

ЗАВРШЕН ЕЛАБОРАТ ЗА ПРОЕКТ

Испитување на комбинации помеѓу КИР молекули кај мајката и ХЛА молекули кај партнерот во проблематични бремености

НАУЧНА ОБЛАСТ: Гинекологија, Хумана генетика

ПОТЕСНО ПОДРАЧЈЕ:

КАТЕДРА-НОСИТЕЛ НА ПРОЕКТОТ: Катедра за генетика, Катедра за гинекологија и акушерство

ДРУГИ КАТЕДРИ УЧЕСНИЦИ ВО ИСТРАЖУВАЊЕТО:

ГЛАВЕН ИСТРАЖУВАЧ: Проф. Д-р Александар Петличковски, Проф. Д-р Глигор Тофоски

УЧЕСНИЦИ ВО ПРОЕКТОТ: Асист. Д-р Горјан Милановски, Доц. Д-р Роса Спасова, Проф. д-р Димитров Горан, Доц. д-р Марија Хаџи Лега, Доц. д-р Киријас Мери, Проф. д-р Ана Данева, Проф.д-р Јадранка Георгиевска, Доц. д-р Елена Цикова, Доц. д-р Ирена Алексиовска Палестијев

ТРАЕЊЕ НА ПРОЕКТОТ: 3 години

Вовед

Репродуктивниот успех на човечкиот вид продолжува да биде имунолошка енигма. Скоро 10% од сите глобални болести се должат на компликации од бременоста како што се рекурентна загуба на бременост, прееклампсија, ограничување на феталниот раст и предвремено породување¹. Се смета дека плацентарната дисфункција е најчеста патогенеза на овие заболувања². Плацентата почнува да се формира откако ќе започне имплантацијата. Екстравилозните трофобластни клетки го формираат ендометриумот и се движат во децидуата. Процесот на децидуализација бара морфолошки и функционални промени на стромалните клетки на матката и вклучување на имуните клетки. Иmunите клетки сочинуваат скоро 40% од децидуалните клетки³. Иmunите клетки лоцирани во миометриумот и децидуата доаѓаат во контакт со клетките на екстравилозниот трофобласт. Отстранувањето на имуните клетки од областа на имплантација или попречувањето на нивниот сигнален пат може да доведе до рекурентни спонтани абортуси⁴.

Рекурентните спонтани абортуси (РСА) со непозната етиологија обезбедуваат фундаментален увид во процесите на ембриогенеза и имплантација и претставуваат значаен клинички проблем. И во услови на најдобри околности, репродуктивниот процес кај луѓето е прилично неефикасен, бидејќи приближно 70% од оплодените јајце клетки се губат (не се имплантираат ниту развиваат). Спонтаниот абортус е еден од најмалку разбраните патолошки процеси и покрај тоа што е еден од најчестите⁵. Кај 50% или повеќе од паровите со РСА евалуацијата вклучува, кариотип на обата партнери, хистеросалфингографија или хистеро-скопија и тестирање на антифосфолипидни антитела. Сите овие тестови најчесто се негативни. Затоа, мнозинството (приближно 50 – 75 %) од паровите со РСА вусшност немаат дијагноза.

Во поново време значаен глобален проблем претставува неуспешната имплантација или спонтаниот абортус по ин-витро оплодување, за жал и покрај значителниот напредок во асистираниите репродуктивни технологии (АРТ). Висок процент на ембриони (50%) се губат ведаш по имплантацијата или набргу потоа како спонтан абортус¹. Сепак, најстресниот проблем од економска и психолошка гледна точка за ембриолозите и субфертилните парови е рекурентниот неуспех на имплантација, кој влијае на 10–15% од паровите кои биле подложени на неколку ембриотрансфери на ин-витро оплодување. Рекурентниот неуспех на имплантација обично се дефинира како неуспех да се постигне бременост по три последователни ИВФ циклуси, во кои четири квалитетни ембриони беа префрлени кај жени на возраст под 40 години.

Проблематичните бремености, репетитивните абортуси и неуспешната имплантација, имаат разни етиологии. Многу од нив имаат имунолошки дисфункции кои вклучуваат присуство на цитотоксични антитела, споделување на HLA антигени и нарушувања на функција на рецепторот сличен на имуноглобулин на клетките природни убијци.

