

Значение аллоиммунных механизмов в возникновении ранних репродуктивных потерь у супружеских пар с привычным невынашиванием беременности

Н.П. Веропотвелян

Межобластной центр медицинской генетики и пренатальной диагностики, г. Кривой Рог

В работе представлены результаты по определению доли аллоиммунных факторов в генезе привычного невынашивания беременности у пар Юго-Восточного и Центрального регионов Украины, обусловленного главным комплексом гистосовместимости II класса. Согласно полученным данным более 20% пар с привычными репродуктивными потерями имеют большое число совпадений по системе HLA II класса (от 3 до 5). В 30% случаев имеет место носительство аллелей склонности к анэмбрионии (DQA1 0201 или DQB1 0201). Выдвинуто предположение, что носительство «аллелей анэмбрионии» в случае 2 совпадений является таким же значимым фактором склонности к невынашиванию беременности, как и большее количество совпадений.

Ключевые слова: невынашивание беременности, гистосовместимость, анэмбриония.

Официально зарегистрированная частота невынашивания беременности в популяции составляет 20% от общего числа беременностей (истинная цифра в 1,5 раза выше официальной, поскольку часто задержки менструации настолько малы, что сама женщина не подозревает о беременности) [1].

Среди различных типов репродуктивных нарушений привычное невынашивание беременности (ПНБ) наблюдается у 1–2% женщин и, зачастую, при клиническом обследовании пациентки не удается выявить его причину [2].

Причиной ПНБ могут быть анатомические аномалии, гормональные нарушения, генетические/хромосомные дефекты, патология системы гемостаза и иммунной системы, инфекции и др.

Распространенность перечисленных нарушений до конца не ясна, а причины данной патологии выявляются только в 50% случаев [3].

Одним из механизмов прерывания беременности могут быть аллоиммунные нарушения, при которых иммунный ответ матери направлен против антигенов плода.

Актуальность этой проблемы связана не только с масштабами репродуктивных потерь, но и с неблагоприятным репродуктивным прогнозом [4].

HLA и невынашивание беременности

Комплекс близкородственных генов, основное предназначение которых – контроль различных функциональных проявлений иммунной реактивности, – получил название главного комплекса гистосовместимости (МНС) (англ. major histocompatibility complex).

МНС расположен у человека на 6-й хромосоме и занимает значительный участок ДНК, в совокупности составляющий около 50 генов.

Основной особенностью комплекса является значитель-

ная полигенность (наличие нескольких неаллельных близкородственных генов, белковые продукты которых сходны в структурном отношении и выполняют идентичные функции) и ярко выраженный полиморфизм – присутствие многих аллельных форм одного и того же гена.

Полигенность и полиморфизм (структурная вариабельность) определяют антигенную индивидуальность особой данного вида.

Все гены МНС делятся на три группы. Каждая группа включает гены, контролирующие синтез полипептидов одного из трех классов МНС (I, II и III).

Молекулы МНС II класса (DP, DQ, DR) представляют антигены из пространства вне клетки в клетку, в частности в Т-лимфоциты. Некоторые антигены стимулируют деление клеток Т-хелперов, которые затем стимулируют В-клетки для производства антител к данному антигену. Молекулы этого класса находятся на поверхности антигенпредставляющих клеток: дендритных клеток, макрофагов, В-лимфоцитов, моноцитов, активированных Т-лимфоцитах, эндотелиальных и эпителиальных клеток, гепатоцитах, клетках трофобласта [5, 6].

Лейкоцитарная аллосенсибилизация матери

Естественных антител к антигенам тканевой совместимости не существует. В 1926 году С. Доан впервые установила, что у беременных в крови появляются антитела, агглютинирующие аллогенные лейкоциты. В 1952 году J. Dausset продемонстрировал, что лейкоагглютинины встречаются у 25% женщин, которые имели более 3 беременностей в анамнезе.

