

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

---

# Testarea receptivității endometriale în diagnosticul și tratamentul personalizat al pacientelor cu eșec repetat de implantare

---

Doctorand **Radu Harșa**

---

Conducător de doctorat **Prof. dr. Florin Stamatian**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b> .....	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOASTERII</b> .....	15
<b>1. Eșecul repetat de implantare</b> .....	17
1.1 Definiție .....	17
1.2 Incidență.....	17
1.3 Etiologie.....	18
1.3.1. Factori anatomici .....	18
1.3.2. Factori endocrini.....	19
1.3.3. Factori genetici.....	19
1.3.4. Factori imunologici și moleculari.....	19
1.4. Rolul sistemului imunitar în implantare .....	20
1.4.1. Celulele sistemului imun din endometru .....	21
1.4.2. Interfața materno-fetală.....	21
1.4.3. Mecanisme de răspuns împotriva aloantigenelor fetale.....	21
<b>2. Receptivitatea endometrială</b> .....	23
2.1 Definiție.....	23
2.2 Fereastra de implantare.....	23
2.3 Metode de studiere a receptivității endometriale.....	23
2.3.1 Ecografia.....	24
2.3.2 Analiza histologică a endometrului.....	25
2.3.3 Analiza markerilor moleculari.....	25
2.3.4 ERA (Endometrial Receptivity Array) .....	28
2.3.5 Analiza lichidului de secreție endometrială.....	29
<b>3. Celulele Natural Killer</b> .....	31
3.1 Definiție.....	31
3.2 Funcțiile celulelor NK.....	31
3.3 Receptorii și liganzii celulelor NK .....	32
3.4 Celulele Natural Killer uterine (uNK) .....	33
3.5 Metode de măsurare a uNK .....	34
3.6 Relația celulelor NK și uNK cu infertilitatea .....	36
<b>4. Genele KIR</b> .....	39
4.1 Definiție.....	39
4.2 Mecanism de acțiune .....	39
4.3 Liganzii genelor KIR.....	39
4.4 Polimorfismul genelor KIR .....	40
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b> .....	41
<b>1. Ipoteza de lucru / obiective</b> .....	43
<b>2. Metodologie generală</b> .....	45
2.1 Formarea loturilor .....	45
2.2 Recoltarea, procesarea și analiza genetică a probelor biologice.....	46
2.3 Analiza statistică.....	46
<b>3. Studiul 1. Evaluarea receptorilor KIR ai celulelor uterine Natural Killer la pacientele cu eșec repetat de implantare</b> .....	49
3.1. Introducere.....	49
3.2. Ipoteza de lucru.....	50
3.3. Material și metodă .....	50
3.3.1. Designul studiului.....	50
3.3.2. Determinări de laborator .....	51
3.3.2.1. Extracția AND-ului.....	51
3.3.2.2. Determinarea KIR .....	52
3.3.3 Analiza datelor .....	53

3.4. Rezultate .....	54
3.4.1. Analiza comparativă a variabilelor demografice între lotul de studiu și lotul de control.....	54
3.4.2. Analiza RT-PCR a genelor KIR .....	57
3.4.3. Analiza comparativă a genotipurilor KIR între lotul de studiu și lotul de control.....	59
3.4.4. Analiza comparativă a genelor KIR între lotul de studiu și lotul de control .....	60
3.4.5. Analiza corelației genotipurilor KIR cu sarcina în grupul de studiu.....	60
3.4.6. Analiza corelației genelor KIR cu sarcina în lotul de studiu.....	61
3.5. Discuții.....	69
3.6. Concluzii .....	71
<b>4. Studiul 2. Evaluarea nivelurilor de TNF-<math>\alpha</math> și IL-1<math>\beta</math> în lichidul de secreție endometrială la pacientele cu eșec repetat de implantare .....</b>	<b>73</b>
4.1. Introducere.....	73
4.2. Ipoteza de lucru.....	74
4.3. Material și metodă .....	74
4.3.1. Designul studiului.....	74
4.3.2. Determinări de laborator .....	75
4.3.3 Analiza datelor .....	75
4.4. Rezultate .....	76
4.4.1. Analiza comparativă a variabilelor demografice.....	76
4.4.2. Analiza comparativă a concentrațiilor IL-1 $\beta$ și TNF- $\alpha$ .....	78
4.4.3. Construirea modelului regresional binar și a curbei ROC.....	89
4.4.4. Corelația dintre IL-1 $\beta$ și TNF- $\alpha$ .....	90
4.5. Discuții.....	91
4.6. Concluzii .....	93
<b>5. Studiul 3. Evaluarea concentrației LIF în lichidul de secreție endometrială la pacientele cu eșec repetat de implantare .....</b>	<b>95</b>
5.1. Introducere.....	95
5.2. Ipoteza de lucru.....	96
5.3. Material și metodă .....	96
5.3.1. Designul studiului.....	96
5.3.2. Determinări de laborator .....	97
5.3.3 Analiza datelor .....	97
5.4. Rezultate .....	98
5.4.1. Analiza comparativă a caracteristicilor pacientelor .....	98
5.4.2. Analiza comparativă a concentrațiilor LIF .....	98
5.4.3. Construirea modelului regresional binar și a curbei ROC.....	102
5.5. Discuții.....	103
5.6. Concluzii .....	104
<b>6. Concluzii generale.....</b>	<b>105</b>
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei.....</b>	<b>107</b>
<b>REFERINȚE .....</b>	<b>109</b>

**Cuvinte cheie:** Eșec repetat de implantare, NK, uNK, KIR, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LIF

# INTRODUCERE

Infertilitatea afectează la nivel mondial aproximativ 10% din cuplurile de vârstă reproductivă estimându-se că, în țara noastră, un cuplu din șase se confruntă cu probleme de fertilitate. Multe dintre aceste cupluri apelează la tehnicile de fertilizare in vitro (FIV) și nu de puține ori, se confruntă cu problemele aferente eșecului acestei proceduri. Rata de succes după un singur ciclu de FIV este de aproximativ 35% și crește până spre 55% după 3 cicluri FIV.

