

©І.Є. Гуменецький, О.І. Терпиляк

ВИЗНАЧЕННЯ РОЛІ ГОМОЛОГІЇ ЗА АЛЕЛЯМИ ГЕНІВ HLA II-ГО КЛАСУ В ПОДРУЖНІХ ПАР ЗІ ЗВИЧНИМ НЕВИНОШУВАННЯМ ВАГІТНОСТІ*Державна Установа «Інститут спадкової патології НАМН України»*

ВИЗНАЧЕННЯ РОЛІ ГОМОЛОГІЇ ЗА АЛЕЛЯМИ ГЕНІВ HLA II-ГО КЛАСУ В ПОДРУЖНІХ ПАР ЗІ ЗВИЧНИМ НЕВИНОШУВАННЯМ ВАГІТНОСТІ. У статті наведені дані обстеження 194 жінок зі звичним невиношуванням вагітності яким проведено ультразвукові, рентгенологічні та ендоскопічні методи діагностики. В зв'язку з тим, що гомологія серед подружніх пар за генами HLA є негативним фактором як для настання вагітності, так і для її нормального протікання проведено аналіз даних генотипування HLA II-го класу з точки зору гомологічності у 122 подружніх пар зі звичним невиношуванням вагітності за алейними варіантами генів HLA-DRB, HLA-DQA1 та HLA-DQB1.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОЛИ ГОМОЛОГИИ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ HLA II-ГО КЛАССА В СУПРУЖЕСКИХ ПАР С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ. В статье представлены данные обследования 194 женщин с привычным невынашиванием беременности у которых выполнены ультразвуковые, рентгенологические и эндоскопические методы диагностики. В связи с тем, что гомология среди супружеских пар по генам HLA является негативным фактором как для наступления беременности, так и для ее нормального протекания выполнен анализ данных генотипирования HLA II-го класса с точки зрения гомологичности у 122 супружеских пар с привычным невынашиванием беременности по аллельными вариантами генотипов HLA-DRB, HLA-DQA1 и HLA-DQB1.

DEFINING THE ROLE HOMOLIGY ALLELES HLA CLASS II IN COUPLES WITH RECURRENT MISCARRIAGE. The article presents a survey 194 women with recurrent miscarriage who performed ultrasound, X-ray and endoscopic methods of diagnosis. Due to the fact that the homology among couples of genes HLA is a negative factor for the onset of pregnancy, and for its normal course performed the analysis of data genotyping HLA class II in terms of homology in 122 couples with recurrent miscarriage by allelic variants HLA-DRB, HLA-DQA1 and HLA-DQB1.

Ключові слова: звичне невиношування вагітності, генотипування HLA II-го класу.

Ключевые слова: привычное невынашивание беременности, генотипирование HLA II-го класса.

Key words: recurrent miscarriage, genotyping HLA II-class.

ВСТУП. Проблема невиношування вагітності, незважаючи на велику кількість експериментальних та наукових досліджень, остаточно не вирішена. Кількість неплодних шлюбних пар в Україні з кожним роком зростає. [1, 2]. Аналізуючи літературні дані про розповсюдженість та структуру невиношування вагітності, можна дійти висновку про широку варіабельність результатів навіть в межах однієї країни. Це є не тільки показником популяційних відмінностей, але й вказує на неадекватність та недосконалість методів дослідження. Подальше покращення організації надання медичної допомоги при неплодності вимагає визначення не тільки розповсюдженості неплодності, але й взаємозв'язку її з чинниками, що визначають умови життя, праці, побуту населення в різних географічних регіонах. Етіологія звичного невиношування вагітності (ЗНВ) різноманітна і залежить від різних чинників. Одні з них безпосередньо призводять до закладання аномального ембріона, другі створюють несприятливі умови для нормального розвитку. Серед основних причин ЗНВ виділяють генетичні чинники, статеві трансмісивні інфекції, ендокринні чинники та імунні порушення (автоімунні та аллоімунні) [3]. На сьогоднішній день однією з провідних причин ЗНВ вагітності в ранніх термінах прийнято вважати генетичний фактор, внесок якого за різними даними складає від 2,5 % до 10 %. У 60–80 % випадків переривання вагітності спровоковано хромосомними аномаліями в ембріона/плода, причому до 95 % зачать з хромо-

сомними порушеннями елімінується ще до моменту встановлення вагітності. Причина раннього невиношування вагітності при відсутності аномалій каріотипу частіше всього має імуногенетичну природу [4, 5].