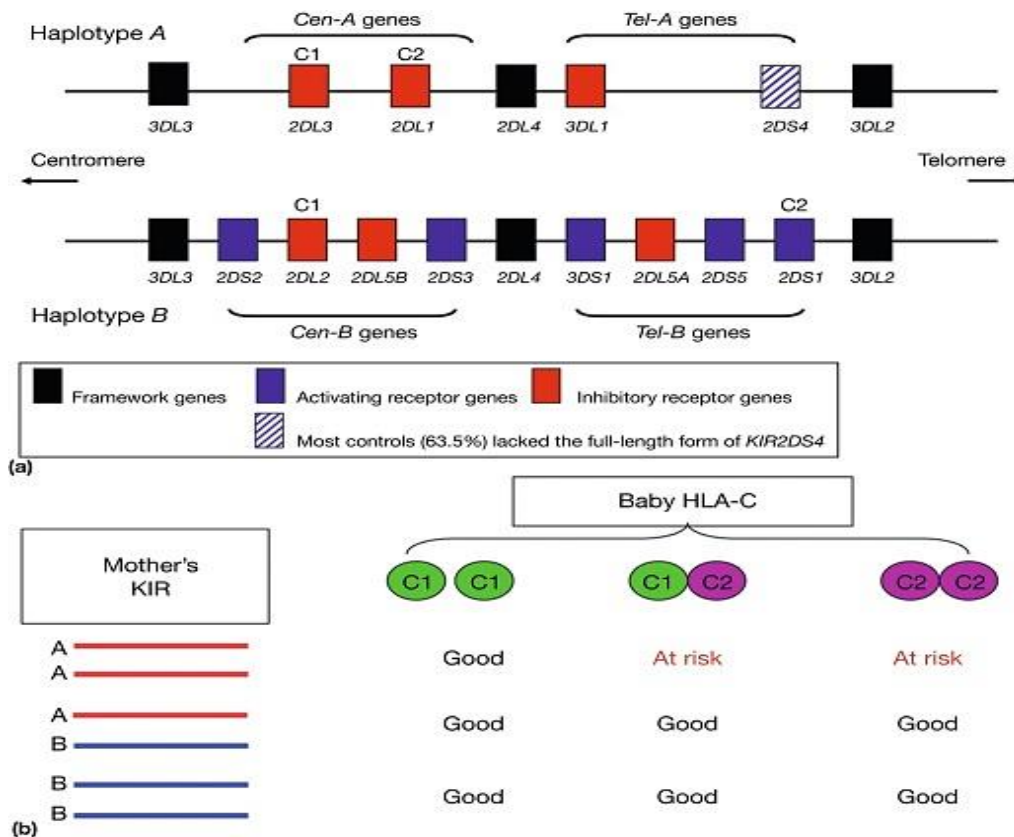
Од прозорецот на имплантација до првиот триместар, повеќето имунолошки клетки на интерфејсот помеѓу мајката и фетусот се клетките природни убијци на матката (УКПУ)¹.

Сè поголем број студии се фокусираа на важноста на УКПУ клетките во зачувувањето на бременоста⁶.

Утерините клетки природни убијци (УКПУ) (uterine natural killer cells- UNKs) се најбројни имуни клетки во мукоза на матката, застапени со повеќе од 70 % од леукоцитите во секреторниот ендометриум⁷. УКПУ и клетките природни убијци во периферната крв се разликуваат меѓусебно според маркерите на клеточната мембрана и функцијата⁸. Постојат цврсти докази дека основната функција на УКПУ е поврзана со регулација на раната плацентација. Студии покажуваат дека тие се диференцираат и пролиферираат во периодот на имплантација и ја населуваат децидуата за време на рана бременост во близина на екстравилозниот трофобласт (ЕВТ) и околу спиралните артерии⁹. УКПУ исто така влијаат врз ангиогенеза и васкуларното ремоделирање на ЕВТ така што секретираат активни молекули брзо после имплантацијата¹⁰. Сè побројните докази укажуваат дека УКПУ имаат важна улога во процесот на имплантацијата преку васкуларното ремоделирање.

