УДК 612,6:575 https://doi.org/10.7124/FEEO.v35.1659

СОСНІНА К. О.✉, ЗАСТАВНА Д. В., ТРЕТЯК Б. І., 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, 0000-0001-6425-4497, 0000-0001-6274-8362
✉ *katja.sosnina@gmail.com, (099) 090-04-09*

ОСОБЛИВОСТІ *KIR*-ГЕНОТИПІВ У ЖІНОК З ДОІМПЛАНТАЦІЙНИМИ ВТРАТАМИ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ДОПОМІЖНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Мета. Аналіз частоти та розподілу *KIR*-генотипів у жінок з повторними доімплантаційними втратами при застосуванні допоміжних репродуктивних технологій у порівнянні з жінками контрольної групи. ***Методи***. Виділення ДНК з лейкоцитів методом висолювання, ПЛР (PCR-SSP), електрофорез в агарозному гелі; методи статистичної обробки. ***Результати***. Проведено молекулярно-генетичне визначення *KIR*-генів у групі жінок з повторними невдалими імплантаціями та у контрольній групі жінок. Визначено частоту та розподіл генотипів *KIR* у обстежуваних групах. У жінок з ПНІ встановлено дещо зсунутий розподіл частоти *KIR*-генотипів, у сторону гомозиготного генотипу за гаплотипом *«A»,* частота якого склала практично половину від усіх визначених генотипів (42,86 %). Розподіл та частота генотипів *KIR* у контрольній групі відповідала закону Харді-Вайнберга. Порівняльний аналіз обстежуваних груп з використанням методів статистичної обробки показав вірогідно вищу частоту генотипу *KIR-AA* (χ^2=8,875; p<0,005) у групі жінок з повторними невдалими імплантаціями у порівнянні з контрольною групою жінок. Обрахунок коефіцієнта шансів вказує на збільшення ризику повторних невдалих імплантацій після ДРТ у 2 рази (OR=1,94; CI95 %: 1,25-3,00) при наявності у жінки *KIR-AA* генотипу. ***Висновки.*** Вважаємо генотип *KIR-AA* фактором значного ризику доімплантаційних втрат. Визначаємо *KIR*-генотипування важливим молекулярно-генетичним тестом для встановлення ризику відторгнення плода материнською імунною системою, що допоможе коректно скерувати медичні втручання для збереження вагітності.

Ключові слова: натуральні кілерні клітини, гени *KIR,* доімплантаційні втрати, допоміжні репродуктивні технології.

Безпліддя важлива соціальна та економічна проблема сьогодення. Все більше подружніх пар звертаються до допоміжних репродуктивних технологій та не отримують бажаного результату. З розвитком ДРТ, доімплантаційна втрата стала клінічно ідентифікованим явищем. Близько 10 % жінок після екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) та перенесення ембріонів страждають на повторну невдалу імплантацію. ПНІ (від англ. *Recurrent Implantation Failure, RIF*), зазвичай, описують як відсутність клінічної вагітності після перенесення чотирьох та більше ембріонів хорошої якості протягом щонайменше трьох циклів ЕКЗ у жінки віком до 40 років [1, 2]. Відомо багато факторів, що можуть спричиняти невдалі імплантації, включаючи хромосомні аномалії батьків, генетичні або метаболічні аномалії ембріона, імунологічні порушення та гінекологічні патології [3]. Не зважаючи на це, високий відсоток повторних невдалих імплантацій залишається нез'ясованого ґенезу. При цьому значна увага приділяється ролі маткових натуральних кіллерних клітин (мНК-клітини, від англ. *uNK*), оскільки вони формують домінуючу клітинну популяцію в матці та тісно контактують з алогенними клітинами екстраворсинчастого трофобласта на ранніх термінах вагітності [4, 5].