Однією із можливих передумов звичного невиношування вагітності може бути так звана «материнська імунна відповідь на плід». Імунний статус організму обумовлює великий комплекс гістосумісності (MHC – Major Histocompatibility Complex), який у людини ще називається HLA-системою (Human Leukocyte A-system) [6]. Участь великого комплексу гістосумісності у схильності до невиношування вагітності розглядається під кутом зору пошуку конкретних генів HLA, причетних до репродукційних втрат, подібності подружжя за HLA-антигенами, або вивчення модулюючих властивостей HLA-системи в комплексі генної сітки [7].

Роботи, присвячені вивченню ролі антигенів HLA у виникненні патології вагітності, проводилися з 70-х років минулого століття. В останні 20 років особливо інтенсивно проводяться дослідження з проблеми «HLA і хвороби» [7, 8, 9, 10]. В основі імунологічних порушень, що ведуть до відторгнення ембріона, лежать аутоімунні і аллоімунні процеси. При аутоімунних процесах фактором агресії стають власні тканини материнського організму. До числа таких відносять антифосфоліпідний синдром [11]. Виявлена позитивна асоціація між антигенами HLA-A29, HLA-B22 і порушенням репродуктивної функції, пов'язаної з циркуляцією антифосфоліпідних антитіл. У зв'язку з цим

можна припустити, що у частини жінок з «проблемних» пар, невиношування обумовлено доклінічним проявом аутоімунного процесу.

В останні роки увага дослідників звернена на можливість участь саме генів II-го класу HLA-системи у спонтанному перериванні вагітності. Пропонується [11, 12] можливий механізм впливу окремих поліморфних варіантів генів II-го класу HLA-системи на переривання вагітності, що полягає у тому, що клітини плода вже на 5-му тижні експресують HLA-антигени II-го класу: HLA-DR та HLA-DQ, що запускають імунну відповідь матері. Відповідно наявність певних алельних варіантів генів HLA-DR та HLA-DQ, можливо, створюють умови, при яких не розпізнаються антигени плода. Зважаючи на те, що такого роду дослідження не проводились в Україні, то ми вважаємо їх надзвичайно актуальними.

Метою роботи було вивчення даних клінічного обстеження репродуктивної функції та даних генотипування жінок зі звичним невиношуванням вагітності нез'ясованого ґенезу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Об'єктом дослідження були 194 пацієнтки зі ЗНВ. Методи дослідження: загальноклінічні, інструментальні (ультразвукове дослідження, гістеросальпінгографія, гістероскопія), генотипування методом поліморфної ланцюгової реакції з сиквенспецифічними праймерами (PCR-SSP), статистичні. ДНК виділяли з лейкоцитів периферійної крові методом висолювання. Генотипування генів HLA-DRB та HLA-DQA1 проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на термоциклері «Терцик» в автоматичному режимі за певною програмою. Для типування алелей вказаних генів використовували набір реагентів «GenPak®HLA-DR PCR test» та «GenPak®HLA-DQA1 PCR test» фірми ООО «Лабораторія Изоген» (м. Москва, РФ). Набори реагентів базуються на використанні процесу ампліфікації ДНК методом ПЛР з сиквенспецифічними праймерами.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. Під спостереженням знаходилось 194 жінки зі ЗНВ яким проведено ультразвукові, рентгенологічні та ендоскопічні методи діагностики. Наступлення менархе у обстежених жінок відбувалося в межах терміну фізіологічної норми. Регулярні менструації зафіксовані у всіх жінок. У більшості жінок (95,36%) пацієнток ендокринних порушень не виявлено.

У всіх обстежених жінок виконувалась трансабдомінальна та трансвагінальна сонографія в динаміці (преовуляторний період, овуляція та постовуляторний період). У всіх пацієнток виявлено нормальні розміри матки. Субсерозні та інтрамуральні міоматозні вузли невеликих розмірів при УЗД виявлені у п'ятьох (2,58 %) пацієнток. Змінена ехоструктура ендометрію що ехографічно проявлялась значним приростом товщини ендометрію в динаміці та поліпами ендометрію виявлена у 9 обстежених (4,64%) жінок. Нормальна ультразвукова структура яєчників зафіксована у 179 (92,27 %) жінок. У 12 пацієнток (6,19 %) спостерігалися полікістозні яєчники, що свідчить про хронічну ановуляцію та у 3 (1,54 %) – кіста яєчника. Одержані дані свідчать про те, що у більшості обстежених жінок при проведенні УЗД патології не виявляється, а се-

ред виявлених патологічних станів превалює патологія ендометрію (поліпи ендометрію та гіперплазія ендометрію) та полікістозно змінені яєчники.

