeptydu. Peptydy są wówczas zamknięte w wewnętrznej wnęce enzymu, a kanał wyjściowy może być powiększany (ze względu na lokalne zmiany konformacyjne), aby umożliwić uwolnienie produktów po ich przycinaniu [304]. Ze względu na lokalizację, arginina w pozycji 127 ERAP1, kodowana przez allel G, mogłaby zmniejszać elastyczność strukturalną enzymu i utrudniać przejście do aktywnej zamkniętej konformacji ERAP1. Możliwe jest więc, że genotyp GG rs26653 *ERAP1* w kombinacji z *HLA-C2C2* i *KIR* AA u kobiet powoduje słabszą aktywność enzymu oraz mniej skuteczne powstawanie peptydu antygenowego. Może to zatem prowadzić do niewłaściwej interakcji pomiędzy receptorami KIR na doczesnowych komórkach NK, a własnymi HLA-C kobiety. Wpływ matczynego *HLA-C* na doczesnowe komórki NK kobiety badał zespół Sharkey i wsp. (2015) [107]. W swojej pracy opisali zmniejszoną ekspresję KIR2DL1 na doczesnowych komórkach NK u kobiet zdrowych, które posiadały epitop HLA-C2. Zmniejszona ekspresja mogłaby oznaczać brak hamowania, za które odpowiedzialny jest m.in. KIR2DL1. Być może poprzez tworzenie niewłaściwie dopasowanych peptydów do bruzdy wiążącej w cząsteczce HLA u kobiet z genotypem rs26653 *ERAP1* GG oraz kombinacją *HLA-C2C2*/*KIR* AA, dochodzi do braku hamowania doczesnowych komórek NK, co jest korzystne w przypadku rozwoju zarodka i później płodu.

Efekt ochronny zaobserwowano w badaniach własnych również wtedy, gdy kobieta posiadała genotyp GG *ERAP1* rs26653 i była pozytywna pod względem *KIR* AA, natomiast partner był homozygotą pod względem *HLA-C2C2*. Pomimo kombinacji genotypu *KIR* AA matki i *HLA-C2C2* ojca, która prowadziłaby do silnego hamowania doczesnowych komórek NK do wydzielania cytokin i czynników wzrostowych niezbędnych do rozwoju zarodka, genotyp GG rs26653 *ERAP1* wpływał ochronnie. W związku z tym, nie zawsze genotyp *KIR* AA matki i *HLA-C2C2* ojca przesądza o niekorzystnym wpływie na implantację. Pary mające taki układ genów występowały częściej w kontroli płodnej niż w grupie pacjentów IVF (**Suplement**, **Tabela 19S**). Niestety po korekcie wyniki dotyczące związku z męskim *HLA-C*, straciły istotność. Obliczono, że aby moc testu była na poziomie 80%, całkowita liczba par

posiadających jeden z trzech genotypów *ERAP1* w miejscu rs26653 (GG, CG lub CC) oraz układ *KIR* AA kobiety/*HLA-C2C2* mężczyzny, powinna wynosić 71, a w rzeczywistości wynosi 23 dla par z grupy IVF i 14 dla par kontrolnych (**Suplement**, **Tabela 19S**).

Genotyp TT w miejscu polimorficznym rs26618 *ERAP1* (T>C; Ile276Met) w kombinacji z allelem *HLA-C2* u kobiet, okazał się być częstszy w grupie kobiet z RIF niż w kontroli, z kolei genotyp CT i CC *ERAP1* rs26618 z *HLA-C2* występował częściej w kontroli (**Tabela 11**, **Suplement**, **Tabela 4S**). Tak więc genotyp TT *ERAP1* w miejscu rs26618 działał predysponująco do niepłodności lub RIF, a genotyp CC działał ochronnie u kobiet pozytywnych pod względem *HLA-C2*.

Podobnie było w przypadku kombinacji genotypów *ERAP1* rs26618/*KIR* kobiety z *HLA-C* partnera. Słabo istotny, ale predysponujący do RIF efekt zaobserwowano, gdy kobieta posiadała genotyp TT rs26618 *ERAP1* oraz genotyp *KIR* Bx (czyli KIR BB lub KIR AB), a partner był heterozygotą *HLA-C1C2* (**Suplement**, **Tabela 19S**). Biorąc pod uwagę fakt, że w genotypie *KIR* Bx znajduje się dużo więcej genów dla receptorów aktywujących niż w genotypie *KIR* AA, można by przypuszczać, że ta kombinacja będzie sprzyjała zajściu wvciążę. Tymczasem efekt jest przeciwny – większy odsetek par z takim układem znajduje się w grupie RIF w porównaniu do grupy SIVF, w której kobiety zaszły w ciążę po *in vitro*. Korzystny efekt zaobserwowano, gdy kobieta posiadała genotyp CC rs26188 *ERAP1* i *KIR* AA, a jej partner posiadał allel *HLA-C2* (**Suplement**, **Tabela 19S**). Istotnie większy odsetek par posiadających ten układ znajdował się w kontroli płodnej w porównaniu do grupy IVF. Należy podkreślić, że żadna z pacjentek, która poddała się zapłodnieniu *in vitro* nie posiadała kombinacji CC rs26618/KIR AA, gdy partner był homozygotą *HLA-C2C2*. Można zatem przypuszczać, że w sytuacji, gdy zarodek dziedziczyłby po ojcu *HLA-C2* a po matce CC rs26618 *ERAP1*, nie dojdzie do silnego hamowania macicznych komórek NK, pomimo że matka posiada hamujący genotyp *KIR* AA.

Allel T w polimorfizmie ERAP1 rs26618 generuje zmianę aminokwasu w pozycji 276 (izoleucynę na metioninę). W badaniach Niepiekło-Miniewskiej i wsp. (2019) związanych z atopowym zapaleniem skóry postanowiono sprawdzić ich aktywność enzymatyczną i okazało się, że oba te warianty (z izoleucyną i metioniną) mogą wpływać na skuteczność wytworzenia epitopu związanego z HLA-C*05, chociaż aktywność allotypu z izoleucyną była o około 50% wyższa [262]. Dodatkowo, wykazano, że wariant rs26618C (276Met) znajdował się w haplotypie ERAP1, który miał niską aktywność enzymatyczną [305, 306]. Niska aktywność enzymu może mieć wpływ na wydajność przetwarzania antygenu, co może skutkować zmianą repertuaru peptydów, które nie będą pasowały do cząsteczek HLA-C2. W ten sposób nie

dojdzie do hamowania komórek NK, które zaszłoby pod wpływem interakcji HLA-C2 i KIR AA. Brak hamowania komórek NK będzie mieć korzystny wpływ na rozwój zarodka.

Odmienny niż w poprzednich analizach – ochronny efekt genotypu TT ERAP1 rs26618 – zaobserwowano tylko w jednym przypadku, a mianowicie w kombinacji z genami *KIR* w regionie centromerycznym BB występował częściej w kontroli niż u pacjentek RIF (**Tabela 11**). Dla regionu centromerycznego BB charakterystyczne jest występowanie genów *KIR,* takich jak: *KIR2DS2 i KIR2DL2*. Oprócz nich dodatkowo mogą pojawić się geny takie jak: *KIR2DL5B, KIR2DS3* i *KIR2DL1* [132]. Obecność genów aktywujących *KIR* w regionie centromerycznym B może mieć wpływ na przekazywanie sygnałów aktywujących do komórki NK w macicy, które będą korzystne dla ciąży. Występowanie genu *KIR2DS2* znacząco korelowało z niższym wskaźnikiem nawracających poronień u kobiet w badaniach Mansour i wsp. (2020) [307]. Co więcej, zauważyli oni silny ochronny efekt w kombinacji *KIR2DS2* z allelem *HLA-C1* kobiet. Można zatem przypuszczać, że aktywujące geny w regionie centromerycznym B mogą mieć wpływ na efekt ochronny przed RIF u kobiet z genotypem TT w rs26618 ERAP1.

W literaturze nie ma doniesień związanych z polimorfizmem rs26618 *ERAP1* w kontekście niepowodzeń implantacji zarodka, czy zaburzeń rozrodu, z wyjątkiem pracy opublikowanej przez nasze Laboratorium, związanej z nawracającymi poronieniami po zapłodnieniu naturalnym [308]. W badaniach pokazano, że genotyp TT w miejscu rs26618 *ERAP1* zwiększał ryzyko poronień u kobiet posiadających genotyp *KIR* Bx lub/i allel *HLA-C1*. Co więcej, kobiety mające genotyp Bx posiadały geny w regionie centromerycznym AA i telomerycznym AB [308]. Podobnie do wyników uzyskanych w niniejszej pracy, genotyp TT rs26618 *ERAP1* miał niekorzystny wpływ na utrzymanie ciąży, gdy kobieta nie posiadała genów *KIR w* regionie centromerycznym BB. Jednak u kobiet z grupy RIF niekorzystny efekt genotypu TT był zaobserwowany w kombinacji z allelem *HLA-C2, a* nie *HLA-C1*.

Kolejnym badanym polimorfizmem, w którym zaobserwowano istotne zależności był polimorfizm rs2287987 *ERAP1* (T>C; Met349Val). Genotyp CT wykazał efekt chroniący przed RIF i niepłodnością u kobiet posiadających geny *KIR* w regionie telomerycznym BB (**Tabela 11**). Polimorfizm rs2287987 powoduje w białku zamianę aminokwasów w pozycji 349 (zamiana metioniny na walinę – M349V). Zlokalizowany jest w miejscu aktywnym enzymu, dlatego może mieć wpływ na interakcje enzymu z substratem [219, 309]. Zmiany konformacyjne w miejscu aktywnym mogą prowadzić do powstania formy otwartej lub zamkniętej enzymu. Otwarta konformacja nadaje aminopeptydazie ERAP1 właściwości receptywne, dzięki którym enzym może wiązać peptydy, natomiast konformacja zamknięta

odpowiada za aktywną formę enzymu, w której dochodzi do przycinania polipeptydu [216]. Korzystny efekt tej kombinacji wynika zatem po pierwsze z posiadania genów aktywujących *KIR* z regionu telomerycznego BB, które sprzyjają właściwej implantacji zarodka. Po drugie, posiadanie genotypu CT ERAP1 w miejscu rs2287987, może mieć wpływ na prawidłową interakcję substratu z enzymem, a w konsekwencji zwiększać aktywność enzymu. Badania na komórkach czerniaka pokazały, że komórki transfekowane enzymem ERAP1 z metioniną w pozycji 349 (kodowaną przez allel T) wykazywały zwiększoną aktywność enzymatyczną w porównaniu do komórek typu dzikiego [310]. Można więc przypuszczać, że allel T odpowiada za konformację zamkniętą enzymu.

Kobiecy genotyp CT *ERAP1* rs2287987 (T>C) niezależnie od genotypu *KIR*, w kombinacji z *HLA-C2* partnera zmniejszał ryzyko niepłodności, co potwierdza ochronny wpływ genotypu CT (**Suplement**, **Tabela 18S**).

Z kolei u mężczyzn sam genotyp CC *ERAP1* rs2287987 (T>C) zwiększał ryzyko RIF u partnerek. Również mężczyźni posiadający genotyp CC rs2287986 w połączeniu z własnym *HLA-C1* oraz *KIR* Bx byli częściej obserwowani w grupie RIF (**Suplement**, **Tabela 15-16S**). Polimorfizmy *ERAP1*, kodujące warianty aminokwasów znajdujące się w pobliżu miejsca katalitycznego ERAP1, mogą powodować zmiany potencjału elektrostatycznego na powierzchni enzymu. Walina kodowana przez allel C w polimorfizmie rs2278978, może wyzwalać odmienny potencjał elektrostatyczny na powierzchni ERAP1 niż metionina [311]. Z kolei zmiana potencjału elektrostatycznego może przyczynić się do słabszego wiązania się substratu z enzymem i mniej wydajnego przycinania peptydów przez ERAP1. U zarodka dziedziczącego allel C rs2287987 ERAP1 po ojcu może dojść do nieprawidłowej interakcji prekursora peptydu antygenowego z enzymem i w konsekwencji do tworzenia niestabilnego kompleksu antygenu z HLA, co w dalszym etapie może prowadzić do niewłaściwej interakcji pomiędzy receptorami KIR na doczesnowych komórkach NK a HLA zarodka na trofoblaście. Należy podkreślić, że wyniki dotyczące mężczyzn są na granicy istotności, wymagają więc powtórzenia na większej liczbie osób.

Badane w niniejszej pracy kobiety będące nosicielkami genotypu AA rs6861666 *ERAP1* (A>G; intron 10) oraz posiadające geny *KIR* w regionie centromerycznym BB miały mniejszą szansę na uzyskanie ciąży (występowały częściej w grupie RIF i IVF) niż kobiety posiadające genotyp AG rs6861666 *ERAP1* (**Tabela 11**). Polimorfizm rs6861666 *ERAP1* jest w całkowitym niezrównoważeniu sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium* – LD) z rs75862629, który znajduje się w promotorze genu *ERAP2*. W pracy Paladini i wsp. (2018) pokazano, że obecność allelu G w miejscu polimorficznym rs75862629 A>G *ERAP2* znacząco wpływała na

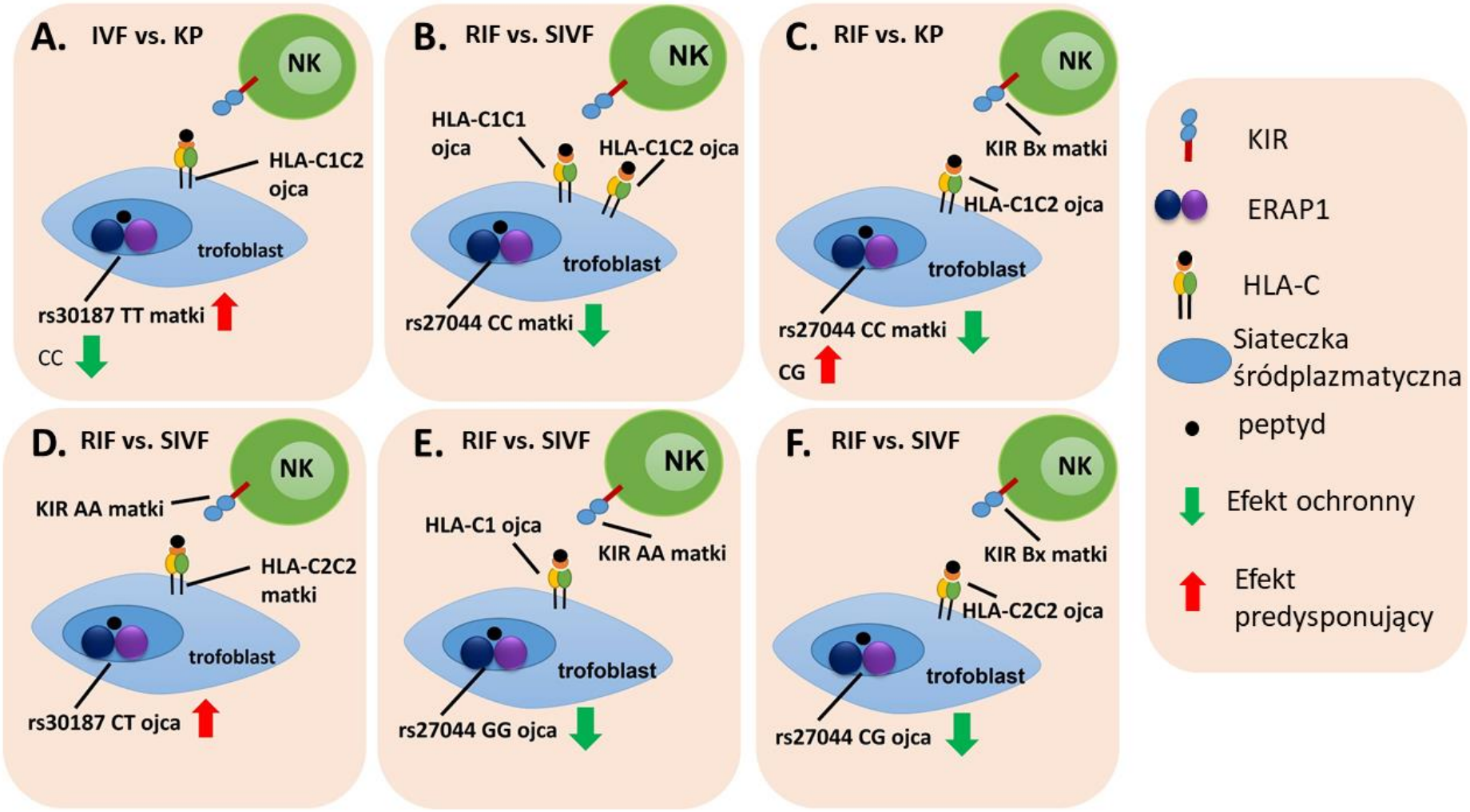
ekspresję zarówno ERAP1, jak i ERAP2, przy czym ekspresja ERAP2 była obniżona, a ekspresja ERAP1 zwiększona [263]. W 2019 roku ten sam zespół badawczy opublikował wyniki, w których jednoznacznie stwierdzono wyższą częstość allelu G polimorfizmu rs75862629 u osób zdrowych, posiadających antygeny HLA-B27 w porównaniu do osób chorujących na zesztywniające zapalenie stawów kręgosłupa [312]. Autorzy sugerują, że w obecności allelu A, czynniki transkrypcyjne mogą przyczynić się do ekspresji ERAP2, natomiast allel G odpowiada za mniej efektywne wiązanie czynników transkrypcyjnych do promotora *ERAP2*. Jednocześnie oznacza to wzmocnioną transkrypcję *ERAP1*. Nieobecność lub obniżenie ERAP2 może zatem wykazywać ochronne działanie w chorobach o podłożu autoimmunologicznym [230, 264, 312, 313]. W niniejszej pracy nie badano jednak ekspresji ERAP1 i ERAP2 na poziomie mRNA, nie można więc było jednoznacznie stwierdzić, że w przypadku kobiet posiadających allel G w genie rs6861666 *ERAP1,* nie dojdzie do ekspresji ERAP2, szczególnie, że w osoczu kobiet z grupy IVF oraz kobiet z kontroli wykryto ERAP2 oraz ERAP1 (**Rozdział 4.4**).

W ramach podsumowania wykonano **Rycinę 55** przedstawiającą istotne genetyczne interakcje pomiędzy kobietą i jej partnerem, które potencjalnie mogą prowadzić do niepowodzeń implantacji lub działać ochronnie i sprzyjać zajściu w ciążę. Analiza wyraźnie pokazała, że genotyp TT *ERAP1* rs30187 C>T u kobiet predysponował do niepłodności, szczególnie, gdy partner posiadał *HLA-C1C2* (**Tabela 14**, **Rycina 55A**). Polimorfizm rs30187 C>T (zamiana argininy na lizynę w pozycji 528 – Arg528Lys) powoduje zmianę pomiędzy zamkniętą a otwartą konformacją enzymu ERAP1 i w ten sposób może mieć wpływ na jego specyficzność. Genotyp TT rs30187 (wariant kodujący lizynę) koduje enzym, który ma wyższą aktywność i ekspresję [314, 315]. Z kolei wyższa aktywność enzymu wyrażona poprzez nadmierne przycinanie, może skutkować zniszczeniem peptydów prezentowanych przez HLA-C. Genotyp TT rs30187 *ERAP1* miał również związek z nawracającymi poronieniami po zapłodnieniu naturalnym, co pokazano w pracy naszego Laboratorium opublikowanej w czasopiśmie Human Immunology w 2019 roku [308]. Predyspozycję do poronień odnotowano w przypadku, gdy kobieta posiadała genotyp TT rs30187 ERAP1 oraz allel *HLA-C2* lub genotyp *HLA-C1C2* [308]. W niniejszej pracy predyspozycja do niepłodności była w przypadku układu TT rs30187 *ERAP1* kobiety z genotypem *HLA-C1C2* jej partnera. Podobny wpływ miał układ CT rs30187 *ERAP1* partnera z *KIR* AA/*HLA-C2C2* kobiety (**Rycina 55D**). Na tej podstawie można wnioskować, że allel T w tym polimorfizmie, niezależnie czy pochodzi od matki czy ojca, jest niekorzystny do zajścia w ciążę i jej utrzymania.

Polimorfizm rs27044 C>G *ERAP1* prowadzi do zamiany aminokwasów – glutaminy na kwas glutaminowy w pozycji 730 (Gln730Glu) – w domenie katalitycznej IV ERAP1 i może wpływać na preferencje długości substratu [219]. W badaniach własnych, genotyp CC rs27044 zmniejszał ryzyko niepłodności u kobiet, których partnerzy byli homozygotami *HLA-C1C1* lub heterozygotami *HLA-C1C2* (**Tabela 14**, **Rycina 55B**). Podobnie było u kobiet mających genotyp CC rs27044 oraz *KIR* Bx, gdy partnerzy byli heterozygotami *HLA-C1C2*. Z kolei, gdy w układzie *KIR* Bx kobiety/*HLA-C1C2* mężczyzny, kobieta miała genotyp CG rs27044 *ERAP1* zaobserwowano predyspozycję do RIF (**Rycina 55C**).

Partnerki mężczyzn posiadających przynajmniej jeden allel G w miejscu rs27044 C>G *ERAP1* (genotyp GG lub CG), oraz *HLA-C1* lub *HLA-C2C2,* miały większą szansę na udany transfer zarodka po zapłodnieniu IVF, skutkujący ciążą i urodzeniem dziecka, niezależnie od własnego genotypu *KIR* (*KIR* Bx lub *KIR* AA) (**Tabela 14**, **Rycina 55E-F**). Stamogiannos i wsp. (2015) stwierdzili, że zamiana aminokwasów, którą powoduje polimorfizm w miejscu rs27044 *ERAP1*, ze względu na jego lokalizację, prowadzi do jego zwiększonej preferencji dla mniejszych peptydów [314]. Pozycja 730 ERAP1 znajduje się w wewnętrznej wnęce enzymu ERAP1, wiążącej substraty peptydowe. Może to bezpośrednio zakłócać zdolność wiązania dłuższych peptydów i aktywacji ich przycinania. Takie wiązanie z dłuższymi peptydami jest uważane za niezbędne do wywołania zmiany konformacyjnej, w której reszta katalityczna jest przeniesiona w kierunku miejsca aktywnego enzymu. Wtedy peptydy dłuższe są efektywnie przycinane, a peptydy krótsze (8-9 reszt aminokwasowych) są przycinane wolniej. W szczególności, znaczenie ma wariant rs27044G (aminokwas w pozycji 730 z kwasem glutaminowym – 730Glu). Aminokwas ten niesie ładunek ujemny, który może wpływać na lokalny potencjał elektrostatyczny, utrudniając dopasowanie ujemnie naładowanego C-końca długich peptydów. Z kolei nadmierne przycinanie krótszych peptydów może prowadzić do ich zniszczenia [314, 316]. Zgadza się więc to z uzyskanymi wynikami w kontekście *ERAP1* rs27044 u kobiet. Allel G w miejscu rs27044, może mieć znaczenie w prawidłowym rozpoznawaniu antygenów dziecka przez organizm matki. Inne efekty występują, kiedy zarodek dziedziczy allel G po ojcu. W sytuacji, gdy na trofoblaście ekspresjonowane są cząsteczki HLA-C1 po ojcu, a matka ekspresjonuje receptory KIR kodowane w obrębie haplotypu A, interakcja może wystąpić tylko przez KIR2DL3. W wyniku zmiany aktywności enzymu ERAP1 powstaną peptydy, które mogą być nieprawidłowo prezentowane przez HLA-C1 receptorowi KIR2DL3. Wtedy nie nastąpi hamowanie komórek NK, co będzie korzystne dla implantacji zarodka (**Rycina 55E**). W sytuacji, gdy na trofoblaście występują cząsteczki HLA-C2C2 ojca, matka ekspresjonuje receptory KIR kodowane w obrębie haplotypu B i A

(Bx), interakcja może nastąpić poprzez KIR2DL1 lub KIR2DS1. Dodatkowo, obecność CG pochodzenia ojcowskiego w polimorfizmie rs27044 zapewnia enzymowi ERAP1 częściowo prawidłową funkcję (**Rycina 55F**). Wszystko zależy od tego, czy przeważy ekspresja receptorów KIR hamujących czy aktywujących.



Rycina 55. Potencjalne interakcje pomiędzy kobietą a jej partnerem w kombinacjach ERAP/HLA-C/KIR wynikające z badań własnych (A-F). Opracowanie własne

Istotne różnice w częstościach kombinacji genotypów *ERAP* z genotypami *KIR* u kobiet dotyczyły genu *ERAP2* i jego polimorfizmu rs2248374 (A>G; intron). Gen *ERAP2* w odróżnieniu od *ERAP1* wykazuje ograniczony polimorfizm. *ERAP2* występuje w dwóch haplotypach: A i B. Allel A jest związany z haplotypem A, natomiast allel G związany jest z haplotypem B. Allel G prowadzi do powstania skróconych transkryptów i prawdopodobnie niefunkcjonalnych form enzymu [216, 264]. Jak pokazały badania własne, genotyp GG *ERAP2* wraz z kombinacją genów *KIR* w regionie centromerycznym AB i telomerycznym AB, występował znacznie częściej u kobiet z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka po *in vitro* niż u kobiet, które zaszły w ciążę po zapłodnieniu *in vitro* (**Tabela 11**). Pomimo posiadania sprzyjającej dla ciąży kombinacji genów aktywujących *KIR*, nieaktywny ERAP2 nie będzie spełniał swojej funkcji poprawnego przycinania peptydów antygenowych. Może to zaburzać prawidłową prezentację antygenu na powierzchni trofoblastu, w konsekwencji prowadzić do nieprawidłowej aktywacji komórek NK w macicy, a więc mieć niekorzystny wpływ na implantujący się zarodek.

Co ciekawe, u mężczyzn allel G genu *ERAP2* rs2248374 A>G wykazał odmienny od kobiet, ochronny efekt w kontekście niepłodności (**Suplement**, **Tabela 14S**), z kolei genotyp AA *ERAP2* okazał się predysponować do niepłodności i RIF. Różnice w częstościach genotypu AA *ERAP2* wykryto pomiędzy mężczyznami z grupy IVF i RIF a mężczyznami z kontroli w analizie kombinacji z *KIR* i *HLA-C* (**Suplement**, **Tabela 15-16S**). Niezależnie od posiadanego allelu HLA-C (*C1*, *C2* lub *HLA-C1C2*), mężczyźni z genotypem *KIR* Bx i wariantem AA *ERAP2* rs2248374 byli częściej w grupie IVF i RIF. Nie zawsze więc

Ze względu na udział w lokalnym szlaku przemian renina-angiotensyna obecnym w łożysku, uważa się że ERAP-y odgrywają kluczową rolę w regulacji ciśnienia krwi. ERAP1 przycina angiotensynę II do angiotensyny III, ERAP2 z kolei przycina angiotensynę III do angiotensyny IV oraz kalidynę do bradykininy. Angiotensyna III i kalidyna zaangażowane są w regulację rozszerzania i zwężania naczyń krwionośnych. Nieprawidłowości w przetwarzaniu angiotensyny i kalidyny mogą przyczynić się do wysokiego ciśnienia krwi. Warianty *ERAP*, które kodują niefunkcjonalne enzymy, zaburzą produkcję angiotensyny III i IV przyczyniając się w ten sposób do wzrostu poziomu krążącej angiotensyny II, co skutkuje nadciśnieniem [317, 318]. W dodatku nadciśnienie i zwiększone poziomy krążącej angiotensyny II często są związane ze wzrostem reaktywnych form tlenu [319]. To z kolei może prowadzić do uszkodzeń jądrowego i mitochondrialnego DNA, skrócenia telomerów, zmian epigenetycznych i mikrodelecji chromosomu Y [320].

Enzym ERAP2 oprócz tego, że odpowiada za przycinanie i przetwarzanie prekursora peptydu antygenowego prezentowanego przez cząsteczki HLA klasy I, jest też zaangażowany w procesy, które są ważne dla rozwoju ciąży takie jak: regulacja odpowiedzi immunologicznej, regulacja angiogenezy i jak już wspomniano wcześniej, kontrola ciśnienia krwi [228, 266]. Badacze koncentrowali się na roli ERAP2 w preeklampsji, która charakteryzuje się nadciśnieniem krwi po 20 tygodniu ciąży. Na preeklampsję ma wpływ zbyt płytka inwazja trofoblastu i słaba przebudowa tętniczek spiralnych, a w schorzeniu uczestniczą również zaburzenia immunologiczne. Różne warianty genetyczne *ERAP2* matki lub płodu wykazywały związek z preeklampsją w odmiennych etnicznie populacjach [240, 241, 321]. Badania Vanhille i wsp. (2013) wskazują, że nadmierne przycinanie peptydów, wynikające z homozygotyczności w miejscu polimorficznym rs2549782 G>T *ERAP2*, nie jest korzystne dla ciąży, ponieważ prowadzi do zmiany repertuaru peptydów HLA klasy I wywołując odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko komórkom płodu. Genotyp TT *ERAP2* rs2549782, w którym allel T wzmacniał aktywność ERAP2, nie był w ogóle obserwowany u matek i ich płodów z prawidłową ciążą w populacji chilijskiej [321].

Obniżenie ekspresji ERAP2 wykryto w pierwszym trymestrze ciąży w łożyskach kobiet, u których doszło do preeklampsji [322]. Jednakże badania Seamon i wsp. (2020) wykazały różnice w ekspresji zarówno ERAP1, jak i ERAP2 w łożyskach kobiet w zależności od zaawansowania ciąży. Testowano łożyska kobiet w pierwszym trymestrze ciąży, które poddały się aborcji z wyboru oraz kobiet z preeklampsją i kobiet z prawidłowym ciśnieniem krwi w czasie porodu. Najmniejszą ekspresję ERAP1/ERAP2 wykazano u kobiet z preeklampsją, pośrednią u kobiet z prawidłwym ciśnieniem, a najwyższą w łożysku kobiet w pierwszym trymestrze ciąży. Przy czym u wszystkich kobiet była większa ekspresja ERAP2 w porównaniu do ERAP1. Ponadto zaobserwowano u tych kobiet znaczące podwyższenie aktywacji cytotoksycznych komórek NK we krwi obwodowej [318]. Jeśli równowaga ekspresji ERAP1 i ERAP2 zostaje zaburzona, może wiązać się ze zmianą funkcji komórek NK z wydzielniczej na cytotoksyczną, a tym samym ze zmianą odpowiedzi immunologicznej komórek NK.

ERAP1 i ERAP2 w osoczu

W niniejszej pracy, po raz pierwszy na świecie, wykryto różnice w wydzielaniu ERAP1 i ERAP2 do osocza pacjentek poddających się zapłodnieniu IVF i kobiet płodnych, które zaszły w ciążę naturalnie. Zaskakującym wynikiem było to, że ERAP1 nie był wykrywalny w osoczu pacjentek z grupy IVF, natomiast jego niewielkie ilości zaobserwowano u kobiet z kontroli

(**Tabela 15, Rycina 33**). ERAP-y, oprócz przycinania peptydów antygenowych, regulacji angiogenezy i ciśnienia krwi, spełniają jeszcze jedną ważną rolę – mogą przycinać i tym samym tworzyć rozpuszczalne receptory dla cytokin prozapalnych. Są to m.in.: receptor dla czynnika martwicy nowotworów TNF-α (TNFR1), receptor dla interleukiny 6 typu I (IL-6Rα) oraz interleukiny 1 typu II (IL-1RII) [234-236]. Funkcja ta znana jest jako „złuszczanie receptorów". Cui i wsp. (2002) wyjaśnili, że mechanizm ten polega na wiązaniu się ERAP1 z zewnątrzkomórkową domeną receptora TNFR1, a następnie całość kompleksu jest złuszczana [234]. Nadmierna ekspresja ERAP1 może więc wytwarzać rozpuszczalny TNFR1, który konkuruje z receptorami TNF-α znajdującymi się na powierzchni komórki. W związku z tym, bioaktywność TNF-α spada, gdy poziom ERAP1 jest podwyższony. Złuszczanie receptora TNFR1 może również zmniejszyć liczbę dostępnych receptorów na powierzchni komórek, wiążących odpowiednie ligandy, dlatego nadekspresja ERAP1 łagodzi stan zapalny. Jednak z analiz własnych wynika, że pacjentki IVF nie wydzielały ERAP1. Wyjaśnieniem obserwowanego braku wydzielania ERAP1 u pacjentek poddających się zapłodnieniu *in vitro*, może być fakt przyjmowania kortykosteroidów podczas procedury IVF. Glikokortykosterydy hamują stan zapalny poprzez różne mechanizmy, w tym: hamowanie wytwarzania i uwalniania mediatorów stanu zapalnego, hamowanie proliferacji tkanek, zmniejszenie przepuszczalności ścian naczyń włosowatych i błon komórkowych oraz zmniejszenie wysięku zapalnego [323]. Prednizon, który przyjmowały pacjentki IVF ma klinicznie szerokie zastosowanie w różnych chorobach o podłożu immunologicznym, często też jest stosowany u pacjentek z RIF lub z nawracającymi poronieniami. Badania wykazały, że prednizon może mieć funkcję immunomodulującą i hamować wydzielanie cytokin prozapalnych w endometrium przed implantacją zarodka, ale także może stymulować wydzielanie gonadotropiny kosmówkowej i promować inwazję trofoblastu w głąb macicy [324, 325]. Można więc wnioskować, że zastosowanie prednizonu u pacjentek, obniżyło poziomy prozapalnych cytokin TNF-α i IFN-ɣ, które z kolei okazały się być niezbędne w ekspresji i aktywacji ERAP1 [326, 327]. Bez wątpienia, pacjentki poddane procedurze IVF, u których badano stężenie ERAP1 w osoczu w niniejszej pracy, w 85% nie wydzielały IFN- ɣ i w 95% nie wydzielały TNF-α (dane jeszcze nieopublikowane). Pacjentki, u których sprawdzano stężenie ERAP2 w osoczu, w 76% nie wydzielały IFN- ɣ i w 95% – TNF-α. Nasuwa się zatem pytanie, czy stosowanie sterydów u pacjentek poddających się zapłodnieniu *in vitro*, ma uzasadnienie [324, 328, 329]. Nie ma jednoznacznych dowodów, że stosowanie glikokortykosterydów pomocniczo w cyklach IVF, poprawia wskaźnik ciąż. Niektóre badania wykazały, że podawanie sterydów w pierwszym trymestrze ciąży może być skorelowane ze wzrostem liczby poronień, przedwczesnych

porodów, nadciśnienia ciążowego i cukrzycy [330, 331]. Dlatego też należy dokładnie ocenić konieczność zastosowania sterydów, biorąc pod uwagę potencjalne ryzyko. Być może terapia sterydami powinna być rozważana tylko w przypadku kobiet z podwyższonym poziomem IFN-ɣ i TNF-α.

Skoro pacjentki IVF miały niewykrywalne stężenia ERAP1 w osoczu, natomiast zaobserwowano u nich wydzielanie ERAP2, nasuwa się pytanie, dlaczego sterydy hamowały wydzielanie ERAP1, ale nie miały wpływu na hamowanie wydzielania ERAP2? W swoich badaniach zespoły badawcze Saveanu (2005) oraz Evnouchidou (2014) dowiodły, że enzymy ERAP1 i ERAP2 mogą tworzyć kompleksy heterodimeryczne [220, 227]. Fizyczna interakcja, jaka wtedy zachodzi pomiędzy ERAP1 a ERAP2, zmienia podstawowe parametry enzymatyczne ERAP1 i polepsza jego powinowactwo do substratu. Heterodimery ERAP1-ERAP2 wykazują zwiększoną wydajność przetwarzania prekursorów antygenowych. Jak wynika z badań Tanioki i wsp. (2003), ERAP2 (L-RAP) może równoważyć brak przycinania peptydów przez ERAP1 [332]. Również Guasp i wsp. (2019) wykazali, że oba enzymy ERAP1 i ERAP2 mają odmienny, ale uzupełniający się wpływ na powstawanie i optymalizację peptydomu HLA-B*51 [333]. Przy braku ERAP1, ERAP2 wystarcza do wydajnego przetwarzania peptydomu HLA-B*51 i wykazuje wzmocnioną aktywność, co potwierdza, że ERAP2 może kompensować brak ERAP1 [333]. Być może w przypadku pacjentek po IVF jest podobnie i gdy dochodzi do wyciszenia ekspresji i braku wydzielania ERAP1 kontrolę przejmuje enzym ERAP2. Jednak rezultaty badań własnych wskazują również, że nadekspresja ERAP2 nie jest korzystna, ponieważ pacjentki z RIF oraz z poronieniami wykazywały wzrost stężenia ERAP2 w osoczu (**Rycina 34, Tabela 16** oraz **Rycina 36, Tabela 18**).

Badania na syngenicznych modelach myszy wskazują, że wyciszenie ERAP1 skutkuje upośledzonym powstawaniem repertuaru peptydów związanych z układem MHC klasy I [334]. To z kolei skutkuje odrzuceniem mysiego chłoniaka T-komórkowego. Odrzucenie to jest spowodowane odpowiedzią komórek NK i zaangażowanych w nią hamujących receptorów Ly49, które są odpowiednikiem receptorów KIR u ludzi. Ponadto ekspresja ERAP1 na poziomie białka związana była z ekspresją HLA-G na powierzchni komórki [260]. W badaniach tych ERAP1 pod wpływem LIF był eliminowany z linii ludzkich komórek JEG-3 kosmówczaka, co powodowało zmniejszenie ekspresji powierzchniowej cząsteczki HLA-G1, a także zmniejszenie wydzielania rozpuszczalnego HLA-G1 [260]. Z przytoczonych badań wynika, że ERAP1 ma wpływ na repertuar peptydów prezentowanych w kontekście HLA-G1 na trofoblaście. Ta hipoteza znalazła potwierdzenie w badaniach własnych zawartych w podrozdziale **4.5.2** w kontekście rozpuszczalnego HLA-G. Wszystkie pacjentki po IVF,

pacjentki z RIF i te, które zaszły w ciążę po zapłodnieniu *in vitro*, wydzielały znacznie mniej sHLA-G niż kobiety z kontroli płodnej (**Rycina 38**). Natomiast Xu i wsp. (2020) wykazali, że ekspresja ERAP1 była podwyższona w łożyskach kobiet z preeklampsją, a niedotlenienie tkanek powodowało wzrost tej ekspresji [242]. Badania własne wskazują jednak, że wydzielanie ERAP1 może być korzystne, ponieważ było obserwowane u kobiet z grupy kontrolnej, które urodziły dziecko w przeszłości. Niższe stężenia ERAP1 miały kobiety w ciąży po poczęciu naturalnym. Warto również wspomnieć o pracy Aldhamena i wsp. (2015), w której przeanalizowano właściwości funkcjonalne wydzielanego ERAP1 [232]. Autorzy dowodzą, że makrofagi traktowane IFN-ɣ i lipopolisacharydem (LPS) wydzielały ERAP1. Co więcej, jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, traktowane ERAP1, powodowały aktywację komórek NK i limfocytów T [232]. Przedstawione badania wskazują, że gdy ERAP1 jest wydzielany poza komórkę, może mieć wpływ na aktywację komórek układu odpornościowego, w tym komórek NK.

Rozpatrując wydzielanie ERAP2 do osocza, można przypuszczać, że enzym ten jest potrzebny do prawidłowej implantacji zarodka, zwłaszcza gdy ekspresja ERAP1 jest stłumiona. Świadczy o tym fakt, że kobiety, które w momencie badania były w ciąży poczętej naturalnie wydzielały więcej ERAP2 (mediana na poziomie 2,69 ng/ml) w porównaniu do kobiet, które zaszły w ciążę naturalnie i urodziły dziecko w przeszłości (mediana na poziomie 1,15 ng/ml) (**Rycina 33** i **Tabela 15**). Jednak zbyt wysokie stężenia ERAP2 mogą mieć negatywny wpływ na ciążę, ponieważ, jak już wcześniej wspomniano, stosunkowo duże ilości ERAP2 wydzielały pacjentki dotknięte poronieniem (3,58 ng/ml przed transferem i 3,61 ng/ml po transferze zarodka) (**Rycina 36** i **Tabela 18**). Wydaje się więc, że zbyt wysokie stężenia ERAP2 u kobiet są niekorzystne i mogą mieć wpływ na wystąpienie poronienia. Lospinoso i wsp. (2021), wykazali, że ERAP2 rs2549782 z argininą w pozycji 392 był ekspresjonowany w komórkach trofoblastu i aktywował komórki układu odpornościowego [335]. Wówczas komórki, które wykazywały ekspresję ERAP2, były zabijane przez cytotoksyczne limfocyty T oraz komórki NK. Okazało się, że wzrost ekspresji ERAP2 był związany ze zmniejszeniem ekspresji wielu genów odpowiadających za przeżycie komórek, natomiast obserwowano zwiększenie ekspresji genów zaangażowanych w śmierć komórki, np. PPP1R12B lub EGLN2. Zwiększało to podatność na apoptozę komórek trofoblastu [335].

Skoro rozpuszczalna forma ERAP2 jest potrzebna do implantacji zarodka, ale jego zbyt wysokie stężenie może przyczyniać się do poronień, nasuwa się pytanie: jakie stężenie ERAP2 jest optymalne do zajścia i utrzymania ciąży i jednocześnie jakie może być maksymalne stężenie, aby nie doszło do poronienia? W tym celu wykonano analizę krzywych ROC

(**podrozdział 4.4.4**). Optymalny punkt odcięcia, który odróżniał kobiety, które zaszły w ciążę i ją utrzymały od tych, które doświadczyły poronienia, ustalono na poziomie około 2,9 ng/ml. Stężenia powyżej tego poziomu mogą być niekorzystne i wskazywać na możliwe ryzyko poronienia u kobiet. Punkt odcięcia wyznaczono przy maksymalnej czułości i specyficzności. Najbardziej trafny model klasyfikacyjny, przy którym uzyskano najwyższe pole powierzchni pod krzywą (AUC=0,72), porównywał zdrowe kobiety z kontroli płodnej, które urodziły dziecko w przeszłości z pacjentkami po IVF, które nie doświadczyły poronienia. Czułość i specyficzność w tym modelu wynosiła 65,38% i 73,68%. W testach diagnostycznych przyjmuje się, że im większe jest AUC tym jakość klasyfikatora jest większa. Przy AUC wynoszącym od 0,7 do 0,8, klasyfikator jest dopuszczalny. AUC w zakresie 0,8-0,9 wskazuje na bardzo dobrze dobrany klasyfikator [336]. W związku z tym w badaniach własnych, rozpuszczalny ERAP2 mógłby być dopuszczalny jako klasyfikator w ocenie ryzyka wystąpienia poronień, należałoby jednak wziąć pod uwagę również czułość i specyficzność.

Rola HLA-G w niepowodzeniach implantacji zarodka

Jednym z najczęściej badanych polimorfizmów genu *HLA-G w* zaburzeniach rozrodu jest 14-nukleotydowa insercja/delecja (rs371194629) znajdująca się w regionie 3'UTR, który nie podlega translacji [337-341]. Obecność 14-nukleotydowej insercji powoduje alternatywny splicing prowadzący do usunięcia 92 zasad znajdujących się w eksonie 8 dojrzałego mRNA HLA-G. Taki skrócony mRNA bez 92 zasad jest bardziej stabilny niż mRNA generowany przez wariant delecyjny [342, 343]. Pomimo wzrostu stabilności mRNA, insercja 14 par zasad związana jest z niższym poziomem lub brakiem sHLA-G w osoczu [344, 345]. W doniesieniach literaturowych dotyczących badań nad rolą 14-nukleotydowej insercji/delecji w RIF wyniki są niejednoznaczne. Może być to spowodowane różnicami w badanych populacjach bądź ograniczoną liczbą testowanych osób [337-339]. Jednak w przedstawionej metaanalizie Monti i wsp. (2019) badali wpływ insercji/delecji w nawracających poronieniach po naturalnym zapłodnieniu u Europejek i pokazali, że kobiety homozygotyczne, posiadające genotyp insercja/insercja, miały znacząco wyższe ryzyko poronień niż kobiety o pozostałych genotypach [346]. Podobnie do wyników niniejszej pracy doktorskiej, Sipak i wsp. (2019) nie zaobserwowali różnic w częstościach poszczególnych genotypów polimorfizmu 14-nukleotydowej ins/del u kobiet z zaburzeniami rozrodu (takimi jak zespół antyfosfolipidowy, preeklampsja, nawracające poronienia) oraz kobiet kontrolnych [347]. Jednakże, autorzy

zasugerowali, że na ryzyko komplikacji ciąży mogą mieć wpływ allele: HLA-G 10101, HLA-G 10108 oraz HLA-G 10106, a nie polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP-y).

Rzeczywiście, ekspresja HLA-G zależy od innych polimorfizmów [210, 348]. Dlatego w niniejszej pracy, oprócz 14-nukleotydowej insercji/delecji, zbadano także polimorfizmy: rs1632947: c.-964G>A oraz rs1233334: c.-725G>C/T znajdujące się w promotorze genu *HLA-G*. Jedynie w przypadku polimorfizmu rs1632947: c.-964G>A większa częstość kobiet o genotypie GG znajdowała się w kontroli w porównaniu do kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro*. Dlatego genotyp GG wydawał się zmniejszać ryzyko niepłodności u kobiet. Nie zaobserwowano jednak związku z niepłodnością lub RIF w przypadku insercji/delecji w polimorfizmie rs371194629 oraz rs1233334: c.-725G>C/T (**Tabela 19**). W promotorze genu *HLA-G* znajduje się kilka ważnych elementów regulatorowych. Polimorfizmy -964G>A oraz -725G>C/T znajdują się w pobliżu wysp CpG, więc prawdopodobnie mają wpływ na wiązanie czynników transkrypcyjnych i metylację promotora, a w konsekwencji wpływają na transkrypcję genu [212, 348]. Obecność adeniny w pozycji -964G>A (tworzącej dinukleotydy A) niszczy dinukleotydy CpG, które mogłyby być metylowane. Z kolei wariant G w pozycji -725G>C/T tworzy dinukleotydy CpG, które mają wpływ na transkrypcję genu [349].

W badaniach własnych uzasadniona więc była analiza haplotypów i diplotypów *HLA-G*, które zawierały polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w kolejności: rs1632947–rs1233334–rs371194629 (**podrozdział 4.5.1**). Zaobserwowano różnice w częstościach haplotypów i diplotypów pomiędzy wszystkimi pacjentami po IVF i kontrolą, ale także pomiędzy pacjentkami z grupy RIF i SIVF a kontrolą. Genetycznie określone haplotypy A-C-del, A-G-del i G-C-ins okazały się mieć efekt predysponujący do niepłodności, natomiast haplotypy A-C-ins, G-C-del i G-G-del były ochronne (**Tabela 20**). W dalszej części pracy zbadano stężenie rozpuszczalnej formy HLA-G (sHLA-G) u pacjentek IVF i kobiet kontrolnych, oraz sprawdzono wydzielanie sHLA-G w zależności od haplotypu i diplotypu *HLA-G*. Istnieją doniesienia literaturowe, w których wykazano, że niższy poziom sHLA-G u kobiet w osoczu lub surowicy, związany był z różnymi komplikacjami ciąży, takimi jak poronienia, preeklampsja, czy wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu [350-352]. Należy jednak podkreślić, że w badaniach własnych po raz pierwszy na świecie zmierzono stężenie sHLA-G w osoczu zarówno przed, jak i po transferze zarodka, aby możliwie jak najwcześniej przed transferem oraz w niedługim czasie po transferze sprawdzić wpływ stężenia sHLA-G na powodzenie ciąży.

Z badań własnych wynika, że wszystkie pacjentki IVF, w tym kobiety z RIF i SIVF, miały niższe poziomy sHLA-G w osoczu w porównaniu do kobiet z kontroli, które zaszły w ciążę naturalnie i urodziły dziecko w przeszłości lub były w ciąży w momencie badania (**Rycina 38** i **Tabela 22**). Spodziewano się więc, że kobiety o haplotypach A-C-del, A-G-del i G-C-ins, które częściej występowały w grupie IVF, będą charakteryzowały się niższym wydzielaniem sHLA-G niż nosicielki haplotypów A-C-ins, G-C-del i G-G-del, które były częściej obserwowane w grupie kontrolnej. Okazało się, że najmniej sHLA-G wydzielały pacjentki, które miały haplotyp G-C-ins, a najwięcej – pacjentki o haplotypie G-C-del, co potwierdziło genetyczne analizy. Pacjentki o pozostałych haplotypach wydzielały pośrednie stężenia sHLA-G (**Tabela 23, Rycina 39**). Haplotyp G-C-ins również był związany z najniższym wydzielanym stężeniem sHLA-G u kobiet płodnych. Natomiast u kobiet płodnych, haplotyp A-G-del oraz diplotypy A-C-del/A-C-del i A-C-del/A-G-del charakteryzowały się najwyższymi stężeniami sHLA-G, co było niezgodne z zaobserwowanymi wcześniej wynikami genetycznymi, wskazującymi na ich predyspozycję do niepłodności (**Tabela 23 i Tabela 24**). Jednak nie można było wnioskować o roli tych haplotypów i diplotypów z uwagi na małą liczbę kobiet kontrolnych, którym zmierzono stężenie sHLA-G (6 kobiet z haplotypem A-G-del oraz 5 i 6 kobiet z diplotypami A-C-del/A-C-del i A-C-del/A-G-del).

Rozpatrując częstości diplotypów, wyniki pokazały, że allel insercyjny jest związany z większym ryzykiem niepłodności w układzie z allelem G rs1632947 i allelem C rs1233334. Im więcej alleli insercyjnych posiadała kobieta, tym bardziej było to dla niej niekorzystne. Diplotyp G-C-del/G-C-del chronił przed niepłodnością, z kolei G-C-del/G-C-ins oraz G-C-ins/G-C-ins przynosiły efekt predysponujący, na co wskazywał również wzrost ilorazu szans OR. Diplotyp G-C-ins/G-C-ins był najbardziej niekorzystny dla zajścia w ciążę w sposób naturalny (**Tabela 21**). Analiza genetyczna znalazła potwierdzenie w wynikach dotyczących wydzielania sHLA-G u pacjentek. Zarówno w haplotypach, jak i diplotypach, kobiety pozytywne pod względem G-C-del wydzielały więcej sHLA-G niż kobiety posiadające G-C-ins (**Rycina 39, Rycina 43**). W niewielkim odsetku (około 3%), kobiety z kontroli posiadały niekorzystny diplotyp G-C-ins/G-C-ins. Jednak stężenie sHLA-G wydzielanego przez kobiety płodne było niemal dwukrotnie większe (114,70 IU/ml) niż pacjentek poddających się zapłodnieniu *in vitro* (47,46 IU/ml przed i 56,32 IU/ml po transferze zarodka). Niskie stężenia sHLA-G mogą być też spowodowane obniżonym poziomem cytokin prozapalnych takich jak IFN-ɣ i TNF-α u pacjentek IVF, które przyjmowały prednizon (dane nieopublikowane). W doniesieniach literaturowych stwierdzono, że w ciąży wzmocniona ekspresja HLA-G

i uwolnienie sHLA-G następuje pod wpływem interferonów (IFN-α, IFN-β, IFN-ɣ) [353-355]. Możliwe, że przyjmowanie prednizonu przez pacjentki, przyczyniło się do znacznego obniżenia sHLA-G w ich osoczu.

Haplotyp z 14-nukleotydową insercją w połączeniu z allelem A w pozycji -964G>A oraz allelem C w pozycji -725G>C/T występował częściej w grupie płodnej niż u pacjentek z grupy IVF. Z kolei allel delecyjny, w wyżej wspomnianej kombinacji, występował częściej u pacjentek IVF (**Tabela 20**). Tak więc nie zawsze allel insercyjny jest związany z podatnością na niepowodzenie ciąży. Stężenie sHLA-G mierzone przed transferem u pacjentek z grupy IVF o haplotypach A-C-del i A-C-ins było podobne (**Tabela 23**). Castelli i wsp. (2014) opisali haplotyp G010101a/G∗01:01:01:01/UTR-1, który w niniejszej pracy doktorskiej odpowiadał haplotypowi G-C-del, jako jeden z najczęściej występujących haplotypów *HLA-G* na świecie [210], wobec tego haplotyp ten jest faworyzowany ewolucyjnie i może być związany z przetrwaniem ludzi jako gatunku. Być może dlatego haplotyp G-C-del występuje częściej u kobiet płodnych (**Tabela 20**). Analiza częstości diplotypów w niniejszej pracy doktorskiej (**Tabela 21**) oraz badania innych naukowców [349, 356] dowodzą, że na promotor *HLA-G* działa tzw. selekcja równoważąca (ang. *balancing selection*), która utrzymuje promotor genu w wysokiej heterozygotyczności. W badaniach własnych, diplotypy heterozygotyczne stanowią około 70% wszystkich diplotypów. Selekcja prawdopodobnie powoduje zachowanie dwóch linii allelicznych w locus HLA-G, które mogą powodować różną aktywność promotora. Przypuszcza się, że te różnice w aktywności pozwalają utrzymać równowagę pomiędzy haplotypami warunkującymi niską i wysoką ekspresję HLA-G, która z kolei jest wymagana do utrzymania tolerancji immunologicznej matki wobec płodu, przy jednoczesnym zachowaniu zdolności do obrony przed patogenami [349, 357].

Profil genów *HLA-G u* par z niepłodnością idiopatyczną, które poddały się technikom wspomaganego rozrodu (ART), zbadano w pracy Costy i wsp. (2016) [358]. Ich wyniki wykazały, że haplotyp *HLA-G* 010101b był związany z niepłodnością. Haplotyp ten posiadał allel G zarówno w pozycji -964G>A, jak i w pozycji -725G>C/T [358]. W badaniach własnych uzyskano odmienne wyniki. Haplotypy zawierające allel G w pozycjach -964 oraz -725 były ochronne. Haplotyp G-G-del istotnie częściej występował w kontroli płodnej niż u pacjentek z grupy IVF (**Tabela 20**). Jak już wcześniej wspomniano, allel G tworzy wyspy CpG, które mogą być metylowane, więc mogłoby to teoretycznie obniżać ekspresję HLA-G [359]. Jednak ten sam zespół badawczy Ober w 2006 roku pokazał na liniach komórkowych kosmówczaka wyższą ekspresję promotora haplotypu HLA-G, który zawierał allel G w pozycji -725G>C/T, w porównaniu do haplotypów posiadających allele C i T [360]. Zwiększona ekspresja mogłaby

działać ochronnie i ułatwiać prawidłowy rozwój ciąży, dlatego badania własne wydają się być z tym zgodne. Potwierdziła to również dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem sHLA-G przed i po transferze zarodka w osoczu pacjentek o haplotypie G-G-del, które zaszły w ciążę po zapłodnieniu *in vitro* (**Rycina 42 F**).

Analizując stężenia sHLA-G w zależności od haplotypów u pacjentek IVF oraz od tego, czy pacjentka zaszła w ciążę po transferze czy nie, zaobserwowano, że pacjentki, które zaszły w ciążę po zapłodnieniu *in vitro*, wykazywały przeważnie wyższe stężenia sHLA-G po transferze zarodka w porównaniu do stężeń przed transferem (**Tabela 26**). Gdy transfer zarodka skończył się niepowodzeniem i pacjentka nie zachodziła w ciążę, widoczny był spadek stężenia sHLA-G po transferze (**Tabela 27**). Ponadto pacjentki, które zaszły w ciążę po *in vitro* i posiadały haplotyp G-C-del, wydzielały około dwa razy więcej sHLA-G niż pacjentki z haplotypem G-C-ins (**Tabela 29**). Pogłębiona różnica pomiędzy stężeniami sHLA-G u kobiet o haplotypach G-C-del i G-C-ins, była u pacjentek, u których transfer zarodka skutkował poronieniem (**Rycina 41 C**). Według Marozio i wsp. (2017), stężenia sHLA-G niższe niż 43,50 IU/ml pod koniec pierwszego trymestru ciąży, wiązały się z dwukrotnym wzrostem ryzyka wystąpienia powikłań ciąży [361]. Z kolei w badaniach Pfeiffer i wsp. (2000) wykazano, że niskie stężenia sHLA-G u kobiet, mierzone jeszcze w fazie przedowulacyjnej, mogą wskazywać na ryzyko wczesnego poronienia po zapłodnieniu *in vitro* [351].

W badaniach własnych optymalny punkt odcięcia stężenia sHLA-G, który odróżniał pacjentki zachodzące w ciążę po *in vitro* od pacjentek z brakiem ciąży lub poronieniami, wynosił 59,73 IU/ml (**Rycina 51**). Pacjentki, które miały stężenie sHLA-G powyżej tej wartości, miały prawie dwukrotnie większą szansę na zajście w ciążę po transferze zarodka, niż pacjentki, które wydzielały niższe stężenia sHLA-G. Tutaj należy wspomnieć, że pacjentkom podawano progesteron dopochwowo i doustnie w celu suplementacji fazy lutealnej. Progesteron jest steroidowym hormonem, który posiada funkcję immunomodulującą. Wydzielany jest przez ciałko żółte i łożysko, umożliwiając implantację zarodka. Progesteron może indukować ekspresję HLA-G głównie poprzez PRE (ang. *progesterone response element*), który znajduje się w promotorze genu *HLA-G* [362-363]. Amerykańskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu potwierdziło znaczącą rolę suplementacji progesteronu w fazie lutealnej u pacjentek poddającym się technikom ART (2021) [364]. Podawanie progesteronu pacjentkom korzystnie wpływa na ciążę oraz zwiększa ekspresję HLA-G. W pracy Nguyen i wsp. (2019) wykazano, że poziom rozpuszczalnego HLA-G wzrastał u pacjentów z wrodzonym przerostem nadnerczy, którzy przyjmowali progesteron

i kortykosteroidy [365]. Badania te mogły sugerować również rolę układu renina-angiotensyna w regulacji ekspresji rozpuszczalnego HLA-G.

Z przeprowadzonych analiz ROC można również wnioskować, że dla kobiet zachodzących w ciążę w zapłodnieniu naturalnym, wartość progowa sHLA-G wzrasta prawie dwukrotnie. Kobiety wydzielające sHLA-G powyżej 110 IU/ml mają większą szansę na naturalne zajście w ciążę niż kobiety wydzielające sHLA-G poniżej tego poziomu (**Rycina 49, 50**). Pomimo że pacjentki wydzielające już powyżej 59,73 IU/ml mogą zajść w ciążę po zapłodnieniu *in vitro*, jest to jednak zapłodnienie wspomagane, a nie naturalne. Do zajścia w ciążę w sposób naturalny potrzebowałyby osiągnąć dwukrotnie wyższe stężenia (110 IU/ml). Badania Shido i wsp. (2006) pokazały, że czynnik hamujący białaczkę LIF zwiększał ekspresję HLA-G na powierzchni komórek kosmówczaka (które stanowiły model komórek trofoblastu), poprzez wzrost ekspresji ERAP1 w siateczce śródplazmatycznej [260]. Wyeliminowanie ERAP1 zmniejszało ekspresję HLA-G. W niniejszej pracy nie wykryto ERAP1 u pacjentek z grupy IVF. Być może miało to również wpływ na niższe stężenia sHLA-G pacjentek w porównaniu do kobiet kontrolnych.

Interesującą kwestią jest wydzielanie sHLA-G u pacjentek w zależności od cyklu świeżego lub mrożonego oraz protokołu stymulacji jajników. Zauważono, że pacjentki, których transfer zarodka odbył się w cyklu mrożonym, wydzielały więcej sHLA-G niż pacjentki w cyklu świeżym (**podrozdział 4.5.5**). Zatem wydaje się, że pacjentki w cyklu mrożonym mogłyby mieć niższe ryzyko powikłań ciąży. Według danych zebranych z klinik IVF całego świata w latach 2004-2013, w cyklach, w których wykorzystuje się transfer zamrożonych zarodków, widoczna była poprawa wskaźnika żywych urodzeń [366]. Z kolei Maheshwari i wsp. (2017) sugerowali, że zastosowanie mrożonego cyklu i transferu pojedynczych zarodków zmniejsza ryzyko przedwczesnego porodu, natomiast cykl świeży miał wpływ na zwiększone ryzyko przedwczesnego porodu, zaburzeń związanych z nadciśnieniem ciąży oraz dużej masy urodzeniowej dziecka [367]. Wyjaśnieniem tego może być fakt, że kobiety, u których stosowany jest transfer z mrożonych zarodków, mają czas na powrót do fizjologicznego stanu hormonalnego, który być może ma wpływ na ekspresję HLA-G.

Uzupełniając rozważania o roli sHLA-G u pacjentek IVF, należy jeszcze uwzględnić wydzielanie sHLA-G w zależności od zastosowanego u pacjentek protokołu stymulacji jajników. Nie stwierdzono różnic w stężeniach sHLA-G pacjentek, u których zastosowano protokół krótki z antagonistą GnRH oraz długi z agonistą GnRH. Natomiast korelacja sHLA-G przed i po transferze zarodka wykazała, że protokół krótki był bardziej korzystny do zajścia w ciążę, ponieważ stężenia sHLA-G u pacjentek, które przeszły stymulację według krótkiego

protokołu, były wyższe niż u pacjentek, które przeszły stymulację według protokołu długiego (**Rycina 47**). Thaker i wsp. (2020) zaobserwowali, że średnia liczba pobranych oocytów była znacząco wyższa u kobiet z długim protokołem stymulacji z agonistą GnRH w porównaniu do protokołu z antagonistą GnRH (krótkiego) [368]. Natomiast odsetek kobiet z udanym i skutecznym zapłodnieniem *in vitro* był niższy, gdy stosowano długi protokół stymulacji. Niższy wskaźnik ciąż uzyskanych przy zastosowaniu długiego protokołu, może być spowodowany właśnie zbyt dużą liczbą oocytów, które należy pobrać od kobiety, a to z kolei może prowadzić do niepowodzenia implantacji w cyklu świeżym i ryzyka wystąpienia zespołu hiperstymulacji jajników. Stwierdzono, że wskaźnik żywych urodzeń był najwyższy, gdy uzyskano optymalną liczbę oocytów, która wynosiła od 6 do 10. Liczba oocytów zarówno poniżej jak i powyżej tego zakresu może mieć niekorzystny wpływ na skuteczność procedury IVF. Z drugiej strony, równoczesny rozwój kilku oocytów może skutkować produkcją hormonów steroidowych o wysokich stężeniach, co ma niekorzystny wpływ na implantację [368]. Jednak badania te nie analizowały wydzielania sHLA-G i polimorfizmów *HLA-G*. Nie ma badań pokazujących korelacje polimorfizmu HLA-G ze stężeniem rozpuszczalnego HLA-G u pacjentek w zależności od zastosowanego protokołu stymulacji jajników (krótkiego lub długiego). Stężenie sHLA-G u pacjentek, które przeszły stymulację według krótkiego oraz długiego protokołu stymulacji było również zależne od haplotypu, pomimo że pacjentki przyjmowały egzogenny progesteron. Sugeruje to, że endogenne wydzielanie sHLA-G jest ważne nie tylko w kontekście ciąży, ale także pełni rolę immunoregulacyjną dla prawidłowego rozwoju organizmu.

Istnieje badanie pokazujące, że przyczyną braku ekspresji i wydzielania HLA-G może być uszkodzenie lub usunięcie wzmacniacza L, znajdującego się w odległości około 12000 par zasad od promotora genu *HLA-G*. Wzmacniacz L posiada motyw dla czynników transkrypcyjnych z rodziny CEBP i GATA, które mogą regulować ekspresję HLA-G [369]. Mogłoby to wyjaśnić, dlaczego niektóre pacjentki lub kobiety z kontroli, nawet posiadające korzystne haplotypy (np. G-C-del), wydzielały niskie stężenia sHLA-G. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga jednak dodatkowych badań.