мНК-клітини беруть участь у розвитку толерантності імунної системи матері до високоімуногенних батьківських антигенів, присутніх у тканинах плода. Після запліднення бластоциста активізує формування химерної плаценти з клітин децидуальної оболонки матері та трофобласту плода, що імплантується в стінку матки, викликаючи запальну реакцію. Контроль над даним процесом належить мНК-клітинам. На відміну від НК-клітин у периферичній крові,

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

мНК-клітини не є сильно цитотоксичними. Їх функція полягає у виробленні цитокінів та факторів росту, які сприяють імплантації та розвитку вагітності [6]. Цитотоксичність і продукція цитокінів НК-клітин регулюються поверхневими рецепторами. На мНК-клітинах спостерігається виражена експресія імуноглобуліноподібних рецепторів клітин-кіллерів (від англ. *killer cell immunoglobulin-like receptors, KIRs*), які після розпізнавання молекул HLA класу I (зокрема HLA-C і HLA-G) на трофобласті можуть активувати або інгібувати НК-клітини. Баланс між активацією та інгібуванням активності мНК-клітин відіграє вирішальну роль у підтриманні імунної толерантності, імплантації та подальшому розвитку вагітності [7].

Імуноглобуліноподібні рецептори клітин-кіллерів є членами надродини імуноглобулінів. Вони експресуються на поверхні НК-клітин та деяких Т-лімфоцитів. KIR характеризуються двома (*KIR2D*, D1-D2 або D0-D2) або трьома (*KIR3D*, D0-D1-D2) позаклітинними доменами та довжиною цитоплазматичного хвоста. Ті, що мають довгі цитоплазматичні хвости та володіють мотивами гальмування імунорецепторів на основі тирозину (ITIM), називаються *KIR2DL*/*KIR3DL*. З короткими цитоплазматичними хвостами, що містять позитивно заряджений амінокислотний залишок у трансмембранній області, називаються *KIR2DS/KIR3DS*. *KIR* з короткими цитоплазматичними хвостами завдяки комплексу з DAP12 (адаптерна сигнальна молекула з мотивом активації імунорецепторного тирозину – ITAM) викликають активацію НК-клітин при взаємодії з їхніми лігандами, на відміну від *KIR2DL* і *KIR3DL*, які викликають інгібування [5].

Гени, що кодують рецептори KIR, розташовані на хромосомі 19 в ділянці q13.4 рецепторного комплексу лейкоцитів (LRC). Всього ідентифіковано 17 генів *KIR*: 6 активаційних(*KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*), 8 інгібіторних (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*), 2 псевдогени (*KIR2DP1* і *KIR3DP1*) та *KIR2DL4*, який має як активуючий, так і інгібуючий потенціал. Гени *KIR* є високополіморфними на алельному та гаплотиповому рівні. Згідно з базою даних Immuno Polymorphism Database, станом на лютий 2024 р. ідентифіковано 2238 *KIR*-алелей (https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/alleles/). Поліморфізм гаплотипу забезпечується різною кількість та комбінацією генів у індивідуумів. Розрізняють два *KIR* гаплотипи: *A* і *B*. До складу обох гаплотипів входять чотири, так званих, «каркасних генів»: *KID3DL3, KIR3DL2, KIR3DP1* та *KIR2DL4*, які є майже в усіх індивідуумів. Гаплотипи «*A»* містить обмежений перелік генів інгібіторних рецепторів (*KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR2DP1)* та лише один ген активаційного рецептора (*KIR2DS4)*. Гаплотипи «*B»* порівняно з гаплотипами «*A»* значно різноманітніші за загальною кількістю генів, їх комбінаціями та кількістю активаційних генів. Гаплотипи *«B»* характеризуються наявністю принаймні одного з таких генів: *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DL2, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS3, KIR2DS5* або *KIR3DS1* [8].

Оскільки в генах *KIR* виділяють центромерну (*Cen*) та теломерну (*Tel*) ділянки, їх також поділяють на *CenA, CenB, TelA* та *TelB*. *CenA* містить *KIR2DL3*; у *CenB* розташовані *KIR2DL2* і *KIR2DS2*; *TelA* містить *KIR3DL1* і *KIR2DS4*; *TelB* має *KIR2DS1* і *KIR3DS1*. Початок і кінець ділянок визначаються «каркасними» генами – *KIR3DL3* і *KIR3DP1* обмежують центромерну ділянку, а *KIR2DL4* і *KIR3DL2* – теломерну ділянку. Гаплотипи «*A»* включають регіони *CenA* і *TelA*, тоді як гаплотипи «*B»* включають різні комбінації, такі як *CenA/TelB, CenB/TelA* або *CenB/TelB.* Генотип особи, яка має обидві копії гаплотипу «*A»,* визначається як *KIR AA* (від 0 до 1 гена активаційних *KIR*), а генотип особи з генами гаплотипу «*B»*, вважається *KIR Bx* (*«AB»* містить від 1 до 6 генів активаційних *KIR*; або *«BB*» містить від 3 до 10 генів активаційних *KIR*) [5].