Окрім виявлення непрохідності маткових труб гістеросальпінгографія дозволяла нам діагностувати такі патологічні стани як поліпи ендометрію, субмукозні міоматозні вузли, гіперпластичні стани ендометрію, вади розвитку матки та внутрішньоматкові зрости. В групі обстежених жінок гістеросальпінгографія виконана у 72 жінок. Діагностовано декілька випадків внутрішньоматкової патології (найчастіше – об'ємні дефекти наповнення порожнини матки з чітким контуром, що як правило є рентгенологічною ознакою поліпів ендометрію). У більшості жінок гістеросальпінгографія виявляла прохідність обох маткових труб, лише у 11 пацієнток виявлена однібочна непрохідність маткових труб.

Гістероскопічне дослідження було основним методом верифікації поліпів ендометрію (залозистих, фіброзних), гіперплазії ендометрію (тотальної, вогнищевої гіперплазії ендометрію), внутрішньоматкових зростів, та субмукозної міоми матки. В групі обстежених жінок гістероскопія виконана у 87 пацієнток. Незмінена порожнина матки та ендометрій виявлені у більшості жінок. Залозисті поліпи ендометрію виявлено у 12 (13,79 %), фіброзні поліпи ендометрію 6 (6,90 %) пацієнток, гіперплазія ендометрію 16 (18,39 %) пацієнток. Найрідше серед патологічних станів порожнини матки ми виявляли субмукозні міоматозні вузли матки – 2 (2,30 %) випадки та внутрішньоматкові зрости – 3 (3,45) випадки. Аналіз одержаних даних демонструє діагностичну цінність гістероскопічного обстеження порожнини матки. Гіперпластичні стани ендометрію (поліпи, гіперплазія ендометрію) частіше виявлялись при виконанні гістероскопії ніж при УЗД. Також додатково виявлена субмукозна міома матки у двох пацієнток.

Відомо, що гомологія серед подружніх пар за генами HLA є негативним фактором як для настання вагітності, так і для її нормального протікання. Серед подружніх пар зі звичним невиношуванням вагітності нез'ясованого ґенезу у яких попередньо були виключені генетичні чинники та хромосомні аномалії, нейроендокринні чинники ЗНВ (порушення в системі гіпоталамус-гіпофіз-яєчники, синдром полікістозних яєчників, гіперпролактинемія), інфекційні та генітальні (вади розвитку статевих органів, істмікоцервікальна недостатність, гіпоплазія матки) чинники ЗНВ нами сформована група в якій ми проводили генотипування HLA II-го класу і аналізували отримані дані з точки зору гомологічності цих подружніх пар за алельними варіантами генів HLA-DRB, HLA-DQA1 та HLA-DQB1. Слід зазначити що в цю групу не потрапляли пацієнтки з гіпергомоцистеїнемією, аутоімунними (антифосфоліпідний синдром, системний червоний вовчак) та аліумунними процесами. Контрольну групу склали 20 подружніх пар без репродуктивних втрат, в яких було проведено генотипування локусів HLA-DRB+ HLA-DQA1+HLA-DQB1. Результати представлені в таблиці 1.

З даних таблиці 1 бачимо, що в групі зі ЗНВ підвищена гомологія 50% і більше за кожним локусом, проте лише за локусом HLA-DQB1 вона підвищена суттєво – в 2 рази.

Таблиця 1. Показники гомології за алельними варіантами генів HLA-DRB, HLA-DQA1 та HLA-DQB1 у подружніх пар зі ЗНВ

Контрольна група, 20 пар	Група зі ЗНВ, 122 пари
абс. знач./ %	абс. знач./ %
Гомологія за HLA-DRB до 50%	
15 / 75,0	77 / 63,0
Гомологія за HLA-DRB 50% і >	
5 / 25,0	45 / 37,0
Гомологія за HLA-DQA1 до 50%	
11 / 55,0	61 / 50,0
Гомологія за HLA-DQA1 50% і >	
9 / 45,0	61 / 50,0
Гомологія за HLA- DQB1 до 50%	
Контрольна група, 20 пар	ЗНВ, 37 пар
16 / 80,0	22 / 59,5
Гомологія за HLA- DQB1 50% і >	
4 / 20,0	15 / 40,5

В зв'язку з цим, ми проаналізували гомологію подружніх пар при поєднанні локусів при умові, що ця гомологія за кожним з них становить 50 % і більше.

В таблиці 2 представлений рівень гомології при поєднанні алельних варіантів генів HLA-DRB і HLA-DQA1 та HLA-DRB, HLA-DQA1 і HLA-DQB1.

