

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

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,

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

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

АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ *KIR* ГЕНОТИПУВАННЯ У ЖІНОК З ПОВТОРНИМИ НЕВДАЛИМИ ІМПЛАНТАЦІЯМИ

Мета. Провести аналіз частоти та розподілу *KIR*-генотипів у жінок з повторними невдалими імплантаціями після циклів екстракорпоральних запліднень. **Методи.** Виділення ДНК з лейкоцитів методом висолювання, ПЛР (PCR-SSP), електрофорез в агарозному гелі. **Результати.** Встановлено спектр *KIR* генів та частоту *KIR* генотипів у жінок з повторними втратами вагітності ідіопатичного генезу. Проведено розподіл досліджуваної групи за анамнезом, зокрема виделено групу з 84 жінок діагноз яких окреслюється поняттям «повторні невдалі імплантації». Статистичне опрацювання отриманих результатів з використанням критерію Пірсона (χ^2) вказує на вірогідно нижчу частоту генотипу *KIR-AB* ($\chi^2 = 9,7$; $p < 0,005$) та вірогідно вищу частоту генотипу *KIR-AA* ($\chi^2 = 7,35$; $p < 0,01$) у жінок з повторними невдалими імплантаціями у порівнянні з загальною групою жінок з репродуктивними невдачами. **Висновки.** Враховуючи результати статистичної обробки даних (OR = 2,05; CI 95 %: 1,21-3,45), вважаємо генотип *KIR-AA* фактором значного ризику повторних невдалих імплантацій після ЕКЗ. Визначаємо *KIR*-генотипування, як генетичний тест для оцінки ризику відторгнення плода материнською імунною системою, що допоможе коректно скерувати медичні втручання для збереження вагітності.

Ключові слова: *KIR*-генотипування, повторні невдалі імплантації (ПНІ), екстракорпоральне запліднення (ЕКЗ).

Незважаючи на значний прогрес у сфері допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ), високий відсоток ембріонів (50 %) втрачається одразу після імплантації [1]. Однак найбільш стресовою проблемою з економічної та психологічної точки зору для безплідних жінок є повторна невдала імплантація ПНІ (від англ. *Recurrent Implantation Failure, RIF*), яка вражає 10 %-15 % подружніх пар, яким проведено кілька пересадок ембріонів методом екстракорпора-

льного запліднення (ЕКЗ, від англ. *in vitro fertilization embryo transfers (IVF-ETs)*). ПНІ зазвичай визначаються як три послідовні невдалі спроби завагітніти після циклів ЕКЗ, під час яких відібрані ембріони перенесені жінкам віком до 40 років [2, 3].

Забезпечення толерантності матері до напівалогенного плода регулюється складними імунними механізмами. Клітини екстраворсинчастого трофобласта плода вступають у безпосередній контакт з імунною системою матері в матці. Вони проникають у децидуальну оболонку під час імплантації та під час плацентації, щоб трансформувати артерії та налагодити кровопостачання плаценти. Вважається, що недостатня інвазія трофобласта і судинні зміни в децидуальній оболонці є основним дефектом при повторних втратах вагітності [4].

В імунній системі матки домінують натуральні клітини-кіллери (маткові НК клітини, від англ. *uterine natural killer cells, uNK*), CD56^{bright}CD16⁻, які є найпоширенішою популяцією лейкоцитів протягом першого триместру вагітності. Децидуальні НК клітини мають слабку цитолітичну дію, вони вивільняють цитокіни/хемокіни та фактори росту, які індукують інвазію трофобласта, ремоделювання тканин, ембріональний розвиток та плацентацію [5]. Ці клітини експресують імуноглобуліноподібні рецептори клітин-кіллерів (від англ. *killer cell immunoglobulin-like receptors, KIRs*). Номенклатура *KIR* базується на ключових структурних особливостях білків: кількості позаклітинних імуноглобуліноподібних (Ig) доменів (2D або 3D) і довжині внутрішньо цитоплазматичного хвоста (S і L позначають короткий хвіст і довгий хвіст, відповідно). В свою чергу, довжина цитоплазматичного фрагмента визначає тип функцій НК, опосередкованих певними *KIR*. Активуючі рецептори мають короткий цитоплазматичний фрагмент і позначаються літерою «S». У свою чергу, інгібіторні рецептори мають довгий цитоплазматичний хвіст і позначаються

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

літерою «L». Функція NK-клітин залежить від балансу між активуючими та інгібуючими рецепторами [6].

