

UDC 575.113.2:618.179

Аналіз розподілу алельних варіантів генів *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* і *HLA-G* серед жінок з навиковим невиношуванням вагітності нез'ясованого генезу

О. І. Терпиляк, К. О. Сосніна, Д. В. Заставна, Н. В. Гельнер, М. І. Микула

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН»
Вул. М. Лисенка, 31-а, Львів, Україна, 79008

zastavna.d@ihp.lviv.ua

Мета. Проаналізувати особливості алельного поліморфізму генів *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* та поліморфізму інсерція/делеція 14 п. н. 3' UTR гена *HLA-G* у жінок з навиковим невиношуванням вагітності (ННВ). **Методи.** Виділення ДНК висоловлянням, ПЛР, електрофорез в агарозному гелі. **Результати.** Проведено комплексний аналіз розподілу та частоти алельних варіантів генів *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* та поліморфізму інсерція/делеція 14 п. н. гена *HLA-G* серед жінок з ННВ. **Висновки.** Зміни в генах системи *HLA* можуть бути причиною порушення репродуктивної функції у жінки і призводять до ранньої елімінації плоду.

Ключові слова: навикове невиношування вагітності(ННВ), *HLA*-генотипування, поліморфізм інсерція/делеція 14 п. н. гена *HLA-G*.

Вступ. Навикове невиношування вагітності (ННВ, від англ. Recurrent Pregnancy Loss) становить 10–15 % усіх вагітностей та визначається як два й більше спонтанних викиднів в анамнезі до 20-го тижня гестації [1]. Причини ННВ до кінця не з'ясовані. Щораз частіше як такі розглядають полігенні передумови ННВ з особливим акцентом на імунній домінанті. Зрозуміло, що виживання алогенного плоду можливе лише за умови функціонування системи імунорегуляторних механізмів, які забезпечують адекватне реагування імунної системи вагітної жінки на плід [2, 3].

Основну роль у підтриманні імунного статусу організму відіграє головний комплекс гістосумісності (МНС, від англ. Major Histocompatibility Complex), який у людини має назву *HLA*-системи (від англ. Human Leukocyte A-system). При дослідженні схильності до ННВ систему *HLA* залучають для пошуку

конкретних генів *HLA*, пов'язаних з репродуктивними втратами [4–6], подібності подружжя за *HLA*-антигенами [7] або вивчення модулюючих властивостей *HLA*-системи у комплексі генної сітки [8].

Згідно з останніми даними [9], не всі антигени *HLA* рівною мірою причетні до генезу репродуктивних невдач. Важлива роль при цьому належить *HLA-G* – неklasичному *HLA*-антигену, який на відміну від антигенів класичних експресується вже на самих ранніх стадіях ембріогенезу людини. *HLA-G* притаманні імуносупресивні властивості, тим самим він забезпечує імунну толерантність метері до плоду [10]. У кодуючій і регуляторних частинах гена *HLA-G* знайдено поліморфізми, асоційовані з різною експресією гена, що, як передбачають, може мати значення для пролонгування вагітності. Зокрема, суттєве значення має ділянка розміром 14 пар нуклеотидів (п. н.), оскільки відомо, що поліморфізм інсерції/делеції 14 п. н. безпосередньо впливає на рівень експресії гена *HLA-G* [11–13].

Метою даної роботи було проаналізувати особливості алельного поліморфізму генів *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, поліморфізму інсерції/делеції 14 п. н. 3' UTR гена *HLA-G* у жінок з ННВ, а також встановити ступінь подібності подружжя за *HLA*-антигенами як передумови навикового невиношування вагітності.

Матеріали і методи. Досліджено ДНК, виділену з лейкоцитів периферійної крові методом висоловлювання. Генотипування *HLA-DRB*, *HLA-DQA1* та *HLA-DQB1* проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», РФ) в автоматичному режимі за відповідною програмою. Для типування алелів зазначених генів використано набір реагентів «GenPak®HLA-DR PCR test», «GenPak®HLA-DQA1 PCR test» та «GenPak®HLA-DQB1 PCR test» (ООО «Лабораторія Ізоген», РФ). Набори реагентів призначені для ампліфікації ДНК методом ПЛР з сиквенса-специфічними праймерами. Алелі детектували електрофорезом в 3 %-му агарозному гелі, забарвленому бромистим етидієм в УФ-світлі за довжини хвилі 302 нм. Поліморфізм інсерція/делеція 14 п. н. 3' UTR гена *HLA-G* ідентифікували методом ПЛР згідно з раніше описаним протоколом [11].