Таблиця 2. Показники гомології при поєднанні алельних варіантів генів HLA-DRB, HLA-DQA1, HLA-DQB1 в подружніх пар зі ЗНВ

Контрольна група, 20 пар	Група з ННВ, 122 пари
абс.знач./ %	абс.знач./ %
Гомологія 50% і > за HLA-DRB+ HLA-DQA1	
4 / 20,0	36 / 30,0
Гомологія 50% і > за HLA-DRB+ HLA-DQA1+HLA- DQB1	
Контрольна група, 20 пар	ННВ, 37 пар
0 / 0,0	10 / 27,0 $\chi^2=6,556, p<0,025$

З даних таблиці 2 чітко видно, що гомологія подружніх пар 50 % і більше за алельними варіантами трьох генів – HLA-DRB, HLA-DQA1, HLA-DQB1 – є статистично вірогідно значимою і є однією з причин ЗНВ нез'ясованого генезу.

ВИСНОВОК. Нами достовірно встановлено що гомологія серед подружніх пар 50 % і більше за алельними варіантами трьох генів HLA-DRB, HLA-DQA1, HLA-DQB1 є статистично вірогідно значимою і є однією з причин ЗНВ нез'ясованого генезу.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. Враховуючи те, що причина раннього невиношування

вагітності при відсутності аномалій каріотипу, нейроендокринних порушень та вад розвитку статевих органів частіше всього має імуногенетичну природу та беручи до уваги те, що гомологія подружніх пар більше 50 % за алельними варіантами трьох генів HLA-DRB, HLA-DQA1, HLA-DQB1 є статистично вірогідно значимою і є однією з причин ЗНВ нез'ясованого генезу ми вважаємо доцільним продовжити дослідження для подальшої розробки лікувально-діагностичного алгоритму у жінок з невиношуванням вагітності зумовленим високим рівнем гомології подружньої пари за алелями генів головного комплексу гістосумісності людини II-го класу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Іванюта Л. І. Результати клінічного обстеження неплідних жінок Буковинського регіону / Л. І. Іванюта, О.В. Хасаян // Буковинський медичний вісник. – 2007. – №1 (11). – С. 22–25.
2. Судома І. О. Частота та структура імунних зрушень та місце імунотерапії внутрішньовенним введенням імуноглобуліну у пацієнок із загрозою переривання вагітності та безпліддям в анамнезі / І. О. Судома, В. П. Чернишов, О. М. Мозгова, О. П. Рябенко // Здоровье женщины. – 2005. – №4. – С. 107–112.
3. Power L. L. Immunoregulatory molecules during pregnancy and at birth / L. L. Power, E. J. Popplewell, J. A. Holloway et al. // J. Reprod. Immunol. – 2002. – Vol. 56. – P. 19–22.
4. Carp H. Embryonic karyotype in recurrent miscarriage with parental karyotypic aberrations / H. Carp, E. Guetta, H. Dorf // Fertil. Steril. – 2006. – Vol. 85. – P. 446–450.
5. Mosaad Y. M. Association between HLA-E *0101 homozygosity and recurrent miscarriage in Egyptian women / Y. M. Mosaad, Y. Abdel-Dayem, B.S. El-Deek et al. // Scand J Immunol. – 2011 Vol. 74(2) – P. 205–209.
6. Nielsen H. S. Association of HY-restricting HLA class II alleles with pregnancy outcome in patients with recurrent miscarriage subsequent to a firstborn boy / H. S. Nielsen, R. Steffensen, K. Varming et al. // Human Molecular Genetics. – 2009, – Vol. 18 (9). – P. 1684–1691.
7. Robinson J. IMGT/HLA Database-a sequence database for the human major histocompatibility complex / J. Robinson, J. Waller Matthew, P. Parham et al. // Nucleic Acids Researc – 2007. – Vol.29 – No1 – P. 210–213.
8. Takakuwa K. Molecular genetic studies on the compatibility of HLA class II alleles in patients with unexplained recurrent miscarriage in the Japanese population / K. Takakuwa, K. Honda, T. Yokoo et al. // Clin Immunol. – 2006. – Vol.118, №1. – P. 101–108.
9. Matsuzaki J. Immunosteroind as a regulator for Th1/Th2 balance: its possible role in autoimmune diseases / J. Matsuzaki, T. Tsuji, I. Imazeki et al. // Autoimmunity. – 2005. – Vol. 38. – P. 369 – 375.
10. Hiby S. E. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage / S. E. Hiby, L. Regan, W. Lo et al. // Human Reproduction. – 2008. – Vol.23 (4). – P. 972–976.
11. Mehra N. K. The HLA complex in biology and medicine : a resource book / N. K. Mehra, G. Kaur, J. McCluskey et al. – New Delhi, Medical Publishers – 2010 – 608 P.
12. Kruse C. A study of HLA-DR and -DQ alleles in 588 patients and 562 controls confirms that HLA-DRB1*03 is associated with recurrent miscarriage / C. Kruse, R. Steffensen, K. Varming // J. Hum. Reprod. Sci. – 2004. – Vol. 19, №5. – P. 1215–1221.

Отримано 24.02.13