HLA-G u mężczyzn

Analizowano również wpływ HLA-G na niepłodność u mężczyzn, którzy wraz z partnerkami poddali się procedurze IVF, co jest istotnym uzupełnieniem badań nad rolą HLA-G w niepłodności. Testowano dwie grupy mężczyzn: mężczyźni uczestniczący w zapłodnieniu

in vitro (materiał do badań pochodził z krwi oraz z nasienia), a także mężczyźni, którzy mieli dzieci dzięki zapłodnieniu naturalnemu (materiał do badań pochodził z krwi) (**rozdział 4.6**). Nie zaobserwowano istotnych różnic w częstościach genotypów *HLA-G* u mężczyzn. Haplotypy *HLA-G* A-C-ins oraz G-G-del były częstsze u mężczyzn z kontroli płodnej niż u mężczyzn IVF, podczas gdy haplotypy A-G-del i G-C-ins były częstsze u mężczyzn z grupy IVF. Wyniki te były zgodne z wynikami genetycznymi kobiet. Haplotypy G-G-ins i A-G-del są bardzo rzadkie w ogólnej populacji, w tym również haplotyp G-C-ins występujący z częstością poniżej 1% [210, 370]. Badania własne pokazały, że haplotyp G-C-ins stanowił 5,96% haplotypów u mężczyzn z kontroli oraz 4,05% haplotypów u kobiet z kontroli. Jednak grupa kontrolna w niniejszej pracy nie jest losowo wybraną grupą osób, a wyselekcjonowaną w kontekście badań nad płodnością. Tak jak w przypadku kobiet, również u mężczyzn rola haplotypu G-C-ins wydaje się być ważna ze względu na związek z najniższym wydzielaniem sHLA-G w nasieniu w porównaniu do innych haplotypów (**Rycina 52**, **Tabela 42**). W dodatku niskie wydzielanie w przypadku haplotypu G-C-ins miało związek z teratozoospermią (**Rycina 53**). Badania w niniejszej pracy doktorskiej, zarówno genetyczne, jak i białkowe, sugerują, że sHLA-G w nasieniu może być zaangażowane w tworzenie odpowiedniej równowagi immunologicznej, wymaganej do utrzymania prawidłowych parametrów plemników. Istnieją doniesienia literaturowe wskazujące właśnie na immunoregulacyjną rolę HLA-G w męskim układzie rozrodczym oraz w nasieniu. Larsen i wsp. (2011) wykryli sHLA-G w nasieniach mężczyzn, a także ekspresję HLA-G na poziomie białka w prawidłowym jądrze i tkance najądrza, ale nie zaobserwowali ekspresji w pęcherzyku nasiennym [197]. HLA-G w jądrach może pełnić funkcję czynnika immunosupresyjnego, który pozwala uniknąć rozpoznania własnych plemników, które mogłyby być postrzegane jako autoantygeny przez układ odpornościowy. Nasienie może również stymulować i modulować układ odpornościowy kobiety w trakcie stosunku płciowego, indukując napływ leukocytów i zmiany ekspresji cytokin i chemokin w szyjce macicy i pochwy nawet do 12 godzin po stosunku płciowym [371, 372]. Poziom sHLA-G w nasieniu może zatem mieć wpływ na indukcję tolerancji partnerki na alloantygeny partnera w trakcie stosunku płciowego, co z kolei może wpływać na prawidłową implantację [197, 198].

W innych badaniach stwierdzono mRNA genu *HLA-G* w niezapłodnionych oocytach oraz zarodkach, które było związane ze wzrostem tempa podziałów komórkowych [190, 191]. Co więcej, HLA-G1 zostało wykryte w stadium blastocysty, natomiast w kontakcie z endometrium w miejscu implantacji, stwierdzono również wydzielanie rozpuszczalnej

izoformy HLA-G5 przez blastocystę [373]. Jeśli zarodek dziedziczyłby ojcowski haplotyp G-C-ins, mogłoby to skutkować niższą produkcją sHLA-G przez zarodek.

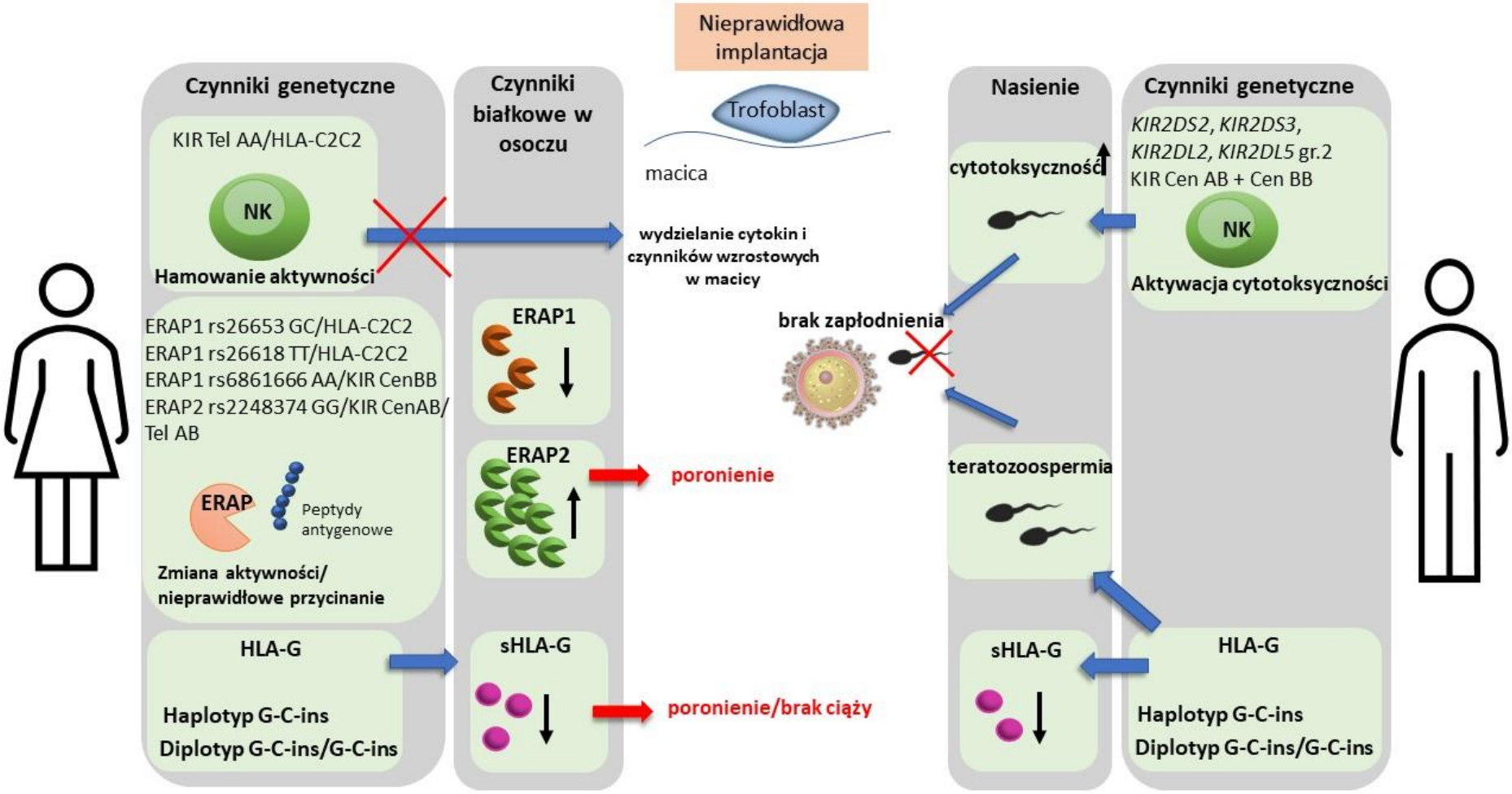
Badania u mężczyzn, tak jak u kobiet, wykazały zależność wydzielanego sHLA-G od polimorfizmów w regionie promotora oraz w regionie 3'UTR genu *HLA-G*. W badaniach własnych stwierdzono, że mężczyźni mieli istotnie różne stężenia sHLA-G w zależności od tego, jaki posiadali haplotyp lub diplotyp (**Rycina 52** i **54**). W analizie haplotypów zauważono, że haplotyp A-C-del warunkował wyższe stężenia sHLA-G, natomiast A-C-ins związany był z niższymi stężeniami sHLA-G. Dahl i wsp. (2014) skorelowali stężenie sHLA-G w nasieniu z polimorfizmem 14-nukleotydowej insercji/delecji u mężczyzn będących pacjentami kliniki leczenia niepłodności [198]. Ich badania wykazały, że genotyp del/del związany był z wyższym poziomem sHLA-G, w przeciwieństwie do genotypu ins/ins, który był skorelowany z niskim poziomem sHLA-G.

Ekspresja HLA-G występuje przeważnie na powierzchni komórek trofoblastu, może być również obserwowana w stanach patologicznych, takich jak nowotwory, przewlekłe infekcje lub też po przeszczepie allogenicznym [209]. W badaniach własnych mężczyźni o haplotypie A-G-del oraz diplotypie A-C-del/A-G-del wydzielali dość wysokie stężenia sHLA-G (około 315 IU/ml w przypadku mężczyzn z normozoospermią). Z kolei w badaniach genetycznych haplotyp A-G-del i diplotyp A-C-del/A-G-del były częstsze u mężczyzn z grupy IVF niż w kontroli (**Tabela 35** i **36**). Mężczyźni z haplotypem A-G-del cechowali się około 3,5 razy większym ryzykiem znalezienia się w grupie IVF, natomiast ryzyko mężczyzn z diplotypem A-C-del/A-G-del było prawie pięciokrotnie większe. Nasuwa się więc pytanie, czy nadmiar wydzielanego sHLA-G może być niekorzystny? Skoro cząsteczka HLA-G ma funkcję immunoregulacyjną, to może regulować odpowiedź immunologiczną. Zatem, gdy HLA-G jest ekspresjonowane przez płód lub przeszczep, może je chronić przed odrzuceniem i pełnić korzystną rolę. Natomiast HLA-G może być również szkodliwe, gdy jest ekspresjonowane przez nowotwór i tym samym może chronić przed odpowiedzią przeciwnowotworową organizmu. Potwierdzono, że wyższe stężenie sHLA-G wiązało się z progresją nowotworów i złym rokowaniem chorych [374-376]. Zwiększona ekspresja HLA-G w nowotworach może być spowodowana wydzielaniem białek związanych z zapaleniem do mikrośrodowiska guza, do których należą IL-6, IL-8, TNF-α oraz immunosupresyjne cytokiny: IL-10 i TGF-β [356].

Niestety wiele wyników dotyczących wydzielania sHLA-G w zależności od diplotypów u mężczyzn, nie mogło być zinterpretowane ze względu na zbyt małą liczbę próbek (**Rycina 54**). Mężczyźni z normozoospermią posiadający haplotyp A-C-del i diplotyp A-C-del/A-C-del wydzielali najwięcej sHLA-G (odpowiednio 574,1 IU/ml i 1047 IU/ml) (**Tabela 43** i **44**).

Z kolei haplotyp G-C-ins i diplotyp G-C-ins/G-C-ins warunkowały najniższe wydzielanie sHLA-G (odpowiednio 80,8 IU/ml i 75,7 IU/ml). Mężczyźni posiadający pozostałe haplotypy i diplotypy wydzielali pośrednie stężenia sHLA-G. Jak już wspomniano, najbardziej korzystne jest zatem posiadanie heterozygotycznych diplotypów, warunkujących pośrednią ekspresję genu i wydzielanie sHLA-G [210]. Promotory heterozygotyczne zapewniają odpowiednią ilość sHLA-G w nasieniu, co z ewolucyjnego punktu widzenia jest korzystne do osiągnięcia sukcesu reprodukcyjnego. Niestety, w badaniu nie było możliwości testowania próbek nasienia od zdrowych mężczyzn, którzy mają dzieci z zapłodnienia naturalnego, co było ograniczeniem tej części pracy – tacy panowie po prostu nie zgłaszają się do klinik leczenia niepłodności. Zbadano jedynie nasienie pacjentów, którzy pomimo prawidłowych parametrów nasienia, zgłaszali się do klinik wraz z partnerkami z powodu niepłodności. Całość badań nad rolą HLA-G u kobiet oraz ich partnerów uczestniczących w zapłodnieniu *in vitro* wskazuje, że polimorfizmy HLA-G oraz wydzielanie sHLA-G mogą mieć wpływ na niepłodność zarówno żeńską, jak i męską.

Na **Rycinie 56** przedstawiono proponowany mechanizm, który może prowadzić do nieprawidłowej implantacji zarodka, uwzględniający analizy najważniejszych czynników genetycznych i białkowych opartych na całych kohortach kobiet i mężczyzn. U kobiet geny *KIR* w regionie telomerycznym AA w kombinacji z *HLA-C2C2* mogą prowadzić do hamowania aktywności komórek NK, jeśli dojdzie do ekspresji receptorów KIR AA. Na skutek tego dochodzi do zahamowania wydzielania cytokin i czynników wzrostowych niezbędnych do rozwoju zarodka. U mężczyzn to genotypy KIR Bx (AB+BB) predysponują do niepłodności, prawdopodobnie przez aktywację cytotoksyczności komórek NK w nasieniu. Wzrost cytotoksyczności prowadzi do potencjalnego ryzyka uszkodzenia plemników lub pogorszenia parametrów nasienia. Poszczególne warianty genetyczne *ERAP* w kombinacjach z *HLA-C* lub *KIR* mogą stwarzać ryzyko zmiany aktywności enzymów ERAP i nieprawidłowe przycinanie peptydów antygenowych, przez co nie dochodzi do prawidłowego rozpoznawania HLA zarodka przez receptory KIR kobiety. Najbardziej niekorzystne zarówno dla kobiety, jak i dla mężczyzny, jest posiadanie haplotypu *HLA-G* G-C-ins lub diplotypu G-C-ins/G-C-ins. Może mieć to wpływ na niskie stężenia rozpuszczalnego sHLA-G w osoczu u kobiet lub w nasieniu u mężczyzn. Ponadto u mężczyzn może wiązać się to z wystąpieniem teratozoospermii, co zmniejsza szansę na skuteczne zapłodnienie. Aminopeptydazy ERAP krążące w osoczu kobiety, mogą być biomarkerem niepowodzeń implantacji zarodka. Istnieje ryzyko nieudanej implantacji, gdy kobieta ma obniżone stężenie ERAP1, ale podwyższone ERAP2. W dodatku wysokie stężenia ERAP2 mogą wskazywać na wystąpienie poronienia, dlatego takie pacjentki powinny być pod szczególną opieką lekarską.



Rycina 56. Proponowany mechanizm niepowodzeń implantacji zarodka przy najbardziej niekorzystnym zestawie czynników genetycznych i białkowych u kobiety i mężczyzny. Opracowanie własne.

6. Wnioski

1. Nosicielki genów dla receptorów hamujących *KIR* z regionu telomerycznego AA i *HLA-C2C2* są obarczone wyższym ryzykiem niepłodności i nawracających niepowodzeń implantacji zarodka.

2. Mężczyźni z zestawem genów dla receptorów aktywujących *KIR* (Cen AB i Cen BB) charakteryzują się większym prawdopodobieństwem niepłodności, co może mieć wpływ na niepłodność pary.

3. Niektóre polimorfizmy pojedynczego nukleotydu *ERAP1* i *ERAP2* u kobiet *HLA-C2* pozytywnych, a także kombinacje *ERAP1*/*HLA-C/KIR* w układzie kobieta/partner, mają związek z niepłodnością i RIF. Rozpuszczalna forma ERAP2 mierzona w osoczu kobiet może być wskaźnikiem przewidującym wystąpienie poronienia.

4. Polimorfizmy w regionie promotora oraz 3'UTR genu *HLA-G* mają związek z niepłodnością zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn. Najbardziej niekorzystnym haplotypem jest układ G-C-ins (-964G/-725C/+14 pz ins). Polimorfizm genu *HLA-G* wpływa na wydzielanie rozpuszczalnej formy sHLA-G i powodzenie ciąży. Kobiety po stymulacji jajników protokołem krótkim (z antagonistą GnRH) i w cyklu mrożonym mają większe szanse na powodzenie ciąży.

7. Spis rycin i tabel

Rycina 1. Proces implantacji zarodka i komórki na styku matczyno-płodowym. (A) Trofoblast (kolor czerwony) i maciczne komórki NK (kolor zielony) na modelu mysim; zdjęcie z mikroskopu konfokalnego według Madeja i wsp. (2011) [84]. (B) Różnicowanie się trofoblastu na modelu ludzkim według Jebrane-Ferrat (2019) [85]. 18

Rycina 2. Struktura receptorów KIR według Aribi (2017) [146]. 25

Rycina 3. Organizacja chromosomu 19 przedstawiająca położenie genów *KIR*, ich haplotypy A i B, strukturę genu *KIR2DL1* oraz strukturę receptora KIR2DL1 według Djaoud i Parham (2020) [158]. 26

Rycina 4. Haplotypy genów *KIR* z podziałem na region centromeryczny i telomeryczny. 2DS4f oznacza wariant z pełną długością, a 2DS4v oznacza wariant występujący w formie delecyjnej według Jiang i wsp. (2012) [169]. 28

Rycina 5. Receptory KIR i ich ligandy według Beziat i wsp. (2016) [139]. 31

Rycina 6. Trofoblast pozakosmkowy (EVT) i bezpośredni kontakt z doczesnowymi komórkami NK (dNK) według Tilburgs i wsp. (2015) [200]. 33

Rycina 7. Pełnej długości pierwotny transkrypt *HLA-G* oraz jego 7 izoform powstałych na skutek alternatywnego splicingu według Attia i wsp. (2020) [143]. 35

Rycina 8. Powstawanie i prezentacja antygenu przez cząsteczki MHC klasy I według Fierabracci i wsp. (2012) z własnymi modyfikacjami [219]. 36

Rycina 9. Schemat organizacji genów *ERAP1* i *ERAP2* i ich izoformy według Fruci i wsp. (2014) [231]. 38

Rycina 10. Zdjęcie modelowe z genotypowania zestawem KIR Ready-Gene przedstawiające wielkości produktów PCR. 53

Rycina 11. Zdjęcie modelowe z genotypowania *HLA-C* C1 i C2. 54

Rycina 12. Zdjęcie modelowe z typowania 14-nukleotydowej insercji/delecji w genie *HLA-G*. 56

Rycina 13. Zdjęcie modelowe z genotypowania *HLA-G* rs1233334 (G>C/T) metodą RT-PCR. 58

Rycina 14. Genotypowanie ERAP1 rs30187 (C>T) metodą RT-PCR. 60

Rycina 15. Schemat ilustrujący testowane *KIR*, *HLA-C* i *ERAP* w kontekście implantacji zarodka. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee (2017) [266]. 64

Rycina 16. Kominacje *KIR/HLA-C* u kobiet z grup IVF oraz kontroli płodnej. 66

Rycina 17. Kombinacje *KIR* w regionie telomerycznym z *HLA-C* u kobiet z grup IVF oraz kontroli płodnej. 67

Rycina 18. Kombinacje *KIR* centromeryczny/telomeryczny z *HLA-C* u kobiet z grup IVF i kontroli płodnej. 67

Rycina 19. Częstość genotypów *ERAP1* rs27044 i *ERAP1* rs26618 u kobiet z grup IVF i kontroli płodnej. 68

Rycina 20. Porównania częstości genotypów *ERAP1 rs*26653 u kobiet z grup IVF i kontroli płodnej w kombinacjach z *HLA-C* (A), z *HLA-C* i *KIR* (B) oraz z *KIR* (C). 71

Rycina 21. Porównania częstości genotypów *ERAP1 rs*26618 u kobiet z grup IVF i kontroli płodnej w kombinacjach z *HLA-C* (A), z *HLA-C* i *KIR* (B) oraz z *KIR* (C). 73

Rycina 22. Porównanie częstości genotypów *ERAP1 rs*2287987 u kobiet z grup IVF i kontroli płodnej w kombinacjach z genami *KIR* w regionie telomerycznym BB. 74

Rycina 23. Porównanie częstości genotypów *ERAP1 rs*6861666 u kobiet z grup IVF i kontroli płodnej w kombinacjach z genami *KIR* (A) oraz *KIR/HLA-C* (B). 75

Rycina 24. Porównanie częstości genotypów *ERAP2 rs*2248374 u kobiet z grup IVF i kontroli płodnej w kombinacjach z genami *KIR*. 76

Rycina 25. Schemat ilustrujący badaną kombinację *KIR* i *HLA-C*. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee (2017) [266]. 84

Rycina 26. Schemat ilustrujący badaną kombinację genów *ERAP* pochodzenia matczynego i *HLA-C* pochodzenia ojcowskiego. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee (2017) [266]. 85

Rycina 27. Schemat ilustrujący badaną kombinację genów *KIR* kobiety i *ERAP* pochodzenia matczynego oraz *HLA-C* pochodzenia ojcowskiego. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee (2017) [266]. 87

Rycina 28. Porównanie częstości kombinacji *ERAP1* rs27044 kobiety/*HLA-C* mężczyzny/*KIR* kobiety wśród par z grup IVF i kontroli płodnej. 88

Rycina 29. Schemat ilustrujący badaną kombinację genów *KIR* kobiety i *HLA-C* pochodzenia matczynego oraz *ERAP* pochodzenia ojcowskiego. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee 2017 [266]. 89

Rycina 30. Schemat ilustrujący badaną kombinację genów *KIR* kobiety i *HLA-C* oraz *ERAP* pochodzenia ojcowskiego. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee 2017 [266]. 90

Rycina 31. Schemat ilustrujący badaną kombinację genów *ERAP* i *HLA-C* pochodzenia matczynego oraz *HLA-C* pochodzenia ojcowskiego. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee (2017) [266]. 91

Rycina 32. Schemat ilustrujący badaną kombinację genów *ERAP i HLA-C* pochodzenia ojcowskiego oraz *HLA-C* pochodzenia matczynego. Strzałkami (od 1 do 3) oznaczono kolejne etapy powstawania peptydu antygenowego. Na podstawie Lee (2017) [266]. 92

Rycina 33. Stężenie ERAP1 i ERAP2 w osoczu kobiet kontrolnych i kobiet IVF. 93

Rycina 34. Stężenie ERAP2 w osoczu kobiet RIF, SIVF i kontroli. 95

Rycina 35. Stężenie ERAP1 w osoczu pacjentek IVF oraz kontroli płodnej. 96

Rycina 36. Stężenie ERAP2 w osoczu pacjentek IVF oraz kontroli. 98

Rycina 37. Analizy ROC dla stężenia ERAP2 u pacjentek, które doznały poronienia i kobiet z kontroli płodnej. 100

Rycina 38. Stężenie sHLA-G (IU/ml) w osoczu pacjentek i kontroli płodnej. 107

Rycina 39. Stężenie sHLA-G (IU/ml) mierzone przed i po transferze zarodka u wszystkich pacjentek IVF w zależności od haplotypu *HLA-G*. 108

Rycina 40. Zależność stężenia sHLA-G od haplotypu u wszystkich kobiet kontrolnych. 110

Rycina 41. Stężenie sHLA-G w osoczu (IU/ml) w zależności od haplotypów *HLA-G* wśród pacjentek IVF, które zaszły w ciążę (A), nie zaszły w ciążę (B) lub doznały poronienia (C) po transferze zarodka. 113

Rycina 42. Korelacje sHLA-G przed i po transferze zarodka w zależności od haplotypu *HLA-G*. 117

Rycina 43. Stężenie sHLA-G (IU/ml) mierzone przed i po transferze zarodka u wszystkich pacjentek IVF w zależności od diplotypu *HLA-G*. 120

Rycina 44. Stężenie sHLA-G (IU/ml) kobiet z kontroli płodnej w zależności od diplotypu *HLA-G*. 122

Rycina 45. Stężenie sHLA-G u pacjentek IVF (A) oraz korelacja sHLA-G przed i po transferze zarodka (B) w cyklu świeżym i mrożonym. 125

Rycina 46. Stężenie sHLA-G u pacjentek IVF o różnych haplotypach *HLA-G* w zależności od cyklu świeżego lub mrożonego. 127

Rycina 47. Stężenie sHLA-G u pacjentek IVF (A) oraz korelacja sHLA-G przed i po transferze zarodka (B) w zależności od krótkiego i długiego protokołu stymulacji. 130

Rycina 48. Stężenie sHLA-G u pacjentek IVF według haplotypów *HLA-G* w zależności od krótkiego lub długiego protokołu stymulacji. 132

Rycina 49. Analizy ROC dla stężenia sHLA-G u pacjentek IVF i kontroli płodnej. 135

Rycina 50. Analizy ROC dla stężenia sHLA-G u pacjentek z brakiem ciąży lub poronieniami po IVF i kobiet z kontroli płodnej. 137

Rycina 51. Analiza ROC dla stężenia sHLA-G mierzonego po transferze zarodka u pacjentek, które zaszły w ciążę po *in vitro* oraz pacjentek, które nie zaszły w ciążę lub miały poronienie. 138

Rycina 52. Stężenie sHLA-G w nasieniu mężczyzn w zależności od haplotypów *HLA-G* i parametrów nasienia. 149

Rycina 53. Stężenie sHLA-G w nasieniu mężczyzn o haplotypie G-C-ins. 151

Rycina 54. Stężenie sHLA-G w nasieniu mężczyzn w zależności od diplotypów *HLA-G* i parametrów nasienia. 153

Rycina 55. Potencjalne interakcje pomiędzy kobietą a jej partnerem w kombinacjach ERAP/HLA-C/KIR wynikające z badań własnych (A-F). Opracowanie własne 171

Rycina 56. Proponowany mechanizm niepowodzeń implantacji zarodka przy najbardziej niekorzystnym zestawie czynników genetycznych i białkowych u kobiety i mężczyzny. Opracowanie własne. 187

Tabela 1. Ligandy HLA dla receptorów KIR [136, 139, 185, 188]. 32

Tabela 2. Charakterystyka pacjentów oraz kontroli płodnej. 45

Tabela 3. Nazewnictwo dotyczące jakości nasienia na podstawie “WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen – 5th ed” [60]. 47

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej dla typowania genów *KIR* dla jednej osoby. 50

Tabela 5. Warianty polimorficzne *KIR*, wielkości produktów PCR dla testowanych genów i kontroli wewnętrznych oraz sekwencje starterów dla poszczególnych wariantów (według producenta). 52

Tabela 6. Sekwencje starterów użytych do genotypowania allotypów *HLA-C*. 53

Tabela 7. Sekwencje starterów użytych do genotypowania insercji/delecji w genie *HLA-G*. 55

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej do genotypowania *HLA-G* metodą RT-PCR. 57

Tabela 9. Polimorfizmy *HLA-G* badane metodą RT-PCR oraz ich sondy. 57

Tabela 10. Badane polimorfizmy *ERAP1* i *ERAP2*. 59

Tabela 11. Kombinacje *ERAP/HLA-C* i *KIR* u pacjentek i kobiet z kontroli. 69

Tabela 12. Haplotypy *ERAP1/ERAP2* u pacjentek i kobiet z kontroli płodnej. 77

Tabela 13. Rozkład częstości genów i genotypów *KIR* oraz genotypów *HLA-C* u partnerów kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz partnerów kobiet płodnych. 79

Tabela 14. Kombinacje *ERAP/HLA-C* i *KIR* u kobiet i ich partnerów. 83

Tabela 15. Stężenie ERAP1 i ERAP2 w osoczu kobiet kontrolnych i kobiet IVF – statystyka opisowa. 94

Tabela 16. Stężenie ERAP2 w osoczu kobiet RIF, SIVF i kontroli – statystyka opisowa. 95

Tabela 17. Stężenie ERAP1 w osoczu pacjentek IVF i kontroli – statystyka opisowa. 97

Tabela 18. Stężenie ERAP2 w osoczu pacjentek IVF i kontroli – statystyka opisowa. 99

Tabela 19. Rozkład częstości genotypów i alleli *HLA-G* u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kobiet kontrolnych. 101

Tabela 20. Rozkład częstości haplotypów *HLA-G* u kobiet z grup IVF i kobiet z kontroli. 102

Tabela 21. Rozkład częstości diplotypów *HLA-G* u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kobiet płodnych. 104

Tabela 22. Mediany stężenia sHLA-G u kobiet z grupy IVF oraz kobiet z kontroli. 107

Tabela 23. Stężenie sHLA-G (IU/ml) mierzone przed i po transferze zarodka u wszystkich pacjentek IVF w zależności od haplotypu *HLA-G* – statystyka opisowa. 109

Tabela 24. Stężenie sHLA-G (IU/ml) mierzone u wszystkich kobiet kontrolnych – statystyka opisowa. 110

Tabela 25. Stężenie sHLA-G u kobiet IVF i kobiet z grupy kontrolnej w zależności od haplotypu *HLA-G*. 111

Tabela 26. Stężenie sHLA-G (IU/ml) w zależności od haplotypu *HLA-G* u pacjentek IVF, które zaszły w ciążę po transferze – statystyka opisowa. 114

Tabela 27. Stężenie sHLA-G (IU/ml) w zależności od haplotypu *HLA-G* u pacjentek IVF, które nie zaszły w ciążę po transferze – statystyka opisowa. 114

Tabela 28. Stężenie sHLA-G (IU/ml) w zależności od haplotypu *HLA-G* u pacjentek IVF, które poroniły po transferze – statystyka opisowa. 115

Tabela 29. Stężenie sHLA-G w zależności od haplotypów *HLA-G* u kobiet, które zaszły w ciążę po zapłodnieniu *in vitro*. 116

Tabela 30. Stężenie sHLA-G (IU/ml) mierzone przed i po transferze zarodka u wszystkich pacjentek IVF w zależności od diplotypu *HLA-G* – statystyka opisowa. 121

Tabela 31. Stężenie sHLA-G (IU/ml) kobiet z kontroli płodnej w zależności od diplotypu *HLA-G* – statystyka opisowa. 123

Tabela 32. Stężenie sHLA-G u kobiet IVF i kobiet płodnych w zależności od diplotypu *HLA-G*. 124

Tabela 33. Stężenie sHLA-G u pacjentek IVF o różnych haplotypach *HLA-G* w zależności od cyklu świeżego lub mrożonego – statystyka opisowa. 128

Tabela 34. Stężenie sHLA-G u pacjentek IVF według haplotypów *HLA-G* w zależności od krótkiego lub długiego protokołu stymulacji – statystyka opisowa. 133

Tabela 35. Rozkład częstości haplotypów *HLA-G* u partnerów kobiet IVF i kobiet z kontroli płodnej. 140

Tabela 36. Rozkład częstości diplotypów *HLA-G* u partnerów kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz partnerów kobiet płodnych. 141

Tabela 37. Rozkład częstości haplotypów *HLA-G u* mężczyzn IVF według liczby plemników w nasieniu. 142

Tabela 38. Rozkład częstości haplotypów *HLA-G* u mężczyzn IVF według ruchliwości i morfologii plemników w nasieniu. 143

Tabela 39. Rozkład częstości diplotypów *HLA-G u* mężczyzn IVF według liczby plemników w nasieniu. 144

Tabela 40. Rozkład częstości diplotypów *HLA-G u* mężczyzn IVF według ruchliwości i morfologii plemników w nasieniu. 145

Tabela 41. Stężenie sHLA-G w nasieniu mężczyzn IVF w zależności od parametrów nasienia – statystyka opisowa. 146

Tabela 42. Stężenie sHLA-G w nasieniach u mężczyzn z normozoospermią i nieprawidłowymi parametrami nasienia w zależności od haplotypów i diplotypów *HLA-G*. 147

Tabela 43. Stężenie sHLA-G w nasieniu mężczyzn w zależności od haplotypów *HLA-G* i parametrów nasienia – statystyka opisowa. 150

Tabela 44. Stężenie sHLA-G w nasieniu mężczyzn w zależności od diplotypów *HLA-G* i parametrów nasienia – statystyka opisowa. 154

8. Literatura

1. Larsen U: Research on infertility: which definition should we use? *Fertil Steril*. 2005;83(4):846-852. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.033.
2. Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definition and causes of infertility. *Reprod Biomed Online*. 2001;2(1):41-53. doi: 10.1016/s1472-6483(10)62187-6.
3. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, i in. The international glossary on infertility and fertility care. *Fertil* Steril. 2017;108(3):393-406. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.06.005.
4. Deyhoul N, Mohamaddoost T, Hosseini M. Infertility-Related Risk Factors: A Systematic Review. *Int. J. Women's Health Reprod. Sci*. 2017;5(1):24–29. doi: 10.15296/ijwhr.2017.05.
5. Vander Borght M, Wyns Ch. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem*. 2018;62:2-10. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012.
6. Khizroeva J, Nalli C, Bitsadze V, Lojacono A, Zatti S, Andreoli L. Infertility in women with systemic autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2019;33(6):101369. doi: 10.1016/j.beem.2019.101369.
7. Sun H, Gong TT, Jiang YT, Zhang S, Zhao YH, Wu QJ. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: results from a global burden of disease study, 2017. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(23):10952-10991. doi: 10.18632/aging.102497.
8. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13:37. doi: 10.1186/s12958-015-0032-1.
9. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*. 2012;9(12):e1001356. doi: 10.1371/journal.pmed.1001356.
10. Łukaszuk K, Kozioł K, Jakiel G, Jakimiuk A, Jędrzejczak P, Kuczyński W i in. : Diagnostyka i leczenie niepłodności – rekomendacje Polskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu i Embriologii (PTMRiE) oraz Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników (PTGP). *Ginekologia i Perinatologia Praktyczna*. 2018;3(3):112-140.
11. Janicka A, Spaczynski RZ, Koziol K, Radwan M, Kurzawa R. Assisted reproductive medicine in Poland, 2013-2016: Polish Society of Reproductive Medicine and Embryology (PTMRiE) and Fertility and Sterility Special Interest Group of the Polish Society of Gynaecologists and Obstetricians (SPiN PTGiP) report. *Ginekol Pol*. 2021;92(1):7-15. doi: 10.5603/GP.a2020.0142.
12. Łepecka-Klusek C, Pilewska-Kozak AB, Jakiel G. Niepłodność w świetle definicji choroby podanej przez WHO. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*. 2012;18(2):163-166.
13. Johnson M. Human in vitro fertilisation and developmental biology: a mutually influential history. *Development*. 2019;146(17):dev183145. doi: 10.1242/dev.183145.
14. Kandavel V, Cheong Y. Does intra-uterine insemination have a place in modern ART practice? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;53:3-10. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.08.003.
15. Mackens S, Santos-Ribeiro S, van de Vijver A, Racca A, Van Landuyt L, Tournaye H i in. Frozen embryo transfer: a review on the optimal endometrial preparation and timing. *Hum Reprod*. 2017;32(11):2234-2242. doi: 10.1093/humrep/dex285.

16. Lo Monte G, Murisier F, Piva I, Germond M, Marci R. Focus on intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a mini-review. *Asian J Androl*. 2013;15(5):608-615. doi: 10.1038/aja.2013.54.

17. Esteves SC, Humaidan P, Roque M, Agarwal A. Female infertility and assisted reproductive technology. *Panminerva Med*. 2019;61(1):1-2. doi: 10.23736/S0031-0808.18.03553-X.

18. Crawford GE, Ledger WL. In vitro fertilisation/intracytoplasmic sperm injection beyond 2020. *BJOG*. 2019;126(2):237-243. doi: 10.1111/1471-0528.15526.

19. DeAngelis A, Martini AE, Owen CM. Assisted Reproductive Technology and Epigenetics. *Semin Reprod Med*. 2018;36(3-04):221-232. doi: 10.1055/s-0038-1675780.

20. Kovács GL, Montskó G, Zrínyi Z, Farkas N, Várnagy A, Bódis J. Non-Invasive Assessment of Viability in Human Embryos Fertilized in Vitro. *EJIFCC*. 2016;27(2):112-121.

21. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirol A, Gurgan T i in. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(1):14-38. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.08.011.

22. Sheikhansari G, Pourmoghadam Z, Danaii S, Mehdizadeh A, Yousefi M. Etiology and management of recurrent implantation failure: A focus on intra-uterine PBMC-therapy for RIF. *J Reprod Immunol*. 2020;139:103121. doi: 10.1016/j.jri.2020.103121.

23. Bashiri A, Halper KI, Orvieto R. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018;16(1):121. doi: 10.1186/s12958-018-0414-2.

24. Timeva T, Shterev A, Kyurkchiev S. Recurrent implantation failure: the role of the endometrium. *J Reprod Infertil*. 2014;15(4):173-183.

25. Polanski ŁT, Baumgarten MN, Quenby S, Brosens J, Campbell BK, Raine-Fenning NJ. What exactly do we mean by 'recurrent implantation failure'? A systematic review and opinion. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(4):409- 423. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.12.006.

26. Orvieto R, Brengauz M, Feldman B. A novel approach to normal responder patient with repeated implantation failures – a case report. *Gynecol Endocrinol*. 2015;31(6):435-7. doi: 10.3109/09513590.2015.1005595.

27. Zeyneloglu HB, Onalan G. Remedies for recurrent implantation failure. *Semin Reprod Med*. 2014;32(4):297-305. doi: 10.1055/s-0034-1375182.

28. Makrigiannakis A, BenKhalifa M, Vrekoussis T, Mahjub S, Kalantaridou SN, Gurgan T. Repeated implantation failure: a new potential treatment option. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(4):380-384. doi: 10.1111/eci.12417.

29. Simon A, Laufer N. Repeated implantation failure: clinical approach. *Fertil Steril*. 2012;97(5):1039-1043. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.03.010.

30. Busnelli A, Reschini M, Cardellicchio L, Vegetti W, Somigliana E, Vercellini P. How common is real repeated implantation failure? An indirect estimate of the prevalence. *Reprod Biomed Online*. 2020;40(1):91-97. doi: 10.1016/j.rbmo.2019.10.014.

31. Nardelli AA, Stafinski T, Motan T, Klein K, Menon D. Assisted reproductive technologies (ARTs): evaluation of evidence to support public policy development. *Reprod Health*. 2014;11(1):76. doi: 10.1186/1742-4755-11-76.

32. Colaco S, Sakkas D. Paternal factors contributing to embryo quality. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(11):1953-1968. doi: 10.1007/s10815-018-1304-4.

33. Ali SB, Jeelall Y, Pennell CE, Hart R, McLean-Tooke A, Lucas M. The role of immunological testing and intervention in reproductive medicine: A fertile collaboration? *Am J Reprod Immunol*. 2018;79(3). doi: 10.1111/aji.12784.

34. Ray A, Shah A, Gudi A, Homburg R. Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(6):591- 602. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.02.021.

35. Ikhena DE, Bulun SE. Literature Review on the Role of Uterine Fibroids in Endometrial Function. *Reprod Sci*. 2018;25(5):635-643. doi: 10.1177/1933719117725827.

36. Coughlan C. What to do when good-quality embryos repeatedly fail to implant. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;53:48-59. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.07.004.

37. Bulun SE, Yilmaz BD, Sison Ch, Miyazaki K, Bernardi L, Liu S i in. Endometriosis. *Endocr Rev*. 2019;40(4):1048-1079. doi: 10.1210/er.2018-00242.

38. Tanbo T, Fedorcsak P. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017;96(6):659-667. doi: 10.1111/aogs.13082.

39. Chapron Ch, Marcellin L, Borghese B, Santulli P. Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(11):666-682. doi: 10.1038/s41574-019-0245-z.

40. de Ziegler D, Pirtea P, Galliano D, Cicinelli E, Meldrum D. Optimal uterine anatomy and physiology necessary for normal implantation and placentation. *Fertil Steril*. 2016;105(4):844-854. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.02.023.

41. Yakin K, Balaban B, Urman B. Impact of the presence of one or more multinucleated blastomeres on the developmental potential of the embryo to the blastocyst stage. *Fertil Steril*. 2005;83(1):243-245. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.08.016.

42. Kirillova A, Lysenkov S, Farmakovskaya M, Kiseleva Y, Martazanova B, Mishieva N i in. Should we transfer poor quality embryos? *Fertil Res Pract*. 2020;6:2. doi: 10.1186/s40738-020-00072-5.

43. Cakiroglu Y, Tiras B. Determining diagnostic criteria and cause of recurrent implantation failure. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2020;32(3):198- 204. doi: 10.1097/GCO.0000000000000620.

44. Verberg MFG, Eijkemans MJC, Macklon NS, Heijnen EMEW, Baart EB, Hohmann FP i in. The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2009;15(1):5-12. doi: 10.1093/humupd/dmn053.

45. Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, Opstal DV, Beckers NGM, Verhoeff A i in. Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2007;22(4):980-988. doi: 10.1093/humrep/del484.

46. Spanò M, Bonde JP, Hjøllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril*. 2000;73(1):43-50. doi: 10.1016/s0015-0282(99)00462-8.

47. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ i in. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl*. 2010;33(1):e221-7. doi: 10.1111/j.1365-2605.2009.00995.x.

48. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 2001;75(4):674-677. doi: 10.1016/s0015-0282(00)01796-9.

49. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A i in. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril*. 2003;79 Suppl 3:1597-1605. doi: 10.1016/s0015-0282(03)00337-6.

50. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl*. 2017;19(1):80-90. doi: 10.4103/1008-682X.182822.

51. Zini A. Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Syst Biol Reprod Med*. 2011;57(1-2):78-85. doi: 10.3109/19396368.2010.515704.

52. Cissen M, van Wely M, Scholten I, Mansell S, de Bruin JP, Mol BW i in. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016;11(11):e0165125. doi: 10.1371/journal.pone.0165125.

53. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril*. 2008;89(4):823-831. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.04.055.

54. Bronet F, Martínez E, Gaytán M, Liñán A, Cernuda D, Ariza M i in. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients. *Hum Reprod*. 2012;27(7):1922-1999. doi: 10.1093/humrep/des148.

55. Coughlan C, Clarke H, Cutting R, Saxton J, Waite S, Ledger W i in. Sperm DNA fragmentation, recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Asian J Androl*. 2015;17(4):681-685. doi: 10.4103/1008-682X.144946.

56. Gill K, Rosiak-Gill A, Jakubik J, Patorski Ł, Łukaszuk M, Piasecka M. The higher risk for sperm DNA damage in infertile men. *Ginekol Pol*. 2019;90(12):684-691. doi: 10.5603/GP.2019.0117.

57. Sengupta P, Borges Jr E, Dutta S, Krajewska-Kulak E. Decline in sperm count in European men during the past 50 years. *Hum Exp Toxicol*. 2018;37(3):247-255. doi: 10.1177/0960327117703690.

58. Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I i in. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update*. 2017;23(6):646-659. doi: 10.1093/humupd/dmx022.

59. Virtanen HE, Jørgensen N, Toppari J. Semen quality in the 21st century. *Nat Rev Urol.* 2017;14(2):120-130. doi: 10.1038/nrurol.2016.261.

60. World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. World Health Organization. (https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261).

61. Viotti M. Preimplantation Genetic Testing for Chromosomal Abnormalities: Aneuploidy, Mosaicism, and Structural Rearrangements. *Genes (Basel).* 2020;11(6):602. doi: 10.3390/genes11060602.

62. Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod*. 2006;21(12):3036-3043. doi: 10.1093/humrep/del305.

63. Voullaire L, Collins V, Tracey Callaghan T, McBain J, Williamson R, Wilton L. High incidence of complex chromosome abnormality in cleavage embryos from patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril*. 2007;87(5):1053-1058. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.11.043.

64. Raziel A, Friedler S, Schachter M, Kasterstein E, Strassburger D, Ron-El R. Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2002 Sep;78(3):515-519. doi: 10.1016/s0015-0282(02)03298-3.

65. Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod*. 2001;16(1):82-90. doi: 10.1093/humrep/16.1.82.

66. Caglar GS, Asimakopoulos B, Nikolettos N, Diedrich K, Al-Hasani S. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in repeated implantation failure. *Reprod Biomed Online*. 2005;10(3):381-388. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61800-7.

67. Harton GL, Tempest HG. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J Androl*. 2012;14(1):32-39. doi: 10.1038/aja.2011.66.

68. Brezina PR, Anchan R, Kearns WG. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(7):823-832. doi: 10.1007/s10815-016-0740-2.

69. Abhari S, Kawwass JF. Pregnancy and Neonatal Outcomes after Transfer of Mosaic Embryos: A Review. *J Clin Med*. 2021;10(7):1369. doi: 10.3390/jcm10071369.

70. Spinella F, Fiorentino F, Biricik A, Bono S, Ruberti A, Cotroneo E i in. Extent of chromosomal mosaicism influences the clinical outcome of in vitro fertilization treatments. *Fertil Steril*. 2018;109(1):77-83. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.09.025.

71. Munné S, Spinella F, Grifo J, Zhang J, Beltran MP, Fragouli E i in. Clinical outcomes after the transfer of blastocysts characterized as mosaic by high resolution Next Generation Sequencing-further insights. *Eur J Med Genet*. 2020;63(2):103741. doi: 10.1016/j.ejmg.2019.103741.

72. Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, Griesinger G; Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update*. 2007;13(4):365-377. doi: 10.1093/humupd/dmm011.

73. Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G. Inflammation and implantation. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(1):17-21. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00792.x.

74. Cakmak H, Taylor HS. Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment. *Hum Reprod Update*. 2011;17(2):242-253. doi: 10.1093/humupd/dmq037.

75. Pollheimer J, Vondra S, Baltayeva J, Beristain AG, Knöfler M. Regulation of Placental Extravillous Trophoblasts by the Maternal Uterine Environment. *Front Immunol*. 2018;9:2597. doi: 10.3389/fimmu.2018.02597.

76. Anin SA, Vince G, Quenby S. Trophoblast invasion. *Hum Fertil (Camb)*. 2004;7(3):169-174. doi: 10.1080/14647270400006911.

77. Baines KJ, Renaud SJ. Transcription Factors That Regulate Trophoblast Development and Function. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;145:39-88. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.12.003.

78. Huppertz B. The feto-maternal interface: setting the stage for potential immune interactions. *Semin Immunopathol*. 2007;29(2):83-94. doi: 10.1007/s00281-007-0070-7.

79. Sato Y. Endovascular trophoblast and spiral artery remodeling. *Mol Cell Endocrinol*. 2020;503:110699. doi: 10.1016/j.mce.2019.110699.

80. Albrecht ED, Pepe GJ. Regulation of Uterine Spiral Artery Remodeling: a Review. *Reprod Sci*. 2020;27(10):1932-1942. doi: 10.1007/s43032-020-00212-8.

81. Liu H, Huang X, Mor G, Liao A. Epigenetic modifications working in the decidualization and endometrial receptivity. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(11):2091-2101. doi: 10.1007/s00018-019-03395-9.

82. Sharma S, Godbole G, Modi D. Decidual Control of Trophoblast Invasion. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(3):341-350. doi: 10.1111/aji.12466.

83. Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol*. 2007;5:6. doi: 10.1186/1477-7827-5-6.

84. Madeja Z, Yadi H, Apps R, Boulenouar S, Roper SJ, Gardner L. Paternal MHC expression on mouse trophoblast affects uterine vascularization and fetal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(10):4012-4017. doi: 10.1073/pnas.1005342108.

85. Jabrane-Ferrat N. Features of Human Decidual NK Cells in Healthy Pregnancy and During Viral Infection. *Front Immunol*. 2019;10:1397. doi: 10.3389/fimmu.2019.01397.

86. Ticconi C, Pietropolli A, Di Simone N, Piccione E, Fazleabas A. Endometrial Immune Dysfunction in Recurrent Pregnancy Loss. *Int J Mol Sci*. 2019;20(21):5332. doi: 10.3390/ijms20215332.

87. Alecsandru D, García-Velasco JA. Immunology and human reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2015;27(3):231-234. doi: 10.1097/GCO.0000000000000174.

88. Franasiak JM, Scott RT. Contribution of immunology to implantation failure of euploid embryos. *Fertil Steril*. 2017;107(6):1279-1283. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.04.019.

89. Cornish EF, Filipovic I, Åsenius F, Williams DJ, McDonnell T. Innate Immune Responses to Acute Viral Infection During Pregnancy. *Front Immunol*. 2020 Sep 30;11:572567. doi: 10.3389/fimmu.2020.572567.

90. Abu-Raya B, Michalski C, Sadarangani M, Lavoie PM. Maternal Immunological Adaptation During Normal Pregnancy. *Front Immunol*. 2020 Oct 7;11:575197. doi: 10.3389/fimmu.2020.575197.

91. Rosenberg EB, Herberman RB, Levine PH, Halterman RH, McCoy JL, Wunderlich JR. Lymphocyte cytotoxicity reactions to leukemia-associated antigens in identical twins. *Int J Cancer*. 1972;9(3):648-658. doi: 10.1002/ijc.2910090323.

92. Di Vito C, Mikulak J, Mavilio D. On the Way to Become a Natural Killer Cell. *Front Immunol*. 2019;10:1812. doi: 10.3389/fimmu.2019.01812.

93. Stokic-Trtica V, Diefenbach A, Klose CSN. NK Cell Development in Times of Innate Lymphoid Cell Diversity. *Front Immunol*. 2020;11:813. doi: 10.3389/fimmu.2020.00813.

94. Zitti B, Bryceson YT. Natural killer cells in inflammation and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018;42:37-46. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.08.001.

95. Zhou J, Tian Z, Peng H. Tissue-resident NK cells and other innate lymphoid cells. *Adv Immunol*. 2020;145:37-53. doi: 10.1016/bs.ai.2019.11.002.

96. Michel T, Poli A, Cuapio A, Briquemont B, Iserentant G, Ollert M i in. Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol*. 2016;196(7):2923-2931. doi: 10.4049/jimmunol.1502570.

97. Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*. 2009;126(4):458-465. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x.

98. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol*. 2018;9:1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869.

99. Amand M, Iserentant G, Poli A, Sleiman M, Fievez V, Sanchez IP i in. Human CD56(dim)CD16(dim) Cells As an Individualized Natural Killer Cell Subset. *Front Immunol*. 2017;8:699. doi: 10.3389/fimmu.2017.00699.

100. Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity*. 2017;47(5):820-833. doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.008.

101. Di Vito C, Mikulak J, Zaghi E, Pesce S, Marcenaro E, Mavilio D. NK cells to cure cancer. *Semin Immunol*. 2019;41:101272. doi: 10.1016/j.smim.2019.03.004.

102. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010;115(11):2167-2176. doi: 10.1182/blood-2009-08-238469.

103. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633-640. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02060-9.

104. Melsen JE, Lugthart G, Lankester AC, Schilham MW. Human Circulating and Tissue-Resident CD56(bright) Natural Killer Cell Populations. *Front Immunol*. 2016;7:262. doi: 10.3389/fimmu.2016.00262.

105. Chakraborty D, Rumi MA, Konno T, Soares MJ. Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(39):16295-300. doi: 10.1073/pnas.1109478108.

106. Lima PD, Zhang J, Dunk C, Lye SJ, Croy BA. Leukocyte driven-decidual angiogenesis in early pregnancy. *Cell Mol Immunol*. 2014;11(6):522-537. doi: 10.1038/cmi.2014.63.

107. Sharkey AM, Xiong S, Kennedy PR, Gardner L, Farrell LE, Chazara O i in. Tissue-Specific Education of Decidual NK Cells. *J Immunol*. 2015;195(7):3026-3032. doi: 10.4049/jimmunol.1501229.

108. Yougbaré I, Tai WS, Zdravic D, Oswald BE, Lang S, Zhu G i in. Activated NK cells cause placental dysfunction and miscarriages in fetal alloimmune thrombocytopenia. *Nat Commun*. 2017;8(1):224. doi: 10.1038/s41467-017-00269-1.

109. Faas MM, de Vos P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta*. 2017;56:44-52. doi: 10.1016/j.placenta.2017.03.001.

110. Kofod L, Lindhard A, Hviid TVF. Implications of uterine NK cells and regulatory T cells in the endometrium of infertile women. *Hum Immunol*. 2018;79(9):693-701. doi: 10.1016/j.humimm.2018.07.003.

111. Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of uterine NK cells. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):434-444. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00794.x.

112. Moffett A, Shreeve N. First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction. *Hum Reprod*. 2015;30(7):1519-1525. doi: 10.1093/humrep/dev098.

113. Vacca P, Vitale C, Montaldo E, Conte R, Cantoni C, Fulcheri E. CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(6):2402-2407. doi: 10.1073/pnas.1016257108.

114. Keskin DB, Allan DS, Rybalov B, Andzelm MM, Stern JN, Kopcow HD i in. TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3378-3383. doi: 10.1073/pnas.0611098104.

115. Liu S, Diao L, Huang C, Li Y, Zeng Y, Kwak-Kim JYH. The role of decidual immune cells on human pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2017;124:44-53. doi: 10.1016/j.jri.2017.10.045.

116. Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Searle RF i in. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *J Leukoc Biol*. 2006;80(3):572-580. doi: 10.1189/jlb.0406250.

117. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S i in. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med*. 2006;12(9):1065-1074. doi: 10.1038/nm1452.

118. Bulmer JN, Lash GE. The Role of Uterine NK Cells in Normal Reproduction and Reproductive Disorders. *Adv Exp Med Biol*. 2015;868:95-126. doi: 10.1007/978-3-319-18881-2_5.

119. Sojka DK, Yang L, Yokoyama WM. Uterine Natural Killer Cells. *Front Immunol*. 2019;10:960. doi: 10.3389/fimmu.2019.00960.

120. Acar N, Ustunel I, Demir R. Uterine natural killer (uNK) cells and their missions during pregnancy: a review. *Acta Histochem*. 2011;113(2):82-91. doi: 10.1016/j.acthis.2009.12.001.

121. Orefice R. Immunology and the immunological response in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2021;76:3-12. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2020.07.013.

122. Magatti M, Stefani FR, Papait A, Cargnoni A, Masserdotti A, Silini AR. Perinatal Mesenchymal Stromal Cells and Their Possible Contribution to Fetal-Maternal Tolerance. *Cells*. 2019;8(11):1401. doi: 10.3390/cells8111401.

123. Tilburgs T, Claas FH, Scherjon SA. Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Unique properties of decidual T cells and their role in immune regulation during human pregnancy. *Placenta*. 2010;31 Suppl:S82-6. doi: 10.1016/j.placenta.2010.01.007.

124. Solano ME. Decidual immune cells: Guardians of human pregnancies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2019;60:3-16. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2019.05.009.

125. Crespo ÂC, van der Zwan A, Ramalho-Santos J, Strominger JL, Tilburgs T. Cytotoxic potential of decidual NK cells and CD8+ T cells awakened by infections. *J Reprod Immunol*. 2017;119:85-90. doi: 10.1016/j.jri.2016.08.001.

126. Tilburgs T, Strominger JL. CD8+ effector T cells at the fetal-maternal interface, balancing fetal tolerance and antiviral immunity. *Am J Reprod Immunol*. 2013;69(4):395-407. doi: 10.1111/aji.12094.

127. Scaife PJ, Bulmer JN, Robson SC, Innes BA, Searle RF. Effector activity of decidual CD8+ T lymphocytes in early human pregnancy. *Biol Reprod*. 2006;75(4):562-567. doi: 10.1095/biolreprod.106.052654.

128. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*. 2006;20(3):123-37. doi: 10.1016/j.blre.2005.10.001.

129. Raulet DH. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Semin Immunol*. 2006;18(3):145-150. doi: 10.1016/j.smim.2006.03.003.

130. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(1):7-19. doi: 10.1038/nrc.2015.5.

131. Kollnberger S. The Role of HLA-Class I Heavy-Chain Interactions with Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptors in Immune Regulation. *Crit Rev Immunol*. 2016;36(3):269-282. doi: 10.1615/CritRevImmunol.2016017965.

132. Carrington M, Martin MP. The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;298:225-57. doi: 10.1007/3-540-27743-9_12.

133. Rajalingam R. Diversity of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors and Disease. *Clin Lab Med*. 2018;38(4):637-653. doi: 10.1016/j.cll.2018.08.001.

134. Augusto DG, Petzl-Erler ML. KIR and HLA under pressure: evidences of coevolution across worldwide populations. *Hum Genet*. 2015;134(9):929-940. doi: 10.1007/s00439-015-1579-9.

135. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:217-251. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.092501.134942.

136. Pende D, Falco M, Vitale M, Cantoni C, Vitale C, Munari E i in. Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front Immunol*. 2019;10:1179. doi: 10.3389/fimmu.2019.01179.

137. Blunt MD, Khakoo SI. Activating killer cell immunoglobulin-like receptors: Detection, function and therapeutic use. *Int J Immunogenet*. 2020;47(1):1-12. doi: 10.1111/iji.12461.

138. Purdy AK, Campbell KS. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). *Cancer Biol Ther*. 2009;8(23):2211-2220. doi: 10.4161/cbt.8.23.10455.

139. Béziat V, Hilton HG, Norman PJ, Traherne JA. Deciphering the killer-cell immunoglobulin-like receptor system at super-resolution for natural killer and T-cell biology. *Immunology*. 2017;150(3):248-264. doi: 10.1111/imm.12684.

140. Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology*. 2011;132(3):315-325. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03398.x.

141. Falco M, Moretta L, Moretta A, Bottino C. KIR and KIR ligand polymorphism: a new area for clinical applications? *Tissue Antigens*. 2013;82(6):363-373. doi: 10.1111/tan.12262.

142. Rajagopalan S, Long EO. KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. *Front Immunol*. 2012;3:258. doi: 10.3389/fimmu.2012.00258.

143. Attia JVD, Dessens CE, van de Water R, Houvast RD, Kuppen PJK, Krijgsman D. The Molecular and Functional Characteristics of HLA-G and the Interaction with Its Receptors: Where to Intervene for Cancer Immunotherapy? *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8678. doi: 10.3390/ijms21228678.

144. Faure M, Long EO. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol*. 2002;168(12):6208-6214. doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6208.

145. Bai Y, Liang J, Liu W, Wang F, Li C. Possible roles of HLA-G regulating immune cells in pregnancy and endometrial diseases via KIR2DL4. *Reprod Immunol*. 2020;142:103176. doi: 10.1016/j.jri.2020.103176.

146. Aribi M. „Introductory chapter: a brief overview on natural killer cells" w *Natural Killer Cells*, InTech, 2017, 1-13. doi: 10.5772/67671.

147. Bashirova AA, Martin MP, McVicar DW, Carrington M. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006;7:277-300. doi: 10.1146/annurev.genom.7.080505.115726.

148. Uhrberg M. Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. *Mol Immunol*. 2005;42(4):471-475. doi: 10.1016/j.molimm.2004.07.029.

149. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med*. 2006;203(3):633-645. doi: 10.1084/jem.20051884.

150. Anderson SK. Transcriptional regulation of NK cell receptors. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;298:59-75. doi: 10.1007/3-540-27743-9_3.

151. Bruijnesteijn J, de Groot NG, Bontrop RE. The Genetic Mechanisms Driving Diversification of the KIR Gene Cluster in Primates. *Front Immunol*. 2020;11:582804. doi: 10.3389/fimmu.2020.582804.

152. Anderson SK. Probabilistic bidirectional promoter switches: noncoding RNA takes control. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3(9):e191. doi: 10.1038/mtna.2014.42.

153. Agrawal S, Prakash S. Significance of KIR like natural killer cell receptors in autoimmune disorders. *Clin Immunol*. 2020;216:108449. doi: 10.1016/j.clim.2020.108449.

154. Bruijnesteijn J, van der Wiel MKH, de Groot N, Otting N, de Vos-Rouweler AJM, Lardy NM. Extensive Alternative Splicing of KIR Transcripts. Front Immunol. 2018;9:2846. doi: 10.3389/fimmu.2018.02846.

155. Schwartz JC, Sanderson ND, Bickhart DM, Smith TPL, Hammond JA. The Structure, Evolution, and Gene Expression Within the Caprine Leukocyte Receptor Complex. Front Immunol. 2019;10:2302. doi: 10.3389/fimmu.2019.02302.

156. Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. Immunol Rev. 2001;181:20-38. doi: 10.1034/j.1600-065x.2001.1810102.x.

157. Roe D, Kuang R. Accurate and Efficient KIR Gene and Haplotype Inference From Genome Sequencing Reads With Novel K-mer Signatures. *Front Immunol*. 2020;11:583013. doi: 10.3389/fimmu.2020.583013.

158. Djaoud Z, Parham P. HLAs, TCRs, and KIRs, a Triumvirate of Human Cell-Mediated Immunity. *Annu Rev Biochem*. 2020;89:717-739. doi: 10.1146/annurev-biochem-011520-102754.

159. Vendelbosch S, de Boer M, van Leeuwen K, Pourfarzad F, Geissler J, van den Berg TK i in. Novel insights in the genomic organization and hotspots of recombination in the human KIR locus through analysis of intergenic regions. *Genes Immun*. 2015;16(2):103-11. doi: 10.1038/gene.2014.68.

160. Vilches C, Pando MJ, Parham P. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. *Immunogenetics*. 2000;51(8-9):639-646. doi: 10.1007/s002510000184.

161. Roe D, Williams J, Ivery K, Brouckaert J, Downey N, Locklear C i in. Efficient Sequencing, Assembly, and Annotation of Human KIR Haplotypes. *Front Immunol*. 2020;11:582927. doi: 10.3389/fimmu.2020.582927.

162. Maxwell LD, Wallace A, Middleton D, Curran MD. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in

the rhesus monkey. *Tissue Antigens*. 2002;60(3):254-8. doi: 10.1034/j.1399-0039.2002.600307.x.

163. Middleton D, Gonzelez F. The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology*. 2010;129(1):8-19. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03208.x.

164. Cisneros E, Moraru M, Gómez-Lozano N, Muntasell A, López-Botet M, Vilches C. Haplotype-Based Analysis of KIR-Gene Profiles in a South European Population-Distribution of Standard and Variant Haplotypes, and Identification of Novel Recombinant Structures. *Front Immunol*. 2020;11:440. doi: 10.3389/fimmu.2020.00440.

165. Ordóñez D, Meenagh A, Gómez-Lozano N, Castaño J, Middleton D, Vilches C. Duplication, mutation and recombination of the human orphan gene KIR2DS3 contribute to the diversity of KIR haplotypes. *Genes Immun*. 2008;9(5):431-437. doi: 10.1038/gene.2008.34.

166. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev*. 2002;190:40-52. doi: 10.1034/j.1600-065x.2002.19004.x.

167. Jiang K, Zhu FM, Lv QF, Yan LX. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. *Tissue Antigens*. 2005;65(6):556-563. doi: 10.1111/j.1399-0039.2005.00412.x.

168. Ewerton PD, Leite Mde M, Magalhães M, Sena L, Melo dos Santos EJ. Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles. *Immunogenetics*. 2007;59(8):625-630. doi: 10.1007/s00251-007-0229-3.

169. Jiang W, Johnson C, Jayaraman J, Simecek N, Noble J, Moffatt MF, Cookson WO, Trowsdale J, Traherne JA. Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors. *Genome Res*. 2012;22(10):1845-1854. doi: 10.1101/gr.137976.112.

170. Boudreau JE, Hsu KC. Natural killer cell education in human health and disease. *Curr Opin Immunol*. 2018;50:102-111. doi: 10.1016/j.coi.2017.11.003.

171. Díaz-Peña R, de Los Santos MJ, Lucia A, Castro-Santos P. Understanding the role of killer cell immunoglobulin-like receptors in pregnancy complications. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(5):827-835. doi: 10.1007/s10815-019-01426-9.

172. Papúchová H, Meissner TB, Li Q, Strominger JL, Tilburgs T. The Dual Role of HLA-C in Tolerance and Immunity at the Maternal-Fetal Interface. *Front Immunol*. 2019;10:2730. doi: 10.3389/fimmu.2019.02730.

173. Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake K, Marquardt H i in. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol*. 2003;171(3):1376-1384. doi: 10.4049/jimmunol.171.3.1376.

174. Shobu T, Sageshima N, Tokui H, Omura M, Saito K, Nagatsuka Y i in. The surface expression of HLA-F on decidual trophoblasts increases from mid to term gestation. *J Reprod Immunol*. 2006;72(1-2):18-32. doi: 10.1016/j.jri.2006.02.001.