Eșecul de implantare se referă din punct de vedere clinic la două situații diferite, una în care nu a existat niciodată dovada biologică a sarcinii (beta-hCG sub 5 mUI/ml) și situația în care valoarea beta-hCG (gonadotropina corionică umană beta) a fost crescută la 14 zile după embriotransfer, dar sarcina nu a evoluat dincolo de formarea ecografică a unui sac gestațional.

Credem că investigarea fondului genetic al receptivității endometriale și a moleculelor din mediul intrauterin rămâne un subiect deschis, iar cercetarea noastră, prin rezultatele obținute să fie un punct de plecare pentru studii ulterioare care vor putea îmbunătăți atât activitatea de diagnostic, cât și tratamentul personalizat al pacientelor care se confruntă cu pierderea repetată a sarcinii în urma tehnicilor de reproducere umană asistată.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Datele actuale sugerează că celulele Natural Killer (NK), atât cele din sângele periferic cât și cele de la nivelul endometrului (uNK), ar putea juca un rol important în reușita și menținerea sarcinii. Spre deosebire de celulele NK din sângele periferic care au funcție citotoxică, celulele uNK au o citotoxicitate redusă și rolul lor principal este de a stimula producția de citokine și factori solubili favorabili implantării. Activitatea acestor celule este reglată de receptorii imunoglobulinici de tip killer-cell (KIR). Acești receptori sunt o familie de proteine de suprafață celulară care se găsesc pe celulele Natural Killer și reglează activitatea acestora prin interacțiunea cu moleculele MHC de clasa I (Major Histocompatibility Complex). Genele KIR pot avea efect inhibitor sau activator asupra celulelor uNK. Fiecare individ are doar un anumit repertoriu din toate cele 16 gene KIR (Killer Immunoglobuline Receptors) descrise până în prezent. Genotipurile pot fi împărțite în funcție de genele KIR pe care le conțin în două mari haplotipuri: A și B. Haplotipul A conține în principal gene inhibitoare, iar în Haplotipul B predomină genele activatoare.

Fiind o metodă mai puțin invazivă decât biopsia, analiza lichidului de spălare endometrială, a stârnit interesul a din ce în ce mai mulți cercetători. Acesta conține celule care se exfoliază în timpul lavajului, proteine, aminoacizi, citokine, factori de creștere, electroliți, imunoglobuline, metaloproteinaze și inhibitorii acestora etc. Unele dintre aceste componente cum ar fi IL-1 $\beta$  (Interleukin-1beta), TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) sau LIF (Leukemia Inhibitory Factor) pot avea valoare predictivă în obținerea sarcinii.

# CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Având în vedere cunoștințele de până acum, am formulat ipoteza că înclinarea balanței către un profil activator al genelor care reglează activitatea celulelor uNK ar fi asociat cu succesul implantării.

În contextul științific actual, ca parte a cercetării doctorale ne-am propus un studiu care utilizează probe prelevate de la pacientele tratate în Departamentul de Reproducere Umană Asistată al Clinicii Ginecologie I Cluj, obiectivul principal al acestuia fiind reprezentat de studierea celulelor NK uterine atât din punct de vedere al genelor care reglează activitatea lor (KIR), cât și prin analiza unor citokine implicate în procesul implantării (IL-1 $\beta$  și TNF- $\alpha$  și LIF) a căror secreție este stimulată de activarea acestora.

Proiectul de cercetare este structurat în trei părți, sub forma a trei studii individuale.

În primul studiu ne-am propus să determinăm dacă tipul de genotip KIR al pacientelor din țara noastră (cât și prezența fiecărei gene în particular) se asociază cu rata de obținere a sarcinii și cu avortul de prim trimestru în urma tehnicilor de reproducere umană asistată, acesta reprezentând și obiectul specific al studiului.

Obiectivul specific al celui de al doilea studiu a fost reprezentat de evaluarea rolului predictiv al nivelurilor de IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 beta) și TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha) din lichidul de spălare endometrială și importanța nivelurilor acestor citokine în implantare.

Studiul al treilea a fost gândit ca o continuare a celui de-al doilea, având ca scop stabilirea unei eventuale corelații între concentrația în lichidul de spălare endometrială a LIF și rezultatul implantării.

## Studiul 1. Evaluarea receptorilor KIR ai celulelor uterine Natural Killer la pacientele cu eșec repetat de implantare

**Introducere și obiective:** Profilul genelor KIR poate fi împărțit în două mari haplotipuri: haplotipul A care, pe lângă genele framework și pseudogene, este format în principal din gene KIR inhibitoare și conține o singură genă activatoare (KIR2DS4) și haplotipul de tip B care conține mai multe gene activatoare. Având în vedere că fiecare individ prezintă o pereche din cele 2 tipuri de haplotipuri, putem împărți pacientele în trei genotipuri: AA, AB și BB.