KIR кодуються кластером генів лейкоцитарного рецепторного комплексу на хромосомі 19q13.4. Гени *KIR* демонструють великий гаплотиповий поліморфізм. Індивідууми відрізняються як кількістю, так і типом (активуючих та інгібуючих) генів *KIR* [7]. Гени *KIR* описуються двома гаплотипами: А і В. Обидва гаплотипи складаються з каркасних генів: *KIR3DL3* на центромерному кінці, *KIR3DL2* на теломерному кінці та *KIR3DP1* і *KIR2DL4* в середині кластера генів *KIR*. Гаплотипи групи А включають гени інгібіторних рецепторів: *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1* та *KIR2DP1*, а також один ген *KIR2DS4* активаційного рецептора, більшість алелів якого у європейській популяції мають делецію зі зсувом рамки зчитування на 22 пари основ в екзоні 5, що призводить до синтезу розчинного білка з одним імуноглобуліноподібним доменом, який не здатний зв'язувати ліганд та виконувати свої функції. Отже, гаплотипи *KIR A* виявляють незначну структурну варіативність або взагалі не відрізняються та кодують рецептори, що пригнічують функцію НК клітин. Гаплотипи *KIR B* демонструють набагато більшу структурну різноманітність у кількості та комбінації генів, які вони містять, але зазвичай мають принаймні один функціональний активуючий *KIR*. Вони можуть включати гени *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL5A/B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* і *KIR3DS1*. Генотип особи з двома копіями гаплотипу А описується як *AA*, тоді як генотип особи з генами гаплотипу В вважається *BB*. Таким чином, генотип *AA* – це набір генів інгібіторних рецепторів. У свою чергу, інтенсивність інгібування зменшується зі збільшенням кількості та експресії генів активації *KIR* у генотипі *BB* [8].

Зважаючи на чисельність та актуальність досліджень [6, 9, 10], щодо внеску *KIR* генотипу жінки у розвиток повторних невдалих імплантацій, **метою** нашого дослідження було провести аналіз частоти та розподілу *KIR*-генотипів у жінок з повторними невдалими імплантаціями після циклів екстракорпоральних запліднень.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження була ДНК, виділена з периферичної крові жінок, які звернулися для медико-генетичного консультування у Львівський міжобласний медико-генетичний

центр з приводу повторних репродуктивних втрат ідіопатичного генезу. Всього обстежено 342 жінки з повторними ранніми репродуктивними втратами нез'ясованого генезу з яких 84 жінки з повторними невдалими імплантаціями після циклів ЕКЗ.

ДНК з лейкоцитів периферійної крові виділяли методом висолювання [11]. *KIR* типування проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з алель специфічними праймерами (від англ. *PCR-SSP polymerase chain reaction with sequence-specific primers*) [12]. Типування генів базувалося на присутності або відсутності ПЛР-продукту, який реєструвався за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі, забарвленому бромистим етидієм в УФ-світлі при довжині хвилі 302 нм. Праймери синтезувала фірма «Neogen» (м. Київ, Україна).

Результати та обговорення

Обстежувана група налічувала 342 жінки з діагнозом повторні репродуктивні втрати (ПРВ) і характеризувалася 2-разовими і більше втратами вагітності нез'ясованого генезу в терміні до 12 тижнів. При попередньому обстеженні цих жінок була виключена анатомічна, ендокринна, андрогенна та інфекційна компонента, тобто причина регулярних репродуктивних втрат не встановлена, а діагноз окреслюється як «ідіопатичне непліддя».

На першому етапі дослідження було окреслено репертуар *KIR* генів в групі жінок з повторними репродуктивними втратами. Всього досліджено 16 *KIR* генів: 8 інгібіторних *2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5 A/B*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*, 6 активаційних *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4f/v*, *2DS5*, *3DS1* та два псевдогени *2DP1* і *3DP1*. В залежності до визначених генів, встановлювали *KIR* гаплотип та генотип. Отримані результати представлені у таблиці 1.

Як видно із таблиці 1, найчастіше (у 71,64 %) зустрічається *AB* генотип, у 95 жінок із 342 обстежених (27,78 %) встановлено *AA* генотип, і лише у двох обстежених жінок (0,58 %) встановлено *BB* генотип.