175. Hackmon R, Pinnaduwage L, Zhang J, Lye SJ, Geraghty DE, Dunk CE. Definitive class I human leukocyte antigen expression in gestational placentation: HLA-F, HLA-E, HLA-C, and HLA-G in extravillous trophoblast invasion on placentation, pregnancy, and parturition. *Am J Reprod Immunol*. 2017 Jun;77(6). doi: 10.1111/aji.12643.

176. Johnson JK, Wright PW, Li H, Anderson SK. Identification of trophoblast-specific elements in the HLA-C core promoter. *HLA*. 2018;92(5):288-297. doi: 10.1111/tan.13404.

177. Hilton HG, Parham P. Missing or altered self: human NK cell receptors that recognize HLA-C. *Immunogenetics*. 2017;69(8-9):567-579. doi: 10.1007/s00251-017-1001-y.

178. Hassan I, Ahmad F. Structural diversity of class I MHC-like molecules and its implications in binding specificities. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2011;83:223-270. doi: 10.1016/B978-0-12-381262-9.00006-9.

179. Anjanappa R, Garcia-Alai M, Kopicki JD, Lockhauserbäumer J, Aboelmagd M, Hinrichs J i in. Structures of peptide-free and partially loaded MHC class I molecules reveal mechanisms of peptide selection. *Nat Commun*. 2020;11(1):1314. doi: 10.1038/s41467-020-14862-4.

180. Littera R, Piredda G, Argiolas D, Lai S, Congeddu E, Ragatzu P i in. KIR and their HLA Class I ligands: Two more pieces towards completing the puzzle of chronic rejection and graft loss in kidney transplantation. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180831. doi: 10.1371/journal.pone.0180831.

181. Hilton HG, Norman PJ, Nemat-Gorgani N, Goyos A, Hollenbach JA, Henn BM i in. Loss and Gain of Natural Killer Cell Receptor Function in an African Hunter-Gatherer Population. *PLoS Genet*. 2015;11(8):e1005439. doi: 10.1371/journal.pgen.1005439.

182. Graef T, Moesta AK, Norman PJ, Abi-Rached L, Vago L, Older Aguilar AM i in. KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med*. 2009;206(11):2557-2572. doi: 10.1084/jem.20091010.

183. Moesta AK, Graef T, Abi-Rached L, Older Aguilar AM, Guethlein LA, Parham P. Humans differ from other hominids in lacking an activating NK cell receptor that recognizes the C1 epitope of MHC class I. *J Immunol*. 2010;185(7):4233-4237. doi: 10.4049/jimmunol.1001951.

184. Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vély F, Saulquin X, Riedmuller J, Tisserant A i in. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(37):13224-13229. doi: 10.1073/pnas.0503594102.

185. Garcia-Beltran WF, Hölzemer A, Martrus G, Chung AW, Pacheco Y, Simoneau CR i in. Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1. *Nat Immunol*. 2016;17(9):1067-1074. doi: 10.1038/ni.3513.

186. Burian A, Wang KL, Finton KA, Lee N, Ishitani A, Strong RK i in. HLA-F and MHC-I Open Conformers Bind Natural Killer Cell Ig-Like Receptor KIR3DS1. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163297. doi: 10.1371/journal.pone.0163297.

187. Carlomagno S, Falco M, Bono M, Alicata C, Garbarino L, Mazzocco M i in. KIR3DS1-Mediated Recognition of HLA-*B51: Modulation of KIR3DS1 Responsiveness by Self HLA-B Allotypes and Effect on NK Cell Licensing. *Front Immunol*. 2017;8:581. doi: 10.3389/fimmu.2017.00581.

188. Dizaji Asl K, Velaei K, Rafat A, Tayefi Nasrabadi H, Movassaghpour AA, Mahdavi M i in. The role of KIR positive NK cells in diseases and its importance in clinical intervention. *Int Immunopharmacol*. 2021;92:107361. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107361.

189. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*. 1990;248(4952):220-223. doi: 10.1126/science.2326636.

190. Verloes A, Van de Velde H, LeMaoult J, Mateizel I, Cauffman G, Horn PA i in. HLA-G expression in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. *J Immunol*. 2011;186(4):2663-2671. doi: 10.4049/jimmunol.1001081.

191. Yao YQ, Barlow DH, Sargent IL. Differential expression of alternatively spliced transcripts of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses. *J Immunol*. 2005;175(12):8379-8385. doi: 10.4049/jimmunol.175.12.8379.

192. Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B i in. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol*. 2002;32(2):311-315. doi: 10.1002/1521-4141(200202)32:2<311::AID-IMMU311>3.0.CO;2-8.

193. Rebmann V, Pfeiffer K, Pässler M, Ferrone S, Maier S, Weiss E i in. Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. *Tissue Antigens*. 1999;53(1):14-22. doi: 10.1034/j.1399-0039.1999.530102.x.

194. Beneventi F, Locatelli E, De Amici M, Martinetti M, Spinillo A. Soluble HLA-G concentrations in obese women during pregnancy and in cord blood. *J Reprod Immunol*. 2017;119:31-37. doi: 10.1016/j.jri.2016.11.005.

195. Hackmon R, Hallak M, Krup M, Weitzman D, Sheiner E, Kaplan B i in. HLA-G antigen and parturition: maternal serum, fetal serum and amniotic fluid levels during pregnancy. *Fetal Diagn Ther*. 2004;19(5):404-409. doi: 10.1159/000078992.

196. Xu X, Zhou Y, Wei H. Roles of HLA-G in the Maternal-Fetal Immune Microenvironment. *Front Immunol*. 2020;11:592010. doi: 10.3389/fimmu.2020.592010.

197. Larsen MH, Bzorek M, Pass MB, Larsen LG, Nielsen MW, Svendsen SG i in. Human leukocyte antigen-G in the male reproductive system and in seminal plasma. *Mol Hum Reprod*. 2011;17(12):727-738. doi: 10.1093/molehr/gar052.

198. Dahl M, Perin TL, Djurisic S, Rasmussen M, Ohlsson J, Buus S i in. Soluble human leukocyte antigen-G in seminal plasma is associated with HLA-G genotype: possible implications for fertility success. *Am J Reprod Immunol*. 2014;72(1):89-105. doi: 10.1111/aji.12251.

199. Schallmoser A, Raab M, Karn T, Königsberger S, Schmidt E, Breitenbach-Koller H i in. Quantitative analysis of the sHLA-G protein in seminal plasma. *Am J Reprod Immunol*. 2019;82(3):e13152. doi: 10.1111/aji.13152.

200. Tilburgs T, Evans JH, Crespo ÂC, Strominger JL. The HLA-G cycle provides for both NK tolerance and immunity at the maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(43):13312-13317. doi: 10.1073/pnas.1517724112.

201. Persson G, Jørgensen N, Nilsson LL, Andersen LHJ, Hviid TVF. A role for both HLA-F and HLA-G in reproduction and during pregnancy? *Hum Immunol*. 2020;81(4):127-133. doi: 10.1016/j.humimm.2019.09.006.

202. Yeung HY, Dendrou CA. Pregnancy Immunogenetics and Genomics: Implications for Pregnancy-Related Complications and Autoimmune Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2019;20:73-97. doi: 10.1146/annurev-genom-083118-014943.

203. Mosaferi E, Alizadeh Gharamaleki N, Farzadi L, Majidi J, Babaloo Z, Kazemi T i in. The Study of HLA-G Gene and Protein Expression in Patients with Recurrent Miscarriage. *Adv Pharm Bull*. 2019;9(1):70-75. doi: 10.15171/apb.2019.009.

204. Yazdani N, Shekari Khaniani M, Bastami M, Ghasemnejad T, Afkhami F, Mansoori Derakhshan S. HLA-G regulatory variants and haplotypes with susceptibility to recurrent pregnancy loss. *Int J Immunogenet*. 2018;45(4):181-189. doi: 10.1111/iji.12364.

205. Rokhafrooz S, Ghadiri A, Ghandil P, Ghafourian M, Hossaini SH, Daraei N i in. Association between HLA-G 14bp Gene Polymorphism and Serum sHLA-G Protein Concentrations in Preeclamptic Patients and Normal Pregnant Women. *Immunol Invest*. 2018;47(6):558-568. doi: 10.1080/08820139.2018.1467925.

206. Alegre E, Díaz-Lagares A, Lemaoult J, López-Moratalla N, Carosella ED, González A. Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy: longitudinal study during pregnancy. *Hum Immunol*. 2007;68(8):661-667. doi: 10.1016/j.humimm.2007.04.007.

207. Hunt JS, Jadhav L, Chu W, Geraghty DE, Ober C. Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(3):682-688. doi: 10.1067/mob.2000.106762.

208. Arnaiz-Villena A, Juarez I, Suarez-Trujillo F, López-Nares A, Vaquero C, Palacio-Gruber J i in. HLA-G: Function, polymorphisms and pathology. *Int J Immunogenet*. 2021;48(2):172-192. doi: 10.1111/iji.12513.

209. Amodio G, Gregori S. HLA-G Genotype/Expression/Disease Association Studies: Success, Hurdles, and Perspectives. *Front Immunol*. 2020;11:1178. doi: 10.3389/fimmu.2020.01178.

210. Castelli EC, Ramalho J, Porto IO, Lima TH, Felício LP, Sabbagh A i in. Insights into HLA-G Genetics Provided by Worldwide Haplotype Diversity. *Front Immunol*. 2014;5:476. doi: 10.3389/fimmu.2014.00476.

211. Dias FC, Bertol BC, Poras I, Souto BM, Mendes-Junior CT, Castelli EC i in. The genetic diversity within the 1.4 kb HLA-G 5' upstream regulatory region moderately impacts on cellular microenvironment responses. *Sci Rep*. 2018;8(1):5652. doi: 10.1038/s41598-018-24009-7.

212. Nilsson LL, Djurisic S, Hviid TV. Controlling the Immunological Crosstalk during Conception and Pregnancy: HLA-G in Reproduction. *Front Immunol*. 2014;5:198. doi: 10.3389/fimmu.2014.00198.

213. Compagnone M, Cifaldi L, Fruci D. Regulation of ERAP1 and ERAP2 genes and their disfunction in human cancer. *Hum Immunol*. 2019;80(5):318-324. doi: 10.1016/j.humimm.2019.02.014.

214. Stratikos E, Stamogiannos A, Zervoudi E, Fruci D. A role for naturally occurring alleles of endoplasmic reticulum aminopeptidases in tumor immunity and cancer pre-disposition. *Front Oncol*. 2014;4:363. doi: 10.3389/fonc.2014.00363.

215. de Castro JAL, Stratikos E. Intracellular antigen processing by ERAP2: Molecular mechanism and roles in health and disease. *Hum Immunol*. 2019;80(5):310-317. doi: 10.1016/j.humimm.2018.11.001.

216. Saulle I, Vicentini C, Clerici M, Biasin M. An Overview on ERAP Roles in Infectious Diseases. *Cells*. 2020;9(3):720. doi: 10.3390/cells9030720.

217. Budenholzer L, Cheng CL, Li Y, Hochstrasser M. Proteasome Structure and Assembly. *J Mol Biol*. 2017;429(22):3500-3524. doi: 10.1016/j.jmb.2017.05.027.

218. Martín-Esteban A, Sanz-Bravo A, Guasp P, Barnea E, Admon A, López de Castro JA. Separate effects of the ankylosing spondylitis associated ERAP1 and ERAP2 aminopeptidases determine the influence of their combined phenotype on the HLA-B*27 peptidome. *J Autoimmun*. 2017;79:28-38. doi: 10.1016/j.jaut.2016.12.008.

219. Fierabracci A, Milillo A, Locatelli F, Fruci D. The putative role of endoplasmic reticulum aminopeptidases in autoimmunity: insights from genomic-wide association studies. *Autoimmun Rev*. 2012;12(2):281-288. doi: 10.1016/j.autrev.2012.04.007.

220. Evnouchidou I, Weimershaus M, Saveanu L, van Endert P. ERAP1-ERAP2 dimerization increases peptide-trimming efficiency. *J Immunol*. 2014;193(2):901-908. doi: 10.4049/jimmunol.1302855.

221. Babaie F, Hosseinzadeh R, Ebrazeh M, Seyfizadeh N, Aslani S, Salimi S i in. The roles of ERAP1 and ERAP2 in autoimmunity and cancer immunity: New insights and perspective. *Mol Immunol*. 2020;121:7-19. doi: 10.1016/j.molimm.2020.02.020.

222. Evnouchidou I, van Endert P. Peptide trimming by endoplasmic reticulum aminopeptidases: Role of MHC class I binding and ERAP dimerization. *Hum Immunol*. 2019;80(5):290-295. doi: 10.1016/j.humimm.2019.01.003.

223. Reeves E, James E. Tumour and placenta establishment: The importance of antigen processing and presentation. *Placenta*. 2017;56:34-39. doi: 10.1016/j.placenta.2017.02.025.

224. Admon A. ERAP1 shapes just part of the immunopeptidome. *Hum Immunol*. 2019;80(5):296-301. doi: 10.1016/j.humimm.2019.03.004.

225. López de Castro JA. How ERAP1 and ERAP2 Shape the Peptidomes of Disease-Associated MHC-I Proteins. *Front Immunol*. 2018;9:2463. doi: 10.3389/fimmu.2018.02463.

226. Chang SC, Momburg F, Bhutani N, Goldberg AL. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(47):17107-12. doi: 10.1073/pnas.0500721102.

227. Saveanu L, Carroll O, Lindo V, Del Val M, Lopez D, Lepelletier Y i in. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol*. 2005;6(7):689-697. doi: 10.1038/ni1208.

228. Tsujimoto M, Aoki K, Goto Y, Ohnishi A. Molecular and functional diversity of the oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases. *J Biochem*. 2021;169(4):409-420. doi: 10.1093/jb/mvab009.

229. López de Castro JA, Alvarez-Navarro C, Brito A, Guasp P, Martín-Esteban A, Sanz-Bravo A. Molecular and pathogenic effects of endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in MHC-I-associated inflammatory disorders: Towards a unifying view. *Mol Immunol*. 2016;77:193-204. doi: 10.1016/j.molimm.2016.08.005.

230. Yao Y, Liu N, Zhou Z, Shi L. Influence of ERAP1 and ERAP2 gene polymorphisms on disease susceptibility in different populations. *Hum Immunol*. 2019;80(5):325-334. doi: 10.1016/j.humimm.2019.02.011.

231. Fruci D, Romania P, D'Alicandro V, Locatelli F. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 function and its pathogenic role in regulating innate and adaptive immunity in cancer and major histocompatibility complex class I-associated autoimmune diseases. *Tissue Antigens*. 2014;84(2):177-186. doi: 10.1111/tan.12410.

232. Aldhamen YA, Pepelyayeva Y, Rastall DP, Seregin SS, Zervoudi E, Koumantou D i in. Autoimmune disease-associated variants of extracellular endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 induce altered innate immune responses by human immune cells. *J Innate Immun*. 2015;7(3):275-289. doi: 10.1159/000368899.

233. Pepelyayeva Y, Amalfitano A. The role of ERAP1 in autoinflammation and autoimmunity. *Hum Immunol*. 2019;80(5):302-309. doi: 10.1016/j.humimm.2019.02.013.

234. Cui X, Hawari F, Alsaaty S, Lawrence M, Combs CA, Geng W i in. Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding. *J Clin Invest*. 2002;110(4):515-526. doi: 10.1172/JCI13847.

235. Cui X, Rouhani FN, Hawari F, Levine SJ. An aminopeptidase, ARTS-1, is required for interleukin-6 receptor shedding. *J Biol Chem*. 2003;278(31):28677-85. doi: 10.1074/jbc.M300456200.

236. Cui X, Rouhani FN, Hawari F, Levine SJ. Shedding of the type II IL-1 decoy receptor requires a multifunctional aminopeptidase, aminopeptidase regulator of TNF receptor type 1 shedding. *J Immunol*. 2003;171(12):6814-9. doi: 10.4049/jimmunol.171.12.6814.

237. Cifaldi L, Romania P, Lorenzi S, Locatelli F, Fruci D. Role of endoplasmic reticulum aminopeptidases in health and disease: from infection to cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(7):8338-8352. doi: 10.3390/ijms13078338.

238. Sato Y. Role of aminopeptidase in angiogenesis. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(6):772-776. doi: 10.1248/bpb.27.772.

239. Irani RA, Xia Y. The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. *Placenta*. 2008;29(9):763-771. doi: 10.1016/j.placenta.2008.06.011.

240. Hill LD, Hilliard DD, York TP, Srinivas S, Kusanovic JP, Gomez R i in. Fetal ERAP2 variation is associated with preeclampsia in African Americans in a case-control study. *BMC Med Genet*. 2011;12:64. doi: 10.1186/1471-2350-12-64.

241. Johnson MP, Roten LT, Dyer TD, East CE, Forsmo S, Blangero J i in. The ERAP2 gene is associated with preeclampsia in Australian and Norwegian populations. *Hum Genet*. 2009;126(5):655-666. doi: 10.1007/s00439-009-0714-x.

242. Xu Y, Wu J, Wu J. Expression and role of ERAP1 in placental tissues of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2020;39(2):165-171. doi: 10.1080/10641955.2020.1749848.

243. Harata T, Ando H, Iwase A, Nagasaka T, Mizutani S, Kikkawa F. Localization of angiotensin II, the AT1 receptor, angiotensin-converting enzyme, aminopeptidase A, adipocyte-derived leucine aminopeptidase, and vascular endothelial growth factor in the human ovary throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril*. 2006;86(2):433-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.01.041.

244. Watanabe Y, Shibata K, Kikkawa F, Kajiyama H, Ino K, Hattori A i in. Adipocyte-derived leucine aminopeptidase suppresses angiogenesis in human endometrial carcinoma via renin-angiotensin system. *Clin Cancer Res*. 2003;9(17):6497-6503.

245. Munro SK, Balakrishnan B, Lissaman AC, Gujral P, Ponnampalam AP. Cytokines and pregnancy: Potential regulation by histone deacetylases. *Mol Reprod Dev*. 2021;88(5):321-337. doi: 10.1002/mrd.23430.

246. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1221(1):80-87. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x.

247. Nagamatsu T, Schust DJ. The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):460-471. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00813.x.

248. Yang F, Zheng Q, Jin L. Dynamic Function and Composition Changes of Immune Cells During Normal and Pathological Pregnancy at the Maternal-Fetal Interface. *Front Immunol*. 2019;10:2317. doi: 10.3389/fimmu.2019.02317.

249. Olmos-Ortiz A, Flores-Espinosa P, Mancilla-Herrera I, Vega-Sánchez R, Díaz L, Zaga-Clavellina V. Innate Immune Cells and Toll-like Receptor-Dependent Responses at the Maternal-Fetal Interface. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15):3654. doi: 10.3390/ijms20153654.

250. Kitazawa J, Kimura F, Nakamura A, Morimune A, Takahashi A, Takashima A i in. Endometrial Immunity for Embryo Implantation and Pregnancy Establishment. *Tohoku J Exp Med*. 2020;250(1):49-60. doi: 10.1620/tjem.250.49.

251. Mekinian A, Cohen J, Alijotas-Reig J, Carbillon L, Nicaise-Roland P, Kayem G i in. Unexplained Recurrent Miscarriage and Recurrent Implantation Failure: Is There a Place for Immunomodulation? *Am J Reprod Immunol*. 2016;76(1):8-28. doi: 10.1111/aji.12493.

252. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJ, Lentjes EG, Fauser BC, Heijnen CJ i in. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum Reprod.* 2009;24(6):1427-1435. doi: 10.1093/humrep/dep011.

253. Guven MA, Coskun A, Ertas IE, Aral M, Zencirci B, Oksuz H. Association of maternal serum CRP, IL-6, TNF-alpha, homocysteine, folic acid and vitamin B12 levels with the severity of preeclampsia and fetal birth weight. *Hypertens Pregnancy*. 2009;28(2):190-200. doi: 10.1080/10641950802601179.

254. Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. *Front Immunol*. 2020;11:2025. doi: 10.3389/fimmu.2020.02025.

255. Jin LP, Fan DX, Zhang T, Guo PF, Li DJ. The costimulatory signal upregulation is associated with Th1 bias at the maternal-fetal interface in human miscarriage. *Am J Reprod Immunol*. 2011;66(4):270-8. doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.00997.x.

256. Spence T, Allsopp PJ, Yeates AJ, Mulhern MS, Strain JJ, McSorley EM. Maternal Serum Cytokine Concentrations in Healthy Pregnancy and Preeclampsia. J Pregnancy. 2021;2021:6649608. doi: 10.1155/2021/6649608.

257. Sang Y, Li Y, Xu L, Li D, Du M. Regulatory mechanisms of endometrial decidualization and pregnancy-related diseases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2020;52(2):105-115. doi: 10.1093/abbs/gmz146.

258. Sharkey AM, King A, Clark DE, Burrows TD, Jokhi PP, Charnock-Jones DS. i in. Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. *Biol Reprod*. 1999;60(2):355-364. doi: 10.1095/biolreprod60.2.355.

259. Dimitriadis E, Menkhorst E, Salamonsen LA, Paiva P. Review: LIF and IL11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy. *Placenta*. 2010;31 Suppl:S99-104. doi: 10.1016/j.placenta.2009.12.027

260. Shido F, Ito T, Nomura S, Yamamoto E, Sumigama S, Ino K i in. Endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 mediates leukemia inhibitory factor-induced cell surface human leukocyte antigen-G expression in JEG-3 choriocarcinoma cells. *Endocrinology*. 2006;147(4):1780-8. doi: 10.1210/en.2005-1449.

261. Frohn C, Schlenke P, Ebel B, Dannenberg C, Bein G, Kirchner H. DNA typing for natural killer cell inhibiting HLA-Cw groups NK1 and NK2 by PCR-SSP. *J Immunol Methods*. 1998;218(1-2):155-60. doi: 10.1016/s0022-1759(98)00126-4.

262. Niepiekło-Miniewska W, Mpakali A, Stratikos E, Matusiak Ł, Narbutt J, Lesiak A i in. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 polymorphism Ile276Met is associated with atopic dermatitis and affects the generation of an HLA-C associated antigenic epitope in vitro. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33(5):906-911. doi: 10.1111/jdv.15449.

263. Paladini F, Fiorillo MT, Vitulano C, Tedeschi V, Piga M, Cauli A i in. An allelic variant in the intergenic region between ERAP1 and ERAP2 correlates with an inverse expression of the two genes. *Sci Rep*. 2018;8(1):10398. doi: 10.1038/s41598-018-28799-8.

264. Andres AM, Dennis MY, Kretzschmar WW, Cannons JL, Lee-Lin SQ, Hurle B i in. Balancing selection maintains a form of ERAP2 that undergoes nonsense-mediated decay and affects antigen presentation. *PLoS Genet*. 2010;6(10):e1001157. doi: 10.1371/journal.pgen.1001157.

265. Evnouchidou I, Birtley J, Seregin S, Papakyriakou A, Zervoudi E, Samiotaki M i in. A common single nucleotide polymorphism in endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 induces a specificity switch that leads to altered antigen processing. *J Immunol*. 2012;189(5):2383-92. doi: 10.4049/jimmunol.1200918.

266. Lee ED. Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2, a common immunological link to adverse pregnancy outcomes and cancer clearance? *Placenta*. 2017;56:40-43. doi: 10.1016/j.placenta.2017.03.012.

267. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evidence-based treatments for couples with unexplained infertility: a guideline. *Fertil Steril*. 2020;113(2):305-322. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.10.014.

268. Sadeghi MR. Unexplained infertility, the controversial matter in management of infertile couples. *J Reprod Infertil*. 2015;16(1):1-2.

269. Guan H, Tang H, Pan L, Song H, Tang L. Pregnancy predictors in unexplained infertility after intrauterine insemination. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2021;50(8):102071. doi: 10.1016/j.jogoh.2021.102071.

270. Mol BW, Tjon-Kon-Fat R, Kamphuis E, van Wely M. Unexplained infertility: Is it over-diagnosed and over-treated? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;53:20-29. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.09.006.

271. Carson SA, Kallen AN. Diagnosis and Management of Infertility: A Review. *JAMA*. 2021;326(1):65-76. doi: 10.1001/jama.2021.4788.

272. Amjadi F, Zandieh Z, Mehdizadeh M, Aghajanpour S, Raoufi E, Aghamajidi A i in. The uterine immunological changes may be responsible for repeated implantation failure. *J Reprod Immunol*. 2020;138:103080. doi: 10.1016/j.jri.2020.103080.

273. Sfakianoudis K, Rapani A, Grigoriadis S, Pantou A, Maziotis E, Kokkini G i in. The Role of Uterine Natural Killer Cells on Recurrent Miscarriage and Recurrent Implantation Failure: From Pathophysiology to Treatment. Biomedicines. 2021;9(10):1425. doi: 10.3390/biomedicines9101425.

274. Sacks G, Finkelstein E. Natural killer cells and reproductive success. *Am J Reprod Immunol*. 2021;85(4):e13291. doi: 10.1111/aji.13291.

275. Hiby SE, Regan L, Lo W, Farrell L, Carrington M, Moffett A. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2008;23(4):972-976. doi: 10.1093/humrep/den011.

276. Varla-Leftherioti M, Spyropoulou-Vlachou M, Niokou D, Keramitsoglou T, Darlamitsou A, Tsekoura C i in. Natural killer (NK) cell receptors' repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol*. 2003;49(3):183-191. doi: 10.1034/j.1600-0897.2003.00018.x.

277. Vargas RG, Bompeixe EP, França PP, Marques de Moraes M, da Graça Bicalho M. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor genes' association with recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol*. 2009;62(1):34-43. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00709.x.

278. Yu H, Pan N, Shen Y, Jin S, Zhai J, Qiao D i in. Interaction of parental KIR and fetal HLA-C genotypes with the risk of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2014;33(4):402-411. doi: 10.3109/10641955.2014.920026.

279. Hiby SE, Apps R, Sharkey AM, Farrell LE, Gardner L, Mulder A i in. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest*. 2010;120(11):4102-4110. doi: 10.1172/JCI43998.

280. Akbari S, Shahsavar F, Karami R, Yari F, Anbari K, Ahmadi SAY. Recurrent Spontaneous Abortion (RSA) and Maternal KIR Genes: A Comprehensive Meta-Analysis. *JBRA Assist Reprod*. 2020;24(2):197-213. doi: 10.5935/1518-0557.20190067.

281. Faridi RM, Agrawal S. Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) and HLA-C allorecognition patterns implicative of dominant activation of natural killer cells contribute to recurrent miscarriages. *Hum Reprod*. 2011;26(2):491-497. doi: 10.1093/humrep/deq341.

282. Wang S, Zhao YR, Jiao YL, Wang LC, Li JF, Cui B i in. Increased activating killer immunoglobulin-like receptor genes and decreased specific HLA-C alleles in couples with recurrent spontaneous abortion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;360(3):696-701. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.125.

283. Nowak I, Malinowski A, Tchórzewski H, Barcz E, Wilczyński JR, Banasik M i in. HLA-C C1C2 heterozygosity may protect women bearing the killer immunoglobulin-like receptor AA genotype from spontaneous abortion. *Reprod Immunol*. 2011;88(1):32-37. doi: 10.1016/j.jri.2010.11.001.

284. Xiong S, Sharkey AM, Kennedy PR, Gardner L, Farrell LE, Chazara O i in. Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation. *J Clin Invest*. 2013;123(10):4264-4272. doi: 10.1172/JCI68991.

285. Alecsandru D, Garrido N, Vicario JL, Barrio A, Aparicio P, Requena A i in. Maternal KIR haplotype influences live birth rate after double embryo transfer in IVF cycles in patients with recurrent miscarriages and implantation failure. *Hum Reprod*. 2014;29(12):2637-2643. doi: 10.1093/humrep/deu251.

286. Alecsandru D, Barrio A, Garrido N, Aparicio P, Pellicer A, Moffett A i in. Parental human leukocyte antigen-C allotypes are predictive of live birth rate and risk of poor placentation in assisted reproductive treatment. *Fertil Steril*. 2020;114(4):809-817. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.05.008.

287. Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J i in. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*. 2004;200(8):957-65. doi: 10.1084/jem.20041214.

288. Moffett A, Chazara O, Colucci F, Johnson MH. Variation of maternal KIR and fetal HLA-C genes in reproductive failure: too early for clinical intervention. *Reprod Biomed Online*. 2016;33(6):763-769. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.08.019.

289. Łuszczek W, Majorczyk E, Nowak I, Pawlik A, Jasek M, Wiśniewski A i in. Inhibitory and activatory KIR gene frequencies in the Polish population. *Int J Immunogenet*. 2006;33(3):167-70. doi: 10.1111/j.1744-313X.2006.00587.x.

290. Fu YY, Ren CE, Qiao PY, Meng YH. Uterine natural killer cells and recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*. 2021;86(2):e13433. doi: 10.1111/aji.13433.

291. Zhou Q, Wang J, He Z, Li X, Mao S, Huang S i in. KIR diversity in three ethnic minority populations in China. *J Transl Med*. 2015;13:221. doi: 10.1186/s12967-015-0544-7.

292. Moffett A, Hiby SE, Sharkey AM. The role of the maternal immune system in the regulation of human birthweight. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;370(1663):20140071. doi: 10.1098/rstb.2014.0071.

293. Niepiekło-Miniewska W, Kuśnierczyk P, Havrylyuk A, Kamieniczna M, Nakonechnyy A, Chopyak V i in. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene association with cryptorchidism. *Reprod Biol*. 2015;15(4):217-222. doi: 10.1016/j.repbio.2015.08.001.

294. Flint M, du Plessis SS, Menkveld R. Revisiting the assessment of semen viscosity and its relationship to leucocytospermia. *Andrologia*. 2014;46(8):837-841. doi: 10.1111/and.12157.

295. Weidner W, Pilatz A, Diemer T, Schuppe HC, Rusz A, Wagenlehner F. Male urogenital infections: impact of infection and inflammation on ejaculate parameters. *World J Urol*. 2013;31(4):717-723. doi: 10.1007/s00345-013-1082-7.

296. Gimenes F, Souza RP, Bento JC, Teixeira JJ, Maria-Engler SS, Bonini MG i in. Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nat Rev Urol*. 2014;11(12):672-87. doi: 10.1038/nrurol.2014.285.

297. Mackern-Oberti JP, Motrich RD, Breser ML, Sánchez LR, Cuffini C, Rivero VE. Chlamydia trachomatis infection of the male genital tract: an update. *J Reprod Immunol*. 2013;100(1):37-53. doi: 10.1016/j.jri.2013.05.002.

298. Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, Menegazzo M, Barzon L, Foresta C. Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. *J Reprod Immunol*. 2013;100(1):20-29. doi: 10.1016/j.jri.2013.03.004.

299. Sim MJW, Rajagopalan S, Altmann DM, Boyton RJ, Sun PD, Long EO. Human NK cell receptor KIR2DS4 detects a conserved bacterial epitope presented by HLA-C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(26):12964-12973. doi: 10.1073/pnas.1903781116.

300. Naiyer MM, Cassidy SA, Magri A, Cowton V, Chen K, Mansour S i in. KIR2DS2 recognizes conserved peptides derived from viral helicases in the context of HLA-C. *Sci Immunol*. 2017;2(15):eaal5296. doi: 10.1126/sciimmunol.aal5296.

301. Wilczyńska K, Radwan P, Krasiński R, Radwan M, Wilczyński JR, Malinowski A i in. KIR and HLA-C genes in male infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37(8):2007-2017. doi: 10.1007/s10815-020-01814-6.

302. Piekarska K, Radwan P, Tarnowska A, Wiśniewski A, Radwan M, Wilczyński JR i in. ERAP, KIR, and HLA-C Profile in Recurrent Implantation Failure. *Front Immunol*. 2021;12:755624. doi: 10.3389/fimmu.2021.755624.

303. Alvarez-Navarro C, López de Castro JA. ERAP1 structure, function and pathogenetic role in ankylosing spondylitis and other MHC-associated diseases. *Mol Immunol*. 2014;57(1):12-21. doi: 10.1016/j.molimm.2013.06.012.

304. Giastas P, Mpakali A, Papakyriakou A, Lelis A, Kokkala P, Neu M i in. Mechanism for antigenic peptide selection by endoplasmic reticulum aminopeptidase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(52):26709-26716. doi: 10.1073/pnas.1912070116.

305. Reeves E, Edwards CJ, Elliott T, James E. Naturally occurring ERAP1 haplotypes encode functionally distinct alleles with fine substrate specificity. *J Immunol*. 2013;191(1):35-43. doi: 10.4049/jimmunol.1300598.

306. Ombrello MJ, Kastner DL, Remmers EF. Endoplasmic reticulum-associated amino-peptidase 1 and rheumatic disease: genetics. *Curr Opin Rheumatol*. 2015;27(4):349-356. doi: 10.1097/BOR.0000000000000189.

307. Mansour L, Alkhuriji A, Babay ZA, Alqadheeb S, Al-Khulaifi F, Al-Talhi R i in. Association of Killer Immunoglobulin-Like Receptor and Human Leukocyte Antigen Class I Ligand with Recurrent Abortion in Saudi Women. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2020;24(2):78-84. doi: 10.1089/gtmb.2019.0224.

308. Wilczyńska K, Wiśniewski A, Malinowski A, Barcz E, Wilczyński JR, Kuśnierczyk P i in. ERAP, KIR and HLA-C gene interaction in susceptibility to recurrent spontaneous abortion in the Polish population. *Hum Immunol*. 2019;80(5):344-348. doi: 10.1016/j.humimm.2019.02.010.

309. Nguyen TT, Chang SC, Evnouchidou I, York IA, Zikos C, Rock KL i in. Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(5):604-613. doi: 10.1038/nsmb.2021.

310. Kamphausen E, Kellert C, Abbas T, Akkad N, Tenzer S, Pawelec G i in. Distinct molecular mechanisms leading to deficient expression of ER-resident aminopeptidases in melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(8):1273-84. doi: 10.1007/s00262-010-0856-7.

311. Takeuchi M, Ombrello MJ, Kirino Y, Erer B, Tugal-Tutkun I, Seyahi E i in. A single endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 protein allotype is a strong risk factor for Behçet's disease in HLA-B*51 carriers. Ann Rheum Dis. 2016;75(12):2208-2211. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-209059.

312. Paladini F, Fiorillo MT, Tedeschi V, D'Otolo V, Piga M, Cauli A i in. The rs75862629 minor allele in the endoplasmic reticulum aminopeptidases intergenic region affects human leucocyte antigen B27 expression and protects from ankylosing spondylitis in Sardinia. *Rheumatology (Oxford)*. 2019;58(12):2315-2324. doi: 10.1093/rheumatology/kez212.

313. Robinson PC, Costello ME, Leo P, Bradbury LA, Hollis K, Cortes A i in. ERAP2 is associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-positive and HLA-B27-negative patients. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(8):1627-1629. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-207416.

314. Stamogiannos A, Koumantou D, Papakyriakou A, Stratikos E. Effects of polymorphic variation on the mechanism of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1. *Mol Immunol*. 2015;67(2 Pt B):426-435. doi: 10.1016/j.molimm.2015.07.010.

315. Costantino F, Talpin A, Evnouchidou I, Kadi A, Leboime A, Said-Nahal R i in. ERAP1 Gene Expression Is Influenced by Nonsynonymous Polymorphisms Associated With Predisposition to Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(6):1525-1534. doi: 10.1002/art.39072.

316. Das A, Chandra A, Chakraborty J, Chattopadhyay A, Senapati S, Chatterjee G i in. Associations of ERAP1 coding variants and domain specific interaction with HLA-C∗06 in the early onset psoriasis patients of India. *Hum Immunol*. 2017;78(11-12):724-730. doi: 10.1016/j.humimm.2017.08.006.

317. D'Amico S, Tempora P, Lucarini V, Melaiu O, Gaspari S, Algeri M i in. ERAP1 and ERAP2 Enzymes: A Protective Shield for RAS against COVID-19? *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1705. doi: 10.3390/ijms22041705.

318. Seamon K, Kurlak LO, Warthan M, Stratikos E, Strauss JF 3rd, Mistry HD i in. The Differential Expression of ERAP1/ERAP2 and Immune Cell Activation in Pre-eclampsia. *Front Immunol*. 2020;11:396. doi: 10.3389/fimmu.2020.00396.

319. Masi S, Uliana M, Virdis A. Angiotensin II and vascular damage in hypertension: Role of oxidative stress and sympathetic activation. *Vascul Pharmacol*. 2019;115:13-17. doi: 10.1016/j.vph.2019.01.004.

320. Bui AD, Sharma R, Henkel R, Agarwal A. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. *Andrologia*. 2018;50(8):e13012. doi: 10.1111/and.13012.

321. Vanhille DL, Hill LD, Hilliard DD, Lee ED, Teves ME, Srinivas S i in. A Novel ERAP2 Haplotype Structure in a Chilean Population: Implications for ERAP2 Protein Expression and Preeclampsia Risk. *Mol Genet Genomic Med*. 2013;1(2):98-107. doi: 10.1002/mgg3.13.

322. Founds SA, Conley YP, Lyons-Weiler JF, Jeyabalan A, Hogge WA, Conrad KP. Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. *Placenta*. 2009;30(1):15-24. doi: 10.1016/j.placenta.2008.09.015.

323. Huang Q, Wu H, Li M, Yang Y, Fu X. Prednisone improves pregnancy outcome in repeated implantation failure by enhance regulatory T cells bias. *J Reprod Immunol*. 2021;143:103245. doi: 10.1016/j.jri.2020.103245.

324. Lédée N, Prat-Ellenberg L, Petitbarat M, Chevrier L, Simon C, Irani EE i in. Impact of prednisone in patients with repeated embryo implantation failures: Beneficial or deleterious? *J Reprod Immunol*. 2018;127:11-15. doi: 10.1016/j.jri.2018.03.003.

325. Lu Y, Yan J, Liu J, Tan J, Hong Y, Wei D i in. Prednisone for patients with recurrent implantation failure: study protocol for a double-blind, multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *Trials*. 2020;21(1):719. doi: 10.1186/s13063-020-04630-6.

326. Forloni M, Albini S, Limongi MZ, Cifaldi L, Boldrini R, Nicotra MR i in. NF-kappaB, and not MYCN, regulates MHC class I and endoplasmic reticulum aminopeptidases in human neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 2010;70(3):916-924. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2582.

327. Saric T, Chang SC, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL i in. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol*. 2002;3(12):1169-1176. doi: 10.1038/ni859.

328. Kalampokas T, Pandian Z, Keay SD, Bhattacharya S. Glucocorticoid supplementation during ovarian stimulation for IVF or ICSI. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;3(3):CD004752. doi: 10.1002/14651858.CD004752.pub2.

329. Dan S, Wei W, Yichao S, Hongbo C, Shenmin Y, Jiaxiong W i in. Effect of Prednisolone Administration on Patients with Unexplained Recurrent Miscarriage and in Routine Intracytoplasmic Sperm Injection: A Meta-Analysis. *Am J Reprod Immunol*. 2015;74(1):89-97. doi: 10.1111/aji.12373.

330. Gur C, Diav-Citrin O, Shechtman S, Arnon J, Ornoy A. Pregnancy outcome after first trimester exposure to corticosteroids: a prospective controlled study. *Reprod Toxicol*. 2004;18(1):93-101. doi: 10.1016/j.reprotox.2003.10.007.

331. Kim YJ. Glucocorticoid therapy in assisted reproduction. *Clin Exp Reprod Med*. 2021;48(4):295-302. doi: 10.5653/cerm.2021.04819.

332. Tanioka T, Hattori A, Masuda S, Nomura Y, Nakayama H, Mizutani S i in. Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J Biol Chem*. 2003;278(34):32275-83. doi: 10.1074/jbc.M305076200.

333. Guasp P, Lorente E, Martín-Esteban A, Barnea E, Romania P, Fruci D i in. Redundancy and Complementarity between ERAP1 and ERAP2 Revealed by their Effects on the Behcet's Disease-associated HLA-B*51 Peptidome. *Mol Cell Proteomics*. 2019;18(8):1491-1510. doi: 10.1074/mcp.RA119.001515.

334. Cifaldi L, Lo Monaco E, Forloni M, Giorda E, Lorenzi S, Petrini S i in. Natural killer cells efficiently reject lymphoma silenced for the endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing. *Cancer Res*. 2011;71(5):1597-1606. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3326.

335. Lospinoso K, Dozmorov M, El Fawal N, Raghu R, Chae WJ, Lee ED. Overexpression of ERAP2N in Human Trophoblast Cells Promotes Cell Death. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8585. doi: 10.3390/ijms22168585.

336. Mandrekar JN. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *J Thorac Oncol*. 2010;5(9):1315-6. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181ec173d.

337. Enghelabifar M, Allafan S, Khayatzadeh J, Shahrokh Abadi K, Hasanzadeh Nazarabadi M, Moradi F i in. Association of the maternal 14-bp insertion/deletion polymorphism in the histocompatibility leukocyte antigen G gene with recurrent implantation failure. *Iran J Reprod Med*. 2014;12(9):641-646.

338. Fan W, Huang Z, Li S, Xiao Z. The HLA-G 14-bp polymorphism and recurrent implantation failure: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(11):1559-1565. doi: 10.1007/s10815-017-0994-3.

339. Lashley LE, van der Westerlaken LA, Haasnoot GW, Drabbels JJ, Spruyt-Gerritse MJ, Scherjon SA i in. Maternal HLA-C2 and 14 bp insertion in HLA-G is associated with recurrent implantation failure after in vitro fertilization treatment. *Tissue Antigens*. 2014;84(6):536-544. doi: 10.1111/tan.12452.

340. Nilsson LL, Scheike T, Langkilde CH, Jørgensen N, Hornstrup MB, Perin TL i in. Examining extended human leukocyte antigen-G and HLA-F haplotypes: the HLA-G UTR-4 haplotype is associated with shorter time to pregnancy in an infertility treatment setting when both female and male partners are carriers. *Fertil Steril*. 2020;114(3):628-639. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.04.052.

341. Johnsen GM, Fjeldstad HES, Drabbels JJM, Haasnoot GW, Eikmans M, Størvold GL i in. A possible role for HLA-G in development of uteroplacental acute atherosis in preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2021;144:103284. doi: 10.1016/j.jri.2021.103284.

342. Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol*. 2003;64(11):1005-1010. doi: 10.1016/j.humimm.2003.08.347.

343. Castelli EC, de Almeida BS, Muniz YCN, Silva NSB, Passos MRS, Souza AS i in. HLA-G genetic diversity and evolutive aspects in worldwide populations. *Sci Rep*. 2021;11(1):23070. doi: 10.1038/s41598-021-02106-4.

344. Chen XY, Yan WH, Lin A, Xu HH, Zhang JG, Wang XX. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue Antigens*. 2008;72(4):335-341. doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01107.x.

345. Hviid TV, Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR. Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. *Hum Immunol*. 2006;67(1-2):53-62. doi: 10.1016/j.humimm.2005.12.003.

346. Monti M, Lupoli R, Sosa Fernandez LM, Cirillo F, Di Minno MND. Association of human leukocyte antigen-G 14 bp polymorphism with recurrent pregnancy loss in European countries: a meta-analysis of literature studies. *Fertil Steril*. 2019;112(3):577-585.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.05.003.

347. Sipak O, Rył A, Grzywacz A, Laszczyńska M, Szymański S, Karakiewicz B i in. Molecular Analysis of HLA-G in Women with High-Risk Pregnancy and Their Partners with Regard to Possible Complications. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(6):982. doi: 10.3390/ijerph16060982.

348. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(3):369-95. doi: 10.1007/s00018-010-0580-7.

349. Tan Z, Shon AM, Ober C. Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region. Hum *Mol Genet*. 2005;14(23):3619-3628. doi: 10.1093/hmg/ddi389.

350. Rizzo R, Andersen AS, Lassen MR, Sørensen HC, Bergholt T, Larsen MH i in. Soluble human leukocyte antigen-G isoforms in maternal plasma in early and late pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2009;62(5):320-338. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00742.x.

351. Pfeiffer KA, Rebmann V, Pässler M, van der Ven K, van der Ven H, Krebs D i in. Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization. *Hum Immunol*. 2000;61(6):559-564. doi: 10.1016/s0198-8859(00)00123-3.

352. Zidi I, Rizzo R, Bouaziz A, Laaribi AB, Zidi N, Di Luca D i in. sHLA-G1 and HLA-G5 levels are decreased in Tunisian women with multiple abortion. *Hum Immunol*. 2016;77(4):342-345. doi: 10.1016/j.humimm.2016.01.019.

353. Lefebvre S, Berrih-Aknin S, Adrian F, Moreau P, Poea S, Gourand L i in. A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. *J Biol Chem*. 2001;276(9):6133-6139. doi: 10.1074/jbc.M008496200.

354. Ugurel S, Rebmann V, Ferrone S, Tilgen W, Grosse-Wilde H, Reinhold U. Soluble human leukocyte antigen--G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferon-alpha immunotherapy. *Cancer*. 2001;92(2):369-376. doi: 10.1002/1097-0142(20010715)92:2<369::aid-cncr1332>3.0.co;2-u.

355. Rebmann V, da Silva Nardi F, Wagner B, Horn PA. HLA-G as a tolerogenic molecule in transplantation and pregnancy. *J Immunol Res*. 2014;2014:297073. doi: 10.1155/2014/297073.

356. Martinez-Laso J, Herraiz MA, Peñaloza J, Barbolla ML, Jurado ML, Macedo J i in. Promoter sequences confirm the three different evolutionary lineages described for HLA-G. *Hum Immunol*. 2013;74(3):383-388. doi: 10.1016/j.humimm.2012.11.016.

357. Castelli EC, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Moreau P, Donadi EA. Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. *J Immunol Res*. 2014;2014:734068. doi: 10.1155/2014/734068.

358. Costa CH, Gelmini GF, Nardi FS, Roxo VM, Schuffner A, da Graça Bicalho M. HLA-G profile of infertile couples who underwent assisted reproduction treatment. *Hum Immunol*. 2016;77(12):1179-1186. doi: 10.1016/j.humimm.2016.09.002.

359. Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL i in. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet*. 2003;72(6):1425-1435. doi: 10.1086/375501.

360. Ober C, Billstrand C, Kuldanek S, Tan Z. The miscarriage-associated HLA-G -725G allele influences transcription rates in JEG-3 cells. *Hum Reprod*. 2006;21(7):1743-1748. doi: 10.1093/humrep/del036.

361. Marozio L, Garofalo A, Berchialla P, Tavella AM, Salton L, Cavallo F i in. Low expression of soluble human leukocyte antigen G in early gestation and subsequent placenta-mediated complications of pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017;43(9):1391-1396. doi: 10.1111/jog.13377.

362. Yie SM, Li LH, Li GM, Xiao R, Librach CL. Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. *Hum Reprod*. 2006;21(1):46-51. doi: 10.1093/humrep/dei305.

363. Gregori S, Amodio G, Quattrone F, Panina-Bordignon P. HLA-G Orchestrates the Early Interaction of Human Trophoblasts with the Maternal Niche. *Front Immunol*. 2015;6:128. doi: 10.3389/fimmu.2015.00128.

364. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Reproductive Endocrinology and Infertility. Diagnosis and treatment of luteal phase deficiency: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2021;115(6):1416-1423. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.02.010.

365. Nguyen LS, Rouas-Freiss N, Funck-Brentano C, Leban M, Carosella ED, Touraine P i in. Influence of hormones on the immunotolerogenic molecule HLA-G: a cross-sectional study in patients with congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol*. 2019;181(5):481-488. doi: 10.1530/EJE-19-0379.

366. Kushnir VA, Barad DH, Albertini DF, Darmon SK, Gleicher N. Systematic review of worldwide trends in assisted reproductive technology 2004-2013. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017;15(1):6. doi: 10.1186/s12958-016-0225-2.

367. Maheshwari A, Pandey S, Amalraj Raja E, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S. Is frozen embryo transfer better for mothers and babies? Can cumulative meta-analysis provide a definitive answer? *Hum Reprod Update*. 2018;24(1):35-58. doi: 10.1093/humupd/dmx031.

368. Thaker R, Mishra V, Gor M, Agarwal R, Sheth H, Kapadia P i in. The role of stimulation protocol, number of oocytes retrieved with respect to follicular fluid oxidative stress and IVF outcome. *Hum Fertil (Camb)*. 2020;23(1):23-31. doi: 10.1080/14647273.2018.1551630.

369. Ferreira LM, Meissner TB, Mikkelsen TS, Mallard W, O'Donnell CW, Tilburgs T i in. A distant trophoblast-specific enhancer controls HLA-G expression at the maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(19):5364-5369. doi: 10.1073/pnas.1602886113.

370. Martelli-Palomino G, Pancotto JA, Muniz YC, Mendes-Junior CT, Castelli EC, Massaro JD i in. Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential hla-g soluble levels in the Brazilian and French population. *PLoS One*. 2013;8(10):e71742. doi: 10.1371/journal.pone.0071742.

371. Sharkey DJ, Macpherson AM, Tremellen KP, Robertson SA. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(7):491-501. doi: 10.1093/molehr/gam028.

372. Sharkey DJ, Tremellen KP, Jasper MJ, Gemzell-Danielsson K, Robertson SA. Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus. *J Immunol*. 2012;188(5):2445-2454. doi: 10.4049/jimmunol.1102736.

373. Furukawa A, Meguro M, Yamazaki R, Watanabe H, Takahashi A, Kuroki K i in. Evaluation of the Reactivity and Receptor Competition of HLA-G Isoforms toward Available Antibodies: Implications of Structural Characteristics of HLA-G Isoforms. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):5947. doi: 10.3390/ijms20235947.

374. Lázaro-Sánchez AD, Salces-Ortiz P, Velásquez LI, Orozco-Beltrán D, Díaz-Fernández N, Juárez-Marroquí A. HLA-G as a new tumor biomarker: detection of soluble isoforms of HLA-G in the serum and saliva of patients with colorectal cancer. *Clin Transl Oncol*. 2020;22(7):1166-1171. doi: 10.1007/s12094-019-02244-2.

375. Jeong S, Park S, Park BW, Park Y, Kwon OJ, Kim HS. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) polymorphism and expression in breast cancer patients. *PLoS One*. 2014;9(5):e98284. doi: 10.1371/journal.pone.0098284.

376. Park Y, Park Y, Lim HS, Kim YS, Hong DJ, Kim HS. Soluble human leukocyte antigen-G expression in hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma. *Tissue Antigens*. 2012;79(2):97-103. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01814.x.

9. Suplement

Tabela 1S. Rozkład częstości genów i genotypów *KIR* oraz genotypów *HLA-C* u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz w kontrolnej grupie kobiet płodnych.

KIR/genotyp KIR/ genotyp HLA-C	Wszystkie kobiety IVF		RIF		SIVF		Kontrola płodna	
	N	n (%)	N	n (%)	N	n (%)	N	n (%)
2DL1	495	472 (95,35)	283	273 (96,47)	161	153 (95,03)	385	365 (94,81)
2DL2	493	291 (59,03)	282	168 (59,57)	160	96 (60,00)	384	203 (52,86)
2DL3	496	441 (88,91)	283	253 (89,40)	161	143 (88,82)	385	339 (88,05)
2DL4 norm.	493	332 (67,34)	281	197 (70,11)	161	102 (63,35)	385	264 (68,57)
2DL4 del.	491	377 (76,78)	280	220 (78,57)	160	116 (72,50)	385	299 (77,66)
2DL5 all	496	264 (53,23)	283	151 (53,36)	161	83 (51,55)	385	207 (53,77)
2DL5 gr.1	493	140 (28,40)	279	80 (28,67)	161	47 (29,19)	363	109 (30,03)
2DL5 gr.2	493	169 (34,28)	282	97 (34,40)	161	51 (31,68)	363	118 (32,51)
2DS1	496	204 (41,13)	283	114 (40,28)	161	70 (43,48)	385	169 (43,90)
2DS2	496	297 (59,88)	283	171 (60,42)	161	98 (60,87)	385	212 (55,06)
2DS3	496	169 (34,07)	283	96 (33,92)	161	50 (31,06)	385	134 (34,81)
2DS4 norm.	495	158 (31,92)	283	94 (33,22)	161	48 (29,81)	385	112 (29,09)
2DS4 del.	495	408 (82,42)	283	238 (84,10)	160	128 (80,00)	385	323 (83,90)
2DS5	494	143 (28,95)	282	81 (28,72)	160	48 (30,00)	385	123 (31,95)
3DL1	494	463 (93,72)	282	267 (94,68)	161	148 (91,93)	384	360 (93,75)
3DL2	495	492 (99,39)	283	282 (99,65)	160	159 (99,38)	383	383 (100,00)
3DL3	496	496 (100,00)	283	283 (100,00)	161	161 (100,00)	383	383 (100,00)
3DS1	496	177 (35,69)	283	103 (36,40)	161	55 (34,16)	384	153 (39,84)
2DP1	488	474 (97,13)	279	272 (97,49)	160	156 (97,50)	364	349 (95,88)
3DP1 norm.	489	469 (95,91)	279	271 (97,13)	161	154 (95,65)	363	346 (95,32)
3DP1 var.	490	150 (30,61)	279	90 (32,26)	161	50 (31,06)	363	106 (29,20)
AA	496	138 (27,82)	283	77 (27,21)	161	44 (27,33)	385	110 (28,57)
Bx	496	358 (72,18)	283	206 (72,79)	161	117 (72,67)	385	275 (71,43)
cenAA	496	197 (39,72)	283	112 (39,58)	161	61 (37,89)	385	173 (44,94)
cenAB	496	244 (49,19)	283	141 (49,82)	161	82 (50,93)	385	166 (43,12)
cenBB	496	55 (11,09)	283	30 (10,60)	161	18 (11,18)	385	46 (11,95)
telAA	496	286 (57,66)	283	164 (57,95)	161	90 (55,90)	384	205 (53,39)
telAB	496	177 (35,69)	283	103 (36,40)	161	58 (36,02)	384	156 (40,63)
telBB	496	33 (6,65)	283	16 (5,65)	161	13 (8,07)	384	23 (5,99)
cenAA/telAA	197	137 (69,54)	112	77 (68,75)	61	43 (70,49)	172	110 (63,95)
cenAA/telAB	197	55 (27,92)	112	33 (29,46)	61	15 (24,59)	172	58 (33,72)
cenAA/telBB	197	5 (2,54)	112	2 (1,79)	61	3 (4,92)	172	4 (2,33)
cenAB/telAA	244	125 (51,23)	141	72 (51,06)	82	42 (51,22)	166	79 (47,59)
cenAB/telAB	244	102 (41,80)	141	60 (42,55)	82	36 (43,90)	166	76 (45,78)
cenAB/telBB	244	17 (6,97)	141	9 (6,38)	82	4 (4,88)	166	11 (6,63)
cenBB/telAA	55	24 (43,64)	30	15 (50,00)	18	5 (27,78)	46	16 (34,78)
cenBB/telAB	55	20 (36,36)	30	10 (33,33)	18	7 (38,89)	46	22 (47,83)
cenBB/telBB	55	11 (20,00)	30	5 (16,67)	18	6 (33,33)	46	8 (17,39)
C1	990	570 (57,58)	566	328 (57,95)	322	186 (57,76)	766	457 (59,66)
C2	990	420 (42,42)	566	238 (42,05)	322	136 (42,24)	766	309 (40,34)
C1C1	495	162 (32,73)	283	96 (33,92)	161	52 (32,30)	383	135 (35,25)

KIR/genotyp KIR/ genotyp HLA-C	Wszystkie kobiety IVF		RIF		SIVF		Kontrola płodna	
	N	n (%)	N	n (%)	N	n (%)	N	n (%)
C1C2	495	246 (49,70)	283	136 (48,06)	161	82 (50,93)	383	187 (48,83)
C2C2	495	87 (17,58)	283	51 (18,02)	161	27 (16,77)	383	61 (15,93)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*. N – całkowita liczba osób przebadanych; n – liczba osób posiadających dany gen/genotyp/kombinację.

Tabela 2S. Porównanie częstości kombinacji genów *KIR* i *HLA-C* u kobiet, które poddały się zapłodnieniu pozaustrojowemu IVF oraz kontrolnych kobiet płodnych.

KIR/HLA	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=196 (%)	N=106 (%)	N=66 (%)	N=162 (%)
AA/C1+	108 (55,10)	58 (54,72)	36 (54,55)	96 (59,26)
AA/C2+	88 (44,90)	48 (45,28)	30 (45,45)	66 (40,74)
	N=137 (%)	N=77 (%)	N=44 (%)	N=110 (%)
AA/C1C1	49 (35,77)	29 (37,66)	14 (31,82)	44 (40,00)
AA/C1C2	59 (43,07)	29 (37,66)	22 (50,00)	52 (47,27)
AA/C2C2	29 (21,16)	19 (24,68)[a]	8 (18,18)	14 (12,73)
	N=545 (%)	N=313 (%)	N=177 (%)	N=408 (%)
Bx/C1+	300 (55,05)	174 (55,59)	98 (55,37)	226 (55,39)
Bx/C2+	245 (44,95)	139 (44,41)	79 (44,63)	182 (44,61)
	N=358 (%)	N=206 (%)	N=117 (%)	N=273 (%)
Bx/C1C1	113 (31,56)	67 (32,52)	38 (32,48)	91 (33,33)
Bx/C1C2	187 (52,23)	107 (51,94)	60 (51,28)	135 (49,45)
Bx/C2C2	58 (16,21)	32 (15,54)	19 (16,24)	47 (17,22)
	N=289 (%)	N=160 (%)	N=95 (%)	N=252 (%)
CenAA/C1+	160 (55,36)	89 (55,62)	52 (54,74)	147 (58,33)
CenAA/C2+	129 (44,64)	71 (44,38)	43 (45,26)	105 (41,67)
	N=196 (%)	N=112 (%)	N=61 (%)	N=172 (%)
CenAA/C1C1	67 (34,18)	41 (36,61)	18 (29,51)	67 (38,95)
CenAA/C1C2	93 (47,45)	48 (42,86)	34 (55,74)	80 (46,51)
CenAA/C2C2	36 (18,37)	23 (20,53)	9 (14,75)	25 (14,54)
	N=368 (%)	N=213 (%)	N=120 (%)	N=253 (%)
CenAB/C1+	202 (54,89)	115 (53,99)	69 (57,50)	140 (55,34)
CenAB/C2+	166 (45,11)	98 (46,01)	51 (42,50)	113 (44,66)
	N=244 (%)	N=141 (%)	N=82 (%)	N=165 (%)
CenAB/C1C1	78 (31,97)	43 (30,50)	31 (37,80)	52 (31,52)
CenAB/C1C2	124 (50,82)	72 (51,06)	38 (46,34)	88 (53,33)
CenAB/C2C2	42 (17,21)	26 (18,44)	13 (15,86)	25 (15,15)
	N=84 (%)	N=46 (%)	N=28 (%)	N=65 (%)
CenBB/C1+	46 (54,76)	28 (60,87)	13 (46,43)	35 (53,85)
CenBB/C2+	38 (45,24)	18 (39,13)	15 (53,57)	30 (46,15)
	N=55 (%)	N=30 (%)	N=18 (%)	N=46 (%)
CenBB/C1C1	17 (30,91)	12 (40,00)	3 (16,67)	16 (34,78)
CenBB/C1C2	29 (52,73)	16 (53,33)	10 (55,56)	19 (41,30)
CenBB/C2C2	9 (16,36)	2 (6,67)	5 (27,77)	11 (23,92)

KIR/HLA	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=422 (%)	N=238 (%)	N=137 (%)	N=309 (%)
TelAA/C1+	229 (54,27)	128 (53,78)	74 (54,01)	182 (58,90)
TelAA/C2+	193 (45,73)	110 (46,22)	63 (45,99)	127 (41,11)
	N=285 (%)	N=164 (%)	N=90 (%)	N=204 (%)
TelAA/C1C1	92 (32,28)	54 (32,93)	27 (30,00)	77 (37,75)
TelAA/C1C2	137 (48,07)	74 (45,12)	47 (52,22)	105 (51,47)
TelAA/C2C2	**56 (19,65)[b]**	**36 (21,95)[c]**	16 (17,78)	22 (10,78)
	N=268 (%)	N=157 (%)	N=87 (%)	N=225 (%)
TelAB/C1+	150 (55,97)	89 (56,69)	50 (57,47)	121 (53,78)
TelAB/C2+	118 (44,03)	68 (43,31)	37 (42,53)	104 (46,22)
	N=177 (%)	N=103 (%)	N=58 (%)	N=156 (%)
TelAB/C1C1	59 (33,33)	35 (33,98)	21 (36,21)	52 (33,33)
TelAB/C1C2	91 (51,41)	54 (52,43)	29 (50,00)	69 (44,23)
TelAB/C2C2	27 (15,26)	14 (13,59)	8 (13,79)	35 (22,44)
	N=51 (%)	N=24 (%)	N=19 (%)	N=36 (%)
TelBB/C1+	29 (56,86)	15 (62,50)	10 (52,63)	19 (52,78)
TelBB/C2+	22 (43,14)	9 (37,50)	9 (47,37)	17 (47,22)
	N=33 (%)	N=16 (%)	N=13 (%)	N=23 (%)
TelBB/C1C1	11 (33,33)	7 (43,75)	4 (30,77)	6 (26,09)
TelBB/C1C2	18 (54,55)	8 (50,00)	6 (46,15)	13 (56,52)
TelBB/C2C2	4 (12,12)	1 (6,25)	3 (23,08)	4 (17,39)
	N=195 (%)	N=106 (%)	N=65 (%)	N=162 (%)
CenAA/TelAA/C1+	107 (54,87)	58 (54,72)	35 (53,85)	96 (59,26)
CenAA/TelAA/C2+	88 (45,13)	48 (45,28)	30 (46,15)	66 (40,74)
	N=136 (%)	N=77 (%)	N=43 (%)	N=110 (%)
CenAA/TelAA/C1C1	48 (35,29)	29 (37,66)	13 (30,23)	44 (40,00)
CenAA/TelAA/C1C2	59 (43,38)	29 (37,66)	22 (51,16)	52 (47,27)
CenAA/TelAA/C2C2	29 (21,33)	**19 (24,68)[d]**	8 (18,61)	14 (12,73)
	N=87 (%)	N=52 (%)	N=25 (%)	N=82 (%)
CenAA/TelAB/C1+	48 (55,17)	29 (55,77)	14 (56,00)	47 (57,32)
CenAA/TelAB/C2+	39 (44,83)	23 (44,23)	11 (44,00)	35 (42,68)
	N=55 (%)	N=33 (%)	N=15 (%)	N=58 (%)
CenAA/TelAB/C1C1	16 (29,09)	10 (30,30)	4 (26,67)	23 (39,66)
CenAA/TelAB/C1C2	32 (58,18)	19 (57,58)	10 (66,67)	24 (41,38)
CenAA/TelAB/C2C2	7 (12,73)	4 (12,12)	1 (6,66)	11 (18,96)
	N=7 (%)	N=2 (%)	N=5 (%)	N=8 (%)
CenAA/TelBB/C1+	5 (71,43)	2 (100,00)	3 (60,00)	4 (50,00)
CenAA/TelBB/C2+	2 (28,57)	0 (0,00)	2 (40,00)	4 (50,00)
	N=5 (%)	N=2 (%)	N=3 (%)	N=4 (%)
CenAA/TelBB/C1C1	3 (60,00)	2 (100,00)	1 (33,33)	0 (0,00)
CenAA/TelBB/C1C2	2 (40,00)	0 (0,00)	2 (66,67)	4 (100,00)
CenAA/TelBB/C2C2	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=186 (%)	N=106 (%)	N=64 (%)	N=126 (%)
CenAB/TelAA/C1+	99 (53,23)	55 (51,89)	35 (54,69)	71 (56,35)
CenAB/TelAA/C2+	87 (46,77)	51 (48,11)	29 (45,31)	55 (43,65)
	N=125 (%)	N=72 (%)	N=42 (%)	N=78 (%)
CenAB/TelAA/C1C1	38 (30,40)	21 (29,17)	13 (30,95)	23 (29,49)

KIR/HLA	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CenAB/TelAA/C1C2	61 (48,80)	34 (47,22)	22 (52,38)	48 (61,54)
CenAB/TelAA/C2C2	**26 (20,80)[e]**	**17 (23,61)[f]**	7 (16,67)	7 (8,97)
	N=155 (%)	N=93 (%)	N=51 (%)	N=110 (%)
CenAB/TelAB/C1+	88 (56,77)	52 (55,91)	31 (60,78)	58 (52,73)
CenAB/TelAB/C2+	67 (43,23)	41 (44,09)	20 (39,22)	52 (47,27)
	N=102 (%)	N=60 (%)	N=36 (%)	N=76 (%)
CenAB/TelAB/C1C1	35 (34,31)	19 (31,67)	16 (44,44)	24 (31,58)
CenAB/TelAB/C1C2	53 (51,96)	33 (55,00)	15 (41,67)	34 (44,74)
CenAB/TelAB/C2C2	14 (13,73)	8 (13,33)	5 (13,89)	18 (23,68)
	N=27 (%)	N=14 (%)	N=5 (%)	N=17 (%)
CenAB/TelBB/C1+	15 (55,56)	8 (57,14)	3 (60,00)	11 (64,71)
CenAB/TelBB/C2+	12 (44,44)	6 (42,86)	2 (40,00)	6 (35,29)
	N=17 (%)	N=9 (%)	N=4 (%)	N=11 (%)
CenAB/TelBB/C1C1	5 (29,41)	3 (33,33)	2 (50,00)	5 (45,45)
CenAB/TelBB/C1C2	10 (58,82)	5 (55,56)	1 (25,00)	6 (54,55)
CenAB/TelBB/C2C2	2 (11,77)	1 (11,11)	1 (25,00)	0 (0,00)
	N=41 (%)	N=26 (%)	N=8 (%)	N=21 (%)
CenBB/TelAA/C1+	23 (56,10)	15 (57,69)	4 (50,00)	15 (71,43)
CenBB/TelAA/C2+	18 (43,90)	11 (42,31)	4 (50,00)	6 (28,57)
	N=24 (%)	N=15 (%)	N=5 (%)	N=16 (%)
CenBB/TelAA/C1C1	**6 (25,00)[g]**	4 (26,67)	1 (20,00)	10 (62,50)
CenBB/TelAA/C1C2	**17 (70,83)[h]**	**11 (73,33)[i]**	3 (60,00)	5 (31,25)
CenBB/TelAA/C2C2	1 (4,17)	0 (0,00)	1 (20,00)	1 (6,25)
	N=26 (%)	N=12 (%)	N=11 (%)	N=33 (%)
CenBB/TelAB/C1+	14 (53,85)	8 (66,67)	5 (45,45)	16 (48,48)
CenBB/TelAB/C2+	12 (46,15)	4 (33,33)	6 (54,55)	17 (51,52)
	N=20 (%)	N=10 (%)	N=7 (%)	N=22 (%)
CenBB/TelAB/C1C1	8 (40,00)	6 (60,00)	1 (14,29)	5 (22,73)
CenBB/TelAB/C1C2	6 (30,00)	2 (20,00)	4 (57,14)	11 (50,00)
CenBB/TelAB/C2C2	6 (30,00)	2 (20,00)	2 (28,57)	6 (27,27)
	N=17 (%)	N=8 (%)	N=9 (%)	N=11 (%)
CenBB/TelBB/C1+	9 (52,94)	5 (62,50)	4 (44,44)	4 (36,36)
CenBB/TelBB/C2+	8 (47,06)	3 (37,50)	5 (55,56)	7 (63,64)
	N=11 (%)	N=5 (%)	N=6 (%)	N=8 (%)
CenBB/TelBB/C1C1	3 (27,27)	2 (40,00)	1 (16,67)	1 (12,50)
CenBB/TelBB/C1C2	6 (54,55)	3 (60,00)	3 (50,00)	3 (37,50)
CenBB/TelBB/C2C2	2 (18,18)	0 (0,00)	2 (33,33)	4 (50,00)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x3 dla możliwych kombinacji HLA-C); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice. Wartości w nawiasach oznaczają procent liczebości.

