

14. Кузнецова Л.В. Поліноз та його прояви: діагностика, особливості лікування. – Монографія. – Київ. – 2009. – 92 с.
15. Кузнецова Л.В., Осипова Л.С., Назар О.В., Грем'яков В.О., Кузнецов О.Г., Грем'яков А.В. Особливості діагностики та лікування кропив'янки в алергологічній практиці. – Монографія за редакцією професора Л.В.Кузнецової. – Київ – 2012 - 68 с.
16. Кузнецова Л.В., Бабаджан В.Д., Фролов В.М., Кравчун П.Г., Кузнецов Г.В., Прилуцький О.С., Гарник Т.П., Курченко А.І., Нагорний О.Є., Пілецький А.М., Гавриленко Т.І., Гуляр С.О., Осипова Л.С., Романюк Л.І., Касянчук Н.Ю., Назаренко О.П., Назар О.В., Кузнецов О.Г., Грем'яков В.О., Юркіна А.В. Клінічна та лабораторна імунологія. – Національний підручник // За загальною редакцією доктора медичних наук, професора Кузнецової Л.В., доктора медичних наук, професора Бабаджана В.Д., доктора медичних наук, професора Фролова В.М. – Рекомендовано та затверджено Міністерством освіти та науки України як Національний підручник для лікарів-інтернів, лікарів-слухачів вищих медичних закладів (факультетів) ІV рівня акредитації та вищих медичних закладів післядипломної освіти (лист № 1.4/18-Г-2951.1 від 30.12.2008 р.) – К.ООО. «Полиграф плюс» – Київ. – 2012 – 922 с.: ил.

### **ІМУНОФЕНОТИПУВАННЯ ТА АНТИГЕНИ ГОЛОВНОГО КОМПЛЕКСУ ГІСТОСУМІСНОСТІ ПРИ НЕВИНОШУВАННІ ВАГІТНОСТІ У ЖІНОК**

<sup>1</sup>ЧОП'ЯК В.В., <sup>1</sup>ГАВРИЛЮК А.М., <sup>2</sup>ЗАСТАВНА Д.В., <sup>2</sup>ТЕРПИЛЯК О.І.,  
<sup>1</sup>КУЛЬЧИЦЬКА А.С., <sup>3</sup>КУРПІШ М.

<sup>1</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра клінічної імунології та алергології, м. Львів, Україна

<sup>2</sup>Державна Установа «Інститут спадкової патології», відділ молекулярно-генетичної діагностики, м. Львів, Україна

<sup>3</sup>Інститут генетики людини, відділ імунобіології репродукції та стовбурових клітин, м. Познань, Польща

Вступ. Причини жіночого непліддя можна розділити на дві групи – неможливість запліднення та невиношування плода. Звичний спонтанний викидень – це щонайменше третій за чергою викидень до 24 тижня вагітності. Серія викиднів після першої доношеної або недоношеної вагітності вважається так званим вторинним синдромом. Імунологічні причини звичних викиднів ґрунтуються на кількох гіпотезах. Найбільш реальними з них є такі: наявність блокуючих антитіл проти плодових антигенів батьківського походження та небезпека ідентичності (гомозиготизму) антигенів HLA у матері та плода для виживання останнього. Блокуючі антитіла захищають трофобласт від атак реактивних лімфоцитів проти антигенів батьківського походження. Вважається, що відсутність блокуючого фактора може виникати у результаті наявності спільних HLA-антигенів у батьків. Було помічено тенденцію до виявлення спільних алелей HLA I-го та II-го класів у парах, у яких жінки мали звичні викидні. Гомозиготизм за антигенами HLA у матері та плода небезпечний для виживання плода. У разі звичних викиднів у жінки потрібно шукати зміни не тільки в межах головного комплексу гістосумісності (MHC), але і локалізованих у близькому

сусідстві з цією системою, наприклад комплексу трофобластично-лейкоцитарного кросреагуючого антигена (TLX) [11].

При звичних викиднях неясної етіології існують певні критерії, які дозволяють зв'язати їх з імунологічними причинами. До них відносяться:

- наявність в анамнезі не менше трьох самовільних викиднів без виявленої етіології, відсутність дітей в даному шлюбі;
- співпадіння (гомозиготизм) подружжя не менше ніж по двох HLA-антигенах;
- ослаблена імунна відповідь лімфоцитів вагітної на алоантигени чоловіка та плода;
- зниження блокуючої активності сироватки вагітної по відношенню до аутологічних лімфоцитів в реакціях клітинного імунітету;
- ослаблена проліферативна реакція в змішаній культурі лімфоцитів вагітної на стимулировані лімфоцити чоловіка в порівнянні із змішаною культурою лімфоцитів інтактного донора;
- наявність аутоімунних реакцій, направлених проти антигенів прозорої зони яйцеклітини, а також антиспермальних антитіл [12, 18, 19, 23].

Нагадаємо будову головного комплексу гістосумісності. Головний комплекс гістосумісності (major histocompatibility complex - MHC) – це група із 80 генів, які знаходяться в 4-Mb регіоні короткого плеча 6 хромосоми. MHC складається з трьох груп: класів I, II, III (див. схему 1). Молекули класу I MHC формують комплекс з чужорідними пептидами, який розпізнається рецепторами на поверхні цитотоксичних Т-лімфоцитів. Подібність алелей класу I донорів та реципієнтів підвищує толерантність господаря до трансплантату. Навпаки, Т-лімфоцити, які протистоять чужим MHC-молекулам на донорських клітинах, сприймають їх як чужі пептиди і атакують ці клітини. Молекули MHC класу I знайдені практично на всіх клітинах, вони можуть зв'язувати рецептори на цитотоксич-

них Т-лімфоцитах та кодуються високо поліморфічними локусами HLA A, B, C на 6 хромосомі. Молекули класу II MHC знайдені тільки на поверхнях антиген-представляючих клітин (фагоцитів та В-лімфоцитів). З'єднавшись з чужими пептидами, вони після приєднання до Т-клітинного рецептора стимулюють активність хелперних Т-лімфоцитів. Молекули класу II MHC кодуються різними генами, які розташовані на 6 хромосомі. Формують один сублокус D (HLA DP, DQ та DR). Другий клас також є високополіморфним. Регіон класу III MHC-системи має 680 kb та містить біля 36 генів, з яких не всі задіяні в імунній відповіді. Певна кількість з них є найбільш відомою як гени, які кодують компоненти комплементу C2, C4 та фактор В та інші білки (наприклад, білки теплового шоку) [11, 17, 21].