Obiectivul principal al studiului nostru este reprezentat de investigarea repertoriului genelor KIR al pacientelor cu eșec repetat de implantare și evaluarea valorii predictive a prezenței sau absenței acestora în obținerea și menținerea sarcinii.

**Material și metodă:** Proiectul propus este un studiu prospectiv caz-control care utilizează probe prelevate de la pacientele tratate în cadrul Clinicii Ginecologie I Cluj între iulie 2017 și ianuarie 2021.

În lotul de studiu au fost incluse 96 de paciente cu eșec repetat de implantare la care s-a efectuat fertilizare în vitro. Toate pacientele au urmat un protocol scurt de

stimulare cu antagoniști. Imediat înaintea puncției ovariene pentru recoltarea de ovocite, de la fiecare pacientă participantă la studiu s-au recoltat 5 ml sânge venos din vasele periferice în vederea extracției ADN-ului și dozarea genelor KIR. În lotul de control au fost introduse 80 de paciente sănătoase cu vârste cuprinse între 18 și 45 ani care nu au avut avorturi spontane și care au născut cel puțin 2 feți vii la termen și nu au prezentat complicații în cursul sarcinii. După naștere s-a recoltat o probă de 5 mililitri sânge matern din vasele periferice care a fost stocată la -18 grade Celsius până în momentul procesării.

**Rezultate:** Deși am obținut o frecvență mai mare a genotipului inhibitor AA și o frecvență mai mică a genotipurilor activatoare AB și BB la grupul de paciente cu eșec repetat de implantare, comparativ cu lotul de control (AA – 33.7%, AB – 56.3%, BB – 10% față de AA – 37.5%, AB – 53.1%, BB – 9.4%), aceste diferențe nu sunt semnificative statistic. De aici deducem că interacțiunea între profilul HLA al embrionului și profilul KIR al mamei joacă un rol important în obținerea și menținerea sarcinii. S-a observat o prezență semnificativ mai mare a genei activatoare KIR2DS1 la pacientele fertile din grupul de control, comparativ cu pacientele din grupul cu eșec repetat de implantare ( $P < 0.05$ ).

În grupul cu eșec repetat de implantare am observat o rată de obținere a sarcinii biochimice semnificativ mai mică la pacientele cu genotip AA (22.3%) comparativ cu cele cu genotip AB (43.2%) ( $P = 0.0465$ ) și cu cele cu genotip BB (45%) ( $P = 0.0423$ ).

Frecvența genei KIR3DS1 activatoare a fost semnificativ statistic mai mare în rândul pacientelor care au obținut sarcina comparativ cu cele care nu au obținut sarcina, iar frecvența genei KIR2DL5(null) inhibitoare a fost semnificativ mai mare în rândul pacientelor care au pierdut sarcina comparativ cu cele care au născut la termen.

**Concluzii:** Studiul nostru demonstrează că genotipul matern KIR influențează rata de obținere a sarcinii la pacientele cu eșec repetat de implantare în urma tehnicilor de reproducere umană asistată. La pacientele cu Genotip AA care au nevoie de donator se pot selecționa embrioni cu genotip HLA favorabil și astfel să maximizăm procentul de obținere și menținere a sarcinii, iar la cuplurile cu polimorfisme nefavorabile KIR-HLA se poate încerca terapie imunomodulatoare.

Rezultatele obținute indică faptul că gena KIR3DS1 are un efect favorizant în implantare, dar nu și în menținerea sarcinii, iar prezența genei 2DL5B(null) este mai degrabă implicată în avortul de prim trimestru decât în implantare.

## **Studiul 2. Evaluarea nivelurilor de TNF- $\alpha$ și IL-1 $\beta$ în lichidul de secreție endometrială la pacientele cu eșec repetat de implantare**

**Introducere și obiective:** Citokinele sunt o familie eterogenă de peste 100 de molecule mici secretate atât în timpul răspunsului imun înăscut, cât și în cel adaptativ. Ele reprezintă factori cruciali în procesele regenerative și inflamatorii, fiind mediatori și reglatori cheie ai interacțiunii complexe dintre făt și mucoasa uterină, ceea ce pledează pentru o influență majoră a acestora asupra receptivității endometriale.

Ipoieza noastră presupune ca nivelurile variate de Interleukin-1 Beta (IL-1 $\beta$ ) și de factor de necroză tumorală Alpha (TNF- $\alpha$ ) pot influența rezultatul implantării. În studiul de față am evaluat și corelat nivelurile din lichidul de spălare endometrială ale acestor două citokine cu implantarea embrionului și sarcina de succes la femeile cu eșec repetat de implantare.

**Material și metodă:** Investigația propusă este un studiu prospectiv efectuat pe un eșantion unde au fost incluse 96 de paciente diagnosticate cu eșec repetat de implantare cu indicație de fertilizare în vitro. Toate pacientele au urmat un protocol scurt de stimulare cu antagoniști urmat de puncție ovariană și embriotransfer cu embrioni proaspeți.

Imediat înaintea puncției ovariene pentru recoltarea de ovocite, vaginul și colul uterin au fost spălate cu soluție salină normală. Am injectat 2 ml de soluție salină în cavitatea uterină cu un cateter și lichidul a fost aspirat și depozitat la -18 grade Celsius până în momentul procesării. Pentru evaluarea nivelurilor de IL-1 $\beta$  și TNF- $\alpha$ , am folosit kituri ELISA standard.

