

Streszczenie pracy doktorskiej lek. Anny Horbaczewskiej

Promotor: prof. dr hab. Robert Jach

Temat pracy doktorskiej: „Analiza czynników wpływających na powodzenie implantacji w endometrium kobiet z niepłodnością pierwotną o nieustalonej etiologii” – monografia

Problem niepłodności dotyka około 8 do 12% par w wieku reprodukcyjnym na całym świecie, co odpowiada ponad 186 milionom ludzi. U około 20 % par nie udaje się ustalić czynnika powodującego niepłodność po zastosowaniu rutynowych badań diagnostycznych. Jedną z przyczyn niepłodności idiopatycznej mogą stanowić zaburzenia procesu implantacji. Do zagnieżdżenia może dojść w ściśle określonym momencie cyklu miesięczkowego, kiedy zdolność blastocysty do zagnieżdżenia nakłada się z gotowością do jej przyjęcia przez endometrium, tzw. receptywnością endometrium. Przedział czasowy w którym endometrium wykazuje tę właściwość zwany jest oknem implantacyjnym. U ludzi jest to okres trwający od 3 do 6 dni, przypadający na połowę fazy wydzielniczej. W cyklu miesięczkowym o długości 28 dni szacunkowo trwa od 20. do 24. dnia cyklu – to jest od 6 do 10 dni po pikę hormonu luteinizującego (*luteinizing hormone*, LH). Rozminięcie się w czasie tych dwóch faz skutkuje poronieniem. Nabywanie receptywności przez błonę śluzową macicy jest odzwierciedlone w zmianach komórkowych i ultrastrukturalnych. Procesy są sterowane hormonalnie, przez estrogeny i progesteron pochodzenia jajnikowego. Ponadto znaczenie odgrywają lokalnie produkowane molekuly sygnalizacyjne, takie jak cytokiny, czynniki wzrostu, czynniki transkrypcyjne homeoboxu, mediatory lipidowe oddziałujące za pomocą sygnalizacji autokrynnej, parakrynnej i juxtakrynnej. W rozważaniu na temat roli lokalnego stanu zapalnego w kontekście płodności kluczowe jest rozróżnienie pomiędzy ostrym stanem zapalnym a przewlekłym stanem zapalnym o umiarkowanym bądź niskim nasileniu. Postuluje się, że mediatory zapalne, w tym interleukina 18 (IL-18) oraz histamina, zwykle uwalniane podczas naprawy i przebudowy tkanek, są ważnymi mediatorami decydualizacji i implantacji.

Z jednej strony, IL-18 obecna w implantacyjnym endometrium w wysokich stężeniach, zwiększa ryzyko porodu przedwczesnego i utraty ciąży w odpowiedzi na zapalenie wewnątrzmaciczne. Z drugiej strony zaś jest niezbędna dla prawidłowej implantacji. Pomimo powszechności występowania histaminy w organizmie, stosunkowo niewielu badaczy sprawdzało jej obecność i rolę w tkankach w kontekście płodności. Jest cząsteczką niezbędną w procesie implantacji, a jak do tej pory nie badano jej poziomu w endometrium w kontekście niepłodności idiopatycznej. Odpowiedni wychwyty i metabolizm glukozy są niezbędne do prawidłowego różnicowania endometrium macicy w kierunku stanu receptywnego umożliwiającego implantację zarodka. Prawidłowa decydualizacja komórek endometrium *in vitro* zależy od odpowiednich stężeń glukozy. Najlepiej dotychczas opisanym i najliczniejszym w zrębie endometrium transporterem glukozy jest transporter glukozy typu 1 (*glucose transporter 1*, GLUT1). GLUT4 jest prawdopodobnie najlepiej zbadanym transporterem ze względu na główną rolę, jaką odgrywa w homeostazie glukozy w całym ciele i patogenezie cukrzycy typu II. Nie ma natomiast danych dotyczących roli GLUT4 w niepłodności o nieustalonej przyczynie.

Endometrial scratching, czyli tak zwany kontrolowany uraz endometrium, to technika proponowana w celu ułatwienia implantacji zarodka i zwiększenia prawdopodobieństwa zajścia w ciążę u kobiet leczonych technikami rozrodu wspomaganego (*assisted reproductive technology*, ART). Postuluje się, że uszkodzenie lub „zadrapanie” endometrium, które powstaje w wyniku biopsji, może ułatwić implantację zarodka przez mechanizmy zapalne i immunologiczne. Ponadto, miejscowe uszkodzenie endometrium w stymulowanych cyklach opóźnia rozwój endometrium z powodu procesu gojenia, a tym samym koryguje asynchronię między etapami endometrium i zarodka.