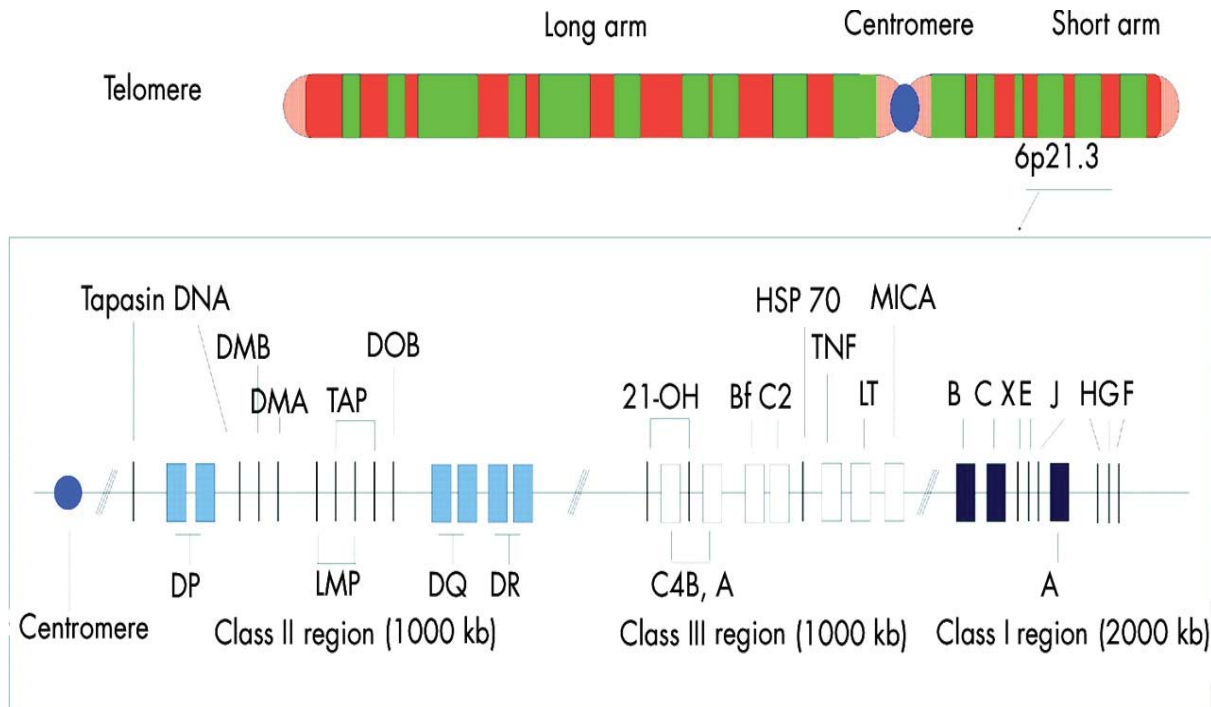


Схема 1. Будова головного комплексу гістосумісності (MHC) людини [17]

Плід по відношенню до матері є напівалотрансплантатом. Імунологічну толерантність до плода забезпечують такі імунологічні механізми: відсутність на ньому класичних молекул MHC класу I, присутність унікальних HLA-антигенів (особливо молекул MHC класу Ib HLA-G), неспецифічна супресія системної імунної відповіді, блокуючі антитіла, активізація білків, регулюючих активацію системи комплементу, і місцевих імуносупресивних факторів. Молекули sHLA-G є обов'язковими на ембріональних клітинах, але невідомо, чи вони є необхідними для прогресування вагітності. Генетичною базою спонтанних викиднів вважається інактивація X-хромосоми та поліморфізм HLA-G-антигенів.

HLA антигени сублокусів E, F та G класу I відносяться до некласичних. Антигени сублокусу HLA-G, за даними дослідників, пов'язані з аутоімунною відповіддю, інгібіцією функцій цитотоксичних лімфоцитів та функцій NK-клітин. З HLA-G-алелями асоційована експресія sHLA-G-білків, які перебувають у високо- та низько- розчинних формах. Доведено підвищення ризику ідіопатичних звичних викиднів після IVF у жінок, які мали низьку концентрацію sHLA-G в периферичній крові в порівнянні з жінками, які мали високу концентрацію цього розчинного антигену. Наявність HLA-G-гену асоційоване із підвищеним ризиком відторгнення ембріона, якщо він експресований і на ембріональній тканині [14, 15, 28].

На клітинах трофобласту немає класичних молекул МНС класів I та II, за винятком HLA-C. Антигени сублокусу HLA-C належать до найменш імуногенних молекул МНС і навіть не беруться до уваги при доборі трансплантату [16, 29]. Молекули HLA-C є єдиними поліморфними молекулами МНС в клітинах трофобласту. Також вони є найважливішими лігандами рецепторів KIR, які належать до рецепторів активуючих (KIR2DS) або гальмуючих (KIR2DL) кілінг клітинами NK [17, 22]

В ряді досліджень виявили, що гени, розміщені в різних частинах II-го класу МНС (HLA B – HLA DR –HLADQ), є пов'язані з різними аспектами репродукції, але набір HLA-антигенів не є єдиним механізмом, задіяним у дефекти репродукції. Фрагмент МНС, який впливає на репродукцію – це набір генів, асоційованих з аутоімунними хворобами, і їх співставлення наводить на думку про асоціацію аутоімунних хвороб та дефектів репродукції. У жінок із спонтанними викиднями було знайдено підвищення вмісту антигенів B44, DR5 та DQ в регіоні HLA-DR [16, 20, 27].