**Rezultate:** Un nivel semnificativ mai mare de IL-1 $\beta$  în lichidul de secreție endometrială a fost observat la pacientele cu sarcină biochimică comparativ cu pacientele care nu au obținut sarcina (val. medie 133 pg/mL comparativ cu 66 pg/mL,  $t(94) = -5.43$ ,  $p=0,01$ ). Cu toate acestea, atunci când sunt comparate pacientele care au pierdut sarcina cu pacientele care au dus sarcina la termen, nu există diferențe semnificative statistic în nivelurile IL-1 $\beta$  (val. medie 130 pg/mL comparativ cu 135 pg/mL,  $t(32) = -.166$ ,  $p=0,8$ ).

În ceea ce privește TNF- $\alpha$ , deși lotul de paciente care nu au obținut sarcina a prezentat un nivel mai ridicat în secreția endometrială, nu au existat diferențe semnificative statistic între loturile analizate ( $t(94) = -1.19$ ,  $p=0,2$  între pacientele cu  $\beta$ -hCG pozitiv comparativ cu  $\beta$ -hCG negativ și  $t(32) = 1,05$ ,  $p=0,2$  în evaluarea evoluției sarcinii).

Analiza de corelație pentru a testa natura relației dintre IL-1 $\beta$  și TNF- $\alpha$  a demonstrat că nu există o corelație semnificativă statistic între aceste variabile studiate, conform coeficientului Pearson ( $r(96)=0.3$ ,  $p >0,05$ ).

**Concluzii:** Studiul nostru a identificat o corelație pozitivă între succesul implantării și nivelul IL-1 $\beta$  și o corelație negativă între nivelul TNF- $\alpha$  în secreția endometrului și implantarea cu succes, ceea ce sugerează că IL-1 $\beta$  ar putea fi un factor de prognostic favorabil, în timp ce TNF- $\alpha$  ar putea servi ca țintă în tratament la pacientele cu eșec repetat de implantare.

Datele obținute în urma acestui studiu subliniază rolul major al IL-1 $\beta$  în procesului de implantare al embrionului. Cu ajutorul parametrilor determinați din lichidul de spălare endometrială sperăm să înțelegem mai bine statusul receptiv al endometrului și să obținem rezultate mai bune prin tehnicile de reproducere umană asistată.

# Studiul 3. Evaluarea concentrației LIF în lichidul de secreție endometrială la pacientele cu eșec repetat de implantare

**Introducere și obiective:** LIF este un mediator al comunicării între celule, având o activitate biologică largă atât în procesele fiziologice normale, cât și în cele patologice. De aceea o mai bună înțelegere a diverselor sale activități ne va permite să înțelegem mai bine geneza și progresia diferitelor entități patologice umane și o estimare mai precisă a valorii sale terapeutice. Prezența LIF și a receptorului său în celulele endometriale și modificările nivelurilor acestora în timpul ciclului menstrual fac evident rolul acestora în receptivitatea endometrului și implantarea cu succes.

Obiectivul specific al acestui studiu a fost reprezentat de evaluarea rolului predictiv al nivelurilor de LIF (Leukemia Inhibitor Factor) din lichidul de spălare endometrială și stabilirea unei eventuale corelații între nivelurile acestei citokine în lichidul de secreție endometrială și obținerea sarcinii.

**Material și metodă:** Metodologia acestui studiu a fost similară cu cea din studiul al doilea, iar eșantionul de paciente s-a suprapus cu cel anterior, dar într-o dimensiune mai mică incluzând 72 de paciente. Pentru evaluarea nivelurilor de LIF, s-au folosit kituri ELISA standard.

**Rezultate:** Se observă o concentrație mai crescută ( $P < 0.08$ ) a nivelului LIF în lichidul de spălare endometrială la pacientele care au obținut sarcina din punct de vedere biochimic ( $2457.2 \pm 766.1$  pg/mL) comparativ cu pacientele care nu au obținut sarcina ( $2019.9 \pm 590.9$  pg/mL). Pacientele care au pierdut sarcina au avut concentrații medii mai mici de LIF ( $2345 \pm 889.8$  pg/mL) comparativ cu pacientele care au dus sarcina la termen ( $2468.9 \pm 711.8$  pg/mL), dar fără diferențe semnificative statistice.

**Concluzii:** Pacientele care au obținut sarcina din punct de vedere biochimic au avut niveluri mai crescute ale concentrației de LIF în lichidul de spălare endometrială comparativ cu cele care nu au obținut-o. De asemenea există o corelație negativă între nivelurile intrauterine de LIF și menținerea sarcinii. Totuși, aceste rezultate nu au atins o semnificație statistică. Probabil că această ipoteză necesită investigații suplimentare într-o dimensiune mai mare a loturilor de studiu și pe eșantioane de cazuri care să cuprindă, pe lângă paciente cu eșec repetat de implantare și paciente sănătoase.

## Concluzii generale

Rezultatele obținute în urma acestui proiect de cercetare doctorală au impus formularea următoarelor concluzii:

1. În rândul pacientelor cu eșec repetat de implantare, genotipul AA s-a asociat cu o rată de obținere a sarcinii biochimice semnificativ mai redusă comparativ genotipul AB și genotipul BB.
2. Prezența genei activatoare KIR 2DS1 are o frecvență semnificativ mai mare la pacientele fertile comparativ cu pacientele cu eșec repetat de implantare.