Зважаючи на чисельність та суперечність досліджень [9-11], щодо внеску *KIR* генотипу жінки у розвиток повторних невдалих імплантацій, ***метою*** нашого дослідження було проаналізувати частоту та розподіл *KIR*-генотипів у жінок з повторними доімплантаційними втратами при застосуванні ДРТ у порівнянні з жінками контрольної групи.

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 ідіопатичних повторних невдалих імплантацій після циклів ЕКЗ та жінок контрольної групи. Всього обстежено 126 жінок з повторними невдалими імплантаціями (2 і бі-

льше невдалих ЕКЗ без імплантації ембріона) та 283 жінки репродуктивного віку без обтяженого акушерсько-гінекологічного анамнезу. ДНК з лейкоцитів периферійної крові виділяли методом висолювання [12]. *KIR* типування проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з алель специфічними праймерами (від англ. *PCR-SSP polymerase chain reaction with sequence-specific primers*) згідно описаної методики з власними модифікаціями [13]. 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

З реєстру подружніх пар з ранніми репродуктивними втратами нез'ясованого ґенезу нами відібрано групу з 128 жінок з щонайменше двома повторними невдалими імплантаціями після циклів ЕКЗ. В анамнезі у цих жінок, до звернення за допоміжними репродуктивними технологіями, встановлено первинне неплідддя від 2 до 10 років з ідіопатичних причин. Для порівняння ми обстежили групу з 283 жінок репродуктивного віку без обтяженого акушерсько-гінекологічного анамнезу.

Провели молекулярно-генетичне визначення *KIR*-генів у жінок відібраних груп. Дослідження охоплювало визначення 17 генів *KIR*: 6 активаційних *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4 f/v*,*2DS5*, *3DS1*), 8 інгібіторних (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*), 2 псевдогенів (*KIR2DP1* і *KIR3DP1*) та *KIR2DL4*, який має як активуючий, так і інгібуючий потенціал. У залежності до визначених генів, встановлювали *KIR*-гаплотипи та генотип.

На першому етапі дослідження визначали частоту та розподіл *KIR*-генотипів у жінок з повторними невдалими імплантаціями. Отримані результати представлені у таблиці 1.

При визначені генотипів *KIR* ми не відрізняли генотипи *«AB»* від *«BB»* та позначали їх як «*Bx»*. Як видно з таблиці 1, у 72 жінок з ПНІ присутні такі генотипи. Встановлені *KIRBx* генотипи у даній групі відрізнялись кількістю генів *KIR* та їх комбінацією. Всього нами встановлено 36 різних варіантів генотипів «*Bx».* Цікаво, що з 72 жінок лише у двох зустрічався генотип, що містив 2 копії гаплотипу *TelB/CenB*, тобто у них були відсутні гени *KIR2DL3*,*KIR3DL1* та *KIR2DS4.* Генотип *KIRAA* був менш розповсюджений у групі з ПНІ та зустрічався у 54 жінок. Серед них нами встановлено чотири різні комбінації генів *KIR*, які описують *«AA»* генотип з 15 відомих згідно Allele Frequency Net DataBase (*https://www.allelefrequencies.net/kir6001a.asp*). Таким чином, частота генотипів *KIRBx* та *KIRAA* у групі жінок з повторними невдалими імплантаціями склала 57,14 % та 42,86 % відповідно.

Далі встановлювали розподіл та частоту генотипів *KIR* у жінок контрольної групи. Отримані результати представлені у таблиці 2. З 283 жінок контрольної групи у 204 встановлено генотипи *KIRBx.* Визначені генотипи характеризувалися 42 різними комбінаціями *KIR* генів. У контрольній групі знайдено два різновиди генотипу *KIRAA*, який встановили у 79 жінок. Щодо частоти генотипів *KIRAA* та *KIRBx* у даній групі, то вона значно відрізнялась (27,92% проти 72,08% відповідно), що відповідає нормальному розподілу генотипів згідно з законом Харді-Вайнберга.

На наступному етапі нашого дослідження ми порівнювали результати *KIR*-генотипування в обстежуваних групах. Отримані результати представлені у таблиці 3.