Хипотезата е дополнително поддржана од студии кои ја докажуваат директната лиганд-рецепторска интеракција помеѓу ЕВТ и УКПУ. Утерините клетки природни убијци имаат специјализирани мембрански рецептори наречени КИР (killer cell immunoglobulin receptors), кои се поврзуваат со ХЛА (human leucocyte antigen) молекулите т.е. со ХЛА-Ц лигандите кои се презентирани на ЕВТ. КИР рецепторите се кодирани од група на високо полиморфни гени кои доведуваат до голема варијација во структурата на КИР. Иако постојат бројни полиморфизми, КИР се класично поделени во две категории, активирачки и инхибиторни. Тие се категоризирани на таков начин според нивното влијание врз функцијата на УКПУ, поточно цитотоксичноста и ангиогенезата. Една индивидуа носи алели од повеќе КИР генотипови, често и активирачки и инхибиторни. Сепак, специфични генотипови имаат тенденција заеднички да се наследуваат, во така наречен linkage disequilibrium¹¹. Поради оваа карактеристика, КИР генотипот кај една индивидуа е традиционално категоризиран во два хаплотипови: КИР А (присутни се само инхибиторни генотипови) и КИР Б (присутни се активирачки генотипови)¹². Лиганди на КИР рецепторите се високо полиморфните ХЛА-Ц молекули. Тие се презентирани на ЕВТ. Досега се откриени илјадници варијанти низ светот. ХЛА-Ц генотиповите се најчесто поделени во две групи во однос на тоа која аминокиселина е присутна на позиција 80 на епитопот (ХЛА-Ц1: аспаргин; ХЛА-Ц2: лизин)¹³. Следствено одговорот на УКПУ е под влијание од Ц1 и Ц2 генотипот (хетерозигот/хомозигот) на новата бременост. Екстремната варијабилност на мајчиниот КИР и феталниот ХЛА-Ц лиганд значи дека секоја бременост си носи низа на различни потенцијални комбинации (Слика 1). Токму влијанието на оваа ХЛА-КИР интеракција врз исходот на една бременост е тема на истражување на бројни студии.

Во нашата држава за оваа проблематика постојат навистина многу малку податоци, поради што беше спроведена оваа студија за испитување на комбинации помеѓу КИР молекули кај мајката и ХЛА молекули кај партнерот во неуспешни (проблематични) бремености.



Слика 1: КИР гени и ризични комбинации помеѓу мајката и плодот

Цели на студијата

1. КИР/ХЛА генетско тестирање на минимум 50 пара кои имаат инфертилитет и/или рекурентни абортуси
2. Споредба и анализа на добиените резултати со контролната група за да се утврди дали постои статистичка значајна разлика
3. Откривање на парови со ризични КИР/ХЛА комбинации опишани во светската научна литература
4. Воведување на нови клинички протоколи за подобрување на шансите за успешна бременост кај парови со ризични комбинации на КИР/ХЛА
5. Воведување на рутинско КИР/ХЛА генетско тестирање
6. Подобрување на интеринституционалната соработка со цел подобра услуга на пациенти со проблеми со зачнување и/или чести абортуси

Материјал и методи

Во студијата беа опфатени 54 парови и контролна група од парови кои имале едно или повеќе деца. Паровите беа регрутирани од страна на Клиниката за Гинекологија и Институтот за Имунобиологија и Хумана Генетика при Медицински Факултет, Скопје. Сите парови беа негативни за инфекции како токсоплазма, рубеола, итн., за

конвенционални причини како хипертензија, дијабетес, за хормонална дисфункција, тромбофилни фактори на ризик, цитогенетика, автоимуни и анатомски абнормалности како причини за лошиот репродуктивен исход. HLA серолошката типизација и анти-HLA антителата беа направени по стандардната двостепена NIH микролимфоцитотоксичност анализа.

