

ТЕРПИЛЯК О. І.<sup>1✉</sup>, ЗАСТАВНА Д. В.<sup>1</sup>, СОСНІНА К. О.<sup>1</sup>, ФІЛЕНКО О. Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,

Україна, 79008, м. Львів, вул. Лисенка, 31а, ORCID: 0001-6274-8362, 0000-0002-3858-7180, 0000-0003-4527-2010

<sup>2</sup> ДУ «Інститут харчових біотехнологій і геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А, ORCID: 0009-0002-7160-2546

✉ [oresta.terp@gmail.com](mailto:oresta.terp@gmail.com)

## РОЛЬ ГЕНІВ *HLA*-КОМПЛЕКСУ В ГЕНЕЗІ ІДІОПАТИЧНИХ ПОВТОРНИХ ВТРАТ ВАГІТНОСТІ У ЛЮДИНИ

**Мета.** Вивчити імуногенетичні передумови ідіопатичних повторних мимовільних втрат вагітності у людини алло- та аутоімунного генезу. **Методи.** PCR-SSP (polymerase chain reaction with sequence-specific primers). **Результати.** Проведений комплексний аналіз розподілу та частоти алельних варіантів генів *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* вказує на підвищений ризик повторних втрат вагітності при сумарній гомології 50 % і більше у подружжя та наявності генотипу *DQ2.5* у жінки. Показник OR засвідчує, що ризик ідіопатичних повторних мимовільних втрат вагітності зростає у 2,68 раза при гомології подружжя у 50 % і більше за двома локусами (*HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*) та у 12,8 раза при гомології 50 % і більше за трьома локусами (*HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*), а при наявності генотипу *DQ2.5* у жінок цей ризик зростає у 4-и рази. **Висновки.** *HLA*-генотипування подружніх пар зі спонтанними втратами вагітності в анамнезі має важливе значення для прекоцепційної профілактики повторних втрат вагітності.

**Ключові слова:** ідіопатичні повторні втрати вагітності *HLA*-генотипування.

Ідіопатичні повторні втрати вагітності – ППВВ (від англ. *Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss (IRPL)*) спостерігаються у 1-8 % жінок і визначається як два і більше спонтанних викиднів в анамнезі до 23 тижні гестації [1, 2]. Причини ППВВ до кінця не з'ясовані. Щораз частіше розглядаються полігенні передумови ППВВ з особливим акцентом на імунній домінанті. Зрозуміло, що виживання аллогенного плода можливе лише за умови функціонування системи імунорегуляторних механізмів, що забезпечують адекватне реагування імунної системи вагітної жінки на плід.

Основну роль у підтриманні імунного статусу організму відіграє великий комплекс гісто-

сумісності – МНС (від англ. *Major Histocompatibility Complex*), який у людини називається *HLA*-системою (від англ. *Human Leukocyte A-system*). Участь *HLA*-системи у схильності до ППВВ розглядається під кутом зору пошуку конкретних генів *HLA*, причетних до репродуктивних втрат, подібності подружжя за *HLA*-антигенами або вивчення модулюючих властивостей *HLA*-системи в комплексі генної сітки [3, 4].

Близько 80 % всіх раніше нез'ясованих випадків повторних втрат вагітності при більш детальному дослідженні окреслюється як «імунне неплоддя» [2, 5]. Тобто, імунна система, яка еволюційно призначена для розпізнавання і елімінації чужорідних антигенів, неадекватно реагує на плід і «запускає» імунні чинники на знищення вагітності [6]. Відомо, що основним механізмом, який забезпечує нормальний перебіг вагітності, є імунна толерантність, тобто, пригнічення імунної відповіді вагітної жінки на антигени плода при збереженні імунної реактивності на інші чужорідні субстанції. Існує низка механізмів, які здатні підтримувати імунну толерантність матері під час вагітності. Зокрема, відсутність на трофобласті класичних *HLA* антигенів класу I та II забезпечує зниження імунної відповіді матері на плід [7]. Під час вагітності змінюється співвідношення субпопуляцій клітин-хелперів Th1/Th2-типу з метою продукування ними низки специфічних цитокінів, зокрема такими як ІЛ-2, ФНП- $\alpha$ , ІФН- $\gamma$ , ІЛ-4, ІЛ-10, роль яких полягає в аутокринному регулюванні процесів проліферації та диференціації, зокрема, і клітин плода [8]. Зміни цих механізмів призводять до порушень репродуктивної функції та призводить до репродуктивних втрат.