3. Frecvența genei KIR 3DS1 activatoare a fost semnificativ statistic mai mare în rândul pacientelor care au obținut sarcina comparativ cu cele care nu au obținut sarcina, demonstrând ca are un efect favorizant în implantare, dar nu și în menținerea sarcinii.
4. Gena KIR 2DL5(null) inhibitoare are frecvență semnificativ mai mare în rândul pacientelor care au pierdut sarcina comparativ cu cele care au născut la termen, dar fără diferențe semnificative statistic în obținerea sarcinii, acest lucru sugerând că prezența genei acesteia este mai degrabă implicată în avortul de prim trimestru decât în implantare.
5. Rezultatele noastre indică faptul că există o corelație negativă moderată între gena KIR 2DL5B(null) și evoluția sarcinii.
6. Pacientele care au obținut sarcina din punct de vedere biochimic au avut niveluri mai crescute ale concentrației de LIF în lichidul de spălare endometrială.
7. Nu există corelație între nivelurile IL-1 $\beta$  și TNF- $\alpha$  în lichidul de secreție endometrială.
8. Nivelurile IL-1beta pot fi folosite ca markeri predictivi ai receptivității endometriale, iar nivelurile de TNF-  $\alpha$  și LIF ar putea fi folosite ca valori țintă a terapiei.
9. O mai bună înțelegere a factorilor genetici și imunologici care promovează o sarcină de succes la femeile cu eșec repetat de implantare ar putea ajuta la stabilirea unor ținte terapeutice, iar unii markeri reglatori ai implantării ar putea fi folosiți ca și factori de prognostic ai rezultatului în tratamentul cuplurilor care se confruntă cu această patologie.

## **Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

Această cercetare doctorală tratează un subiect de mare actualitate, care reprezintă o problemă majoră în rândul cuplurilor infertile care apelează la tehnicile de reproducere umană asistată, având totodată un impact semnificativ asupra familiei și al societății.

Unul din elementele de originalitate ale cercetării a fost reprezentat de analiza genetică a profilului KIR din sânge al pacientelor cu eșec repetat de implantare din țara noastră în combinație cu studierea moleculelor din lichidul de secreție endometrială aspirat înaintea puncției ovariene pentru extracția de ovocite și stabilirea unei corelații cu rezultatul FIV și totodată, cu evoluția ulterioară a sarcinii.

Chiar dacă nu toate ipotezele noastre s-au confirmat, considerăm că am obținut date relevante, adecvate pentru a fi publicate în lucrări bine cotate, care pot fi considerate o bază de plecare pe studiile ulterioare.

La final putem afirma că rezultatele acestei teze doctorale aduc o contribuție reală într-un domeniu de foarte mare actualitate, furnizând date folositoare și aplicabile în practica clinică, în scopul îmbunătățirii rezultatelor în urma tehnicilor de reproducere umană asistată la pacientele cu eșec repetat de implantare.

ABSTRACT OF DOCTORAL THESIS

---

# Assessment of endometrial receptivity in the diagnosis and personalized treatment of patients with repeated implantation failure

---

PhD Student **Radu Harșa**

---

PhD Scientific Coordinator **Prof. dr. Florin Stamatian**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b> .....	13
<b>CURRENT STATE OF THE ART</b> .....	15
<b>1. Repeated implantation failure</b> .....	17
1.1 Definition.....	17
1.2 Incidence.....	17
1.3 Etiology.....	18
1.3.1. Anatomic factors.....	18
1.3.2. Endocrine factors.....	19
1.3.3. Genetic factors.....	19
1.3.4. Immunological and molecular factors.....	19
1.4. The role of the immune system in implantation.....	20
1.4.1. Cells of the immune system in the endometrium.....	21
1.4.2. Maternal-fetal interface.....	21
1.4.3. Mechanisms of response against fetal alloantigens.....	21
<b>2. Endometrial receptivity</b> .....	23
2.1 Definition.....	23
2.2 Window of implantation.....	23
2.3 Methods for analyzing endometrial receptivity.....	23
2.3.1 Ultrasound.....	24
2.3.2 Histological analysis of the endometrium.....	25
2.3.3 Analysis of molecular markers.....	25
2.3.4 ERA (Endometrial Receptivity Array).....	28
2.3.5 Analysis of the endometrial secretion fluid.....	29
<b>3. Natural Killer Cells</b> .....	31
3.1 Definition.....	31
3.2 Functions of NK cells.....	31
3.3 NK cell receptors and ligands.....	32
3.4 Uterine Natural Killer cells (uNK).....	33
3.5 Methods of measuring uNK.....	34
3.6 Relationship of NK and uNK cells with infertility.....	36
<b>4. KIR Genes</b> .....	39
4.1 Definition.....	39
4.2 Mechanism of action.....	39
4.3 KIR genes ligands.....	39
4.4 Polymorphism of KIR genes.....	40
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b> .....	41
<b>1. Work hypothesis / Objectives</b> .....	43
<b>2. General methodology</b> .....	45
2.1 Plots formation.....	45
2.2 Collection, processing and genetic analysis of biological samples.....	46
2.3 Statistical analysis.....	46
<b>3. Study 1. Evaluation of KIR gene expression in patients with recurrent implantation failure</b> .....	49
3.1. Introduction.....	49
3.2. Work hypothesis.....	50
3.3. Material and method.....	50
3.3.1. Study design.....	50
3.3.2. Laboratory tests.....	51
3.3.2.1. AND extraction.....	51
3.3.2.2. KIR typing.....	52
3.3.3 Data analysis.....	53
3.4. Results.....	54

