

ТЕРПИЛЯК О. І.[✉], ЗАСТАВНА Д. В., СОСНІНА К. О.

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,

Україна, 79008, м. Львів, вул. Лисенка, 31а, e-mail: root@ihp.lviv.ua

✉ oresta.terp@gmail.com, (067) 951 32 40

ВИВЧЕННЯ HLA-МАРКЕРІВ СХИЛЬНОСТІ ДО ЦЕЛІАКІЇ У ЖІНОК З НАВИКОВИМ НЕВИНОШУВАННЯМ ВАГІТНОСТІ

Мета. Целіакія – мультифакторна хвороба з високою генетичною предрисповицією, яка асоціюється порушеннями репродуктивного здоров'я у жінок. Метою роботи було дослідити наявність *HLA-DQ2.5* (*HLA-DQA1*05:01 + HLA-DQB1*02*) та *HLA-DQ8* (*HLA-DQB1*03:02*) генотипів схильності до целіакії у жінок із навиковим невиношуванням вагітності. **Методи.** PCR-SSP (polymerase chain reaction with sequence-specific primers). **Результати.** Підвищений ризик навикового невиношування вагітності у жінки асоціюється з *DQ2.5* – генотипом предрисповиції до целіакії ($\chi^2=4,35$, $P<0,05$). Показник OR засвідчує, що ризик навикового невиношування вагітності за наявності генотипу *DQ2.5* у жінок зростає у 4-и рази. **Висновки.** Вивчення HLA-маркерів схильності до целіакії у жінок із репродуктивними втратами надзвичайно важливе та має велике значення для прекоцепційної профілактики навикового невиношування вагітності.

Ключові слова: целіакія, навикове невиношування вагітності, HLA-маркери

Відповідно до визначення ВООЗ, навикове невиношування вагітності – ННВ (звичний викидень, повторний спонтанний аборт, рецидивуючий спонтанний аборт, від. англ. *Recurrent Pregnancy Loss*) – визначається як мимовільна втрата трьох або більше вагітностей у терміні до 22 тижнів [1]. ННВ спостерігаються в 1–8 % жінок репродуктивного віку [2]. Етіологія ННВ окреслюється такими чинниками: генетичними, анатомічними, ендокринними, інфекційними та імунологічними [3–7]. Також існує поняття «ідіопатичне ННВ», тобто причина невідома, і це стосується 40 % випадків регулярних втрат вагітності [8].

Слід зазначити, що, за останніми даними наукової літератури, приблизно 80 % усіх раніше нез'ясованих випадків повторних втрат вагітності за більш детального дослідження окреслюються як «імунонепліддя» [9, 10], тобто

імунона система, яка еволюційно призначена для розпізнавання й елімінації чужорідних антигенів, неадекватно реагує на плід і «запускає» імуноні чинники на знищення вагітності [9, 11, 12]. Відомо, що основним механізмом, який забезпечує нормальний перебіг вагітності, є імунона толерантність, тобто пригнічення імуноної відповіді вагітної жінки на антигени плода за збереження імуноної реактивності на інші чужорідні субстанції. Існує низка механізмів, які здатні підтримувати імунона толерантність матері під час вагітності. Зокрема, відсутність на трофобласті класичних HLA антигенів класу I та II забезпечує зниження імуноної відповіді матері на плід [13]. Під час вагітності змінюється співвідношення субпопуляцій клітин-хелперів Th1/Th2-типу з метою продукування ними низки специфічних цитокінів, зокрема таких, як ІЛ-2, ФНП-6, ІФН- γ , ІЛ-4, ІЛ-10, роль яких полягає в аутокринному регулюванні процесів проліферації та диференціації, зокрема і клітин плода [14, 15]. Зміни цих механізмів призводять до порушень репродуктивної функції та до репродуктивних втрат.

Імуноні порушення, що ведуть до відторгнення ембріона/плода можна поділити на аутоімуноні і аллоімуноні. За аллоімуноних порушень імунона відповідь жінки спрямована проти антигенів ембріона, отриманих від батька, оскільки вони є потенційно чужорідними для організму матері. На сьогодні до аллоімуноних процесів, що призводять до відторгнення плода, відносять: підвищений рівень гомології за HLA-антигенами між чоловіком та жінкою, активацію окремих складових вродженого імунониту, зокрема НК- та НКТ-клітин у жінки, та пов'язане з цим посилення цитотоксичної реактивності матері на тканини зародка. Така активація цитотоксичності зазвичай зумовлена генетично детермінованою зниженою активністю клітин-супресорів (Ts) [16]. За аутоімуноних процесів мішенню для агресії імуноної системи стають власні тканини материнського організму

і, як результат, накопичення в організмі аутоантитіл, циркуляція яких ускладнює перебіг вагітності [3]. З аутоімунних порушень, які спричиняються до репродуктивних втрат, загальнови-знаними є, зокрема, антифосфоліпідний синдром, системний червоний вовчак та аутоімунний тиреоїдит [17].