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням критерію Пірсона χ^2 . Для всіх видів аналізу критичний рівень значущості для статистичних критеріїв приймали як $p < 0,05$. Асоціацію генотипів та алелів з ризиком репродуктивних втрат оцінювали, розраховуючи коефіцієнт шансів (Odds ratio, OR) з 95 %-м довірчим інтервалом.

Результати і обговорення. Генотипуванню за локусами *DR* і *DQ* системи *HLA* II класу підлягали 122 жінки з діагнозом «ідіопатичне навикове невиношування вагітності», котрі звернулися до Львівського міжобласного медико-генетичного центру з приводу 2–3-разової втрати вагітності у терміні 5–10 тижнів нез'ясованого генезу. До контрольної групи увійшли 20 жінок без обтяженого акушерсько-генетичного анамнезу, які мають двоє і більше здорових дітей.

Досліджено 16 алелів гена *HLA-DRB1*, 10 алелів гена *HLA-DQA1* і 19 алелів гена *HLA-DQB1*. Охарактеризовано алельні поліморфізми та генотипи у

межах цих генів. Проведено статистичний аналіз отриманих даних порівняно з контрольною групою.

Одержані результати показали інший (відносно контролю) розподіл частот алельних варіантів досліджуваних генів у групі жінок з ННВ (122 жінки, 244 алеля). Зокрема, в межах локусу *DRB1* встановлено підвищену (у порівнянні з контрольними показниками) частоту алеля *DRB1*0301* (13,5 проти 2,5 % у контролі), *DRB1*1601–1602* (8,2 проти 2,5 % у контролі) та знижену (стосовно контролю) частоту алеля *DRB1*1302* (0,4 проти 10 % у контролі) та алельної групи *DRB1*1201–1202* (0,8 проти 5 % у контролі). В межах локусу *DQA1* у групі жінок з ННВ підвищеною виявилася частота алеля *DQA1*0501* (32,4 проти 20 % у контролі) та зниженою – частота алеля *DQA1*0104* (2,9 проти 5 % в контролі). Для локусу *DQB1* у групі жінок з ННВ підвищеною була частота алеля *DQB1*0201* (16,21 проти 7,5 % у контролі) та знижена – частота алелів *DQB1*0503* (1,35 проти 5 % у контролі), *DQB1*0304* (1,35 проти 5 % у контролі), *DQB1*0604* (2,7 проти 10 % у контролі) і *DQB1*0602* (6,7 проти 15 % у контролі).

Статистичне опрацювання результатів дозволило виокремити три алеля, асоційовані з ННВ. Як видно з даних табл. 1, вірогідно значуще підвищення частоти встановлено для алеля *DRB1*0301* ($\chi^2 = 3,96$, $p < 0,05$), а вірогідно значуще зниження частоти – для алеля *DRB1*1302* ($\chi^2 = 18,28$, $p < 0,01$) і алельної групи *DRB1*1201–1202* ($\chi^2 = 4,33$, $p < 0,05$). Тобто алель *DRB1*0301* можна розглядати як алель-агресор, а алель *DRB1*1302* і алельну групу *DRB1*1201–1202*, навпаки, як алелі-протектори.

Обрахунок OR показав, що носійство *DRB1*0301* алеля підвищує ризик ННВ у жінки вшестеро (OR = 6,1; CI 95 %: 1,18–14,45). До речі, отримані нами результати щодо позитивної асоціації даного алеля з ННВ співставні з такими і інших авторів [14]. Ми солідарні з авторами робіт [14–19] відносно того, що наявність певних алельних варіантів генів локусів *DR* і *DQ* системи *HLA* у матері створює умови, за яких її імунна система не розпізнає антигени плоду і не запускає потрібних для його розвитку захисних механізмів.