Імунні порушення, що ведуть до відторгнення ембріона/плода можна поділити на аутоімунні та аллоімунні. При аллоімунних порушеннях імунна відповідь жінки спрямована

© ТЕРПИЛЯК О. І., ЗАСТАВНА Д. В., СОСНІНА К. О., ФІЛЕНКО О. Л.

проти антигенів ембріона, отриманих від батька, оскільки вони є потенційно чужорідними для організму матері. При аутоімунних процесах мішенню для агресії імунної системи стають власні тканини материнського організму, і як результат, накопичення в організмі аутоантитіл, циркулювання яких ускладнює перебіг вагітності. З аутоімунних порушень, які спричиняються до репродуктивних втрат, загально визнаними є, зокрема, антифосфоліпідний синдром, системний червоний вовчак та аутоімунний тиреоїдит [9].

В останні роки широко дискутується питання зв'язку ідіопатичних втрат вагітності з целиакією. Целиакія – це аутоімунна хвороба, яка характеризується запальним процесом тонкого кишківника внаслідок несприйняття продуктів харчування, що містять глютен (зокрема гліадинової фракції глютену). Хвороба супроводжується ентеропатією, діареєю, присутністю в крові циркулюючих ауто-антитіл. У хворих целиакією відзначають анорексію, зниження щільності кісткової тканини, нез'ясований дефіцит заліза, лімфоми. Окрім цього, целиакія часто ускладнюється цілим рядом ендокринних порушень, зокрема інсулін-залежним діабетом, аутоімунним тиреоїдитом, множинними грандулярними ендокринопатіями [10, 11].

Частота целиакії в Європі та США становить 1:100. Перші клінічні прояви хвороби починаються у ранньому дитинстві. Причому, дівчатка хворіють у 2 рази частіше, ніж хлопчики. У зрілому віці целиакія у жінок призводить до порушення репродуктивної функції, зокрема, непліддя нез'ясованого генезу [12, 13], передчасного переривання вагітності, завмирання вагітності, ендометріозу. У жінок з целиакією часто відзначають запізніле менархе, ранню менопаузу, що в свою чергу приводить до скорочення часу фертильності, чи вторинної аменореї [14]. У жінок, які страждають на целиакію частота ПІВВ подвоюється [2]. За визначенням, целиакія – це мультифакторна хвороба з високою генетичною предрисповицією. Генетично обумовлена схильність до целиакії окреслюється специфічним алельним поліморфізмом *DQA1*- та *DQB1*-генів головного комплексу гістосумісності II класу. До 95 % пацієнтів з встановленою целиакією несуть *DQ2.5* гетеродимер, що кодується *DQA1\*05* та *DQB1\*02* алелями, як в транс-, так і в цис-конфігурації (позиції), а у решти 5-10 % наявна молекула *DQ8*, що кодується *DQB1\*03:02* переважно в комбінації з *DQA1\*03* алельним варіантом [9, 12]. При цьому слід на-

голосити, що наявність у індивіда вищенаведених генотипів не передбачає однозначного розвитку хвороби, проте їх відсутність свідчить про майже 100 % виключення целиакії.

Метою роботи було вивчення імуногенетичних передумов ідіопатичних повторних мимовільних втрат вагітності у людини алло- та аутоімунного генезу на підставі аналізу особливостей алельного поліморфізму генів *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*.