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 гліадінової фракції глютену). Хвороба супроводжується ентеропатією, діареєю, присутністю в крові циркулюючих аутоантитіл. У хворих целиакією відзначають анорексію, зниження щільності кісткової тканини, нез'ясований дефіцит заліза, лімфому. Окрім цього, целиакія часто ускладнюється рядом ендокринних порушень, зокрема інсулін-залежним діабетом, аутоімунним тиреоїдитом, множинними грандулярними ендокринопатіями [18, 19].

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 [20]. У зрілому віці целиакія у жінок призводить до порушення репродуктивної функції, зокрема непліддя нез'ясованого генезу [21], передчасного переривання вагітності, завмирання вагітності, ендометріозу. У жінок зі целиакією часто відзначають запізниле менархе, ранню менопаузу, що, в свою чергу, призводить до скорочення часу фертильності чи вторинної аменореї [22–27].

За визначенням, целиакія – це мультифакторна хвороба з високою генетичною предрисункією. Однозначне діагностування целиакії передбачає біопсію ворсин кишківника у пацієнта з наступними гістологічними дослідженнями. Ще одним маркером хвороби є наявність антитканинних антитіл (IgA) до трансглютамінази та ендомізіуму. Генетично зумовлена схильність до целиакії окреслюється специфічним алельним поліморфізмом *DQA1* та *DQB1* – генів головного комплексу гістосумісності II-го класу [20, 28–30]. До 95 % пацієнтів із встановленою целиакією несуть *DQ2.5* гетеродимер, що кодується *DQA1*05* та *DQB1*02* алелями як в транс-

так і в цисконфігурації (позиції), а у решти 5–10 % наявна молекула *DQ8*, що кодується *DQB1*03:02* переважно в комбінації з *DQA1*03* алельним варіантом [20, 28]. При цьому слід наголосити, що наявність в індивіда вищенаведених генотипів не передбачає однозначного ризику розвитку хвороби, проте їх відсутність свідчить про майже 100 % виняток целиакії.

Метою роботи було дослідити наявність *HLA-DQ2.5* (*HLA-DQA1*05:01* + *HLA-DQB1*02*) та *HLA-DQ8* (*HLA-DQB1*03:02*) генотипів у жінок із навиковим невиношуванням вагітності.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження була ДНК, виділена з периферичної крові жінок, які звернулися для медико-генетичного консультування у Львівський міжобласний медико-генетичний центр. Усього обстежено 267 жінок із ННВ, які мимовільно втрачали 2–3-разово і більше вагітність до 14-и тижнів. При цьому причина не була встановлена; здорових народжених дітей на час обстеження вони не мали. Контрольну групу склали 33 жінки без репродуктивних втрат в анамнезі, у яких було не менше 2-х здорових дітей.

ДНК з лейкоцитів периферійної крові виділяли методом висолування [31].

Типування алелів *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). Для внутрішнього контролю використовували фрагмент величиною 350 п. н. гена альбуміну людини. Перелік алелів та їх поєднання подані в таблиці 1 та 2 відповідно. Праймери синтезувала фірма «Neogen» (м. Київ, Україна), умови реакції узгоджувалися інструкціями фірми-виробника.

Типування алелів базувалося на присутності або відсутності ПЛР-продукту, який реєструвався за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі, забарвленому бромистим етидієм в УФ-світлі за довжини хвилі 302 нм. За наявності або відсутності специфічного фрагмента ампліфікації певного розміру (табл. 1) відповідної алель-специфічної або групо-специфічної суміші праймерів проводили типування відповідних алелів.