Коли практичний лікар повинен запідозрити імуногенетичну природу непліддя? При відсутності інших причин – наявності вторинного імунодефіциту, гормональних порушень у жінки та антиспермальних антитіл у обидвох партнерів. У таких випадках може спостерігатися значне відхилення в ступені гістосумісності по системі HLA між бездітними партнерами і порівнянні з фертильними. Для фертильних партнерів звичайно характерний низький або середній ступінь гістосумісності – 1-2 ідентичних антигени системи HLA I класу (не більше), тоді як для такої форми імунозалежного непліддя характерне його підвищення – наприклад 3 ідентичних антигени системи HLA або 2 ідентичних плюс наявність подібних, тобто перехресно реагуючих. Ступінь гістосумісності між партнерами виявляють, порівнюючи їх HLA-фенотипи. Найчастіше визначають фенотипи обидвох партнерів по антигенах HLA I-го класу – класичних антигенах локусів A та B. Таким чином, на протипагу алотрансплантації органів, успішна репродукція можлива тільки при достатніх генетичних відмінностях між партнерами по антигенах гістосумісності HLA. При подібності HLA-фенотипів батька та матері не формується обов'язкова ізосенсибілізація вагітної до HLA-антигенів чоловіка, тому не індукується продукція гуморальних та клітинних супресорних факторів, необхідних для виношування плоду [6].

Найчастіше у практичній роботі акушер-гінекологів як ускладнення виношування у пари з подібністю HLA-фенотипів розвиваються гестози вагітних. Гестози прийнято поділяти на ранні та пізні. Умовною межею між ними є термін вагітності 20 тижнів. Провідним патогене-

тичним механізмом раннього гестозу вважають функціональну недостатність центральної нервової системи в поєднанні з порушеннями імунологічної толерантності, що виникає в системі «мати-плід». При комплексній сенсибілізації організму жінки утворюються антиеритроцитарні, антилейкоцитарні та антитромбоцитарні антитіла. Так як на незрілих еритроцитах також експресуються HLA-антигени, антитіла винтезуються і проти них. Вони безпосередньо посилюють гемоліз еритроцитів плода, можуть лізувати гемопоетичні клітини еритроїдного ряду. Анти-HLA-антитіла сприяють розвитку жовтухи плода і новонародженого в результаті цитотоксичного пошкодження печінки, внаслідок чого в організмі плода підвищується концентрація жовчних пігментів. Всі ці види антитіл грають значну роль в патогенезі захворювання. При пізньому гестозі часто відсутні зміни у розподілі HLA-A- та HLA-B-антигенів та кореляція наявності окремих антигенів з клінічними проявами. Якщо підвищеної сумісності немає, пізні гестози найчастіше асоціюються з несумісністю по HLA-B-сублокусу. Однак є дані, що підвищена сумісність чоловіка та жінки по HLA-A- та HLA-B-сублокусах корелює з пізніми токсикозами [1, 2, 5, 8, 10].

Як бачимо, дані літератури щодо подібності батьків за HLA-антигенами і асоціація цього факту із схильністю до звичних викиднів доволі різноманітні і часом суперечливі. У зв'язку із цим ми розпочали дослідження, яке мало за мету розробити новий метод лабораторного імунологічного обстеження таких пар (доступніший за ціною і технікою виконання проти HLA-типуювання) та порівняти результати між собою, спираючись на клінічну картину невиношування у пар із спонтанними викиднями.

#### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ**

Було обстежено 43 подружні пари із спонтанними викиднями (2-3 в анамнезі) та контрольну групу із 12 плідних пар, у яких ніколи не було викиднів. Вік пацієнтів 27-35 років. Пацієнтки були поділені на дві підгрупи – з «ранніми» викиднями у терміні 6-8 тижнів вагітності (в акушерсько-гінекологічній практиці використовується також термін «завмирання вагітності»), та «пізніми» викиднями у терміні 14-16 тижнів вагітності.

#### **Фенотипування лімфоцитів**

Периферичну кров забирали з ліктьової вени в пробірку з р-ном ЕДТА (2,7%), завдяки лімфоцитів отримували центрифугуванням на градієнті густини  $d=0,077$ . Клітини відмивали 2-3 рази фосфатним буфером рН 7,2-7,4. Концентрацію клітин доводили тим же буфером до  $2 \times 10^6$ /мл (20 клітин у великому квадраті камери Горяєва). Діагностичними готували таким чином: осад еритроцитів ресуспендували погойдуванням флаконів без пі-

ноутворення, відбирали стерильним інсуліновим шприцом кількість, відповідну кількості проб (на одну пробу 0,05 мл) та переносили в пробірки, в які попередньо вносили по 0,05 мл лімфозависі. Суміш інкубували 30 хв при 37°C. Далі центрифугували при 1000 об/хв протягом 5 хвилин. Пробірки залишали на одну годину в холодильнику при +4°C, відбирали надосадову рідину, додавали до осаду 0,05 мл 0,12% р-ну глутарового альдегіду і обережно ресуспендували. Витримували 5-7 хв, потім знову повторювали ре суспендування. Робили мазки, фіксували та зафарбовували по Романовському за стандартною методикою. Підраховували відсоток розетко утворюючих лімфоцитів під імерсією за допомогою світлового мікроскопа. За позитивні приймали лімфоцити, які зв'язали не менш як три еритроцити із CD-діагностикуму на 200 клітин. Використовували набори "Stable diagnostic kit based an monoclonal antibodies to detection subpopulation T- and B-lymphocytes" моноклональних антитіл до CD3, 4, 8, активізаційні маркери CD 25, HLA-DR, 71 виробництва State Medical Institute (Department of Allergology and Immunology) Vitebsk, Byelorussia НВ УУУНН:300002704.

#### Дослідження клітинної цитотоксичності

Для дослідження лімфоцитолізу використовували базовий метод Horeg та O'Horman, 1956 [13], удосконалений Лаповець Л.Є. та Луцик Б.Д., 2002 [7]. Суспензію виділених лімфоцитів розводять р-ном Хенкса до концентрації 6-8 тис в 1 мл. У лунках мікропланшету Кавасакі готували 5 розведень тестованої сироватки реципієнта, вносимо по 0,001 мл в лунки, як негативний контроль використовували пул сироваток групи АВ (IV), Rh- від'ємний, як позитивний контроль – лімфоцитарний глобулін. В кожен лунку по 0,001 мл вносили суспензію виділених лімфоцитів. Інкубували 1 годину в термостаті при 37°C. Потім вносили в кожен лунку по 0,002 мл робочого розчину еозину, витримували 10 хв. Після цього оцінювали результати проби за кількістю лізованих лімфоцитів безпосередньо в лунках камери Тerasaki при збільшенні 10x10. Живі клітини залишалися рефрактерними до еозину, блискучими, нормальних розмірів. Загиблі (лізовані) клітини – великих розмірів, рожевого кольору різної інтенсивності. Якщо число лізованих лімфоцитів було менше 10%, з цієї суспензією продовжували роботу і виконували модифіковану нами cross-match реакцію. Лімфоцити дружини інкубували протягом 1 години в термостаті при температурі +37°C разом із розведеною 1:2 фізіологічним розчином сироваткою чоловіка. Після інкубації ці лімфоцити відмивали центрифугуванням та проводили фенотипування CD3, 4, 8, активізаційних маркерів CD 25, HLA-DR, 71 за методикою, описаною вище.