### Матеріали і методи

Матеріалом дослідження була ДНК, виділена з лейкоцитів периферійної крові методом висолювання [15]. Типування алелей *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* та *HLA-DQB1* проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з алель специфічними праймерами (від англ. *PCR-SSP polymerase chain reaction with sequence-specific primers*). Провели типування 16 алелей/алельних груп локусу *HLA-DRB1*, 10 алелей локусу *HLA-DQA1* та 19 алелей локусу *HLA-DQB1*. Для внутрішнього контролю використовували фрагмент величиною 200 п. н. гена людського гормону росту (*HGH*). Праймери синтезувала фірма «Neogen» (м. Київ, Україна), умови реакції згідно інструкції фірми-виробника.

Типування алелей базувалося на присутності або відсутності ПЛР-продукту, який реєструвався за допомогою елеткрофорезу у 2 % агарозному гелі, забарвленому бромистим етидієм в УФ-світлі при довжині хвилі 302 нм. За наявності або відсутності специфічного фрагмента ампліфікації певного розміру відповідної алель-специфічної або групо-специфічної суміші праймерів проводили типування відповідних алелей.

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням критерію Пірсона  $\chi^2$ . Для всіх видів аналізу критичний рівень значущості для статистичних критеріїв приймався рівень  $p < 0,05$ . Асоціацію генотипів та алелів з ризиком репродуктивних втрат оцінювали за допомогою розрахунку коефіцієнта шансів (Odds ratio, OR) з 95 % довірчим інтервалом.

### Результати та обговорення

Генотипуванню по *DR*- та *DQ*-локусах *HLA*-системи II класу підлягали 200 подружніх пар з діагнозом «ідіопатична повторна втрата вагітності», котрі звернулися у Львівський міжобласний медико-генетичний центр з приводу 2-3-разової втрати вагітності у терміні 5-10 тижнів

вагітності нез'ясованого генезу. Окрім цього, генотипуванню по *DQ*-локусі *HLA*-системи II класу підлягали 267 жінок з ІПВВ. Контроль склали 34 подружні пари без обтяженого акушерсько-генетичного анамнезу, у котрих є 2-є і більше здорових дітей. Досліджено 16 алелів гена *HLA-DRB1*, 10 алелів гена *HLA-DQA1* та 19 алелів гена *HLA-DQB1*. Схарактеризовано алельні поліморфізми та генотипи в межах цих генів. Проведено статистичний аналіз отриманих даних у порівнянні з контрольною групою.

Аллоїмунна компонента розглядалася як «подібність» між чоловіком і дружиною за алельними варіантами генів *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* та *HLA-DQB1*. Алельний поліморфізм генів *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* оцінено у 200 подружніх парах з ІПВВ, а генотипування по всіх трьох локусах *HLA* (*DRB1*, *DQA1* та *DQB1*) проведено у 68 подружніх парах з ІПВВ. Критичною вважали гомологію між подружжям за алельним поліморфізмом не менше, ніж 50 % за кожним локусом.

Отримані результати показників гомології при поєднанні алельних варіантів генів *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* вказують, що у подружніх пар з репродуктивними втратами гомологія за локусами 50 % і вище зустрічається частіше у порівнянні з контролем (табл. 1). У зв'язку з цим сумарну гомологію за локусами оцінювали як менш ніж 50 % та 50 % і більше.

У групі з ІПВВ гомологія 50 % і більше за локусами *DRB1 + DQA1* встановлена у 36,5 % пар, що у два рази більше в порівнянні з контролем (17,65 %) Гомологія 50 % і більше за трьома локусами у подружніх пар з ІПВВ зустрічалася у 27,94 % у порівнянні з 2,94 % у контрольній групі.

Статистичне опрацювання отриманих результатів з використанням критерію Пірсона ( $\chi^2$ )

показало, що гомологія подружньої пари 50 % і більше за локусами *DRB1 + DQA1* та *DRB1 + DQA1 + DQB1* є вірогідно вища у подружніх пар з ІПВВ ( $\chi^2 = 4,62$ ;  $p < 0,05$  та  $\chi^2 = 8,99$ ;  $p < 0,05$  відповідно) у порівнянні з контрольною групою. Обрахунок коефіцієнта шансів (OR) показав, що ризик ІПВВ збільшується в 2,68 рази при гомології подружжя на 50 % і вище за двома локусами *DRB1 + DQA1*, а при гомології 50 % і вище за трьома локусами ризик ІПВВ збільшується аж у 12,8 рази.