Эмбрион млекопитающих (зигота), возникающий в результате слияния генетического материала двух гамет, обычно в значительной степени отличается генетически от материнского организма и обладает антигенами отцовского происхождения. Ранее полагали, что избежать отторжения эмбриону помогает абсолютная неиммуногенность клеток трофобласта. Позже было установлено, что оплодотворенное яйцо, как и сперматозоид, имеет на своей поверхности различные антигены отцовского происхождения [7].

Антигенный состав трофобласта в основном представлен антигенами II класса гистосовместимости (HLA DRB1, DQA1, DQB1).

Эта «чужеродность» является нормальным физиологическим явлением, запускающим особые иммунные реакции, направленные на сохранение беременности. Пролиферируя, клетки трофобласта внедряются в кровотоки матери, происходит контакт антигенов плода с Т-лимфоцитами матери. Далее осуществляется выработка специальных «защитных» антиотцовских аллоантител (APCA – antipaternal cytotoxic antibodies, Ab2-anti-anti HLA antibodies, MLR-Bf – mixed lymphocyte reaction blocking factor), которые покрывают по-

верхность клеток трофобласта и играют важную роль в успешном развитии беременности [8].

При этом, если на клетку, пораженную вирусом, реагирует 0,001% Т-клеток организма, то на одиночные HLA-антигены реагируют больше 0,1% Т-клеток [9]

Также при стимуляции антигенами эмбриона происходит ингибирование цитотоксичности NK-клеток (естественных киллеров) децидуальной оболочки, что необходимо для имплантации эмбриона и развития васкуляризации плаценты [10].

По данным ряда исследований, полное несовпадение HLA-генотипов у супругов благоприятно для развития беременности [11].

У супружеских пар с ПНБ неясного генеза было отмечено, что одинаковые антигены в HLA-генотипах встречаются чаще по сравнению с теми парами, в которых беременность развивается нормально. Большое число совпадающих антигенов HLA II класса у супругов приводит к тому, что не происходит достаточной иммуностимуляции организма матери и она не вырабатывает необходимого количества аллоантител к антигенам эмбриона. Возможно также развитие аутоиммунной реакции матери, приводящей к выработке антифосфолипидных, антиядерных, антитиреоидных и других антител, повреждающих плаценту [12].

Также у женщин с ПНБ, у которых совпадают с мужем аллели HLA-DQ и DR, наблюдается повышение цитотоксичности и количества NK-клеток. Эмбрион не распознается как плод, а воспринимается как измененная клетка собственного организма, против которой активно начинает работать иммунная система. Это приводит к развитию некроза в области децидуальной оболочки и трофобласта и к раннему прерыванию кариотипически нормальной беременности. Таким образом, несовместимость супругов по HLA-антигенам и отличие зародыша от материнского организма являются важным моментом, необходимым для сохранения и вынашивания беременности.

По-видимому, антигены гистосовместимости важны и на таких этапах, как оплодотворение яйцеклетки, поскольку при совпадении родителей по антигенам HLA повышается процент случаев оплодотворения яйцеклетки одновременно двумя сперматозоидами (Coullin et al., 1978).

Таким образом, для диагностики иммунных форм бесплодия и невынашивания беременности необходимо генотипировать супругов по локусу HLA для антигенов класса II (HLA-типирование). Генотипирование проводится по HLA-DR и HLA-DQ антигенам, так как эти антигены представлены на клетке в несравненно большем количестве и являются наиболее иммуногенно активными.

Критерии оценки результатов HLA-типирования супружеской пары

Определение аллелей MHC проводят индивидуально каждому пациенту.

Результатом является получение гаплотипа по 6 аллелям 3 локусов (DQA1, DQB1, DR). Далее проводят анализ каждого результата отдельно и в паре.

Неблагоприятными аллоиммунными факторами являются:

– гистосовместимость родителей (наличие 3 и более общих антигенов системы MHC – HLA II класса)

При наличии у супругов повышенного количества (более 3) общих HLA-антигенов развивается невынашивание беременности.

Большой процент совпадений по HLA-аллелям у мужа и жены может расцениваться как абсолютная иммуногенетическая несовместимость – в таком случае даже зачатие невозможно.