#### Визначення HLA-антигенів

Визначення зв'язку антигенів головного комплексу гістосумісності та непліддя в основному пов'язане із ідентифікацією відповідних HLA-антигенів, асоційованих із репродуктивними втратами. В обстежуваних нами сім'ях ми проводили аналіз алельного поліморфізму генів HLA – DRB1, – DQA1, – DQB1. Працювали за стандартною методикою: ДНК екстрагували з клітин периферичної крові; здійснювали полімеразну ланцюгову реакцію (polymerase chain reaction – PCR); отриманий матеріал розділяли за допомогою гелю електрофорезу в агарозі. Використовували реактиви фірми «Ізоген Лабораторія», виготовлені у м. Москва, Росія ("Isogen Laboratory" (Moscow, Russia). Ланцюгова полімеразна реакція виконувалася на автоматичному термоциклі "Tertsyk" ("DNA-technology", Russia). У всіх обстежуваних пацієнтів (і чоловіків, і жінок) аналізували наявність таких HLA-антигенів класу II: DRB1\*0301/\*0701-0702, DRB3\*0101-0301, DRB4\*0101, DQA1\*0201.

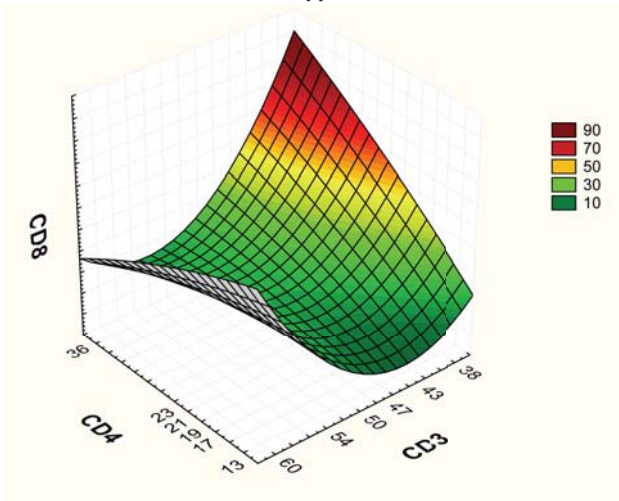
#### Статистичний аналіз

Статистичну достовірність виявляли за допомогою методу Стюдента (Student's t-test). Достовірними вважали показники вище 0,05. Для складання малюнків ми використовували метод мультифакторіального аналізу з програми СТАТИСТИКА, версія 6.0 (STATISTICA version 6.0).

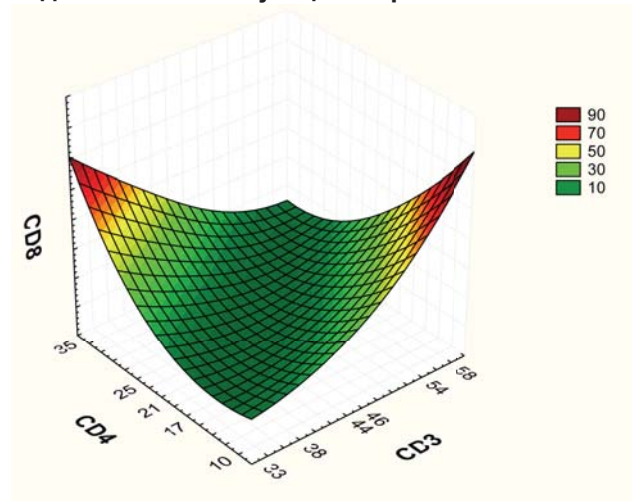
#### РЕЗУЛЬТАТИ

Проводили дослідження периферичної крові двох груп: 20 пацієток із «ранніми» (6-8 тижнів вагітності) та 23 пацієнтки із «пізніми» викиднями (14-16 тижнів вагітності). Поділ на такі групи ґрунтувався на відмінностях у механізмах супресії імунної відповіді при різних термінах вагітності, але в межах першої половини вагітності. Результати досліджень показали, що у першій групі із «ранніми» викиднями рівні клітин із фенотипами CD3+, CD4+ та CD8+ були статистично достовірно вищими, ніж в контролі (p<0,001) (Діаграма 1), їх активізаційні маркери CD71+, CD25+ та HLA-DR+ знаходилися в рамках норми (Діаграма 3). У другій групі жінок із «пізніми» викиднями рівні клітин із фенотипами CD3+, CD4+ та CD8+ не відрізнялися від цих же параметрів контрольної групи (p>0,05) (Діаграма 5), однак активізаційні маркери CD71+, CD25+ та HLA-DR+ були статистично вищими показників контрольної групи (p<0,001) (Діаграма 7). У першій групі не знайдено кореляції із присутністю HLA- антигенів класу II, асоційованих із репродуктивними втратами. Протилежно до цього у 70% пацієток другої групи виявлено HLA-антигени локусів DRB1 and DQA1-, які асоційовані із репродуктивними втратами.