Ще одним фактором ризику репродуктивних втрат, згідно з цілою низкою повідомлень [7, 8, 20],

Таблиця 1

Встановлені за типом асоціації алелі в групі жінок з навиковим невиношуванням вагітності (ННВ)

Тип асоціації та алелі <i>HLA-II</i>	Жінки контрольної групи (20 осіб; 40 алелів)		Жінки з ННВ (122 особи; 244 алеля)		χ^2	p
	n*	%**	n*	%**		
Позитивна, алель-агресор						
<i>DRB1*0301</i>	1	2,5	33	13,5	3,96	< 0,05
Негативна, алель-протектор						
<i>DRB1*1302</i>	4	10	1	0,4	18,28	< 0,01
<i>DRB1*1201–1202</i>	2	5	2	0,8	4,33	< 0,05

Примітка. *Кількість і **частота алелів у групі.

Таблиця 2

Показники гомології при поєднанні локусів *HLA-DRB*, *HLA-DQA1* і *HLA-DQB1* в обстежених групах

Гомологія 50 % і більше> за локусами	Контрольна група (n = 20 пар), n/%	Група з ННВ (n = 37 пар), n/%	χ^2	P
<i>HLA-DRB + HLA-DQA1 + HLA-DQB1</i>	0*/0,0	10*/27,0	6,55	< 0,025

Примітка. *Кількість подружніх пар з виявленою гомологією.

є гомологія за *HLA*-антигенами у подружжя. Ми проаналізували власні дані з точки зору «подібності» між чоловіком і дружиною за алельними варіантами генів *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* і *HLA-DQB1*. Алельний поліморфізм генів *HLA-DRB1* і *HLA-DQA1* оцінено у 122 родин з ННВ, а генотипування по всіх трьох локусах *HLA* (*DRB1*, *DQA1* і *DQB1*) проведено у 37 подружніх пар з ННВ. Контролем слугували 20 родин, у яких було не менше двох здорових дітей. Критичною вважали гомологію між подружжям за алельним поліморфізмом не менше ніж 50 % (коли подружжя має хоча б по одному одному алелю з кожного локусу).

Отримані результати виявили підвищену частоту (у порівнянні з контролем) гомологічності між подружжям у групі з ННВ по всіх досліджуваних генах. Однак вірогідно значущу відмінність відносно контролю спостерігали за комплексної сумарної гомології по всіх трьох *HLA*-локусах. Результати представлено в табл. 2. Як можна бачити, у контрольній групі взагалі не виявилось родин, де гомологія була б 50 % і вище одночасно по всіх трьох локусах системи *HLA*. У той час як більш ніж чверть (27 %) жінок з ННВ були подібними до своїх чоловіків (> 50 %) за алельним поліморфізмом одночасно по всіх досліджуваних генах *HLA*.

Спираючись на дані літератури останнього часу стосовно того, що пролонгування вагітності великою мірою залежить від неklasичного антигену *HLA-G* і асоційоване з поліморфізмом інсерція/делеція 14 п. н. 3' UTR гена *HLA-G*, наступним етапом нашої роботи став аналіз розподілу генотипів поліморфізму інсерція(+)/делеція(-) 14 п. н. 3' UTR гена *HLA-G* у жінок з ННВ. Всього обстежено 40 жінок з ННВ та 40 репродуктивно здорових жінок (табл. 3). Отримані результати продемонстрували вірогідно значуще зростання частоти генотипу +14 п. н./+14 п. н. 3' UTR гена *HLA-G* ($\chi^2 = 4,021$; $P < 0,05$) у групі жінок з ННВ порівняно з контрольною групою. Розрахунок OR засвідчив зростання більш ніж у 3 рази ризику невиношування вагітності у жінок – носіїв гомозиготного генотипу за алелем інсерція(+)-14 п. н. 3' UTR гена *HLA-G* (OR = 3,41 CI 95 %: 1,065–11,85).

Висновки. Проведено комплексний аналіз розподілу та частоти алельних варіантів генів *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* і *HLA-DQB1* II класу МНС людини серед подружніх пар з навиковим невиношуванням вагітності нез'ясованого генезу.