Инклузиони критериуми:

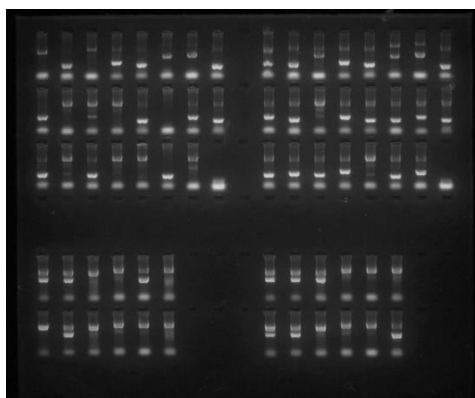
1. Парови со инфертилитет(примарен или секундарен)
2. Парови со репетитивни абортуси
3. Парови со неуспешна имплатација по ин-витро оплодување

После соодветна анамнеза и преглед пациентите беа упатени до Институтот за Имунобиологија и Хумана Генетика за генетски анализи. На прием паровите заедно со истражувачот пополнуваа прашалник во кој беше содржана целокупната репродуктивна и лична анамнеза. За учество во студијата испитаниците потпишуваа информирана согласност. Студијата беше одобрена од Етичкиот комитет при Медицинскиот Факултет во Скопје .

Следствено од пациентите се земаше примерок од периферна крв (5 мл крв во епруветка со антикоагуланс ЕДТА) и од него се правеше изолација на ДНК на MagCore™ платформа, Тајван. Понатаму се правеа генетски анализи со SSP (sequence specific priming) техника (Слика 2), а користени китови беа KIR Genotyping и KIR HLA Ligand, Olerup SSP™, Шведска. KIR Genotyping китот ги опфаќа следните гени: KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4*001/002, KIR2DS4*003-007, KIR2DS5, KIR3DS1, KIR2DP1, KIR3DP1*001/002/004 и KIR3DP1*003. Овие гени понатаму се анализираа и се категоризираа во соодветни хаплотипови KIR А или KIR Б. KIR HLA Ligand китот ги опфаќа следните групи на гени: HLA-C^{Asn80}(C1), HLA-C^{Lys80}(C2), HLA-B^{Bw4+Thr80}, HLA-B^{Bw4+Ile80}, HLA-A^{Bw4}, HLA-B^{Bw4,Thr80} и B^{Bw4+Asp77,Thr80}.

Само кај женските индивидуи се правеше KIR Genotyping со цел откривање на молекулите на површината на утерините клетки природни убијци. Додека KIR HLA Ligand се анализираше и на жените и на мажите со цел откривање што потенцијално би наследил плодот.

Поврзаноста помеѓу пациентите и контроли беше евалуирана за проценка на фреквенцијата на алели, анализа на хаплотип и P-вредност.



Слика 2: Гел елктрофореза (SSP KIR genotyping и KIR-HLA ligand)

Резултати

Во студијата учествуваа 54 пара со проблеми со инфертилитет и чести спонтани абортуси. Од нив вкупно 51 пар пополнија прашалник. Според добиените податоци од прашалникот 47 пара беа ставени во групата со инфертилитет или абортус (Група 1), додека 7 пара кои имале претходна успешна бременост беа сместени во посебна група (Група 2).

Група 1 дополнително ја поделивме во група на парови со примарен инфертилитет (12 пара; Група 3) и група кои пријавиле спонтан абортус (32; Група 4). Како контролна група беа вклучени 122 здрави индивидуи без репродуктивни потешкотии¹⁴.

Алелната фреквенција на анализирани КИР гени од испитаниците од Група 1 (жени) ја споредивме со алелната фреквенција на контролната група. Статистички значајна разлика забележавме во два алели: **KIR2DS1** ($p < 0.01475$) и **KIR2DS5** ($p < 0.04049$).