Отже, нами показано, що не останню роль в генезі ранніх репродуктивних втрат відіграє гомологія подружжя за генами *HLA*-системи. Зокрема сумарна гомологія 50 % та більше за локусами *DRB1* та *DQA1* або ж за трьома *DRB1*, *DQA1* та *DQB1* виступає негативним прогностичним маркером повторних ранніх репродуктивних втрат.

Наступним етапом нашої роботи було дослідження наявності алелей *DQA1\*05:01*, *DQB1\*02* та *DQB1\*03:02* в дослідній групі жінок з ІПВВ у порівнянні з контрольною групою жінок. Ці алелі є генетичними маркерами целіакії. Ми вибрали целіакію як модель для вивчення аутоїмунної компоненти ІПВВ. У таблиці 2 представлено розподіл та частоту *DQ*-генотипів, відповідальних за схильність до целіакії у дослідній та контрольній групах.

Як видно з представлених результатів (табл. 2), майже 80 % (78,79 %) репродуктивно здорових жінок (контрольна група) не несуть жодного з целіакійних генотипів. У групі жінок з ІПВВ відсутній целіакійний генотип тільки у половини жінок (53,56 %). Статистичні обрахунки засвідчили вірогідно значуще підвищення частоти жінок з целіакійним генотипом у групі ІПВВ у порівнянні з контролем при показниках  $\chi^2 = 7,6$  і  $P < 0,01$ .

Таблиця 1. Гомологія при поєднанні алельних варіантів генів *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* в групі з ІПВВ

<i>HLA</i> -локус к-ть спільних алелей (% гомології)	Контроль (34 пари)		ІПВВ (200 пар)		$\chi^2$	OR (CI 95 %)
	n	%	n	%		
<i>DRB1/DQA1</i>					4,62	2,68 (1.061-6.7819)
0-1 (0 % та 25 %)	28	82,35	127	63,50		
2-4 (50 %-100 %)	6	17,65	73	36,50		
	Контроль (34 пари)		ІПВВ (68 пар)			
<i>DRB1/DQA1/DQB1</i>					8,99	12,80 (1,63-100,27)
0-2 (0 %-34 %)	33	97,06	49	72,06		
3-6 (50 %-100 %)	1	2,94	19	27,94		

Таблиця 2. Розподіл та частота *DQ*-генотипів серед жінок з ІПВВ

<i>DQ</i> -генотип	Контрольна група, N = 33		Дослідна група, N = 267		$\chi$	P	OR (CI 95 %)
	Кількість носіїв	%	Кількість носіїв	%			
–	26	78,79	143	53,56	7,6	<0,01	3,2 (1,3-7,67)
<i>DQ2.5 + DQ8</i>	1	3,03	13	4,87	0,22	>0,05	1,64 (0,21-12,94)
<i>DQ2.5</i>	2	6,06	57	21,34	4,35	<0,05	4,2 (1-18,12)
<i>DQ8</i>	4	12,12	54	20,22	1,24	>0,05	1,84 (0,62-5,45)

Целіакійні генотипи нами були поділені на генотипи: високого ступеня ризику з алейним варіантом *DQA1\*05:01 + DQB1\*02 + DQB1\*03:02*, що відповідає генотипу *DQ2.5 + DQ8*, середньо-високого ступеня ризику з алейним варіантом *DQA1\*05:01 + DQB1\*02*, що відповідає генотипу *DQ2.5* та низького ступеня ризику з алейним варіантом *DQB1\*03:02*, що відповідає генотипу *DQ8*. Згідно з цим поділом, як видно з таблиці 2, жінки з ІПВВ виразно значимо не відрізняються від контрольної групи за целіакійними генотипами високого та низького ступеня ризику ( $\chi^2 = 0,22$  та  $1,24$ , відповідно,  $P > 0,05$ ). Що стосується генотипу середньо-високого ступеня ризику (*DQ2.5* – генотип), то його носіями є понад 20 % жінок з ІПВВ при контрольних показниках 6 %. Статистичні обчислення показали виразно значуще підвищення цього генотипу при ІПВВ порівняні з контролем:  $\chi^2 = 4,35$ ,  $P < 0,05$ . Показник OR (коефіцієнт шансів) засвідчує, що ризик навикового невиношування вагітності при наявності генотипу *DQ2.5* у жінок зростає у 4-и рази.