Таблиця 1. Перелік алельних варіантів *HLA-DQA1* та *HLA-DQB1*

| №№ Мікс | Алельні варіанти, що ампліфікуються | Розмір ПЛР-продукту |
|---------|-------------------------------------|---------------------|
| 1 | <i>DQA1*05:01</i> | 186 п.н. |
| 2 | <i>DQB1*02:01-02:03</i> | 205 п.н. |
| 3 | <i>DQB1*03:02</i> | 120 п.н. |

Таблиця 2. Поєднання алельних варіантів, що асоціюються з ризиком розвитку целиації

| Алельні варіанти | DQ – генотип | Ступінь ризику целиації |
|---------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| <i>DQA1*05:01+DQB1*02, DQB1*03:02</i> | <i>DQ2.5 + DQ8</i> | високий |
| <i>DQA1*05:01+DQB1*02</i> | <i>DQ2.5</i> | середньо-високий |
| <i>DQB1*03:02</i> | <i>DQ8</i> | низький |

Результати та обговорення

У результаті проведених досліджень було встановлено розподіл алелів *DQA1*05:01*, *DQB1*02* та *DQB1*03:02* у дослідній групі жінок із ННВ у порівнянні з контрольною групою жінок. У таблиці 3 представлено розподіл та частоту DQ-генотипів, відповідальних за целиацію у дослідній та контрольній групах.

Як видно з представлених результатів (табл. 3), майже 80 % (78,79 %) репродуктивно здорових жінок (контрольна група) не несуть жодного з целиакійних генотипів. У групі жінок із ННВ відсутній целиакійний генотип тільки у половини жінок (53,56 %). Статистичні обрахунки засвідчили вірогідно значуще підвищення частоти жінок із целиакійним генотипом у групі ННВ у порівнянні з контролем за показників $\chi^2=7.6$ і $P<0,01$.

Як зазначено вище, целиакійні генотипи нами були поділені на такі генотипи: високого ступеня ризику з алельним варіантом *DQA1*05:01+DQB1*02, DQB1*03:02*, що відповідає генотипу *DQ2.5 + DQ8*; середньо-високого ступеня ризику з алельним варіантом *DQA1*05:01+DQB1*02*, що відповідає генотипу *DQ2.5*; низького ступеня ризику з алельним варіантом *DQB1*03:02*, що відповідає генотипу *DQ8*. Згідно із цим поділом, як видно з таблиці 3, жінки з ННВ вірогідно значуще не відрізняються від контрольної групи за целиакійними

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 більш ніж 20 % жінок із ННВ за контрольних показників 6 %. Статистичні обрахунки показали вірогідно значуще підвищення цього генотипу за ННВ у порівнянні з контролем: $\chi^2=4,35$, $P<0,05$. Показник OR (коефіцієнт шансів) засвідчує, що ризик навикового невиношування вагітності за наявності генотипу *DQ2.5* у жінок зростає у 4-и рази.

У підсумку ми схилиємося до думки, що ризик ННВ у жінки асоціюється з окресленими HLA-маркерами головного комплексу гістосумісності II класу, а саме *DQA1*05:01+DQB1*02*-генотипом. Враховуючи те, що цей HLA-генотип загально визнано як *DQ2.5*-генотип предиспозиції до целиації, можна передбачити ключову роль аутоімунного процесу, запущеного целиацією, в генезі регулярних репродуктивних втрат. Вважаємо, що подібні дослідження є вкрай важливими, особливо, якщо врахувати (і це показано у багатьох дослідженнях [24, 25, 32]), що безглютенна дієта як профілактика целиації може значною мірою вирішити проблему репродуктивного здоров'я жінки.

Таблиця 3. Розподіл та частота DQ-генотипів серед жінок із ННВ

| DQ-генотип | Контрольна група, N=33 | | Дослідна група, N=267 | | χ^2 | P | OR (CI95%) |
|------------------|------------------------|-------|-----------------------|-------|-------------|-------|-------------------|
| | 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) |

Висновки

1. Встановлено підвищений ризик навикого невиношування вагітності у жінок в асоціації з наявністю в них *DQ2.5*-генотипу предиспозиції до целіакії.

2. HLA-генотипування за репродуктивних втрат у жінок має велике практичне значення для прекоцепційної профілактики навикого невиношування вагітності.