Также отмечают, что даже при 2 совпадениях в разных локусах повышается риск невынашивания беременности в 3,5 раза [9];

– наличие аллелей, генотипов, гаплотипов «повышенного риска».

По результатам проведенных на сегодняшний день исследований в этой области к генотипам «повышенного риска» у пациентов с привычным выкидышем относятся (общие для мужчин и женщин): 0501/0501, 0102/0301 по локусу DQA1 и 0301/0301 по локусу DQB1, DRB1 06/15 (наличие последнего повышает риск патологии в 12 раз).

Предрасполагающими к потерям беременности в парах с привычным выкидышем являются у мужчин антиген B35, аллели 0501 и 0201 по локусу DQA1, аллели 0301 и 0201, 0302 по локусу DQB1 (наличие аллеля 0302 повышает риск невынашивания в 6 раз), у женщин – 0301/0301, 0501/0502, 0604/0605, 0402 DQB1, DQA1 0101/0501, 0201/0602 [9, 13, 14];

– носительство локусов DR4, DR7, DRw53 системы HLA, которое связывают со склонностью к развитию антифосфолипидного синдрома;

– наличие у мужчины аллелей DQA1 0201, DQB1 0201 повышает риск анэмбрионии [9].

Лечение

Лимфоцитотерапию (ЛИТ) проводят у супружеских пар с гистосовместимостью и высоким уровнем клеток с цитотоксической активностью в первой фазе (на 5–8-й день) менструального цикла в сочетании с терапией дидрогестероном во второй фазе (с 16-го по 25-й день) предполагаемого фертильного цикла. Иммунизацию женщины рекомендуется проводить лимфоцитами мужа. Однако при значительной степени совпадения генотипа супругов по HLA-антигенам может быть рекомендовано проведение иммунизации пациентки донорскими лимфоцитами.

ЛИТ позволяет резко снизить (уже после первой процедуры) процентное содержание лимфоцитов с цитотоксической активностью, тем самым способствуя нормализации механизмов распознавания клеток трофобласта отцовского происхождения. Дидрогестерон, используемый с целью иммуномодуляции, повышает эффективность ЛИТ.

На заре внедрения ЛИТ в медицинскую практику (20 лет практического использования этого метода в нашем центре) этот метод использовали эмпирически, безвыборочно. В последние годы благодаря использованию молекулярно-генетических методов проводят избирательный этиопатогенетический подход с учетом вышеуказанных критериев.

Ведение беременности

На ранних этапах беременности предпочтительным является сочетание методов активной и пассивной иммунизации у пар с аллоиммунными нарушениями. Использование ЛИТ с 3–4-недельным интервалом до 12–14 нед беременности в сочетании с внутривенным капельным введением средних доз иммуноглобулина (15 г в I триместре) с момента диагностики беременности способствует успешному исходу I триместра и снижению частоты формирования плацентарной недостаточности.

Результаты наших исследований свидетельствуют, что возможность сохранения беременности при применении ЛИТ в семьях с 3 и более самопроизвольных абортов в анамнезе превышало 90% у беременных с ПНБ, а отсутствие применения ЛИТ в комплексном лечении приводит к сохранению беременности только в 14 (29,7%) случаях, что является убедительным аргументом в пользу применения аллогенных лимфоцитов для лечения и профилактики ПНБ.

Встречаемость аллелей склонности к анэмбрионии у пар с разным количеством совпадений по системе HLA II класса

Количество совпадений	Количество случаев аллелей склонности к анэмбрионии (DQA1 или DQB1)	%	Количество случаев аллелей склонности к анэмбрионии (DQA1 и DQB1)	%
0	18	25,0	6	8,3
1	19	27,9	4	5,9
2	29	51,8	9	16,1
3-5	23	44,2	5	9,6

Несмотря на разноречивость и неоднозначность мнений множества авторов, наши результаты свидетельствуют, что ЛИТ является эффективным методом лечения ПНБ и может с успехом применяться для профилактики и лечения привычной потери беременности [15].

