

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

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,

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

[✉] katja.sosnina@gmail.com, (099) 090-04-09

KIR-HLAC ГЕНОТИПУВАННЯ У ПОДРУЖНІХ ПАР ІЗ РАННІМИ РЕПРОДУКТИВНИМИ ВТРАТАМИ НЕЗ'ЯСОВАНОГО ГЕНЕЗУ

Мета. Провести KIR-HLAC генотипування у подружніх пар із ранніми ідіопатичними втратами вагітності. **Методи.** Виділення ДНК з лейкоцитів методом висолування, ПЛР (PCR-SSP), електрофорез в агарозному гелі. **Результати.** Проаналізовано спектр KIR генів та встановлено частоту KIR генотипів у жінок із ранніми репродуктивними втратами. Найчастіше (у 77,78 %) трапляється AB генотип, у 20,37 % встановлено AA генотип, у 1,85 % обстежених виявлено BB генотип. HLAC-генотипування подружніх пар із регулярними ранніми репродуктивними втратами засвідчило генотип C1/C2 гена HLAC у 40,74 % обстежених жінок та 44,44 % – у чоловіків. Частота генотипу C1/C1 у жінок склала 27,78 % проти 38,89 % у чоловіків. Генотип C2/C2 гена HLAC детектовано у 31,48 % жінок та у 12,96 % чоловіків. За результатами аналізу KIR-HLAC генотипування подружніх пар із ранніми репродуктивними втратами встановлено високий / значний ризик репродуктивних втрат імунологічного генезу у 55,56 % випадків. **Висновки.** Генотипування KIR-HLAC – це генетичний тест, який дозволяє оцінити ризики відторгнення плоду материнською імунною системою, що допоможе коректно скерувати медичні втручання для збереження вагітності.

Ключові слова: ранні репродуктивні втрати, KIR, HLAC.

Вагітність – це унікальний імунологічний стан, за якого батьківські антигени головного комплексу гістосумісності здатні виживати у материнському середовищі без відторгнення. Материнсько-плодова толерантність починається на матковому рівні, а успішна адаптація до плоду відбувається після складного імунологічного процесу. Чисельні дослідження показали, що зміни в механізмах імунорегуляції материнської відповіді на плід можуть бути причиною повторних викиднів, порушень імплантації та жіночого безпліддя [1–3]. Важливу роль у цьому

процесі відіграє взаємодія між імуноглобуліно-подібними рецепторами (KIRs), експресованими матковими природними кілерами (uNK), та їх лігандами HLA-C, які експресуються клітинами екстраторсинчастого трофобласту плода [2–5].

KIRs (від англ. killer cell immunoglobulin-like receptor) – трансмембранні глікопротеїни з двома або трьома позаклітинними імуноглобуліноподібними доменами (KIR2D і KIR3D відповідно) і довгою (L) або короткою (S) цитоплазматичною ділянкою. KIRs з довгою (L) цитоплазматичною ділянкою під час взаємодії з відповідними HLA-C-лігандами генерують інгібуючий сигнал на NK-клітину, а KIRs з короткою (S) цитоплазматичною ділянкою під час взаємодії з відповідними лігандами HLA-C генерують активуючий сигнал NK-клітинам [2].

KIR-локус містить родину поліморфних і високогомологічних генів, розташовану на короткому плечі хромосоми 19 (19q13.4), і займає ділянку протяжністю 100–200 т. п. н. лейкоцитарного рецепторного комплексу – LRC. На сьогодні ідентифіковано 18 KIR генів. Репертуар генів KIR характеризується високим міжіндивідуальним поліморфізмом. Це, в свою чергу, зумовлює велику різноманітність KIR-гаплотипів. KIR-гаплотипи поділені на дві групи: А та В, які відрізняються між собою передусім кількістю генів, які кодують активуючі KIR-рецептори. Гаплотипи групи А містять тільки один активаційний ген KIR2DS4, у той час як гаплотипи групи В містять різні комбінації активаційних генів KIR. Ці групи гаплотипів формують три генотипи за генами KIR: AA, AB та BB. Слід також зазначити, що серед KIR-генів є так звані «рамкові», або структурні гени, зокрема 2DL4, 3DL2, 3DL3; вони не експресуються та присутні у всіх гаплотипах [2, 4].

