

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

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 antigen* – 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.