Пациентки с привычными ранними выкидышами составляют группу риска по реализации поздних гестационных осложнений, в связи с чем необходим тщательный гемостазиологический контроль на протяжении всей беременности, мониторинг состояния плода (ультразвуковая фетометрия, доплерометрия, кардиотокография) для своевременной диагностики, лечения плацентарной недостаточности и выбора оптимальных сроков и способов родоразрешения.

Цель исследования: определить долю HLA-системы II класса в структуре ранних привычных выкидышей неясного генеза в группе супружеских пар Центрального и Юго-Восточного регионов Украины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были отобраны 248 супружеских пар из Днепропетровской, Запорожской, Черкасской, Кировоградской, Херсонской областей с ПНБ в I триместре неясного генеза (средний возраст женщин составлял 30±2 года, среднее количество СА/замерших беременностей – 3±1). Все пациенты предварительно прошли цитогенетическое исследование и имели нормальный кариотип (в трех случаях наблюдался хромосомный полиморфизм у супруга).

В 35 случаях семьи обратились в момент прерывания беременности, в этой группе удалось проанализировать кариотип материала продуктов концепции. В 17 случаях кариотип был нормальным, а в остальных 18 – наблюдалась различная хромосомная патология (69,XXY,69,XXX,69,XY – 4 случая, 92,XXYY – 4 случая, 47,XY+16 – 4 случая, 92,XXX+4/8 – 2 случая, 45,X – 2 случая, 47,XY+21 – 1 случай, 47,XY+14 – 1 случай).

Всем парам проводили SSP-типирование MHC II класса (HLA II класс).

Исследования выполнены на наборах фирмы «Изоген» (Россия) с детекцией результатов путем электрофореза в 2% агарозном геле.

Спектр определяемых аллелей и групп аллелей был следующим:

DQA10101,0102,0103,0104,0201,0301,0302,0401,0501,0601;DQB10201,0301,0302,0303,0304,0401,0402,0501,0502,0503,0504,0601,0602,0603,0604,0605,0606,0607,0608;DRB11,3,4,7,9,w8,w10,w11,w12,w13.1,w13.2,w14.1,w14.2,w15,w16,w17,w18, DRB3 w52,DRB4 w53.

Статистическую достоверность отличий выборок анализировали с помощью метода углового превращения Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценку результатов проводили согласно наличию совпадений по системе гистосовместимости II класса у супругов, а также относительно присутствия аллелей риска анэмбрионии у мужчин (рисунок, таблица).

Так, доля значимых совпадений (3–6) по системе HLA составила в сумме 21%. При этом приблизительно такой же процент пар имели 2 совпадения (22,6%).

Аллели повышенного риска анэмбрионии по локусам DQA1, DQB1 среди мужчин обнаружены в 30,7% случаев (11,4% – HLA DQA1 0201; 19,3% – HLA DQB1 0201). При этом 9,6% мужчин из пар имели аллели склонности к анэмбрионии одновременно по двум локусам.

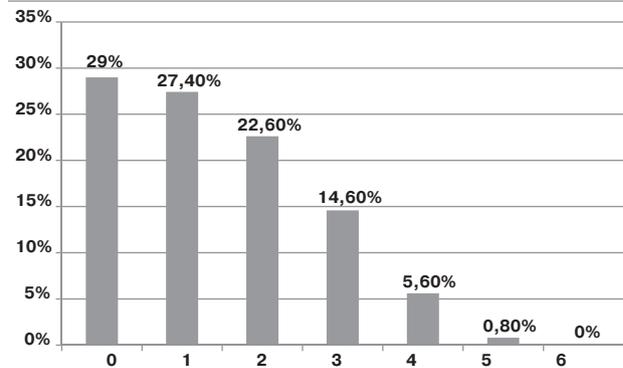
При анализе встречаемости аллелей склонности к анэмбрионии оказалось, что аллели DQA1 0201 или DQB1 0201 достоверно (P<0,001) в 2 раза чаще встречались в парах, имевших по 2 совпадения по системе HLA, чем в парах без совпадений. Достоверных различий по носительству одновременно 2 аллелей склонности к анэмбрионии у пар с совпадениями по системе тканевой совместимости и без обнаружено не было.