| Тип на КИР | Активирачки КИР | | | | | | Ихибиторни КИР | | | | | | | Псевдогени | | |
|---------------------------|-----------------|----------|----------|----------|----------------|----------|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|----------|----------|
| Ген | KIR 2DS1 | KIR 2DS2 | KIR 2DS3 | KIR 2DS4 | KIR 2DS5 | KIR 3DS1 | KIR 2DL1 | KIR 2DL2 | KIR 2DL3 | KIR 2DL4 | KIR 2DL5 | KIR 3DL1 | KIR 3DL2 | KIR 3DL3 | KIR 2DP1 | KIR 3DP1 |
| Број на испитаници | 13 | 27 | 17 | 46 | 7 | 12 | 44 | 30 | 41 | 47 | 20 | 46 | 47 | 47 | 45 | 47 |
| Група 1 | 0.28 | 0.57 | 0.36 | 0.98 | 0.15 | 0.26 | 0.94 | 0.64 | 0.87 | 1.00 | 0.43 | 0.98 | 1.00 | 1.00 | 0.96 | 1.00 |
| Контролна група | 0.48 | 0.57 | 0.33 | 0.96 | 0.3 | 0.38 | 0.94 | 0.59 | 0.9 | 1.00 | 0.41 | 0.96 | 1.00 | 1.00 | 0.98 | 1.00 |
| p вредност ($p < 0.05$) | 0.01475 | 0.9934 | 0.6768 | 0.535 | 0.04049 | 0.1353 | 0.8734 | 0.5665 | 0.5801 | 1.00 | 0.8528 | 0.535 | 1.00 | 1.00 | 0.3162 | 1.00 |

Исто така направивме споредба помеѓу повеќе различни групи на фреквенцијата на хаплотиповите (А и Б) и ризичните комбинации опишани во литературата (А/Ц2 и Б/Ц1).

Група 1 во споредба со Група 2 во овие параметри покажа дека ниту во хаплотиповите ниту пак во однос на ризичните комбинации не се разликуваат т.е. не се пронајде статистички значајна разлика. Но мора да се потенцира дека во Група 1 дури 21% (10/47) од испитаниците ја имале А/Ц2 ризичната комбинација, додека во Група 2 не е забележана ниту еднаш (0/7).

| | А хаплотип | Б хаплотип | А / Ц2 | Б / Ц1 |
|---|------------|------------|--------|--------|
| Анализирани парови кои ги исполнуваат инклузионите критериуми (Група 1) | 0.30 | 0.70 | 0.21 | 0.55 |
| Анализирани парови кои имале успешна бременост (Група 2) | 0.43 | 0.57 | 0 | 0.57 |
| p вредност ($p < 0.05$) | 0.4873 | 0.4873 | 0.2276 | 0.9278 |

Понатаму сакавме да дознаеме дали постои разлика во фреквенции помеѓу Група 3 (парови со примарен инфертилитет) и Група 4 (парови со спонтан абортус). Анализирајќи ги хаплотиповите А и Б не забележавме статистички значајна разлика. Воедно не се пронајде разлика и кај ризичните комбинации (А/Ц2 и Б/Ц1).

| | А хаплотип | Б хаплотип | А / Ц2 | Вх / Ц1 |
|--|------------|------------|--------|---------|
| Анализирани парови со примарен инфертилитет (Група 3) | 0.33 | 0.67 | 0.25 | 0.42 |
| Анализирани парови кои пријавиле спонтан абортус (Група 4) | 0.28 | 0.72 | 0.22 | 0.59 |
| р вредност (p<0.05) | 0.7359 | 0.7359 | 0.8256 | 0.2934 |

Интересна компарација е помеѓу екстремите, Група 2 (парови со претходна успешна бременост) и Група 3 (парови со примарен инфертилитет). Во однос на фреквенцијата на хаплотиповите не се забележа разлика, исто така и за ризичните комбинации.

| | А хаплотип | Б хаплотип | А / Ц2 | Б / Ц1 |
|--|------------|------------|--------|--------|
| Анализирани парови со примарен инфертилитет (Група 3) | 0.33 | 0.67 | 0.25 | 0.42 |
| Анализирани парови кои имале успешна бременост (Група 2) | 0.43 | 0.57 | 0 | 0.57 |
| р вредност (p<0.05) | 0.678 | 0.678 | 0.1494 | 0.5146 |

Резултатите добиени од студијата не ги споредивме само со контролната група, туку и со општата македонска популација¹⁵. Компарацијата ја направивме на ниво на хаплотип и не се пронајде статистички значајна разлика.

| | А хаплотип | Б хаплотип |
|---|------------|------------|
| Анализирани парови кои ги исполнуваат инклузионите критериуми (Група 1) | 0.30 | 0.70 |
| Македонска популација | 0.215 | 0.785 |
| р вредност (p<0.05) | 0.2511 | 0.2511 |