RIF *vs.* kontrola płodna: [a]$p/p_{corr.}$=0,050/ns, OR=2,236, 95% CI (0,98-5,22); [c]$p/p_{corr.}$=0,004/0,012, OR=2,321, 95% CI (1,26-4,35); [d]$p/p_{corr.}$=0,050/ns, OR=2,236, 95% CI (0,98-5,22); [f]$p/p_{corr.}$=0,024/ns, OR=3,111, 95% CI (1,13-9,53); [i]$p/p_{corr.}$=0,032/ns, OR=5,663, 95% CI (1,03-38,63);

Wszystkie kobiety IVF *vs.* kontrola płodna: [b]$p/p_{corr.}$=0,009/0,026, OR=2,020, 95% CI (1,16-3,61); [e]$p/p_{corr.}$=0,031/ns, OR=2,652, 95% CI (1,05-7,65); [g]$p/p_{corr.}$=0,025/ns, OR=0,209, 95% CI (0,04-0,95); [h]$p/p_{corr.}$=0,023/ns, OR=5,097, 95% CI (1,13-26,76)

Tabela 3S. Częstość genotypów i alleli *ERAP1* i *ERAP2* u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kontrolnych kobiet płodnych.

	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
ERAP1 rs30187	N=496 (%)	N=283 (%)	N=161 (%)	N=385 (%)
CC	221 (44,56)	118 (41,70)	75 (46,58)	185 (48,05)
CT	219 (44,15)	130 (45,94)	70 (43,48)	166 (43,12)
TT	56 (11,29)	35 (12,36)	16 (9,94)	34 (8,83)
T	331 (33,37)	200 (35,34)	102 (31,68)	234 (30,39)
H-W	p=0,875	p=0,930	p=0,955	p=0,708
ERAP1 rs27044	N=496 (%)	N=283 (%)	N=161 (%)	N=385 (%)
CC	264 (53,23)	**141 (49,82)[a]**	88 (54,66)	225 (58,44)
CG	197 (39,72)	**120 (42,40)[b]**	63 (39,13)	133 (34,55)
GG	35 (7,05)	22 (7,78)	10 (6,21)	27 (7,01)
G	267 (26,92)	164 (28,98)	83 (25,78)	187 (24,29)
H-W	p=0,832	p=0,229	p=0,774	p=0,234
ERAP1 rs26653	N=496 (%)	N=283 (%)	N=161 (%)	N=382 (%)
GG	270 (54,44)	149 (52,65)	89 (55,28)	213 (55,76)
CG	201 (40,52)	120 (42,40)	66 (40,99)	150 (39,27)
CC	25 (5,04)	14 (4,95)	6 (3,73)	19 (4,97)
C	251 (25,30)	148 (26,15)	78 (24,22)	188 (24,61)
H-W	p=0,109	p=0,100	p=0,139	p=0,255
ERAP1 rs26618	N=496 (%)	N=283 (%)	N=161 (%)	N=385 (%)
TT	268 (54,03)	**163 (57,60)[c]**	81 (50,31)	190 (49,35)
CT	188 (37,90)	99 (34,98)	65 (40,37)	162 (42,08)
CC	40 (8,07)	21 (7,42)	15 (9,32)	33 (8,57)
C	268 (27,02)	141 (24,91)	95 (29,50)	228 (29,61)
H-W	p=0,387	p=0,275	p=0,709	p=0,853
ERAP1 rs2287987	N=496 (%)	N=283 (%)	N=161 (%)	N=385 (%)
TT	307 (61,90)	175 (61,84)	103 (63,98)	228 (59,22)
CT	165 (33,27)	94 (33,22)	50 (31,06)	146 (37,92)
CC	24 (4,83)	14 (4,94)	8 (4,96)	11 (2,86)
C	213 (21,47)	122 (21,55)	66 (20,50)	168 (21,82)
H-W	p=0,763	p=0,765	p=0,550	p=0,029
ERAP2 rs2248374	N=495 (%)	N=282 (%)	N=161 (%)	N=382 (%)
AA	126 (25,45)	67 (23,76)	48 (29,81)	106 (27,75)
AG	237 (47,88)	134 (47,52)	76 (47,20)	181 (47,38)
GG	132 (26,67)	81 (28,72)	37 (22,99)	95 (24,87)
G	501 (50,61)	296 (52,48)	150 (46,58)	371 (48,56)
H-W	p=0,347	p=0,459	p=0,514	p=0,313
ERAP1 rs6861666	N=495 (%)	N=282 (%)	N=161 (%)	N=380 (%)
AA	424 (85,66)	238 (84,40)	138 (85,71)	326 (85,79)
AG	69 (13,94)	43 (15,25)	22 (13,66)	53 (13,95)
GG	2 (0,40)	1 (0,35)	1 (0,63)	1 (0,26)

G	73 (7,37)	45 (7,98)	24 (7,45)	55 (7,24)
H-W	p=0,649	p=0,519	p=0,904	p=0,449

H-W – rozkład Hardy'ego-Weinberga; p – istotność statystyczna; OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności. Wartości pogrubione wskazują na istotne statystycznie różnice.

RIF *vs.* kontrola płodna: [a]p=0,028, OR=0,706, 95% CI (0,51-0,97); [b]p=0,044, OR=1,394, 95% CI (1,00-1,94); [c]p=0,041, OR=1,393, 95% CI (1,01-1,92)

Tabela 4S. Częstość kombinacji genotypów *ERAP* oraz *HLA-C* u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kontrolnych kobiet płodnych.

ERAP/HLA-C	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
ERAP1 rs30187/HLA-C	N=408 (%)	N=232 (%)	N=134 (%)	N=322 (%)
CC/C1+	189 (46,32)	102 (43,97)	63 (47,01)	153 (47,52)
CT/C1+	176 (43,14)	105 (45,26)	57 (42,54)	139 (43,17)
TT/C1+	43 (10,54)	25 (10,77)	14 (10,45)	30 (9,31)
	N=333 (%)	N=187 (%)	N=109 (%)	N=248 (%)
CC/C2+	148 (44,44)	77 (41,18)	50 (45,87)	118 (47,58)
CT/C2+	149 (44,74)	85 (45,45)	51 (46,79)	114 (45,97)
TT/C2+	36 (10,82)	**25 (13,37)[a]**	8 (7,34)	16 (6,45)
	N=162 (%)	N=96 (%)	N=52 (%)	N=135 (%)
CC/C1C1	73 (45,06)	41 (42,71)	25 (48,08)	66 (48,89)
CT/C1C1	69 (42,59)	45 (46,88)	19 (36,54)	51 (37,78)
TT/C1C1	20 (12,35)	10 (10,41)	8 (15,38)	18 (13,33)
	N=246 (%)	N=136 (%)	N=82 (%)	N=187 (%)
CC/C1C2	116 (47,15)	61 (44,85)	38 (46,34)	87 (46,52)
CT/C1C2	107 (43,50)	60 (44,12)	38 (46,34)	88 (47,06)
TT/C1C2	23 (9,35)	15 (11,03)	6 (7,32)	12 (6,42)
	N=87 (%)	N=51 (%)	N=27 (%)	N=61 (%)
CC/C2C2	32 (36,78)	**16 (31,37)[b]**	12 (44,44)	31 (50,82)
CT/C2C2	42 (48,28)	25 (49,02)	13 (48,15)	26 (42,62)
TT/C2C2	13 (14,94)	**10 (19,61)[c]**	2 (7,41)	4 (6,56)
ERAP1 rs27044/HLA-C	N=408 (%)	N=232 (%)	N=134 (%)	N=322 (%)
CC/C1+	224 (54,90)	120 (51,72)	74 (55,22)	189 (58,70)
CG/C1+	157 (38,48)	95 (40,95)	52 (38,81)	109 (33,85)
GG/C1+	27 (6,62)	17 (7,33)	8 (5,97)	24 (7,45)
	N=333 (%)	N=187 (%)	N=109 (%)	N=248 (%)
CC/C2+	181 (54,35)	96 (51,34)	58 (53,21)	143 (57,66)
CG/C2+	131 (39,34)	77 (41,18)	46 (42,20)	94 (37,90)
GG/C2+	21 (6,31)	14 (7,48)	5 (4,59)	11 (4,44)
	N=162 (%)	N=96 (%)	N=52 (%)	N=135 (%)
CC/C1C1	83 (51,23)	45 (46,88)	30 (57,69)	81 (60,00)
CG/C1C1	**65 (40,12)[d]**	**43 (44,79)[e]**	17 (32,69)	38 (28,15)
GG/C1C1	14 (8,65)	8 (8,33)	5 (9,61)	16 (11,85)
	N=246 (%)	N=136 (%)	N=82 (%)	N=187 (%)
CC/C1C2	141 (57,32)	75 (55,15)	44 (53,66)	108 (57,75)
CG/C1C2	92 (37,40)	52 (38,24)	35 (42,68)	71 (37,97)
GG/C1C2	13 (5,28)	9 (6,61)	3 (3,66)	8 (4,28)

ERAP/HLA-C	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=87 (%)	N=51 (%)	N=27 (%)	N=61 (%)
CC/C2C2	40 (45,98)	21 (41,18)	14 (51,85)	35 (57,38)
CG/C2C2	39 (44,82)	25 (49,02)	11 (40,74)	23 (37,70)
GG/C2C2	8 (9,20)	5 (9,80)	2 (7,41)	3 (4,92)
ERAP1 rs26653/HLA-C	N=408 (%)	N=232 (%)	N=134 (%)	N=320 (%)
GG/C1+	231 (56,62)	130 (56,03)	74 (55,22)	169 (52,81)
CG/C1+	157 (38,48)	91 (39,22)	56 (41,79)	134 (41,88)
CC/C1+	20 (4,90)	11 (4,75)	4 (2,99)	17 (5,31)
	N=333 (%)	N=187 (%)	N=109 (%)	N=246 (%)
GG/C2+	182 (54,65)	98 (52,41)	62 (56,88)	140 (56,91)
CG/C2+	136 (40,84)	80 (42,78)	43 (39,45)	96 (39,02)
CC/C2+	15 (4,51)	9 (4,81)	4 (3,67)	10 (4,07)
	N=162 (%)	N=96 (%)	N=52 (%)	N=135 (%)
GG/C1C1	88 (54,32)	51 (53,12)	27 (51,92)	72 (53,33)
CG/C1C1	64 (39,51)	40 (41,67)	23 (44,23)	54 (40,00)
CC/C1C1	10 (6,17)	5 (5,21)	2 (3,85)	9 (6,67)
	N=246 (%)	N=136 (%)	N=82 (%)	N=185 (%)
GG/C1C2	143 (58,13)	79 (58,09)	47 (57,32)	97 (52,43)
CG/C1C2	93 (37,80)	51 (37,50)	33 (40,24)	80 (43,24)
CC/C1C2	10 (4,07)	6 (4,41)	2 (2,44)	8 (4,33)
	N=87 (%)	N=51 (%)	N=27 (%)	N=61 (%)
GG/C2C2	**39 (44,83)[f]**	**19 (37,25)[g]**	15 (55,56)	43 (70,49)
CG/C2C2	**43 (49,43)[h]**	**29 (56,86)[i]**	10 (37,04)	16 (26,23)
CC/C2C2	5 (5,74)	3 (5,89)	2 (7,40)	2 (3,28)
ERAP1 rs26618/HLA-C	N=408 (%)	N=232 (%)	N=134 (%)	N=322 (%)
TT/C1+	212 (51,96)	129 (55,60)	65 (48,51)	161 (50,00)
CT/C1+	163 (39,95)	84 (36,21)	57 (42,54)	135 (41,93)
CC/C1+	33 (8,09)	19 (8,19)	12 (8,95)	26 (8,07)
	N=333 (%)	N=187 (%)	N=109 (%)	N=248 (%)
TT/C2+	186 (55,86)	**116 (62,03) [j,k]**	54 (49,54)	120 (48,39)
CT/C2+	123 (36,94)	**62 (33,16)[l]**	44 (40,37)	109 (43,95)
CC/C2+	24 (7,20)	9 (4,81)	11 (10,09)	19 (7,66)
	N=162 (%)	N=96 (%)	N=52 (%)	N=135 (%)
TT/C1C1	81 (50,00)	47 (48,96)	27 (51,92)	70 (51,85)
CT/C1C1	65 (40,12)	37 (38,54)	21 (40,38)	52 (38,52)
CC/C1C1	16 (9,88)	12 (12,50)	4 (7,70)	13 (9,63)
	N=246 (%)	N=136 (%)	N=82 (%)	N=187 (%)
TT/C1C2	131 (53,25)	**82 (60,29)[m,n]**	38 (46,34)	91 (48,66)
CT/C1C2	98 (39,84)	47 (34,56)	36 (43,90)	83 (44,39)
CC/C1C2	17 (6,91)	7 (5,15)	8 (9,76)	13 (6,95)
	N=87 (%)	N=51 (%)	N=27 (%)	N=61 (%)
TT/C2C2	55 (63,22)	34 (66,67)	16 (59,26)	29 (47,54)
CT/C2C2	25 (28,74)	15 (29,41)	8 (29,63)	26 (42,62)
CC/C2C2	7 (8,04)	2 (3,92)	3 (11,11)	6 (9,84)
ERAP1 rs2287987/HLA-C	N=408 (%)	N=232 (%)	N=134 (%)	N=322 (%)
TT/C1+	248 (60,78)	140 (60,34)	87 (64,93)	192 (59,63)
CT/C1+	138 (33,82)	80 (34,48)	39 (29,1)	121 (37,58)

ERAP/HLA-C	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CC/C1+	22 (5,40)	12 (5,18)	8 (5,96)	9 (2,9)
	N=333 (%)	N=187 (%)	N=109 (%)	N=248 (%)
TT/C2+	203 (60,96)	111 (59,36)	70 (64,22)	153 (61,69)
CT/C2+	111 (33,33)	65 (34,76)	33 (30,28)	87 (35,08)
CC/C2+	19 (5,71)	11 (5,88)	6 (5,50)	8 (3,23)
	N=162 (%)	N=96 (%)	N=52 (%)	N=135 (%)
TT/C1C1	103 (63,58)	64 (66,67)	33 (63,46)	73 (54,07)
CT/C1C1	54 (33,33)	29 (30,21)°	17 (32,69)	59 (43,70)
CC/C1C1	5 (3,09)	3 (3,12)	2 (3,85)	3 (2,23)
	N=246 (%)	N=136 (%)	N=82 (%)	N=187 (%)
TT/C1C2	145 (58,94)	76 (55,88)	54 (65,85)	119 (63,64)
CT/C1C2	84 (34,15)	51 (37,50)	22 (26,83)	62 (33,16)
CC/C1C2	17 (6,91)	9 (6,62)	6 (7,32)	6 (3,20)
	N=87 (%)	N=51 (%)	N=27 (%)	N=61 (%)
TT/C2C2	58 (66,67)	35 (68,63)	16 (59,26)	34 (55,74)
CT/C2C2	27 (31,03)	14 (27,45)	11 (40,74)	25 (40,98)
CC/C2C2	2 (2,30)	2 (3,92)	0 (0,00)	2 (3,28)
ERAP2 rs2248374/HLA-C	N=407 (%)	N=231 (%)	N=134 (%)	N=320 (%)
AA/C1+	114 (28,01)	61 (26,41)	44 (32,84)	91 (28,44)
AG/C1+	193 (47,42)	107 (46,32)	64 (47,76)	156 (48,75)
GG/C1+	100 (24,57)	63 (27,27)	26 (19,40)	73 (22,81)
	N=332 (%)	N=186 (%)	N=109 (%)	N=246 (%)
AA/C2+	78 (23,49)	41 (22,04)	30 (27,52)	67 (27,24)
AG/C2+	166 (50,00)	94 (50,54)	52 (47,71)	118 (47,97)
GG/C2+	88 (26,51)	51 (27,42)	27 (24,77)	61 (24,9)
	N=162 (%)	N=96 (%)	N=52 (%)	N=135 (%)
AA/C1C1	48 (29,63)	26 (27,08)	18 (34,62)	38 (28,15)
AG/C1C1	71 (43,83)	40 (41,67)	24 (46,15)	63 (46,67)
GG/C1C1	43 (26,54)	30 (31,25)	10 (19,23)	34 (25,18)
	N=245 (%)	N=135 (%)	N=82 (%)	N=185 (%)
AA/C1C2	66 (26,94)	35 (25,93)	26 (31,71)	53 (28,65)
AG/C1C2	122 (49,80)	67 (49,63)	40 (48,78)	93 (50,27)
GG/C1C2	57 (23,26)	33 (24,44)	16 (19,51)	39 (21,08)
	N=87 (%)	N=51 (%)	N=27 (%)	N=61 (%)
AA/C2C2	12 (13,79)	6 (11,77)	4 (14,82)	14 (22,95)
AG/C2C2	44 (50,57)	27 (52,94)	12 (44,44)	25 (40,98)
GG/C2C2	31 (35,64)	18 (35,29)	11 (40,74)	22 (36,07)
ERAP1 rs6861666/HLA-C	N=407 (%)	N=231 (%)	N=134 (%)	N=319 (%)
AA/C1+	349 (85,75)	194 (83,98)	116 (86,57)	280 (87,77)
AG/C1+	57 (14,00)	36 (15,58)	18 (13,43)	39 (12,23)
GG/C1+	1 (0,25)	1 (0,44)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=332 (%)	N=186 (%)	N=109 (%)	N=244 (%)
AA/C2+	289 (87,05)	159 (85,48)	95 (87,16)	207 (84,84)
AG/C2+	41 (12,35)	26 (13,98)	13 (11,93)	36 (14,75)
GG/C2+	2 (0,60)	1 (0,54)	1 (0,91)	1 (0,41)
	N=162 (%)	N=96 (%)	N=52 (%)	N=135 (%)
AA/C1C1	134 (82,72)	79 (82,29)	43 (82,69)	118 (87,41)

ERAP/HLA-C	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
AG/C1C1	28 (17,28)	17 (17,71)	9 (17,31)	17 (12,59)
GG/C1C1	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=245 (%)	N=135 (%)	N=82 (%)	N=184 (%)
AA/C1C2	215 (87,76)	115 (85,19)	73 (89,02)	162 (88,04)
AG/C1C2	29 (11,84)	19 (14,07)	9 (10,98)	22 (11,96)
GG/C1C2	1 (0,40)	1 (0,74)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=87 (%)	N=51 (%)	N=27 (%)	N=60 (%)
AA/C2C2	74 (85,06)	44 (86,27)	22 (81,48)	45 (75,00)
AG/C2C2	12 (13,79)	7 (13,73)	4 (14,81)	14 (23,33)
GG/C2C2	1 (1,15)	0 (0,00)	1 (3,71)	1 (1,67)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla możliwych alleli HLA-C lub x9 dla kombinacji z genotypami HLA-C); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice. Wartości w nawiasach oznaczają procent liczebności.

RIF *vs.* kontrola płodna: [a]$p/p_{corr.}$=0,020/ns, OR=2,233, 95% CI (1,11-4,63); [b]$p/p_{corr.}$=0,054/ns, OR=0,446, 95% CI (0,19-1,03); [c]$p/p_{corr.}$=0,047/ns, OR=3,437, 95% CI (0,91-16,07); [e]$p/p_{corr.}$=0,012/ns, OR=2,064, 95% CI (1,15-3,72); [g]$p/p_{corr.}$=0,001/0,005, OR=0,252, 95% CI (0,10-0,59); [i]$p/p_{corr.}$=0,002/0,016, OR=3,661, 95% CI (1,56-8,89); [j]$p/p_{corr.}$=0,005/0,029, OR=1,741, 95% CI (1,16-2,61); [l]$p/p_{corr.}$=0,023/ns, OR=0,633, 95% CI (0,42-0,96); [m]$p/p_{corr.}$=0,042/ns, OR=1,600, 95% CI (1,00-2,57); [o]$p/p_{corr.}$=0,040/ns, OR=0,559, 95% CI (0,31-1,00);

Wszystkie kobiety IVF *vs.* kontrola płodna: [d]$p/p_{corr.}$=0,037/ns, OR=1,707, 95% CI (1,02-2,88); [f]$p/p_{corr.}$=0,002/0,022, OR=0,343, 95% CI (0,16-0,72); [h]$p/p_{corr.}$=0,006/ns, OR=2,730, 95% CI (1,29-6,00);

RIF *vs.* SIVF: [k]$p/p_{corr.}$=0,039/ns, OR=1,661, 95% CI (1,00-2,76); [n]$p/p_{corr.}$=0,050/ns, OR=1,754, 95% CI (0,97-3,18)

Tabela 5S. Częstość kombinacji genotypów *ERAP, HLA-C i KIR* u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kontrolnych kobiet płodnych.

ERAP/HLA-C/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
ERAP1 rs30187/HLA-C/KIR	N=108 (%)	N=58 (%)	N=36 (%)	N=96 (%)
CC/C1+/AA	44 (40,74)	22 (37,93)	16 (44,44)	46 (47,92)
CT/C1+/AA	49 (45,37)	26 (44,83)	17 (47,22)	39 (40,62)
TT/C1+/AA	15 (13,89)	10 (17,24)	3 (8,34)	11 (11,46)
	N=300 (%)	N=174 (%)	N=98 (%)	N=226 (%)
CC/C1+/Bx	145 (48,33)	80 (45,98)	47 (47,96)	107 (47,35)
CT/C1+/Bx	127 (42,33)	79 (45,40)	40 (40,82)	100 (44,25)
TT/C1+/Bx	28 (9,34)	15 (8,62)	11 (11,22)	19 (8,40)
	N=88 (%)	N=48 (%)	N=30 (%)	N=66 (%)
CC/C2+/AA	31 (35,23)	16 (33,33)	11 (36,67)	31 (46,97)
CT/C2+/AA	42 (47,73)	21 (43,75)	17 (56,67)	30 (45,45)
TT/C2+/AA	15 (17,04)	**11 (22,92)[a]**	2 (6,66)	5 (7,58)
	N=245 (%)	N=139 (%)	N=79 (%)	N=182 (%)
CC/C2+/Bx	117 (47,76)	61 (43,88)	39 (49,37)	87 (47,80)
CT/C2+/Bx	107 (43,67)	64 (46,04)	34 (43,04)	84 (46,15)

ERAP/HLA-C/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
TT/C2+/Bx	21 (8,57)	14 (10,08)	6 (7,59)	11 (6,05)
	N=49 (%)	N=29 (%)	N=14 (%)	N=44 (%)
CC/C1C1/AA	23 (46,94)	13 (44,83)	8 (57,14)	21 (47,73)
CT/C1C1/AA	20 (40,82)	12 (41,38)	5 (35,71)	15 (34,09)
TT/C1C1/AA	6 (12,24)	4 (13,79)	1 (7,15)	8 (18,18)
	N=59 (%)	N=29 (%)	N=22 (%)	N=52 (%)
CC/C1C2/AA	21 (35,59)	9 (31,03)	8 (36,36)	25 (48,08)
CT/C1C2/AA	29 (49,15)	14 (48,28)	12 (54,55)	24 (46,15)
TT/C1C2/AA	9 (15,26)	6 (20,69)	2 (9,09)	3 (5,77)
	N=29 (%)	N=19 (%)	N=8 (%)	N=14 (%)
CC/C2C2/AA	10 (34,48)	7 (36,84)	3 (37,50)	6 (42,86)
CT/C2C2/AA	13 (44,83)	7 (36,84)	5 (62,50)	6 (42,86)
TT/C2C2/AA	6 (20,69)	5 (26,32)	0 (0,00)	2 (14,28)
	N=113 (%)	N=67 (%)	N=38 (%)	N=91 (%)
CC/C1C1/Bx	50 (44,25)	28 (41,79)	17 (44,74)	45 (49,45)
CT/C1C1/Bx	49 (43,36)	33 (49,25)	14 (36,84)	36 (39,56)
TT/C1C1/Bx	14 (12,39)	6 (8,96)	7 (18,42)	10 (10,99)
	N=187 (%)	N=107 (%)	N=60 (%)	N=135 (%)
CC/C1C2/Bx	95 (50,80)	52 (48,60)	30 (50,00)	62 (45,93)
CT/C1C2/Bx	78 (41,71)	46 (42,99)	26 (43,33)	64 (47,41)
TT/C1C2/Bx	14 (7,49)	9 (8,41)	4 (6,67)	9 (6,66)
	N=58 (%)	N=32 (%)	N=19 (%)	N=47 (%)
CC/C2C2/Bx	22 (37,93)	9 (28,12)[b]	9 (47,37)	25 (53,19)
CT/C2C2/Bx	29 (50,00)	18 (56,25)	8 (42,11)	20 (42,55)
TT/C2C2/Bx	7 (12,07)	5 (15,63)	2 (10,52)	2 (4,26)
ERAP1 rs27044/HLA-C/KIR	N=108 (%)	N=58 (%)	N=36 (%)	N=96 (%)
CC/C1+/AA	56 (51,85)	29 (50,00)	20 (55,56)	56 (58,33)
CG/C1+/AA	40 (37,04)	20 (34,48)	15 (41,67)	30 (31,25)
GG/C1+/AA	12 (11,11)	9 (15,52)	1 (2,77)	10 (10,42)
	N=300 (%)	N=174 (%)	N=98 (%)	N=226 (%)
CC/C1+/Bx	168 (56,00)	91 (52,30)	54 (55,10)	133 (58,85)
CG/C1+/Bx	117 (39,00)	75 (43,10)	37 (37,76)	79 (34,96)
GG/C1+/Bx	15 (5,00)	8 (4,60)	7 (7,14)	14 (6,19)
	N=88 (%)	N=48 (%)	N=30 (%)	N=66 (%)
CC/C2+/AA	40 (45,45)	21 (43,75)	14 (46,67)	36 (54,55)
CG/C2+/AA	37 (42,05)	19 (39,58)	15 (50,00)	26 (39,39)
GG/C2+/AA	11 (12,50)	8 (16,67)	1 (3,33)	4 (6,06)
	N=245 (%)	N=139 (%)	N=79 (%)	N=182 (%)
CC/C2+/Bx	141 (57,55)	75 (53,96)	44 (55,70)	107 (58,79)
CG/C2+/Bx	94 (38,37)	58 (41,73)	31 (39,24)	68 (37,36)
GG/C2+/Bx	10 (4,08)	6 (4,31)	4 (5,06)	7 (3,85)
	N=49 (%)	N=29 (%)	N=14 (%)	N=44 (%)
CC/C1C1/AA	28 (57,14)	16 (55,17)	10 (71,43)	26 (59,09)
CG/C1C1/AA	17 (34,69)	10 (34,48)	4 (28,57)	11 (25,00)
GG/C1C1/AA	4 (8,17)	3 (10,35)	0 (0,00)	7 (15,91)
	N=59 (%)	N=29 (%)	N=22 (%)	N=52 (%)

ERAP/HLA-C/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CC/C1C2/AA	28 (47,46)	13 (44,83)	10 (45,45)	30 (57,69)
CG/C1C2/AA	23 (38,98)	10 (34,48)	11 (50,00)	19 (36,54)
GG/C1C2/AA	8 (13,56)	6 (20,69)	1 (4,55)	3 (5,77)
	N=29 (%)	N=19 (%)	N=8 (%)	N=14 (%)
CC/C2C2/AA	12 (41,38)	8 (42,11)	4 (50,00)	6 (42,86)
CG/C2C2/AA	14 (48,28)	9 (47,37)	4 (50,00)	7 (50,00)
GG/C2C2/AA	3 (10,34)	2 (10,52)	0 (0,00)	1 (7,14)
	N=113 (%)	N=67 (%)	N=38 (%)	N=91 (%)
CC/C1C1/Bx	55 (48,67)	**29 (43,28)[c]**	20 (52,63)	55 (60,44)
CG/C1C1/Bx	48 (42,48)	**33 (49,25)[d]**	13 (34,21)	27 (29,67)
GG/C1C1/Bx	10 (8,85)	5 (7,47)	5 (13,16)	9 (9,89)
	N=187 (%)	N=107 (%)	N=60 (%)	N=135 (%)
CC/C1C2/Bx	113 (60,43)	62 (57,94)	34 (56,67)	78 (57,78)
CG/C1C2/Bx	69 (36,90)	42 (39,25)	24 (40,00)	52 (38,52)
GG/C1C2/Bx	5 (2,67)	3 (2,81)	2 (3,33)	5 (3,70)
	N=58 (%)	N=32 (%)	N=19 (%)	N=47 (%)
CC/C2C2/Bx	28 (48,28)	13 (40,62)	10 (52,63)	29 (61,70)
CG/C2C2/Bx	25 (43,10)	16 (50,00)	7 (36,84)	16 (34,04)
GG/C2C2/Bx	5 (8,62)	3 (9,38)	2 (10,53)	2 (4,26)
ERAP1 rs26653/HLA-C/KIR	N=108 (%)	N=58 (%)	N=36 (%)	N=95 (%)
GG/C1+/AA	61 (56,48)	31 (53,45)	20 (55,56)	53 (55,79)
CG/C1+/AA	38 (35,19)	22 (37,93)	13 (36,11)	38 (40,00)
CC/C1+/AA	9 (8,33)	5 (8,62)	3 (8,33)	4 (4,21)
	N=300 (%)	N=174 (%)	N=98 (%)	N=225 (%)
GG/C1+/Bx	170 (56,67)	99 (56,90)	54 (55,10)	116 (51,56)
CG/C1+/Bx	119 (39,67)	69 (39,66)	43 (43,88)	96 (42,67)
CC/C1+/Bx	11 (3,66)	6 (3,44)	1 (1,02)	13 (5,77)
	N=88 (%)	N=48 (%)	N=30 (%)	N=65 (%)
GG/C2+/AA	**42 (47,73)[e]**	**21 (43,75)[f]**	15 (50,00)	42 (64,62)
CG/C2+/AA	40 (45,45)	**25 (52,08)[g]**	11 (36,67)	21 (32,31)
CC/C2+/AA	6 (6,82)	2 (4,17)	4 (13,33)	2 (3,07)
	N=245 (%)	N=139 (%)	N=79 (%)	N=181 (%)
GG/C2+/Bx	140 (57,14)	77 (55,40)	47 (59,49)	98 (54,14)
CG/C2+/Bx	96 (39,18)	55 (39,56)	32 (40,51)	75 (41,44)
CC/C2+/Bx	9 (3,68)	**7 (5,04)[h]**	0 (0,00)	8 (4,42)
	N=49 (%)	N=29 (%)	N=14 (%)	N=44 (%)
GG/C1C1/AA	29 (59,18)	16 (55,17)	8 (57,14)	23 (52,27)
CG/C1C1/AA	15 (30,62)	10 (34,48)	5 (35,71)	18 (40,91)
CC/C1C1/AA	5 (10,20)	3 (10,35)	1 (7,15)	3 (6,82)
	N=59 (%)	N=29 (%)	N=22 (%)	N=51 (%)
GG/C1C2/AA	32 (54,24)	15 (51,72)	12 (54,55)	30 (58,82)
CG/C1C2/AA	23 (38,98)	12 (41,38)	8 (36,36)	20 (39,22)
CC/C1C2/AA	4 (6,78)	2 (6,90)	2 (9,09)	1 (1,96)
	N=29 (%)	N=19 (%)	N=8 (%)	N=14 (%)
GG/C2C2/AA	**10 (34,48)[i]**	**6 (31,58)[j]**	**3 (37,50)[k]**	12 (85,72)
CG/C2C2/AA	**17 (58,62)[l]**	**13 (68,42)[m]**	3 (37,50)	1 (7,14)

ERAP/HLA-C/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CC/C2C2/AA	2 (6,90)	0 (0,00)	2 (25,00)	1 (7,14)
	N=113 (%)	N=67 (%)	N=38 (%)	N=91 (%)
GG/C1C1/Bx	59 (52,21)	35 (52,23)	19 (50,00)	49 (53,85)
CG/C1C1/Bx	49 (43,36)	30 (44,78)	18 (47,37)	36 (39,56)
CC/C1C1/Bx	5 (4,43)	2 (2,99)	1 (2,63)	6 (6,59)
	N=187 (%)	N=107 (%)	N=60 (%)	N=134 (%)
GG/C1C2/Bx	111 (59,36)	64 (59,81)	35 (58,33)	67 (50,00)
CG/C1C2/Bx	70 (37,43)	39 (36,45)	25 (41,67)	60 (44,78)
CC/C1C2/Bx	6 (3,21)	4 (3,74)	0 (0,00)	7 (5,22)
	N=58 (%)	N=32 (%)	N=19 (%)	N=47 (%)
GG/C2C2/Bx	29 (50,00)	**13 (40,62)[n]**	12 (63,16)	31 (65,96)
CG/C2C2/Bx	26 (44,83)	16 (50,00)	7 (36,84)	15 (31,91)
CC/C2C2/Bx	3 (5,17)	3 (9,38)	0 (0,00)	1 (2,13)
ERAP1 rs26618/HLA-C/KIR	N=108 (%)	N=58 (%)	N=36 (%)	N=96 (%)
TT/C1+/AA	60 (55,56)	35 (60,34)	19 (52,78)	45 (46,88)
CT/C1+/AA	43 (39,81)	19 (32,76)	16 (44,44)	38 (39,58)
CC/C1+/AA	**5 (4,63)[o]**	4 (6,90)	1 (2,78)	13 (13,54)
	N=300 (%)	N=174 (%)	N=98 (%)	N=226 (%)
TT/C1+/Bx	152 (50,67)	94 (54,02)	46 (46,94)	116 (51,33)
CT/C1+/Bx	120 (40,00)	65 (37,36)	41 (41,84)	97 (42,92)
CC/C1+/Bx	28 (9,33)	15 (8,62)	11 (11,22)	13 (5,75)
	N=88 (%)	N=48 (%)	N=30 (%)	N=66 (%)
TT/C2+/AA	**53 (60,23)[p]**	29 (60,42)	19 (63,33)	29 (43,94)
CT/C2+/AA	34 (38,63)	18 (37,50)	11 (36,67)	29 (43,94)
CC/C2+/AA	**1 (1,14)[q]**	1 (2,08)	**0 (0,00)[r]**	8 (12,12)
	N=245 (%)	N=139 (%)	N=79 (%)	N=182 (%)
TT/C2+/Bx	133 (54,29)	**87 (62,59)[s,t]**	35 (44,30)	91 (50,00)
CT/C2+/Bx	89 (36,33)	**44 (31,65)[u]**	33 (41,78)	80 (43,96)
CC/C2+/Bx	23 (9,38)	**8 (5,76)[v]**	**11 (13,92)[w]**	11 (6,04)
	N=49 (%)	N=29 (%)	N=14 (%)	N=44 (%)
TT/C1C1/AA	25 (51,02)	15 (51,73)	7 (50,00)	22 (50,00)
CT/C1C1/AA	19 (38,78)	10 (34,48)	6 (42,86)	15 (34,09)
CC/C1C1/AA	5 (10,20)	4 (13,79)	1 (7,14)	7 (15,91)
	N=59 (%)	N=29 (%)	N=22 (%)	N=52 (%)
TT/C1C2/AA	35 (59,32)	**20 (68,97)[x]**	12 (54,55)	23 (44,23)
CT/C1C2/AA	24 (40,68)	9 (31,03)	10 (45,45)	23 (44,23)
CC/C1C2/AA	**0 (0,00)[y]**	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (11,54)
	N=29 (%)	N=19 (%)	N=8 (%)	N=14 (%)
TT/C2C2/AA	18 (62,07)	9 (47,37)	7 (87,50)	6 (42,86)
CT/C2C2/AA	10 (34,48)	9 (47,37)	1 (12,50)	6 (42,86)
CC/C2C2/AA	1 (3,45)	1 (5,26)	0 (0,00)	2 (14,28)
	N=113 (%)	N=67 (%)	N=38 (%)	N=91 (%)
TT/C1C1/Bx	56 (49,56)	32 (47,76)	20 (52,63)	48 (52,75)
CT/C1C1/Bx	46 (40,71)	27 (40,30)	15 (39,47)	37 (40,66)
CC/C1C1/Bx	11 (9,73)	8 (11,94)	3 (7,89)	6 (6,59)
	N=187 (%)	N=107 (%)	N=60 (%)	N=135 (%)

ERAP/HLA-C/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
TT/C1C2/Bx	96 (51,34)	62 (57,94)	26 (43,33)	68 (50,37)
CT/C1C2/Bx	74 (39,57)	38 (35,51)	26 (43,33)	60 (44,44)
CC/C1C2/Bx	17 (9,09)	7 (6,55)	8 (13,34)	7 (5,19)
	N=58 (%)	N=32 (%)	N=19 (%)	N=47 (%)
TT/C2C2/Bx	37 (63,79)	**25 (78,12)[z,aa]**	9 (47,37)	23 (48,94)
CT/C2C2/Bx	15 (25,86)	**6 (18,75)[ab]**	7 (36,84)	20 (42,55)
CC/C2C2/Bx	6 (10,35)	1 (3,13)	3 (15,79)	4 (8,51)
ERAP1 rs2287987/HLA-C/KIR	N=108 (%)	N=58 (%)	N=36 (%)	N=96 (%)
TT/C1+/AA	68 (62,96)	37 (63,79)	23 (63,89)	63 (65,62)
CT/C1+/AA	37 (34,26)	20 (34,48)	11 (30,56)	32 (33,33)
CC/C1+/AA	3 (2,78)	1 (1,73)	2 (5,55)	1 (1,05)
	N=300 (%)	N=174 (%)	N=98 (%)	N=226 (%)
TT/C1+/Bx	180 (60,00)	103 (59,20)	64 (65,31)	129 (57,08)
CT/C1+/Bx	101 (33,67)	60 (34,48)	28 (28,57)	89 (39,38)
CC/C1+/Bx	19 (6,33)	11 (6,32)	6 (6,12)	8 (3,54)
	N=88 (%)	N=48 (%)	N=30 (%)	N=66 (%)
TT/C2+/AA	56 (63,64)	33 (68,75)	17 (56,67)	45 (68,18)
CT/C2+/AA	30 (34,09)	15 (31,25)	11 (36,67)	20 (30,30)
CC/C2+/AA	2 (2,27)	0 (0,00)	2 (6,66)	1 (1,52)
	N=245 (%)	N=139 (%)	N=79 (%)	N=182 (%)
TT/C2+/Bx	147 (60,00)	78 (56,12)	53 (67,09)	108 (59,34)
CT/C2+/Bx	81 (33,06)	50 (35,97)	22 (27,85)	67 (36,81)
CC/C2+/Bx	17 (6,94)	11 (7,91)	4 (5,06)	7 (3,85)
	N=49 (%)	N=29 (%)	N=14 (%)	N=44 (%)
TT/C1C1/AA	32 (65,31)	19 (65,52)	10 (71,43)	28 (63,64)
CT/C1C1/AA	16 (32,65)	9 (31,03)	4 (28,57)	16 (36,36)
CC/C1C1/AA	1 (2,04)	1 (3,45)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=59 (%)	N=29 (%)	N=22 (%)	N=52 (%)
TT/C1C2/AA	36 (61,02)	18 (62,07)	13 (59,09)	35 (67,31)
CT/C1C2/AA	21 (35,59)	11 (37,93)	7 (31,82)	16 (30,77)
CC/C1C2/AA	2 (3,39)	0 (0,00)	2 (9,09)	1 (1,92)
	N=29 (%)	N=19 (%)	N=8 (%)	N=14 (%)
TT/C2C2/AA	20 (68,97)	15 (78,95)	4 (50,00)	10 (71,43)
CT/C2C2/AA	9 (31,03)	4 (21,05)	4 (50,00)	4 (28,57)
CC/C2C2/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=113 (%)	N=67 (%)	N=38 (%)	N=91 (%)
TT/C1C1/Bx	71 (62,83)	**45 (67,16)[ac]**	23 (60,53)	45 (49,45)
CT/C1C1/Bx	38 (33,63)	**20 (29,85)[ad]**	13 (34,21)	43 (47,25)
CC/C1C1/Bx	4 (3,54)	2 (2,99)	2 (5,26)	3 (3,30)
	N=187 (%)	N=107 (%)	N=60 (%)	N=135 (%)
TT/C1C2/Bx	109 (58,29)	58 (54,21)	41 (68,33)	84 (62,22)
CT/C1C2/Bx	63 (33,69)	40 (37,38)	15 (25,00)	46 (34,07)
CC/C1C2/Bx	15 (8,02)	9 (8,41)	4 (6,67)	5 (3,71)
	N=58 (%)	N=32 (%)	N=19 (%)	N=47 (%)
TT/C2C2/Bx	38 (65,52)	20 (62,50)	12 (63,16)	24 (51,06)
CT/C2C2/Bx	18 (31,03)	10 (31,25)	7 (36,84)	21 (44,68)

ERAP/HLA-C/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CC/C2C2/Bx	2 (3,45)	2 (6,25)	0 (0,00)	2 (4,26)
ERAP2 rs2248374/HLA-C/KIR	N=107 (%)	N=57 (%)	N=36 (%)	N=95 (%)
AA/C1+/AA	32 (29,91)	18 (31,58)	10 (27,78)	28 (29,47)
AG/C1+/AA	49 (45,79)	25 (43,86)	20 (55,56)	47 (49,47)
GG/C1+/AA	26 (24,30)	14 (24,56)	6 (16,66)	20 (21,06)
	N=300 (%)	N=174 (%)	N=98 (%)	N=225 (%)
AA/C1+/Bx	82 (27,33)	43 (24,71)	34 (34,69)	63 (28,00)
AG/C1+/Bx	144 (48,00)	82 (47,13)	44 (44,90)	109 (48,44)
GG/C1+/Bx	74 (24,67)	49 (28,16)	20 (20,41)	53 (23,56)
	N=87 (%)	N=47 (%)	N=30 (%)	N=65 (%)
AA/C2+/AA	12 (13,79)	6 (12,77)	4 (13,33)	17 (26,15)
AG/C2+/AA	47 (54,02)	27 (57,45)	17 (56,67)	34 (52,31)
GG/C2+/AA	28 (32,19)	14 (29,78)	9 (30,00)	14 (21,54)
	N=245 (%)	N=139 (%)	N=79 (%)	N=181 (%)
AA/C2+/Bx	66 (26,94)	35 (25,18)	26 (32,91)	50 (27,62)
AG/C2+/Bx	119 (48,57)	67 (48,20)	35 (44,30)	84 (46,41)
GG/C2+/Bx	60 (24,49)	37 (26,62)	18 (22,79)	47 (25,97)
	N=49 (%)	N=29 (%)	N=14 (%)	N=44 (%)
AA/C1C1/AA	21 (42,86)	13 (44,83)	6 (42,86)	13 (29,55)
AG/C1C1/AA	17 (34,69)	9 (31,03)	6 (42,86)	19 (43,18)
GG/C1C1/AA	11 (22,45)	7 (24,14)	2 (14,28)	12 (27,27)
	N=58 (%)	N=28 (%)	N=22 (%)	N=51 (%)
AA/C1C2/AA	11 (18,97)	5 (17,86)	4 (18,18)	15 (29,41)
AG/C1C2/AA	32 (55,17)	16 (57,14)	14 (63,64)	28 (54,90)
GG/C1C2/AA	15 (25,86)	7 (25,00)	4 (18,18)	8 (15,69)
	N=29 (%)	N=19 (%)	N=8 (%)	N=14 (%)
AA/C2C2/AA	1 (3,45)	1 (5,26)	0 (0,00)	2 (14,28)
AG/C2C2/AA	15 (51,72)	11 (57,89)	3 (37,50)	6 (42,86)
GG/C2C2/AA	13 (44,83)	7 (36,85)	5 (62,50)	6 (42,86)
	N=113 (%)	N=67 (%)	N=38 (%)	N=91 (%)
AA/C1C1/Bx	27 (23,89)	13 (19,40)	12 (31,58)	25 (27,47)
AG/C1C1/Bx	54 (47,79)	31 (46,27)	18 (47,37)	44 (48,35)
GG/C1C1/Bx	32 (28,32)	23 (34,33)	8 (21,05)	22 (24,18)
	N=187 (%)	N=107 (%)	N=60 (%)	N=134 (%)
AA/C1C2/Bx	55 (29,41)	30 (28,04)	22 (36,67)	38 (28,36)
AG/C1C2/Bx	90 (48,13)	51 (47,66)	26 (43,33)	65 (48,51)
GG/C1C2/Bx	42 (22,46)	26 (24,30)	12 (20,00)	31 (23,13)
	N=58 (%)	N=32 (%)	N=19 (%)	N=47 (%)
AA/C2C2/Bx	11 (18,97)	5 (15,62)	4 (21,05)	12 (25,53)
AG/C2C2/Bx	29 (50,00)	16 (50,00)	9 (47,37)	19 (40,43)
GG/C2C2/Bx	18 (31,03)	11 (34,38)	6 (31,58)	16 (34,03)
ERAP1 rs6861666/HLA-C/KIR	N=107 (%)	N=57 (%)	N=36 (%)	N=95 (%)
AA/C1+/AA	91 (85,05)	48 (84,21)	31 (86,11)	83 (87,37)
AG/C1+/AA	15 (14,02)	8 (14,04)	5 (13,89)	12 (12,63)
GG/C1+/AA	1 (0,93)	1 (1,75)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=300 (%)	N=174 (%)	N=98 (%)	N=224 (%)

ERAP/HLA-C/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
AA/C1+/Bx	258 (86,00)	146 (83,91)	85 (86,73)	197 (87,95)
AG/C1+/Bx	42 (14,00)	28 (16,09)	13 (13,27)	27 (12,05)
GG/C1+/Bx	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=87 (%)	N=47 (%)	N=30 (%)	N=65 (%)
AA/C2+/AA	74 (85,06)	42 (89,36)	24 (80,00)	59 (90,77)
AG/C2+/AA	12 (13,79)	4 (8,51)	6 (20,00)	6 (9,23)
GG/C2+/AA	1 (1,15)	1 (2,13)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=245 (%)	N=139 (%)	N=79 (%)	N=179 (%)
AA/C2+/Bx	215 (87,76)	117 (84,17)	71 (89,87)	148 (82,68)
AG/C2+/Bx	29 (11,84)	22 (15,83)	7 (8,86)	30 (16,76)
GG/C2+/Bx	1 (0,40)	0 (0,00)	1 (1,27)	1 (0,56)
	N=49 (%)	N=29 (%)	N=14 (%)	N=44 (%)
AA/C1C1/AA	40 (81,63)	23 (79,31)	12 (85,71)	37 (84,09)
AG/C1C1/AA	9 (18,37)	6 (20,69)	2 (14,29)	7 (15,91)
GG/C1C1/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=58 (%)	N=28 (%)	N=22 (%)	N=51 (%)
AA/C1C2/AA	51 (87,93)	25 (89,29)	19 (86,36)	46 (90,20)
AG/C1C2/AA	6 (10,34)	2 (7,14)	3 (13,64)	5 (9,80)
GG/C1C2/AA	1 (1,73)	1 (3,57)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=29 (%)	N=19 (%)	N=8 (%)	N=14 (%)
AA/C2C2/AA	23 (79,31)	17 (89,47)	5 (62,50)	13 (92,86)
AG/C2C2/AA	6 (20,69)	2 (10,53)	3 (37,50)	1 (7,14)
GG/C2C2/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=113 (%)	N=67 (%)	N=38 (%)	N=91 (%)
AA/C1C1/Bx	94 (83,19)	56 (83,58)	31 (81,58)	81 (89,01)
AG/C1C1/Bx	19 (16,81)	11 (16,42)	7 (18,42)	10 (10,99)
GG/C1C1/Bx	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=187 (%)	N=107 (%)	N=60 (%)	N=133 (%)
AA/C1C2/Bx	164 (87,70)	90 (84,11)	54 (90,00)	116 (87,22)
AG/C1C2/Bx	23 (12,30)	17 (15,89)	6 (10,00)	17 (12,78)
GG/C1C2/Bx	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=58 (%)	N=32 (%)	N=19 (%)	N=46 (%)
AA/C2C2/Bx	**51 (87,93)[ae]**	27 (84,38)	17 (89,48)	32 (69,57)
AG/C2C2/Bx	**6 (10,34)[af]**	5 (15,62)	**1 (5,26)[ag]**	13 (28,26)
GG/C2C2/Bx	1 (1,73)	0 (0,00)	1 (5,26)	1 (2,17)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla kombinacji genotypów ERAP z HLA-C C1+ lub C2+ oraz AA lub Bx; x9 dla kombinacji genotypów ERAP, HLA-C z KIR AA lub Bx); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice. Wartości w nawiasach oznaczają procent liczebności.

RIV *vs.* kontrola płodna: [a]$p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=3,585, 95% CI (1,05-14,25); [b]$p/p_{corr.}$=0,037/ns, OR=0,349, 95% CI (0,12-0,99); [c]$p/p_{corr.}$=0,037/ns, OR=0,502, 95% CI (0,25-0,99); [d]$p/p_{corr.}$=0,014/ns, OR=2,288, 95% CI (1,13-4,68); [f]$p/p_{corr.}$=0,035/ns, OR=0,429, 95% CI (0,18-0,98); [g]$p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=2,260, 95% CI (0,99-5,28); [j]$p/p_{corr.}$=0,004/0,036, OR=0,084, 95% CI (0,01-0,55); [m]$p/p_{corr.}$=0,001/0,008, OR=25,017, 95% CI (2,69-1275,24); [n]$p/p_{corr.}$=0,038/ns, OR=0,358, 95% CI (0,13-0,98); [s]$p/p_{corr.}$=0,031/ns, OR=1,670, 95% CI (1,04-2,69); [u]$p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=0,592, 95% CI (0,36-0,96); [x]$p/p_{corr.}$=0,039/ns, OR=2,766, 95% CI (0,98-8,31);

[z]$p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=3,664, 95% CI (1,23-12,08); [ab]$p/p_{corr.}$=0,031/ns, OR=0,316, 95% CI (0,09-0,98); [ac]$p/p_{corr.}$=0,034/ns, OR=2,081, 95% CI (1,04-4,26); [ad]$p/p_{corr.}$=0,033/ns, OR=0,477, 95% CI (0,23-0,97);

Wszystkie kobiety IVF *vs.* kontrola płodna: [e]$p/p_{corr.}$=0,049/ns, OR=0,502, 95% CI (0,24-1,01); [i]$p/p_{corr.}$=0,003/0,025, OR=0,093, 95% CI (0,01-0,54); [l]$p/p_{corr.}$=0,002/0,020, OR=17,289, 95% CI (2,08-823,60); [o]$p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=0,312, 95% CI (0,08-0,98); [p]$p/p_{corr.}$=0,051/ns, OR=1,924, 95% CI (0,96-3,88); [q]$p/p_{corr.}$=0,005/0,031, OR=0,084, 95% CI (0,00-0,66); [y]$p/p_{corr.}$=0,009/ns, OR=0,000, 95% CI (0,00-0,71); [ae]$p/p_{corr.}$=0,027/ns, OR=3,151, 95% CI (1,05-10,29); [af]$p/p_{corr.}$=0,023/ns, OR=0,296, 95% CI (0,08-0,94);

RIV *vs.* SIVF: [h]$p/p_{corr.}$=0,050/ns, OR=Inf,, 95% CI (0,84–Inf); [t]$p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=2,096, 95% CI (1,15-3,83); [v]$p/p_{corr.}$=0,048/ns, OR=0,379, 95% CI (0,13-1,09); [aa]$p/p_{corr.}$=0,034/ns, OR=3,850, 95% CI (0,99-16,26);

SIVF *vs.* kontrola płodna: [k]$p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=0,114, 95% CI (0,01-1,10); [r]$p/p_{corr.}$=0,054/ns, OR=0,00, 95% CI (0,00-1,23); [w]$p/p_{corr.}$=0,050/ns, OR=2,505, 95% CI (0,94-6,71); [ag]$p/p_{corr.}$=0,050/ns, OR=0,144, 95% CI (0,00-1,11)

Tabela 6S. Częstość genotypów *ERAP1* rs26653 w kombinacjach z *KIR* u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kontrolnych kobiet płodnych.

ERAP1 rs26653/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=138 (%)	N=77 (%)	N=44 (%)	N=109 (%)
GG/AA	71 (51,45)	37 (48,05)	23 (52,27)	65 (59,63)
CG/AA	56 (40,58)	35 (45,45)	16 (36,36)	39 (35,78)
CC/AA	11 (7,97)	5 (6,50)	5 (11,37)	5 (4,59)
	N=358 (%)	N=206 (%)	N=117 (%)	N=273 (%)
GG/Bx	199 (55,59)	112 (54,37)	66 (56,41)	148 (54,21)
CG/Bx	145 (40,50)	85 (41,26)	50 (42,74)	111 (40,66)
CC/Bx	14 (3,91)	9 (4,37)	1 (0,85)[a]	14 (5,13)
	N=197 (%)	N=112 (%)	N=61 (%)	N=171 (%)
GG/cenAA	103 (52,28)	55 (49,11)	32 (52,46)	100 (58,48)
CG/cenAA	78 (39,59)	48 (42,86)	24 (39,34)	65 (38,01)
CC/cenAA	16 (8,13)	9 (8,03)	5 (8,20)	6 (3,51)
	N=244 (%)	N=141 (%)	N=82 (%)	N=165 (%)
GG/cenAB	129 (52,87)	72 (51,06)	45 (54,88)	90 (54,55)
CG/cenAB	106 (43,44)	64 (45,39)	36 (43,90)	65 (39,39)
CC/cenAB	9 (3,69)	5 (3,55)	1 (1,22)	10 (6,06)
	N=55 (%)	N=30 (%)	N=18 (%)	N=46 (%)
GG/cenBB	38 (69,09)	22 (73,33)	12 (66,67)	23 (50,00)
CG/cenBB	17 (30,91)	8 (26,67)	6 (33,33)	20 (43,48)
CC/cenBB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (6,52)
	N=286 (%)	N=164 (%)	N=90 (%)	N=203 (%)
GG/telAA	156 (54,55)	88 (53,66)	47 (52,22)	116 (57,14)
CG/telAA	114 (39,86)	68 (41,46)	38 (42,22)	75 (36,95)
CC/telAA	16 (5,59)	8 (4,88)	5 (5,56)	12 (5,91)
	N=177 (%)	N=103 (%)	N=58 (%)	N=156 (%)
GG/telAB	98 (55,37)	58 (56,31)	31 (53,45)	86 (55,13)
CG/telAB	72 (40,68)	40 (38,83)	26 (44,83)	64 (41,03)
CC/telAB	7 (3,95)	5 (4,86)	1 (1,72)	6 (3,84)
	N=33 (%)	N=16 (%)	N=13 (%)	N=23 (%)
GG/telBB	16 (48,48)	3 (18,75)[b]	11 (84,62)[c]	11 (47,83)
CG/telBB	15 (45,45)	12 (75,00)[d]	2 (15,38)	11 (47,83)

ERAP1 rs26653/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CC/telBB	2 (6,07)	1 (6,25)	0 (0,00)	1 (4,34)
	N=137 (%)	N=77 (%)	N=43 (%)	N=109 (%)
GG/cenAA/telAA	70 (51,09)	37 (48,05)	22 (51,16)	65 (59,63)
CG/cenAA/telAA	56 (40,88)	35 (45,45)	16 (37,21)	39 (35,78)
CC/cenAA/telAA	11 (8,03)	5 (6,50)	5 (11,63)	5 (4,59)
	N=55 (%)	N=33 (%)	N=15 (%)	N=58 (%)
GG/cenAA/telAB	30 (54,55)	18 (54,55)	7 (46,67)	35 (60,34)
CG/cenAA/telAB	21 (38,18)	12 (36,36)	8 (53,33)	22 (37,93)
CC/cenAA/telAB	4 (7,27)	3 (9,09)	0 (0,00)	1 (1,73)
	N=5 (%)	N=2 (%)	N=3 (%)	N=4 (%)
GG/cenAA/telBB	3 (60,00)	0 (0,00)	**3 (100,00)[e]**	0 (0,00)
CG/cenAA/telBB	**1 (20,00)[f]**	1 (50,00)	**0 (0,00)[g]**	4 (100,00)
CC/cenAA/telBB	1 (20,00)	1 (50,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=125 (%)	N=72 (%)	N=42 (%)	N=78 (%)
GG/cenAB/telAA	67 (53,60)	39 (54,17)	21 (50,00)	42 (53,85)
CG/cenAB/telAA	53 (42,40)	30 (41,67)	21 (50,00)	30 (38,46)
CC/cenAB/telAA	5 (4,00)	3 (4,16)	0 (0,00)	6 (7,69)
	N=102 (%)	N=60 (%)	N=36 (%)	N=76 (%)
GG/cenAB/telAB	55 (53,92)	31 (51,67)	21 (58,33)	42 (55,26)
CG/cenAB/telAB	44 (43,14)	27 (45,00)	14 (38,89)	31 (40,79)
CC/cenAB/telAB	3 (2,94)	2 (3,33)	1 (2,78)	3 (3,95)
	N=17 (%)	N=9 (%)	N=4 (%)	N=11 (%)
GG/cenAB/telBB	7 (41,18)	2 (22,22)	3 (75,00)	6 (54,55)
CG/cenAB/telBB	9 (52,94)	7 (77,78)	1 (25,00)	4 (36,36)
CC/cenAB/telBB	1 (5,88)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (9,09)
	N=24 (%)	N=15 (%)	N=5 (%)	N=16 (%)
GG/cenBB/telAA	19 (79,17)	12 (80,00)	4 (80,00)	9 (56,25)
CG/cenBB/telAA	5 (20,83)	3 (20,00)	1 (20,00)	6 (37,50)
CC/cenBB/telAA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (6,25)
	N=20 (%)	N=10 (%)	N=7 (%)	N=22 (%)
GG/cenBB/telAB	13 (65,00)	**9 (90,00)[h]**	3 (42,86)	9 (40,91)
CG/cenBB/telAB	7 (35,00)	**1 (10,00)[i]**	4 (57,14)	11 (50,00)
CC/cenBB/telAB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (9,09)
	N=11 (%)	N=5 (%)	N=6 (%)	N=8 (%)
GG/cenBB/telBB	6 (54,55)	1 (20,00)	5 (83,33)	5 (62,50)
CG/cenBB/telBB	5 (45,45)	4 (80,00)	1 (16,67)	3 (37,50)
CC/cenBB/telBB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla kombinacji AA/Bx; x9 dla kombinacji z centromerycznym lub telomerycznym KIR; x27 dla kombinacji z centromerycznym i telomerycznym KIR); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice. Wartości w nawiasach oznaczają procent liczebności.

SIVF *vs.* kontrola płodna: [a]$p/p_{corr.}$=0,046/ns, OR=0,160, 95% CI (0,00-1,08); [c]$p/p_{corr.}$=0,039/ns, OR=5,712, 95% CI (0,93-64,52); [e]$p/p_{corr.}$=0,029/ns, OR=Inf,, 95% CI (0,93-Inf,); [g]$p/p_{corr.}$=0,029/ns, OR=0,000, 95% CI (0,00-1,08);

RIF *vs.* SIFV: [b]$p/p_{corr.}$=0,001/0,006, OR=0,049, 95% CI (0,00-0,38); [d]$p/p_{corr.}$=0,003/0,023, OR=14,540, 95% CI (2,00-191,36);
Wszystkie kobiety IVF *vs.* kontrola płodna: [f]$p/p_{corr.}$=0,048/ns, OR=0,000, 95% CI (0,00-1,28);

RIF *vs.* kontrola płodna: [h]$p/p_{corr.}$=0,019/ns, OR=12,030, 95% CI (1,28-610,25); [i]$p/p_{corr.}$=0,050/ns, OR=0,118, 95% CI (0,00-1,11)

Tabela 7S. Częstość genotypów *ERAP1 rs*26618 w kombinacjach z *KIR* u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kontrolnych kobiet płodnych.