На наступному етапі дослідження, із загальної групи жінок з повторними репродуктивними втратами було відібрано групу з 84 жінок, що перенесли дві та більше невдалих імплантацій після екстракорпоральних запліднень. Проаналізували частоту та розподіл генотипів *KIR* у даній групі. Результати представлені у таблиці 2.

Таблиця 1. Розподіл та частота KIR генотипів у жінок з повторними репродуктивними втратами

KIR-генотип	Жінки ПРВ, n = 342	
	n	%
AA	95	27,78
AB	245	71,64
BB	2	0,58

Таблиця 2. Розподіл та частота генотипів KIR у жінок з повторними невдалими імплантаціями

KIR-генотип	Жінки з ПНІ, n = 84	
	n	%
AA	33	39,29
AB	49	58,33
BB	2	2,38

Таблиця 3. Аналіз KIR-генотипування серед жінок з повторними репродуктивними втратами та невдалими імплантаціями

KIR-генотип	Жінки з ПНІ, n = 84		Жінки ПРВ, n = 258		χ^2	P	OR (CI 95 %)
	n	%	n	%			
AA	33	39,29	62	24,03	7,35	<0,01	2,05(1,21 - 3,45)
AB	49	58,33	196	75,97	9,7	<0,005	0,44(0,26 - 0,74)
BB	2	2,38	0	0,00	6,18	>0,025	-

Серед жінок з повторними невдалими імплантаціями найбільшою частотою характеризувався KIR AB-генотип, який визначений у 49 жінок з 84 (58,33 %). Частота генотипу AA становила 39,29 %, а генотипу BB – 2,38 %. Отримані результати порівнювали з результатами загальної групи жінок з повторними репродуктивними втратами. Результати представлені у таблиці 3.

Статистичне опрацювання отриманих результатів з використанням критерію Пірсона (χ^2) показало вірогідно нижчу частоту генотипу KIR-AB ($\chi^2 = 9,7$; $p < 0,005$) та вірогідно вищу частоту генотипу KIR-AA ($\chi^2 = 7,35$; $p < 0,01$) у жінок з повторними невдалими імплантаціями у порівнянні з загальною групою жінок з репродуктивними невдачами. Обрахунок коефіцієнта шансів (OR) вказує на збільшення ризику повторних невдалих імплантацій після ЕКЗ у 2,05 рази (OR = 2,05; CI 95 %: 1,21-3,45) при наявності у жінки KIR-AA генотипу.

Враховуючи результати статистичної обробки даних, вважаємо генотип KIR-AA фактором значного ризику повторних невдалих імплантацій після ЕКЗ. Визначаємо KIR-генотипування, як генетичний тест для оцінки ризику відторгнення плода материнською імунною системою, що допоможе коректно скерувати медичні втручання для збереження вагітності.

Висновки

1. За результатами KIR-генотипування встановлено спектр KIR генів та частоту KIR генотипів у жінок з повторними втратами вагітності ідіопатичного генезу. Найчастіше (у 71,64 %) зустрічається AB генотип, у 95 жінок із 342 обстежених (27,78) встановлено AA генотип, у 0,58 % обстежених встановлено BB генотип.

2. Проведено розподіл досліджуваної групи за анамнезом, зокрема вичленено групу з 84 жінок діагноз яких окреслюється поняттям «повторні невдалі імплантації». Аналіз результатів KIR-генотипування показав підвищену частоту генотипу AA у даній групі жінок.

3. Статистичне опрацювання отриманих результатів з використанням критерію Пірсона (χ^2) показало вірогідно нижчу частоту генотипу KIR-AB ($\chi^2 = 9,7$; $p < 0,005$) та вірогідно вищу частоту генотипу KIR-AA ($\chi^2 = 7,35$; $p < 0,01$) у жінок з повторними невдалими імплантаціями у порівнянні з загальною групою жінок з репродуктивними невдачами.

4. Обрахунок коефіцієнта шансів (OR) вказує на збільшення ризику повторних невдалих імплантацій після ЕКЗ у 2,05 рази (OR = 2,05; CI 95 %: 1,21-3,45) при наявності у жінки KIR-AA генотипу.