Основними лігандами, як вже зазначено вище, для KIRs є антигени HLAC. Це єдині класичні антигени HLA I класу, які експресуються клітинами екстраторсинчастого трофобласту плоду. Ідентифіковано приблизно 4000 алелей

гена *HLA-C*. Кожен *HLA-C* алотип (алельний варіант) належить до однієї з двох груп лігандів, що відрізняються диморфізмом в позиції 80 α -спіралі. Молекули *HLA-C* з аспарагіном (Asn) у позиції 80 належать до групи *HLA-C1*, а ті, що мають амінокислоту лізин (Lys) у 80-ій позиції, належать до групи *HLA-C2*. Кожна із цих груп *HLA-C*-лігандів здатна розпізнавати і зв'язувати певні рецептори NK-клітин, умовно кажучи, для кожної групи *HLA-C* тропними є свої KIRs. З боку KIRs за таку взаєморозпізнаваність відповідає позиція 44 у домені D1 KIR [1, 4].

Деталізуючи причинно-наслідковий ефект від поєднання окремих KIRs зі своїми *HLA-C*-лігандами, слід наголосити на різних ефектах від такого поєднання. Для прикладу, KIR2DL1 – інгібіторний рецептор – зазвичай зв'язується з *HLA-C2* – лігандом, у той час як інший інгібіторний рецептор KIR2DL2 / 2DL3 зазвичай зв'язується з лігандом *HLA-C1*. При цьому відомо, що інгібуючий сигнал, викликаний взаємодією KIR2DL2 / 2DL3 + *HLA-C1*, є відносно слабшим у порівнянні з тим, який викликаний взаємодією KIR2DL1 + *HLA-C2*. У продовження вище сказаного, активуючий рецептор KIR2DS1 (аналогічно до вже представленого інгібуючого аналога KIR2DL1) зв'язується з *HLA-C2*-лігандом, а інший активуючий рецептор 2DS2 (аналогічно до описаного вище інгібуючого аналога KIR2DL2 / 2DL3) зв'язується з *HLA-C1*-лігандом. Водночас описані комбінації мають значно сильніший ефект у випадку наявності в описаній комбінаториці інгібіторних рецепторів (KIR2DL1, 2DL2/3) у порівнянні з наявністю в ідентичних (KIR+*HLA-C*) комбінаціях активуючих рецепторів (KIR2DS1, 2DS2), іншими словами, в особі за наявності таких комбінацій інгібування NK клітин буде переважати над їх активуванням [4].

Чисельні дослідження показали, що певні комбінації KIR та *HLA-C* збільшують ризик ускладнень за вагітності [4,6–8]. Оскільки KIR та *HLA-C* є високополіморфними, кожна вагітність буде характеризуватися специфічними комбінаціями материнського варіанта KIR та *HLA-C* плоду. Генотипування KIR та *HLA-C* дозволяє визначити, чи є сумісність між матковими рецепторами KIR та батьківськими *HLA-C*-лігандами, представленими ембріоном. Якщо так, процес материнсько-плодової толерантності буде розвиватися правильно і вагітність пролонгуватиме без ускладнень. В іншому випадку, якщо такої сумісності між ембріональними ре-

цепторами *HLA-C* та KIR матки немає, виникає небезпека затримки розвитку плоду. Для розвитку вагітності також важливим є і материнський *HLA-C* генотип, оскільки він може впливати на репертуар та функції uNK клітин шляхом взаємодії материнських KIRs з її власними молекулами *HLA-C* під час розвитку NK-клітин. Такий процес отримав назву «ліцензування» або «формування» (від англ. «licensing» or «formation») [5].

Отже, генотипування KIR-*HLA-C* – це генетичний тест, який дозволяє оцінити ризики відторгнення плоду материнською імунною системою, що допоможе коректно скерувати медичні втручання для збереження вагітності. Виходячи з цього, **метою** нашого дослідження було провести KIR-*HLA-C* генотипування у подружніх пар із ранніми ідіопатичними втратами вагітності.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження була ДНК, виділена з периферичної крові подружніх пар, які звернулися для медико-генетичного консультування у Львівський міжобласний медико-генетичний центр із приводу ідіопатичного непліддя. Всього обстежено 54 подружні пари з повторними ранніми репродуктивними втратами нез'ясованого генезу.

ДНК з лейкоцитів периферичної крові виділяли методом висолювання [9]. KIR-*HLA-C* типування проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з алель специфічними праймерами (від англ. PCR-SSP polymerase chain reaction with sequence-specific primers) [10]. Типування генів ґрунтувалося на присутності або відсутності ПЛР-продукту, який рееструвався за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі, забарвленому бромистим етидієм в УФ-світлі за довжини хвилі 302 нм. Праймери синтезувала фірма «Neogen» (м. Київ, Україна).