В підсумку, ми схиляємося до думки, що ризик повторних втрат вагітності асоціюється з окресленими *HLA*-маркерами головного комплексу гістосумісності II класу, а саме: *DQA1\*05:01 + DQB1\*02* – генотипом. Врахо-

вуючи те, що цей *HLA*-генотип загально визнано як *DQ2.5*-генотип передиспозиції до целіакії, можна запідозрити ключову роль аутоімунного процесу, запущеного целіакією, в генезі регулярних репродуктивних втрат. Вважаємо, що подібні дослідження є крайньо важливими, особливо, якщо врахувати, і це показано у багатьох дослідженнях [24, 25, 32], що безглютенова дієта – як профілактика целіакії може значною мірою розв'язати проблему репродуктивного здоров'я жінки..

### Висновки

1. Встановлено, що сумарна гомологія 50 % та більше за локусами *DRB1* та *DQA1* або ж за трьома *DRB1*, *DQA1* та *DQB1* виступає негативним прогностичним маркером повторних ранніх репродуктивних втрат.

2. Встановлено підвищений ризик навикового невиношування вагітності у жінок в асоціації з наявністю в них *DQ2.5*-генотипу передиспозиції до целіакії.

3. *HLA*-генотипування при репродуктивних втратах у жінок має велике практичне значення з метою прекоцепційної профілактики навикового невиношування вагітності.

### References

- Królik M., Wrzesniak M., Jezela-Stanek A. Possible effect of the HLA-DQ2/DQ8 polymorphism on autoimmune parameters and lymphocyte subpopulation in recurrent pregnancy losses. *J. Reprod. Immunol.* 2022. Vol. 149. doi: 10.1016/j.jri.2021.103467.
- Masucci L., D'Ippolito S., De Maio F., Quaranta G., Mazzarella R., Bianco D. M., Castellani R. et al. Celiac Disease Predisposition and Genital Tract Microbiota in Women Affected by Recurrent Pregnancy Loss. *Nutrients.* 2023. Vol. 15 (1). P. 221. doi: 10.3390/nu15010221.
- Beydoun H., Saftlas A. F. Association of human leucocyte antigen sharing with recurrent spontaneous abortions *Tissue Antigens.* 2005. Vol. 65, No. 2. P. 123–135.
- Varla-Leftherioti M., Keramitsoglou T., Spyropoulou-Vlachou M., Papadimitropoulos M., Kontopoulou-Antonopoulou V., Tsekoura C., Sankarkumar U. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: Report from the reproductive immunology component. *Tissue Antigens.* 2007. Vol. 69, No. 1. P. 297–303.
- Dimitriadis E., Menkhorst E., Saito S., Kutteh W. H., Brosens J. J. Recurrent pregnancy loss. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2020. Vol. 10 (1). P. 98. doi: 10.1038/s41572-020-00228-z.
- Egerup P., Kolte A. M., Larsen E. C., Krog M., Nielsen H. S., Christiansen O. B. Recurrent pregnancy loss: what is the impact of consecutive versus non-consecutive losses? *Hum. Reprod.* 2016. Vol. 31 (11). P. 2428–2434. doi: 10.1093/humrep/dew169.
- Ober C. HLA and Pregnancy: The Paradox of the Fetal Allograft. *Am J Hum Genet.* 2002. Vol. 62 (1). P. 1–5. doi: 10.1086/301692.