Встановлено, що алель *DRB1*0301* є алелем-агресором у групі жінок з ННВ, а носійство цього алеля підвищує ризик навикового невиношування

Таблиця 3

Аналіз розподілу поліморфізму інсерція/делеція 14 п. н. 3'UTR гена HLA-G у жінок з ННВ

Генотип	Жінки з ННВ (40 осіб)		Контрольна група (40 жінок)		χ^2	p	OR (CI)
	n	%	n	%			
-14 п. н./-14 п. н.	9	22,5	10	25	0,069	> 0,05	0,871 (0,311–2,442)
+14 п. н./+14 п. н.	11	27,5	4	10	4,021	< 0,05	3,4138 (1,065–11,850)
+14 п. н./-14 п. н.	20	50	26	65	1,841	> 0,05	0,5385 (0,219–1,322)

вагітності у жінки вшестеро (OR = 6,1; CI 95 %: 1,18–14,45).

Виявлено вірогідно значуще зростання частоти генотипу +14 п. н./+14 п. н. 3' UTR гена HLA-G ($\chi^2 = 4,021$; $p < 0,05$) у групі жінок з навиковим невиношуванням вагітності у порівнянні з контрольною групою. Показано зростання більш ніж у 3 рази ризику невиношування вагітності у жінок – носіїв гомозиготного генотипу за алелем інсерція(+)_{14 п. н.} 3' UTR гена HLA-G (OR = 3,41; CI 95 %: 1,065–11,85).

Визначено, що підвищення сумарної гомології подружніх пар на 50 % і вище за алельним поліморфізмом за локусами HLA-DRB1, HLA-DQA1 і HLA-DQB1 є негативним прогностичним маркером для настання та пролонгування вагітності.

O. I. Terpylyak, K. O. Sosnina, D. V. Zastavna, N. V. Helner, M. I. Mikula

The distribution of allelic variants of genes HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 and HLA-G among women with idiopathic recurrent pregnancy loss

«Institute of Hereditary Pathology, NAMS of Ukraine»

31a, M. Lysenko Str., Lviv, Ukraine, 79008

Summary

Aim. To analyze the distribution of allelic polymorphism of the HLA-DRB1, DQA1, DQB1 genes and HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism in women with RPL. **Methods.** DNA extraction, PCR, agarose gel electrophoresis. **Results.** A comprehensive analysis of the distribution and frequency of allelic variants of the genes HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 and HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism among women with RPL has been performed. **Conclusions.** Changes in the major histocompatibility complex genes can cause the failure of female reproductive function and lead to the early fetal loss.

Keywords: recurrent pregnancy loss, HLA-genotyping, HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism.

O. I. Terpylyak, K. A. Sosnina, D. V. Zastavna, N. V. Gelyner, M. I. Mikula

Аналіз розподілення алельних варіантів генів HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 и HLA-G среди женщин с привычным невынашиванием беременности неизвестного генеза

Резюме

Цель. Проанализировать особенности аллельного полиморфизма генов HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 и полиморфизма инсерция/делеция 14 п. н. 3' UTR гена HLA-G у женщины с привычным невынашиванием беременности (ПНБ). **Методы.** Выделение ДНК высаливанием, ПЦР, электрофорез в агарозном геле. **Результаты.** Проведен комплексный анализ распределения и частоты аллельных вариантов генов HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 и полиморфизма инсерция/делеция 14 п. н. гена HLA-G среди женщин с ПНБ. **Выводы.** Изменения в генах системы HLA могут быть причиной нарушения репродуктивной функции у женщины и приводят к ранней элиминации плода.

Ключевые слова: привычное невынашивание беременности (ПНБ), HLA-генотипирование, полиморфизм инсерция/делеция 14 п. н. гена HLA-G.

REFERENCES

1. Baek K. H., Lee E. J., Kim Y. S. Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms // Trends Mol. Med.–2007.–**13**, N 7.–P. 310–317.
2. Power L. L., Popplewell E. J., Holloway J. A., Diaper N. D., Warner J. O., Jones C. A. Immunoregulatory molecules during pregnancy and at birth // J. Reprod. Immunol.–2002.–**56**, N 1–2.–P. 19–22.
3. Sierra S., Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss // Semin. Reprod. Med.–2006.–**24**, N 1.–P. 17–24.
4. Aruna M., Nagaraja T., Andal Bhaskar S., Tarakeswari S., Reddy A. G., Thangaraj K., Singh L., Reddy B. M. Novel alleles of HLA-DQ and -DR loci show association with recurrent miscarriages among South Indian women // Hum. Reprod.–2011.–**26**, N 4.–P. 765–774.
5. Sipak-Szmigiel O., Ronin-Walknowska E., Miklaszewicz A., Doblubeczko A., Zejmo M., Giedrys-Kalamba S. Association between HLA-DQA1, HLA-DQB1 alleles and risk of early pregnancy loss // Ginekol. Pol.–2007.–**78**, N 10.–P. 792–795.
6. Takakuwa K., Adachi H., Hataya I., Ishii K., Tamura M., Tanaka K. Molecular genetic studies of HLA-DRB1 alleles in pa-