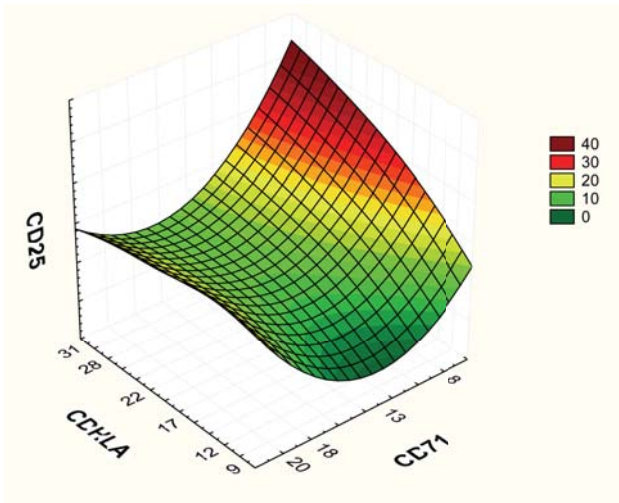
Діаграма 1. Рівні CD 3,4,8 у жінок із «ранніми» викиднями



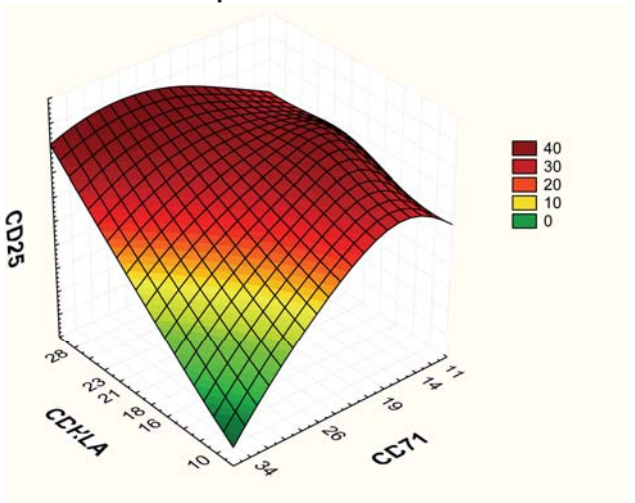
Діаграма 2. Рівні CD 3,4,8 у жінок з ранніми викиднями після їх інкубації із сироваткою чоловіка



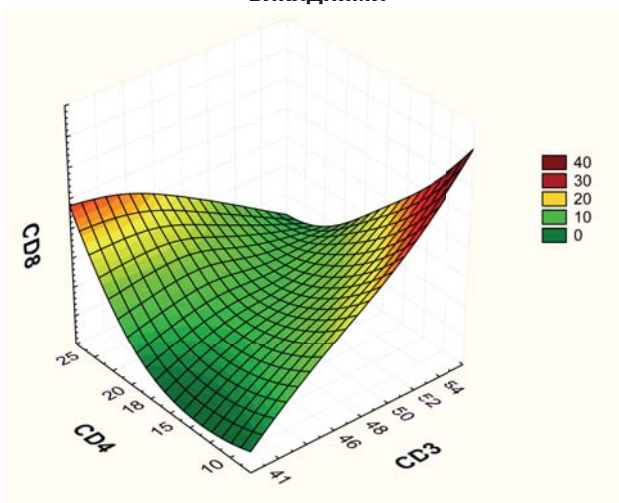
Діаграма 3. Рівні CD 71, HLA-DR, 25 у жінок із «ранніми» викиднями



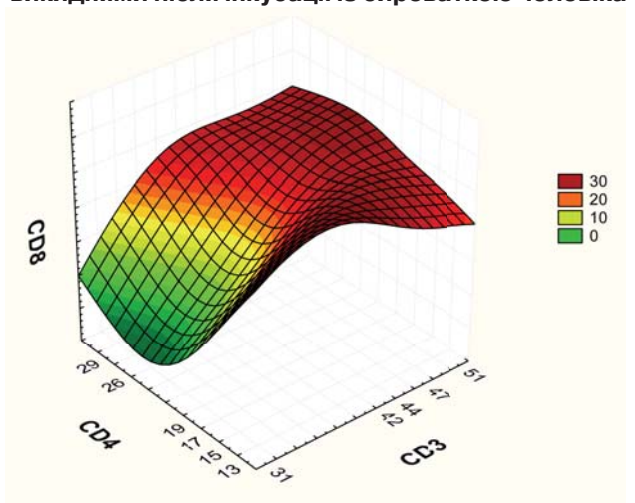
Діаграма 4. Рівні CD 71, HLA-DR, 25 у жінок із «ранніми» викиднями після їх інкубації із сироваткою чоловіка



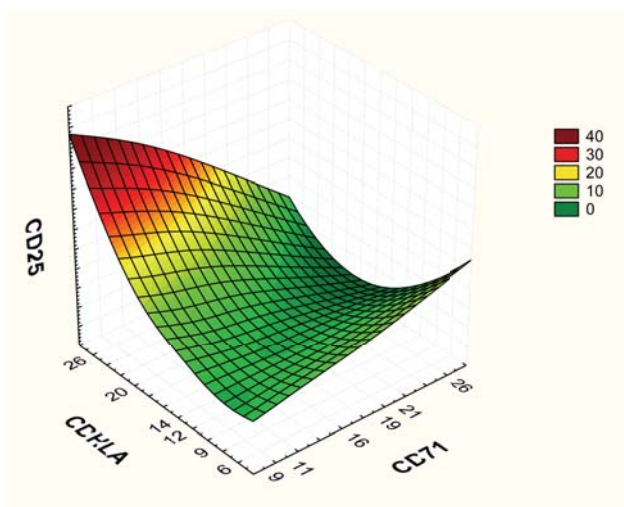
Діаграма 5. Рівні CD 3,4,8 у жінок із «пізніми» викиднями



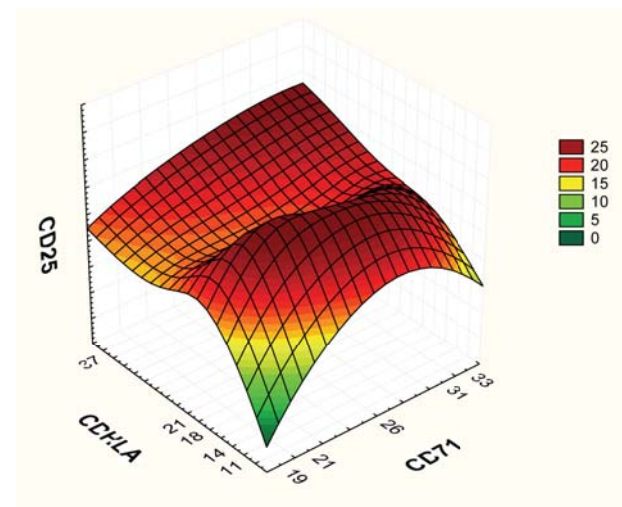
Діаграма 6. Рівні CD 3,4,8, у жінок із «пізніми» викиднями після інкубації із сироваткою чоловіка