ERAP1 rs26618/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=138 (%)	N=77 (%)	N=44 (%)	N=110 (%)
TT/AA	79 (57,25)	44 (57,14)	26 (59,09)	51 (46,36)
CT/AA	53 (38,41)	28 (36,36)	17 (38,64)	44 (40,00)
CC/AA	**6 (4,34)[a]**	5 (6,50)	**1 (2,27)[b]**	15 (13,64)
	N=358 (%)	N=206 (%)	N=117 (%)	N=275 (%)
TT/Bx	189 (52,79)	119 (57,77)	55 (47,01)	139 (50,55)
CT/Bx	135 (37,71)	71 (34,47)	48 (41,03)	118 (42,91)
CC/Bx	34 (9,50)	16 (7,76)	14 (11,96)	18 (6,54)
	N=197 (%)	N=112 (%)	N=61 (%)	N=173 (%)
TT/cenAA	**114 (57,87)[c]**	**68 (60,71)[d]**	34 (55,74)	80 (46,24)
CT/cenAA	72 (36,55)	37 (33,04)	24 (39,34)	76 (43,93)
CC/cenAA	11 (5,58)	7 (6,25)	3 (4,92)	17 (9,83)
	N=244 (%)	N=141 (%)	N=82 (%)	N=166 (%)
TT/cenAB	137 (56,15)	**88 (62,41)[e,f]**	40 (48,78)	84 (50,60)
CT/cenAB	83 (34,02)	**42 (29,79)[g]**	32 (39,02)	69 (41,57)
CC/cenAB	24 (9,83)	11 (7,80)	10 (12,20)	13 (7,83)
	N=55 (%)	N=30 (%)	N=18 (%)	N=46 (%)
TT/cenBB	**17 (30,91)[h]**	**7 (23,33)[i]**	7 (38,89)	26 (56,52)
CT/cenBB	**33 (60,00)[j]**	**20 (66,67)[k]**	9 (50,00)	17 (36,96)
CC/cenBB	5 (9,09)	3 (10,00)	2 (11,11)	3 (6,52)
	N=286 (%)	N=164 (%)	N=90 (%)	N=205 (%)
TT/telAA	150 (52,45)	88 (53,66)	48 (53,33)	93 (45,37)
CT/telAA	115 (40,21)	64 (39,02)	34 (37,78)	89 (43,41)
CC/telAA	21 (7,33)	12 (7,32)	8 (8,89)	23 (11,22)
	N=177 (%)	N=103 (%)	N=58 (%)	N=156 (%)
TT/telAB	102 (57,63)	64 (62,14)	29 (50,00)	81 (51,92)
CT/telAB	58 (32,77)	**30 (29,13)[l]**	23 (39,66)	66 (42,31)
CC/telAB	17 (9,60)	9 (8,73)	6 (10,34)	9 (5,77)
	N=33 (%)	N=16 (%)	N=13 (%)	N=23 (%)
TT/telBB	16 (48,48)	11 (68,75)	**4 (30,77)[m]**	16 (69,57)
CT/telBB	15 (45,45)	5 (31,25)	8 (61,54)	6 (26,09)
CC/telBB	2 (6,06)	0 (0,00)	1 (7,69)	1 (4,34)
	N=137 (%)	N=77 (%)	N=43 (%)	N=110 (%)
TT/cenAA/telAA	78 (56,93)	44 (57,14)	25 (58,14)	51 (46,36)
CT/cenAA/telAA	53 (38,69)	28 (36,36)	17 (39,53)	44 (40,00)
CC/cenAA/telAA	**6 (4,38)[n]**	5 (6,50)	**1 (2,33)[o]**	15 (13,64)
	N=55 (%)	N=33 (%)	N=15 (%)	N=58 (%)
TT/cenAA/telAB	34 (61,82)	**23 (69,70)[p]**	8 (53,33)	25 (43,10)

ERAP1 rs26618/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CT/cenAA/telAB	**17 (30,91)[q]**	**8 (24,24)[r]**	6 (40,00)	31 (53,45)
CC/cenAA/telAB	4 (7,27)	2 (6,06)	1 (6,67)	2 (3,45)
	N=5 (%)	N=2 (%)	N=3 (%)	N=4 (%)
TT/cenAA/telBB	2 (40,00)	1 (50,00)	1 (33,33)	4 (100,00)
CT/cenAA/telBB	2 (40,00)	1 (50,00)	1 (33,33)	0 (0,00)
CC/cenAA/telBB	1 (20,00)	0 (0,00)	1 (33,33)	0 (0,00)
	N=125 (%)	N=72 (%)	N=42 (%)	N=79 (%)
TT/cenAB/telAA	65 (52,00)	40 (55,56)	21 (50,00)	33 (41,77)
CT/cenAB/telAA	48 (38,40)	26 (36,11)	16 (38,10)	38 (48,10)
CC/cenAB/telAA	12 (9,60)	6 (8,33)	5 (11,90)	8 (10,13)
	N=102 (%)	N=60 (%)	N=36 (%)	N=76 (%)
TT/cenAB/telAB	63 (61,76)	41 (68,33)	18 (50,00)	45 (59,21)
CT/cenAB/telAB	28 (27,45)	14 (23,33)	13 (36,11)	26 (34,21)
CC/cenAB/telAB	11 (10,79)	5 (8,34)	5 (13,89)	5 (6,58)
	N=17 (%)	N=9 (%)	N=4 (%)	N=11 (%)
TT/cenAB/telBB	9 (52,94)	7 (77,78)	1 (25,00)	6 (54,55)
CT/cenAB/telBB	7 (41,18)	2 (22,22)	3 (75,00)	5 (45,45)
CC/cenAB/telBB	1 (5,88)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=24 (%)	N=15 (%)	N=5 (%)	N=16 (%)
TT/cenBB/telAA	7 (29,17)	4 (26,67)	2 (40,00)	9 (56,25)
CT/cenBB/telAA	14 (58,33)	10 (66,67)	1 (20,00)	7 (43,75)
CC/cenBB/telAA	3 (12,50)	1 (6,66)	**2 (40,00)[s]**	0 (0,00)
	N=20 (%)	N=10 (%)	N=7 (%)	N=22 (%)
TT/cenBB/telAB	5 (25,00)	**0 (0,00)[t,u]**	3 (42,86)	11 (50,00)
CT/cenBB/telAB	13 (65,00)	8 (80,00)	4 (57,14)	9 (40,91)
CC/cenBB/telAB	2 (10,00)	2 (20,00)	0 (0,00)	2 (9,09)
	N=11 (%)	N=5 (%)	N=6 (%)	N=8 (%)
TT/cenBB/telBB	5 (45,45)	3 (60,00)	2 (33,33)	6 (75,00)
CT/cenBB/telBB	6 (54,55)	2 (40,00)	4 (66,67)	1 (12,50)
CC/cenBB/telBB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (12,50)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla kombinacji AA/Bx; x9 dla kombinacji z centromerycznym lub telomerycznym KIR; x27 dla kombinacji z centromerycznym i telomerycznym KIR); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice. Wartości w nawiasach oznaczają procent liczebności.

Wszystkie kobiety IVF *vs. k*ontrola płodna: [a]$p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=0,289, 95% CI (0,09-0,82); [c]$p/p_{corr.}$=0,029/ns, OR=1,595, 95% CI (1,04-2,46); [h]$p/p_{corr.}$=0,015/ns, OR=0,348, 95% CI (0,14-0,84); [j]$p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=2,534, 95% CI (1,06-6,21); [n]$p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=0,292, 95% CI (0,09-0,83); [q]$p/p_{corr.}$=0,022/ns, OR=0,393, 95% CI (0,17-0,90);

SIVF *vs. k*ontrola płodna: [b]$p/p_{corr.}$=0,041/ns, OR=0,148, 95% CI (0,00-1,03); [m]$p/p_{corr.}$=0,038/ns, OR=0,205, 95% CI (0,03-1,04); [o]$p/p_{corr.}$=0,042/ns, OR=0,152, 95% CI (0,00-1,05); [s]$p/p_{corr.}$=0,048/ns, OR=Inf,, 95% CI (0,67-Inf,);

RIF *vs. k*ontrola płodna: [d]$p/p_{corr.}$=0,021/ns, OR=1,793, 95% CI (1,08-3,00); [e]$p/p_{corr.}$=0,039/ns, OR=1,618, 95% CI (1,00-2,63); [g]$p/p_{corr.}$=0,043/ns, OR=0,597, 95% CI (0,36-0,98); [i]$p/p_{corr.}$=0,005/0,045, OR=0,239, 95% CI (0,07-0,72); [k]$p/p_{corr.}$=0,018/ns, OR=3,354, 95% CI (1,18-10,12); [l]$p/p_{corr.}$=0,036/ns, OR=0,562, 95% CI (0,32-0,98); [p]$p/p_{corr.}$=0,017/ns, OR=2,998, 95% CI (1,13-8,43); [r]$p/p_{corr.}$=0,008/ns, OR=0,283, 95% CI (0,09-0,78); [t]$p/p_{corr.}$=0,006/ns, OR=0,000, 95% CI (0,00-0,61);

RIF *vs.* SIVF: [f]$p/p_{corr.}$=0,051/ns, OR=1,739, 95% CI (0,97-3,14); [u]$p/p_{corr.}$=0,051, OR=0,000, 95% CI (0,00-1,47)

Tabela 8S. Częstość genotypów *ERAP1 rs*2287987 w kombinacjach z *KIR* u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kontrolnych kobiet płodnych.

ERAP1 rs2287987/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=138 (%)	N=77 (%)	N=44 (%)	N=110 (%)
TT/AA	89 (64,49)	52 (67,53)	27 (61,36)	73 (66,36)
CT/AA	46 (33,33)	24 (31,17)	15 (34,09)	36 (32,73)
CC/AA	3 (2,18)	1 (1,30)	2 (4,55)	1 (0,91)
	N=358 (%)	N=206 (%)	N=117 (%)	N=275 (%)
TT/Bx	218 (60,89)	123 (59,71)	76 (64,96)	155 (56,36)
CT/Bx	119 (33,24)	70 (33,98)	35 (29,91)	110 (40,00)
CC/Bx	21 (5,87)	13 (6,31)	6 (5,13)	10 (3,64)
	N=197 (%)	N=112 (%)	N=61 (%)	N=173 (%)
TT/cenAA	128 (64,97)	74 (66,07)	40 (65,57)	111 (64,16)
CT/cenAA	64 (32,49)	35 (31,25)	19 (31,15)	59 (34,10)
CC/cenAA	5 (2,54)	3 (2,68)	2 (3,28)	3 (1,74)
	N=244 (%)	N=141 (%)	N=82 (%)	N=166 (%)
TT/cenAB	146 (59,84)	84 (59,57)	51 (62,20)	91 (54,82)
CT/cenAB	83 (34,02)	48 (34,04)	27 (32,93)	68 (40,96)
CC/cenAB	15 (6,14)	9 (6,39)	4 (4,87)	7 (4,22)
	N=55 (%)	N=30 (%)	N=18 (%)	N=46 (%)
TT/cenBB	33 (60,00)	17 (56,67)	12 (66,67)	26 (56,52)
CT/cenBB	18 (32,73)	11 (36,67)	4 (22,22)	19 (41,30)
CC/cenBB	4 (7,27)	2 (6,66)	2 (11,11)	1 (2,18)
	N=286 (%)	N=164 (%)	N=90 (%)	N=205 (%)
TT/telAA	172 (60,14)	102 (62,20)	54 (60,00)	127 (61,95)
CT/telAA	104 (36,36)	56 (34,15)	33 (36,67)	72 (35,12)
CC/telAA	10 (3,50)	6 (3,65)	3 (3,33)	6 (2,93)
	N=177 (%)	N=103 (%)	N=58 (%)	N=156 (%)
TT/telAB	110 (62,15)	60 (58,25)	40 (68,97)	90 (57,69)
CT/telAB	57 (32,20)	37 (35,92)	15 (25,86)	61 (39,10)
CC/telAB	10 (5,65)	6 (5,83)	3 (5,17)	5 (3,21)
	N=33 (%)	N=16 (%)	N=13 (%)	N=23 (%)
TT/telBB	**25 (75,76)[a]**	**13 (81,25)[b]**	9 (69,23)	10 (43,48)
CT/telBB	**4 (12,12)[c]**	**1 (6,25)[d]**	**2 (15,38)[e]**	13 (56,52)
CC/telBB	4 (12,12)	2 (12,50)	2 (15,39)	0 (0,00)
	N=137 (%)	N=77 (%)	N=43 (%)	N=110 (%)
TT/cenAA/telAA	88 (64,23)	52 (67,53)	26 (60,47)	73 (66,36)
CT/cenAA/telAA	46 (33,58)	24 (31,17)	15 (34,88)	36 (32,73)
CC/cenAA/telAA	3 (2,19)	1 (1,30)	2 (4,65)	1 (0,91)
	N=55 (%)	N=33 (%)	N=15 (%)	N=58 (%)
TT/cenAA/telAB	35 (63,64)	20 (60,61)	11 (73,33)	34 (58,62)
CT/cenAA/telAB	18 (32,73)	11 (33,33)	4 (26,67)	22 (37,93)
CC/cenAA/telAB	2 (3,63)	2 (6,06)	0 (0,00)	2 (3,45)
	N=5 (%)	N=2 (%)	N=3 (%)	N=4 (%)
TT/cenAA/telBB	5 (100,00)	2 (100,00)	3 (100,00)	3 (75,00)

ERAP1 rs2287987/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CT/cenAA/telBB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (25,00)
CC/cenAA/telBB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=125 (%)	N=72 (%)	N=42 (%)	N=79 (%)
TT/cenAB/telAA	71 (56,80)	43 (59,72)	24 (57,14)	49 (62,03)
CT/cenAB/telAA	48 (38,40)	25 (34,72)	17 (40,48)	26 (32,91)
CC/cenAB/telAA	6 (4,80)	4 (5,56)	1 (2,38)	4 (5,06)
	N=102 (%)	N=60 (%)	N=36 (%)	N=76 (%)
TT/cenAB/telAB	63 (61,76)	34 (56,67)	25 (69,44)	38 (50,00)
CT/cenAB/telAB	32 (31,37)	22 (36,67)	**9 (25,00)[f]**	35 (46,05)
CC/cenAB/telAB	7 (6,87)	4 (6,66)	2 (5,56)	3 (3,95)
	N=17 (%)	N=9 (%)	N=4 (%)	N=11 (%)
TT/cenAB/telBB	12 (70,59)	7 (77,78)	2 (50,00)	4 (36,36)
CT/cenAB/telBB	**3 (17,65)[g]**	**1 (11,11)[h]**	1 (25,00)	7 (63,64)
CC/cenAB/telBB	2 (11,76)	1 (11,11)	1 (25,00)	0 (0,00)
	N=24 (%)	N=15 (%)	N=5 (%)	N=16 (%)
TT/cenBB/telAA	13 (54,17)	7 (46,67)	4 (80,00)	5 (31,25)
CT/cenBB/telAA	10 (41,67)	7 (46,67)	1 (20,00)	10 (62,50)
CC/cenBB/telAA	1 (4,16)	1 (6,66)	0 (0,00)	1 (6,25)
	N=20 (%)	N=10 (%)	N=7 (%)	N=22 (%)
TT/cenBB/telAB	12 (60,00)	6 (60,00)	4 (57,14)	18 (81,82)
CT/cenBB/telAB	7 (35,00)	4 (40,00)	2 (28,57)	4 (18,18)
CC/cenBB/telAB	1 (5,00)	0 (0,00)	1 (14,29)	0 (0,00)
	N=11 (%)	N=5 (%)	N=6 (%)	N=8 (%)
TT/cenBB/telBB	8 (72,73)	4 (80,00)	4 (66,66)	3 (37,50)
CT/cenBB/telBB	**1 (9,09)[i]**	0 (0,00)	1 (16,67)	5 (62,50)
CC/cenBB/telBB	2 (18,18)	1 (20,00)	1 (16,67)	0 (0,00)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym in vitro; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu in vitro; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla kombinacji AA/Bx; x9 dla kombinacji z centromerycznym lub telomerycznym KIR; x27 dla kombinacji z centromerycznym i telomerycznym KIR); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice. Wartości w nawiasach oznaczają procent liczebności.

Wszystkie kobiety IVF *vs.* kontrola płodna: [a]$p/p_{corr.}$=0,024/ns, OR=3,952, 95% CI (1,12-14,98); [c]$p/p_{corr.}$=0,001/0,007, OR=0,111, 95% CI (0,02-0,46); [g]$p/p_{corr.}$=0,020/ns, OR=0,134, 95% CI (0,01-0,91); [i]$p/p_{corr.}$=0,041/ns, OR=0,072, 95% CI (0,00-0,98);

RIF *vs.* kontrola płodna: [b]$p/p_{corr.}$=0,024/ns, OR=5,377, 95% CI (1,07-37,54); [d]$p/p_{corr.}$=0,002/0,016, OR=0,055, 95% CI (0,00-0,47); [h]$p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=0,083, 95% CI (0,00-1,00);

SIVF *vs.* kontrola płodna: [e]$p/p_{corr.}$=0,033/ns, OR=0,148, 95% CI (0,01-0,91); [f]$p/p_{corr.}$=0,039/ns, OR=0,394, 95% CI (0,14-1,01)

Tabela 9S. Częstość genotypów *ERAP1* rs6861666 w kombinacjach z *KIR* u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kontrolnych kobiet płodnych.

ERAP1 rs6861666/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=137 (%)	N=76 (%)	N=44 (%)	N=109 (%)
AA/AA	115 (83,94)	65 (85,53)	36 (81,82)	96 (88,07)
AG/AA	21 (15,33)	10 (13,16)	8 (18,18)	13 (11,93)
GG/AA	1 (0,73)	1 (1,31)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=358 (%)	N=206 (%)	N=117 (%)	N=271 (%)
AA/Bx	309 (86,31)	173 (83,98)	102 (87,18)	230 (84,87)
AG/Bx	48 (13,41)	33 (16,02)	14 (11,97)	40 (14,76)
GG/Bx	1 (0,28)	0 (0,00)	1 (0,85)	1 (0,37)
	N=196 (%)	N=111 (%)	N=61 (%)	N=170 (%)
AA/cenAA	167 (85,20)	95 (85,59)	51 (83,61)	155 (91,18)
AG/cenAA	28 (14,29)	15 (13,51)	10 (16,39)	15 (8,82)
GG/cenAA	1 (0,51)	1 (0,90)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=244 (%)	N=141 (%)	N=82 (%)	N=164 (%)
AA/cenAB	205 (84,02)	114 (80,85)	71 (86,59)	139 (84,76)
AG/cenAB	38 (15,57)	27 (19,15)	10 (12,20)	25 (15,24)
GG/cenAB	1 (0,41)	0 (0,00)	1 (1,21)	0 (0,00)
	N=55 (%)	N=30 (%)	N=18 (%)	N=46 (%)
AA/cenBB	**52 (94,55)[a]**	**29 (96,67)[b]**	16 (88,89)	32 (69,57)
AG/cenBB	**3 (5,45)[c]**	**1 (3,33)[d]**	2 (11,11)	13 (28,26)
GG/cenBB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,17)
	N=285 (%)	N=163 (%)	N=90 (%)	N=203 (%)
AA/telAA	243 (85,26)	139 (85,28)	76 (84,44)	177 (87,19)
AG/telAA	41 (14,39)	23 (14,11)	14 (15,56)	26 (12,81)
GG/telAA	1 (0,35)	1 (0,61)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=177 (%)	N=103 (%)	N=58 (%)	N=155 (%)
AA/telAB	152 (85,88)	85 (82,52)	51 (87,93)	131 (84,52)
AG/telAB	24 (13,56)	18 (17,48)	6 (10,34)	23 (14,84)
GG/telAB	1 (0,56)	0 (0,00)	1 (1,73)	1 (0,64)
	N=33 (%)	N=16 (%)	N=13 (%)	N=22 (%)
AA/telBB	29 (87,88)	14 (87,50)	11 (84,62)	18 (81,82)
AG/telBB	4 (12,12)	2 (12,50)	2 (15,38)	4 (18,18)
GG/telBB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=136 (%)	N=76 (%)	N=43 (%)	N=109 (%)
AA/cenAA/telAA	114 (83,82)	65 (85,53)	35 (81,40)	96 (88,07)
AG/cenAA/telAA	21 (15,44)	10 (13,16)	8 (18,60)	13 (11,93)
GG/cenAA/telAA	1 (0,74)	1 (1,31)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=55 (%)	N=33 (%)	N=15 (%)	N=58 (%)
AA/cenAA/telAB	48 (87,27)	28 (84,85)	13 (86,67)	56 (96,55)
AG/cenAA/telAB	7 (12,73)	5 (15,15)	2 (13,33)	2 (3,45)
GG/cenAA/telAB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=5 (%)	N=2 (%)	N=3 (%)	N=3 (%)
AA/cenAA/telBB	5 (100,00)	2 (100,00)	3 (100,00)	3 (100,00)
AG/cenAA/telBB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
GG/cenAA/telBB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)

ERAP1 rs6861666/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=125 (%)	N=72 (%)	N=42 (%)	N=78 (%)
AA/cenAB/telAA	107 (85,60)	60 (83,33)	37 (88,10)	70 (89,74)
AG/cenAB/telAA	18 (14,40)	12 (16,67)	5 (11,90)	8 (10,26)
GG/cenAB/telAA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=102 (%)	N=60 (%)	N=36 (%)	N=75 (%)
AA/cenAB/telAB	84 (82,35)	47 (78,33)	31 (86,11)	60 (80,00)
AG/cenAB/telAB	17 (16,67)	13 (21,67)	4 (11,11)	15 (20,00)
GG/cenAB/telAB	1 (0,98)	0 (0,00)	1 (2,78)	0 (0,00)
	N=17 (%)	N=9 (%)	N=4 (%)	N=11 (%)
AA/cenAB/telBB	14 (82,35)	7 (77,78)	3 (75,00)	9 (81,82)
AG/cenAB/telBB	3 (17,65)	2 (22,22)	1 (25,00)	2 (18,18)
GG/cenAB/telBB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=24 (%)	N=15 (%)	N=5 (%)	N=16 (%)
AA/cenBB/telAA	22 (91,67)	14 (93,33)	4 (80,00)	11 (68,75)
AG/cenBB/telAA	2 (8,33)	1 (6,67)	1 (20,00)	5 (31,25)
GG/cenBB/telAA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=20 (%)	N=10 (%)	N=7 (%)	N=22 (%)
AA/cenBB/telAB	**20 (100,00)[e]**	10 (100,00)	7 (100,00)	15 (68,18)
AG/cenBB/telAB	**0 (0,00)[f]**	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (27,27)
GG/cenBB/telAB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (4,55)
	N=11 (%)	N=5 (%)	N=6 (%)	N=8 (%)
AA/cenBB/telBB	10 (90,91)	5 (100,00)	5 (83,33)	6 (75,00)
AG/cenBB/telBB	1 (9,09)	0 (0,00)	1 (16,67)	2 (25,00)
GG/cenBB/telBB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym in vitro; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu in vitro; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla kombinacji AA/Bx; x9 dla kombinacji z centromerycznym lub telomerycznym KIR; x27 dla kombinacji z centromerycznym i telomerycznym KIR); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* –brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice. Wartości w nawiasach oznaczają procent liczebności.

Wszystkie kobiety IVF *vs.* kontrola płodna: [a]$p/p_{corr.}$=0,001/0,010, OR=7,435, 95% CI (1,87-43,47); [c]$p/p_{corr.}$=0,002/0,020, OR=0,149, 95% CI (0,03-0,60); [e]$p/p_{corr.}$=0,009/ns, OR=Inf,, 95% CI (1,58-Inf,); [f]$p/p_{corr.}$=0,022/ns, OR=0,000, 95% CI (0,00-0,81);

RIF *vs.* kontrola płodna [b]$p/p_{corr.}$=0,003/0,029, OR=12,373, 95% CI (1,68-553,07); [d]$p/p_{corr.}$=0,006/ns, OR=0,090, 95% CI (0,00-0,67)

Tabela 10S. Częstość genotypów *ERAP1* rs2248374 w kombinacjach z *KIR* u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kontrolnych kobiet płodnych.

ERAP2 rs2248374/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=137 (%)	N=76 (%)	N=44 (%)	N=109 (%)
AA/AA	33 (24,09)	19 (25,00)	10 (22,73)	30 (27,52)
AG/AA	64 (46,72)	36 (47,37)	23 (52,27)	53 (48,62)
GG/AA	40 (29,19)	21 (27,63)	11 (25,00)	26 (23,86)
	N=358 (%)	N=206 (%)	N=117 (%)	N=273 (%)
AA/Bx	93 (25,98)	48 (23,30)	38 (32,48)	76 (27,84)
AG/Bx	173 (48,32)	98 (47,57)	53 (45,30)	128 (46,89)
GG/Bx	92 (25,70)	60 (29,13)	26 (22,22)	69 (25,27)
	N=196 (%)	N=111 (%)	N=61 (%)	N=171 (%)
AA/cenAA	48 (24,49)	29 (26,13)	14 (22,95)	45 (26,32)
AG/cenAA	94 (47,96)	52 (46,85)	31 (50,82)	84 (49,12)
GG/cenAA	54 (27,55)	30 (27,02)	16 (26,23)	42 (24,56)
	N=244 (%)	N=141 (%)	N=82 (%)	N=165 (%)
AA/cenAB	65 (26,64)	**31 (21,99)[a]**	30 (36,59)	47 (28,48)
AG/cenAB	116 (47,54)	67 (47,51)	37 (45,12)	78 (47,27)
GG/cenAB	63 (25,82)	43 (30,50)	15 (18,29)	40 (24,25)
	N=55 (%)	N=30 (%)	N=18 (%)	N=46 (%)
AA/cenBB	13 (23,64)	7 (23,33)	4 (22,22)	14 (30,43)
AG/cenBB	27 (49,09)	15 (50,00)	8 (44,44)	19 (41,30)
GG/cenBB	15 (27,27)	8 (26,67)	6 (33,34)	13 (28,27)
	N=285 (%)	N=163 (%)	N=90 (%)	N=203 (%)
AA/telAA	74 (25,96)	41 (25,15)	24 (26,67)	61 (30,05)
AG/telAA	132 (46,32)	79 (48,47)	41 (45,56)	94 (46,31)
GG/telAA	79 (27,72)	43 (26,38)	25 (27,77)	48 (23,64)
	N=177 (%)	N=103 (%)	N=58 (%)	N=156 (%)
AA/telAB	46 (25,99)	25 (24,27)	20 (34,48)	38 (24,36)
AG/telAB	86 (48,59)	45 (43,69)	28 (48,28)	77 (49,36)
GG/telAB	45 (25,42)	**33 (32,04)[b]**	10 (17,24)	41 (26,28)
	N=33 (%)	N=16 (%)	N=13 (%)	N=23 (%)
AA/telBB	6 (18,18)	1 (6,25)	4 (30,77)	7 (30,43)
AG/telBB	19 (57,58)	10 (62,50)	7 (53,85)	10 (43,48)
GG/telBB	8 (24,24)	5 (31,25)	2 (15,38)	6 (26,09)
	N=136 (%)	N=76 (%)	N=43 (%)	N=109 (%)
AA/cenAA/telAA	33 (24,26)	19 (25,00)	10 (23,26)	30 (27,52)
AG/cenAA/telAA	63 (46,32)	36 (47,37)	22 (51,16)	53 (48,62)
GG/cenAA/telAA	40 (29,42)	21 (27,63)	11 (25,58)	26 (23,86)
	N=55 (%)	N=33 (%)	N=15 (%)	N=58 (%)
AA/cenAA/telAB	14 (25,45)	10 (30,30)	3 (20,00)	14 (24,14)
AG/cenAA/telAB	29 (52,73)	15 (45,45)	8 (53,33)	30 (51,72)
GG/cenAA/telAB	12 (21,82)	8 (24,25)	4 (26,67)	14 (24,14)
	N=5 (%)	N=2 (%)	N=3 (%)	N=4 (%)
AA/cenAA/telBB	1 (20,00)	0 (0,00)	1 (33,33)	1 (25,00)
AG/cenAA/telBB	2 (40,00)	1 (50,00)	1 (33,33)	1 (25,00)
GG/cenAA/telBB	2 (40,00)	1 (50,00)	1 (33,33)	2 (50,00)

ERAP2 rs2248374/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=125 (%)	N=72 (%)	N=42 (%)	N=78 (%)
AA/cenAB/telAA	33 (26,40)	17 (23,61)	13 (30,95)	27 (34,62)
AG/cenAB/telAA	60 (48,00)	36 (50,00)	18 (42,86)	34 (43,59)
GG/cenAB/telAA	32 (25,60)	19 (26,39)	11 (26,19)	17 (21,79)
	N=102 (%)	N=60 (%)	N=36 (%)	N=76 (%)
AA/cenAB/telAB	29 (28,43)	**13 (21,67)[c]**	**16 (44,44)[d]**	18 (23,68)
AG/cenAB/telAB	46 (45,10)	25 (41,66)	17 (47,23)	38 (50,00)
GG/cenAB/telAB	27 (26,47)	**22 (36,67)[e]**	**3 (8,33)[f]**	20 (26,32)
	N=17 (%)	N=9 (%)	N=4 (%)	N=11 (%)
AA/cenAB/telBB	3 (17,65)	1 (11,11)	1 (25,00)	2 (18,18)
AG/cenAB/telBB	10 (58,82)	6 (66,67)	2 (50,00)	6 (54,55)
GG/cenAB/telBB	4 (23,53)	2 (22,22)	1 (25,00)	3 (27,27)
	N=24 (%)	N=15 (%)	N=5 (%)	N=16 (%)
AA/cenBB/telAA	8 (33,33)	5 (33,33)	1 (20,00)	4 (25,00)
AG/cenBB/telAA	9 (37,50)	7 (46,67)	1 (20,00)	7 (43,75)
GG/cenBB/telAA	7 (29,17)	3 (20,00)	3 (60,00)	5 (31,25)
	N=20 (%)	N=10 (%)	N=7 (%)	N=22 (%)
AA/cenBB/telAB	3 (15,00)	2 (20,00)	1 (14,28)	6 (27,27)
AG/cenBB/telAB	11 (55,00)	5 (50,00)	3 (42,86)	9 (40,91)
GG/cenBB/telAB	6 (30,00)	3 (30,00)	3 (42,86)	7 (31,82)
	N=11 (%)	N=5 (%)	N=6 (%)	N=8 (%)
AA/cenBB/telBB	2 (18,18)	0 (0,00)	2 (33,33)	4 (50,00)
AG/cenBB/telBB	7 (63,64)	3 (60,00)	4 (66,67)	3 (37,50)
GG/cenBB/telBB	2 (18,18)	2 (40,00)	0 (0,00)	1 (12,50)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym in vitro; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu in vitro; p – istotność statystyczna; $pc_{orr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla kombinacji AA/Bx; x9 dla kombinacji z centromerycznym lub telomerycznym KIR; x27 dla kombinacji z centromerycznym i telomerycznym KIR); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice. Wartości w nawiasach oznaczają procent liczebności.

RIF *vs.* SIVF: [a]$p/p_{corr.}$=0,020/ns, OR=0,490, 95% CI (0,26-0,93); [b]p/p_{corr}=0,044/ns, OR=2,252, 95% CI (0,97-5,62); [c]$p/p_{corr.}$=0,023/ns, OR=0,350, 95% CI (0,13-0,94); [e]$p/p_{corr.}$=0,002/0,051, OR=6,262, 95% CI (1,66-35,58);

SIVF *vs.* kontrola płodna: [d]$p/p_{corr.}$=0,030/ns, OR=2,554, 95% CI (1,01-6,50); [f]$p/p_{corr.}$=0,043/ns, OR=0,257, 95% CI (0,05-0,97)

Tabela 11S. Częstość genotypów *ERAP1* rs27044 w kombinacjach z *KIR* u kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kontrolnych kobiet płodnych.

ERAP1 rs27044/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=138 (%)	N=77 (%)	N=44 (%)	N=110 (%)
CC/AA	68 (49,28)	37 (48,05)	24 (54,55)	62 (56,36)
CG/AA	55 (39,86)	29 (37,66)	19 (43,18)	37 (33,64)
GG/AA	15 (10,86)	**11 (14,29)[a]**	1 (2,27)	11 (10,00)
	N=358 (%)	N=206 (%)	N=117 (%)	N=275 (%)
CC/Bx	196 (54,75)	104 (50,49)	64 (54,70)	163 (59,27)
CG/Bx	142 (39,66)	**91 (44,17)[b]**	44 (37,61)	96 (34,91)
GG/Bx	20 (5,59)	11 (5,34)	9 (7,69)	16 (5,82)
	N=197 (%)	N=112 (%)	N=61 (%)	N=173 (%)
CC/cenAA	96 (48,73)	50 (44,64)	33 (54,10)	94 (54,34)
CG/cenAA	81 (41,12)	49 (43,75)	24 (39,34)	64 (36,99)
GG/cenAA	20 (10,15)	13 (11,61)	4 (6,56)	15 (8,67)
	N=244 (%)	N=141 (%)	N=82 (%)	N=166 (%)
CC/cenAB	132 (54,10)	**68 (48,23)[c]**	47 (57,32)	104 (62,65)
CG/cenAB	98 (40,16)	**64 (45,39)[d]**	30 (36,59)	53 (31,93)
GG/cenAB	14 (5,74)	9 (6,38)	5 (6,09)	9 (5,42)
	N=55 (%)	N=30 (%)	N=18 (%)	N=46 (%)
CC/cenBB	36 (65,45)	**23 (76,67)[e]**	8 (44,44)	27 (58,70)
CG/cenBB	18 (32,73)	7 (23,33)	9 (50,00)	16 (34,78)
GG/cenBB	1 (1,82)	0 (0,00)	1 (5,56)	3 (6,52)
	N=286 (%)	N=164 (%)	N=90 (%)	N=205 (%)
CC/telAA	162 (56,64)	92 (56,10)	50 (55,56)	122 (59,51)
CG/telAA	103 (36,01)	57 (34,76)	37 (41,11)	69 (33,66)
GG/telAA	21 (7,35)	15 (9,14)	3 (3,33)	14 (6,83)
	N=177 (%)	N=103 (%)	N=58 (%)	N=156 (%)
CC/telAB	85 (48,02)	**44 (42,72)[f]**	30 (51,72)	88 (56,41)
CG/telAB	81 (45,76)	**53 (51,46)[g]**	23 (39,66)	58 (37,18)
GG/telAB	11 (6,22)	6 (5,82)	5 (8,62)	10 (6,41)
	N=33 (%)	N=16 (%)	N=13 (%)	N=23 (%)
CC/telBB	17 (51,52)	**5 (31,25)[h]**	8 (61,54)	15 (65,22)
CG/telBB	13 (39,39)	**10 (62,50)[i]**	3 (23,08)	5 (21,74)
GG/telBB	3 (9,09)	1 (6,25)	2 (15,38)	3 (13,04)
	N=137 (%)	N=77 (%)	N=43 (%)	N=110 (%)
CC/cenAA/telAA	68 (49,64)	37 (48,05)	24 (55,81)	62 (56,36)
CG/cenAA/telAA	54 (39,42)	29 (37,66)	18 (41,86)	37 (33,64)
GG/cenAA/telAA	15 (10,94)	**11 (14,29)[j]**	1 (2,33)	11 (10,00)
	N=55 (%)	N=33 (%)	N=15 (%)	N=58 (%)
CC/cenAA/telAB	26 (47,27)	13 (39,39)	7 (46,67)	30 (51,72)
CG/cenAA/telAB	26 (47,27)	19 (57,58)	6 (40,00)	26 (44,83)
GG/cenAA/telAB	3 (5,46)	1 (3,03)	2 (13,33)	2 (3,45)
	N=5 (%)	N=2 (%)	N=3 (%)	N=4 (%)
CC/cenAA/telBB	2 (40,00)	0 (0,00)	2 (66,67)	2 (50,00)
CG/cenAA/telBB	1 (20,00)	1 (50,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
GG/cenAA/telBB	2 (40,00)	1 (50,00)	1 (33,33)	2 (50,00)

ERAP1 rs27044/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=125 (%)	N=72 (%)	N=42 (%)	N=79 (%)
CC/cenAB/telAA	77 (61,60)	45 (62,50)	23 (54,76)	52 (65,82)
CG/cenAB/telAA	42 (33,60)	23 (31,94)	17 (40,48)	25 (31,65)
GG/cenAB/telAA	6 (4,80)	4 (5,56)	2 (4,76)	2 (2,53)
	N=102 (%)	N=60 (%)	N=36 (%)	N=76 (%)
CC/cenAB/telAB	47 (46,08)	**22 (36,67)^{k}**	21 (58,33)	44 (57,89)
CG/cenAB/telAB	47 (46,08)	**33 (55,00)^{l}**	12 (33,33)	26 (34,22)
GG/cenAB/telAB	8 (7,84)	5 (8,33)	3 (8,34)	6 (7,89)
	N=17 (%)	N=9 (%)	N=4 (%)	N=11 (%)
CC/cenAB/telBB	8 (47,06)	**1 (11,11)^{m,n}**	3 (75,00)	8 (72,73)
CG/cenAB/telBB	9 (52,94)	**8 (88,89)^{o,p}**	1 (25,00)	2 (18,18)
GG/cenAB/telBB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (9,09)
	N=24 (%)	N=15 (%)	N=5 (%)	N=16 (%)
CC/cenBB/telAA	17 (70,83)	10 (66,67)	3 (60,00)	8 (50,00)
CG/cenBB/telAA	7 (29,17)	5 (33,33)	2 (40,00)	7 (43,75)
GG/cenBB/telAA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (6,25)
	N=20 (%)	N=10 (%)	N=7 (%)	N=22 (%)
CC/cenBB/telAB	12 (60,00)	**9 (90,00)^{q}**	2 (28,57)	14 (63,64)
CG/cenBB/telAB	8 (40,00)	**1 (10,00)^{r}**	5 (71,43)	6 (27,27)
GG/cenBB/telAB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (9,09)
	N=11 (%)	N=5 (%)	N=6 (%)	N=8 (%)
CC/cenBB/telBB	7 (63,64)	4 (80,00)	3 (50,00)	5 (62,50)
CG/cenBB/telBB	3 (27,27)	1 (20,00)	2 (33,33)	3 (37,50)
GG/cenBB/telBB	1 (9,09)	0 (0,00)	1 (16,67)	0 (0,00)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym in vitro; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu in vitro; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla kombinacji AA/Bx; x9 dla kombinacji z centromerycznym lub telomerycznym KIR; x27 dla kombinacji z centromerycznym i telomerycznym KIR); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice. Wartości w nawiasach oznaczają procent liczebności.

RIF *vs.* SIVF: $^{a}p/p_{corr.}$=0,054/ns, OR=7,085, 95% CI (0,97-315,07); $^{e}p/p_{corr.}$=0,032/ns, OR=3,974, 95% CI (0,99-17,38); $^{j}p/p_{corr.}$=0,054/ns, OR=6,920, 95% CI (0,94-307,92); $^{n}p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=0,062, 95% CI (0,00-1,46); $^{p}p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=16,100, 95% CI (0,68-1388,84); $^{q}p/p_{corr.}$=0,035/ns, OR=17,340, 95% CI (1,15-1165,33); $^{r}p/p_{corr.}$=0,035/ns, OR=0,058, 95% CI (0,00-0,87);

RIF *vs.* kontrola płodna: $^{b}p/p_{corr.}$=0,047/ns, OR=1,474, 95% CI (1,00-2,17); $^{c}p/p_{corr.}$=0,015/ns, OR=0,556, 95% CI (0,34-0,90); $^{d}p/p_{corr.}$=0,018/ns, OR=1,769, 95% CI (1,08-2,90); $^{f}p/p_{corr.}$=0,042/ns, OR=0,578, 95% CI (0,34-0,98); $^{g}p/p_{corr.}$=0,029/ns, OR=1,787, 95% CI (1,05-3,06); $^{h}p/p_{corr.}$=0,054/ns, OR=0,252, 95% CI (0,05-1,13); $^{i}p/p_{corr.}$=0,018/ns, OR=5,689, 95% CI (1,20-31,53); $^{k}p/p_{corr.}$=0,016/ns, OR=0,424, 95% CI (0,20-0,89); $^{l}p/p_{corr.}$=0,023/ns, OR=2,335, 95% CI (1,11-5,00); $^{m}p/p_{corr.}$=0,010/ns, OR=0,057, 95% CI (0,00-0,70); $^{o}p/p_{corr.}$=0,005/ns, OR=27,326, 95% CI (2,06-1740,08)

Tabela 12S. Częstość genotypów *ERAP1* rs30187 w kombinacjach z *KIR u* kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kontrolnych kobiet płodnych.

ERAP1 rs30187/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=138 (%)	N=77 (%)	N=44 (%)	N=110 (%)
CC/AA	54 (39,13)	29 (37,66)	19 (43,18)	52 (47,27)
CT/AA	63 (45,65)	33 (42,86)	22 (50,00)	45 (40,91)
TT/AA	21 (15,22)	15 (19,48)	3 (6,82)	13 (11,82)
	N=358 (%)	N=206 (%)	N=117 (%)	N=275 (%)
CC/Bx	167 (46,65)	89 (43,20)	56 (47,86)	133 (48,36)
CT/Bx	156 (43,58)	97 (47,09)	48 (41,03)	121 (44,00)
TT/Bx	35 (9,77)	20 (9,71)	13 (11,11)	21 (7,64)
	N=197 (%)	N=112 (%)	N=61 (%)	N=173 (%)
CC/cenAA	79 (40,10)	40 (35,71)	28 (45,90)	78 (45,09)
CT/cenAA	87 (44,16)	51 (45,54)	27 (44,26)	77 (44,51)
TT/cenAA	31 (15,74)	**21 (18,75)[a]**	6 (9,84)	18 (10,40)
	N=244 (%)	N=141 (%)	N=82 (%)	N=166 (%)
CC/cenAB	111 (45,49)	59 (41,84)	39 (47,56)	86 (51,81)
CT/cenAB	110 (45,08)	69 (48,94)	34 (41,46)	68 (40,96)
TT/cenAB	23 (9,43)	13 (9,22)	9 (10,98)	12 (7,23)
	N=55 (%)	N=30 (%)	N=18 (%)	N=46 (%)
CC/cenBB	31 (56,36)	19 (63,33)	8 (44,44)	21 (45,65)
CT/cenBB	22 (40,00)	10 (33,33)	9 (50,00)	21 (45,65)
TT/cenBB	2 (3,64)	1 (3,34)	1 (5,56)	4 (8,70)
	N=286 (%)	N=164 (%)	N=90 (%)	N=205 (%)
CC/telAA	129 (45,10)	74 (45,12)	39 (43,33)	104 (50,73)
CT/telAA	125 (43,71)	68 (41,46)	45 (50,00)	84 (40,98)
TT/telAA	32 (11,19)	22 (13,42)	6 (6,67)	17 (8,29)
	N=177 (%)	N=103 (%)	N=58 (%)	N=156 (%)
CC/telAB	78 (44,07)	41 (39,81)	28 (48,28)	68 (43,59)
CT/telAB	81 (45,76)	53 (51,46)	22 (37,93)	73 (46,79)
TT/telAB	18 (10,17)	9 (8,73)	8 (13,79)	15 (9,62)
	N=33 (%)	N=16 (%)	N=13 (%)	N=23 (%)
CC/telBB	14 (42,42)	**3 (18,75)[b,c]**	8 (61,54)	13 (56,52)
CT/telBB	13 (39,39)	9 (56,25)	3 (23,08)	8 (34,78)
TT/telBB	6 (18,18)	4 (25,00)	2 (15,38)	2 (8,70)
	N=137 (%)	N=77 (%)	N=43 (%)	N=110 (%)
CC/cenAA/telAA	54 (39,42)	29 (37,66)	19 (44,19)	52 (47,27)
CT/cenAA/telAA	62 (45,26)	33 (42,86)	21 (48,84)	45 (40,91)
TT/cenAA/telAA	21 (15,32)	15 (19,48)	3 (6,97)	13 (11,82)
	N=55 (%)	N=33 (%)	N=15 (%)	N=58 (%)
CC/cenAA/telAB	23 (41,82)	11 (33,33)	7 (46,67)	24 (41,38)
CT/cenAA/telAB	24 (43,64)	17 (51,52)	6 (40,00)	31 (53,45)
TT/cenAA/telAB	8 (14,54)	5 (15,15)	2 (13,33)	3 (5,17)
	N=5 (%)	N=2 (%)	N=3 (%)	N=4 (%)
CC/cenAA/telBB	2 (40,00)	0 (0,00)	2 (66,67)	2 (50,00)
CT/cenAA/telBB	1 (20,00)	1 (50,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
TT/cenAA/telBB	2 (40,00)	1 (50,00)	1 (33,33)	2 (50,00)

ERAP1 rs30187/KIR	Wszystkie kobiety IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=125 (%)	N=72 (%)	N=42 (%)	N=79 (%)
CC/cenAB/telAA	61 (48,80)	36 (50,00)	18 (42,86)	44 (55,70)
CT/cenAB/telAA	53 (42,40)	29 (40,28)	21 (50,00)	32 (40,50)
TT/cenAB/telAA	11 (8,80)	7 (9,72)	3 (7,14)	3 (3,80)
	N=102 (%)	N=60 (%)	N=36 (%)	N=76 (%)
CC/cenAB/telAB	43 (42,16)	22 (36,67)	18 (50,00)	35 (46,05)
CT/cenAB/telAB	49 (48,04)	**34 (56,67)[d]**	12 (33,33)	32 (42,11)
TT/cenAB/telAB	10 (9,80)	4 (6,66)	6 (16,67)	9 (11,84)
	N=17 (%)	N=9 (%)	N=4 (%)	N=11 (%)
CC/cenAB/telBB	7 (41,18)	**1 (11,11)[e,f]**	3 (75,00)	7 (63,64)
CT/cenAB/telBB	8 (47,06)	6 (66,67)	1 (25,00)	4 (36,36)
TT/cenAB/telBB	2 (11,76)	2 (22,22)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=24 (%)	N=15 (%)	N=5 (%)	N=16 (%)
CC/cenBB/telAA	14 (58,33)	9 (60,00)	2 (40,00)	8 (50,00)
CT/cenBB/telAA	10 (41,67)	6 (40,00)	3 (60,00)	7 (43,75)
TT/cenBB/telAA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (6,25)
	N=20 (%)	N=10 (%)	N=7 (%)	N=22 (%)
CC/cenBB/telAB	12 (60,00)	8 (80,00)	3 (42,86)	9 (40,91)
CT/cenBB/telAB	8 (40,00)	2 (20,00)	4 (57,14)	10 (45,45)
TT/cenBB/telAB	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (13,64)
	N=11 (%)	N=5 (%)	N=6 (%)	N=8 (%)
CC/cenBB/telBB	5 (45,45)	2 (40,00)	3 (50,00)	4 (50,00)
CT/cenBB/telBB	4 (36,36)	2 (40,00)	2 (33,33)	4 (50,00)
TT/cenBB/telBB	2 (18,19)	1 (20,00)	1 (16,67)	0 (0,00)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym in vitro; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu in vitro; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla kombinacji AA/Bx; x9 dla kombinacji z centromerycznym lub telomerycznym KIR; x27 dla kombinacji z centromerycznym i telomerycznym KIR); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice. Wartości w nawiasach oznaczają procent liczebności.

RIF *vs.* kontrola płodna: [a]$p/p_{corr.}$=0,053/ns, OR=1,982, 95% CI (0,95-4,18); [b]$p/p_{corr.}$=0,024/ns, OR=0,186, 95% CI (0,03-0,94); [e]$p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=0,083, 95% CI (0,00-1,00);

RIF *vs.* SIVF: [c]$p/p_{corr.}$=0,027/ns, OR=0,156, 95% CI (0,02-0,98); [d]$p/p_{corr.}$=0,035/ns, OR=2,589, 95% CI (1,02-6,83); [f]$p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=0,062, 95% CI (0,00-1,46)

Tabela 13S. Porównanie częstości kombinacji genów *KIR* i *HLA-C* u partnerów kobiet, które poddały się zapłodnieniu pozaustrojowemu oraz partnerów kobiet płodnych.

KIR/HLA	Mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=169 (%)	N=100 (%)	N=58 (%)	N=151 (%)
AA/C1+	95 (56,21)	56 (56,00)	31 (53,45)	82 (54,30)
AA/C2+	74 (43,79)	44 (44,00)	27 (46,55)	69 (45,70)
	N=121 (%)	N=73 (%)	N=39 (%)	N=102 (%)
AA/C1C1	47 (38,84)	29 (39,73)	12 (30,77)	33 (32,35)
AA/C1C2	48 (39,67)	27 (36,99)	19 (48,72)	49 (48,04)
AA/C2C2	26 (21,49)	17 (23,29)	8 (20,51)	20 (19,61)
	N=570 (%)	N=316 (%)	N=188 (%)	N=330 (%)
Bx/C1+	324 (56,84)	180 (56,96)	105 (55,85)	189 (57,27)
Bx/C2+	246 (43,16)	136 (43,04)	83 (44,15)	141 (42,73)
	N=370 (%)	N=205 (%)	N=122 (%)	N=219 (%)
Bx/C1C1	124 (33,51)	69 (33,66)	39 (31,97)	78 (35,62)
Bx/C1C2	200 (54,05)	111 (54,15)	66 (54,10)	111 (50,68)
Bx/C2C2	46 (12,43)	25 (12,20)	17 (13,93)	30 (13,70)
	N=270 (%)	N=154 (%)	N=90 (%)	N=237 (%)
CenAA/C1+	153 (56,67)	86 (55,84)	50 (55,56)	129 (54,43)
CenAA/C2+	117 (43,33)	68 (44,16)	40 (44,44)	108 (45,57)
	N=186 (%)	N=105 (%)	N=62 (%)	N=155 (%)
CenAA/C1C1	69 (37,10)	37 (35,24)	22 (35,48)	47 (30,32)
CenAA/C1C2	84 (45,16)	49 (46,67)	28 (45,16)	82 (52,90)
CenAA/C2C2	33 (17,74)	19 (18,10)	12 (19,35)	26 (16,77)
	N=362 (%)	N=204 (%)	N=118 (%)	N=197 (%)
CenAB/C1+	204 (56,35)	116 (56,86)	64 (54,24)	117 (59,39)
CenAB/C2+	158 (43,65)	88 (43,14)	54 (45,76)	80 (40,61)
	N=239 (%)	N=137 (%)	N=75 (%)	N=135 (%)
CenAB/C1C1	81 (33,89)	49 (35,77)	21 (28,00)	55 (40,74)
CenAB/C1C2	123 (51,46)	67 (48,91)	43 (57,33)	62 (45,93)
CenAB/C2C2	35 (14,64)	21 (15,33)	11 (14,67)	18 (13,33)
	N=107 (%)	N=58 (%)	N=38 (%)	N=47 (%)
CenBB/C1+	62 (57,94)	34 (58,62)	22 (57,89)	25 (53,19)
CenBB/C2+	45 (42,06)	24 (41,38)	16 (42,11)	22 (46,81)
	N=66 (%)	N=36 (%)	N=24 (%)	N=31 (%)
CenBB/C1C1	21 (31,82)	12 (33,33)	8 (33,33)	9 (29,03)
CenBB/C1C2	41 (62,12)	22 (61,11)	14 (58,33)	16 (51,61)
CenBB/C2C2	4 (6,06)	2 (5,56)	2 (8,33)	6 (19,35)
	N=428 (%)	N=239 (%)	N=147 (%)	N=291 (%)
TelAA/C1+	241 (56,31)	134 (56,07)	80 (54,42)	159 (54,64)
TelAA/C2+	187 (43,69)	105 (43,93)	67 (45,58)	132 (45,36)
	N=285 (%)	N=161 (%)	N=95 (%)	N=197 (%)
TelAA/C1C1	98 (34,39)	56 (34,78)	28 (29,47)	65 (32,99)
TelAA/C1C2	143 (50,18)	78 (48,45)	52 (54,74)	94 (47,72)
TelAA/C2C2	44 (15,44)	27 (16,77)	15 (15,79)	38 (19,29)
	N=263 (%)	N=146 (%)	N=85 (%)	N=170 (%)
TelAB/C1+	153 (58,17)	86 (58,90)	49 (57,65)	100 (58,82)

KIR/HLA	Mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
TelAB/C2+	110 (41,83)	60 (41,10)	36 (42,35)	70 (41,18)
	N=178 (%)	N=99 (%)	N=58 (%)	N=111 (%)
TelAB/C1C1	68 (38,20)	39 (39,39)	22 (37,93)	41 (36,94)
TelAB/C1C2	85 (47,75)	47 (47,47)	27 (46,55)	59 (53,15)
TelAB/C2C2	25 (14,04)	13 (13,13)	9 (15,52)	11 (9,91)
	N=48 (%)	N=31 (%)	N=14 (%)	N=20 (%)
TelBB/C1+	25 (52,08)	16 (51,61)	7 (50,00)	12 (60,00)
TelBB/C2+	23 (47,92)	15 (48,39)	7 (50,00)	8 (40,00)
	N=28 (%)	N=18 (%)	N=8 (%)	N=13 (%)
TelBB/C1C1	5 (17,86)	3 (16,67)	1 (12,50)	5 (38,46)
TelBB/C1C2	20 (71,43)	13 (72,22)	6 (75,00)	7 (53,85)
TelBB/C2C2	3 (10,71)	2 (11,11)	1 (12,50)	1 (7,69)
	N=168 (%)	N=100 (%)	N=57 (%)	N=151 (%)
CenAA/TelAA/C1+	95 (56,55)	56 (56,00)	31 (54,39)	82 (54,30)
CenAA/TelAA/C2+	73 (43,45)	44 (44,00)	26 (45,61)	69 (45,70)
	N=120 (%)	N=73 (%)	N=38 (%)	N=102 (%)
CenAA/TelAA/C1C1	47 (39,17)	29 (39,73)	12 (31,58)	33 (32,35)
CenAA/TelAA/C1C2	48 (40,00)	27 (36,99)	19 (50,00)	49 (48,04)
CenAA/TelAA/C2C2	25 (20,83)	17 (23,29)	7 (18,42)	20 (19,61)
	N=94 (%)	N=50 (%)	N=31 (%)	N=79 (%)
CenAA/TelAB/C1+	54 (57,45)	28 (56,00)	18 (58,06)	43 (54,43)
CenAA/TelAB/C2+	40 (42,55)	22 (44,00)	13 (41,94)	36 (45,57)
	N=62 (%)	N=30 (%)	N=23 (%)	N=49 (%)
CenAA/TelAB/C1C1	22 (35,48)	8 (26,67)	10 (43,48)	13 (26,53)
CenAA/TelAB/C1C2	32 (51,61)	**20 (66,67)[a]**	**8 (34,78)[b]**	30 (61,22)
CenAA/TelAB/C2C2	8 (12,90)	2 (6,67)	5 (21,74)	6 (12,24)
	N=8 (%)	N=4 (%)	N=2 (%)	N=7 (%)
CenAA/TelBB/C1+	4 (50,00)	2 (50,00)	1 (50,00)	4 (57,14)
CenAA/TelBB/C2+	4 (50,00)	2 (50,00)	1 (50,00)	3 (42,86)
	N=4 (%)	N=2 (%)	N=1 (%)	N=4 (%)
CenAA/TelBB/C1C1	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (25,00)
CenAA/TelBB/C1C2	4 (100,00)	2 (100,00)	1 (100,00)	3 (75,00)
CenAA/TelBB/C2C2	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=198 (%)	N=114 (%)	N=62 (%)	N=118 (%)
CenAB/TelAA/C1+	111 (56,06)	64 (56,14)	33 (53,23)	66 (55,93)
CenAB/TelAA/C2+	87 (43,94)	50 (43,86)	29 (46,77)	52 (44,07)
	N=128 (%)	N=73 (%)	N=40 (%)	N=80 (%)
CenAB/TelAA/C1C1	41 (32,03)	23 (31,51)	11 (27,50)	28 (35,00)
CenAB/TelAA/C1C2	70 (54,69)	41 (56,16)	22 (55,00)	38 (47,50)
CenAB/TelAA/C2C2	17 (13,28)	9 (12,33)	7 (17,50)	14 (17,50)
	N=131 (%)	N=70 (%)	N=44 (%)	N=72 (%)
CenAB/TelAB/C1+	76 (58,02)	42 (60,00)	25 (56,82)	46 (63,89)
CenAB/TelAB/C2+	55 (41,98)	28 (40,00)	19 (43,18)	26 (36,11)
	N=91 (%)	N=52 (%)	N=28 (%)	N=50 (%)
CenAB/TelAB/C1C1	36 (39,56)	24 (46,15)	9 (32,14)	24 (48,00)
CenAB/TelAB/C1C2	40 (43,96)	18 (34,62)	16 (57,14)	22 (44,00)
CenAB/TelAB/C2C2	15 (16,48)	10 (19,23)	3 (10,71)	4 (8,00)

KIR/HLA	Mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=33 (%)	N=20 (%)	N=12 (%)	N=7 (%)
CenAB/TelBB/C1+	17 (51,52)	10 (50,00)	6 (50,00)	5 (71,43)
CenAB/TelBB/C2+	16 (48,48)	10 (50,00)	6 (50,00)	2 (28,57)
	N=20 (%)	N=12 (%)	N=7 (%)	N=5 (%)
CenAB/TelBB/C1C1	4 (20,00)	2 (16,67)	1 (14,29)	3 (60,00)
CenAB/TelBB/C1C2	13 (65,00)	8 (66,67)	5 (71,43)	2 (40,00)
CenAB/TelBB/C2C2	3 (15,00)	2 (16,67)	1 (14,29)	0 (0,00)
	N=62 (%)	N=25 (%)	N=28 (%)	N=22 (%)
CenBB/TelAA/C1+	35 (56,45)	14 (56,00)	16 (57,14)	11 (50,00)
CenBB/TelAA/C2+	27 (43,55)	11 (44,00)	12 (42,86)	11 (50,00)
	N=37 (%)	N=15 (%)	N=17 (%)	N=15 (%)
CenBB/TelAA/C1C1	10 (27,03)	4 (26,67)	5 (29,41)	4 (26,67)
CenBB/TelAA/C1C2	25 (67,57)	10 (66,67)	11 (64,71)	7 (46,67)
CenBB/TelAA/C2C2	**2 (5,41)[c]**	1 (6,67)	1 (5,88)	4 (26,67)
	N=38 (%)	N=26 (%)	N=10 (%)	N=19 (%)
CenBB/TelAB/C1+	23 (60,53)	16 (61,54)	6 (60,00)	11 (57,89)
CenBB/TelAB/C2+	15 (39,47)	10 (38,46)	4 (40,00)	8 (42,11)
	N=25 (%)	N=17 (%)	N=7 (%)	N=12 (%)
CenBB/TelAB/C1C1	10 (40,00)	7 (41,18)	3 (42,86)	4 (33,33)
CenBB/TelAB/C1C2	13 (52,00)	9 (52,94)	3 (42,86)	7 (58,33)
CenBB/TelAB/C2C2	2 (8,00)	1 (5,88)	1 (14,29)	1 (8,33)
	N=7 (%)	N=7 (%)	N=0 (%)	N=6 (%)
CenBB/TelBB/C1+	4 (57,14)	4 (57,14)	0 (0,00)	3 (50,00)
CenBB/TelBB/C2+	3 (42,86)	3 (42,86)	0 (0,00)	3 (50,00)
	N=4 (%)	N=4 (%)	N=0 (%)	N=4 (%)
CenBB/TelBB/C1C1	1 (25,00)	1 (25,00)	0 (0,00)	1 (25,00)
CenBB/TelBB/C1C2	3 (75,00)	3 (75,00)	0 (0,00)	2 (50,00)
CenBB/TelBB/C2C2	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (25,00)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x3 dla możliwych kombinacji HLA-C); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice.

IVF *vs.* kontrola płodna: $^{c}p/p_{corr.}$=0,050/ns, OR=0,164, 95% CI (0,01-1,32);

RIF *vs.* SIVF: $^{a}p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=3,650, 95% CI (1,04-13,84);

SIVF *vs.* kontrola płodna: $^{b}p/p_{corr.}$ =0,045/ns, OR=0,343, 95% CI (0,10-1,06)

Tabela 14S. Częstość genotypów i alleli *ERAP1* i *ERAP2* u partnerów kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz partnerów kobiet płodnych.

	Mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
ERAP1 rs30187	N=491 (%)	N=278 (%)	N=161 (%)	N=318 (%)
CC	248 (50,51)	142 (51,08)	81 (50,31)	144 (45,28)
CT	194 (39,51)	109 (39,21)	60 (37,27)	139 (43,71)
TT	49 (9,98)	27 (9,71)	20 (12,42)	35 (11,01)
T	292 (29,74)	163 (29,32)	100 (31,06)	209 (32,86)
H-W	p=0,23	p=0,37	p=0,10	p=0,87
ERAP1 rs27044	N=491 (%)	N=278 (%)	N=161 (%)	N=318 (%)
CC	287 (58,45)	170 (61,15)	86 (53,42)	177 (55,66)
CG	170 (34,62)	94 (33,81)	57 (35,40)	114 (35,85)
GG	34 (6,92)	**14 (5,04)[a]**	18 (11,18)	27 (8,49)
G	238 (24,24)	**122 (21,94)[b]**	93 (28,88)	168 (26,42)
H-W	p=0,20	p=0,83	p=0,08	p=0,17
ERAP1 rs26653	N=491 (%)	N=278 (%)	N=161 (%)	N=318 (%)
GG	276 (56,21)	155 (55,76)	92 (57,14)	163 (51,26)
CG	173 (35,23)	98 (35,25)	54 (33,54)	129 (40,57)
CC	42 (8,55)	25 (8,99)	15 (9,32)	26 (8,18)
C	257 (26,17)	148 (26,62)	84 (26,09)	181 (28,46)
H-W	p=0,05	p=0,10	p=0,10	p=0,95
ERAP1 rs26618	N=491 (%)	N=278 (%)	N=161 (%)	N=317 (%)
TT	251 (51,12)	144 (51,80)	78 (48,45)	167 (52,68)
CT	191 (38,90)	109 (39,21)	64 (39,75)	124 (39,12)
CC	49 (9,98)	25 (8,99)	19 (11,80)	26 (8,20)
C	289 (29,43)	159 (28,60)	102 (31,68)	176 (27,76)
H-W	p=0,16	p=0,51	p=0,30	p=0,66
ERAP1 rs2287987	N=490 (%)	N=278 (%)	N=160 (%)	N=317 (%)
TT	304 (62,04)	176 (63,31)	100 (62,50)	198 (62,46)
CT	155 (31,63)	81 (29,14)	53 (33,13)	108 (34,07)
CC	31 (6,33)	**21 (7,55)[c]**	7 (4,38)	11 (3,47)
C	217 (22,14)	123 (22,12)	67 (20,94)	130 (20,50)
H-W	p=0,07	p=0,01	p=0,99	p=0,42
ERAP2 rs2248374	N=489 (%)	N=278 (%)	N=159 (%)	N=318 (%)
AA	125 (25,56)	73 (26,26)	37 (23,27)	65 (20,44)
AG	247 (50,51)	144 (51,80)	76 (47,80)	161 (50,63)
GG	117 (23,93)	61 (21,94)	46 (28,93)	92 (28,93)
G	**481 (49,18)[d]**	**266 (47,84)[e]**	168 (52,83)	345 (54,25)
H-W	p=0,82	p=0,53	p=0,61	p=0,72
ERAP1 rs6861666	N=491 (%)	N=278 (%)	N=161 (%)	N=296 (%)
AA	420 (85,54)	243 (87,41)	135 (83,85)	243 (82,09)
AG	70 (14,26)	34 (12,23)	26 (16,15)	50 (16,89)
GG	1 (0,20)	1 (0,36)	0 (0,00)	3 (1,01)
G	72 (7,33)	36 (6,47)	26 (8,07)	56 (9,46)
H-W	p=0,28	p=0,87	p=0,27	p=0,81

H-W – rozkład Hardy'ego-Weinberga; p – istotność statystyczna; OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności. Wartości pogrubione wskazują na istotne statystycznie różnice.