References

- Hachem H., Crepaux V., May-Panloup P., Descamps P., Legendre G., Bouet P.E. Recurrent pregnancy loss: Current perspectives. *Int. J. Womens. Health*. 2017. Vol. 9. P. 331–345. doi: 10.2147/IJWH.S100817.
- Van Den Berg M.M.J., Vissenberg R., Goddijn M. Recurrent Miscarriage Clinics. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 2014. Vol. 41 (1). P. 145–155. doi: 10.1056/NEJMc1005330.
- Cervera R., Balasch J. Autoimmunity and recurrent pregnancy losses. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2010. Vol. 39 (3). P. 148–52. doi: 10.1007/s12016-009-8179-1.
- Li T.C., Makris M., Tomsu M., Tuckerman E., Laird S. Recurrent miscarriage: Aetiology, management and prognosis. *Hum. Reprod. Update*. 2002. Vol. 8 (5). P. 463–481. doi: 10.1093/humupd/8.5.463.
- Rull K., Nagiraj L., Laan M. Genetics of recurrent miscarriage: Challenges, current knowledge, future directions. *Front. Genet.* 2012. Vol. 3. P. 20894. doi: 10.3389/fgene.2012.00034.
- Hyde K.J., Schust D.J. Genetic considerations in recurrent pregnancy loss. *Cold Spring Harb. Perspect Med.* 2015. Vol. 5 (3). P. 20894. doi: 10.1101/cshperspect.a023119.
- Suzumori N., Sugiura-Ogasawara M. Genetic Factors as a Cause of Miscarriage. *Curr. Med. Chem.* 2012. Vol. 17 (29). P. 3431–3437. doi: 10.2174/092986710793176302.
- Imam S.N., Shamsi M.B., Kumar K., Deka D. Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss: Role of Paternal Factors; A Pilot Study. *Journal of reproduction and infertility*. 2011. P. 20894.
- Gilman-Sachs A., Kwak-Kim J., Beaman K.D., Jaiswal M.K., Mallers T.M., Ntrivalas E. Immune Etiology of Recurrent Pregnancy Loss and Its Diagnosis. *Am J. Reprod. Immunol.* 2012. Vol. 67 (4). P. 319–325. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01118.x.
- Matthiesen L., Kalkunte S., Sharma S. Multiple Pregnancy Failures: An Immunological Paradigm. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2012. Vol. 67 (4). P. 334–340. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01121.x.
- Christiansen O.B., Kolte A.M., Larsen E.C., Nielsen H.S. Immunological causes of recurrent pregnancy loss. *Recurrent Pregnancy Loss Evidence-Based Eval Diagnosis Treat* 2016. P. 75–88. doi: 10.1007/978-3-319-27452-2_6.
- Hyde K.J., Andelin C.O., Schust D.J. Immunology of Isolated and Recurrent Spontaneous Pregnancy Loss. *Glob Libr Women's Med.* 2014. P. 22281–22337. doi: 10.3843/GLOWM.10320.
- 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.
- 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.
- Al-Shamali E., Ashkanani L., Makhseed M., Omu A., Azizieh F., Raghupathy R. Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. *Hum. Reprod.* 2002. Vol. 16 (10). P. 2219–2226. doi: 10.1093/humrep/16.10.2219.
- Dawood F., Farquharson R.G., Stephenson M.D. Investigation of recurrent miscarriage. *Early Pregnancy*. 2010. P. 59–66. doi: 10.1017/CBO9780511777851.008.
- Choudhury S.R. Human reproductive failure II: Immunogenetic and interacting factors. *Hum. Reprod. Update* .2004. Vol. 7 (2). P. 135–160. doi: 10.1093/humupd/7.2.135.
- Freeman H.J. Endocrine manifestations in celiac disease. *World J. Gastroenterol.* 2016. Vol. 22 (38). P. 8472–8479. doi: 10.3748/wjg.v22.i38.8472.
- Levy J., Bernstein L., Silber N. Celiac Disease: An Immune Dysregulation Syndrome. *Curr. Probl. Pediatr Adolesc Health Care*. 2014. Vol. 44 (11). P. 324–327.
- Megiorni F., Pizzuti A. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: Practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of Biomedical Science*. 2012. Vol. 19(1). P. 254–8. doi: 10.1186/1423-0127-19-88.
- Lal S., Singh P., Arora S., Strand T.A., Makharia G.K. Celiac Disease in Women With Infertility. *J. Clin. Gastroenterol.* 2015. Vol. 50 (1). P. 33–39. doi: 10.1097/mcg.0000000000000285.
- Soni S., Badawy S.A. Celiac Disease and Its Effect on Human reproduction: A Review. *J. Reprod. Med.* 2010. Vol. 55 (1–2). P. 3–8.
- Casella G., Orfanotti G., Giacomantonio L., Bella C. Di, Crisafulli V., Villanacci V., Baldini V., Bassotti G. Celiac disease and obstetrical-gynecological contribution. 2016. Vol. 9 (4). P. 241–249.
- Santonicola A., Iovino P., Cappello C., Capone P., Andreozzi P., Ciacci C. From menarche to menopause: The fertile life span of celiac women. *Menopause*. 2011. Vol. 18 (10). P. 1125–1130. doi: 10.1097/gme.0b013e3182188421.
- Castellani R., Di Simone N., Fattorossi A., de Waure C., De Spirito M., Tersigni C., Gasbarrini A., Scambia G. Celiac disease and reproductive disorders: meta-analysis of epidemiologic associations and potential pathogenic mechanisms. *Hum. Reprod. Update*. 2014. Vol. 20 (4). P. 582–593. doi: 10.1093/humupd/dmu007.