Діаграма 7. Рівні CD 71,HLA-DR, 25 у жінок із «пізніми» викиднями



Діаграма 8. Рівні CD 71,HLA-DR, 25 у жінок із «пізніми» викиднями після їх інкубації із сироваткою чоловіка



Проводили порівняння результатів фенотипування лімфоцитів жінок із обидвох груп після їх інкубації із сироваткою чоловіка. Отримані результати відображали різні тенденції. У групі жінок із «ранніми» викиднями інкубація із сироваткою чоловіка приводила до зростання рівнів CD 3+, 8+ та їх активізаційних маркерів CD 25+, 71+ (Діаграми 2,4). Ці результати свідчать про активацію клітинних цитотоксичних механізмів жінки факторами, отриманими від сироватки чоловіка (модель реалізації антитіло-залежної цитотоксичності). А у групі жінок із «пізніми» викиднями інкубація їх лімфоцитів із сироваткою чоловіка з наступним фенотипуванням ми отримали зростання рівнів CD 4+ та активізаційних маркерів CD 25+ та HLA-DR+ (Діаграми 6, 8). Ці результати свідчать про активацію гуморальних механізмів, можливо навіть автоімунного характеру, під впливом факторів сироватки чоловіка. Щодо можливого автоімунного характеру відповіді та, як наслідку, переривання вагітності, свідчили і зростання кількості Т-лімфоцитів-хелперів, і посилені пізні активізаційні маркери, відповідальні за продукцію прозапальних цитокінів та активацію В-лімфоцитів із наступним антитілоутворенням.

**Дискусія**

Недивлячись на надійний матково-плацентарний бар'єр під час вагітності, лейкоцити завдяки амебоїдному рухові можуть проникати через плаценту. На них представлений основний склад антигенів гістосумісності, і ало-сенсibilізація до них може не тільки привести до лейкопенії плода, але і повпливати на розвиток всіх органів та тканин фетального комплексу. Значення несумісності по антигенах системи HLA в розвитку вагітності розцінюють по-різному. Існує думка, що імунологічний конфлікт,

обумовлений несумісністю матері та плоду по алоантигенах лейкоцитів, може бути причиною самовільних викиднів і передчасних пологів, однак інші автори відзначали, що і при вираженій лейкоцитарній сенсibilізації матері може народитися дитина без будь-якої патології. Антилейкоцитарні антитіла частіше виявляються у вагітних з пізнім токсикозом. В процесі вивчення лейкоцитарної сенсibilізації все більше спеціалістів схиляються до того, що це природний процес, який є характерним для кожної вагітності. Разом з тим можна припустити, що є певний рівень, вище якого алоантитіла проявляють патологічні властивості (наприклад, алоімунна форма агранулоцитозу у плода) [24, 26].

Звичні викидні, обумовлені можливою різкою несумісністю або, навпаки, сумісністю по HLA-антигенах, при формуванні самого процесу повинні супроводжуватися в першу чергу вираженими клітинними імунними реакціями. Серологічне типування встановило, що у жінок із звичними викиднями є підвищена частота HLA-A9 та висока частота ідентичності по HLA-A локусу. З приводу спонтанних викиднів помічена підвищена їх частота при несумісності між подружжям по HLA-A9 та HLA-B5-антигенах. Наявність HLA-B7 несумісності сприяє розвитку фізіологічно протікаючої вагітності. Був зроблений ще один висновок – несумісність по HLA-A, B, C-антигенах не є ведучим фактором в етіопатогенезі спонтанних викиднів, більше значення в цьому сенсі мають HLA-D (DR)-антигени. Волкова Л.С. (1979) показала, що ускладнення вагітності були асоційовані із антигенами Aw19, B7, B17, Bw35 (сублокус В- це так звані «сильні» трансплантаційні антигени),зворотній зв'язок був встановлений із антигеном В 27.

Спроби вияснити вплив HLA –фенотипу матері на схильність до патологічного протікання

вагітності не дозволили прийти до певного висновку: суттєві відмінності в антигенному складі тканин жінок з нормальною та патологічною вагітністю спостерігалися лише у відношенні частоти визначення антигенів [19, 25].

При звичному невиношуванні вагітності не спостерігається зміна частоти наявності певних HLA-антигенів у дружини чи чоловіка в порівнянні із загальною популяцією (Lauristen J. et al., 1976; Говалло В.І., 1979), однак самовільні викидні часто асоціюються з частковою сумісністю подружжя по HLA-антигенах. Komlos L. et al., 1977; Gerenger M. et al., 1979 першими відзначили високий відсоток гомозиготності по HLA-антигенах I і II класів головного комплексу гістосумісності у пар, де дружини мали чисельні самовільні аборти, HLA-D-сумісні подружжя часто були сумісними і по еритроцитарних ABO-антигенах. Однак думку щодо вирішальної ролі гомозиготності по HLA-антигенах при самовільних викиднях розділяють не всі дослідники (Persitz E. Et al., 1983; Mowbray J., Underwood J, 1985). Загалом було сформульовано гіпотезу, що відносна HLA-сумісність при вагітності обумовлює відсутність анти- HLA-антитіл, необхідних для імунорегуляторних фізіологічних реакцій (Olding L. Et al., 1982).

Дослідження останнього часу, які довели існування антигенів MHC I і II класів на клітинах трофобласту, підвищили інтерес дослідників до аналізу механізмів реакції відповіді материнського організму на ці антигени. Очевидно, що розпізнавання гетерозиготного плоду прямо зв'язане із формуванням загального і місцевого супресорного імунітету при вагітності. Важливу роль у цьому відіграють антигени трофобласту TA1 та TA2, які визначають супресію імунної відповіді матері на батьківські MHC-антигени плоду. В ранніх наукових дослідженнях на цю тему самовільні викидні зв'язували із посиленою імунною відповіддю на батьківські трансплантаційні антигени (Jensen K., 1967; Ivaskova E. et al., 1967), пізніше, навпаки, накопичилося багато даних стосовно зниження імунологічної реакції матері і пов'язаної із цим недостатності імуносупресивних механізмів. Самовільні викидні мають різний імунологічний генез. В одних випадках відзначали гомозиготність HLA та відсутність цитотоксичних антитіл у вагітних, в других – спільних HLA-антигенів у чоловіка та жінки немає, але при вагітності з'являються виражені цитотоксичні реакції на батьківські антигени [2, 3, 4, 9, 10].