Результати та обговорення

Обстежувана група налічувала 54 подружні пари з діагнозом ранні репродуктивні втрати (РРВ) і характеризувалася 2-разовими і більше втратами вагітності нез'ясованого генезу в терміні до 12 тижнів. За попереднього обстеження цих пар була виключена анатомічна, ендокринна, андрогенна та інфекційна компоненти, тобто причина регулярних репродуктивних втрат не встановлена, а діагноз окреслюється як «ідіопатичне непліддя». Враховуючи те, що у

45 % рання ідіопатична втрата вагітності супроводжується материнською імунною інтолерантністю, нам видавалося небезпідставним KIR-HLAC генотипування цих пар.

На першому етапі роботи було окреслено репертуар KIR генів у групі жінок із регулярними ранніми репродуктивними втратами. Всього досліджено 14 KIR генів: 8 інгібіторних: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3 та 6 активаційних: 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DS1.

Отримані результати представлені на рисунку. Як видно із рисунка, репертуар KIR-генів окреслюється 33-а різними комбінаціями (гаплотипами). Найчастіше (у 13 % обстежених жінок) окреслена така комбінація KIR-генів: 2DL1, 2DL3, 3DL1, 2DS4, 2DL4, 3DL2-, 3DL3. Ця комбінація окреслюється як AA генотип. Дещо рідше (в 11 % жінок) встановлено наявність усіх досліджуваних генів, окрім одного активаційно-

го 2DS5-гена, і така комбінація окреслюється як AB генотип. В однієї із обстежуваних 54 жінок встановлена присутність усіх 14 обстежуваних KIR генів, що також окреслюється як AB генотип.

Зведені результати щодо частоти та розподілу KIR-генотипів у групі обстежуваних жінок представлено у таблиці 1.

Як видно із табл. 1, найчастіше (у 77,78 %) трапляється AB генотип; в 11 жінок із 54 обстежених (20,37 %) встановлено AA генотип, і тільки в однієї жінки із 54 (1,85 %) обстежених встановлено BB генотип. Принагідно слід зазначити, що, згідно з науковими літературними даними [11], AA генотип асоційований із високим ризиком репродуктивних невдач.

Наступним етапом роботи було HLAC-генотипування у групі подружніх пар із ранніми регулярними втратами вагітності. Отримані результати представлені у таблиці 2.

№	KIR генотип	A гаплотип				B гаплотип				Структурні гени			Кількість		
		2DL1	2DL3	3DL1	2DS4	2DL2	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	3DS1		2DL4	3DL2
1	AA														7
2	AA														2
3	AA														1
4	AA														1
5	AB														1
6	AB														6
7	AB														2
8	AB														1
9	AB														1
10	AB														1
11	AB														1
12	AB														1
13	AB														2
14	AB														1
15	AB														1
16	AB														1
17	AB														1
18	AB														1
19	AB														1
20	AB														2
21	AB														2
22	AB														2
23	AB														1
24	AB														2
25	AB														2
26	AB														1
27	AB														2
28	AB														1
29	AB														1
30	AB														1
31	AB														2
32	AB														1
33	BB														1

Рис. Розподіл KIR-генів та генотипів у жінок із PPB.

Як видно із табл. 2, у жінок та чоловіків досліджуваної групи з найвищою частотою траплявся генотип *C1/C2* гена *HLAC* (40,74 % та 44,44 % відповідно). Частота генотипу *C1/C1* у жінок була дещо нижчою у порівнянні з чоловіками (27,78 % проти 38,89 %). Генотип *C2/C2* гена *HLAC* детектовано у 31,48 % жінок, що удвічі частіше у порівнянні з чоловіками (12,96 %). Згідно з науковими літературними даними [8, 12], генотип *C2/C2* зазвичай асоціюється з високим ризиком репродуктивних втрат, зокрема у чоловіків.

На основі вище представлених результатів генотипування *KIRs* та відповідних *HLAC*-лігандів обчислені ступені ризику репродуктивних втрат в обстежуваній групі подружніх пар. Ризики оцінено як: «високий», «значний», «незначний» та «низький». До групи з високим ризиком РРВ зачислено подружні пари з *AA KIR*-генотипом у жінки та переважанням *HLAC2* алелі у подружжя. Група значного ризику РРВ характеризувалася наявністю *AA KIR*-генотипу у жінки та *C2/C2 HL*-генотипу у жінки або у чоловіка. Незначний ризик РРВ охарактеризовано переважанням алелі *C1* в *HLAC*-генотипі у подружжя та наявністю *AB KIR* генотипу у жінки. До групи низького ризику РРВ віднесено под-

ружні пари з *AB/BB KIR*-генотипом у жінки та генотипом *HLA C1/C1* у чоловіка, та *C1/C1* або *C1/C2* у жінки. Результати розподілу досліджуваної групи подружніх пар за ступенем ризику РРВ представлено у таблиці 3.