Postanowiono zbadać, czy poziomy wybranych molekuł prozapalnych – IL-18 oraz histaminy, a także transportera glukozy GLUT4, różnią się w populacji kobiet z niepłodnością o nieustalonej etiologii w porównaniu z kobietami posiadającymi naturalnie poczęte potomstwo.

Celami pracy są:

- I. Analiza poziomu interleukiny 18 oraz histaminy jako cząsteczek o postulowanej roli w procesie implantacji w receptywnym endometrium u kobiet z niepłodnością pierwotną o nieustalonej etiologii oraz porównanie go do grupy kobiet posiadających naturalnie poczęte potomstwo.
- II. Ocena korelacji poziomów interleukiny 18 i histaminy w receptywnym endometrium oraz we krwi jako próba odnalezienia użytecznego diagnostycznie markera receptywności.
- III. Analiza poziomu GLUT4 w receptywnym endometrium kobiet z niepłodnością pierwotną o nieustalonej etiologii i porównanie go z kobietami posiadającymi naturalnie poczęte potomstwo.

Przeprowadzono badanie prospektywne, przekrojowe. Materiał badawczy stanowiła grupa 58 kobiet ze zdiagnozowaną niepłodnością pierwotną, zaś grupę kontrolną 8 pacjentek posiadających naturalnie poczęte potomstwo. Pacjentki rekrutowano spośród kobiet hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii Ginekologicznej i Ginekologii celem przeprowadzenia diagnostyki hormonalnej, konsultowanych w Poradni Endokrynologii Ginekologicznej oraz diagnozowanych w ramach Programu Kompleksowej Ochrony Zdrowia Prokreacyjnego w okresie od listopada 2017 do marca 2019. Projekt badania uzyskał pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego nr 1072.6120.78.2017 z dn. 29. czerwca 2017 r. Środki finansowe pozyskano z dotacji celowej nr K/DSC/00421 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Kryteria włączenia do grupy badanej spełniały pacjentki w wieku reprodukcyjnym (18-40 lat) cierpiące z powodu niepłodności pierwotnej (bezsukteczne starające się o ciążę przez ponad rok), miesiączkujące regularnie, nie stosujące terapii hormonalnej.

Kryteria włączenia do grupy kontrolnej spełniały pacjentki w wieku reprodukcyjnym (18-40 lat) posiadające naturalnie poczęte potomstwo w wieku do trzech lat, miesiączkujące regularnie.

Pacjentki z obu grup zrekrutowane do badania zapraszano na wizytę w okresie okna implantacyjnego. Stosowny moment cyklu był określany na podstawie ultrasonograficznego monitoringu

owulacji. W trakcie wizyty, po potwierdzeniu przebytej owulacji, wykonywano biopsję aspiracyjną endometrium. W tym samym dniu od każdej pacjentki pobierano próbkę krwi żyłnej o objętości 5 ml. Następnie w pobranym materiale tkankowym metodą immunohistochemiczną oznaczano poziom IL-18, histaminy oraz GLUT4. We krwi metodą ELISA oznaczano poziom IL-18 oraz histaminy. Zebrane dane przeanalizowano przy użyciu stosownych metod statystycznych z wykorzystaniem programu Statistica StatSoft 13.3.

Wykazano, iż poziom IL-18 jest w sposób istotny statystycznie wyższy u kobiet posiadających potomstwo aniżeli u kobiet obciążonych niepłodnością idiopatyczną. Nie wykazano różnicy między poziomem IL-18 we krwi u kobiet z niepłodnością idiopatyczną w porównaniu z kobietami posiadającymi potomstwo. Dla wartości IL-18 we krwi stwierdzono różnicę, która przy większej liczebności grupy kontrolnej mogłaby być istotna statystycznie z uwagi na zawężenie przedziału ufności. Nie wykazano różnicy między poziomem histaminy w receptywnym endometrium kobiet z niepłodnością idiopatyczną w porównaniu z kobietami posiadającymi potomstwo. Nie wykazano różnicy między poziomem histaminy we krwi kobiet z niepłodnością idiopatyczną w porównaniu z kobietami posiadającymi potomstwo. Nie wykazano korelacji pomiędzy poziomem IL-18 w endometrium a jej poziomem we krwi. Nie wykazano korelacji pomiędzy poziomem histaminy w endometrium a jej poziomem we krwi. Stwierdzono, że poziom GLUT4 w receptywnym endometrium nie różni się między kobietami z niepłodnością idiopatyczną a posiadającymi potomstwo.