Потужним напрямком досліджень причин «пізніх» викиднів стали тести для визначення аутоімунітету (присутність антифосфоліпідних, антинуклеарних, антитиреоїдних антитіл) та зміни у гуморальному імунітеті, а у дослідженнях причин «ранніх» викиднів - зміни клітинної ланки на-

бутого імунітету. У жінок із звичними викиднями у периферичній крові визначалася висока кількість клітин із цитотоксичними функціями (натуральних кілерів, Т-лімфоцитів-цитотоксичних) в порівнянні із контролем. Також у таких жінок знаходили зміни у співвідношенні цитокінів, синтезованих Т-хелперами-1 та Т-хелперами – 2 в сторону збільшення продукції прозапальних цитокінів [12, 18, 23]. Навіть такий ранній етап вагітності, як імплантація бластоцисти в ендометрій, вимагає участі імунних факторів (цитокінів, простагландин-асоційованих ферментів, матрикспротеїназ, адгезивних молекул (особливо інтегрину  $\beta$ -3), муцинів (зокрема MUC-1), внаслідок чого змінюється кількість і функція популяцій та субпопуляцій імунотернетних клітин). Особливо цей процес потребує материнської імунологічної толерантності до напівалогенного ембріона [19].

Звичні викидні також є асоційованими із присутністю певних HLA-антигенів II-го класу (HLA-B-HLA-DR-HLA-DQ регіону), хоча дуже важливими є визначення повного комплексу (I-го та II-го класів) таких антигенів і у чоловіка, і у дружини. Поки що не вдалося виявити жодного окремого HLA-антигену чи комбінації HLA-антигенів, які би напевно були асоційовані із дефектами репродукції [20]. На це і на багато інших запитань до сьогодення немає чітких відповідей.

## ВИСНОВКИ

1. Досліджено, що молекули MHC I і II класів мають незаперечне значення у фізіологічному виношуванні вагітності - імунопатогенез спонтанних викиднів у жінок є HLA-асоційованим; HLA-асоційована аутоімунна патологія як у жінок так і чоловіків приводить до формування непліддя
2. Показано, що «ранні» викидні у жінок у більшій мірі пов'язані із активацією клітинних факторів набутого імунітету
3. Доведено, що «пізні» викидні у жінок асоційовані і з порушеннями гуморальної ланки набутого імунітету, і з присутністю HLA-DRB1\*0301/\*0701-0702, DRB3\*0101-0301, DRB4\*0101, DQA1\*0201 антигенів
4. Запропоновано недорогий та простий у виконанні модифікований cross-match метод для виявлення імунологічних змін у жінок із «ранніми» та «пізніми» викиднями, які можуть вказувати на потребу в імунотерапевтичному лікуванні.

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Бесєдін В.М., Герасун Б.А., Шевченко Л.Ю.* Жовтятиці у вагітних. Львів.– В-во ЛДМУ.– 1999. – 239 с.

2. Васильева З.Ф., Шабалин В.Н. Иммунологические основы акушерской патологии. М: Медицина, 1984, 189 с.
3. Гаврилюк А.М. Роль HLA-антигенів у порушеннях репродуктивної функції жінки. Медицинский аспекты здоровья женщины, №2 (29) 2010, С.42-49
4. Говалло В.И. Иммунология репродукции. М: Медицина, 1987, 304 с.
5. Демина Т.Н., Майлян Э.А., Гюльмамедова И.Д., Гюльмамедов В.А. Современные взгляды на иммунологию гестационного процесса. Репродуктивное здоровье женщины. – 2002. – №11. – С.43-48.
6. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. Киев, «Полиграф плюс», 2010.–552 с.
7. Лаповець Л.Є., Луцик Б.Д. Посібник з лабораторної імунології, Львів, 2002, 173 с. (розділ 9 «Трансплантація органів», 51-56 с.)
8. Медвинский И.Д., Серов В.Н., Юрченко Л.Н., Шабунина-Басок Н.Р., Макаров А.Д. Тяжелый гестоз с позиции синдрома системного воспалительного ответа. Вестник интенсивной терапии.–2003.–№1.–С.19-26.
9. Талвар Дж. П. Иммунология контрацепции. М: Медицина, 1983, 191 с.
10. Трунова Л.А. Иммунология репродукции. Новосибирск «Наука» (сибирское отделение), 1984, 156 с.
11. Чоп'як В.В., Потьомкіна Г.О., Гаврилюк А.М. Лекції з клінічної імунології для практичних лікарів. Частина 1. Львів, Видавництво Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького, 2010, 226 с.
12. Emmer P.M., Nelen W.L., Steegers E.A., Hendriks J.C., Veerhoek M., Joosten I. Peropheral natural killer cytotoxicity and CD 56 (pos) CD 16 (pos) cell increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. Hum Reprod 2000; 15:1163-1169.
13. Friemel H. Immunologische Arbeitsmethoden. VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1984, 472 p. (in part Cytotoxicity dependent of complement, PP. 176-186).
14. Fuzzi B., Rizzo R., Criscuolli L., Melchiorri L. et al. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy.2002;32:311-315.
15. Gaunt G., Ramin K. Immunological tolerance of the human fetus. J Am Perinatol 2001;8:299-312.
16. Gill T.J. Mechanisms of action of major-histocompatibility-complex-linked genes affecting reproduction. Am J Reprod Immunol 1999;41:23-33.
17. Golab J., Jakobisiak M., Lasek W., Stoklosa T. Immunologia. Warszawa, Wydawnictwo naukowe PWN;2007:511 s.
18. Horne A.W., Claire I.A. Recurrent miscarriage. J Fam Plann Reprod Health Care 2005: 31(2), pp. 103-107.
19. Inagaki N., Stern C., Bain J.Мс., Lopata A., Kornman L., Wilkinson D. Analysis of intra-uterine cytokine concentration and matrix-metalloproteinase activity in women with recurrent failed embryo transfer. Human Reprod 2003; 18 (3): 608-615
20. Jin K., Ho H.-N., Speed T.P., Gill T.J. Reproductive Failure and the Major Histocompatibility Complex. Am.J.Hum. Genet. 1995;56:1456-1467.
21. Jorde L.B., Carey J.C., Bamshad M.J., White R.L. Medical Genetics. Mosby: A Times Mirror Company, 1999, United States, 372 p.
22. Kusnierczyk P., Jankowska R., Nowak I. No significant positive or negative association of spontaneous abortion, leukemias or NSCLC with KIR2DS5 or C1 and C2 was detected in our study. Матеріали науково-практичної конференції «Імунотерапія і імунопрофілактика: реалії та перспективи» Львів, 14-16 жовтня 2009 р. С.48-50.
23. Makhseed M., Raghupathy R., Azizieh F., Omu A., Al-Shamali E., Ashkanani L. Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with succesful pregnancy and with subsequent abortions. Hum Reproduct 2001; 6:2219-2226.
24. Morin-Papunen L., Tiilikainen A., Hartikainen-Sorri A.L. Maternal HLA immunization during pregnancy: presence of anti-HLA antibodies in half of multigravidous women. Med Biol 1984; 62: 323-325.
25. Pidwell D. Interpretation of crossmatch results. In ASHI Laboratory Manual, In A.Hahn, G. Land, R.Strothman (eds). Mt Laurel, NJ, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2000, pp. 13-15.
26. Regan L., Braude P.R., Hill D.P. A prospective study of the incidence of anti-paternal lymphototoxic antibodies in human pregnancy. Hum Reprod 1991; 6: 294-298.
27. Sbracia M., Mastrone M., Scarpellini F., Grasso J.A. Influence of histocompatibility antigens in recurrent spontaneous abortion couples and on their reproductive performances. Am J Reprod Immunol 1996; 35:213-214.
28. Sierra S., Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. Semin Reprod Med 2006; 24:17-24.
29. Sipak-Szmiegiel O., Ronin-Walknowska E., Cybulski C. et al. Antigens HLA-G, sHLA-G and sHLA-class I in reproductive failure. Folia histochemia et cytobiologica. 2007; 45: 137-141.