Як видно з таблиці 3, частота та розподіл досліджуваних *KIR*-генотпів значно відрізняється в групі жінок з ПНІ в порівнянні з контролем. Так частота генотипу *KIRAA*, що характеризується наявністю генів інгібіторних рецепторів KIR, значно вища у групі жінок з ПНІ (42,86 % проти 27,92 %).

Таблиця 1. Розподіл та частота *KIR*-генотипів у жінок з повторними невдалими імплантаціями

KIR-генотип	Жінки з ПНІ, n= 126	
	n	%
AA	54	42,86
Bx	72	57,14

Таблиця 2. Розподіл та частота генотипів *KIR* у жінок контрольної групи

KIR-генотип	Контрольна група жінок, n=283	
	n	%
AA	79	27,92
Bx	204	72,08

Таблиця 3. Аналіз *KIR*-генотипування серед жінок з повторними невдалими імплантаціями у порівнянні з контрольною групою жінок.

KIR-генотип	Жінки з ПНІ, n=126		Контрольна група, n= 283		χ^2	P	OR(CI 95%)
	n	%	n	%			
AA	54	42,86	79	27,92	8,87	<0,005	1,94 (1,25 – 3,00)
Bx	72	57,14	204	72,08			

Статистичне опрацювання отриманих результатів з використанням критерію Пірсона (χ^2) показало вірогідно вищу частоту генотипу *KIR-AA* (χ^2=8,87; p<0,005) у групі жінок з повторними невдалими імплантаціями у порівнянні з контрольною групою жінок. Обрахунок коефіцієнта шансів (OR) вказує на збільшення ризику повторних невдалих імплантацій після ЕКЗ у 2 рази (OR=1,94; CI 95 %: 1,25–3,00) при наявності у жінки *KIR-AA* генотипу.

Підтримання функціонального балансу між активаційними та інгібіторними *KIR*-рецепторами у жінки має важливе значення для правильного формування плаценти та імплантації ембріона в матку. Припускаємо, що порушення цього балансу може спричинити повторні доімплантаційні втрати вагітності. Очевидно, що даний процес регулюється на генетичному рівні, при цьому дослідження *KIR*-генотипів у жінок видається надзвичайно актуальним. Отримані нами результати щодо частоти генотипу *KIRAA* у групі жінок з повторними невдалими імплантаціями підтверджують дане припущення, оскільки цей генотип представлений набором генів інгібіторних рецепторів та не містить генів активаційних рецепторів необхідних для підтримання низької цитолітичної активності мНК-клітин під час імплантації ембріона.

Підсумовуючи отримані результати, вважаємо генотип *KIR-AA* фактором значного ризику доімплантаційних втрат. Визначаємо *KIR*-генотипування важливим молекулярно-генетичним тестом для встановлення ризику відторгнення плода материнською імунною системою, що допоможе коректно скерувати медичні втручання для збереження вагітності.

Висновки

1. Молекулярно-генетичне визначення *KIR*-генів дозволило встановити частоту та розподіл генотипів *KIR* у жінок з повторними невдалими імплантаціями. У даній групі встановлено дещо зсунутий розподіл частоти *KIR*-генотипів, у сторону гомозиготного генотипу за гаплотипом *«A»,* частота якого склала практично половину від усіх визначених генотипів (42,86 %).

2. Результати *KIR*-генотипування у контрольній групі продемонстрували нормальний розподіл *KIR*-генотипів, що підлягає закону Харді-Вайнберга.

3. Статистичне опрацювання отриманих результатів з використанням критерію Пірсона (χ^2) показало вірогідно вищу частоту генотипу *KIR-AA* (χ^2=8,875; p<0,005) у групі жінок з повторними невдалими імплантаціями у порівнянні з контрольною групою жінок.

4. Обрахунок коефіцієнта шансів (OR) вказує на збільшення ризику повторних невдалих імплантацій після ДРТ у 2 рази (OR=1,94; CI 95 %: 1,25 – 3,00) при наявності у жінки *KIR-AA* генотипу.

References

1. Ma J., Gao W., Li D. Recurrent implantation failure: A comprehensive summary from etiology to treatment. *Front. Endocrinol.* 2023. Vol. 13, N. January. P. 1–21. doi: 10.3389/fendo.2022.1061766.
2. Garneau A. S., Young S. L., Defining recurrent implantation failure: a profusion of confusion or simply an illusion? *Fertil. Steril.* 2021. Vol. 116, N. 6. P. 1432–1435. doi: 10.1016/j.fertnstert. 2021.10.023.