RIF *vs.* SIVF: [a]p=0,022, OR=0,422, 95% CI (0,19-0,93); [b]p=0,023, OR=0,693, 95% CI (0,50-0,96);

RIF *vs.* kontrola płodna: [c]p=0,030, OR=2,270, 95% CI (1,02-5,32); [e]p=0,032, OR=0,774, 95% CI (0,61-0,98);

Mężczyźni IVF *vs.* kontrola płodna: [d]p=0,047, OR=0,816, 95% CI (0,66-1,00)

Tabela 15S. Częstość kombinacji genotypów *ERAP* oraz *HLA-C* u partnerów kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz partnerów kobiet płodnych.

ERAP/HLA-C mężczyzn	Wszyscy mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
ERAP1 rs30187/HLA-C	N=419 (%)	N=236 (%)	N=136 (%)	N=268 (%)
CC/C1+	212 (50,60)	122 (51,69)	70 (51,47)	121 (45,15)
CT/C1+	166 (39,62)	92 (38,98)	49 (36,03)	115 (42,91)
TT/C1+	41 (9,79)	22 (9,32)	17 (12,50)	32 (11,94)
	N=320 (%)	N=180 (%)	N=110 (%)	N=207 (%)
CC/C2+	157 (49,06)	90 (50,00)	53 (48,18)	88 (42,51)
CT/C2+	127 (39,69)	71 (39,44)	42 (38,18)	97 (46,86)
TT/C2+	36 (11,25)	19 (10,56)	15 (13,64)	22 (10,63)
	N=171 (%)	N=98 (%)	N=51 (%)	N=111 (%)
CC/C1C1	91 (53,22)	52 (53,06)	28 (54,90)	56 (50,45)
CT/C1C1	67 (39,18)	38 (38,78)	18 (35,29)	42 (37,84)
TT/C1C1	13 (7,60)	8 (8,16)	5 (9,80)	13 (11,71)
	N=248 (%)	N=138 (%)	N=85 (%)	N=157 (%)
CC/C1C2	121 (48,79)	70 (50,72)	42 (49,41)	65 (41,40)
CT/C1C2	99 (39,92)	54 (39,13)	31 (36,47)	73 (46,50)
TT/C1C2	28 (11,29)	14 (10,14)	12 (14,12)	19 (12,10)
	N=72 (%)	N=42 (%)	N=25 (%)	N=50 (%)
CC/C2C2	36 (50,00)	20 (47,62)	11 (44,00)	23 (46,00)
CT/C2C2	28 (38,89)	17 (40,48)	11 (44,00)	24 (48,00)
TT/C2C2	8 (11,11)	5 (11,90)	3 (12,00)	3 (6,00)
ERAP1 rs27044/HLA-C	N=419 (%)	N=236 (%)	N=136 (%)	N=268 (%)
CC/C1+	246 (58,71)	145 (61,44)	75 (55,15)	148 (55,22)
CG/C1+	145 (34,61)	81 (34,32)	45 (33,09)	94 (35,07)
GG/C1+	28 (6,68)	**10 (4,24)[a,b]**	16 (11,76)	26 (9,70)
	N=320 (%)	N=180 (%)	N=110 (%)	N=207 (%)
CC/C2+	185 (57,81)	111 (61,67)	56 (50,91)	115 (55,56)
CG/C2+	110 (34,38)	58 (32,22)	42 (38,18)	75 (36,23)
GG/C2+	25 (7,81)	11 (6,11)	12 (10,91)	17 (8,21)
	N=171 (%)	N=98 (%)	N=51 (%)	N=111 (%)
CC/C1C1	102 (59,65)	59 (60,20)	30 (58,82)	62 (55,86)
CG/C1C1	60 (35,09)	36 (36,73)	15 (29,41)	39 (35,14)
GG/C1C1	9 (5,26)	3 (3,06)	6 (11,76)	10 (9,01)
	N=248 (%)	N=138 (%)	N=85 (%)	N=157 (%)
CC/C1C2	144 (58,06)	86 (62,32)	45 (52,94)	86 (54,78)
CG/C1C2	85 (34,27)	45 (32,61)	30 (35,29)	55 (35,03)
GG/C1C2	19 (7,66)	7 (5,07)	10 (11,76)	16 (10,19)
	N=72 (%)	N=42 (%)	N=25 (%)	N=50 (%)
CC/C2C2	41 (56,94)	25 (59,52)	11 (44,00)	29 (58,00)
CG/C2C2	25 (34,72)	13 (30,95)	12 (48,00)	20 (40,00)
GG/C2C2	6 (8,33)	4 (9,52)	2 (8,00)	1 (2,00)

ERAP/HLA-C mężczyzn	Wszyscy mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
ERAP1 rs26653/HLA-C	N=419 (%)	N=236 (%)	N=136 (%)	N=268 (%)
GG/C1+	235 (56,09)	133 (56,36)	76 (55,88)	140 (52,24)
CG/C1+	150 (35,80)	83 (35,17)	48 (35,29)	108 (40,30)
CC/C1+	34 (8,11)	20 (8,47)	12 (8,82)	20 (7,46)
	N=320 (%)	N=180 (%)	N=110 (%)	N=207 (%)
GG/C2+	175 (54,69)	98 (54,44)	62 (56,36)	106 (51,21)
CG/C2+	115 (35,94)	63 (35,00)	38 (34,55)	82 (39,61)
CC/C2+	30 (9,38)	19 (10,56)	10 (9,09)	19 (9,18)
	N=171 (%)	N=98 (%)	N=51 (%)	N=111 (%)
GG/C1C1	101 (59,06)	57 (58,16)	30 (58,82)	57 (51,35)
CG/C1C1	58 (33,92)	35 (35,71)	16 (31,37)	47 (42,34)
CC/C1C1	12 (7,02)	6 (6,12)	5 (9,80)	7 (6,31)
	N=248 (%)	N=138 (%)	N=85 (%)	N=157 (%)
GG/C1C2	134 (54,03)	76 (55,07)	46 (54,12)	83 (52,87)
CG/C1C2	92 (37,10)	48 (34,78)	32 (37,65)	61 (38,85)
CC/C1C2	22 (8,87)	14 (10,14)	7 (8,24)	13 (8,28)
	N=72 (%)	N=42 (%)	N=25 (%)	N=50 (%)
GG/C2C2	41 (56,94)	22 (52,38)	16 (64,00)	23 (46,00)
CG/C2C2	23 (31,94)	15 (35,71)	6 (24,00)	21 (42,00)
CC/C2C2	8 (11,11)	5 (11,90)	3 (12,00)	6 (12,00)
ERAP1 rs26618/HLA-C	N=419 (%)	N=236 (%)	N=136 (%)	N=267 (%)
TT/C1+	215 (51,31)	124 (52,54)	65 (47,79)	140 (52,43)
CT/C1+	161 (38,42)	91 (38,56)	54 (39,71)	105 (39,33)
CC/C1+	43 (10,26)	21 (8,90)	17 (12,50)	22 (8,24)
	N=320 (%)	N=180 (%)	N=110 (%)	N=206 (%)
TT/C2+	169 (52,81)	95 (52,78)	55 (50,00)	111 (53,88)
CT/C2+	120 (37,50)	69 (38,33)	42 (38,18)	79 (38,35)
CC/C2+	31 (9,69)	16 (8,89)	13 (11,82)	16 (7,77)
	N=171 (%)	N=98 (%)	N=51 (%)	N=111 (%)
TT/C1C1	82 (47,95)	49 (50,00)	23 (45,10)	56 (50,45)
CT/C1C1	71 (41,52)	40 (40,82)	22 (43,14)	45 (40,54)
CC/C1C1	18 (10,53)	9 (9,18)	6 (11,76)	10 (9,01)
	N=248 (%)	N=138 (%)	N=85 (%)	N=156 (%)
TT/C1C2	133 (53,63)	75 (54,35)	42 (49,41)	84 (53,85)
CT/C1C2	90 (36,29)	51 (36,96)	32 (37,65)	60 (38,46)
CC/C1C2	25 (10,08)	12 (8,70)	11 (12,94)	12 (7,69)
	N=72 (%)	N=42 (%)	N=25 (%)	N=50 (%)
TT/C2C2	36 (50,00)	20 (47,62)	13 (52,00)	27 (54,00)
CT/C2C2	30 (41,67)	18 (42,86)	10 (40,00)	19 (38,00)
CC/C2C2	6 (8,33)	4 (9,52)	2 (8,00)	4 (8,00)
ERAP1 rs2287987/HLA-C	N=418 (%)	N=236 (%)	N=135 (%)	N=267 (%)
TT/C1+	258 (61,72)	148 (62,71)	84 (62,22)	168 (62,92)
CT/C1+	135 (32,30)	69 (29,24)	46 (34,07)	89 (33,33)
CC/C1+	25 (5,98)	**19 (8,05)[c]**	5 (3,70)	10 (3,75)
	N=320 (%)	N=180 (%)	N=110 (%)	N=206 (%)
TT/C2+	206 (64,38)	117 (65,00)	72 (65,45)	128 (62,14)
CT/C2+	94 (29,38)	51 (28,33)	32 (29,09)	71 (34,47)

ERAP/HLA-C mężczyzn	Wszyscy mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CC/C2+	20 (6,25)	12 (6,67)	6 (5,45)	7 (3,40)
	N=170 (%)	N=98 (%)	N=50 (%)	N=111 (%)
TT/C1C1	98 (57,65)	59 (60,20)	28 (56,00)	70 (63,06)
CT/C1C1	61 (35,88)	30 (30,61)	21 (42,00)	37 (33,33)
CC/C1C1	11 (6,47)	9 (9,18)	1 (2,00)	4 (3,60)
	N=248 (%)	N=138 (%)	N=85 (%)	N=156 (%)
TT/C1C2	160 (64,52)	89 (64,49)	56 (65,88)	98 (62,82)
CT/C1C2	74 (29,84)	39 (28,26)	25 (29,41)	52 (33,33)
CC/C1C2	14 (5,65)	10 (7,25)	4 (4,71)	6 (3,85)
	N=72 (%)	N=42 (%)	N=25 (%)	N=50 (%)
TT/C2C2	46 (63,89)	28 (66,67)	16 (64,00)	30 (60,00)
CT/C2C2	20 (27,78)	12 (28,57)	7 (28,00)	19 (38,00)
CC/C2C2	6 (8,33)	2 (4,76)	2 (8,00)	1 (2,00)
ERAP2 rs2248374/HLA-C	N=417 (%)	N=236 (%)	N=134 (%)	N=268 (%)
AA/C1+	106 (25,42)	62 (26,27)	30 (22,39)	54 (20,15)
AG/C1+	211 (50,60)	122 (51,69)	64 (47,76)	137 (51,12)
GG/C1+	100 (23,98)	52 (22,03)	40 (29,85)	77 (28,73)
	N=318 (%)	N=180 (%)	N=108 (%)	N=207 (%)
AA/C2+	**84 (26,42)[d]**	48 (26,67)	26 (24,07)	39 (18,84)
AG/C2+	152 (47,80)	90 (50,00)	51 (47,22)	101 (48,79)
GG/C2+	82 (25,79)	42 (23,33)	31 (28,70)	67 (32,37)
	N=171 (%)	N=98 (%)	N=51 (%)	N=111 (%)
AA/C1C1	41 (23,98)	25 (25,51)	11 (21,57)	26 (23,42)
AG/C1C1	95 (55,56)	54 (55,10)	25 (49,02)	60 (54,05)
GG/C1C1	35 (20,47)	19 (19,39)	15 (29,41)	25 (22,52)
	N=246 (%)	N=138 (%)	N=83 (%)	N=157 (%)
AA/C1C2	**65 (26,42)[e]**	37 (26,81)	19 (22,89)	28 (17,83)
AG/C1C2	116 (47,15)	68 (49,28)	39 (46,99)	77 (49,04)
GG/C1C2	65 (26,42)	33 (23,91)	25 (30,12)	52 (33,12)
	N=72 (%)	N=42 (%)	N=25 (%)	N=50 (%)
AA/C2C2	19 (26,39)	11 (26,19)	7 (28,00)	11 (22,00)
AG/C2C2	36 (50,00)	22 (52,38)	12 (48,00)	24 (48,00)
GG/C2C2	17 (23,61)	9 (21,43)	6 (24,00)	15 (30,00)
ERAP1 rs6861666/HLA-C	N=417 (%)	N=234 (%)	N=136 (%)	N=251 (%)
AA/C1+	357 (85,61)	204 (87,18)	115 (84,56)	206 (82,07)
AG/C1+	59 (14,15)	29 (12,39)	21 (15,44)	42 (16,73)
GG/C1+	1 (0,24)	1 (0,43)	0	3 (1,20)
	N=319 (%)	N=179 (%)	N=110 (%)	N=191 (%)
AA/C2+	271 (84,95)	158 (88,27)	89 (80,91)	161 (84,29)
AG/C2+	47 (14,73)	20 (11,17)	21 (19,09)	28 (14,66)
GG/C2+	1 (0,31)	1 (0,56)	0 (0,00)	2 (1,05)
	N=170 (%)	N=97 (%)	N=51 (%)	N=105 (%)
AA/C1C1	147 (86,47)	83 (85,57)	46 (90,20)	82 (78,10)
AG/C1C1	23 (13,53)	14 (14,43)	5 (9,80)	22 (20,95)
GG/C1C1	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,95)
	N=247 (%)	N=137 (%)	N=85 (%)	N=146 (%)
AA/C1C2	210 (85,02)	121 (88,32)	69 (81,18)	124 (84,93)

ERAP/HLA-C mężczyzn	Wszyscy mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
AG/C1C2	36 (14,57)	15 (10,95)	16 (18,82)	20 (13,70)
GG/C1C2	1 (0,40)	1 (0,73)	0	2 (1,37)
	N=72 (%)	N=42 (%)	N=25 (%)	N=45 (%)
AA/C2C2	61 (84,72)	37 (88,10)	20 (80,00)	37 (82,22)
AG/C2C2	11 (15,28)	5 (11,90)	5 (20,00)	8 (17,78)
GG/C2C2	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla możliwych alleli HLA-C lub x9 dla kombinacji z genotypami HLA-C); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* –- brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice.

Wszyscy mężczyźni IVF *vs.* kontrola płodna: $^{d}p/p_{corr.}$=0,046/ns, OR=1,545, 95% CI (0,99-2,44); $^{e}p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=1,652, 95% CI (0,98-2,83);

RIF *vs.* kontrola płodna: $^{a}p/p_{corr.}$=0,023/ns, OR=0,413, 95% CI (0,17-0,91); $^{c}p/p_{corr.}$=0,054/ns, OR=2,247, 95% CI (0,97-5,53);

RIF *vs.* SIVF: $^{b}p/p_{corr.}$=0,010/ns, OR=0,333, 95% CI (0,13-0,81)

Tabela 16S. Częstość kombinacji genotypów *ERAP*, *HLA-C i KIR* u partnerów kobiet poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz partnerów kobiet płodnych.

ERAP/HLA-C/KIR	Mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
ERAP1 rs30187/HLA-C/KIR	N=95 (%)	N=56 (%)	N=31 (%)	N=80 (%)
CC/C1+/AA	50 (52,63)	30 (53,57)	17 (54,84)	38 (47,50)
CT/C1+/AA	31 (32,63)	19 (33,93)	**7 (22,58)[a]**	35 (43,75)
TT/C1+/AA	14 (14,74)	7 (12,50)	7 (22,58)	7 (8,75)
	N=324 (%)	N=180 (%)	N=105 (%)	N=187 (%)
CC/C1+/Bx	162 (50,00)	92 (51,11)	53 (50,48)	82 (43,85)
CT/C1+/Bx	135 (41,67)	73 (40,56)	42 (40,00)	80 (42,78)
TT/C1+/Bx	27 (8,33)	15 (8,33)	10 (9,52)	25 (13,37)
	N=74 (%)	N=44 (%)	N=27 (%)	N=68 (%)
CC/C2+/AA	32 (43,24)	19 (43,18)	12 (44,44)	28 (41,18)
CT/C2+/AA	29 (39,19)	18 (40,91)	9 (33,33)	34 (50,00)
TT/C2+/AA	13 (17,57)	7 (15,91)	6 (22,22)	6 (8,82)
	N=246 (%)	N=136 (%)	N=83 (%)	N=139 (%)
CC/C2+/Bx	125 (50,81)	71 (52,21)	41 (49,40)	60 (43,17)
CT/C2+/Bx	98 (39,84)	53 (38,97)	33 (39,76)	63 (45,32)
TT/C2+/Bx	23 (9,35)	12 (8,82)	9 (10,84)	16 (11,51)
	N=47 (%)	N=29 (%)	N=12 (%)	N=32 (%)
CC/C1C1/AA	30 (63,83)	18 (62,07)	9 (75,00)	17 (53,13)
CT/C1C1/AA	12 (25,53)	8 (27,59)	1 (8,33)	13 (40,63)
TT/C1C1/AA	5 (10,64)	3 (10,34)	2 (16,67)	2 (6,25)
	N=48 (%)	N=27 (%)	N=19 (%)	N=48 (%)
CC/C1C2/AA	20 (41,67)	12 (44,44)	8 (42,11)	21 (43,75)
CT/C1C2/AA	19 (39,58)	11 (40,74)	6 (31,58)	22 (45,83)
TT/C1C2/AA	9 (18,75)	4 (14,81)	5 (26,32)	5 (10,42)

ERAP/HLA-C/KIR	Mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=26 (%)	N=17 (%)	N=8 (%)	N=20 (%)
CC/C2C2/AA	12 (46,15)	7 (41,18)	4 (50,00)	7 (35,00)
CT/C2C2/AA	10 (38,46)	7 (41,18)	3 (37,50)	12 (60,00)
TT/C2C2/AA	4 (15,38)	3 (17,65)	1 (12,50)	1 (5,00)
	N=124 (%)	N=69 (%)	N=39 (%)	N=78 (%)
CC/C1C1/Bx	61 (49,19)	34 (49,28)	19 (48,72)	38 (48,72)
CT/C1C1/Bx	55 (44,35)	30 (43,48)	17 (43,59)	29 (37,18)
TT/C1C1/Bx	8 (6,45)	5 (7,25)	3 (7,69)	11 (14,10)
	N=200 (%)	N=111 (%)	N=66 (%)	N=109 (%)
CC/C1C2/Bx	101 (50,50)	58 (52,25)	34 (51,52)	44 (40,37)
CT/C1C2/Bx	80 (40,00)	43 (38,74)	25 (37,88)	51 (46,79)
TT/C1C2/Bx	19 (9,50)	10 (9,01)	7 (10,61)	14 (12,84)
	N=46 (%)	N=25 (%)	N=17 (%)	N=30 (%)
CC/C2C2/Bx	24 (52,17)	13 (52,00)	7 (41,18)	16 (53,33)
CT/C2C2/Bx	18 (39,13)	10 (40,00)	8 (47,06)	12 (40,00)
TT/C2C2/Bx	4 (8,70)	2 (8,00)	2 (11,76)	2 (6,67)
ERAP1 rs27044/HLA-C/KIR	N=95 (%)	N=56 (%)	N=31 (%)	N=80 (%)
CC/C1+/AA	57 (60,00)	37 (66,07)	17 (54,84)	43 (53,75)
CG/C1+/AA	27 (28,42)	15 (26,79)	7 (22,58)	30 (37,50)
GG/C1+/AA	11 (11,58)	**4 (7,14)[b]**	7 (22,58)	7 (8,75)
	N=324 (%)	N=180 (%)	N=105 (%)	N=187 (%)
CC/C1+/Bx	189 (58,33)	108 (60,00)	58 (55,24)	104 (55,61)
CG/C1+/Bx	118 (36,42)	66 (36,67)	38 (36,19)	64 (34,22)
GG/C1+/Bx	**17 (5,25)[c]**	**6 (3,33)[d]**	9 (8,57)	19 (10,16)
	N=74 (%)	N=44 (%)	N=27 (%)	N=68 (%)
CC/C2+/AA	39 (52,70)	26 (59,09)	12 (44,44)	35 (51,47)
CG/C2+/AA	24 (32,43)	13 (29,55)	9 (33,33)	28 (41,18)
GG/C2+/AA	11 (14,86)	5 (11,36)	6 (22,22)	5 (7,35)
	N=246 (%)	N=136 (%)	N=83 (%)	N=139 (%)
CC/C2+/Bx	146 (59,35)	85 (62,50)	44 (53,01)	80 (57,55)
CG/C2+/Bx	86 (34,96)	45 (33,09)	33 (39,76)	47 (33,81)
GG/C2+/Bx	14 (5,69)	6 (4,41)	6 (7,23)	12 (8,63)
	N=47 (%)	N=29 (%)	N=12 (%)	N=32 (%)
CC/C1C1/AA	33 (70,21)	21 (72,41)	9 (75,00)	17 (53,13)
CG/C1C1/AA	11 (23,40)	7 (24,14)	1 (8,33)	13 (40,63)
GG/C1C1/AA	3 (6,38)	1 (3,45)	2 (16,67)	2 (6,25)
	N=48 (%)	N=27 (%)	N=19 (%)	N=48 (%)
CC/C1C2/AA	24 (50,00)	16 (59,26)	8 (42,11)	26 (54,17)
CG/C1C2/AA	16 (33,33)	8 (29,63)	6 (31,58)	17 (35,42)
GG/C1C2/AA	8 (16,67)	3 (11,11)	5 (26,32)	5 (10,42)
	N=26 (%)	N=17 (%)	N=8 (%)	N=20 (%)
CC/C2C2/AA	15 (57,69)	10 (58,82)	4 (50,00)	9 (45,00)
CG/C2C2/AA	8 (30,77)	5 (29,41)	3 (37,50)	11 (55,00)
GG/C2C2/AA	3 (11,54)	2 (11,76)	1 (12,50)	0 (0,00)
	N=124 (%)	N=69 (%)	N=39 (%)	N=78 (%)
CC/C1C1/Bx	69 (55,65)	38 (55,07)	21 (53,85)	44 (56,41)

ERAP/HLA-C/KIR	Mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CG/C1C1/Bx	49 (39,52)	29 (42,03)	14 (35,90)	26 (33,33)
GG/C1C1/Bx	6 (4,84)	2 (2,90)	4 (10,26)	8 (10,26)
	N=200 (%)	N=111 (%)	N=66 (%)	N=109 (%)
CC/C1C2/Bx	120 (60,00)	70 (63,06)	37 (56,06)	60 (55,05)
CG/C1C2/Bx	69 (34,50)	37 (33,33)	24 (36,36)	38 (34,86)
GG/C1C2/Bx	11 (5,50)	4 (3,60)	5 (7,58)	11 (10,09)
	N=46 (%)	N=25 (%)	N=17 (%)	N=30 (%)
CC/C2C2/Bx	26 (56,52)	15 (60,00)	7 (41,18)	20 (66,67)
CG/C2C2/Bx	17 (36,96)	8 (32,00)	9 (52,94)	9 (30,00)
GG/C2C2/Bx	3 (6,52)	2 (8,00)	1 (5,88)	1 (3,33)
ERAP1 rs26653/HLA-C/KIR	N=95 (%)	N=56 (%)	N=31 (%)	N=80 (%)
GG/C1+/AA	55 (57,89)	31 (55,36)	19 (61,29)	50 (62,50)
CG/C1+/AA	33 (34,74)	23 (41,07)	7 (22,58)	28 (35,00)
CC/C1+/AA	7 (7,37)	**2 (3,57)[e]**	**5 (16,13)[f]**	2 (2,50)
	N=324 (%)	N=180 (%)	N=105 (%)	N=187 (%)
GG/C1+/Bx	180 (55,56)	102 (56,67)	57 (54,29)	90 (48,13)
CG/C1+/Bx	117 (36,11)	60 (33,33)	41 (39,05)	79 (42,25)
CC/C1+/Bx	27 (8,33)	18 (10,00)	7 (6,67)	18 (9,63)
	N=74 (%)	N=44 (%)	N=27 (%)	N=68 (%)
GG/C2+/AA	42 (56,76)	25 (56,82)	16 (59,26)	36 (52,94)
CG/C2+/AA	23 (31,08)	15 (34,09)	6 (22,22)	28 (41,18)
CC/C2+/AA	9 (12,16)	4 (9,09)	5 (18,52)	4 (5,88)
	N=246 (%)	N=136 (%)	N=83 (%)	N=139 (%)
GG/C2+/Bx	133 (54,07)	73 (53,68)	46 (55,42)	70 (50,36)
CG/C2+/Bx	92 (37,40)	48 (35,29)	32 (38,55)	54 (38,85)
CC/C2+/Bx	21 (8,54)	15 (11,03)	5 (6,02)	15 (10,79)
	N=47 (%)	N=29 (%)	N=12 (%)	N=32 (%)
GG/C1C1/AA	26 (55,32)	14 (48,28)	8 (66,67)	23 (71,88)
CG/C1C1/AA	19 (40,43)	14 (48,28)	3 (25,00)	9 (28,13)
CC/C1C1/AA	2 (4,26)	1 (3,45)	1 (8,33)	0 (0,00)
	N=48 (%)	N=27 (%)	N=19 (%)	N=48 (%)
GG/C1C2/AA	29 (60,42)	17 (62,96)	11 (57,89)	27 (56,25)
CG/C1C2/AA	14 (29,17)	9 (33,33)	4 (21,05)	19 (39,58)
CC/C1C2/AA	5 (10,42)	**1 (3,70)[g]**	**4 (21,05)[h]**	2 (4,17)
	N=26 (%)	N=17 (%)	N=8 (%)	N=20 (%)
GG/C2C2/AA	13 (50,00)	8 (47,06)	5 (62,50)	9 (45,00)
CG/C2C2/AA	9 (34,62)	6 (35,29)	2 (25,00)	9 (45,00)
CC/C2C2/AA	4 (15,38)	3 (17,65)	1 (12,50)	2 (10,00)
	N=124 (%)	N=69 (%)	N=39 (%)	N=78 (%)
GG/C1C1/Bx	**75 (60,48)[i]**	**43 (62,32)[j]**	22 (56,41)	34 (43,59)
CG/C1C1/Bx	**39 (31,45)[k]**	**21 (30,43)[l]**	13 (33,33)	37 (47,44)
CC/C1C1/Bx	10 (8,06)	5 (7,25)	4 (10,26)	7 (8,97)
	N=200 (%)	N=111 (%)	N=66 (%)	N=109 (%)
GG/C1C2/Bx	105 (52,50)	59 (53,15)	35 (53,03)	56 (51,38)
CG/C1C2/Bx	78 (39,00)	39 (35,14)	28 (42,42)	42 (38,53)
CC/C1C2/Bx	17 (8,50)	13 (11,71)	3 (4,55)	11 (10,09)

ERAP/HLA-C/KIR	Mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=46 (%)	N=25 (%)	N=17 (%)	N=30 (%)
GG/C2C2/Bx	28 (60,87)	14 (56,00)	11 (64,71)	14 (46,67)
CG/C2C2/Bx	14 (30,43)	9 (36,00)	4 (23,53)	12 (40,00)
CC/C2C2/Bx	4 (8,70)	2 (8,00)	2 (11,76)	4 (13,33)
ERAP1 rs26618/HLA-C/KIR	N=95 (%)	N=56 (%)	N=31 (%)	N=80 (%)
TT/C1+/AA	53 (55,79)	34 (60,71)	16 (51,61)	39 (48,75)
CT/C1+/AA	34 (35,79)	19 (33,93)	11 (35,48)	32 (40,00)
CC/C1+/AA	8 (8,42)	3 (5,36)	4 (12,90)	9 (11,25)
	N=324 (%)	N=180 (%)	N=105 (%)	N=186 (%)
TT/C1+/Bx	162 (50,00)	90 (50,00)	49 (46,67)	101 (54,30)
CT/C1+/Bx	127 (39,20)	72 (40,00)	43 (40,95)	72 (38,71)
CC/C1+/Bx	35 (10,80)	18 (10,00)	13 (12,38)	13 (6,99)
	N=74 (%)	N=44 (%)	N=27 (%)	N=68 (%)
TT/C2+/AA	43 (58,11)	26 (59,09)	15 (55,56)	32 (47,06)
CT/C2+/AA	26 (35,14)	16 (36,36)	9 (33,33)	30 (44,12)
CC/C2+/AA	5 (6,76)	2 (4,55)	3 (11,11)	6 (8,82)
	N=246 (%)	N=136 (%)	N=83 (%)	N=138 (%)
TT/C2+/Bx	126 (51,22)	69 (50,74)	40 (48,19)	79 (57,25)
CT/C2+/Bx	94 (38,21)	53 (38,97)	33 (39,76)	49 (35,51)
CC/C2+/Bx	26 (10,57)	14 (10,29)	10 (12,05)	10 (7,25)
	N=47 (%)	N=29 (%)	N=12 (%)	N=32 (%)
TT/C1C1/AA	21 (44,68)	**17 (58,62)[m]**	2 (16,67)	16 (50,00)
CT/C1C1/AA	21 (44,68)	10 (34,48)	8 (66,67)	11 (34,38)
CC/C1C1/AA	5 (10,64)	2 (6,90)	2 (16,67)	5 (15,63)
	N=48 (%)	N=27 (%)	N=19 (%)	N=48 (%)
TT/C1C2/AA	32 (66,67)	17 (62,96)	14 (73,68)	23 (47,92)
CT/C1C2/AA	13 (27,08)	9 (33,33)	**3 (15,79)[n]**	21 (43,75)
CC/C1C2/AA	3 (6,25)	1 (3,70)	2 (10,53)	4 (8,33)
	N=26 (%)	N=17 (%)	N=8 (%)	N=20 (%)
TT/C2C2/AA	11 (42,31)	**9 (52,94)[o]**	1 (12,50)	9 (45,00)
CT/C2C2/AA	13 (50,00)	7 (41,18)	6 (75,00)	9 (45,00)
CC/C2C2/AA	2 (7,69)	1 (5,88)	1 (12,50)	2 (10,00)
	N=124 (%)	N=69 (%)	N=39 (%)	N=78 (%)
TT/C1C1/Bx	61 (49,19)	32 (46,38)	21 (53,85)	40 (51,28)
CT/C1C1/Bx	50 (40,32)	30 (43,48)	14 (35,90)	33 (42,31)
CC/C1C1/Bx	13 (10,48)	7 (10,14)	4 (10,26)	5 (6,41)
	N=200 (%)	N=111 (%)	N=66 (%)	N=108 (%)
TT/C1C2/Bx	101 (50,50)	**58 (52,25)[p]**	28 (42,42)	61 (56,48)
CT/C1C2/Bx	77 (38,50)	42 (37,84)	29 (43,94)	39 (36,11)
CC/C1C2/Bx	22 (11,00)	11 (9,91)	9 (13,64)	8 (7,41)
	N=46 (%)	N=25 (%)	N=17 (%)	N=30 (%)
TT/C2C2/Bx	25 (54,35)	11 (44,00)	12 (70,59)	18 (60,00)
CT/C2C2/Bx	17 (36,96)	11 (44,00)	4 (23,53)	10 (33,33)
CC/C2C2/Bx	4 (8,70)	3 (12,00)	1 (5,88)	2 (6,67)
ERAP1 rs2287987/HLA-C/KIR	N=95 (%)	N=56 (%)	N=31 (%)	N=80 (%)
TT/C1+/AA	59 (62,11)	34 (60,71)	20 (64,52)	51 (63,75)

ERAP/HLA-C/KIR	Mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CT/C1+/AA	28 (29,47)	17 (30,36)	8 (25,81)	26 (32,50)
CC/C1+/AA	8 (8,42)	5 (8,93)	3 (9,68)	3 (3,75)
	N=323 (%)	N=180 (%)	N=104 (%)	N=186 (%)
TT/C1+/Bx	199 (61,61)	114 (63,33)	64 (61,54)	116 (62,37)
CT/C1+/Bx	107 (33,13)	52 (28,89)	38 (36,54)	63 (33,87)
CC/C1+/Bx	17 (5,26)	**14 (7,78)[q]**	2 (1,92)	7 (3,76)
	N=74 (%)	N=44 (%)	N=27 (%)	N=68 (%)
TT/C2+/AA	48 (64,86)	28 (63,64)	18 (66,67)	42 (61,76)
CT/C2+/AA	21 (28,38)	14 (31,82)	6 (22,22)	26 (38,24)
CC/C2+/AA	5 (6,76)	2 (4,55)	**3 (11,11)[r]**	0 (0,00)
	N=246 (%)	N=136 (%)	N=83 (%)	N=138 (%)
TT/C2+/Bx	158 (64,23)	89 (65,44)	54 (65,06)	86 (62,32)
CT/C2+/Bx	73 (29,67)	37 (27,21)	26 (31,33)	45 (32,61)
CC/C2+/Bx	15 (6,10)	10 (7,35)	3 (3,61)	7 (5,07)
	N=47 (%)	N=29 (%)	N=12 (%)	N=32 (%)
TT/C1C1/AA	29 (61,70)	17 (58,62)	8 (66,67)	21 (65,63)
CT/C1C1/AA	14 (29,79)	8 (27,59)	4 (33,33)	8 (25,00)
CC/C1C1/AA	4 (8,51)	4 (13,79)	0 (0,00)	3 (9,38)
	N=48 (%)	N=27 (%)	N=19 (%)	N=48 (%)
TT/C1C2/AA	30 (62,50)	17 (62,96)	12 (63,16)	30 (62,50)
CT/C1C2/AA	14 (29,17)	9 (33,33)	4 (21,05)	18 (37,50)
CC/C1C2/AA	4 (8,33)	1 (3,70)	**3 (15,79)[s]**	0 (0,00)
	N=26 (%)	N=17 (%)	N=8 (%)	N=20 (%)
TT/C2C2/AA	18 (69,23)	11 (64,71)	6 (75,00)	12 (60,00)
CT/C2C2/AA	7 (26,92)	5 (29,41)	2 (25,00)	8 (40,00)
CC/C2C2/AA	1 (3,85)	1 (5,88)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=123 (%)	N=69 (%)	N=38 (%)	N=78 (%)
TT/C1C1/Bx	69 (56,10)	42 (60,87)	20 (52,63)	48 (61,54)
CT/C1C1/Bx	47 (38,21)	22 (31,88)	17 (44,74)	29 (37,18)
CC/C1C1/Bx	7 (5,69)	5 (7,25)	1 (2,63)	1 (1,28)
	N=200 (%)	N=111 (%)	N=66 (%)	N=108 (%)
TT/C1C2/Bx	130 (65,00)	72 (64,86)	44 (66,67)	68 (62,96)
CT/C1C2/Bx	60 (30,00)	30 (27,03)	21 (31,82)	34 (31,48)
CC/C1C2/Bx	10 (5,00)	**9 (8,11)[t]**	1 (1,52)	6 (5,56)
	N=46 (%)	N=25 (%)	N=17 (%)	N=30 (%)
TT/C2C2/Bx	28 (60,87)	17 (68,00)	10 (58,82)	18 (60,00)
CT/C2C2/Bx	13 (28,26)	7 (28,00)	5 (29,41)	11 (36,67)
CC/C2C2/Bx	5 (10,87)	1 (4,00)	2 (11,76)	1 (3,33)
ERAP2 rs2248374/HLA-C/KIR	N=95 (%)	N=56 (%)	N=31 (%)	N=80 (%)
AA/C1+/AA	23 (24,21)	12 (21,43)	9 (29,03)	21 (26,25)
AG/C1+/AA	48 (50,53)	33 (58,93)	10 (32,26)	40 (50,00)
GG/C1+/AA	24 (25,26)	**11 (19,64)[u]**	12 (38,71)	19 (23,75)
	N=322 (%)	N=180 (%)	N=103 (%)	N=187 (%)
AA/C1+/Bx	**83 (25,78)[w]**	**50 (27,78)[x]**	21 (20,39)	32 (17,11)
AG/C1+/Bx	163 (50,62)	89 (49,44)	54 (52,43)	97 (51,87)
GG/C1+/Bx	76 (23,60)	41 (22,78)	28 (27,18)	58 (31,02)

ERAP/HLA-C/KIR	Mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=74 (%)	N=44 (%)	N=27 (%)	N=68 (%)
AA/C2+/AA	19 (25,68)	11 (25,00)	8 (29,63)	17 (25,00)
AG/C2+/AA	33 (44,59)	22 (50,00)	9 (33,33)	35 (51,47)
GG/C2+/AA	22 (29,73)	11 (25,00)	10 (37,04)	16 (23,53)
	N=244 (%)	N=136 (%)	N=81 (%)	N=139 (%)
AA/C2+/Bx	**65 (26,64)[y]**	**37 (27,21)[z]**	18 (22,22)	22 (15,83)
AG/C2+/Bx	119 (48,77)	68 (50,00)	42 (51,85)	66 (47,48)
GG/C2+/Bx	**60 (24,59)[aa]**	**31 (22,79)[ab]**	21 (25,93)	51 (36,69)
	N=47 (%)	N=29 (%)	N=12 (%)	N=32 (%)
AA/C1C1/AA	13 (27,66)	7 (24,14)	4 (33,33)	9 (28,13)
AG/C1C1/AA	26 (55,32)	18 (62,07)	4 (33,33)	16 (50,00)
GG/C1C1/AA	8 (17,02)	4 (13,79)	4 (33,33)	7 (21,88)
	N=48 (%)	N=27 (%)	N=19 (%)	N=48 (%)
AA/C1C2/AA	10 (20,83)	5 (18,52)	5 (26,32)	12 (25,00)
AG/C1C2/AA	22 (45,83)	15 (55,56)	6 (31,58)	24 (50,00)
GG/C1C2/AA	16 (33,33)	7 (25,93)	8 (42,11)	12 (25,00)
	N=26 (%)	N=17 (%)	N=8 (%)	N=20 (%)
AA/C2C2/AA	9 (34,62)	6 (35,29)	3 (37,50)	5 (25,00)
AG/C2C2/AA	11 (42,31)	7 (41,18)	3 (37,50)	11 (55,00)
GG/C2C2/AA	6 (23,08)	4 (23,53)	2 (25,00)	4 (20,00)
	N=124 (%)	N=69 (%)	N=39 (%)	N=78 (%)
AA/C1C1/Bx	28 (22,58)	18 (26,09)	7 (17,95)	16 (20,51)
AG/C1C1/Bx	69 (55,65)	36 (52,17)	21 (53,85)	44 (56,41)
GG/C1C1/Bx	27 (21,77)	15 (21,74)	11 (28,21)	18 (23,08)
	N=198 (%)	N=111 (%)	N=64 (%)	N=109 (%)
AA/C1C2/Bx	**55 (27,78)[ac]**	**32 (28,83)[ad]**	14 (21,88)	16 (14,68)
AG/C1C2/Bx	94 (47,47)	53 (47,75)	33 (51,56)	53 (48,62)
GG/C1C2/Bx	**49 (24,75)[ae]**	**26 (23,42)[af]**	17 (26,56)	40 (36,70)
	N=46 (%)	N=25 (%)	N=17 (%)	N=30 (%)
AA/C2C2/Bx	10 (21,74)	5 (20,00)	4 (23,53)	6 (20,00)
AG/C2C2/Bx	25 (54,35)	15 (60,00)	9 (52,94)	13 (43,33)
GG/C2C2/Bx	11 (23,91)	5 (20,00)	4 (23,53)	11 (36,67)
ERAP1 rs6861666/HLA-C/KIR	N=95 (%)	N=56 (%)	N=31 (%)	N=77 (%)
AA/C1+/AA	85 (89,47)	52 (92,86)	27 (87,10)	64 (83,12)
AG/C1+/AA	10 (10,53)	4 (7,14)	4 (12,90)	11 (14,29)
GG/C1+/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (2,60)
	N=322 (%)	N=178 (%)	N=105 (%)	N=173 (%)
AA/C1+/Bx	272 (84,47)	152 (85,39)	88 (83,81)	141 (81,50)
AG/C1+/Bx	49 (15,22)	25 (14,04)	17 (16,19)	31 (17,92)
GG/C1+/Bx	1 (0,31)	1 (0,56)	0 (0,00)	1 (0,58)
	N=74 (%)	N=44 (%)	N=27 (%)	N=66 (%)
AA/C2+/AA	64 (86,49)	39 (88,64)	23 (85,19)	55 (83,33)
AG/C2+/AA	10 (13,51)	5 (11,36)	4 (14,81)	10 (15,15)
GG/C2+/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,52)
	N=245 (%)	N=135 (%)	N=83 (%)	N=125 (%)
AA/C2+/Bx	207 (84,49)	119 (88,15)	66 (79,52)	106 (84,80)

ERAP/HLA-C/KIR	Mężczyźni IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
AG/C2+/Bx	37 (15,10)	15 (11,11)	17 (20,48)	18 (14,40)
GG/C2+/Bx	1 (0,41)	1 (0,74)	0 (0,00)	1 (0,80)
	N=47 (%)	N=29 (%)	N=12 (%)	N=30 (%)
AA/C1C1/AA	43 (91,49)	27 (93,10)	11 (91,67)	24 (80,00)
AG/C1C1/AA	4 (8,51)	2 (6,90)	1 (8,33)	5 (16,67)
GG/C1C1/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,33)
	N=48 (%)	N=27 (%)	N=19 (%)	N=47 (%)
AA/C1C2/AA	42 (87,50)	25 (92,59)	16 (84,21)	40 (85,11)
AG/C1C2/AA	6 (12,50)	2 (7,41)	3 (15,79)	6 (12,77)
GG/C1C2/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,13)
	N=26 (%)	N=17 (%)	N=8 (%)	N=19 (%)
AA/C2C2/AA	22 (84,62)	14 (82,35)	7 (87,50)	15 (78,95)
AG/C2C2/AA	4 (15,38)	3 (17,65)	1 (12,50)	4 (21,05)
GG/C2C2/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=123 (%)	N=68 (%)	N=39 (%)	N=74 (%)
AA/C1C1/Bx	104 (84,55)	56 (82,35)	35 (89,74)	57 (77,03)
AG/C1C1/Bx	19 (15,45)	12 (17,65)	4 (10,26)	17 (22,97)
GG/C1C1/Bx	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=199 (%)	N=110 (%)	N=66 (%)	N=99 (%)
AA/C1C2/Bx	168 (84,42)	96 (87,27)	53 (80,30)	84 (84,85)
AG/C1C2/Bx	30 (15,08)	13 (11,82)	13 (19,70)	14 (14,14)
GG/C1C2/Bx	1 (0,50)	1 (0,91)	0 (0,00)	1 (1,01)
	N=46 (%)	N=25 (%)	N=17 (%)	N=26 (%)
AA/C2C2/Bx	39 (84,78)	23 (92,00)	13 (76,47)	22 (84,62)
AG/C2C2/Bx	7 (15,22)	2 (8,00)	4 (23,53)	4 (15,38)
GG/C2C2/Bx	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla kombinacji genotypów ERAP z HLA-C C1+ lub C2+ oraz AA lub Bx; x9 dla kombinacji genotypów ERAP, HLA-C z KIR AA lub Bx); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice.

Mężczyźni IVF *vs.* kontrola płodna: $^{c}p/p_{corr.}$=0,047/ns, OR=0,490, 95% CI (0,23-1,03); $^{i}p/p_{corr.}$=0,021/ns, OR=1,974, 95% CI (1,07-3,67); $^{k}p/p_{corr.}$=0,026/ns, OR=0,510, 95% CI (0,27-0,95); $^{w}p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=1,680, 95% CI (1,05-2,74); $^{y}p/p_{corr.}$=0,016/ns, OR=1,928, 95% CI (1,10-3,47) $^{aa}p/p_{corr.}$=0,014/ns, OR=0,564, 95% CI (0,35-0,91); $^{ac}p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=2,230, 95% CI (1,17-4,43); $^{ae}p/p_{corr.}$=0,035/ns, OR=0,568, 95% CI (0,33-0,97)

RIF *vs.* kontrola płodna: $^{d}p/p_{corr.}$=0,012/ns, OR=0,306, 95% CI (0,10-0,82); $^{j}p/p_{corr.}$=0,031/ns, OR=2,129, 95% CI (1,05-4,38); $^{l}p/p_{corr.}$=0,043/ns, OR=0,487, 95% CI (0,23-1,01); $^{x}p/p_{corr.}$=0,017/ns, OR=1,860, 95% CI (1,10-3,19); $^{z}p/p_{corr.}$=0,027/ns, OR=1,983, 95% CI (1,06-3,78) $^{ab}p/p_{corr.}$=0,013/ns, OR=0,511, 95% CI (0,29-0,89); $^{ad}p/p_{corr.}$=0,014/ns, OR=2,345, 95% CI (1,15-4,94); $^{af}p/p_{corr.}$=0,039/ns, OR=0,529, 95% CI (0,28-0,99)

SIVF *vs.* kontrola płodna: $^{a}p/p_{corr.}$=0,050/ns, OR=0,378, 95% CI (0,12-1,04); $^{f}p/p_{corr.}$=0,018/ns, OR=7,336, 95% CI (1,12-81,22); $^{h}p/p_{corr.}$=0,050/ns, OR=5,933, 95% CI (0,76-71,93); $^{n}p/p_{corr.}$=0,047/ns, OR=0,246, 95% CI (0,04-1,03); $^{r}p/p_{corr.}$=0,021/ns, OR=Inf, 1,082-Inf; $^{s}p/p_{corr}$ =0,02/ns, OR=Inf, 1,11-Inf

RIF *vs.* SIVF: $^{b}p/p_{corr.}$=0,037/ns, OR=0,237, 95% CI (0,05-1,03); $^{e}p/p_{corr.}$=0,031/ns, OR=0,163, 95% CI (0,01-1,07); $^{g}p/p_{corr.}$=0,024/ns, OR=0,089, 95% CI (0,00-0,99); $^{m}p/p_{corr.}$=0,014/ns, OR=8,023, 95% CI (1,32-90,04); $^{o}p/p_{corr.}$=0,020/ns, OR=17,276, 95% CI (1,39-1 039,29); $^{p}p/p_{corr.}$=0,038/ns, OR=2,009, 95% CI (1,02-4,00);

[q]$p/p_{corr.}$=0,034/ns, OR=4,529, 95% CI (1,01-41,92); [t]$p/p_{corr.}$=0,049/ns, OR=6,667, 95% CI (0,89-298,77); [u]$p/p_{corr.}$=0,042/ns, OR=0,353, 95% CI (0,12-1,04)

Tabela 17S. Porównanie częstości kombinacji genów *KIR* kobiety i *HLA-C* partnera wśród par, które poddały się zapłodnieniu pozaustrojowemu oraz par płodnych.

KIR kobiety/HLA partnera	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=209 (%)	N=120 (%)	N=64 (%)	N=146 (%)
AA/C1+	117 (55,98)	67 (55,83)	36 (56,25)	80 (54,79)
AA/C2+	92 (44,02)	53 (44,17)	28 (43,75)	66 (45,21)
	N=138 (%)	N=77 (%)	N=44 (%)	N=94 (%)
AA/C1C1	46 (33,33)	24 (31,17)	16 (36,36)	28 (29,79)
AA/C1C2	71 (51,45)	43 (55,84)	20 (45,45)	52 (55,32)
AA/C2C2	21 (15,22)	10 (12,99)	8 (18,18)	14 (14,89)
	N=530 (%)	N=293 (%)	N=182 (%)	N=336 (%)
Bx/C1+	302 (56,98)	171 (58,36)	98 (53,85)	192 (57,14)
Bx/C2+	228 (43,02)	122 (41,64)	84 (46,15)	144 (42,86)
	N=353 (%)	N=201 (%)	N=117 (%)	N=228 (%)
Bx/C1C1	125 (35,41)	**79 (39,30)[a]**	33 (28,21)	84 (36,84)
Bx/C1C2	177 (50,14)	92 (45,77)	65 (55,56)	108 (47,37)
Bx/C2C2	51 (14,45)	30 (14,93)	19 (16,24)	36 (15,79)
	N=291 (%)	N=167 (%)	N=89 (%)	N=220 (%)
CenAA/C1+	163 (56,01)	93 (55,69)	50 (56,18)	124 (56,36)
CenAA/C2+	128 (43,99)	74 (44,31)	39 (43,82)	96 (43,64)
	N=195 (%)	N=110 (%)	N=61 (%)	N=143 (%)
CenAA/C1C1	67 (34,36)	36 (32,73)	22 (36,07)	47 (32,87)
CenAA/C1C2	96 (49,23)	57 (51,82)	28 (45,90)	77 (53,85)
CenAA/C2C2	32 (16,41)	17 (15,45)	11 (18,03)	19 (13,29)
	N=365 (%)	N=202 (%)	N=129 (%)	N=196 (%)
CenAB/C1+	209 (57,26)	119 (58,91)	69 (53,49)	109 (55,61)
CenAB/C2+	156 (42,74)	83 (41,09)	60 (46,51)	87 (44,39)
	N=241 (%)	N=138 (%)	N=82 (%)	N=137 (%)
CenAB/C1C1	85 (35,27)	55 (39,86)	22 (26,83)	50 (36,50)
CenAB/C1C2	124 (51,45)	64 (46,38)	**47 (57,32)[b]**	59 (43,07)
CenAB/C2C2	32 (13,28)	19 (13,77)	13 (15,85)	28 (20,44)
	N=83 (%)	N=44 (%)	N=28 (%)	N=66 (%)
CenBB/C1+	47 (56,63)	26 (59,09)	15 (53,57)	39 (59,09)
CenBB/C2+	36 (43,37)	18 (40,91)	13 (46,43)	27 (40,91)
	N=55 (%)	N=30 (%)	N=18 (%)	N=42 (%)
CenBB/C1C1	19 (34,55)	12 (40,00)	5 (27,78)	15 (35,71)
CenBB/C1C2	28 (50,91)	14 (46,67)	10 (55,56)	24 (57,14)
CenBB/C2C2	8 (14,55)	4 (13,33)	3 (16,67)	3 (7,14)
	N=436 (%)	N=255 (%)	N=133 (%)	N=266 (%)
TelAA/C1+	247 (56,65)	146 (57,25)	73 (54,89)	144 (54,14)
TelAA/C2+	189 (43,35)	109 (42,75)	60 (45,11)	122 (45,86)
	N=285 (%)	N=163 (%)	N=90 (%)	N=175 (%)
TelAA/C1C1	96 (33,68)	54 (33,13)	30 (33,33)	53 (30,29)
TelAA/C1C2	151 (52,98)	92 (56,44)	43 (47,78)	91 (52,00)

KIR kobiety/HLA partnera	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
TelAA/C2C2	38 (13,33)	17 (10,43)	17 (18,89)	31 (17,71)
	N=253 (%)	N=138 (%)	N=91 (%)	N=185 (%)
TelAB/C1+	143 (56,52)	78 (56,52)	50 (54,95)	111 (60,00)
TelAB/C2+	110 (43,48)	60 (43,48)	41 (45,05)	74 (40,00)
	N=173 (%)	N=99 (%)	N=58 (%)	N=129 (%)
TelAB/C1C1	63 (36,42)	39 (39,39)	17 (29,31)	55 (42,64)
TelAB/C1C2	80 (46,24)	**39 (39,39)[c]**	33 (56,90)	56 (43,41)
TelAB/C2C2	30 (17,34)	21 (21,21)	8 (13,79)	18 (13,95)
	N=50 (%)	N=20 (%)	N=22 (%)	N=29 (%)
TelBB/C1+	29 (58,00)	14 (70,00)	11 (50,00)	16 (55,17)
TelBB/C2+	21 (42,00)	6 (30,00)	11 (50,00)	13 (44,83)
	N=33 (%)	N=16 (%)	N=13 (%)	N=17 (%)
TelBB/C1C1	12 (36,36)	**10 (62,50)[d,e]**	2 (15,38)	4 (23,53)
TelBB/C1C2	17 (51,52)	**4 (25,00)[f,g]**	9 (69,23)	12 (70,59)
TelBB/C2C2	4 (12,12)	2 (12,50)	2 (15,38)	1 (5,88)
	N=207 (%)	N=120 (%)	N=62 (%)	N=146 (%)
CenAA/TelAA/C1+	116 (56,04)	67 (55,83)	35 (56,45)	80 (54,79)
CenAA/TelAA/C2+	91 (43,96)	53 (44,17)	27 (43,55)	66 (45,21)
	N=137 (%)	N=77 (%)	N=43 (%)	N=94 (%)
CenAA/TelAA/C1C1	46 (33,58)	24 (31,17)	16 (37,21)	28 (29,79)
CenAA/TelAA/C1C2	70 (51,09)	43 (55,84)	19 (44,19)	52 (55,32)
CenAA/TelAA/C2C2	21 (15,33)	10 (12,99)	8 (18,60)	14 (14,89)
	N=76 (%)	N=44 (%)	N=22 (%)	N=66 (%)
CenAA/TelAB/C1+	43 (56,58)	24 (54,55)	13 (59,09)	40 (60,61)
CenAA/TelAB/C2+	33 (43,42)	20 (45,45)	9 (40,91)	26 (39,39)
	N=53 (%)	N=31 (%)	N=15 (%)	N=45 (%)
CenAA/TelAB/C1C1	20 (37,74)	11 (35,48)	6 (40,00)	19 (42,22)
CenAA/TelAB/C1C2	23 (43,40)	13 (41,94)	7 (46,67)	21 (46,67)
CenAA/TelAB/C2C2	10 (18,87)	7 (22,58)	2 (13,33)	5 (11,11)
	N=8 (%)	N=3 (%)	N=5 (%)	N=6 (%)
CenAA/TelBB/C1+	4 (50,00)	2 (66,67)	2 (40,00)	3 (50,00)
CenAA/TelBB/C2+	4 (50,00)	1 (33,33)	3 (60,00)	3 (50,00)
	N=5 (%)	N=2 (%)	N=3 (%)	N=3 (%)
CenAA/TelBB/C1C1	1 (20,00)	1 (50,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
CenAA/TelBB/C1C2	3 (60,00)	1 (50,00)	2 (66,67)	3 (100,00)
CenAA/TelBB/C2C2	1 (20,00)	0 (0,00)	1 (33,33)	0 (0,00)
	N=193 (%)	N=112 (%)	N=65 (%)	N=98 (%)
CenAB/TelAA/C1+	110 (56,99)	64 (57,14)	35 (53,85)	50 (51,02)
CenAB/TelAA/C2+	83 (43,01)	48 (42,86)	30 (46,15)	48 (48,98)
	N=124 (%)	N=71 (%)	N=42 (%)	N=66 (%)
CenAB/TelAA/C1C1	41 (33,06)	23 (32,39)	12 (28,57)	18 (27,27)
CenAB/TelAA/C1C2	69 (55,65)	41 (57,75)	23 (54,76)	32 (48,48)
CenAB/TelAA/C2C2	**14 (11,29)[h]**	**7 (9,86)[i]**	7 (16,67)	16 (24,24)
	N=145 (%)	N=78 (%)	N=57 (%)	N=87 (%)
CenAB/TelAB/C1+	84 (57,93)	47 (60,26)	31 (54,39)	52 (59,77)
CenAB/TelAB/C2+	61 (42,07)	31 (39,74)	26 (45,61)	35 (40,23)
	N=100 (%)	N=58 (%)	N=36 (%)	N=64 (%)

KIR kobiety/HLA partnera	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CenAB/TelAB/C1C1	39 (39,00)	27 (46,55)	10 (27,78)	29 (45,31)
CenAB/TelAB/C1C2	45 (45,00)	**20 (34,48)[j]**	**21 (58,33)[k]**	23 (35,94)
CenAB/TelAB/C2C2	16 (16,00)	11 (18,97)	5 (13,89)	12 (18,75)
	N=27 (%)	N=12 (%)	N=7 (%)	N=11 (%)
CenAB/TelBB/C1+	15 (55,56)	8 (66,67)	3 (42,86)	7 (63,64)
CenAB/TelBB/C2+	12 (44,44)	4 (33,33)	4 (57,14)	4 (36,36)
	N=17 (%)	N=9 (%)	N=4 (%)	N=7 (%)
CenAB/TelBB/C1C1	5 (29,41)	5 (55,56)	0 (0,00)	3 (42,86)
CenAB/TelBB/C1C2	10 (58,82)	3 (33,33)	3 (75,00)	4 (57,14)
CenAB/TelBB/C2C2	2 (11,76)	1 (11,11)	1 (25,00)	0 (0,00)
	N=36 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=22 (%)
CenBB/TelAA/C1+	21 (58,33)	15 (65,22)	3 (50,00)	14 (63,64)
CenBB/TelAA/C2+	15 (41,67)	8 (34,78)	3 (50,00)	8 (36,36)
	N=24 (%)	N=15 (%)	N=5 (%)	N=15 (%)
CenBB/TelAA/C1C1	9 (37,50)	7 (46,67)	2 (40,00)	7 (46,67)
CenBB/TelAA/C1C2	12 (50,00)	8 (53,33)	1 (20,00)	7 (46,67)
CenBB/TelAA/C2C2	3 (12,50)	**0 (0,00)[l]**	2 (40,00)	1 (6,67)
	N=32 (%)	N=16 (%)	N=12 (%)	N=32 (%)
CenBB/TelAB/C1+	16 (50,00)	7 (43,75)	6 (50,00)	19 (59,38)
CenBB/TelAB/C2+	16 (50,00)	9 (56,25)	6 (50,00)	13 (40,62)
	N=20 (%)	N=10 (%)	N=7 (%)	N=20 (%)
CenBB/TelAB/C1C1	4 (20,00)	1 (10,00)	1 (14,29)	7 (35,00)
CenBB/TelAB/C1C2	12 (60,00)	6 (60,00)	5 (71,43)	12 (60,00)
CenBB/TelAB/C2C2	4 (20,00)	3 (30,00)	1 (14,29)	1 (5,00)
	N=15 (%)	N=5 (%)	N=10 (%)	N=12 (%)
CenBB/TelBB/C1+	10 (66,67)	4 (80,00)	6 (60,00)	6 (50,00)
CenBB/TelBB/C2+	5 (33,33)	1 (20,00)	4 (40,00)	6 (50,00)
	N=11 (%)	N=5 (%)	N=6 (%)	N=7 (%)
CenBB/TelBB/C1C1	6 (54,55)	4 (80,00)	2 (33,33)	1 (14,29)
CenBB/TelBB/C1C2	4 (36,36)	**0 (0,00)[m]**	4 (66,67)	5 (71,43)
CenBB/TelBB/C2C2	1 (9,09)	1 (20,00)	0 (0,00)	1 (14,29)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x3 dla możliwych kombinacji HLA-C); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice. Wartości w nawiasach oznaczają procent liczebości.

RIF *vs.* SIVF: [a]$p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=1,646, 95% CI (0,98-2,79), [c]$p/p_{corr.}$=0,046/ns, OR=0,495, 95% CI (0,24-1,00); [e]$p/p_{corr.}$=0,022/ns, OR=8,412, 95% CI (1,21-104,09); [g]$p/p_{corr.}$=0,027/ns, OR=0,160, 95% CI (0,02-0,96); [j]$p/p_{corr.}$=0,032/ns, OR=0,380, 95% CI (0,15-0,96); [l]$p/p_{corr.}$=0,053/ns, OR=0,000, 95% CI (0,00-1,60)

SIVF *vs.* kontrola płodna: [b]$p/p_{corr.}$=0,051/ns, OR=1,771, 95% CI (0,98-3,21); [k]$p/p_{corr.}$=0,037/ns, OR=2,472, 95% CI (1,00-6,28);

RIF *vs.* kontrola płodna: [d]$p/p_{corr.}$=0,037/ns, OR=5,115, 95% CI (0,98-32,72); [f]$p/p_{corr.}$=0,015/ns, OR=0,149, 95% CI (0,02-0,80); [i]$p/p_{corr.}$=0,038/ns, OR=0,344, 95% CI (0,11-0,97); [m]$p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=0,000, 95% CI (0,00-1,03);

IVF *vs.* kontrola płodna: [h]$p/p_{corr.}$=0,035/ns, OR=0,400, 95% CI (0,17-0,95)

Tabela 18S. Częstość kombinacji genotypów *ERAP* kobiety oraz *HLA-C* partnera u par poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz par płodnych.

