

Niepłodność oraz trudności związane z zajściem w ciążę stanowią w dzisiejszym świecie coraz większy problem. Obecnie kobiety decydują się najpierw na osiągnięcie określonego poziomu wykształcenia oraz stabilizacji ekonomicznej, a dopiero potem (około 30-tych lat) na macierzyństwo, a przecież płodność kobiety jest uwarunkowana jej wiekiem. Z tego też względu coraz więcej z nich wymaga technik wspomaganego rozrodu (ART ang. assisted reproductive technology). Techniki wspomaganego rozrodu, do których należy zapłodnienie *in vitro* (IVF) często są ostatnią szansą na posiadanie własnego dziecka. Pomimo znacznego postępu tych technik, około 10% kobiet poddających się zabiegowi *in vitro*, doświadcza nawracających niepowodzeń implantacji zarodka (RIF, ang. recurrent implantation failure). Możemy mówić o tym zaburzeniu, gdy kobieta w wieku poniżej 40 lat poddała się co najmniej trzem procedurom IVF, w których były przeniesione przynajmniej cztery dobrej jakości zarodki i pomimo tego nie zaszła w ciążę. Ponad 50% takich przypadków wciąż pozostaje niewyjaśnione. Dlaczego więc nie wszystkim zarodkom udaje się prawidłowa implantacja do macicy? W poszukiwaniach przyczyn tych niepowodzeń, ważne jest lepsze poznanie układu immunologicznego, a konkretniej mechanizmów tolerancji immunologicznej matki wobec obcego antygenowo zarodka i płodu.

W czasie implantacji i wczesnej ciąży największą populację w macicy stanowią maciczne komórki NK. Na ich powierzchni znajdują się receptory, m.in. receptory immunoglobulinopodobne KIR. Receptory te mogą rozpoznawać swoiste ligandy, które znajdują się na powierzchni zagnieżdżającego się zarodka. Takimi ligandami są antygeny leukocytarne HLA klasy I (HLA-C, HLA-G), które w połowie pochodzą od matki, jak i od ojca. W badaniach prowadzonych w naszym laboratorium analizujemy zróżnicowanie (polimorfizm) genów, które kodują receptory KIR i ich ligandy HLA u par z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka po zabiegu *in vitro*. To od właściwej interakcji antygenów HLA na komórkach powstającego łożyska (trofoblastu) z receptorami KIR na komórkach NK w macicy, może zależeć odpowiedź tychże komórek NK na rozwijający się zarodek. W związku z tym polimorfizm tych genów pochodzenia zarówno matczynego, jak i ojcowskiego, może warunkować udaną implantację. W czasie interakcji KIR-HLA dochodzi również do prezentacji peptydu antygenowego w kontekście HLA. Okazuje się, że większość peptydów antygenowych prezentowanych przez HLA powstaje przez ich cięcie do odpowiedniej długości przez aminopeptydazy siateczki śródplazmatycznej ERAP1 i ERAP2. Jeśli te aminopeptydazy i ich genetyczne zróżnicowanie mają wpływ na powstawanie odpowiedniego kompleksu peptyd antygenowy - HLA-C i/lub HLA-G zarodka, prezentowanego odpowiednim receptorom, to może mieć to znaczący wpływ na niepowodzenia implantacji. Wydaje się, że hipoteza ta jest uzasadniona. Nasze badania wstępne wykazały istotne różnice w polimorfizmie genów ERAP pomiędzy kobietami doświadczającymi nawracających spontanicznych poronień, kobietami cierpiącymi na RIF oraz zdrowymi kobietami płodnymi.

Głównym celem tego projektu jest zbadanie roli aminopeptydaz siateczki śródplazmatycznej ERAP1 i ERAP2 u pacjentek z RIF, co jest niejako kontynuacją prac badawczych nad rolą KIR i HLA oraz może być brakującym elementem w zrozumieniu patomechanizmu zaburzeń rozrodu. Kobiety, którym udało się zająć w ciążę po zabiegu *in vitro* oraz kobiety płodne, posiadające przynajmniej dwójkę zdrowo urodzonych dzieci będą stanowić grupy kontrolne. Zastosowanie techniki PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR) pozwoli ocenić polimorfizm genów ERAP u kobiet z RIF jak również ich partnerów. Dodatkowo zbadana zostanie ilość aminopeptydaz u kobiet z RIF przed i po procedurze IVF-ET (IVF-embryo transfer) w osoczu krwi testem ELISA, co pozwoli nam połączyć genetykę ERAP z ich sekrecją do krwi obwodowej i przybliży nam rolę obu aminopeptydaz w RIF. Co więcej, analizie poddane będą również kombinacje polimorfizmu *ERAP*, *KIR*, *HLA-C*, *HLA-G* wśród par cierpiących na RIF. Być może różne genetyczne warianty *HLA* w połączeniu z pewnymi zestawami genów *KIR* i *ERAP* mają wpływ na nawracające niepowodzenia implantacji zarodka po zabiegu *in vitro*.

W projekcie chcemy również zbadać profil immunologiczny (poziom cytokin pro- i przeciwzapalnych oraz czynników wzrostowych) kobiet przed i po zabiegu *in vitro* w osoczu pacjentek. Ma to na celu sprawdzenie czy odmienne protokoły stymulacji jajników, jakim poddawane są pacjentki w celu pobrania jak największej liczby komórek jajowych do IVF, a także sama procedura IVF-ET, mogą mieć wpływ na powstawanie reakcji zapalnych. Ponieważ dowiedziono, że ERAP1 złuszcza receptory dla cytokin, m.in. dla TNFR- α i ILR-6, jego wpływ na poziom tychże cytokin i ich receptorów w trakcie implantacji może być istotny. Istotnym faktem jest również to, że w praktyce klinicznej w Polsce pacjentki nie są poddawane rutynowo testom określającym poziom cytokin pro- i przeciwzapalnych oraz czynników wzrostowych.

Wierzmy, że badania wykonywane w tym projekcie poszerzą wiedzę dotyczącą 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. Nasze badania mogą okazać się pomocne w diagnostyce RIF i prognozowaniu wyników terapii oraz mogą przyczynić się do wyjaśnienia patogenezy tej choroby.