3. Franasiak J. M.et al. A review of the pathophysiology of recurrent implantation failure. *Fertil. Steril*. 2021. Vol. 116, No. 6. P. 1436–1448. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.09.014.
4. Wasilewska A., Grabowska M., Moskalik-Kierat D., Brzoza M., Laudański P., and Garley M. Immunological Aspects of Infertility-The Role of KIR Receptors and HLA-C Antigen. *Cells.* Vol. 13. No. 1. 2024. doi: 10.3390/cells13010059.
5. Pende D. et. al. Killer Ig-like receptors (KIRs): Their role in NK cell modulation and developments leading to their clinical exploitation. *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. doi: 10.3389/fimmu.2019.01179.
6. Von Woon E., Greer O., Shah N., Nikolaou D., Johnson M., and Male V., Number and function of uterine natural killer cells in recurrent miscarriage and implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update.* 2022. Vol. 28. No. 4. P. 548–582. doi: 10.1093/humupd/dmac006.
7. Xie M. et. al. Uterine Natural Killer Cells: A Rising Star in Human Pregnancy Regulation. *Front. Immunol*. 2022. Vol. 13. P. 1–20. doi: 10.3389/fimmu.2022.918550.
8. Roe D. et al. A Detailed View of KIR Haplotype Structures and Gene Families as Provided by a New Motif-Based Multiple Sequence Alignment. *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.585731.
9. Nowak I. et al. KIR, LILRB and their Ligands' Genes as Potential Biomarkers in Recurrent Implantation Failure. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2017. Vol. 65. P. 391–399. doi: 10.1007/s00005-017-0474-6.
10. Maftei R. et al. 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. *J. Clin. Med.* 2023. Vol. 12, No. 5. P. 1–10. doi: 10.3390/jcm12051905.
11. Piekarska K. et al. ERAP, KIR, and HLA-C Profile in Recurrent Implantation Failure. *Front. Immunol*. 2021. Vol. 12, No. October. P. 1–13. doi: 10.3389/fimmu.2021.755624.
12. Makukh H. V., Zastavna D. V., Tyrkus M. J., Tretiak B. I., Chorna L. B. Sposib vydilennia DNK z leikocytiv peryferijnoi krovi: pat.32044 Ukraina: MPK G01N33/49 (2006.01); No u200801896; aPl. 14.02.2008; publ. 25.04.2008, bul. No 8. [in Ukrainian]
13. 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, No. 3. P. 159–168. doi: 10.1111/j.1744-313X.2010.00906.x.

SOSNINA K. O., ZASTAVNA D. V., TRETIAK B. I., 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

PATTERNS OF *KIR*-GENOTYPES IN WOMEN WITH PREIMPLANTATION LOSSES AFTER ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES

Aim. To analyze the frequency and distribution of *KIR* genotypes in women with repeated preimplantation losses during ARTs compared to women with control group. ***Methods***. DNA isolation from leukocytes by the salting method, PCR-SSP, agarose gel electrophoresis; methods of statistical analysis. ***Results.*** The molecular genetic determination of *KIR* genes in the group of women with recurrent implantation failures and in the control group of women was performed. The frequency and distribution of *KIR* genotypes in the study groups were determined. In women with RIF, a slightly shifted distribution of the frequency of *KIR* genotypes was found, towards the homozygous genotype by haplotype *"A"*, the frequency of which was almost half of all identified genotypes (42.86 %). The distribution and frequency of *KIR* genotypes in the control group was normal and described by the Hardy-Weinberg principle. A comparative analysis of the study groups using statistical methods showed a significantly higher frequency of the *KIR-AA* genotype ($\chi 2=8.875$; $p<0.005$) in the group of women with RIF compared to the control group of women. The calculation of the odds ratio indicates a 2-fold increase of risk for recurrent implantation failures after ARTs (OR=1.94; CI 95 %: 1.25–3.00) in women with the *KIR-AA* genotype. ***Conclusions***. We regard the *KIR-AA* genotype as a significant risk factor for preimplantation loss. *KIR* genotyping is considered an important molecular genetic test for determining the risk of fetal rejection by the maternal immune system, which will help to correctly direct treatment interventions to keep the pregnancy alive.

Keywords: natural killer cells, *KIR* genes, preimplantation losses, assisted reproductive technologies.