26. 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.
27. Ozgur B., Selimoglu M.A. Coeliac disease and reproductive disorders. *Scand. J. Gastroenterol.* 2010. Vol. 45 (4). P. 395–402. doi: 10.3109/0036552090350890.
28. Stankovič B., Radlovič N., Lekovič Z., Ristič D., Radlovič V., Nikievič G., Kotur N., Vujičević K., Kostić T., Pavlovič S., Zukić B. HLA genotyping in pediatric celiac disease patients. *Bosn J. Basic Med. Sci.* 2015. Vol. 14 (3). P. 171–176. doi: 10.17305/bjms.2014.3.28.
29. Biagi F., Marchese A., Bianchi P.I., Trotta L., Corazza G.R., De Silvestri A., Badulli C., Vattiato C., Martinetti M. Influence of HLA-DQ2 and DQ8 on Severity in Celiac Disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 2011. Vol. 46 (1). P. 46–50. doi: 10.1097/mcg.0b013e318221077e.
30. Effelsberg N.M., Thiel J., Driever S., Neagu M., Salzer U., Koehn C., Warnatz K., Voll R.E., Goldacker S., Kollert F., Rizzi M., Venhoff N., Kreisel W., Emmerich F. The Role of HLA DQ2 and DQ8 in Dissecting Celiac-Like Disease in Common Variable Immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* 2013. Vol. 33 (5). P. 909–916. doi: 10.1007/s10875-013-9892-3.
31. Makukh H.V., Zastavna D.V., Tyrkus M.J., Tretiak B.I., Chorna L.B. Sposib vydilennia DNK z leikocytiv peryferijnoi krov: pat. 32044 Ukraina: MPK G01N33/49 (2006.01); No. u200801896; appl. 14.02.2008; publ. 25.04.2008, bul. No. 8. [in Ukrainian] / Макух Г.В., Заставна Д.В., Тиркус М.Я. Третяк Б.І., Чорна Л.Б. Пат. 32044 UA, МПК G01N33/49 (2006.01) Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові / заявник ДУ «Інститут спадкової патології АМНУ». № u200801896, заявл. 14.02.2008, опубл. 25.04.2008, бюл. № 8.
32. Peterson M., Grossman S. Managing celiac disease for women implications for the primary care provider. *Gastroenterol. Nurs.* 2016. Vol. 39 (3). P. 186–194. doi: 10.1097/SGA.0000000000000197.

TERPYLIAK O. I., ZASTAVNA D. V., SOSNINA K. O.

*State Institution "Institute of Hereditary Pathology NAMNS of Ukraine",
Ukraine, 79008, Lviv, M. Lysenko str., 31a, e-mail: oresta.terp@gmail.com*

THE STUDY OF HLA MARKERS SUSCEPTIBILITY TO CELIAC DISEASE IN WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS

Aim. Celiac disease (CD) is a multifactorial pathology with high genetic predisposition, and is associated with reproductive health disorders in women. The purpose of the study was to investigate the presence of *HLA-DQ2.5 (HLA-DQA1 * 05:01 HLA-DQB1 * 02)* and *HLA-DQ8 (HLA-DQB1 * 03:02)* genotypes of predisposition to CD in women with recurrent pregnancy loss. **Methods.** PCR-SSP (polymerase chain reaction with sequence-specific primers). **Results.** The increased risk of recurrent pregnancy loss in women is associated with DQ2.5 - the pre-disposition genotype for CD ($\chi^2=4.35$, $P<0,05$). Calculation of odds ratio (OR) showed more than 4-fold increase in recurrent pregnancy loss risk in women with HLA-DQ2.5 genotype. **Conclusions.** The study of HLA markers of celiac disease in women with reproductive loss is important for the purpose of preconceptional prevention of recurrent pregnancy loss. **Keywords:** celiac disease, recurrent pregnancy loss, HLA markers.