**РЕЗЮМЕ****ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ И АНТИГЕНЫ  
ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ  
ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ  
У ЖЕНЩИН**

*Чопьяк В.В., Гаврилюк А.М., Заставная Д.В.,  
Терпиляк О.И., Кульчицкая А.С., Курписз М.*

Спонтанне викидиши у женщин часто имеют иммунозависимые причины. При нормальной беременности защита плода от воздействия иммунной системы матери происходит с помощью двух типов иммунного ответа: гуморального с вовлечением антител и клеточно-опосредованного, реализуемого Т-лимфоцитами в кооперации с натуральными киллерами (НК). Блокирующие антитела играют тоже важную роль. Но иммунорегуляторные механизмы, опосредованные генами, ответственными за реализацию функций главного комплекса гистосовместимости (ГКГ), требуют дальнейшего изучения. Вам предлагаются результаты исследования двух проблем. Первая – это иммунологические тесты, которые изучают состояние гуморального и клеточно-опосредованного иммунитета у пар со спонтанными выкидышами. Другая – это типирование алелей HLA-антигенов II-го класса, которые могут определить склонность к спонтанным выкидышам. Мы обследовали 43 пары со спонтанными выкидышами неясной этиологии и 12 фертильных пар. Женщины-пациентки со спонтанными выкидышами были разделены на две группы: ранние выкидыши (n=20) и поздние (n=23). У них определяли фенотипы изолированных из периферической крови лимфоцитов CD3, CD4, CD8, и их активизационные маркеры CD71, CD25, HLA-DR. Лимфоциты от этих же пациенток инкубировали с сывороткой крови партнера *in vitro*, потом их тоже фенотипировали. В первой группе не найдено корреляции между присутствием HLA-антигенов II-го класса, ассоциированных с репродуктивными потерями, наоборот, во второй группе мы нашли ассоциацию (50-70%) с присутствием HLA-антигенов, которые принадлежали к локусам DRB1 и DQA1. Эти данные поддерживают утверждение, что нарушения в клеточно-опосредованном иммунном ответе касаются первой группы пар с репродуктивными потерями, а гиперактивация гуморального иммунного ответа играет важную роль во второй группе со спонтанными выкидышами. Мы предложили новый вид лабораторных исследований у таких пар. Пролученные результаты могут указывать на необходимость в отдельных случаях применять иммулотропную терапию для их лечения.

**SUMMARY****IMMUNOPHENOTYPING AND HUMAN  
HISTOCOMPABILITY ANTIGENS IN RECURRENT  
SPONTANEOUS ABORTION**

*Chopyak V.V., Havrylyuk A.M., Zastavna D.V., Terpylyak O.I.,  
Kulchycka A.S., Kurpysz M.*

The recurrent spontaneous abortions (RSA) frequently can be caused by immunologic factors. In normal pregnancy two active arms of immune system maintain protection of the fetus: the first one involves a humoral immune system with antibody response, the second arm involves cell-mediated immunity in which T-cells are at operation while innate immunity contains natural killer (NK) cells. There is a certain role assigned to the blocking antibodies. To get an insight to the mechanisms of action the major-histocompatibility-complex (MHC)-linked genes have to be also considered. The present study addresses two problems. First, it employs the immunological tests, to study humoral and cell-mediated immune systems in couples with RSA. Second, typing of the shared-alleles of class II HLA-antigens in couples with RSA have been performed. 43 couples with unexplained RSA and a control group of 12 fertile couples that never experienced abortion were under investigation. Their age ranged from 27 to 35 years. The patient with RSA (women) were to separate in two group with early (n=20) and late (n=23) spontaneous abortions. Differentiated phenotype CD3, CD4, CD8, their activating markers CD71, CD25, HLA-DR were detected in isolated peripheral blood lymphocytes. Incubation of women's lymphocytes with partners serum *in vitro* have been performed. In the first group there was no correlation with the presence of HLA- Class II antigens, associated with reproductive failure, in the contrary to the second group where it was found an association (50-70%) with the presence of certain HLA-antigens belonging to DRB1 and DQA1-loci. The data support that disturbances in cell-mediated immunological pathway are distinct to the first group of couples with reproductive failure. Also hyperactivation of humoral immune system plays an important role in the second group with RSA. We proposed a novel design of laboratory tests in such couples. Results indicate the need for possible intervention with immunotherapy in selected cases.