3.4.1. Comparative analysis of demographic variables between the study group and the control group .....	54
3.4.2. RT-PCR analysis of KIR genes .....	57
3.4.3. Comparative analysis of KIR genotypes between study and control group.....	59
3.4.4. Comparative analysis of KIR genes between study and control group .....	60
3.4.5. Analysis of correlation of KIR genotypes with pregnancy in the study group	60
3.4.6. Analysis of the correlation of KIR genes with pregnancy in the study group	.61
3.5. Discussion .....	69
3.6. Conclusions .....	71
<b>4. Study 2. Evaluation of IL-1<math>\beta</math> and TNF-<math>\alpha</math> level in endometrial flush in patients with recurrent implantation failure .....</b>	<b>73</b>
4.1. Introduction .....	73
4.2. Work hypothesis.....	74
4.3. Material and method .....	74
4.3.1. Study design .....	74
4.3.2. Laboratory tests .....	75
4.3.3 Data analysis .....	75
4.4. Results .....	76
4.4.1. Comparative analysis of demographic variables.....	76
4.4.2. Comparative analysis of il-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ concentrations.....	78
4.4.3. Creation of the binary regression model and the ROC curve .....	89
4.4.4. Correlation between Il-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ .....	90
4.5. Discussion .....	91
4.6. Conclusions .....	93
<b>5. Study 3. Evaluation of LIF concentration in endometrial secretion fluid in patients with repeated implantation failure .....</b>	<b>95</b>
5.1. Introduction .....	95
5.2. Work hypothesis.....	96
5.3. Material and method .....	96
5.3.1. Study design .....	96
5.3.2. Laboratory tests .....	97
5.3.3 Data analysis .....	97
5.4. Results .....	98
5.4.1. Comparative analysis of patient characteristics.....	98
5.4.2. Comparative analysis of LIF concentrations .....	98
5.4.3. Creation of the binary regression model and the ROC curve .....	102
5.5. Discussion .....	103
5.6. Conclusions .....	104
<b>6. General conclusions .....</b>	<b>105</b>
<b>7. The originality and innovative contributions of the thesis.....</b>	<b>107</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>109</b>

**Keywords:** Repeated implantation failure, NK, uNK, KIR, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LIF

## INTRODUCTION

Infertility affects approximately 10% of couples of reproductive age worldwide, being estimated that, in our country, one out of six couples faces fertility issues. Many of these couples turn to in vitro fertilization (IVF) techniques and, not infrequently, face failure related problems. The success rate after a single IVF cycle is around 35% and increases to 55% after 3 IVF cycles.

Implantation failure refers to two different clinical situations: one where there was never biological proof of pregnancy (beta-hCG below 5 mIU/ml) and the situation where the beta-hCG (human chorionic gonadotropin beta) value was increased 14 days after embryo transfer, but the pregnancy did not progress beyond the ultrasound detection of a gestational sac.

We believe that investigation of the genetic background of endometrial receptivity and molecules of the intrauterine environment remains an open research topic, and our study, through the results obtained, should be a starting point for further enlarged analysis in order to improve the diagnostic accuracy and personalize treatment of patients experiencing repeated pregnancy loss following assisted human reproduction techniques.

## CURRENT STATE OF THE ART

Current data suggest that Natural Killer (NK) cells, both peripheral blood and endometrial (uNK), may play an important role in the success and maintenance of pregnancy. Unlike peripheral blood NK cells which have a cytotoxic function, uNK cells have low cytotoxicity and their main role is to stimulate the production of cytokines and soluble factors favorable to implantation. The activity of these cells is regulated by killer-cell immunoglobulin receptors (KIR). KIR are a family of cell surface proteins found on Natural Killer cells, regulating their activity by interacting with MHC class I (Major Histocompatibility Complex) molecules. KIR genes can have inhibitory or activating effect on uNK cells. Each individual has only a certain directory of the 16 KIR (Killer Immunoglobulin Receptors) genes described so far. Genotypes can be divided according to their KIR gene profile into two major haplotypes: A and B. Haplotype A mainly contains inhibiting genes, while Haplotype B is dominated by activator genes.

Analysis of endometrial washing fluid has attracted the interest of more and more researchers as a less invasive method than biopsy. It contains cells that exfoliate during washing, proteins, amino acids, cytokines, growth factors, electrolytes, immunoglobulins, metalloproteinases and their inhibitors etc. Some of these components such as IL-1 $\beta$  (Interleukin-1beta), TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) or LIF (Leukemia Inhibitory Factor) may have predictive value in obtaining pregnancy.

# PERSONAL CONTRIBUTION

Given the knowledge to date, we hypothesized that tipping the balance toward an activating profile of genes that regulate uNK cell activity would be associated with implantation success.

In the current scientific context, as part of the doctoral research, we aiming to assess uterine NK cells both from the point of view of the genes that regulate their activity (KIR), as well as certain cytokines involved in the implantation process (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and LIF) whose secretion is stimulated by KIR activation. We enrolled patients treated in the Department of Assisted Human Reproduction of the Cluj Gynecology I Clinic.