Дискусија

Во последните неколку години доказите за влијанието на УКПУ врз имплантацијата на ембрионот и формирањето на плацентата се сè поцврсти и КИР/ХЛА генетските анализи стануваат дел од протоколите кај парови кои имаат проблеми со инфертилитет, повторувачки абортуси и/или болести во бременоста. Особено важно е тоа што идентификуваните ризични комбинации не се само научен факт, туку со напорот на бројни истражувачи се докажа и клиничкото значење на нив. Сè повеќе светски клиници за инвитро фертилизација воведоа модифицирани протоколи со кои се обидуваат да ја надминат дополнителната пречка и да ја зголемат веројатноста за успешна бременост. Со нашата студија се обидовме да допринесеме со информации и од македонската популација.

Една од главните цели на истражувањето беше споредба на алелната фреквенција на КИР гените помеѓу жени кои имаат проблеми со инфертилитет и/или чести абортуси и здрави жени со успешни бремености од контролната група. Досега има само неколку студии каде се испитуваат матерналните КИР гени за репетитивни спонтани абортуси, и тие истите имаат спротивставени заклучоци. Ванг и сор. објавуваат дека активирачките КИР гени се побројни кај жените со репетитивни абортуси во однос на фертилни пациентки во кинеската популација¹⁶. Вит и сор., пак не пронашле значајна врска меѓу полиморфизмите на генот КИР и рекурентниот спонтан абортус¹⁷. Варла-Лефтериоти и сор. утврдуваат дека причината за спонтан абортус кај жени кои доживеале ало-имун абортус е тоа што тие имаат ограничен број на инхибирачки репертоар на КИР и на тој начин трофобластните HLA класа I молекули не биле препознаени од децидуалните УКПУ и се перципирани како туѓи¹⁸. Студијата на Александру и сор. пак открила дека носителство на КИР А хаплотипот т.е. недостатокот на активирачки КИР гени го зголемува ризикот за неуспешна бременост во споредба со КИР Б¹⁹. Нашата студија е во согласност со оваа студија. Во нашата студија, увидовме дека во активирачките 2DS1 и 2DS5 гени постои статистички значајна разлика помеѓу испитуваната и контролната група. Споменатите активирачки гени поретко се среќаваат кај жени кои имаат проблеми со бременоста во споредба со жени кои имале успешна бременост. Истражувањата покажуваат дека KIR2DS1 игра важна улога во соодветната активација, миграција и учество на утерините клетки природни убијци во процесот на имплантација и формирањето на плацентата. Отсуството на KIR2DS1, кое го забележавме во нашата студија, би можело да доведе до намалена активација на УКПУ и тоа да доведе до инсуфициентна имплантација на ембрионот, а понатаму и субоптимално формирање на плацентата. Мора да се потенцира дека влијанието на КИР генотипот многу зависи и од експресираниот КИР-ХЛА лиганд на трофобластот²⁰.

Во серија на студии, Хиби и сор. откриваат дека специфични КИР генотипови се почесто забележани кај пациенти со проблеми типично поврзани со абнормална плацентација - повторувачки абортуси, рестрикции во растот на фетусот (fetal growth restriction) и преекламсија^{21,22}, додека други КИР генотипови го намалуваат ризикот од овие заболувања²³. Кај пациенти кои имаат само инхибиторни генотипови (КИР А), ризикот за нарушувања во бременост е егзацериран со присуство на татков ХЛА-Ц2 лиганд кај

плодот²⁴. Исто така, присуство на КИР А хаплотипот се покажало дека го зголемува ризикот за неуспешна бременост во споредба со КИР Б. Сепак, во оваа студија не е анализиран ХЛА-Ц генотипот на ЕВТ¹⁹. Иако споменатите студии даваат сериозни докази за придонесот на ХЛА-КИР системот во абнормалната плацентација и абортуси во рана бременост, сепак постојат и ограничувања. Едното ограничување е влијанието на хромозомските абнормалности, кои се причина за половина од пријавените абортуси. Другото е што овие споменати студии немаат директен доказ за ХЛА-Ц генотипот наследен кај ЕВТ, туку информациите за потенцијалниот генотип се базирани од ХЛА-Ц типизацијата на мајката и таткото. Една студија се обиде овие ограничувања да ги надмине каде што ретроспективно анализираа 668 еуплоидни ембриотрансфери заедно со ДНК од мајката. Студијата покажа дека високо ризичните комбинации КИР А/ хомозигот Ц2 и КИР Б/ хомозигот Ц1 доведуваат до 51% зголемен ризик за неуспешна бременост во споредба со други комбинации²⁰.

