

АССОЦИАЦИЯ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ИЗ СИСТЕМЫ HLA У СУПРУЖЕСКИХ ПАР С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ РАЗВИТИЯ ПЛОДА В АНАМНЕЗЕ

Г.Т. Мамедзаде

НИИ Акушерства и гинекологии

Врожденные пороки развития могут вызывать самопроизвольные аборт и мертворождения. Они могут угрожать жизни, приводить к инвалидности. Ключевую роль в процессе иммунных взаимодействий между матерью и гемиаллеогенным эмбрионом играют гены главного комплекса гистосовместимости (HLA).

Обследовано 29 семейных пар, в анамнезе которых были дети с ВПР. Родители были протипированы по локусу HLA-DR и HLA-DQ. Сопоставление супружеских гаплотипов показало, что в 20,7% случаев отмечалась схожесть 1 аллеля и определялась косолапость, гипосподия, расщелина неба. Схожесть по 2 аллелям выявлена в 13,8% - гипосподия, врожденные пороки сердца, множественные пороки развития. Схожесть по 3 аллелям также отмечалась у 13,8% пар. В этих случаях выявлялись анэнцефалия, множественные пороки развития, гидроцефалия.

Ключевые слова: новорожденные, врожденные пороки развития, супружеские пары, HLA.

Врожденные пороки развития могут вызывать самопроизвольные аборт и мертворождения [1-3]. Они могут быть угрожающими жизни, приводить к долгосрочной инвалидности и оказывать отрицательное воздействие на отдельных людей, семьи, системы здравоохранения и общества [1,3].

Здравоохранение до и во время зачатия (предубеждение и переоценка) включает в себя основные методы репродуктивного здоровья, а также медицинский генетический скрининг и консультирование. Скрининг может проводиться в течение трех периодов. Профилактический скрининг может быть полезен для выявления лиц, подверженных риску возникновения определенных расстройств, или риска заражения детей. Скрининг включает в себя получение семейных историй и скрининга носителей и особенно ценен в странах, где общий брак является общепринятым. Периконцептуальный скрининг: характеристики материнства могут увеличить риск, и результаты скрининга следует использовать для обеспечения надлежащего ухода в соответствии с риском. Это может включать скрининг на

молодом или продвинутом материнском возрасте, а также скрининг на использование алкоголя, табака или других рисков. Неонатальный скрининг включает клиническое обследование и скрининг на расстройства крови, метаболизм и производство гормонов [2,4].

Ключевую роль в процессе иммунных взаимодействий между матерью и гемиаллеогенным эмбрионом играют гены главного комплекса гистосовместимости (HLA). При наследовании антигенов тканевой совместимости ребенок получает по одному гену каждого локуса от обоих родителей. Таким образом, ребенок является наполовину чужеродным для организма матери. Эта "чужеродность" нормальное физиологическое явление, запускающее иммунологические реакции, направленные на сохранение беременности. Формируется клон иммунных клеток, вырабатывающий специальные "защитные" (блокирующие) антитела. Различные комбинации отцовских и материнских аллелей HLAII класса могут обеспечить как положительный, так и отрицательный прогноз здоровья ребенка [1,6,8].

Медицинская и социальная значимость врожденных пороков у детей придает проблеме профилактики ВПР особый статус, как реальному резерву снижения детской заболеваемости, инвалидности и смертности.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности влияния локуса HLA-DR и DQ на развитие ВПР и выявление ассоциативных связей между этим осложнением и HLA-антигенами II класса в азербайджанской популяции.

Материал и методы исследования. Научная работа выполнена на базе НИИ Акушерства и гинекологии и НИИ педиатрии МЗ Азербайджанской Республики. В основу работы легли результаты анализа собранной информации по случаям ВПР в различных родильных домах г.Баку и республики, а также клинико-генетического обследования супружеских пар.