- tients with unexplained recurrent abortion in the Japanese population // *Hum. Reprod.*—2003.—**18**, N 4.—P. 728–733.
7. *Beydoun H., Safilas A. F.* Association of human leucocyte antigen sharing with recurrent spontaneous abortions // *Tissue Antigens.*—2005.—**65**, N 2.—P. 123–135.
 8. *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.—**69**, Suppl. 1.—P. 297–303.
 9. *Berger D. S., Hogge W. A., Barmada M. M., Ferrell R. E.* Comprehensive analysis of HLA-G: implications for recurrent spontaneous abortion // *Reprod. Sci.*—2010.—**17**, N 4.—P. 331–338.
 10. *Hviid T. V. F.* HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications // *Hum. Reprod. Update.*—2006.—**12**, N 3.—P. 209–232.
 11. *Aruna M., Sirisha P. V., Andal Bhaskar S., Tarakeswari S., Thangaraj K., Reddy B. M.* Role of 14-bp insertion/deletion polymorphism in HLA-G among Indian women with recurrent spontaneous abortions // *Tissue Antigens.*—2011.—**77**, N 2.—P. 131–135.
 12. *Tripathi P., Abbas A., Naik S., Agrawal S.* Role of 14-bp deletion in the *HLA-G* gene in the maintenance of pregnancy // *Tissue Antigens.*—2004.—**64**, N 6.—P. 706–710.
 13. *Xue S., Yang J., Yao F., Xu L., Fan L.* Recurrent spontaneous abortions patients have more –14 bp/+14 bp heterozygotes in the 3'UT region of the *HLA-G* gene in a Chinese Han population // *Tissue Antigens.*—2007.—**69**, Suppl 1.—P. 153–155.
 14. *Kruse C., Steffensen R., Varming K., Christiansen O. B.* A study of HLA-DR and -DQ alleles in 588 patients and 562 controls confirms that HLA-DRB1*03 is associated with recurrent miscarriage // *Hum. Reprod.*—2004.—**19**, N 5.—P. 1215–1221.
 15. *Takakuwa K., Honda K., Yokoo T., Hataya I., Tamura M., Tanaka K.* Molecular genetic studies on the compatibility of HLA class II alleles in patients with unexplained recurrent miscarriage in the Japanese population // *Clin. Immunol.*—2006.—**118**, N 1.—P. 101–108.
 16. *Shankarkumar U., Pawar A., Gaonkar P., Parasannavar D., Salvi V., Ghosh K.* HLA allele associations in idiopathic recurrent spontaneous abortion patients from India // *J. Hum. Reprod. Sci.*—2008.—**1**, N 1.—P. 19–24.
 17. *Steck T., van der Ven K., Kwak J., Beer A., Ober C.* HLA-DQA1 and HLA-DQB1 haplotypes in aborted fetuses and couples with recurrent spontaneous abortion // *J. Reprod. Immunol.*—1995.—**29**, N 2.—P. 95–104.
 18. *Wang X. P., Lin Q. D., Lu P. H., Ma Z. W., Zhao A. M.* Association of HLA-DQB1 coding region with unexplained recurrent spontaneous abortion // *Chin. Med. J.*—2004.—**117**, N 4.—P. 492–497.
 19. *Lin Q., Lu P., Wang X.* The study on human leucocyte antigen DQ region genes polymorphism in unexplained habitual abortion patients // *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.*—2001.—**36**, N 5.—P. 293–295.
 20. *Moghraby J. S., Tamim H., Anacan V., Al Khalaf H., Moghraby S. A.* HLA sharing among couples appears unrelated to idiopathic recurrent fetal loss in Saudi Arabia // *Hum. Reprod.*—2010.—**25**, N 8.—P. 1900–1905.

Received 02.04.13