В случаях, где был известен кариотип эмбриона, различий в распределении факторов риска по системе HLA в выборке с нормальным и аномальным кариотипом обнаружено не было.

Как уже известно, у человека HLA-система создает условия, препятствующие появлению HLA-гомозиготного потомства, в связи с тем, что такие индивидуумы имеют повышенный риск целого ряда патологических состояний – инфекционных, онкологических, аутоиммунных, поскольку уже установлена корреляция между HLA-фенотипом и особенностями иммунного ответа.

Некоторые исследователи полагают, что эффект совместимости родительских антигенов может быть не только иммунологического происхождения. Существуют «летальные» или «полуметалетальные» гены, которые сцеплены с комплексом HLA и регулируют процессы раннего развития и дифференцировки, а также созревания гамет [9]. Согласно этому предположению родительская совместимость по HLA может быть вторичной, отражающей гомозиготность для эмбриона по связанному с HLA летальному гену.

Так, основываясь на этой теории, возможно предположить, что факторами риска невынашивания беременности может быть следующее:



Количество совпадений по аллелям HLA-системы в супружеских парах с невынашиванием беременности

– «похожесть» супругов по системе HLA;
 – наличие аллелей системы HLA I и II класса, сцепленных с так называемыми летальными и полuletальными генами (т.е. аллели повышенного риска невынашивания беременности);
 – гомозиготность хотя бы одного из супругов по «неблагоприятным» аллелям локусов системы HLA. Но в этом случае необходимо также учитывать возможность того, что второй аллель просто не определяется выбранной тест-системой.

Как непрямые факторы также выделяют наличие аллелей склонности к антифосфолипидному синдрому и преэклампсии.

Согласно полученным нами данным три и более совпадения у супругов наблюдали у 21% пар, тогда как, по данным других авторов, это цифра достигает 50% [9]. Это может объясняться тем, что в большинстве исследований, кроме системы II класса проводили анализ и системы I класса. Также это возможно связано с различными критериями отбора пациентов или популяционными отличиями распределения полиморфных вариантов генов системы MHC и соответственно преобладания различных факторов возникновения репродуктивной дисфункции этого типа, что требует дальнейшего углубленного изучения и анализа.

Значення алоімуних механізмів у виникненні ранніх репродуктивних втрат у подружніх пар зі звичним не виношуванням вагітності
М.П. Веропотвелян

У роботі представлені результати з визначення частки алоімуних факторів у генезі звичного невиношування вагітності у пар Південно-Східного та Центрального регіонів України, зумовленого головним комплексом гістосумісності II класу. Згідно з отриманими даними більше 20% пар із звичними репродуктивними втратами мають високе число збігів за системою HLA II класу (від 3 до 5). У 30% випадків має місце носійство алелей схильності до анембріонії (DQA1 0201 або DQB1 0201). Висунуто припущення, що носійство «аллелей анембріонії» у разі 2 збігів є таким самим значущим фактором схильності до невиношування вагітності, як і більша кількість співпадінь.
Ключові слова: невиношування вагітності, гістосумісність, анембріонія.

Сведения об авторе

Веропотвелян Николай Петрович – Республиканский центр медицинской генетики и пренатальной диагностики, 50000, г. Кривой Рог, пл. Освобождения, 3а. E-mail: genetika@ukrpost.ua

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Радзинский В.Е. Неразвивающаяся беременность. М.: Гэотар-Медиа, 2009.
2. Regan L., Braude P.R., Trembath P.L. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion // *BMJ* 1989; 299(6698): 541–545.
3. Clifford K., Rai R., Watson H., Regan L. An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases // *Hum Reprod* 1994; 9: 1328–1332.
4. Доброхотова Ю.Э. Неразвивающаяся беременность. – М.: Гэотар-Медиа, 2010.
5. Bottley G, Watherston O, Hiew Y, Norrild B, Cook G and Blair G (2007). «High-risk human papillomavirus E7 expression reduces cell-surface MHC class I molecules and increases susceptibility to natural killer cells». *Oncogene*. [Epub ahead of print] PMID 1782829.
6. Brennan P and Kendrick K (2006). «Mammalian social odours: attraction and individual recognition». *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 361(1476):2061–78 PMID 17118924.
7. Halim A., Abbasi K., Festenstein H. The expression of the HLA antigens on human spermatozoa. *Tissue Antigens* 1974; 4: 1–6.
8. McIntyre J.A., Coulam C.B., Faulk W.P. Recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1989; 21: 100–104.
9. Сидельникова В.М. Подготовка и ведение беременности у женщин с привычным невынашиванием. – М., 2011.
10. Aoki K., Kajiuura S., Matsumoto Y., Ogasawara M. et al. Preconceptional