References

1. 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. P. 1273–1278. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.04.018.
2. Somigliana E., Vigano P., Busnelli A., Paffoni A., Vegetti W., Vercellini P. Repeated Implantation Failure at the Crossroad Between Statistics, Clinics and Over-Diagnosis. *Reprod. BioMed Online.* 2018. Vol. 36. P. 32–38. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.09.012.
3. Busnelli A., Reschini M., Cardelicchio L., Vegetti W., Somigliana E., Vercellini P. How Common is Real Repeated Implantation Failure? An Indirect Estimate of the Prevalence. *Reprod. BioMed Online.* 2020. Vol. 40. P. 91–97. doi: 10.1016/j.rbmo.2019.10.014.
4. Zhang X., Wei H. Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications. *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 1–14. doi: 10.3389/fimmu.2021.728291.
5. Yeung H.-Y., Dendrou C. A. Pregnancy Immunogenetics and Genomics: Implications for Pregnancy-Related Complications and Autoimmune Disease. *Annual Rev. of Genom. and Hum. Genet.* 2019. Vol. 20. P. 73–97. doi: 10.1146/annurev-genom-083118-014943.
6. Piekarska K., Radwan P., Tarnowska A., Wiśniewski A., Radwan M., Wilczyński J. R., Malinowski A., Nowak I. ERAP, KIR, and HLA-C Profile in Recurrent Implantation Failure. *Front Immunol.* 2021. Vol. 22 (12): 755624. P. 1–13. doi: 10.3389/fimmu.2021.755624.
7. Hammond J. A., Carrington M., Khakoo S. I. A Vision of KIR Variation at Super Resolution. *Immunology.* 2016. Vol. 148. P. 249–252. doi: 10.1111/imm.12606.
8. Blunt M. D., Khakoo S. I. Activating Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors: Detection, Function and Therapeutic Use. *Int. J. Immunogenet.* 2020. Vol. 47. P. 1–12. doi: 10.1111/iji.12461.
9. Maftai R., Doroftei B., Popa R., Harabor V., Adam A-M., Popa C., Harabor A., Adam G., Nechita A., Vasilache I-A., Mihalceanu E., Bivoleanu A., Lunguleac G., Cretu A-M., Armeanu T., Diaconu R., Cianga P. The Influence of Maternal KIR Haplotype on the Reproductive Outcomes after Single Embryo Transfer in IVF Cycles in Patients with Recurrent Pregnancy Loss and Implantation Failure – A Single Center Experience. *Journal of Clinical Medicine.* 2023. Vol. 12 (5): 1905. doi: 10.3390/jcm12051905.
10. Nowak I., Wilczyńska K., Wilczyński J. R., Malinowski A., Radwan P., Radwan M., et al. KIR, LILRB and Their Ligands' Genes as Potential Biomarkers in Recurrent Implantation Failure. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 2017. Vol. 65. P. 391–399. doi: 10.1007/s00005-017-0474-6.
11. 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]
12. Tajik N., Shahsavar 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.

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

State Institution «Institute of Hereditary Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Ukraine, 79008, Lviv, M. Lysenko str., 31a

ANALYSIS OF KIR GENOTYPING RESULTS IN WOMEN WITH RECURRENT IMPLANTATION FAILURE

Aim. To analyze the frequency and distribution of *KIR* genotypes in women with recurrent implantation failure after cycles of *in vitro* fertilization. **Methods.** DNA extraction and purification, PCR-SSP, agarose gel electrophoresis. **Results.** The spectrum of *KIR* genes and the frequency of *KIR* genotypes in women with recurrent implantation failure were determined. The study group was divided according to history, in particular, a group of 84 women whose diagnosis was outlined by the concept of "repeated failed implantations" was singled out. Statistical analysis of the obtained results using the Pearson test (χ^2) indicates a significantly lower frequency of the *KIR-AB* genotype ($\chi^2 = 9.7$; $p < 0.005$) and a significantly higher frequency of the *KIR-AA* genotype ($\chi^2 = 7.35$; $p < 0.01$) in women with repeated failed implantations compared to the general group of women with reproductive failures. **Conclusions.** Taking into account the results of statistical data processing (OR = 2.05; CI 95 %: 1.21-3.45), we consider the *KIR-AA* genotype to be a significant risk factor for recurrent implantation failure after IVF. We define *KIR* genotyping as a genetic test to assess the risk of the embryo being rejected by the maternal immune system, and thus to direct medical interventions in order to achieve a successful pregnancy.

Keywords: *KIR* genotyping, Recurrent Implantation Failure (RIF), *in vitro* fertilization (IVF).