Як видно з табл. 3, 30 подружніх пар із 54-ох обстежених мають високий / значний ступінь ризику ранніх репродуктивних втрат, зумовлений імунологічним чинником, тобто майже 56 відсотків обстежених пар із попередньо встановленим діагнозом «ідіопатичне непліддя» можна зачислити до пар із несприятливим поєднанням генотипів *KIRs* у жінки та *HLAC*-генотипів у жінки / чоловіка. Згідно із загально визначеними рекомендаціями [1], у такому випадку доцільне призначення імуномодулюючого лікування майбутній матері. За використання допоміжних репродуктивних технологій парам, несумісним за генами *KIR-HLAC*, передбачено перенесення одного ембріона (для уникнення впливу на матір подвійного навантаження несумісного *HLAC*-ліганда). У випадках донорства ооцитів або сперми рекомендується відповідність донорського генотипу *HLA-C* та *KIR* матері для забезпечення сумісності матері та плоду [13, 14].

Таблиця 1. Розподіл та частота *KIR*-генотипів у жінок із РРВ

<i>KIR</i> -генотип	Жінки з РРВ, n= 54	
	n	%
<i>AA</i>	11	20,37
<i>AB</i>	42	77,78
<i>BB</i>	1	1,85

Таблиця 2. Частота та розподіл генотипів та алелей гена *HLAC* у подружніх пар із РРВ

<i>HLAC</i> -генотипи	Жінки, n=54		Чоловіки, n=54	
	n	%	n	%
<i>C1/C1</i>	15	27,78	21	38,89
<i>C1/C2</i>	22	40,74	24	44,44
<i>C2/C2</i>	17	31,48	9	12,96
Алелі				
<i>C1</i>	52	48,15	66	61,11
<i>C2</i>	56	51,85	42	38,89

Таблиця 3. Розподіл та частота ризиків щодо ранніх репродуктивних втрат

Ризик РРВ	Подружні пари з РРВ (n=54)	
	n	%
високий	5	9,26
значний	25	46,30
незначний	13	24,07
низький	11	20,37

Висновки

1. Проведено *KIR-HLAC* генотипування в групі подружніх пар із регулярними ранніми ідіопатичними втратами вагітності.

2. Проаналізовано спектр *KIR* генів та встановлено частоту *KIR* генотипів у жінок із ранніми репродуктивними втратами. Найчастіше (у 77,78 %) трапляються *AB* генотип, в 11 жінок із 54 обстежених (20,37 %) встановлено *AA* генотип, у 1,85 % обстежених встановлено *BB* генотип.

3. *HLAC*-генотипування подружніх пар із регулярними ранніми репродуктивними втрата-

ми засвідчило генотип *C1/C2* гена *HLAC* у 40,74 % обстежених жінок та 44,44 % чоловіків. Частота генотипу *C1/C1* у жінок склала 27,78 % проти 38,89 % у чоловіків. Генотип *C2/C2* гена *HLAC* детектовано у 31,48 % жінок та у 12,96 % чоловіків.

4. За результатами аналізу *KIR-HLAC* генотипування подружніх пар із ранніми репродуктивними втратами встановлено високий / значний ризик репродуктивних втрат імунологічного ґенезу у 55,56 % випадків.