Во нашата студија забележавме дека дури 21 % од паровите ја имаат КИР А/Ц2 ризична комбинација. Оваа информација ни беше особено важна, бидејќи како што наведовме погоре, сè повеќе ин-витро клиници имаат модифицирани протоколи за парови кај кои се откриени ризични КИР/ХЛА комбинации. Со ова 21% од паровите добиваат уште една опција за подобрување на нивните шанси за успешна бременост кои претходно ја немаа во Република Македонија. Ограничувањето на нашата студија е тоа што можевме само статистички да забележиме колку парови ја имаат оваа ризична комбинација, но не и од прва рака да анализираме дали навистина постои статистичка разлика помеѓу двете групи. Не можевме, бидејќи контролната група која ја користевме имаше само информации за фреквенцијата на КИР гените кај жени со успешна бременост. Ни недостасуваше КИР-ХЛА лигандот од нивниот партнер. Ова планираме да го анализираме со идно прошурување на студијата.

Покрај научните сознанија кои ги добивме од истражувањето, исто толку важна е имплементацијата на КИР/ХЛА генетските анализи во рутината и во протоколите кај парови со проблеми во бременоста. Ова е од особено значење, бидејќи со ова ги следиме светските трендови во генетиката и гинекологија и им овозможуваме квалитетна услуга на пациентите. Соработката која се оствари и подобри помеѓу инволвираните институции е особено важна. Плановите за продолжување и проширување на студијата се: зголемување на бројот на испитаници, дополнување на контролната група со податоци од партнерите, анализа на влијанието на КИР/ХЛА комбинациите кај други болести во бременоста како преекламсија/еклампсија, имплементација на модифицираните протоколи за ин-витро фертилизација за ризичните парови и др.

Литература:

1. **Brosens I, Pijnenborg R, Vercruyse L and Romero R:** The “Great Obstetrical Syndromes“ are associated with disorders of deep placentation. *Am J Obstet Gynecol.* 204:193–201. 2011. PubMed/NCBI View Article : Google Scholar
2. “Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss“: A committee opinion. *Fertil Steril.* 98:1103–1111. 2012. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
3. **Van den Boogaard E, Kaandorp SP, Franssen MT, Mol BW, Leschot NJ, Wouters CH, van der Veen F, Korevaar JC and Goddijn M:** “Consecutive or non-consecutive recurrent miscarriage: Is there any difference in carrier status? “ *Hum Reprod.* 25:1411–1414. 2010. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI.
4. **Prager SW, Steinauer JE, Foster DG, Darney PD, Drey EA.** “ Risk factors for repeat elective abortion“. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197:575.e1–6
5. Bearak J, Popinchalk A, Ganatra B, Moller A-B, Tunçalp Ö, Beavin C, et al. “Unintended pregnancy and abortion by income, region, and the legal status of abortion: estimates from a comprehensive model for 1990–2019“. *Lancet Glob Health.* 2020;8(9):e1152–61.
6. **Moffett-King A:** “ Natural killer cells and pregnancy“. *Nat Rev Immunol.* 2:656–663. 2002. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
7. **Trundley A, Moffett A.** “Human uterine leukocytes and pregnancy“. *Tissue Antigens.* 2004 Jan;63(1):1-12. doi: 10.1111/j.1399-0039.2004.00170.x. PMID: 14651517.
8. **Moffett A, Shreeve N.** “First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction“. *Hum Reprod.* 2015 Jul;30(7):1519-25. doi: 10.1093/humrep/dev098. Epub 2015 May 7. PMID: 25954039; PMCID: PMC4472320.
9. **Pace D, Morrison L, Bulmer JN.** “Proliferative activity in endometrial stromal granulocytes throughout menstrual cycle and early pregnancy“. *J Clin Pathol.* 1989 Jan;42(1):35-9. doi: 10.1136/jcp.42.1.35. PMID: 2921342; PMCID: PMC1141787.
10. **Robson A, Harris LK, Innes BA, Lash GE, Aljunaidy MM, Aplin JD, Baker PN, Robson SC, Bulmer JN.** “Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy“. *FASEB J.* 2012 Dec;26(12):4876-85. doi: 10.1096/fj.12-210310. Epub 2012 Aug 23. PMID: 22919072.
11. **Parham P.** “MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival“. *Nat Rev Immunol.* 2005 Mar;5(3):201-14. doi: 10.1038/nri1570. PMID: 15719024.
12. **Lanier LL.** “NK cell receptors“. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:359-93. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.359. PMID: 9597134.
13. **Mandelboim O, Reyburn HT, Valés-Gómez M, Pazmany L, Colonna M, Borsellino G, Strominger JL.** “ Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules“. *J Exp Med.* 1996 Sep 1;184(3):913-22. doi: 10.1084/jem.184.3.913. PMID: 9064351; PMCID: PMC2192787.
14. **Djulejic E, Petlichkovski A, Trajkov D, Dimitrov G, Alabakovska S.** KIR Gene “Frequencies in Women with Infertility Problems“. *SEE J Immunol.* 2015 Feb 04; 2015:20002. <http://dx.doi.org/10.3889/seejim.2015.20002>
15. **Djulejic E, Petlichkovski A, Trajkov D, Hristomanova S, Middleton D, Spiroski M.** “Distribution of killer cell immunoglobulinlike receptors in the Macedonian population“.