8. Nakagawa K., Kuroda K., Sugiyama R., Yamaguchi K. After 12 consecutive miscarriages, a patient received immunosuppressive treatment and delivered an intact baby. *Reprod. Med. Biol.* 2017. Vol. 16 (3). P. 297–301. doi: 10.1002/rmb2.12040.
9. Sange I., Mohamed M. F., Aung S. et al. Celiac Disease and the Autoimmune Web of Endocrinopathies. *Cureus.* 2020. Vol. 12. doi: 10.7759/cureus.12383.
10. Vipin Gupta, Alka Singh, Rajesh Khadgawat, Ashish Agarwal, Asif Iqbal, Wajiha Mehtab, Chaturvedi P. K., Vineet Ahuja, Govind K Makharia The spectrum of clinical and subclinical endocrinopathies in treatment-naïve patients with celiac disease. *Indian J. Gastroenterol.* 2019. Vol. 38 (6). P. 518–526. doi: 10.1007/s12664-019-01006-w.
11. Grode L. B., Agerholm I. E., Humaidan P., Parkner T., Bech B. H., Ramlau-Hansen C. H., Jensen T. M. Unrecognised coeliac disease among men and women undergoing fertility treatment: A screening study. *United European Gastroenterol. J.* 2018. Vol. 6 (10). P. 1477–1484. doi: 10.1177/2050640618796750.
12. Caio G., Volta U., Sapone A., Leffler D., De Giorgio R., Catassi C., Fasano A. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Medicine.* 2019. Vol. 17. P. 142. doi: 10.1186/s12916-019-1380-z.
13. Casella G., Orfanotti G., Giacomantonio L., Bella C. D., Crisafulli V., Villanacci V., Baldini V., Bassotti G. Celiac disease and obstetrical-gynecological contribution. *Gastroenterol. Hepatol. Bed. Bench.* 2016. Vol. 9 (4). P. 241–249.
14. Saccone G., Berghella V., Sarno L., Maruotti G.M., Cetin I., Greco L., Khashan A.S., McCarthy F., Martinelli D., Fortunato F., Martinelli P. Celiac disease and obstetric complications: A systematic review and metaanalysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2016. Vol. 214 (2) P. 225–234. doi: 10.1016/j.ajog.2015.09.080.
15. Makukh H. V., Zastavna D. V., Tyrkus M. J., Tretiak B. I., Chorna L. B. Sposib vydilennia DNK z leukocytiv peryferijnoi krovi: pat. 32044 Ukraina: MPK G01N33/49 (2006.01); No u200801896; appl. 14.02.2008; publ. 25.04.2008, bul. No. 8. [in Ukrainian]

**TERPYLIAK O. I.<sup>1</sup>, ZASTAVNA D. V.<sup>1</sup>, SOSNINA K. O.<sup>1</sup>, FILENKO O. L.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> State Institution “Institute of Hereditary Pathology NAMNS of Ukraine”,  
Ukraine, 79008, Lviv, M. Lysenko str., 31a

<sup>2</sup> State Institution “Institute of Food Biotechnology and Genomics NAN of Ukraine”,  
Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2a

## THE ROLE OF THE HLA-COMPLEX GENES IN GENESIS OF HUMAN IDIOPATHIC RECURRENT PREGNANCY LOSS

**Aim.** To study the immunogenetic prerequisites of idiopathic recurrent spontaneous pregnancy losses in humans of allo- and autoimmune genesis. **Methods.** PCR-SSP (polymerase chain reaction with sequence-specific primers). **Results.** A comprehensive analysis of the distribution and frequency of allelic variants of the *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* genes testifies to an increased risk of recurrent pregnancy losses with a total homology of 50 % or more in couples and presence of the *DQ2.5* genotype in a woman. The OR indicates that the risk of idiopathic recurrent spontaneous pregnancy loss increases 2.68 times when the homology of the couples is 50 % or more for two loci (*HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*) and 12.8 times when the homology is 50 % or more for three loci (*HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*), and if the *DQ2.5* genotype is present in women, this risk increases 4 times. **Conclusions.** *HLA* genotyping of married couples with a history of spontaneous pregnancy loss is important for preconceptional prevention of recurrent pregnancy losses.

**Keywords:** idiopathic recurrent pregnancy loss, *HLA* genotyping.