ERAP kobiety/HLA-C partnera	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
ERAP1 rs30187/HLA-C	N=419 (%)	N=238 (%)	N=134 (%)	N=272 (%)
CC/C1+	181 (43,20)	96 (40,34)	59 (44,03)	128 (47,06)
CT/C1+	188 (44,87)	111 (46,64)	59 (44,03)	122 (44,85)
TT/C1+	50 (11,93)	31 (13,03)	16 (11,94)	22 (8,09)
	N=320 (%)	N=175 (%)	N=112 (%)	N=210 (%)
CC/C2+	141 (44,06)	77 (44,00)	45 (40,18)	106 (50,48)
CT/C2+	137 (42,81)	74 (42,29)	53 (47,32)	89 (42,38)
TT/C2+	**42 (13,12)[a]**	**24 (13,71)[b]**	14 (12,50)	15 (7,14)
	N=171 (%)	N=103 (%)	N=49 (%)	N=112 (%)
CC/C1C1	79 (46,20)	**40 (38,83)[c]**	**30 (61,22)[d]**	46 (41,07)
CT/C1C1	78 (45,61)	52 (50,49)	17 (34,69)	53 (47,32)
TT/C1C1	14 (8,19)	11 (10,68)	2 (4,08)	13 (11,61)
	N=248 (%)	N=135 (%)	N=85 (%)	N=160 (%)
CC/C1C2	**102 (41,13)[e]**	56 (41,48)	**29 (34,12)[f]**	82 (51,25)
CT/C1C2	110 (44,35)	59 (43,70)	42 (49,41)	69 (43,12)
TT/C1C2	**36 (14,52)[g]**	**20 (14,81)[h]**	**14 (16,47)[i]**	9 (5,62)
	N=72 (%)	N=40 (%)	N=27 (%)	N=50 (%)
CC/C2C2	39 (54,17)	21 (52,50)	16 (59,26)	24 (48,00)
CT/C2C2	27 (37,50)	15 (37,50)	11 (40,74)	20 (40,00)
TT/C2C2	6 (8,33)	4 (10,00)	0 (0,00)	6 (12,00)
ERAP1 rs27044/HLA-C	N=419 (%)	N=238 (%)	N=134 (%)	N=272 (%)
CC/C1+	221 (52,74)	**117 (49,16)[j]**	72 (53,73)	159 (58,46)
CG/C1+	166 (39,62)	101 (42,44)	52 (38,81)	95 (34,93)
GG/C1+	32 (7,64)	20 (8,40)	10 (7,46)	18 (6,62)
	N=320 (%)	N=175 (%)	N=112 (%)	N=210 (%)
CC/C2+	**164 (51,25)[k]**	**89 (50,86)[l]**	**52 (46,43)[m]**	130 (61,90)
CG/C2+	**129 (40,31)[n]**	71 (40,57)	**51 (45,54)[o]**	66 (31,43)
GG/C2+	27 (8,44)	15 (8,57)	9 (8,04)	14 (6,67)
	N=171 (%)	N=103 (%)	N=49 (%)	N=112 (%)
CC/C1C1	98 (57,31)	**50 (48,54)[p]**	**36 (73,47)[q]**	59 (52,68)
CG/C1C1	65 (38,01)	**46 (44,66)[r]**	12 (24,49)	44 (39,29)
GG/C1C1	8 (4,68)	7 (6,80)	1 (2,04)	9 (8,04)
	N=248 (%)	N=135 (%)	N=85 (%)	N=160 (%)
CC/C1C2	**123 (49,60)[s]**	**67 (49,63)[t]**	**36 (42,35)[u]**	100 (62,50)
CG/C1C2	101 (40,73)	55 (40,74)	**40 (47,06)[w]**	51 (31,88)
GG/C1C2	24 (9,68)	13 (9,63)	9 (10,59)	9 (5,62)
	N=72 (%)	N=40 (%)	N=27 (%)	N=50 (%)
CC/C2C2	41 (56,94)	22 (55,00)	16 (59,26)	30 (60,00)
CG/C2C2	28 (38,89)	16 (40,00)	11 (40,74)	15 (30,00)
GG/C2C2	3 (4,17)	2 (5,00)	0 (0,00)	5 (10,00)
ERAP1 rs26653/HLA-C	N=419 (%)	N=238 (%)	N=134 (%)	N=269 (%)
GG/C1+	230 (54,89)	128 (53,78)	73 (54,48)	148 (55,02)
CG/C1+	169 (40,33)	99 (41,60)	56 (41,79)	106 (39,41)
CC/C1+	20 (4,77)	11 (4,62)	5 (3,73)	15 (5,58)

ERAP kobiety/HLA-C partnera	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=320 (%)	N=175 (%)	N=112 (%)	N=208 (%)
GG/C2+	175 (54,69)	95 (54,29)	59 (52,68)	121 (58,17)
CG/C2+	128 (40,00)	71 (40,57)	49 (43,75)	78 (37,50)
CC/C2+	17 (5,31)	9 (5,14)	4 (3,57)	9 (4,33)
	N=171 (%)	N=103 (%)	N=49 (%)	N=111 (%)
GG/C1C1	92 (53,80)	51 (49,51)	30 (61,22)	58 (52,25)
CG/C1C1	71 (41,52)	47 (45,63)	17 (34,69)	45 (40,54)
CC/C1C1	8 (4,68)	5 (4,85)	2 (4,08)	8 (7,21)
	N=248 (%)	N=135 (%)	N=85 (%)	N=158 (%)
GG/C1C2	138 (55,65)	77 (57,04)	43 (50,59)	90 (56,96)
CG/C1C2	98 (39,52)	52 (38,52)	39 (45,88)	61 (38,61)
CC/C1C2	12 (4,84)	6 (4,44)	3 (3,53)	7 (4,43)
	N=72 (%)	N=40 (%)	N=27 (%)	N=50 (%)
GG/C2C2	37 (51,39)	18 (45,00)	16 (59,26)	31 (62,00)
CG/C2C2	30 (41,67)	19 (47,50)	10 (37,04)	17 (34,00)
CC/C2C2	5 (6,94)	3 (7,50)	1 (3,70)	2 (4,00)
ERAP1 rs26618/HLA-C	N=419 (%)	N=238 (%)	N=134 (%)	N=272 (%)
TT/C1+	221 (52,74)	132 (55,46)	68 (50,75)	129 (47,43)
CT/C1+	166 (39,62)	89 (37,39)	55 (41,04)	120 (44,12)
CC/C1+	32 (7,64)	17 (7,14)	11 (8,21)	23 (8,46)
	N=320 (%)	N=175 (%)	N=112 (%)	N=210 (%)
TT/C2+	171 (53,44)	97 (55,43)	60 (53,57)	101 (48,10)
CT/C2+	124 (38,75)	66 (37,71)	42 (37,50)	90 (42,86)
CC/C2+	25 (7,81)	12 (6,86)	10 (8,93)	19 (9,05)
	N=171 (%)	N=103 (%)	N=49 (%)	N=112 (%)
TT/C1C1	93 (54,39)	62 (60,19)	21 (42,86)	54 (48,21)
CT/C1C1	64 (37,43)	33 (32,04)	23 (46,94)	50 (44,64)
CC/C1C1	14 (8,19)	8 (7,77)	5 (10,20)	8 (7,14)
	N=248 (%)	N=135 (%)	N=85 (%)	N=160 (%)
TT/C1C2	128 (51,61)	70 (51,85)	47 (55,29)	75 (46,88)
CT/C1C2	102 (41,13)	56 (41,48)	32 (37,65)	70 (43,75)
CC/C1C2	18 (7,26)	9 (6,67)	6 (7,06)	15 (9,38)
	N=72 (%)	N=40 (%)	N=27 (%)	N=50 (%)
TT/C2C2	43 (59,72)	27 (67,50)	13 (48,15)	26 (52,00)
CT/C2C2	22 (30,56)	10 (25,00)	10 (37,04)	20 (40,00)
CC/C2C2	7 (9,72)	3 (7,50)	4 (14,81)	4 (8,00)
ERAP1 rs2287987/HLA-C	N=419 (%)	N=238 (%)	N=134 (%)	N=272 (%)
TT/C1+	258 (61,58)	146 (61,34)	87 (64,93)	169 (62,13)
CT/C1+	142 (33,89)	81 (34,03)	41 (30,60)	96 (35,29)
CC/C1+	19 (4,53)	11 (4,62)	6 (4,48)	7 (2,57)
	N=320 (%)	N=175 (%)	N=112 (%)	N=210 (%)
TT/C2+	205 (64,06)	111 (63,43)	74 (66,07)	122 (58,10)
CT/C2+	98 (30,62)[x]	55 (31,43)	32 (28,57)	82 (39,05)
CC/C2+	17 (5,31)	9 (5,14)	6 (5,36)	6 (2,86)
	N=171 (%)	N=103 (%)	N=49 (%)	N=112 (%)
TT/C1C1	99 (57,89)	61 (59,22)	29 (59,18)	76 (67,86)
CT/C1C1	65 (38,01)	37 (35,92)	18 (36,73)	34 (30,36)

ERAP kobiety/HLA-C partnera	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CC/C1C1	7 (4,09)	5 (4,85)	2 (4,08)	2 (1,79)
	N=248 (%)	N=135 (%)	N=85 (%)	N=160 (%)
TT/C1C2	159 (64,11)	85 (62,96)	58 (68,24)	93 (58,12)
CT/C1C2	77 (31,05)	44 (32,59)	23 (27,06)	62 (38,75)
CC/C1C2	12 (4,84)	6 (4,44)	4 (4,71)	5 (3,12)
	N=72 (%)	N=40 (%)	N=27 (%)	N=50 (%)
TT/C2C2	46 (63,89)	26 (65,00)	16 (59,26)	29 (58,00)
CT/C2C2	21 (29,17)	11 (27,50)	9 (33,33)	20 (40,00)
CC/C2C2	5 (6,94)	3 (7,50)	2 (7,41)	1 (2,00)
ERAP2 rs2248374/HLA-C	N=418 (%)	N=237 (%)	N=134 (%)	N=269 (%)
AA/C1+	108 (25,84)	58 (24,47)	40 (29,85)	72 (26,77)
AG/C1+	204 (48,80)	114 (48,10)	64 (47,76)	133 (49,44)
GG/C1+	106 (25,36)	65 (27,43)	30 (22,39)	64 (23,79)
	N=319 (%)	N=174 (%)	N=112 (%)	N=208 (%)
AA/C2+	79 (24,76)	41 (23,56)	33 (29,46)	54 (25,96)
AG/C2+	150 (47,02)	81 (46,55)	50 (44,64)	100 (48,08)
GG/C2+	90 (28,21)	52 (29,89)	29 (25,89)	54 (25,96)
	N=171 (%)	N=103 (%)	N=49 (%)	N=111 (%)
AA/C1C1	47 (27,49)	26 (25,24)	15 (30,61)	32 (28,83)
AG/C1C1	85 (49,71)	51 (49,51)	26 (53,06)	54 (48,65)
GG/C1C1	39 (22,81)	26 (25,24)	8 (16,33)	25 (22,52)
	N=247 (%)	N=134 (%)	N=85 (%)	N=158 (%)
AA/C1C2	61 (24,70)	32 (23,88)	25 (29,41)	40 (25,32)
AG/C1C2	119 (48,18)	63 (47,01)	38 (44,71)	79 (50,00)
GG/C1C2	67 (27,13)	39 (29,10)	22 (25,88)	39 (24,68)
	N=72 (%)	N=40 (%)	N=27 (%)	N=50 (%)
AA/C2C2	18 (25,00)	9 (22,50)	8 (29,63)	14 (28,00)
AG/C2C2	31 (43,06)	18 (45,00)	12 (44,44)	21 (42,00)
GG/C2C2	23 (31,94)	13 (32,50)	7 (25,93)	15 (30,00)
ERAP1 rs6861666/HLA-C	N=418 (%)	N=237 (%)	N=134 (%)	N=267 (%)
AA/C1+	361 (86,36)	202 (85,23)	115 (85,82)	229 (85,77)
AG/C1+	55 (13,16)	34 (14,35)	18 (13,43)	38 (14,23)
GG/C1+	2 (0,48)	1 (0,42)	1 (0,75)	0 (0,00)
	N=319 (%)	N=174 (%)	N=112 (%)	N=207 (%)
AA/C2+	272 (85,27)	149 (85,63)	94 (83,93)	174 (84,06)
AG/C2+	46 (14,42)	25 (14,37)	17 (15,18)	32 (15,46)
GG/C2+	1 (0,31)	0 (0,00)	1 (0,89)	1 (0,48)
	N=171 (%)	N=103 (%)	N=49 (%)	N=110 (%)
AA/C1C1	148 (86,55)	85 (82,52)	44 (89,80)	94 (85,45)
AG/C1C1	22 (12,87)	17 (16,50)	5 (10,20)	16 (14,55)
GG/C1C1	1 (0,58)	1 (0,97)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=247 (%)	N=134 (%)	N=85 (%)	N=157 (%)
AA/C1C2	213 (86,23)	117 (87,31)	71 (83,53)	135 (85,99)
AG/C1C2	33 (13,36)	17 (12,69)	13 (15,29)	22 (14,01)
GG/C1C2	1 (0,40)	0 (0,00)	1 (1,18)	0 (0,00)
	N=72 (%)	N=40 (%)	N=27 (%)	N=50 (%)
AA/C2C2	59 (81,94)	32 (80,00)	23 (85,19)	39 (78,00)

ERAP kobiety/HLA-C partnera	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
AG/C2C2	13 (18,06)	8 (20,00)	4 (14,81)	10 (20,00)
GG/C2C2	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,00)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla możliwych alleli HLA-C lub x9 dla kombinacji z genotypami HLA-C); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice.

IVF *vs.* kontrola płodna: $^{a}p/p_{corr.}$=0,032/ns, OR=1,962, 95% CI (1,03-3,92); $^{e}p/p_{corr.}$=0,053/ns, OR=0,665, 95% CI (0,44-1,01); $^{g}p/p_{corr.}$=0,006/0,050, OR=2,843, 95% CI (1,3-6,92); $^{k}p/p_{corr.}$=0,016/ns, OR=0,647, 95% CI (0,45-0,94); $^{n}p/p_{corr.}$=0,043/ns, OR=1,472, 95% CI (1,01-2,17); $^{s}p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=0,591, 95% CI (0,39-0,9); $^{x}p/p_{corr.}$=0,049/ns, OR=0,690, 95% CI (0,47-1,01);

RIF *vs.* kontrola płodna: $^{b}p/p_{corr.}$=0,041/ns, OR=2,062, 95% CI (1-4,39); $^{h}p/p_{corr.}$=0,010/ns, OR=2,907, 95% CI (1,21-7,54); $^{j}p/p_{corr.}$=0,041/ns, OR=0,688, 95% CI (0,48-0,99); $^{l}p/p_{corr.}$=0,031/ns, OR=0,638, 95% CI (0,42-0,98); $^{t}p/p_{corr.}$=0,034/ns, OR=0,592, 95% CI (0,36-0,97);

RIF *vs.* SIVF: $^{c}p/p_{corr.}$=0,014/ns, OR=0,405, 95% CI (0,19-0,85); $^{p}p/p_{corr.}$=0,005/0,044, OR=0,343, 95% CI (0,15-0,75); $^{r}p/p_{corr.}$=0,020/ns, OR=2,474, 95% CI (1,11-5,83);

SIVF *vs.* kontrola płodna: $^{d}p/p_{corr.}$=0,025/ns, OR=2,254, 95% CI (1,08-4,79); $^{f}p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=0,494, 95% CI (0,27-0,88); $^{i}p/p_{corr.}$=0,010/ns, OR=3,290, 95% CI (1,26-9,06); $^{m}p/p_{corr.}$=0,009/ns, OR=0,534, 95% CI (0,33-0,87); $^{o}p/p_{corr.}$=0,015/ns, OR=1,821, 95% CI (1,1-3); $^{q}p/p_{corr.}$=0,015/ns, OR=2,474, 95% CI (1,14-5,65); $^{u}p/p_{corr.}$=0,003/0,027, OR=0,442, 95% CI (0,25-0,78); $^{w}p/p_{corr.}$=0,026/ns, OR=1,895, 95% CI (1,07-3,38)

Tabela 19S. Częstość kombinacji genotypów *ERAP* i *KIR* kobiet z *HLA-C* ich partnerów wśród par poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz par kontrolnych.

ERAP kobiety/HLA-C partnera/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
ERAP1 rs30187/HLA-C/KIR	N=115 (%)	N=70 (%)	N=30 (%)	N=80 (%)
CC/C1+/AA	46 (40,00)	27 (38,57)	14 (46,67)	36 (45,00)
CT/C1+/AA	49 (42,61)	28 (40,00)	14 (46,67)	35 (43,75)
TT/C1+/AA	20 (17,39)	15 (21,43)	2 (6,67)	9 (11,25)
	N=304 (%)	N=166 (%)	N=106 (%)	N=192 (%)
CC/C1+/Bx	136 (44,74)	66 (39,76)	50 (47,17)	92 (47,92)
CT/C1+/Bx	139 (45,72)	85 (51,20)	43 (40,57)	87 (45,31)
TT/C1+/Bx	29 (9,54)	15 (9,04)	13 (12,26)	13 (6,77)
	N=103 (%)	N=54 (%)	N=38 (%)	N=66 (%)
CC/C2+/AA	38 (36,89)	19 (35,19)	16 (42,11)	33 (50,00)
CT/C2+/AA	50 (48,54)	24 (44,44)	20 (52,63)	26 (39,39)
TT/C2+/AA	15 (14,56)	11 (20,37)	2 (5,26)	7 (10,61)
	N=217 (%)	N=126 (%)	N=72 (%)	N=144 (%)
CC/C2+/Bx	103 (47,47)	55 (43,65)	37 (51,39)	73 (50,69)
CT/C2+/Bx	89 (41,01)	56 (44,44)	27 (37,50)	63 (43,75)
TT/C2+/Bx	25 (11,52)	15 (11,90)	8 (11,11)	8 (5,56)
	N=35 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=28 (%)
CC/C1C1/AA	16 (45,71)	10 (43,48)	3 (50,00)	11 (39,29)
CT/C1C1/AA	13 (37,14)	9 (39,13)	2 (33,33)	12 (42,86)
TT/C1C1/AA	6 (17,14)	4 (17,39)	1 (16,67)	5 (17,86)
	N=80 (%)	N=47 (%)	N=24 (%)	N=52 (%)
CC/C1C2/AA	30 (37,50)	17 (36,17)	11 (45,83)	25 (48,08)
CT/C1C2/AA	36 (45,00)	19 (40,43)	12 (50,00)	23 (44,23)
TT/C1C2/AA	14 (17,50)	**11 (23,40)[a,b]**	1 (4,17)	4 (7,69)
	N=23 (%)	N=7 (%)	N=14 (%)	N=14 (%)
CC/C2C2/AA	8 (34,78)	2 (28,57)	5 (35,71)	8 (57,14)
CT/C2C2/AA	**14 (60,87)[c]**	5 (71,43)	8 (57,14)	3 (21,43)
TT/C2C2/AA	1 (4,35)	0 (0,00)	1 (7,14)	3 (21,43)
	N=136 (%)	N=75 (%)	N=45 (%)	N=84 (%)
CC/C1C1/Bx	63 (46,32)	33 (44,00)	19 (42,22)	35 (41,67)
CT/C1C1/Bx	63 (46,32)	37 (49,33)	21 (46,67)	41 (48,81)
TT/C1C1/Bx	10 (7,35)	5 (6,67)	5 (11,11)	8 (9,52)
	N=168 (%)	N=91 (%)	N=61 (%)	N=108 (%)
CC/C1C2/Bx	73 (43,45)	**33 (36,26)[d]**	31 (50,82)	57 (52,78)
CT/C1C2/Bx	76 (45,24)	**48 (52,75)[e]**	22 (36,07)	46 (42,59)
TT/C1C2/Bx	19 (11,31)	10 (10,99)	8 (13,11)	5 (4,63)
	N=49 (%)	N=35 (%)	N=11 (%)	N=36 (%)
CC/C2C2/Bx	30 (61,22)	22 (62,86)	6 (54,55)	16 (44,44)
CT/C2C2/Bx	13 (26,53)	**8 (22,86)[f]**	5 (45,45)	17 (47,22)
TT/C2C2/Bx	6 (12,24)	5 (14,29)	0 (0,00)	3 (8,33)
ERAP1 rs27044/HLA-C/KIR	N=115 (%)	N=70 (%)	N=30 (%)	N=80 (%)
CC/C1+/AA	57 (49,57)	35 (50,00)	16 (53,33)	45 (56,25)
CG/C1+/AA	43 (37,39)	24 (34,29)	13 (43,33)	27 (33,75)

ERAP kobiety/HLA-C partnera/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
GG/C1+/AA	15 (13,04)	11 (15,71)	1 (3,33)	8 (10,00)
	N=304 (%)	N=166 (%)	N=106 (%)	N=192 (%)
CC/C1+/Bx	162 (53,29)	**79 (47,59)[g]**	58 (54,72)	114 (59,38)
CG/C1+/Bx	126 (41,45)	**80 (48,19)[h]**	39 (36,79)	68 (35,42)
GG/C1+/Bx	16 (5,26)	7 (4,22)	9 (8,49)	10 (5,21)
	N=103 (%)	N=54 (%)	N=38 (%)	N=66 (%)
CC/C2+/AA	48 (46,60)	24 (44,44)	20 (52,63)	39 (59,09)
CG/C2+/AA	44 (42,72)	22 (40,74)	17 (44,74)	21 (31,82)
GG/C2+/AA	11 (10,68)	8 (14,81)	1 (2,63)	6 (9,09)
	N=217 (%)	N=126 (%)	N=72 (%)	N=144 (%)
CC/C2+/Bx	118 (54,38)	**63 (50,00)[i]**	39 (54,17)	91 (63,19)
CG/C2+/Bx	85 (39,17)	54 (42,86)	28 (38,89)	45 (31,25)
GG/C2+/Bx	14 (6,45)	9 (7,14)	5 (6,94)	8 (5,56)
	N=35 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=28 (%)
CC/C1C1/AA	20 (57,14)	13 (56,52)	4 (66,67)	15 (53,57)
CG/C1C1/AA	11 (31,43)	7 (30,43)	2 (33,33)	9 (32,14)
GG/C1C1/AA	4 (11,43)	3 (13,04)	0 (0,00)	4 (14,29)
	N=80 (%)	N=47 (%)	N=24 (%)	N=52 (%)
CC/C1C2/AA	37 (46,25)	22 (46,81)	12 (50,00)	30 (57,69)
CG/C1C2/AA	32 (40,00)	17 (36,17)	11 (45,83)	18 (34,62)
GG/C1C2/AA	11 (13,75)	8 (17,02)	1 (4,17)	4 (7,69)
	N=23 (%)	N=7 (%)	N=14 (%)	N=14 (%)
CC/C2C2/AA	11 (47,83)	2 (28,57)	8 (57,14)	9 (64,29)
CG/C2C2/AA	12 (52,17)	5 (71,43)	6 (42,86)	3 (21,43)
GG/C2C2/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (14,29)
	N=136 (%)	N=75 (%)	N=45 (%)	N=84 (%)
CC/C1C1/Bx	76 (55,88)	39 (52,00)	25 (55,56)	44 (52,38)
CG/C1C1/Bx	54 (39,71)	34 (45,33)	16 (35,56)	35 (41,67)
GG/C1C1/Bx	6 (4,41)	2 (2,67)	4 (8,89)	5 (5,95)
	N=168 (%)	N=91 (%)	N=61 (%)	N=108 (%)
CC/C1C2/Bx	**86 (51,19)[j]**	**40 (43,96)[k]**	33 (54,10)	70 (64,81)
CG/C1C2/Bx	**72 (42,86)[l]**	**46 (50,55)[m]**	23 (37,70)	33 (30,56)
GG/C1C2/Bx	10 (5,95)	5 (5,49)	5 (8,20)	5 (4,63)
	N=49 (%)	N=35 (%)	N=11 (%)	N=36 (%)
CC/C2C2/Bx	32 (65,31)	23 (65,71)	6 (54,55)	21 (58,33)
CG/C2C2/Bx	13 (26,53)	8 (22,86)	5 (45,45)	12 (33,33)
GG/C2C2/Bx	4 (8,16)	4 (11,43)	0 (0,00)	3 (8,33)
ERAP1 rs26653/HLA-C/KIR	N=115 (%)	N=70 (%)	N=30 (%)	N=79 (%)
GG/C1+/AA	63 (54,78)	35 (50,00)	18 (60,00)	48 (60,76)
CG/C1+/AA	41 (35,65)	30 (42,86)	7 (23,33)	27 (34,18)
CC/C1+/AA	11 (9,57)	5 (7,14)	5 (16,67)	4 (5,06)
	N=304 (%)	N=166 (%)	N=106 (%)	N=190 (%)
GG/C1+/Bx	168 (55,26)	88 (53,01)	61 (57,55)	100 (52,63)
CG/C1+/Bx	127 (41,78)	73 (43,98)	44 (41,51)	79 (41,58)
CC/C1+/Bx	9 (2,96)	5 (3,01)	1 (0,94)	11 (5,79)
	N=103 (%)	N=54 (%)	N=38 (%)	N=65 (%)

ERAP kobiety/HLA-C partnera/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
GG/C2+/AA	55 (53,40)	27 (50,00)	22 (57,89)	42 (64,62)
CG/C2+/AA	41 (39,81)	24 (44,44)	13 (34,21)	20 (30,77)
CC/C2+/AA	7 (6,80)	3 (5,56)	3 (7,89)	3 (4,62)
	N=217 (%)	N=126 (%)	N=72 (%)	N=143 (%)
GG/C2+/Bx	123 (56,68)	69 (54,76)	43 (59,72)	79 (55,24)
CG/C2+/Bx	84 (38,71)	51 (40,48)	29 (40,28)	58 (40,56)
CC/C2+/Bx	10 (4,61)	6 (4,76)	0 (0,00)	6 (4,20)
	N=35 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=28 (%)
GG/C1C1/AA	16 (45,71)	10 (43,48)	1 (16,67)	16 (57,14)
CG/C1C1/AA	15 (42,86)	11 (47,83)	3 (50,00)	10 (35,71)
CC/C1C1/AA	4 (11,43)	2 (8,70)	2 (33,33)	2 (7,14)
	N=80 (%)	N=47 (%)	N=24 (%)	N=51 (%)
GG/C1C2/AA	47 (58,75)	25 (53,19)	17 (70,83)	32 (62,75)
CG/C1C2/AA	26 (32,50)	19 (40,43)	4 (16,67)	17 (33,33)
CC/C1C2/AA	7 (8,75)	3 (6,38)	3 (12,50)	2 (3,92)
	N=23 (%)	N=7 (%)	N=14 (%)	N=14 (%)
GG/C2C2/AA	**8 (34,78)[n]**	2 (28,57)	5 (35,71)	10 (71,43)
CG/C2C2/AA	**15 (65,22)[o]**	5 (71,43)	9 (64,29)	3 (21,43)
CC/C2C2/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (7,14)
	N=136 (%)	N=75 (%)	N=45 (%)	N=83 (%)
GG/C1C1/Bx	73 (53,68)	40 (53,33)	23 (51,11)	42 (50,60)
CG/C1C1/Bx	59 (43,38)	32 (42,67)	21 (46,67)	35 (42,17)
CC/C1C1/Bx	4 (2,94)	3 (4,00)	1 (2,22)	6 (7,23)
	N=168 (%)	N=91 (%)	N=61 (%)	N=107 (%)
GG/C1C2/Bx	95 (56,55)	48 (52,75)	38 (62,30)	58 (54,21)
CG/C1C2/Bx	68 (40,48)	41 (45,05)	23 (37,70)	44 (41,12)
CC/C1C2/Bx	5 (2,98)	2 (2,20)	0 (0,00)	5 (4,67)
	N=49 (%)	N=35 (%)	N=11 (%)	N=36 (%)
GG/C2C2/Bx	28 (57,14)	21 (60,00)	5 (45,45)	21 (58,33)
CG/C2C2/Bx	16 (32,65)	10 (28,57)	6 (54,55)	14 (38,89)
CC/C2C2/Bx	5 (10,20)	4 (11,43)	0 (0,00)	1 (2,78)
ERAP1 rs26618/HLA-C/KIR	N=115 (%)	N=70 (%)	N=30 (%)	N=80 (%)
TT/C1+/AA	67 (58,26)	40 (57,14)	18 (60,00)	38 (47,50)
CT/C1+/AA	42 (36,52)	25 (35,71)	11 (36,67)	32 (40,00)
CC/C1+/AA	6 (5,22)	5 (7,14)	1 (3,33)	10 (12,50)
	N=304 (%)	N=166 (%)	N=106 (%)	N=192 (%)
TT/C1+/Bx	154 (50,66)	92 (55,42)	49 (46,23)	91 (47,40)
CT/C1+/Bx	123 (40,46)	63 (37,95)	44 (41,51)	88 (45,83)
CC/C1+/Bx	27 (8,88)	11 (6,63)	13 (12,26)	13 (6,77)
	N=103 (%)	N=54 (%)	N=38 (%)	N=66 (%)
TT/C2+/AA	57 (55,34)	31 (57,41)	22 (57,89)	27 (40,91)
CT/C2+/AA	42 (40,78)	20 (37,04)	15 (39,47)	30 (45,45)
CC/C2+/AA	**4 (3,88)[p]**	3 (5,56)	1 (2,63)	9 (13,64)
	N=217 (%)	N=126 (%)	N=72 (%)	N=144 (%)
TT/C2+/Bx	114 (52,53)	**75 (59,52)[q]**	29 (40,28)	74 (51,39)
CT/C2+/Bx	82 (37,79)	42 (33,33)	33 (45,83)	60 (41,67)

ERAP kobiety/HLA-C partnera/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CC/C2+/Bx	21 (9,68)	9 (7,14)	10 (13,89)	10 (6,94)
	N=35 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=28 (%)
TT/C1C1/AA	22 (62,86)	13 (56,52)	4 (66,67)	17 (60,71)
CT/C1C1/AA	11 (31,43)	8 (34,78)	2 (33,33)	7 (25,00)
CC/C1C1/AA	2 (5,71)	2 (8,70)	0 (0,00)	4 (14,29)
	N=80 (%)	N=47 (%)	N=24 (%)	N=52 (%)
TT/C1C2/AA	45 (56,25)	27 (57,45)	14 (58,33)	21 (40,38)
CT/C1C2/AA	31 (38,75)	17 (36,17)	9 (37,50)	25 (48,08)
CC/C1C2/AA	4 (5,00)	3 (6,38)	1 (4,17)	6 (11,54)
	N=23 (%)	N=7 (%)	N=14 (%)	N=14 (%)
TT/C2C2/AA	12 (52,17)	4 (57,14)	8 (57,14)	6 (42,86)
CT/C2C2/AA	11 (47,83)	3 (42,86)	6 (42,86)	5 (35,71)
CC/C2C2/AA	0 (0,00)[r]	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (21,43)
	N=136 (%)	N=75 (%)	N=45 (%)	N=84 (%)
TT/C1C1/Bx	71 (52,21)	40 (53,33)	26 (57,78)	37 (44,05)
CT/C1C1/Bx	53 (38,97)	29 (38,67)	15 (33,33)	43 (51,19)
CC/C1C1/Bx	12 (8,82)	6 (8,00)	4 (8,89)	4 (4,76)
	N=168 (%)	N=91 (%)	N=61 (%)	N=108 (%)
TT/C1C2/Bx	83 (49,40)	52 (57,14)[s]	23 (37,70)	54 (50,00)
CT/C1C2/Bx	70 (41,67)	34 (37,36)	29 (47,54)	45 (41,67)
CC/C1C2/Bx	15 (8,93)	5 (5,49)	9 (14,75)	9 (8,33)
	N=49 (%)	N=35 (%)	N=11 (%)	N=36 (%)
TT/C2C2/Bx	31 (63,27)	23 (65,71)	6 (54,55)	20 (55,56)
CT/C2C2/Bx	12 (24,49)	8 (22,86)	4 (36,36)	15 (41,67)
CC/C2C2/Bx	6 (12,24)	4 (11,43)	1 (9,09)	1 (2,78)
ERAP1 rs2287987/HLA-C/KIR	N=115 (%)	N=70 (%)	N=30 (%)	N=80 (%)
TT/C1+/AA	71 (61,74)	45 (64,29)	17 (56,67)	53 (66,25)
CT/C1+/AA	41 (35,65)	24 (34,29)	11 (36,67)	26 (32,50)
CC/C1+/AA	3 (2,61)	1 (1,43)	2 (6,67)	1 (1,25)
	N=304 (%)	N=166 (%)	N=106 (%)	N=192 (%)
TT/C1+/Bx	190 (62,50)	100 (60,24)	73 (68,87)	116 (60,42)
CT/C1+/Bx	98 (32,24)	57 (34,34)	28 (26,42)	70 (36,46)
CC/C1+/Bx	16 (5,26)	9 (5,42)	5 (4,72)	6 (3,12)
	N=103 (%)	N=54 (%)	N=38 (%)	N=66 (%)
TT/C2+/AA	68 (66,02)	37 (68,52)	23 (60,53)	44 (66,67)
CT/C2+/AA	32 (31,07)	16 (29,63)	13 (34,21)	21 (31,82)
CC/C2+/AA	3 (2,91)	1 (1,85)	2 (5,26)	1 (1,52)
	N=217 (%)	N=126 (%)	N=72 (%)	N=144 (%)
TT/C2+/Bx	133 (61,29)	77 (61,11)	46 (63,89)	78 (54,17)
CT/C2+/Bx	70 (32,26)	41 (32,54)	22 (30,56)	61 (42,36)
CC/C2+/Bx	14 (6,45)	8 (6,35)	4 (5,56)	5 (3,47)
	N=35 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=28 (%)
TT/C1C1/AA	21 (60,00)	15 (65,22)	4 (66,67)	20 (71,43)
CT/C1C1/AA	14 (40,00)	8 (34,78)	2 (33,33)	8 (28,57)
CC/C1C1/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=80 (%)	N=47 (%)	N=24 (%)	N=52 (%)

ERAP kobiety/HLA-C partnera/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
TT/C1C2/AA	50 (62,50)	30 (63,83)	13 (54,17)	33 (63,46)
CT/C1C2/AA	27 (33,75)	16 (34,04)	9 (37,50)	18 (34,62)
CC/C1C2/AA	3 (3,75)	1 (2,13)	2 (8,33)	1 (1,92)
	N=23 (%)	N=7 (%)	N=14 (%)	N=14 (%)
TT/C2C2/AA	18 (78,26)	7 (100,00)	10 (71,43)	11 (78,57)
CT/C2C2/AA	5 (21,74)	0 (0,00)	4 (28,57)	3 (21,43)
CC/C2C2/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=136 (%)	N=75 (%)	N=45 (%)	N=84 (%)
TT/C1C1/Bx	82 (60,29)	43 (57,33)	30 (66,67)	56 (66,67)
CT/C1C1/Bx	47 (34,56)	27 (36,00)	13 (28,89)	26 (30,95)
CC/C1C1/Bx	7 (5,15)	5 (6,67)	2 (4,44)	2 (2,38)
	N=168 (%)	N=91 (%)	N=61 (%)	N=108 (%)
TT/C1C2/Bx	108 (64,29)	57 (62,64)	43 (70,49)	60 (55,56)
CT/C1C2/Bx	51 (30,36)	30 (32,97)	**15 (24,59)[t]**	44 (40,74)
CC/C1C2/Bx	9 (5,36)	4 (4,40)	3 (4,92)	4 (3,70)
	N=49 (%)	N=35 (%)	N=11 (%)	N=36 (%)
TT/C2C2/Bx	25 (51,02)	20 (57,14)	3 (27,27)	18 (50,00)
CT/C2C2/Bx	19 (38,78)	11 (31,43)	7 (63,64)	17 (47,22)
CC/C2C2/Bx	5 (10,20)	4 (11,43)	1 (9,09)	1 (2,78)
ERAP2 rs2248374/HLA-C/KIR	N=114 (%)	N=69 (%)	N=30 (%)	N=79 (%)
AA/C1+/AA	29 (25,44)	19 (27,54)	7 (23,33)	20 (25,32)
AG/C1+/AA	49 (42,98)	31 (44,93)	13 (43,33)	39 (49,37)
GG/C1+/AA	36 (31,58)	19 (27,54)	10 (33,33)	20 (25,32)
	N=304 (%)	N=166 (%)	N=106 (%)	N=190 (%)
AA/C1+/Bx	78 (25,66)	39 (23,49)	33 (31,13)	52 (27,37)
AG/C1+/Bx	149 (49,01)	80 (48,19)	49 (46,23)	94 (49,47)
GG/C1+/Bx	77 (25,33)	47 (28,31)	24 (22,64)	44 (23,16)
	N=102 (%)	N=53 (%)	N=38 (%)	N=65 (%)
AA/C2+/AA	22 (21,57)	11 (20,75)	9 (23,68)	16 (24,62)
AG/C2+/AA	49 (48,04)	25 (47,17)	20 (52,63)	35 (53,85)
GG/C2+/AA	31 (30,39)	17 (32,08)	9 (23,68)	14 (21,54)
	N=217 (%)	N=126 (%)	N=72 (%)	N=143 (%)
AA/C2+/Bx	60 (27,65)	**30 (23,81)[u]**	28 (38,89)	38 (26,57)
AG/C2+/Bx	105 (48,39)	60 (47,62)	30 (41,67)	65 (45,45)
GG/C2+/Bx	52 (23,96)	36 (28,57)	14 (19,44)	40 (27,97)
	N=35 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=28 (%)
AA/C1C1/AA	11 (31,43)	8 (34,78)	1 (16,67)	8 (28,57)
AG/C1C1/AA	15 (42,86)	11 (47,83)	3 (50,00)	12 (42,86)
GG/C1C1/AA	9 (25,71)	4 (17,39)	2 (33,33)	8 (28,57)
	N=79 (%)	N=46 (%)	N=24 (%)	N=51 (%)
AA/C1C2/AA	18 (22,78)	11 (23,91)	6 (25,00)	12 (23,53)
AG/C1C2/AA	34 (43,04)	20 (43,48)	10 (41,67)	27 (52,94)
GG/C1C2/AA	27 (34,18)	15 (32,61)	8 (33,33)	12 (23,53)
	N=23 (%)	N=7 (%)	N=14 (%)	N=14 (%)
AA/C2C2/AA	4 (17,39)	0 (0,00)	3 (21,43)	4 (28,57)
AG/C2C2/AA	15 (65,22)	5 (71,43)	10 (71,43)	8 (57,14)

ERAP kobiety/HLA-C partnera/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
GG/C2C2/AA	4 (17,39)	2 (28,57)	1 (7,14)	2 (14,29)
	N=136 (%)	N=75 (%)	N=45 (%)	N=83 (%)
AA/C1C1/Bx	33 (24,26)	18 (24,00)	10 (22,22)	24 (28,92)
AG/C1C1/Bx	66 (48,53)	36 (48,00)	23 (51,11)	42 (50,60)
GG/C1C1/Bx	37 (27,21)	21 (28,00)	12 (26,67)	17 (20,48)
	N=168 (%)	N=91 (%)	N=61 (%)	N=107 (%)
AA/C1C2/Bx	45 (26,79)	21 (23,08)	23 (37,70)	28 (26,17)
AG/C1C2/Bx	83 (49,40)	44 (48,35)	26 (42,62)	52 (48,60)
GG/C1C2/Bx	40 (23,81)	26 (28,57)	12 (19,67)	27 (25,23)
	N=49 (%)	N=35 (%)	N=11 (%)	N=36 (%)
AA/C2C2/Bx	15 (30,61)	9 (25,71)	5 (45,45)	10 (27,78)
AG/C2C2/Bx	22 (44,90)	16 (45,71)	4 (36,36)	13 (36,11)
GG/C2C2/Bx	12 (24,49)	10 (28,57)	2 (18,18)	13 (36,11)
ERAP1 rs6861666/HLA-C/KIR	N=114 (%)	N=69 (%)	N=30 (%)	N=79 (%)
AA/C1+/AA	97 (85,09)	60 (86,96)	24 (80,00)	69 (87,34)
AG/C1+/AA	16 (14,04)	8 (11,59)	6 (20,00)	10 (12,66)
GG/C1+/AA	1 (0,88)	1 (1,45)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=304 (%)	N=166 (%)	N=106 (%)	N=188 (%)
AA/C1+/Bx	261 (85,86)	138 (83,13)	92 (86,79)	160 (85,11)
AG/C1+/Bx	42 (13,82)	28 (16,87)	13 (12,26)	28 (14,89)
GG/C1+/Bx	1 (0,33)	0 (0,00)	1 (0,94)	0 (0,00)
	N=102 (%)	N=53 (%)	N=38 (%)	N=65 (%)
AA/C2+/AA	87 (85,29)	47 (88,68)	32 (84,21)	56 (86,15)
AG/C2+/AA	15 (14,71)	6 (11,32)	6 (15,79)	9 (13,85)
GG/C2+/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=217 (%)	N=126 (%)	N=72 (%)	N=142 (%)
AA/C2+/Bx	188 (86,64)	108 (85,71)	62 (86,11)	118 (83,10)
AG/C2+/Bx	29 (13,36)	18 (14,29)	10 (13,89)	23 (16,20)
GG/C2+/Bx	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,70)
	N=35 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=28 (%)
AA/C1C1/AA	28 (80,00)	18 (78,26)	4 (66,67)	26 (92,86)
AG/C1C1/AA	6 (17,14)	4 (17,39)	2 (33,33)	2 (7,14)
GG/C1C1/AA	1 (2,86)	1 (4,35)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=79 (%)	N=46 (%)	N=24 (%)	N=51 (%)
AA/C1C2/AA	69 (87,34)	42 (91,30)	20 (83,33)	43 (84,31)
AG/C1C2/AA	10 (12,66)	4 (8,70)	4 (16,67)	8 (15,69)
GG/C1C2/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=23 (%)	N=7 (%)	N=14 (%)	N=14 (%)
AA/C2C2/AA	18 (78,26)	5 (71,43)	12 (85,71)	13 (92,86)
AG/C2C2/AA	5 (21,74)	2 (28,57)	2 (14,29)	1 (7,14)
GG/C2C2/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=136 (%)	N=75 (%)	N=45 (%)	N=82 (%)
AA/C1C1/Bx	117 (86,03)	61 (81,33)	40 (88,89)	68 (82,93)
AG/C1C1/Bx	18 (13,24)	14 (18,67)	4 (8,89)	14 (17,07)
GG/C1C1/Bx	1 (0,74)	0 (0,00)	1 (2,22)	0 (0,00)
	N=168 (%)	N=91 (%)	N=61 (%)	N=106 (%)

ERAP kobiety/HLA-C partnera/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
AA/C1C2/Bx	144 (85,71)	77 (84,62)	52 (85,25)	92 (86,79)
AG/C1C2/Bx	24 (14,29)	14 (15,38)	9 (14,75)	14 (13,21)
GG/C1C2/Bx	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=49 (%)	N=35 (%)	N=11 (%)	N=36 (%)
AA/C2C2/Bx	**44 (89,80)^{w}**	31 (88,57)	10 (90,91)	26 (72,22)
AG/C2C2/Bx	5 (10,20)	4 (11,43)	1 (9,09)	9 (25,00)
GG/C2C2/Bx	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,78)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla kombinacji genotypów ERAP z HLA-C C1+ lub C2+ oraz AA lub Bx; x9 dla kombinacji genotypów ERAP, HLA-C z KIR AA lub Bx); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice.

IVF *vs.* kontrola płodna: $^{c}p/p_{corr.}$=0,040/ns, OR=5,425, 95% CI (1,04-38,86); $^{j}p/p_{corr.}$=0,034/ns, OR=0,570, 95% CI (0,33-0,96); $^{l}p/p_{corr.}$=0,043/ns, OR=1,701, 95% CI (0,99-2,95); $^{n}p/p_{corr.}$=0,045/ns, OR=0,223, 95% CI (0,04-1,09); $^{o}p/p_{corr.}$=0,017/ns, OR=6,490, 95% CI (1,23-47,02); $^{p}p/p_{corr.}$=0,035/ns, OR=0,258, 95% CI (0,06-0,98); $^{r}p/p_{corr.}$=0,047/ns, OR=0,000, 95% CI (0,00-1,38); $^{w}p/p_{corr.}$=0,046/ns, OR=3,334, 95% CI (0,92-13,86);

RIF *vs.* kontrola płodna: $^{a}p/p_{corr.}$=0,047/ns, OR=3,620, 95% CI (0,97-16,88); $^{d}p/p_{corr.}$=0,023/ns, OR=0,511, 95% CI (0,28-0,94); $^{f}p/p_{corr.}$=0,047/ns, OR=0,337, 95% CI (0,10-1,03); $^{g}p/p_{corr.}$=0,033/ns, OR=0,622, 95% CI (0,40-0,97); $^{h}p/p_{corr.}$=0,018/ns, OR=1,694, 95% CI (1,09-2,65); $^{i}p/p_{corr.}$=0,036/ns, OR=0,584, 95% CI (0,35-0,98), $^{k}p/p_{corr.}$=0,004/0,037, OR=0,428, 95% CI (0,23-0,78); $^{m}p/p_{corr.}$=0,006/0,050, OR=2,313, 95% CI (1,25-4,33);

SIVF *vs.* kontrola płodna: $^{t}p/p_{corr.}$=0,044/ns, OR=0,476, 95% CI (0,22-1,00);
RIF *vs.* SIVF: $^{b}p/p_{corr.}$=0,049/ns, OR=6,886, 95% CI (0,89-314,94); $^{e}p/p_{corr.}$=0,048/ns, OR=1,970, 95% CI (0,97-4,08); $^{q}p/p_{corr.}$=0,012/ns, OR=2,172, 95% CI (1,16-4,11); $^{s}p/p_{corr.}$=0,021/ns, OR=2,191, 95% CI (1,08-4,52); $^{u}p/p_{corr.}$=0,034/ns, OR=0,493, 95% CI (0,25-0,97)

Tabela 20S. Częstość kombinacji genotypów *KIR i HLA-C* kobiet z *ERAP* ich partnerów wśród par poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz par kontrolnych.

ERAP partnera/HLA-C kobiety/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
ERAP1 rs30187/HLA-C/KIR	N=108 (%)	N=58 (%)	N=36 (%)	N=82 (%)
CC/C1+/AA	61 (56,48)	37 (63,79)	17 (47,22)	40 (48,78)
CT/C1+/AA	38 (35,19)	19 (32,76)	12 (33,33)	30 (36,59)
TT/C1+/AA	9 (8,33)	**2 (3,45)^{a,b}**	7 (19,44)	12 (14,63)
	N=296 (%)	N=170 (%)	N=98 (%)	N=190 (%)
CC/C1+/Bx	151 (51,01)	84 (49,41)	51 (52,04)	82 (43,16)
CT/C1+/Bx	115 (38,85)	68 (40,00)	37 (37,76)	90 (47,37)
TT/C1+/Bx	30 (10,14)	18 (10,59)	10 (10,20)	18 (9,47)
	N=88 (%)	N=48 (%)	N=30 (%)	N=52 (%)
CC/C2+/AA	42 (47,73)	24 (50,00)	15 (50,00)	25 (48,08)
CT/C2+/AA	36 (40,91)	20 (41,67)	9 (30,00)	22 (42,31)
TT/C2+/AA	10 (11,36)	4 (8,33)	6 (20,00)	5 (9,62)
	N=242 (%)	N=136 (%)	N=79 (%)	N=149 (%)
CC/C2+/Bx	117 (48,35)	66 (48,53)	38 (48,10)	63 (42,28)
CT/C2+/Bx	99 (40,91)	51 (37,50)	35 (44,30)	70 (46,98)
TT/C2+/Bx	26 (10,74)	19 (13,97)	6 (7,59)	16 (10,74)

ERAP partnera/HLA-C kobiety/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=49 (%)	N=29 (%)	N=14 (%)	N=40 (%)
CC/C1C1/AA	30 (61,22)	20 (68,97)	6 (42,86)	19 (47,50)
CT/C1C1/AA	14 (28,57)	8 (27,59)	4 (28,57)	13 (32,50)
TT/C1C1/AA	5 (10,20)	1 (3,45)	4 (28,57)	8 (20,00)
	N=59 (%)	N=29 (%)	N=22 (%)	N=42 (%)
CC/C1C2/AA	31 (52,54)	17 (58,62)	11 (50,00)	21 (50,00)
CT/C1C2/AA	24 (40,68)	11 (37,93)	8 (36,36)	17 (40,48)
TT/C1C2/AA	4 (6,78)	1 (3,45)	3 (13,64)	4 (9,52)
	N=29 (%)	N=19 (%)	N=8 (%)	N=10 (%)
CC/C2C2/AA	11 (37,93)	7 (36,84)	4 (50,00)	4 (40,00)
CT/C2C2/AA	12 (41,38)	**9 (47,37)[c]**	1 (12,50)	5 (50,00)
TT/C2C2/AA	6 (20,69)	3 (15,79)	3 (37,50)	1 (10,00)
	N=111 (%)	N=65 (%)	N=38 (%)	N=76 (%)
CC/C1C1/Bx	59 (53,15)	32 (49,23)	22 (57,89)	36 (47,37)
CT/C1C1/Bx	44 (39,64)	30 (46,15)	12 (31,58)	34 (44,74)
TT/C1C1/Bx	8 (7,21)	3 (4,62)	4 (10,53)	6 (7,89)
	N=185 (%)	N=105 (%)	N=60 (%)	N=114 (%)
CC/C1C2/Bx	92 (49,73)	52 (49,52)	29 (48,33)	46 (40,35)
CT/C1C2/Bx	71 (38,38)	38 (36,19)	25 (41,67)	56 (49,12)
TT/C1C2/Bx	22 (11,89)	15 (14,29)	6 (10,00)	12 (10,53)
	N=57 (%)	N=31 (%)	N=19 (%)	N=35 (%)
CC/C2C2/Bx	25 (43,86)	14 (45,16)	9 (47,37)	17 (48,57)
CT/C2C2/Bx	28 (49,12)	13 (41,94)	10 (52,63)	14 (40,00)
TT/C2C2/Bx	4 (7,02)	4 (12,90)	0 (0,00)	4 (11,43)
ERAP1 rs27044/HLA-C/KIR	N=108 (%)	N=58 (%)	N=36 (%)	N=82 (%)
CC/C1+/AA	68 (62,96)	42 (72,41)	17 (47,22)	49 (59,76)
CG/C1+/AA	33 (30,56)	15 (25,86)	13 (36,11)	27 (32,93)
GG/C1+/AA	7 (6,48)	**1 (1,72)[d]**	6 (16,67)	6 (7,32)
	N=296 (%)	N=170 (%)	N=98 (%)	N=190 (%)
CC/C1+/Bx	177 (59,80)	103 (60,59)	55 (56,12)	101 (53,16)
CG/C1+/Bx	98 (33,11)	57 (33,53)	34 (34,69)	74 (38,95)
GG/C1+/Bx	21 (7,09)	10 (5,88)	9 (9,18)	15 (7,89)
	N=88 (%)	N=48 (%)	N=30 (%)	N=52 (%)
CC/C2+/AA	49 (55,68)	29 (60,42)	15 (50,00)	29 (55,77)
CG/C2+/AA	30 (34,09)	16 (33,33)	9 (30,00)	19 (36,54)
GG/C2+/AA	9 (10,23)	3 (6,25)	6 (20,00)	4 (7,69)
	N=242 (%)	N=136 (%)	N=79 (%)	N=149 (%)
CC/C2+/Bx	136 (56,20)	78 (57,35)	42 (53,16)	77 (51,68)
CG/C2+/Bx	88 (36,36)	48 (35,29)	30 (37,97)	59 (39,60)
GG/C2+/Bx	18 (7,44)	10 (7,35)	7 (8,86)	13 (8,72)
	N=49 (%)	N=29 (%)	N=14 (%)	N=40 (%)
CC/C1C1/AA	32 (65,31)	22 (75,86)	6 (42,86)	24 (60,00)
CG/C1C1/AA	14 (28,57)	7 (24,14)	5 (35,71)	12 (30,00)
GG/C1C1/AA	3 (6,12)	0 (0,00)	3 (21,43)	4 (10,00)
	N=59 (%)	N=29 (%)	N=22 (%)	N=42 (%)
CC/C1C2/AA	36 (61,02)	20 (68,97)	11 (50,00)	25 (59,52)

ERAP partnera/HLA-C kobiety/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CG/C1C2/AA	19 (32,20)	8 (27,59)	8 (36,36)	15 (35,71)
GG/C1C2/AA	4 (6,78)	1 (3,45)	3 (13,64)	2 (4,76)
	N=29 (%)	N=19 (%)	N=8 (%)	N=10 (%)
CC/C2C2/AA	13 (44,83)	9 (47,37)	4 (50,00)	4 (40,00)
CG/C2C2/AA	11 (37,93)	**8 (42,11)[e]**	1 (12,50)	4 (40,00)
GG/C2C2/AA	5 (17,24)	2 (10,53)	3 (37,50)	2 (20,00)
	N=111 (%)	N=65 (%)	N=38 (%)	N=76 (%)
CC/C1C1/Bx	70 (63,06)	41 (63,08)	23 (60,53)	46 (60,53)
CG/C1C1/Bx	37 (33,33)	23 (35,38)	13 (34,21)	24 (31,58)
GG/C1C1/Bx	4 (3,60)	1 (1,54)	2 (5,26)	6 (7,89)
	N=185 (%)	N=105 (%)	N=60 (%)	N=114 (%)
CC/C1C2/Bx	107 (57,84)	62 (59,05)	32 (53,33)	55 (48,25)
CG/C1C2/Bx	61 (32,97)	34 (32,38)	21 (35,00)	50 (43,86)
GG/C1C2/Bx	17 (9,19)	9 (8,57)	7 (11,67)	9 (7,89)
	N=57 (%)	N=31 (%)	N=19 (%)	N=35 (%)
CC/C2C2/Bx	29 (50,88)	16 (51,61)	10 (52,63)	22 (62,86)
CG/C2C2/Bx	**27 (47,37)[f]**	14 (45,16)	9 (47,37)	9 (25,71)
GG/C2C2/Bx	1 (1,75)	1 (3,23)	0 (0,00)	4 (11,43)
ERAP1 rs26653/HLA-C/KIR	N=108 (%)	N=58 (%)	N=36 (%)	N=82 (%)
GG/C1+/AA	66 (61,11)	34 (58,62)	22 (61,11)	43 (52,44)
CG/C1+/AA	35 (32,41)	23 (39,66)	9 (25,00)	28 (34,15)
CC/C1+/AA	7 (6,48)	**1 (1,72)[g,h]**	5 (13,89)	11 (13,41)
	N=296 (%)	N=170 (%)	N=98 (%)	N=190 (%)
GG/C1+/Bx	159 (53,72)	93 (54,71)	52 (53,06)	95 (50,00)
CG/C1+/Bx	113 (38,18)	61 (35,88)	39 (39,80)	86 (45,26)
CC/C1+/Bx	24 (8,11)	16 (9,41)	7 (7,14)	9 (4,74)
	N=88 (%)	N=48 (%)	N=30 (%)	N=52 (%)
GG/C2+/AA	54 (61,36)	28 (58,33)	20 (66,67)	30 (57,69)
CG/C2+/AA	26 (29,55)	17 (35,42)	6 (20,00)	14 (26,92)
CC/C2+/AA	8 (9,09)	3 (6,25)	4 (13,33)	8 (15,38)
	N=242 (%)	N=136 (%)	N=79 (%)	N=149 (%)
GG/C2+/Bx	136 (56,20)	76 (55,88)	45 (56,96)	75 (50,34)
CG/C2+/Bx	84 (34,71)	44 (32,35)	29 (36,71)	64 (42,95)
CC/C2+/Bx	22 (9,09)	16 (11,76)	5 (6,33)	10 (6,71)
	N=49 (%)	N=29 (%)	N=14 (%)	N=40 (%)
GG/C1C1/AA	28 (57,14)	16 (55,17)	7 (50,00)	18 (45,00)
CG/C1C1/AA	17 (34,69)	12 (41,38)	4 (28,57)	17 (42,50)
CC/C1C1/AA	4 (8,16)	1 (3,45)	3 (21,43)	5 (12,50)
	N=59 (%)	N=29 (%)	N=22 (%)	N=42 (%)
GG/C1C2/AA	38 (64,41)	18 (62,07)	15 (68,18)	25 (59,52)
CG/C1C2/AA	18 (30,51)	11 (37,93)	5 (22,73)	11 (26,19)
CC/C1C2/AA	3 (5,08)	0 (0,00)	2 (9,09)	6 (14,29)
	N=29 (%)	N=19 (%)	N=8 (%)	N=10 (%)
GG/C2C2/AA	16 (55,17)	10 (52,63)	5 (62,50)	5 (50,00)
CG/C2C2/AA	8 (27,59)	**6 (31,58)[i]**	1 (12,50)	3 (30,00)
CC/C2C2/AA	5 (17,24)	3 (15,79)	2 (25,00)	2 (20,00)

ERAP partnera/HLA-C kobiety/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=111 (%)	N=65 (%)	N=38 (%)	N=76 (%)
GG/C1C1/Bx	58 (52,25)	35 (53,85)	20 (52,63)	39 (51,32)
CG/C1C1/Bx	45 (40,54)	25 (38,46)	15 (39,47)	34 (44,74)
CC/C1C1/Bx	8 (7,21)	5 (7,69)	3 (7,89)	3 (3,95)
	N=185 (%)	N=105 (%)	N=60 (%)	N=114 (%)
GG/C1C2/Bx	101 (54,59)	58 (55,24)	32 (53,33)	56 (49,12)
CG/C1C2/Bx	68 (36,76)	36 (34,29)	24 (40,00)	52 (45,61)
CC/C1C2/Bx	16 (8,65)	11 (10,48)	4 (6,67)	6 (5,26)
	N=57 (%)	N=31 (%)	N=19 (%)	N=35 (%)
GG/C2C2/Bx	35 (61,40)	18 (58,06)	13 (68,42)	19 (54,29)
CG/C2C2/Bx	16 (28,07)	8 (25,81)	5 (26,32)	12 (34,29)
CC/C2C2/Bx	6 (10,53)	5 (16,13)	1 (5,26)	4 (11,43)
ERAP1 rs26618/HLA-C/KIR	N=108 (%)	N=58 (%)	N=36 (%)	N=82 (%)
TT/C1+/AA	56 (51,85)	32 (55,17)	19 (52,78)	51 (62,20)
CT/C1+/AA	40 (37,04)	21 (36,21)	12 (33,33)	22 (26,83)
CC/C1+/AA	12 (11,11)	5 (8,62)	5 (13,89)	9 (10,98)
	N=296 (%)	N=170 (%)	N=98 (%)	N=190 (%)
TT/C1+/Bx	146 (49,32)	87 (51,18)	41 (41,84)	87 (45,79)
CT/C1+/Bx	122 (41,22)	70 (41,18)	45 (45,92)	89 (46,84)
CC/C1+/Bx	28 (9,46)	13 (7,65)	12 (12,24)	14 (7,37)
	N=88 (%)	N=48 (%)	N=30 (%)	N=51 (%)
TT/C2+/AA	43 (48,86)	23 (47,92)	16 (53,33)	28 (54,90)
CT/C2+/AA	37 (42,05)	20 (41,67)	11 (36,67)	13 (25,49)
CC/C2+/AA	8 (9,09)	5 (10,42)	3 (10,00)	10 (19,61)
	N=242 (%)	N=136 (%)	N=79 (%)	N=149 (%)
TT/C2+/Bx	123 (50,83)	71 (52,21)	35 (44,30)	76 (51,01)
CT/C2+/Bx	90 (37,19)	49 (36,03)	33 (41,77)	64 (42,95)
CC/C2+/Bx	29 (11,98)	16 (11,76)	**11 (13,92)[j]**	9 (6,04)
	N=49 (%)	N=29 (%)	N=14 (%)	N=40 (%)
TT/C1C1/AA	30 (61,22)	18 (62,07)	10 (71,43)	30 (75,00)
CT/C1C1/AA	13 (26,53)	9 (31,03)	2 (14,29)	10 (25,00)
CC/C1C1/AA	**6 (12,24)[k]**	2 (6,90)	2 (14,29)	0 (0,00)
	N=59 (%)	N=29 (%)	N=22 (%)	N=42 (%)
TT/C1C2/AA	26 (44,07)	14 (48,28)	9 (40,91)	21 (50,00)
CT/C1C2/AA	27 (45,76)	12 (41,38)	10 (45,45)	12 (28,57)
CC/C1C2/AA	6 (10,17)	3 (10,34)	3 (13,64)	9 (21,43)
	N=29 (%)	N=19 (%)	N=8 (%)	N=9 (%)
TT/C2C2/AA	17 (58,62)	9 (47,37)	7 (87,50)	7 (77,78)
CT/C2C2/AA	10 (34,48)	**8 (42,11)[l]**	1 (12,50)	1 (11,11)
CC/C2C2/AA	2 (6,90)	2 (10,53)	0 (0,00)	1 (11,11)
	N=111 (%)	N=65 (%)	N=38 (%)	N=76 (%)
TT/C1C1/Bx	55 (49,55)	32 (49,23)	17 (44,74)	33 (43,42)
CT/C1C1/Bx	50 (45,05)	31 (47,69)	18 (47,37)	36 (47,37)
CC/C1C1/Bx	6 (5,41)	2 (3,08)	3 (7,89)	7 (9,21)
	N=185 (%)	N=105 (%)	N=60 (%)	N=114 (%)
TT/C1C2/Bx	91 (49,19)	**55 (52,38)[m]**	24 (40,00)	54 (47,37)

ERAP partnera/HLA-C kobiety/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CT/C1C2/Bx	72 (38,92)	39 (37,14)	27 (45,00)	53 (46,49)
CC/C1C2/Bx	22 (11,89)	11 (10,48)	9 (15,00)	7 (6,14)
	N=57 (%)	N=31 (%)	N=19 (%)	N=35 (%)
TT/C2C2/Bx	32 (56,14)	16 (51,61)	11 (57,89)	22 (62,86)
CT/C2C2/Bx	18 (31,58)	10 (32,26)	6 (31,58)	11 (31,43)
CC/C2C2/Bx	7 (12,28)	5 (16,13)	2 (10,53)	2 (5,71)
ERAP1 rs2287987/HLA-C/KIR	N=108 (%)	N=58 (%)	N=36 (%)	N=82 (%)
TT/C1+/AA	63 (58,33)	31 (53,45)	24 (66,67)	51 (62,20)
CT/C1+/AA	32 (29,63)	18 (31,03)	9 (25,00)	27 (32,93)
CC/C1+/AA	13 (12,04)	**9 (15,52)[n]**	3 (8,33)	4 (4,88)
	N=295 (%)	N=170 (%)	N=97 (%)	N=190 (%)
TT/C1+/Bx	191 (64,75)	110 (64,71)	65 (67,01)	118 (62,11)
CT/C1+/Bx	91 (30,85)	51 (30,00)	29 (29,90)	67 (35,26)
CC/C1+/Bx	13 (4,41)	9 (5,29)	3 (3,09)	5 (2,63)
	N=88 (%)	N=48 (%)	N=30 (%)	N=51 (%)
TT/C2+/AA	53 (60,23)	30 (62,50)	18 (60,00)	35 (68,63)
CT/C2+/AA	26 (29,55)	13 (27,08)	9 (30,00)	15 (29,41)
CC/C2+/AA	9 (10,23)	5 (10,42)	3 (10,00)	1 (1,96)
	N=241 (%)	N=136 (%)	N=78 (%)	N=149 (%)
TT/C2+/Bx	152 (63,07)	90 (66,18)	49 (62,82)	96 (64,43)
CT/C2+/Bx	78 (32,37)	39 (28,68)	27 (34,62)	48 (32,21)
CC/C2+/Bx	11 (4,56)	7 (5,15)	2 (2,56)	5 (3,36)
	N=49 (%)	N=29 (%)	N=14 (%)	N=40 (%)
TT/C1C1/AA	29 (59,18)	15 (51,72)	10 (71,43)	22 (55,00)
CT/C1C1/AA	13 (26,53)	8 (27,59)	3 (21,43)	15 (37,50)
CC/C1C1/AA	7 (14,29)	6 (20,69)	1 (7,14)	3 (7,50)
	N=59 (%)	N=29 (%)	N=22 (%)	N=42 (%)
TT/C1C2/AA	34 (57,63)	16 (55,17)	14 (63,64)	29 (69,05)
CT/C1C2/AA	19 (32,20)	10 (34,48)	6 (27,27)	12 (28,57)
CC/C1C2/AA	6 (10,17)	3 (10,34)	2 (9,09)	1 (2,38)
	N=29 (%)	N=19 (%)	N=8 (%)	N=9 (%)
TT/C2C2/AA	19 (65,52)	**14 (73,68)[o]**	4 (50,00)	6 (66,67)
CT/C2C2/AA	7 (24,14)	3 (15,79)	3 (37,50)	3 (33,33)
CC/C2C2/AA	3 (10,34)	2 (10,53)	1 (12,50)	0 (0,00)
	N=111 (%)	N=65 (%)	N=38 (%)	N=76 (%)
TT/C1C1/Bx	69 (62,16)	41 (63,08)	23 (60,53)	45 (59,21)
CT/C1C1/Bx	38 (34,23)	21 (32,31)	14 (36,84)	29 (38,16)
CC/C1C1/Bx	4 (3,60)	3 (4,62)	1 (2,63)	2 (2,63)
	N=184 (%)	N=105 (%)	N=59 (%)	N=114 (%)
TT/C1C2/Bx	122 (66,30)	69 (65,71)	42 (71,19)	73 (64,04)
CT/C1C2/Bx	53 (28,80)	30 (28,57)	15 (25,42)	38 (33,33)
CC/C1C2/Bx	9 (4,89)	6 (5,71)	2 (3,39)	3 (2,63)
	N=57 (%)	N=31 (%)	N=19 (%)	N=35 (%)
TT/C2C2/Bx	30 (52,63)	21 (67,74)	**7 (36,84)[q]**	23 (65,71)
CT/C2C2/Bx	25 (43,86)	**9 (29,03)[p]**	**12 (63,16)[r]**	10 (28,57)
CC/C2C2/Bx	2 (3,51)	1 (3,23)	0 (0,00)	2 (5,71)

ERAP partnera/HLA-C kobiety/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
ERAP2 rs2248374/HLA-C/KIR	N=107 (%)	N=58 (%)	N=35 (%)	N=82 (%)
AA/C1+/AA	33 (30,84)	17 (29,31)	12 (34,29)	17 (20,73)
AG/C1+/AA	44 (41,12)	25 (43,10)	12 (34,29)	41 (50,00)
GG/C1+/AA	30 (28,04)	16 (27,59)	11 (31,43)	24 (29,27)
	N=295 (%)	N=170 (%)	N=97 (%)	N=190 (%)
AA/C1+/Bx	77 (26,10)	46 (27,06)	23 (23,71)	39 (20,53)
AG/C1+/Bx	157 (53,22)	95 (55,88)	48 (49,48)	101 (53,16)
GG/C1+/Bx	61 (20,68)	**29 (17,06)[s]**	26 (26,80)	50 (26,32)
	N=87 (%)	N=48 (%)	N=29 (%)	N=52 (%)
AA/C2+/AA	24 (27,59)	14 (29,17)	9 (31,03)	13 (25,00)
AG/C2+/AA	45 (51,72)	25 (52,08)	13 (44,83)	23 (44,23)
GG/C2+/AA	18 (20,69)	9 (18,75)	7 (24,14)	16 (30,77)
	N=242 (%)	N=136 (%)	N=79 (%)	N=149 (%)
AA/C2+/Bx	64 (26,45)	38 (27,94)	19 (24,05)	30 (20,13)
AG/C2+/Bx	115 (47,52)	67 (49,26)	35 (44,30)	81 (54,36)
GG/C2+/Bx	63 (26,03)	31 (22,79)	25 (31,65)	38 (25,50)
	N=49 (%)	N=29 (%)	N=14 (%)	N=40 (%)
AA/C1C1/AA	13 (26,53)	7 (24,14)	3 (21,43)	5 (12,50)
AG/C1C1/AA	18 (36,73)	11 (37,93)	5 (35,71)	22 (55,00)
GG/C1C1/AA	18 (36,73)	11 (37,93)	6 (42,86)	13 (32,50)
	N=58 (%)	N=29 (%)	N=21 (%)	N=42 (%)
AA/C1C2/AA	20 (34,48)	10 (34,48)	9 (42,86)	12 (28,57)
AG/C1C2/AA	26 (44,83)	14 (48,28)	7 (33,33)	19 (45,24)
GG/C1C2/AA	12 (20,69)	5 (17,24)	5 (23,81)	11 (26,19)
	N=29 (%)	N=19 (%)	N=8 (%)	N=10 (%)
AA/C2C2/AA	4 (13,79)	4 (21,05)	0 (0,00)	1 (10,00)
AG/C2C2/AA	19 (65,52)	11 (57,89)	6 (75,00)	4 (40,00)
GG/C2C2/AA	6 (20,69)	4 (21,05)	2 (25,00)	5 (50,00)
	N=110 (%)	N=65 (%)	N=37 (%)	N=76 (%)
AA/C1C1/Bx	23 (20,91)	14 (21,54)	6 (16,22)	17 (22,37)
AG/C1C1/Bx	**69 (62,73)[t]**	41 (63,08)	23 (62,16)	35 (46,05)
GG/C1C1/Bx	**18 (16,36)[u]**	**10 (15,38)[w]**	8 (21,62)	24 (31,58)
	N=185 (%)	N=105 (%)	N=60 (%)	N=114 (%)
AA/C1C2/Bx	54 (29,19)	32 (30,48)	17 (28,33)	22 (19,30)
AG/C1C2/Bx	88 (47,57)	54 (51,43)	25 (41,67)	66 (57,89)
GG/C1C2/Bx	43 (23,24)	19 (18,10)	18 (30,00)	26 (22,81)
	N=57 (%)	N=31 (%)	N=19 (%)	N=35 (%)
AA/C2C2/Bx	10 (17,54)	6 (19,35)	2 (10,53)	8 (22,86)
AG/C2C2/Bx	27 (47,37)	13 (41,94)	10 (52,63)	15 (42,86)
GG/C2C2/Bx	20 (35,09)	12 (38,71)	7 (36,84)	12 (34,29)
ERAP1 rs6861666/HLA-C/KIR	N=108 (%)	N=58 (%)	N=36 (%)	N=76 (%)
AA/C1+/AA	96 (88,89)	52 (89,66)	31 (86,11)	65 (85,53)
AG/C1+/AA	12 (11,11)	6 (10,34)	5 (13,89)	9 (11,84)
GG/C1+/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (2,63)
	N=295 (%)	N=169 (%)	N=98 (%)	N=181 (%)
AA/C1+/Bx	244 (82,71)	146 (86,39)	79 (80,61)	150 (82,87)

ERAP partnera/HLA-C kobiety/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
AG/C1+/Bx	50 (16,95)	22 (13,02)	19 (19,39)	31 (17,13)
GG/C1+/Bx	1 (0,34)	1 (0,59)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=88 (%)	N=48 (%)	N=30 (%)	N=46 (%)
AA/C2+/AA	81 (92,05)	44 (91,67)	28 (93,33)	37 (80,43)
AG/C2+/AA	7 (7,95)	4 (8,33)	2 (6,67)	6 (13,04)
GG/C2+/AA	**0 (0,00)^{x}**	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (6,52)
	N=243 (%)	N=137 (%)	N=79 (%)	N=139 (%)
AA/C2+/Bx	207 (85,19)	117 (85,40)	68 (86,08)	110 (79,14)
AG/C2+/Bx	35 (14,40)	19 (13,87)	11 (13,92)	29 (20,86)
GG/C2+/Bx	1 (0,41)	1 (0,73)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=49 (%)	N=29 (%)	N=14 (%)	N=38 (%)
AA/C1C1/AA	41 (83,67)	25 (86,21)	10 (71,43)	33 (86,84)
AG/C1C1/AA	8 (16,33)	4 (13,79)	4 (28,57)	5 (13,16)
GG/C1C1/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=59 (%)	N=29 (%)	N=22 (%)	N=38 (%)
AA/C1C2/AA	55 (93,22)	27 (93,10)	21 (95,45)	32 (84,21)
AG/C1C2/AA	4 (6,78)	2 (6,90)	1 (4,55)	4 (10,53)
GG/C1C2/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (5,26)
	N=29 (%)	N=19 (%)	N=8 (%)	N=8 (%)
AA/C2C2/AA	26 (89,66)	17 (89,47)	7 (87,50)	5 (62,50)
AG/C2C2/AA	3 (10,34)	2 (10,53)	1 (12,50)	2 (25,00)
GG/C2C2/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (12,50)
	N=110 (%)	N=64 (%)	N=38 (%)	N=73 (%)
AA/C1C1/Bx	90 (81,82)	57 (89,06)	29 (76,32)	63 (86,30)
AG/C1C1/Bx	20 (18,18)	7 (10,94)	9 (23,68)	10 (13,70)
GG/C1C1/Bx	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=185 (%)	N=105 (%)	N=60 (%)	N=108 (%)
AA/C1C2/Bx	154 (83,24)	89 (84,76)	50 (83,33)	87 (80,56)
AG/C1C2/Bx	30 (16,22)	15 (14,29)	10 (16,67)	21 (19,44)
GG/C1C2/Bx	1 (0,54)	1 (0,95)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=58 (%)	N=32 (%)	N=19 (%)	N=31 (%)
AA/C2C2/Bx	53 (91,38)	28 (87,50)	18 (94,74)	23 (74,19)
AG/C2C2/Bx	5 (8,62)	4 (12,50)	1 (5,26)	8 (25,81)
GG/C2C2/Bx	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla kombinacji genotypów ERAP z HLA-C C1+ lub C2+ oraz AA lub Bx; x9 dla kombinacji genotypów ERAP, HLA-C z KIR AA lub Bx); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice.