- Hum Immunol.* 2010 Mar;71(3):281-8. doi: 10.1016/j.humimm.2009.12.001. Epub 2009 Dec 22. PMID: 20004695.
16. **Wang S, Zhao YR, Jiao YL, et al.** “Increased activating killer immunoglobulin-like receptor genes and decreased specific HLA-C alleles in couples with recurrent spontaneous abortion“. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;360:696–701. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.125.
 17. **Witt CS, Goodridge J, Gerbase-Delima MG, Daher S, Christiansen FT.** “ Maternal KIR repertoire is not associated with recurrent spontaneous abortion“. *Hum Reprod.* 2004;19:2653–2657. doi: 10.1093/humrep/deh483
 18. **Varla-Leftherioti M, Spyropoulou-Vlachou M, Keramitsoglou T, et al.** “Lack of the appropriate natural killer cell inhibitory receptors in women with spontaneous abortion“. *Hum Immunol.* 2005;66:65–71. doi: 10.1016/j.humimm.2004.10.005
 19. **Alecsandru D, Garrido N, Vicario JL, Barrio A, Aparicio P, Requena A, García-Velasco JA.** “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 Dec;29(12):2637-43. doi: 10.1093/humrep/deu251. Epub 2014 Oct 14. PMID: 25316448.
 20. **Morin SJ, Treff NR, Tao X, Scott RT 3rd, Franasiak JM, Juneau CR, Maguire M, Scott RT.** “ Combination of uterine natural killer cell immunoglobulin receptor haplotype and trophoblastic HLA-C ligand influences the risk of pregnancy loss: a retrospective cohort analysis of direct embryo genotyping data from euploid transfers“. *Fertil Steril.* 2017 Mar;107(3):
 21. **Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A.** “ Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success “. *J Exp Med.* 2004 Oct 18;200(8):957-65. doi: 10.1084/jem.20041214. Epub 2004 Oct 11. PMID: 15477349; PMCID: PMC2211839.
 22. **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 Apr;23(4):972-6. doi: 10.1093/humrep/den011. Epub 2008 Feb 8. PMID: 18263639.
 23. **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
 24. **Hiby SE, Apps R, Chazara O, Farrell LE, Magnus P, Trogstad L, Gjessing HK, Carrington M, Moffett A.** “ Maternal KIR in combination with paternal HLA-C2 regulate human birth weight“. *J Immunol.* 2014 Jun 1;192(11):5069-73. doi: 10.4049/jimmunol.1400577. Epub 2014 Apr 28. PMID: 24778445; PMCID: PMC4028203.