ВЫВОДЫ

1. Более 20% пар с привычными репродуктивными потерями в Юго-Восточном и Центральном регионе Украины имеют большое число совпадений по системе HLA II класса (от 3 до 5).
2. В 30% случаев имеет место носительство аллелей склонности к анембрии (DQA1 0201 или DQB1 0201).
3. Возможно предположить, что носительство «аллелей анембрии» в случае 2 совпадений являются такими же значимыми факторами склонности к невынашиванию беременности, как и большее количество совпадений.
4. Полученные данные не противоречат ранее описанным нами результатам кариотипирования замерших беременностей [16], согласно которым уровень хромосомной патологии при наличии эмбриона и при анембриониях одинаковый и составляет 57%. Это свидетельствует о наличии причин возникновения анембрионий независимых от кариотипа.
5. Считаем целесообразным также включать в группу риска пары с двумя совпадениями, которые согласно полученным нами данным составляют 22,6%.
6. Таким образом, более чем у 50% пар с невынашиванием беременности неясной этиологии возможно определить причину репродуктивных потерь с помощью генотипирования главного комплекса гистосовместимости II класса и провести соответствующую профилактическую терапию.

The meaning of alloimmune mechanisms in the event of early reproductive loss in couples with recurrent miscarriage
N.P. Veropotvelyan

The present work represents the results on determination of alloimmune factors role in the genesis of recurrent miscarriage in couples of the south-eastern and central regions of Ukraine conditioned by the main complex of histocompatibility of the second class. According to the received data more than 20% of couples with recurrent reproductive miscarriages have a high number of coincidence according to the system HLA of the second class (from 3 to 5). In 30% of the cases there is carrying of inclination alleles to unembryonia (DQA1 0201 or DQB1 0201). There is a supposition that carrying of «unembryonia alleles» in case of 2 coincidence is considered to be such a significant factor of inclination to pregnancy miscarriage as a bigger number of coincidence.
Key words: pregnancy miscarriage, histocompatibility, unembryonia.

11. Coulam C.B., Moore S.B., O’Fallon W. Association between major histocompatibility antigen and reproductive performance. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987 Jun 14; 2: 54–58.
12. Yamada H., Atsumi T., Kato E.H. et al. Prevalence of diverse antiphospholipid antibodies in women with recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 2003.
13. Терпиляк О.І. та ін. Аналіз розподілу алельних варіантів генів HLA – DRB1, HLA-DQA1, HLA – DQB1 і HLA-G серед жінок зі звичним невиношуванням вагітності нез’ясованого генезу// *Biopolymers and Cell*. 2013. Vol. 29. N 5. P. 413–417
14. Роль антигенов II класса главного комплекса гистосовместимости в привычном невынашивании беременности / Т.С. Бескорвайная, Н.В. Полтавец // *Проблемы репродукции*. – 2005.
15. Рациональный подход к применению лимфоцитотерапии при привычном невынашивании беременности / Н.П. Веропотвелян, П.Н. Веропотвелян, П.С. Горук, Ю.С. Погуляй, Л.И. Завгородняя // *Здоровье женщины*. – 2012. – №2. – С. 130-133.
16. Веропотвелян М.П., Кодунов Л.О. та ін. Визначення первинної популяційної частоти хромосомної патології і ранньої ембріональної летальності в Україні// *Здоровье женщины*. – № 9. – 2012. – С. 108–114.

Статья поступила в редакцию 14.03.2014