IVF *vs.* kontrola płodna: $^{f}p/p_{corr.}$=0,049/ns, OR=2,573, 95% CI (0,96-7,40); $^{k}p/p_{corr.}$=0,031/ns, OR=Inf, 95% CI (1,01-Inf); $^{t}p/p_{corr.}$=0,035/ns, OR=1,964, 95% CI (1,04-3,73); $^{u}p/p_{corr.}$=0,020/ns, OR=0,426, 95% CI (0,20-0,90); $^{x}p/p_{corr.}$=0,039/ns, OR=0,000, 95% CI (0,00-1,24);

RIF *vs.* kontrola płodna: $^{a}p/p_{corr.}$=0,043/ns, OR=0,210, 95% CI (0,02-1,00); $^{g}p/p_{corr.}$=0,015/ns, OR=0,114, 95% CI (0,00-0,83); $^{n}p/p_{corr.}$=0,041/ns, OR=3,548, 95% CI (0,93-16,64); $^{s}p/p_{corr.}$=0,041/ns, OR=0,577, 95% CI (0,33-0,99); $^{w}p/p_{corr.}$=0,030/ns, OR=0,397, 95% CI (0,15-0,96);

SIVF *vs.* kontrola płodna: [j]$p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=2,505, 95% CI (0,90-7,20); [q]$p/p_{corr.}$=0,051/ns, OR=0,312, 95% CI (0,08-1,12); [r]$p/p_{corr.}$=0,021/ns, OR=4,160, 95% CI (1,13-16,69)

RIF *vs.* SIVF: [b]$p/p_{corr.}$=0,025/ns, OR=0,154, 95% CI (0,01-0,88); [c]$p/p_{corr.}$=0,005/0,049, OR=24,000, 95% CI (1,76-1549,16); [d]$p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=0,087, 95% CI (0,00-0,77); [e]$p/p_{corr.}$=0,015/ns, OR=21,399, 95% CI (1,53-1 396,02); [h]$p/p_{corr.}$=0,020/ns, OR=0,098, 95% CI (0,00-0,92); [i]$p/p_{corr.}$=0,041/ns, OR=16,199, 95% CI (1,09-1 088,44); [l]$p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=12,052, 95% CI (1,00-703,94); [m]$p/p_{corr.}$=0,032/ns, OR=2,105, 95% CI (1,04-4,32); [o]$p/p_{corr.}$=0,010/ns, OR=Inf, 95% CI (1,50-Inf)

Tabela 21S. Częstość kombinacji genotypów *KIR* kobiet z *HLA-C* i *ERAP* ich partnerów wśród par poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz par kontrolnych.

ERAP partnera/HLA-C partnera/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
ERAP1 rs30187/HLA-C/KIR	N=115 (%)	N=70 (%)	N=30 (%)	N=78 (%)
CC/C1+/AA	57 (49,57)	40 (57,14)	12 (40,00)	38 (48,72)
CT/C1+/AA	47 (40,87)	26 (37,14)	11 (36,67)	29 (37,18)
TT/C1+/AA	11 (9,57)	**4 (5,71)[a]**	7 (23,33)	11 (14,10)
	N=304 (%)	N=166 (%)	N=106 (%)	N=190 (%)
CC/C1+/Bx	155 (50,99)	82 (49,40)	58 (54,72)	83 (43,68)
CT/C1+/Bx	119 (39,14)	66 (39,76)	38 (35,85)	86 (45,26)
TT/C1+/Bx	30 (9,87)	18 (10,84)	10 (9,43)	21 (11,05)
	N=103 (%)	N=54 (%)	N=38 (%)	N=64 (%)
CC/C2+/AA	54 (52,43)	30 (55,56)	19 (50,00)	29 (45,31)
CT/C2+/AA	37 (35,92)	20 (37,04)	11 (28,95)	24 (37,50)
TT/C2+/AA	12 (11,65)	4 (7,41)	8 (21,05)	11 (17,19)
	N=217 (%)	N=126 (%)	N=72 (%)	N=143 (%)
CC/C2+/Bx	103 (47,47)	60 (47,62)	34 (47,22)	59 (41,26)
CT/C2+/Bx	90 (41,47)	51 (40,48)	31 (43,06)	73 (51,05)
TT/C2+/Bx	24 (11,06)	15 (11,90)	7 (9,72)	11 (7,69)
	N=35 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=28 (%)
CC/C1C1/AA	18 (51,43)	14 (60,87)	2 (33,33)	15 (53,57)
CT/C1C1/AA	14 (40,00)	8 (34,78)	2 (33,33)	11 (39,29)
TT/C1C1/AA	3 (8,57)	1 (4,35)	2 (33,33)	2 (7,14)
	N=80 (%)	N=47 (%)	N=24 (%)	N=50 (%)
CC/C1C2/AA	39 (48,75)	26 (55,32)	10 (41,67)	23 (46,00)
CT/C1C2/AA	33 (41,25)	18 (38,30)	9 (37,50)	18 (36,00)
TT/C1C2/AA	8 (10,00)	3 (6,38)	5 (20,83)	9 (18,00)
	N=23 (%)	N=7 (%)	N=14 (%)	N=14 (%)
CC/C2C2/AA	15 (65,22)	4 (57,14)	9 (64,29)	6 (42,86)
CT/C2C2/AA	4 (17,39)	2 (28,57)	2 (14,29)	6 (42,86)
TT/C2C2/AA	4 (17,39)	1 (14,29)	3 (21,43)	2 (14,29)
	N=136 (%)	N=75 (%)	N=45 (%)	N=83 (%)
CC/C1C1/Bx	73 (53,68)	38 (50,67)	26 (57,78)	41 (49,40)
CT/C1C1/Bx	53 (38,97)	30 (40,00)	16 (35,56)	31 (37,35)
TT/C1C1/Bx	10 (7,35)	7 (9,33)	3 (6,67)	11 (13,25)
	N=168 (%)	N=91 (%)	N=61 (%)	N=107 (%)
CC/C1C2/Bx	82 (48,81)	44 (48,35)	32 (52,46)	42 (39,25)
CT/C1C2/Bx	66 (39,29)	36 (39,56)	22 (36,07)	55 (51,40)
TT/C1C2/Bx	20 (11,90)	11 (12,09)	7 (11,48)	10 (9,35)

ERAP partnera/HLA-C partnera/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=49 (%)	N=35 (%)	N=11 (%)	N=36 (%)
CC/C2C2/Bx	21 (42,86)	16 (45,71)	2 (18,18)	17 (47,22)
CT/C2C2/Bx	24 (48,98)	**15 (42,86)[b]**	9 (81,82)	18 (50,00)
TT/C2C2/Bx	4 (8,16)	4 (11,43)	0 (0,00)	1 (2,78)
ERAP1 rs27044/HLA-C/KIR	N=115 (%)	N=70 (%)	N=30 (%)	N=78 (%)
CC/C1+/AA	66 (57,39)	47 (67,14)	12 (40,00)	46 (58,97)
CG/C1+/AA	40 (34,78)	21 (30,00)	11 (36,67)	24 (30,77)
GG/C1+/AA	9 (7,83)	**2 (2,86)[c]**	7 (23,33)	8 (10,26)
	N=304 (%)	N=166 (%)	N=106 (%)	N=190 (%)
CC/C1+/Bx	180 (59,21)	98 (59,04)	63 (59,43)	102 (53,68)
CG/C1+/Bx	105 (34,54)	60 (36,14)	34 (32,08)	70 (36,84)
GG/C1+/Bx	19 (6,25)	8 (4,82)	9 (8,49)	18 (9,47)
	N=103 (%)	N=54 (%)	N=38 (%)	N=64 (%)
CC/C2+/AA	60 (58,25)	35 (64,81)	19 (50,00)	34 (53,12)
CG/C2+/AA	33 (32,04)	16 (29,63)	12 (31,58)	23 (35,94)
GG/C2+/AA	10 (9,71)	3 (5,56)	7 (18,42)	7 (10,94)
	N=217 (%)	N=126 (%)	N=72 (%)	N=143 (%)
CC/C2+/Bx	125 (57,60)	76 (60,32)	37 (51,39)	81 (56,64)
CG/C2+/Bx	77 (35,48)	42 (33,33)	30 (41,67)	52 (36,36)
GG/C2+/Bx	15 (6,91)	8 (6,35)	5 (6,94)	10 (6,99)
	N=35 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=28 (%)
CC/C1C1/AA	21 (60,00)	16 (69,57)	2 (33,33)	19 (67,86)
CG/C1C1/AA	12 (34,29)	7 (30,43)	2 (33,33)	8 (28,57)
GG/C1C1/AA	2 (5,71)	**0 (0,00)[d]**	2 (33,33)	1 (3,57)
	N=80 (%)	N=47 (%)	N=24 (%)	N=50 (%)
CC/C1C2/AA	45 (56,25)	31 (65,96)	10 (41,67)	27 (54,00)
CG/C1C2/AA	28 (35,00)	14 (29,79)	9 (37,50)	16 (32,00)
GG/C1C2/AA	7 (8,75)	2 (4,26)	5 (20,83)	7 (14,00)
	N=23 (%)	N=7 (%)	N=14 (%)	N=14 (%)
CC/C2C2/AA	15 (65,22)	4 (57,14)	9 (64,29)	7 (50,00)
CG/C2C2/AA	5 (21,74)	2 (28,57)	3 (21,43)	7 (50,00)
GG/C2C2/AA	3 (13,04)	1 (14,29)	2 (14,29)	0 (0,00)
	N=136 (%)	N=75 (%)	N=45 (%)	N=83 (%)
CC/C1C1/Bx	81 (59,56)	43 (57,33)	28 (62,22)	43 (51,81)
CG/C1C1/Bx	48 (35,29)	29 (38,67)	13 (28,89)	31 (37,35)
GG/C1C1/Bx	7 (5,15)	3 (4,00)	4 (8,89)	9 (10,84)
	N=168 (%)	N=91 (%)	N=61 (%)	N=107 (%)
CC/C1C2/Bx	99 (58,93)	55 (60,44)	35 (57,38)	59 (55,14)
CG/C1C2/Bx	57 (33,93)	31 (34,07)	21 (34,43)	39 (36,45)
GG/C1C2/Bx	12 (7,14)	5 (5,49)	5 (8,20)	9 (8,41)
	N=49 (%)	N=35 (%)	N=11 (%)	N=36 (%)
CC/C2C2/Bx	26 (53,06)	**21 (60,00)[e]**	**2 (18,18)[f]**	22 (61,11)
CG/C2C2/Bx	20 (40,82)	**11 (31,43)[g]**	**9 (81,82)[h]**	13 (36,11)
GG/C2C2/Bx	3 (6,12)	3 (8,57)	0 (0,00)	1 (2,78)
ERAP1 rs26653/HLA-C/KIR	N=115 (%)	N=70 (%)	N=30 (%)	N=78 (%)
GG/C1+/AA	66 (57,39)	40 (57,14)	17 (56,67)	40 (51,28)

ERAP partnera/HLA-C partnera/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CG/C1+/AA	40 (34,78)	27 (38,57)	8 (26,67)	29 (37,18)
CC/C1+/AA	9 (7,83)	3 (4,29)	5 (16,67)	9 (11,54)
	N=304 (%)	N=166 (%)	N=106 (%)	N=190 (%)
GG/C1+/Bx	169 (55,59)	93 (56,02)	59 (55,66)	100 (52,63)
CG/C1+/Bx	110 (36,18)	56 (33,73)	40 (37,74)	79 (41,58)
CC/C1+/Bx	25 (8,22)	17 (10,24)	7 (6,60)	11 (5,79)
	N=103 (%)	N=54 (%)	N=38 (%)	N=64 (%)
GG/C2+/AA	62 (60,19)	30 (55,56)	25 (65,79)	32 (50,00)
CG/C2+/AA	34 (33,01)	21 (38,89)	9 (23,68)	22 (34,38)
CC/C2+/AA	7 (6,80)	3 (5,56)	4 (10,53)	10 (15,62)
	N=217 (%)	N=126 (%)	N=72 (%)	N=143 (%)
GG/C2+/Bx	113 (52,07)	68 (53,97)	37 (51,39)	74 (51,75)
CG/C2+/Bx	81 (37,33)	42 (33,33)	29 (40,28)	60 (41,96)
CC/C2+/Bx	23 (10,60)	16 (12,70)	6 (8,33)	9 (6,29)
	N=35 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=28 (%)
GG/C1C1/AA	20 (57,14)	14 (60,87)	2 (33,33)	16 (57,14)
CG/C1C1/AA	10 (28,57)	8 (34,78)	1 (16,67)	9 (32,14)
CC/C1C1/AA	5 (14,29)	**1 (4,35)[i]**	**3 (50,00)[j]**	3 (10,71)
	N=80 (%)	N=47 (%)	N=24 (%)	N=50 (%)
GG/C1C2/AA	46 (57,50)	26 (55,32)	15 (62,50)	24 (48,00)
CG/C1C2/AA	30 (37,50)	19 (40,43)	7 (29,17)	20 (40,00)
CC/C1C2/AA	4 (5,00)	2 (4,26)	2 (8,33)	6 (12,00)
	N=23 (%)	N=7 (%)	N=14 (%)	N=14 (%)
GG/C2C2/AA	16 (69,57)	4 (57,14)	10 (71,43)	8 (57,14)
CG/C2C2/AA	4 (17,39)	2 (28,57)	2 (14,29)	2 (14,29)
CC/C2C2/AA	3 (13,04)	1 (14,29)	2 (14,29)	4 (28,57)
	N=136 (%)	N=75 (%)	N=45 (%)	N=83 (%)
GG/C1C1/Bx	81 (59,56)	43 (57,33)	28 (62,22)	41 (49,40)
CG/C1C1/Bx	48 (35,29)	27 (36,00)	15 (33,33)	38 (45,78)
CC/C1C1/Bx	7 (5,15)	5 (6,67)	2 (4,44)	4 (4,82)
	N=168 (%)	N=91 (%)	N=61 (%)	N=107 (%)
GG/C1C2/Bx	88 (52,38)	50 (54,95)	31 (50,82)	59 (55,14)
CG/C1C2/Bx	62 (36,90)	29 (31,87)	25 (40,98)	41 (38,32)
CC/C1C2/Bx	18 (10,71)	12 (13,19)	5 (8,20)	7 (6,54)
	N=49 (%)	N=35 (%)	N=11 (%)	N=36 (%)
GG/C2C2/Bx	25 (51,02)	18 (51,43)	6 (54,55)	15 (41,67)
CG/C2C2/Bx	19 (38,78)	13 (37,14)	4 (36,36)	19 (52,78)
CC/C2C2/Bx	5 (10,20)	4 (11,43)	1 (9,09)	2 (5,56)
ERAP1 rs26618/HLA-C/KIR	N=115 (%)	N=70 (%)	N=30 (%)	N=77 (%)
TT/C1+/AA	60 (52,17)	37 (52,86)	18 (60,00)	49 (63,64)
CT/C1+/AA	44 (38,26)	28 (40,00)	8 (26,67)	21 (27,27)
CC/C1+/AA	11 (9,57)	5 (7,14)	4 (13,33)	7 (9,09)
	N=304 (%)	N=166 (%)	N=106 (%)	N=190 (%)
TT/C1+/Bx	155 (50,99)	87 (52,41)	47 (44,34)	91 (47,89)
CT/C1+/Bx	117 (38,49)	63 (37,95)	46 (43,40)	84 (44,21)
CC/C1+/Bx	32 (10,53)	16 (9,64)	13 (12,26)	15 (7,89)

ERAP partnera/HLA-C partnera/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=103 (%)	N=54 (%)	N=38 (%)	N=63 (%)
TT/C2+/AA	55 (53,40)	29 (53,70)	21 (55,26)	42 (66,67)
CT/C2+/AA	35 (33,98)	18 (33,33)	12 (31,58)	14 (22,22)
CC/C2+/AA	13 (12,62)	7 (12,96)	5 (13,16)	7 (11,11)
	N=217 (%)	N=126 (%)	N=72 (%)	N=143 (%)
TT/C2+/Bx	114 (52,53)	66 (52,38)	34 (47,22)	69 (48,25)
CT/C2+/Bx	85 (39,17)	51 (40,48)	30 (41,67)	65 (45,45)
CC/C2+/Bx	18 (8,29)	9 (7,14)	8 (11,11)	9 (6,29)
	N=35 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=28 (%)
TT/C1C1/AA	18 (51,43)	12 (52,17)	5 (83,33)	16 (57,14)
CT/C1C1/AA	16 (45,71)	11 (47,83)	1 (16,67)	9 (32,14)
CC/C1C1/AA	1 (2,86)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (10,71)
	N=80 (%)	N=47 (%)	N=24 (%)	N=49 (%)
TT/C1C2/AA	42 (52,50)	25 (53,19)	13 (54,17)	33 (67,35)
CT/C1C2/AA	28 (35,00)	17 (36,17)	7 (29,17)	12 (24,49)
CC/C1C2/AA	10 (12,50)	5 (10,64)	4 (16,67)	4 (8,16)
	N=23 (%)	N=7 (%)	N=14 (%)	N=14 (%)
TT/C2C2/AA	13 (56,52)	4 (57,14)	8 (57,14)	9 (64,29)
CT/C2C2/AA	7 (30,43)	1 (14,29)	5 (35,71)	2 (14,29)
CC/C2C2/AA	3 (13,04)	2 (28,57)	1 (7,14)	3 (21,43)
	N=136 (%)	N=75 (%)	N=45 (%)	N=83 (%)
TT/C1C1/Bx	64 (47,06)	37 (49,33)	18 (40,00)	40 (48,19)
CT/C1C1/Bx	55 (40,44)	29 (38,67)	21 (46,67)	36 (43,37)
CC/C1C1/Bx	17 (12,50)	9 (12,00)	6 (13,33)	7 (8,43)
	N=168 (%)	N=91 (%)	N=61 (%)	N=107 (%)
TT/C1C2/Bx	91 (54,17)	50 (54,95)	29 (47,54)	51 (47,66)
CT/C1C2/Bx	62 (36,90)	34 (37,36)	25 (40,98)	48 (44,86)
CC/C1C2/Bx	15 (8,93)	7 (7,69)	7 (11,48)	8 (7,48)
	N=49 (%)	N=35 (%)	N=11 (%)	N=36 (%)
TT/C2C2/Bx	23 (46,94)	16 (45,71)	5 (45,45)	18 (50,00)
CT/C2C2/Bx	23 (46,94)	17 (48,57)	5 (45,45)	17 (47,22)
CC/C2C2/Bx	3 (6,12)	2 (5,71)	1 (9,09)	1 (2,78)
ERAP1 rs2287987/HLA-C/KIR	N=115 (%)	N=70 (%)	N=30 (%)	N=77 (%)
TT/C1+/AA	70 (60,87)	40 (57,14)	20 (66,67)	46 (59,74)
CT/C1+/AA	32 (27,83)	19 (27,14)	8 (26,67)	28 (36,36)
CC/C1+/AA	13 (11,30)	**11 (15,71)[k]**	2 (6,67)	3 (3,90)
	N=303 (%)	N=166 (%)	N=105 (%)	N=190 (%)
TT/C1+/Bx	188 (62,05)	108 (65,06)	64 (60,95)	122 (64,21)
CT/C1+/Bx	103 (33,99)	50 (30,12)	38 (36,19)	61 (32,11)
CC/C1+/Bx	12 (3,96)	8 (4,82)	3 (2,86)	7 (3,68)
	N=103 (%)	N=54 (%)	N=38 (%)	N=63 (%)
TT/C2+/AA	60 (58,25)	32 (59,26)	23 (60,53)	40 (63,49)
CT/C2+/AA	31 (30,10)	15 (27,78)	11 (28,95)	21 (33,33)
CC/C2+/AA	12 (11,65)	7 (12,96)	4 (10,53)	2 (3,17)
	N=217 (%)	N=126 (%)	N=72 (%)	N=143 (%)
TT/C2+/Bx	146 (67,28)	85 (67,46)	49 (68,06)	88 (61,54)

ERAP partnera/HLA-C partnera/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
CT/C2+/Bx	63 (29,03)	36 (28,57)	21 (29,17)	50 (34,97)
CC/C2+/Bx	8 (3,69)	5 (3,97)	2 (2,78)	5 (3,50)
	N=35 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=28 (%)
TT/C1C1/AA	23 (65,71)	13 (56,52)	5 (83,33)	17 (60,71)
CT/C1C1/AA	8 (22,86)	6 (26,09)	1 (16,67)	9 (32,14)
CC/C1C1/AA	4 (11,43)	4 (17,39)	0 (0,00)	2 (7,14)
	N=80 (%)	N=47 (%)	N=24 (%)	N=49 (%)
TT/C1C2/AA	47 (58,75)	27 (57,45)	15 (62,50)	29 (59,18)
CT/C1C2/AA	24 (30,00)	13 (27,66)	7 (29,17)	19 (38,78)
CC/C1C2/AA	9 (11,25)	**7 (14,89)[l]**	2 (8,33)	1 (2,04)
	N=23 (%)	N=7 (%)	N=14 (%)	N=14 (%)
TT/C2C2/AA	13 (56,52)	5 (71,43)	8 (57,14)	11 (78,57)
CT/C2C2/AA	7 (30,43)	2 (28,57)	4 (28,57)	2 (14,29)
CC/C2C2/AA	3 (13,04)	0 (0,00)	2 (14,29)	1 (7,14)
	N=135 (%)	N=75 (%)	N=44 (%)	N=83 (%)
TT/C1C1/Bx	75 (55,56)	46 (61,33)	23 (52,27)	53 (63,86)
CT/C1C1/Bx	53 (39,26)	24 (32,00)	20 (45,45)	28 (33,73)
CC/C1C1/Bx	7 (5,19)	5 (6,67)	1 (2,27)	2 (2,41)
	N=168 (%)	N=91 (%)	N=61 (%)	N=107 (%)
TT/C1C2/Bx	113 (67,26)	62 (68,13)	41 (67,21)	69 (64,49)
CT/C1C2/Bx	50 (29,76)	26 (28,57)	18 (29,51)	33 (30,84)
CC/C1C2/Bx	5 (2,98)	3 (3,30)	2 (3,28)	5 (4,67)
	N=49 (%)	N=35 (%)	N=11 (%)	N=36 (%)
TT/C2C2/Bx	33 (67,35)	23 (65,71)	8 (72,73)	19 (52,78)
CT/C2C2/Bx	13 (26,53)	10 (28,57)	3 (27,27)	17 (47,22)
CC/C2C2/Bx	3 (6,12)	2 (5,71)	0 (0,00)	0 (0,00)
ERAP2 rs2248374/HLA-C/KIR	N=114 (%)	N=70 (%)	N=29 (%)	N=78 (%)
AA/C1+/AA	**32 (28,07)[m]**	19 (27,14)	8 (27,59)	12 (15,38)
AG/C1+/AA	52 (45,61)	33 (47,14)	11 (37,93)	40 (51,28)
GG/C1+/AA	30 (26,32)	18 (25,71)	10 (34,48)	26 (33,33)
	N=303 (%)	N=166 (%)	N=105 (%)	N=190 (%)
AA/C1+/Bx	74 (24,42)	43 (25,90)	22 (20,95)	42 (22,11)
AG/C1+/Bx	159 (52,48)	89 (53,61)	53 (50,48)	97 (51,05)
GG/C1+/Bx	70 (23,10)	34 (20,48)	30 (28,57)	51 (26,84)
	N=102 (%)	N=54 (%)	N=37 (%)	N=64 (%)
AA/C2+/AA	29 (28,43)	14 (25,93)	11 (29,73)	13 (20,31)
AG/C2+/AA	47 (46,08)	27 (50,00)	16 (43,24)	26 (40,62)
GG/C2+/AA	26 (25,49)	13 (24,07)	10 (27,03)	25 (39,06)
	N=216 (%)	N=126 (%)	N=71 (%)	N=143 (%)
AA/C2+/Bx	55 (25,46)	34 (26,98)	15 (21,13)	26 (18,18)
AG/C2+/Bx	105 (48,61)	63 (50,00)	35 (49,30)	75 (52,45)
GG/C2+/Bx	56 (25,93)	29 (23,02)	21 (29,58)	42 (29,37)
	N=35 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=28 (%)
AA/C1C1/AA	9 (25,71)	7 (30,43)	1 (16,67)	5 (17,86)
AG/C1C1/AA	16 (45,71)	**9 (39,13)[n]**	2 (33,33)	19 (67,86)
GG/C1C1/AA	10 (28,57)	7 (30,43)	3 (50,00)	4 (14,29)

ERAP partnera/HLA-C partnera/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=79 (%)	N=47 (%)	N=23 (%)	N=50 (%)
AA/C1C2/AA	23 (29,11)	12 (25,53)	7 (30,43)	7 (14,00)
AG/C1C2/AA	36 (45,57)	24 (51,06)	9 (39,13)	21 (42,00)
GG/C1C2/AA	20 (25,32)[o]	11 (23,40)[p]	7 (30,43)	22 (44,00)
	N=23 (%)	N=7 (%)	N=14 (%)	N=14 (%)
AA/C2C2/AA	6 (26,09)	2 (28,57)	4 (28,57)	6 (42,86)
AG/C2C2/AA	11 (47,83)	3 (42,86)	7 (50,00)	5 (35,71)
GG/C2C2/AA	6 (26,09)	2 (28,57)	3 (21,43)	3 (21,43)
	N=136 (%)	N=75 (%)	N=45 (%)	N=83 (%)
AA/C1C1/Bx	32 (23,53)	18 (24,00)	10 (22,22)	21 (25,30)
AG/C1C1/Bx	79 (58,09)	45 (60,00)	23 (51,11)	41 (49,40)
GG/C1C1/Bx	25 (18,38)	12 (16,00)	12 (26,67)	21 (25,30)
	N=167 (%)	N=91 (%)	N=60 (%)	N=107 (%)
AA/C1C2/Bx	42 (25,15)	25 (27,47)	12 (20,00)	21 (19,63)
AG/C1C2/Bx	80 (47,90)	44 (48,35)	30 (50,00)	56 (52,34)
GG/C1C2/Bx	45 (26,95)	22 (24,18)	18 (30,00)	30 (28,04)
	N=49 (%)	N=35 (%)	N=11 (%)	N=36 (%)
AA/C2C2/Bx	13 (26,53)	9 (25,71)	3 (27,27)	5 (13,89)
AG/C2C2/Bx	25 (51,02)	19 (54,29)	5 (45,45)	19 (52,78)
GG/C2C2/Bx	11 (22,45)	7 (20,00)	3 (27,27)	12 (33,33)
ERAP1 rs6861666/HLA-C/KIR	N=115 (%)	N=70 (%)	N=30 (%)	N=73 (%)
AA/C1+/AA	102 (88,70)	62 (88,57)	26 (86,67)	61 (83,56)
AG/C1+/AA	13 (11,30)	8 (11,43)	4 (13,33)	9 (12,33)
GG/C1+/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (4,11)
	N=302 (%)	N=164 (%)	N=106 (%)	N=178 (%)
AA/C1+/Bx	255 (84,44)	142 (86,59)	89 (83,96)	145 (81,46)
AG/C1+/Bx	46 (15,23)	21 (12,80)	17 (16,04)	33 (18,54)
GG/C1+/Bx	1 (0,33)	1 (0,61)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=103 (%)	N=54 (%)	N=38 (%)	N=57 (%)
AA/C2+/AA	92 (89,32)	49 (90,74)	32 (84,21)	47 (82,46)
AG/C2+/AA	11 (10,68)	5 (9,26)	6 (15,79)	8 (14,04)
GG/C2+/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (3,51)
	N=216 (%)	N=125 (%)	N=72 (%)	N=134 (%)
AA/C2+/Bx	179 (82,87)	109 (87,20)	57 (79,17)	114 (85,07)
AG/C2+/Bx	36 (16,67)	15 (12,00)	15 (20,83)	20 (14,93)
GG/C2+/Bx	1 (0,46)	1 (0,80)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=35 (%)	N=23 (%)	N=6 (%)	N=27 (%)
AA/C1C1/AA	31 (88,57)	20 (86,96)	6 (100,00)	23 (85,19)
AG/C1C1/AA	4 (11,43)	3 (13,04)	0 (0,00)	3 (11,11)
GG/C1C1/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,70)
	N=80 (%)	N=47 (%)	N=24 (%)	N=46 (%)
AA/C1C2/AA	71 (88,75)	42 (89,36)	20 (83,33)	38 (82,61)
AG/C1C2/AA	9 (11,25)	5 (10,64)	4 (16,67)	6 (13,04)
GG/C1C2/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (4,35)
	N=23 (%)	N=7 (%)	N=14 (%)	N=11 (%)
AA/C2C2/AA	21 (91,30)	7 (100,00)	12 (85,71)	9 (81,82)

ERAP partnera/HLA-C partnera/KIR kobiety	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
AG/C2C2/AA	2 (8,70)	0 (0,00)	2 (14,29)	2 (18,18)
GG/C2C2/AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=135 (%)	N=74 (%)	N=45 (%)	N=78 (%)
AA/C1C1/Bx	116 (85,93)	63 (85,14)	40 (88,89)	59 (75,64)
AG/C1C1/Bx	19 (14,07)	11 (14,86)	5 (11,11)	19 (24,36)
GG/C1C1/Bx	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=167 (%)	N=90 (%)	N=61 (%)	N=100 (%)
AA/C1C2/Bx	139 (83,23)	79 (87,78)	49 (80,33)	86 (86,00)
AG/C1C2/Bx	27 (16,17)	10 (11,11)	12 (19,67)	14 (14,00)
GG/C1C2/Bx	1 (0,60)	1 (1,11)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=49 (%)	N=35 (%)	N=11 (%)	N=34 (%)
AA/C2C2/Bx	40 (81,63)	30 (85,71)	8 (72,73)	28 (82,35)
AG/C2C2/Bx	9 (18,37)	5 (14,29)	3 (27,27)	6 (17,65)
GG/C2C2/Bx	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x6 dla kombinacji genotypów ERAP z HLA-C C1+ lub C2+ oraz AA lub Bx; x9 dla kombinacji genotypów ERAP, HLA-C z KIR AA lub Bx); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice.

IVF *vs.* kontrola płodna: $^{m}p/p_{corr.}$=0,054/ns, OR=2,138, 95% CI (0,98-4,93); $^{o}p/p_{corr.}$=0,034/ns, OR=0,434, 95% CI (0,19-0,98)

RIF *vs.* kontrola płodna: $^{k}p/p_{corr.}$=0,022/ns, OR=4,554, 95% CI (1,13-26,58); $^{l}p/p_{corr.}$=0,029/ns, OR=8,246, 95% CI (0,99-385,54); $^{n}p/p_{corr.}$=0,052/ns, OR=0,312, 95% CI (0,08-1,11); $^{p}p/p_{corr.}$=0,053/ns, OR=0,393, 95% CI (0,15-1,01)

SIVF *vs.* kontrola płodna: $^{f}p/p_{corr.}$=0,017/ns, OR=0,147, 95% CI (0,01-0,86); $^{h}p/p_{corr.}$=0,014/ns, OR=7,606, 95% CI (1,30-82,62); $^{j}p/p_{corr.}$=0,053/ns, OR=7,582, 95% CI (0,70-91,51)

RIF *vs.* SIVF: $^{a}p/p_{corr.}$=0,039/ns, OR=0,243, 95% CI (0,05-1,07); $^{b}p/p_{corr.}$=0,015/ns, OR=0,129, 95% CI (0,01-0,73); $^{c}p/p_{corr.}$=0,005/0,031, OR=0,114, 95% CI (0,01-0,66); $^{d}p/p_{corr.}$=0,046/ns, OR=0,000, 95% CI (0,00-1,47); $^{e}p/p_{corr.}$=0,014/ns, OR=7,501, 95% CI (1,26-82,40); $^{g}p/p_{corr.}$=0,004/0,033, OR=0,096, 95% CI (0,01-0,56); $^{i}p/p_{corr.}$=0,022/ns, OR=0,057, 95% CI (0,00-0,95)

Tabela 22S. Częstość kombinacji alleli *HLA-C* i *ERAP* kobiety z *HLA-C* partnera wśród par poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kontroli płodnej.

HLA-C kobiety/ERAP kobiety/HLA-C mężczyzny	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
HLA-C K/ERAP1 rs30187 K/HLA-C M	N=343 (%)	N=193 (%)	N=113 (%)	N=234 (%)
C1+/CC/C1+	154 (44,90)	80 (41,45)	53 (46,90)	109 (46,58)
C1+/CT/C1+	152 (44,31)	92 (47,67)	47 (41,59)	105 (44,87)
C1+/TT/C1+	37 (10,79)	21 (10,88)	13 (11,50)	20 (8,55)
	N=260 (%)	N=141 (%)	N=91 (%)	N=179 (%)
C1+/CC/C2+	118 (45,38)	61 (43,26)	43 (47,25)	91 (50,84)
C1+/CT/C2+	112 (43,08)	62 (43,97)	39 (42,86)	76 (42,46)
C1+/TT/C2+	30 (11,54)	18 (12,77)	9 (9,89)	12 (6,70)
	N=285 (%)	N=157 (%)	N=95 (%)	N=170 (%)
C2+/CC/C1+	126 (44,21)	61 (38,85)	46 (48,42)	80 (47,06)

HLA-C kobiety/ERAP kobiety/HLA-C mężczyzny	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
C2+/CT/C1+	128 (44,91)	74 (47,13)	42 (44,21)	81 (47,65)
C2+/TT/C1+	31 (10,88)	**22 (14,01)[a]**	7 (7,37)	9 (5,29)
	N=210 (%)	N=121 (%)	N=71 (%)	N=132 (%)
C2+/CC/C2+	95 (45,24)	51 (42,15)	34 (47,89)	66 (50,00)
C2+/CT/C2+	89 (42,38)	51 (42,15)	32 (45,07)	57 (43,18)
C2+/TT/C2+	26 (12,38)	**19 (15,70)[b]**	5 (7,04)	9 (6,82)
HLA-C K/ERAP1 rs27044 K/HLA-C M	N=343 (%)	N=193 (%)	N=113 (%)	N=234 (%)
C1+/CC/C1+	184 (53,64)	97 (50,26)	61 (53,98)	139 (59,40)
C1+/CG/C1+	135 (39,36)	82 (42,49)	44 (38,94)	78 (33,33)
C1+/GG/C1+	24 (7,00)	14 (7,25)	8 (7,08)	17 (7,26)
	N=260 (%)	N=141 (%)	N=91 (%)	N=179 (%)
C1+/CC/C2+	140 (53,85)	**71 (50,35)[c]**	49 (53,85)	113 (63,13)
C1+/CG/C2+	101 (38,85)	57 (40,43)	37 (40,66)	54 (30,17)
C1+/GG/C2+	19 (7,31)	13 (9,22)	5 (5,49)	12 (6,70)
	N=285 (%)	N=157 (%)	N=95 (%)	N=170 (%)
C2+/CC/C1+	155 (54,39)	78 (49,68)	53 (55,79)	99 (58,24)
C2+/CG/C1+	112 (39,30)	68 (43,31)	37 (38,95)	65 (38,24)
C2+/GG/C1+	18 (6,32)	11 (7,01)	5 (5,26)	6 (3,53)
	N=210 (%)	N=121 (%)	N=71 (%)	N=132 (%)
C2+/CC/C2+	113 (53,81)	61 (50,41)	37 (52,11)	78 (59,09)
C2+/CG/C2+	83 (39,52)	49 (40,50)	32 (45,07)	47 (35,61)
C2+/GG/C2+	14 (6,67)	11 (9,09)	2 (2,82)	7 (5,30)
HLA-C K/ERAP1 rs26653 K/HLA-C M	N=343 (%)	N=193 (%)	N=113 (%)	N=232 (%)
C1+/GG/C1+	195 (56,85)	107 (55,44)	64 (56,64)	121 (52,16)
C1+/CG/C1+	132 (38,48)	78 (40,41)	45 (39,82)	97 (41,81)
C1+/CC/C1+	16 (4,66)	8 (4,15)	4 (3,54)	14 (6,03)
	N=260 (%)	N=141 (%)	N=91 (%)	N=178 (%)
C1+/GG/C2+	151 (58,08)	80 (56,74)	54 (59,34)	99 (55,62)
C1+/CG/C2+	94 (36,15)	53 (37,59)	35 (38,46)	71 (39,89)
C1+/CC/C2+	15 (5,77)	8 (5,67)	2 (2,20)	8 (4,49)
	N=285 (%)	N=157 (%)	N=95 (%)	N=168 (%)
C2+/GG/C1+	158 (55,44)	81 (51,59)	57 (60,00)	95 (56,55)
C2+/CG/C1+	116 (40,70)	70 (44,59)	34 (35,79)	66 (39,29)
C2+/CC/C1+	11 (3,86)	6 (3,82)	4 (4,21)	7 (4,17)
	N=210 (%)	N=121 (%)	N=71 (%)	N=131 (%)
C2+/GG/C2+	119 (56,67)	66 (54,55)	43 (60,56)	77 (58,78)
C2+/CG/C2+	81 (38,57)	50 (41,32)	25 (35,21)	48 (36,64)
C2+/CC/C2+	10 (4,76)	5 (4,13)	3 (4,23)	6 (4,58)
HLA-C K/ERAP1 rs26618 K/HLA-C M	N=343 (%)	N=193 (%)	N=113 (%)	N=234 (%)
C1+/TT/C1+	174 (50,73)	103 (53,37)	55 (48,67)	112 (47,86)
C1+/CT/C1+	143 (41,69)	76 (39,38)	47 (41,59)	103 (44,02)
C1+/CC/C1+	26 (7,58)	14 (7,25)	11 (9,73)	19 (8,12)
	N=260 (%)	N=141 (%)	N=91 (%)	N=179 (%)
C1+/TT/C2+	136 (52,31)	82 (58,16)	42 (46,15)	86 (48,04)
C1+/CT/C2+	103 (39,62)	48 (34,04)	41 (45,05)	76 (42,46)
C1+/CC/C2+	21 (8,08)	11 (7,80)	8 (8,79)	17 (9,50)
	N=285 (%)	N=157 (%)	N=95 (%)	N=170 (%)

HLA-C kobiety/ERAP kobiety/HLA-C mężczyzny	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
C2+/TT/C1+	156 (54,74)	95 (60,51)[d]	46 (48,42)	79 (46,47)
C2+/CT/C1+	109 (38,25)	55 (35,03)	39 (41,05)	78 (45,88)
C2+/CC/C1+	20 (7,02)	7 (4,46)	10 (10,53)	13 (7,65)
	N=210 (%)	N=121 (%)	N=71 (%)	N=132 (%)
C2+/TT/C2+	113 (53,81)	74 (61,16)[e,f]	31 (43,66)	62 (46,97)
C2+/CT/C2+	80 (38,10)	41 (33,88)	31 (43,66)	59 (44,70)
C2+/CC/C2+	17 (8,10)	6 (4,96)	9 (12,68)	11 (8,33)
HLA-C K/ERAP1 rs2287987 K/HLA-C M	N=343 (%)	N=193 (%)	N=113 (%)	N=234 (%)
C1+/TT/C1+	209 (60,93)	116 (60,10)	75 (66,37)	146 (62,39)
C1+/CT/C1+	117 (34,11)	69 (35,75)	31 (27,43)	82 (35,04)
C1+/CC/C1+	17 (4,96)	8 (4,15)	7 (6,19)	6 (2,56)
	N=260 (%)	N=141 (%)	N=91 (%)	N=179 (%)
C1+/TT/C2+	160 (61,54)	86 (60,99)	58 (63,74)	105 (58,66)
C1+/CT/C2+	84 (32,31)	47 (33,33)	27 (29,67)	68 (37,99)
C1+/CC/C2+	16 (6,15)	8 (5,67)	6 (6,59)	6 (3,35)
	N=285 (%)	N=157 (%)	N=95 (%)	N=170 (%)
C2+/TT/C1+	174 (61,05)	93 (59,24)	62 (65,26)	109 (64,12)
C2+/CT/C1+	95 (33,33)	56 (35,67)	27 (28,42)	55 (32,35)
C2+/CC/C1+	16 (5,61)	8 (5,10)	6 (6,32)	6 (3,53)
	N=210 (%)	N=121 (%)	N=71 (%)	N=132 (%)
C2+/TT/C2+	132 (62,86)	75 (61,98)	46 (64,79)	82 (62,12)
C2+/CT/C2+	65 (30,95)	39 (32,23)	21 (29,58)	46 (34,85)
C2+/CC/C2+	13 (6,19)	7 (5,79)	4 (5,63)	4 (3,03)
HLA-C K/ERAP2 rs2248374 K/HLA-C M	N=342 (%)	N=192 (%)	N=113 (%)	N=232 (%)
C1+/AA/C1+	96 (28,07)	52 (27,08)	37 (32,74)	65 (28,02)
C1+/AG/C1+	163 (47,66)	91 (47,40)	52 (46,02)	116 (50,00)
C1+/GG/C1+	83 (24,27)	49 (25,52)	24 (21,24)	51 (21,98)
	N=259 (%)	N=140 (%)	N=91 (%)	N=178 (%)
C1+/AA/C2+	73 (28,19)	36 (25,71)	33 (36,26)	48 (26,97)
C1+/AG/C2+	127 (49,03)	66 (47,14)	43 (47,25)	88 (49,44)
C1+/GG/C2+	59 (22,78)	38 (27,14)	15 (16,48)	42 (23,60)
	N=284 (%)	N=156 (%)	N=95 (%)	N=168 (%)
C2+/AA/C1+	67 (23,59)	36 (23,08)	26 (27,37)	45 (26,79)
C2+/AG/C1+	140 (49,30)	77 (49,36)	44 (46,32)	83 (49,40)
C2+/GG/C1+	77 (27,11)	43 (27,56)	25 (26,32)	40 (23,81)
	N=209 (%)	N=120 (%)	N=71 (%)	N=131 (%)
C2+/AA/C2+	53 (25,36)	26 (21,67)	24 (33,80)	30 (22,90)
C2+/AG/C2+	102 (48,80)	59 (49,17)	31 (43,66)	64 (48,85)
C2+/GG/C2+	54 (25,84)	35 (29,17)	16 (22,54)	37 (28,24)
HLA-C K/ERAP1 rs6861666 K/HLA-C M	N=342 (%)	N=192 (%)	N=113 (%)	N=231 (%)
C1+/AA/C1+	294 (85,96)	161 (83,85)	98 (86,73)	202 (87,45)
C1+/AG/C1+	47 (13,74)	30 (15,62)	15 (13,27)	29 (12,55)
C1+/GG/C1+	1 (0,29)	1 (0,52)	0 (0,00)	0 (0,00)
	N=259 (%)	N=140 (%)	N=91 (%)	N=177 (%)
C1+/AA/C2+	219 (84,56)	118 (84,29)	76 (83,52)	153 (86,44)
C1+/AG/C2+	40 (15,44)	22 (15,71)	15 (16,48)	24 (13,56)
C1+/GG/C2+	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)

HLA-C kobiety/ERAP kobiety/HLA-C mężczyzny	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
	N=284 (%)	N=156 (%)	N=95 (%)	N=166 (%)
C2+/AA/C1+	248 (87,32)	134 (85,90)	82 (86,32)	141 (84,94)
C2+/AG/C1+	34 (11,97)	21 (13,46)	12 (12,63)	25 (15,06)
C2+/GG/C1+	2 (0,70)	1 (0,64)	1 (1,05)	0 (0,00)
	N=209 (%)	N=120 (%)	N=71 (%)	N=130 (%)
C2+/AA/C2+	185 (88,52)	107 (89,17)	62 (87,32)	106 (81,54)
C2+/AG/C2+	24 (11,48)	13 (10,83)	9 (12,68)	23 (17,69)
C2+/GG/C2+	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,77)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x12 dla możliwych alleli HLA-C); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice.

RIF *vs.* kontrola płodna: [a]$p/p_{corr.}$=0,008/ns, OR=2,906, 95% CI (1,24-7,42); [b]$p/p_{corr.}$=0,028/ns, OR=2,537, 95% CI (1,04-6,66); [c]$p/p_{corr.}$=0,023/ns, OR=0,593, 95% CI (0,37-0,95); [d]$p/p_{corr.}$=0,015/ns, OR=1,762, 95% CI (1,11-2,81); [e]$p/p_{corr.}$=0,032/ns, OR=1,774, 95% CI (1,05-3,03)

RIF *vs.* SIVF: [f]$p/p_{corr.}$=0,024/ns, OR=2,024, 95% CI (1,07-3,85)

Tabela 23S. Częstość kombinacji alleli *HLA-C* kobiety i *ERAP/HLA-C* partnera wśród par poddających się zapłodnieniu *in vitro* oraz kontroli.

HLA-C kobiety/ERAP mężczyzny/HLA-C mężczyzny	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
HLA-C K/ERAP1 rs30187 M/HLA-C M	N=343 (%)	N=193 (%)	N=113 (%)	N=231 (%)
C1+/CC/C1+	181 (52,77)	104 (53,89)	59 (52,21)	105 (45,45)
C1+/CT/C1+	128 (37,32)	72 (37,31)	39 (34,51)	99 (42,86)
C1+/TT/C1+	34 (9,91)	17 (8,81)	15 (13,27)	27 (11,69)
	N=260 (%)	N=141 (%)	N=91 (%)	N=177 (%)
C1+/CC/C2+	**131 (50,38)[a]**	**74 (52,48)[b]**	43 (47,25)	72 (40,68)
C1+/CT/C2+	100 (38,46)	53 (37,59)	35 (38,46)	84 (47,46)
C1+/TT/C2+	29 (11,15)	14 (9,93)	13 (14,29)	21 (11,86)
	N=285 (%)	N=157 (%)	N=95 (%)	N=166 (%)
C2+/CC/C1+	135 (47,37)	77 (49,04)	46 (48,42)	72 (43,37)
C2+/CT/C1+	120 (42,11)	62 (39,49)	38 (40,00)	75 (45,18)
C2+/TT/C1+	30 (10,53)	18 (11,46)	11 (11,58)	19 (11,45)
	N=210 (%)	N=121 (%)	N=71 (%)	N=129 (%)
C2+/CC/C2+	95 (45,24)	56 (46,28)	32 (45,07)	49 (37,98)
C2+/CT/C2+	91 (43,33)	50 (41,32)	31 (43,66)	68 (52,71)
C2+/TT/C2+	24 (11,43)	15 (12,40)	8 (11,27)	12 (9,30)
HLA-C K/ERAP1 rs27044 M/HLA-C M	N=343 (%)	N=193 (%)	N=113 (%)	N=231 (%)
C1+/CC/C1+	209 (60,93)	123 (63,73)	63 (55,75)	128 (55,41)
C1+/CG/C1+	110 (32,07)	62 (32,12)	36 (31,86)	83 (35,93)
C1+/GG/C1+	24 (7,00)	**8 (4,15)[c]**	14 (12,39)	20 (8,66)
	N=260 (%)	N=141 (%)	N=91 (%)	N=177 (%)
C1+/CC/C2+	155 (59,62)	**92 (65,25)[d,e]**	45 (49,45)	94 (53,11)
C1+/CG/C2+	85 (32,69)	41 (29,08)	36 (39,56)	68 (38,42)

HLA-C kobiety/ERAP mężczyzny/HLA-C mężczyzny	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
C1+/GG/C2+	20 (7,69)	8 (5,67)	10 (10,99)	15 (8,47)
	N=285 (%)	N=157 (%)	N=95 (%)	N=166 (%)
C2+/CC/C1+	159 (55,79)	92 (58,60)	50 (52,63)	87 (52,41)
C2+/CG/C1+	104 (36,49)	56 (35,67)	33 (34,74)	63 (37,95)
C2+/GG/C1+	22 (7,72)	9 (5,73)	12 (12,63)	16 (9,64)
	N=210 (%)	N=121 (%)	N=71 (%)	N=129 (%)
C2+/CC/C2+	112 (53,33)	67 (55,37)	35 (49,30)	65 (50,39)
C2+/CG/C2+	79 (37,62)	44 (36,36)	28 (39,44)	54 (41,86)
C2+/GG/C2+	19 (9,05)	10 (8,26)	8 (11,27)	10 (7,75)
HLA-C K/ERAP1 rs26653 M/HLA-C M	N=343 (%)	N=193 (%)	N=113 (%)	N=231 (%)
C1+/GG/C1+	191 (55,69)	108 (55,96)	62 (54,87)	120 (51,95)
C1+/CG/C1+	127 (37,03)	71 (36,79)	42 (37,17)	97 (41,99)
C1+/CC/C1+	25 (7,29)	14 (7,25)	9 (7,96)	14 (6,06)
	N=260 (%)	N=141 (%)	N=91 (%)	N=177 (%)
C1+/GG/C2+	141 (54,23)	78 (55,32)	48 (52,75)	89 (50,28)
C1+/CG/C2+	97 (37,31)	51 (36,17)	34 (37,36)	72 (40,68)
C1+/CC/C2+	22 (8,46)	12 (8,51)	9 (9,89)	16 (9,04)
	N=285 (%)	N=157 (%)	N=95 (%)	N=166 (%)
C2+/GG/C1+	161 (56,49)	90 (57,32)	53 (55,79)	89 (53,61)
C2+/CG/C1+	98 (34,39)	51 (32,48)	34 (35,79)	63 (37,95)
C2+/CC/C1+	26 (9,12)	16 (10,19)	8 (8,42)	14 (8,43)
	N=210 (%)	N=121 (%)	N=71 (%)	N=129 (%)
C2+/GG/C2+	115 (54,76)	65 (53,72)	41 (57,75)	65 (50,39)
C2+/CG/C2+	75 (35,71)	43 (35,54)	24 (33,80)	50 (38,76)
C2+/CC/C2+	20 (9,52)	13 (10,74)	6 (8,45)	14 (10,85)
HLA-C K/ERAP1 rs26618 M/HLA-C M	N=343 (%)	N=193 (%)	N=113 (%)	N=231 (%)
C1+/TT/C1+	171 (49,85)	102 (52,85)	49 (43,36)	118 (51,08)
C1+/CT/C1+	136 (39,65)	76 (39,38)	48 (42,48)	94 (40,69)
C1+/CC/C1+	36 (10,50)	15 (7,77)	16 (14,16)	19 (8,23)
	N=260 (%)	N=141 (%)	N=91 (%)	N=177 (%)
C1+/TT/C2+	135 (51,92)	74 (52,48)	43 (47,25)	93 (52,54)
C1+/CT/C2+	100 (38,46)	55 (39,01)	37 (40,66)	69 (38,98)
C1+/CC/C2+	25 (9,62)	12 (8,51)	11 (12,09)	15 (8,47)
	N=285 (%)	N=157 (%)	N=95 (%)	N=165 (%)
C2+/TT/C1+	145 (50,88)	80 (50,96)	46 (48,42)	86 (52,12)
C2+/CT/C1+	108 (37,89)	59 (37,58)	37 (38,95)	63 (38,18)
C2+/CC/C1+	32 (11,23)	18 (11,46)	12 (12,63)	16 (9,70)
	N=210 (%)	N=121 (%)	N=71 (%)	N=128 (%)
C2+/TT/C2+	106 (50,48)	60 (49,59)	34 (47,89)	67 (52,34)
C2+/CT/C2+	83 (39,52)	49 (40,50)	28 (39,44)	50 (39,06)
C2+/CC/C2+	21 (10,00)	12 (9,92)	9 (12,68)	11 (8,59)
HLA-C K/ERAP1 rs2287987 M/HLA-C M	N=342 (%)	N=193 (%)	N=112 (%)	N=231 (%)
C1+/TT/C1+	218 (63,74)	120 (62,18)	76 (67,86)	142 (61,47)
C1+/CT/C1+	103 (30,12)	57 (29,53)	31 (27,68)	81 (35,06)
C1+/CC/C1+	21 (6,14)	16 (8,29)[f]	5 (4,46)	8 (3,46)
	N=260 (%)	N=141 (%)	N=91 (%)	N=177 (%)
C1+/TT/C2+	171 (65,77)	90 (63,83)	65 (71,43)	111 (62,71)

HLA-C kobiety/ERAP mężczyzny/HLA-C mężczyzny	IVF	RIF	SIVF	Kontrola płodna
C1+/CT/C2+	72 (27,69)	41 (29,08)	21 (23,08)	61 (34,46)
C1+/CC/C2+	17 (6,54)	10 (7,09)	5 (5,49)	5 (2,82)
	N=284 (%)	N=157 (%)	N=94 (%)	N=165 (%)
C2+/TT/C1+	177 (62,32)	102 (64,97)	58 (61,70)	110 (66,67)
C2+/CT/C1+	91 (32,04)	44 (28,03)	32 (34,04)	49 (29,70)
C2+/CC/C1+	16 (5,63)	11 (7,01)	4 (4,26)	6 (3,64)
	N=210 (%)	N=121 (%)	N=71 (%)	N=128 (%)
C2+/TT/C2+	136 (64,76)	82 (67,77)	45 (63,38)	87 (67,97)
C2+/CT/C2+	63 (30,00)	34 (28,10)	22 (30,99)	37 (28,91)
C2+/CC/C2+	11 (5,24)	5 (4,13)	4 (5,63)	4 (3,12)
HLA-C K/ERAP2 rs2248374 M/HLA-C M	N=341 (%)	N=193 (%)	N=111 (%)	N=231 (%)
C1+/AA/C1+	**93 (27,27)[g]**	53 (27,46)	29 (26,13)	46 (19,91)
C1+/AG/C1+	170 (49,85)	101 (52,33)	50 (45,05)	124 (53,68)
C1+/GG/C1+	78 (22,87)	39 (20,21)	32 (28,83)	61 (26,41)
	N=258 (%)	N=141 (%)	N=89 (%)	N=177 (%)
C1+/AA/C2+	**74 (28,68)[h]**	**41 (29,08)[i]**	24 (26,97)	33 (18,64)
C1+/AG/C2+	123 (47,67)	73 (51,77)	40 (44,94)	89 (50,28)
C1+/GG/C2+	61 (23,64)	**27 (19,15)[j]**	25 (28,09)	55 (31,07)
	N=284 (%)	N=157 (%)	N=94 (%)	N=166 (%)
C2+/AA/C1+	72 (25,35)	44 (28,03)	21 (22,34)	34 (20,48)
C2+/AG/C1+	141 (49,65)	79 (50,32)	43 (45,74)	86 (51,81)
C2+/GG/C1+	71 (25,00)	34 (21,66)	30 (31,91)	46 (27,71)
	N=209 (%)	N=121 (%)	N=70 (%)	N=129 (%)
C2+/AA/C2+	58 (27,75)	33 (27,27)	20 (28,57)	27 (20,93)
C2+/AG/C2+	95 (45,45)	61 (50,41)	29 (41,43)	64 (49,61)
C2+/GG/C2+	56 (26,79)	27 (22,31)	21 (30,00)	38 (29,46)
HLA-C K/ERAP1 rs6861666 M/HLA-C M	N=341 (%)	N=191 (%)	N=113 (%)	N=219 (%)
C1+/AA/C1+	289 (84,75)	167 (87,43)	94 (83,19)	183 (83,56)
C1+/AG/C1+	51 (14,96)	23 (12,04)	19 (16,81)	34 (15,53)
C1+/GG/C1+	1 (0,29)	1 (0,52)	0 (0,00)	2 (0,91)
	N=259 (%)	N=140 (%)	N=91 (%)	N=167 (%)
C1+/AA/C2+	218 (84,17)	124 (88,57)	72 (79,12)	142 (85,03)
C1+/AG/C2+	40 (15,44)	**15 (10,71)[k]**	19 (20,88)	23 (13,77)
C1+/GG/C2+	1 (0,39)	1 (0,71)	0 (0,00)	2 (1,20)
	N=284 (%)	N=156 (%)	N=95 (%)	N=154 (%)
C2+/AA/C1+	**246 (86,62)[l]**	134 (85,90)	84 (88,42)	121 (78,57)
C2+/AG/C1+	37 (13,03)	21 (13,46)	11 (11,58)	30 (19,48)
C2+/GG/C1+	1 (0,35)	1 (0,64)	0 (0,00)	3 (1,95)
	N=210 (%)	N=121 (%)	N=71 (%)	N=117 (%)
C2+/AA/C2+	182 (86,67)	106 (87,60)	62 (87,32)	95 (81,20)
C2+/AG/C2+	27 (12,86)	14 (11,57)	9 (12,68)	20 (17,09)
C2+/GG/C2+	1 (0,48)	1 (0,83)	0 (0,00)	2 (1,71)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zapłodnieniu pozaustrojowym *in vitro*; SIVF – klinicznie zaawansowana ciąża po zapłodnieniu *in vitro*; p – istotność statystyczna; $p_{corr.}$ – istotność po korekcie Bonferroniego dla wielokrotnych porównań (x12 dla możliwych alleli HLA-C); OR – iloraz szans; 95% CI – przedział ufności; ns – (*not significant* – brak istotności statystycznej). Wartości pogrubione oznaczają istotne statystycznie różnice.

IVF *vs.* kontrola plodna: [a]$p/p_{corr.}$=0,051/ns, OR=1,480, 95% CI (0,99-2,22); [g]$p/p_{corr.}$=0,047/ns, OR=1,507, 95% CI (0,99-2,31); [h]$p/p_{corr.}$=0,018/ns, OR=1,753, 95% CI (1,08-2,89); [l]$p/p_{corr.}$=0,041/ns, OR=1,763, 95% CI (1,02-3,05);

RIF *vs.* kontrola plodna: [b]$p/p_{corr.}$=0,042/ns, OR=1,608, 95% CI (1,01-2,58); [d]$p/p_{corr.}$=0,030/ns, OR=1,655, 95% CI (1,03-2,69); [f]$p/p_{corr.}$=0,036/ns, OR=2,514, 95% CI (0,99-6,95); [i]$p/p_{corr.}$=0,033/ns, OR=1,786, 95% CI (1,02-3,13); [j]$p/p_{corr.}$=0,020/ns, OR=0,526, 95% CI (0,30-0,92);

RIF *vs.* SIVF: [c]$p/p_{corr.}$=0,011/ns, OR=0,307, 95% CI (0,11-0,82); [e]$p/p_{corr.}$=0,020/ns, OR=1,914, 95% CI (1,08-3,40); [k]$p/p_{corr.}$=0,038/ns, OR=0,456, 95% CI (0,20-1,01)