References

- Singh M., Rajak J., Kadam S. B., Rajadhyaksha S. Alloimmunization and Role of HLA in Pregnancy. *Complicat Pregnancy*. Published online. 2019. doi: 10.5772/intechopen.84211.
- Yeung H.Y., Dendrou C.A. Pregnancy Immunogenetics and Genomics: Implications for Pregnancy-Related Complications and Autoimmune Disease. *Annu Rev. Genomics. Hum. Genet.* 2019. Vol. 20. P. 73–97. doi: 10.1146/annurev-genom-083118-014943.
- Alecsandru D., García-Velasco J.A. Immunology and human reproduction. *Curr Opin Obstet. Gynecol.* 2015. Vol. 27 (3). P. 231–234. doi: 10.1097/GCO.0000000000000174.
- Moffett A., Chazara O., Colucci F., Johnson M.H. Variation of maternal KIR and fetal HLA-C genes in reproductive failure: too early for clinical intervention. *Reprod. Biomed. Online.* 2016. Vol. 33 (6). P. 763–769. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.08.019.
- Chazara O., Xiong S., Moffett A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J. Leukoc. Biol.* 2011. Vol. 90 (4). P. 703–716. doi: 10.1189/jlb.0511227.
- Su N., Wang H., Zhang B., Kang Y., Guo Q., Xiao H., Yang H., Liao S. Maternal natural killer cell immunoglobulin receptor genes and human leukocyte antigen-C ligands influence recurrent spontaneous abortion in the Han Chinese population. *Exp. Ther. Med.* 2018. Vol. 15. P. 327–337. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5406>.
- Alecsandru D., García-Velasco J.A. Why natural killer cells are not enough: a further understanding of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen. *Fertil. Steril.* 2017. Vol. 107 (6). P. 1273–1278. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.04.018.
- Dambaeva S., Lee D. H., Sung N., Chen C.-Y., Bao S., Gilman-Sachs A., Kwak-Kim J. Recurrent Pregnancy Loss in Women with Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor KIR2DS1 is Associated with an Increased HLA-C2 Allelic Frequency. Published online. 2016. Vol. 75 (2). P. 94–103. doi: 10.1111/aji.12453.
- Makukh H.V., Zastavna D.V., Tyrkus M.J., Tretiak B.I., Chorna L.B. Sposib vydilennia DNK z leikocytiv peryferijnoi krvi: pat.32044 Ukraina: MPK G01N33/49 (2006.01); No. u200801896; appl. 14.02.2008; publ. 25.04.2008, bul. No 8. [in Ukrainian]
- Tajik N., Shahsavari F., Nasiri M., Radjabzadeh M.F. Compound KIR-HLA genotype analyses in the Iranian population by a ovel PCR-SSP assay. *Int J. Immunogenet.* 2010. Vol. 37 (3). P. 159–168. doi: 10.1111/j.1744-313X.2010.00906.x.
- Akbari S., Shahsavari F., Karami R., Yari F., Anbari K. Recurrent Spontaneous Abortion (RSA) and Maternal KIR Genes: A Comprehensive Meta-Analysis. Published online 2020. 20894. doi: 10.2427/12522.
- Elbaşı M.O., Tulunay A., Karagözoğlu H., Kahraman S., Ekşioğlu-Demiralp E. Maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and paternal human leukocyte antigen ligands in recurrent pregnancy loss cases in Turkey. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 2020. Vol. 47 (2). P. 122–129. doi: 10.5653/CERM.2019.03223.
- Alecsandru D., Garrido N. Maternal KIR haplotype influences live birth rate after double embryo transfer in IVF cycles in patients with recurrent miscarriages and implantation failure. Published online. 2014. 20894. doi: 10.1093/humrep/deu251.
- Franasiak J.M., Scott R.T. Contribution of immunology to implantation failure of euploid embryos. *Fertil. Steril.* 2017. Vol. 107 (6). P. 1279–1283. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.04.019.

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

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

KIR-HLAC GENOTYPING IN MARRIED COUPLES WITH EARLY REPRODUCTIVE LOSSES OF UNKNOWN GENESIS

Aim. *KIR-HLAC* genotyping in married couples with early idiopathic pregnancy loss. **Methods.** DNA extraction and purification, PCR-SSP, agarose gel electrophoresis. **Results.** The spectrum of *KIR* genes was analyzed and the frequency of *KIR* genotypes in women with early reproductive losses was established. The most common (77.78 %) was the *AB* genotype, 20.37 % had the *AA* genotype, and 1.85 % had the *BB* genotype. *HLAC* genotyping of couples

with regular early reproductive losses showed the *C1/C2* genotype of the *HLAC* gene in 40.74 % of women and 44.44 % of men. The frequency of *C1/C1* genotype in women was 27.78% versus 38.89 % in men. The *C2/C2* genotype of the *HLAC* gene was detected in 31.48 % of women and 12.96 % of men. According to the results of *KIR-HLAC* analysis of genotyping of married couples with early reproductive losses, a high/significant risk of reproductive losses of immunological genesis was found in 55.56 % of cases. **Conclusions.** *KIR-HLAC* genotyping is a genetic test that allows to assess the risks of the embryo being rejected by the maternal immune system, and thus to direct medical interventions in order to achieve a successful pregnancy.

Keywords: early reproductive losses, *KIR*, *HLAC*.