The research project is structured in three parts, in the form of three individual studies.

In the first study, we set out to determine whether the KIR genotype type of patients in our country (as well as the presence of each gene in particular) is associated with the obtained pregnancy rate and first-trimester miscarriage following assisted human reproduction techniques, as representing representing the specific object of the study.

The major objective of the second study was to evaluate the predictive role of IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 beta) and TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha) levels in the endometrial washing fluid and the importance of these cytokine levels in implantation.

The third study was designed as a continuation of the second, with the aim to establish a possible correlation between the concentration of LIF in the endometrial washing fluid and the outcome of implantation.

## Study 1. Evaluation of KIR gene expression in patients with recurrent implantation failure

**Introduction and Aims:** The profile of KIR genes can be divided into two major haplotypes: haplotype A which, in addition to framework genes and pseudogenes, consists mainly of inhibitory KIR genes and contains a single activating gene (KIR2DS4) and haplotype B which contains several activating genes. Considering that each individual presents a pair of the 2 haplotypes, we can divide patients into three genotypes: AA, AB and BB.

The main objective of our study is to investigate the directory of KIR genes in patients with repeated implantation failure and to evaluate the predictive value of their presence or absence in obtaining and maintaining pregnancy.

**Material and method:** The project is a prospective case-control study using samples taken from patients treated at Cluj Gynecology Clinic I between July 2017 and January 2021.

We enrolled in the study group 96 patients with repeated implantation failure who underwent in vitro fertilization. All patients followed a short antagonist stimulation protocol. Immediately before ovarian puncture for oocyte pick-up, 5 ml of

peripheral venous blood were collected from each patient participating in the study for DNA extraction and KIR gene quantification. In the control group we included 80 healthy patients aged 18 - 45 years with no history of miscarriage, with at least 2 physiologic pregnancies, who delivered term infants. Following delivery, 5 ml of peripheral maternal blood were collected and stored at -18 degrees Celsius until processing.

**Results:** Although we obtained a higher frequency of the inhibitory genotype AA and a lower frequency of the activating genotypes AB and BB in the group of patients with repeated implantation failure compared to the control group (AA – 33.7%, AB – 56.3%, BB – 10% face of AA – 37.5%, AB – 53.1%, BB – 9.4%), these differences are not statistically significant. We may therefore infer that the interaction between the HLA profile of the embryo and the KIR profile of the mother plays an important role in obtaining and maintaining pregnancy. A significantly higher presence of the KIR2DS1 activating gene was observed in fertile patients in the control group compared to patients in the group with repeated implantation failure ( $P < 0.05$ ).

In the repeated implantation failure group, we observed a significantly lower biochemical pregnancy rate in patients with the AA genotype (22.3%) compared to those with genotype AB (43.2%) ( $P = 0.0465$ ) and those with genotype BB (45%) ( $P = 0.0423$ ).

The frequency of the activating KIR3DS1 gene was statistically significantly higher among patients who achieved pregnancy compared to those who did not achieve pregnancy, and the frequency of the inhibitory KIR2DL5(null) gene was significantly higher among patients who lost pregnancy compared to those delivered at term.

**Conclusions:** Our study demonstrates that maternal KIR genotype influences pregnancy rates in patients with repeated implantation failure following assisted human reproduction techniques. In patients with Genotype AA who need a donor, embryos with a favorable HLA genotype can be selected, thus maximizing the percentage of obtaining and maintaining pregnancy. In couples with unfavorable KIR-HLA polymorphisms, immunomodulatory therapy can be attempted.

Study results indicate that the KIR3DS1 gene has a favorable effect on implantation, but not in pregnancy maintenance. The 2DL5B(null) gene seems to be more involved in first-trimester miscarriage than implantation.

## **Study 2. Evaluation of IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ levels in endometrial flush in patients with recurrent implantation failure**

**Introduction and Aims:** Cytokines are a heterogeneous family of over 100 small molecules secreted during both the innate and adaptive immune responses. They represent crucial factors in regenerative and inflammatory processes, being mediators and key regulators of the complex interaction between the fetus and the uterine mucosa, which stands in favor of their major influence on endometrial receptivity.

We hypothesized that varying levels of Interleukin-1 Beta (IL-1 $\beta$ ) and Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) may influence implantation outcome. In the present study we assessed and correlated the endometrial washing fluid levels of these two cytokines with embryo implantation and successful pregnancy in women with recurrent implantation failure.

**Material and method:** This is a prospective study carried out on a population of 96 patients with repeated implantation failure and indication for in vitro fertilization. All patients followed a short antagonist stimulation protocol followed by ovarian puncture and fresh embryo transfer.

Before ovarian puncture, the vagina and the cervix were washed with normal saline solution. 2 ml of saline solution were injected into the uterine cavity with and then sucked and stored at -18 degrees C. For the evaluation of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels, we used standard ELISA kits.

**Results:** A significantly higher level of endometrial washing IL-1 $\beta$  was observed in patients with biochemical pregnancy compared to patients who did not achieve pregnancy (mean value 133 pg/mL compared to 66 pg/mL,  $t(94) = -5.43$ ,  $p=0.01$ ). However, when comparing patients who miscarried with patients who carried to term, there were no statistically significant differences in IL-1 $\beta$  levels (mean 130 pg/mL vs. 135 pg/mL,  $t(32) = -0.166$ ,  $p=0.8$ ).