Uzyskane wyniki własne w kontekście doniesień z literatury pozwalają stwierdzić, że IL-18 jest cytokiną o działaniu dwukierunkowym. Z jednej strony jest niezbędna do implantacji w endometrium, prawidłowej inwazji trofoblastu oraz angiogenezy, z drugiej zaś podwyższone stężenie tej cytokiny jest szkodliwe i może potencjalnie prowadzić do niepowodzenia implantacji. Potrzebne są dalsze badania, aby możliwe było ustalenie punktu odcięcia dla tej wartości. Nie wykazano różnic w poziomie histaminy w endometrium między kobietami płodnymi a grupą o nieustalonej przyczynie niepłodności. Znajomość regulacji metabolizmu histaminowego w endometrium zwiększy zrozumienie problemów związanych z niepłodnością i może zaoferować nowe podejście farmakologiczne w celu optymalizacji metod wspomaganego rozrodu. Nie stwierdzono korelacji między poziomem histaminy w endometrium oraz we krwi. Podobnie w przypadku IL-18. Środowisko jamy macicy cechuje się wysoką autonomią, a warunki w endometrium nie przekładają się na efekty ogólnoustrojowe. Stąd nie zidentyfikowano do tej pory markera receptywności endometrium, którego oznaczenie byłoby jednoznaczne, wiarygodne oraz nie wiązało się z koniecznością przeprowadzania skomplikowanych procedur diagnostycznych. Wykonywanie kontrolowanego urazu endometrium celem poprawy wskaźnika implantacji jest zagadnieniem wysoce kontrowersyjnym z uwagi na sprzeczne wyniki badań. Ekspresja receptorów glukozy w endometrium jest spójna z faktem, iż tkanka ta charakteryzuje się wysokim obrotem komórkowym, a obecność specyficznych receptorów insuliny sugeruje bezpośrednie działanie insuliny na endometrium. Nieprawidłowe warunki hormonalne, takie jak PCOS (charakteryzujący się zwiększonym poziomem androgenów), zakłócają normalne wzorce ekspresji GLUT4 w komórkach endometrium.

Summary

The problem of infertility affects around 8 to 12% of reproductive age couples worldwide, which corresponds to more than 186 million people. Approximately 20% of couples cannot be diagnosed with particular factor causing infertility after routine diagnostic tests. Implantation disorders may be one of the causes of idiopathic infertility. Implantation can occur only at a specific point in the menstrual cycle, when the blastocyst's ability to implant is superimposed with readiness to be accepted by the endometrium, the so-called endometrial receptivity. The time interval in which the endometrium manifests this feature is called the implantation window. In human, this is a period of 3 to 6 days, falling in half of the secretory phase. In a 28-day menstrual cycle, it is estimated to last from the 20th to the 24th day of the cycle - that is, 6 to 10 days after the luteinizing hormone (LH) peak. Misadaptation of these two phases results in a miscarriage. Acquisition of receptivity by the endometrium is reflected in cellular and ultrastructural changes. These processes are controlled hormonally by estrogen and ovarian progesterone. In addition, locally produced signaling molecules such as cytokines, growth factors, homeobox transcription factors, and lipid mediators interacting with autocrine, paracrine and juxtacrine signaling play a role. Considering the role of local inflammation in the context of fertility, the distinction between acute inflammation and chronic inflammation of moderate or low intensity is the key. It is postulated that inflammatory mediators, including interleukin 18 (IL-18) and histamine, usually released during tissue repair and remodeling, are important mediators in decidualization and implantation. On the one hand, IL-18 is necessary for proper implantation in endometrium, undisturbed invasion of trophoblast and angiogenesis. On the other hand, in high concentrations IL-18 may potentially lead to implantation failure. Despite the widespread occurrence of histamine in organisms, few researches check its presence and role in tissues in the context of fertility. It is a molecule necessary for the implantation process, however its level in the endometrium in the context of idiopathic infertility has not been studied so far.

There was no correlation between histamine levels in the endometrium and in the blood. Similarly for IL-18. The environment of the uterine cavity is characterized by high autonomy, and conditions in the endometrium do not reflect systemic effects. Therefore, the endometrial receptivity marker has not yet been identified, whose determination would be unambiguous, reliable and did not involve the need for complicated diagnostic procedures. Performing a controlled endometrial injury to improve the implantation rate is a highly controversial issue due to conflicting research results. Appropriate glucose uptake and metabolism are associated with the function of differentiating the uterine endometrium towards receptive state that allows implantation of the embryo. The correct decidualization depends on adequate glucose concentration. The best described and most abundant glucose transporter in the endometrial stroma is glucose transporter 1 (GLUT1). GLUT4 is the most popular transporter studied due to its major role in glucose homeostasis throughout the body and the pathogenesis of type II diabetes. There is no data concerning role of GLUT4 in infertility of an undetermined cause. Endometrial scratching, or so-called controlled endometrial trauma, is a technique proposed to facilitate embryo implantation and increase the likelihood of pregnancy in women treated with assisted reproductive technology (ART). It is postulated

that damage or "scratching" of the endometrium that occurs as a result of biopsy may facilitate implantation of the embryo through inflammatory and immunological mechanisms. In addition, local endometrial damage in stimulated cycles delays endometrial development due to the healing process, and thus corrects asynchrony between the endometrial and embryo stages.