Regarding TNF- $\alpha$ , although the group of patients who did not achieve pregnancy presented a higher level of endometrial secretion, there were no statistically significant differences between the analyzed groups ( $t(94) = -1.19$ ,  $p=0.2$  between patients with positive  $\beta$ -hCG compared to negative  $\beta$ -hCG and  $t(32) = 1.05$ ,  $p=0.2$  in the evaluation of pregnancy outcome).

Correlation analysis to test the nature of the relationship between IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  demonstrated that there is no statistically significant correlation between these variables, according to the Pearson coefficient ( $r(96) = 0.3$ ,  $p > 0.05$ ).

**Conclusions:** Our study identified a positive correlation between implantation success and the level of IL-1 $\beta$  and a negative correlation between the level of TNF- $\alpha$  in the endometrial secretion and successful implantation, suggesting that IL-1 $\beta$  could be a favorable prognostic factor, while TNF- $\alpha$  could serve as a target in the treatment of patients with recurrent implantation failure.

The data obtained from this study emphasize the major role of IL-1 $\beta$  in the embryo implantation process. With the help of the parameters determined from the endometrial wash fluid we hope to better understand the receptive status of the endometrium and achieve better results with assisted human reproduction techniques.



# **Study 3. Evaluation of Leukemia Inhibitory Factor (LIF) concentration in endometrial washout fluid in patients with repeated implantation failure**

**Introduction and Aims:** Leukemia Inhibitory Factor - LIF is a mediator of cell-to-cell communication with broad biological activity in both normal and pathological physiological processes. A better understanding of its various activities will allow us to better understand the genesis and progression of various human pathological entities and a more accurate estimate of its therapeutic value. The presence of LIF and its receptor in endometrial cells and changes of its levels during the menstrual cycle make LIF role in endometrial receptivity and successful implantation evident.

The specific objective of this study was to evaluate the predictive role of LIF levels in the endometrial washing fluid and establish a possible correlation between the levels of this cytokine in the endometrial fluid and pregnancy.

**Material and method:** The methodology of this study was similar to that of the second study, and patients samples coincide with those described in the above research, including however only 72 patients. Standard ELISA kits were used to assess LIF levels.

**Results:** A higher concentration ( $P < 0.08$ ) of LIF levels in endometrial lavage fluid was observed in patients who achieved biochemical pregnancy ( $2457.2 \pm 766.1$  pg/mL) compared to patients who did not achieve pregnancy ( $2019.9 \pm 590.9$  µg/mL). Patients who miscarried had lower mean concentrations of LIF ( $2345 \pm 889.8$  pg/mL) compared to patients who delivered at term ( $2468.9 \pm 711.8$  pg/mL), but without statistically significant differences.

**Conclusions:** Patients who achieved biochemical pregnancy had higher LIF concentrations in the endometrial washing compared to those who did not. There is also a negative correlation between intrauterine LIF levels and pregnancy maintenance. However, these results did not reach statistical significance. This hypothesis probably requires further investigation on larger sample sizes and case population which include healthy patients in addition to patients with recurrent implantation failure .

## **General conclusions**

The results deriving from this doctoral research project let to the drafting of the following conclusions:

1. Among patients with repeated implantation failure, the AA KIR genotype was associated with a significantly lower biochemical pregnancy rate compared to the AB and BB genotypes.
2. The presence of the KIR 2DS1 activator gene had a significantly higher frequency in fertile patients compared to patients with repeated implantation failure.

3. The frequency of the activating KIR 3DS1 gene was statistically significantly higher among patients who achieved pregnancy compared to those who did not, demonstrating that it has a favorable effect on implantation but not on pregnancy maintenance.
4. The inhibitory KIR 2DL5(null) gene has a significantly higher frequency among patients who miscarried compared to those who delivered at term, but without statistically significant differences in achieving pregnancy, suggesting that the presence of this gene is rather more involved in first-trimester abortion than implantation.
5. Our results indicate that there is a moderate negative correlation between KIR 2DL5B(null) gene and pregnancy outcome.
6. Patients who achieved biochemical pregnancy had higher levels of LIF concentration in endometrial washout fluid.
7. There was no correlation between IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in endometrial washout fluid.
8. IL-1  $\beta$  levels can be used as predictive markers of endometrial receptivity, and TNF- $\alpha$  and LIF levels could be used as therapy targets.
9. A better understanding of the genetic and immunological factors that promote successful pregnancy in women with recurrent implantation failure could help to establish therapeutic targets, and some regulatory markers of implantation could be used as prognostic factors of outcome in the treatment of couples facing this pathology.

## **The originality and innovative contributions of the thesis**

This doctoral research addresses a very current topic, representing a major problem among infertile couples who resort to assisted human reproduction techniques. There is also a significant impact on the family and society.

One of the original elements of the research was represented by the genetic analysis of the KIR profile in the blood of patients with repeated implantation failure from our country in combination with the study of molecules from the endometrial washout sucked before ovarian puncture for oocyte extraction and establishing a correlation with the result of IVF and at the same time, with the subsequent evolution of pregnancy.

Even if not all of our hypotheses were confirmed, we believe that we have obtained relevant data, suitable to be published in well-rated papers, which can be considered a starting point for further studies.

In the end, we can say that the results of this doctoral research make a real contribution in a very topical field, providing useful and applicable data in clinical practice, in order to improve the results of assisted human reproduction techniques for patients with repeated implantation failure.