It was decided to examine whether the levels of selected pro-inflammatory molecules – IL-18 and histamine, as well as the GLUT4, differ in the population of women with infertility of unknown etiology as compared to women with naturally conceived offspring.

Work objectives include:

- I. Analysis of the level of IL-18 and histamine as molecules with a postulated role in the process of implantation in the receptive endometrium in women with primary idiopathic infertility in comparison to a group of women with naturally conceived offspring.
- II. Assessment of the correlation of IL-18 and histamine levels in the receptive endometrium and in the blood as an attempt to find a diagnostically useful receptivity marker.
- III. Analysis of GLUT4 level in the receptive endometrium of women with primary idiopathic infertility of unknown etiology in comparison with women with naturally conceived offspring.

A prospective, cross-sectional study was conducted. The research material was a group of 58 women diagnosed with primary idiopathic infertility, and the control group - 8 patients with naturally conceived offspring. Patients were recruited among women hospitalized at the Gynecological Endocrinology and Gynecology Clinic for hormonal diagnostics, consulted at the Gynecological Endocrinology Clinic and diagnosed in Comprehensive Procreational Health Protection Program from November 2017 to March 2019. The study design received a positive opinion from the Bioethical Committee of the Jagiellonian University No. 1072.6120.78.2017 on 29th June 2017. Financial resources were obtained from the Ministry of Science and Higher Education grant No. K / DSC / 0042.

The study group inclusion criteria were met by patients in reproductive age (18-40 years) suffering from primary infertility (unsuccessful seeking pregnancy for over a year), menstruating regularly, not using hormonal therapy.

The control group inclusion criteria were met by patients in reproductive age (18-40 years) with naturally conceived offspring up to three years of age, regularly menstruating.

Patients from both groups recruited for the study were invited to the Clinic during the implantation period. The appropriate moment of the cycle was determined on the basis of ultrasound ovulation monitoring. During the visit, after confirmation of ovulation, an endometrial aspiration biopsy was performed. On the same day, a 5 ml venous blood sample was taken from each patient. Then, IL-18, histamine and GLUT4 levels were checked in the collected tissue material by immunohistochemistry. Blood levels of IL-18 and histamine were determined by ELISA. The collected data was analyzed using appropriate statistical methods using the Statistica StatSoft 13.3 program.

It has been shown that the level of IL-18 is statistically significantly higher in women with offspring than in women with idiopathic infertility. There was no difference between blood IL-18 levels in women with idiopathic infertility compared to women with offspring. For the IL-18 value in the blood, a difference was found which, if the control group was larger, could be statistically significant due to the narrowing of the confidence interval. There was no difference between the histamine level in the receptive endometrium of women with idiopathic infertility compared with women with offspring. There was no difference between the levels of histamine in the blood of women with idiopathic infertility compared with women with offspring. There was no correlation between the level of IL-18 in the endometrium and its level in the blood. There was no correlation between the level of histamine in the endometrium and its level in the blood. It was found that GLUT4 levels in the receptive endometrium do not differ between women with idiopathic infertility and those with offspring.

Obtained own results in the context of reports from the literature allow to state that IL-18 is a bi-directional cytokine. On the one hand, it is necessary for implantation in the endometrium, proper trophoblast invasion and angiogenesis, on the other, the elevated concentration of this cytokine is harmful and can potentially lead to implantation failure. More research is needed to determine the cut-off point for this value. There were no differences in the level of histamine in the endometrium between fertile women and the group of undetermined cause of infertility. Knowledge of the regulation of histamine metabolism in the endometrium will increase understanding of infertility problems and may offer a new pharmacological approach to optimize assisted reproduction methods. There was no correlation between histamine levels in the endometrium and in the blood. Similarly for IL-18. The environment of the uterine cavity is characterized by high autonomy, and conditions in the endometrium do not translate into systemic effects. Therefore, the endometrial receptivity marker has not yet been identified, whose determination would be unambiguous, reliable and did not involve the need for complicated diagnostic procedures. Performing a controlled endometrial injury to improve the implantation rate is a highly controversial issue due to conflicting research results. The expression of glucose receptors in the endometrium is consistent with the fact that this tissue is characterized by high cell turnover, and the presence of specific insulin receptors suggests a direct effect of insulin on the endometrium. Abnormal hormonal conditions, such as PCOS (characterized by increased levels of androgens), interfere with normal GLUT4 expression patterns in endometrial cells.