Обследовано 29 семейных пар с наличием в анамнезе у женщины рождение ребенка с врожденными пороками развития (ВПР) и 22 семейных пар без осложнений (контрольная группа) в азербайджанской популяции. Пациентки были в возрасте от 22 до 32 лет, средний возраст – $26,1 \pm 3,9$ лет. Контрольная группа была сопоставима по возрасту с основной группой, средний возраст составил – $26,1 \pm 2,8$ лет.

Все супруги были протипированы по локусу HLA-DR и HLA-DQ.

Геномную ДНК выделяли из периферической крови методом высаливания по стандартной процедуре [10]. HLA генотипирование образцов ДНК проводили методом мультипраймерной ПЦР. Для типирования генов HLA класса II (DRB1, DQA1, DQB1) использовали наборы HLA-ДНК-Тех (фирма «НПФ ДНК-Технология», Россия). Амплификацию осуществляли на многоканальном термоциклере типа MC2 «Терцик» («НПФ ДНК-Технология», Москва).

Для диагностики HLA-типирования (DRB1) проводили забор 2 мл венозной крови стерильной одноразовой иглой в пробирку с антикоагулянтом (ЭДТА или цитрат натрия). С целью выделения ДНК на HLA выполняли поэтапно следующее.

0,5 мл крови переносили в пластиковые пробирки «Эппендорф» и добавляли 0,5 мл лизирующего раствора, все перемешивали пипетированием и осаждали в центрифуге в течение 1 мин при 13000 оборотов. Затем удаляли надосадочную жидкость, к осадку добавляли 0,5 мл лизирующего буфера, перемешивали пипетированием и также удаляли надосадочную жидкость. В пробирку вносили 60-100 мкл буфера для протеиназы К, 1 мкл протеиназы К перемешивали пипетированием. Пробирку помещали 30-60 мин в термостат при $+55^{\circ}\text{C}$ или на 12-16 часов при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Затем пробирку помещали на 10 мин в термостат при температуре $+95^{\circ}\text{C}$. После остывания конденсат со стенок пробирки осаждали центрифугированием в течение 5-10 сек. Раствор ДНК хранили в течение недели при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Выделенную ДНК из образца крови помещали в пробирку с готовой реакционной смесью состоящей из 5 мкл разбавителя, 4 мкл одного из праймеров, 0,1 мкл ДНК-полимеразы, 1 капли минерального масла. Проведение полимеразной цепной реакции проводили на заданной программе амплификатора типа MC2 «Терцик». После амплификации продукты реакции анализировали в 7% полиакриламидном геле с последующей окраской в растворе бромида этидия (конечная концентрация 0,1 мкг/мл) и визуализацией в проходящем УФ-свете при длине волны 312 нм.

Статистическая обработка материала выполнена в системе STATISTICA программы «MicrosoftExcel». Анализ полученных результатов проведен с помощью критерия достоверности Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Определение частот гена DRB1 и гаплотипов DRB1-DQA1-DQB1, относительного риска (RR), вычисляли по формуле В. Woolf [5]. Достоверность значений определяли по точному двустороннему критерию Фишера без корректировки на количество аллелей.

Результаты и обсуждение. Из врожденных пороков в анамнезе указано на: анэнцефалию – 1 ($3,45 \pm 0,82\%$, $p \leq 0,001$), гидроцефалию – 3 ($10,34 \pm 3,56\%$, $p \leq 0,001$), косолапие – 3 ($10,34 \pm 2,56\%$, $p \leq 0,001$),

гипоспадию - 4 (13,79±2,72%, p≤0,001), расщелину нёба – 4 (13,79 ±2,72 %), врожденный порок сердца – 6 (20,69 ±5,47%, p≤0,001), множественные пороки развития – 8 (27,59±5,80%, p≤0,001).

Наличие ассоциации между ВПР и HLA-антигеном проводили в результате сравнения частот HLA-антигенов у пар

основной и контрольной групп. Проанализировав показатели HLA-DRB1, выявлено, что наиболее часто встречались аллели DRB1*04 (21,55%, RR=1,92), DRB1*11 (19,83%, RR=1,57) и DRB1*15 (19,83%, RR=1,57) (рис.1).

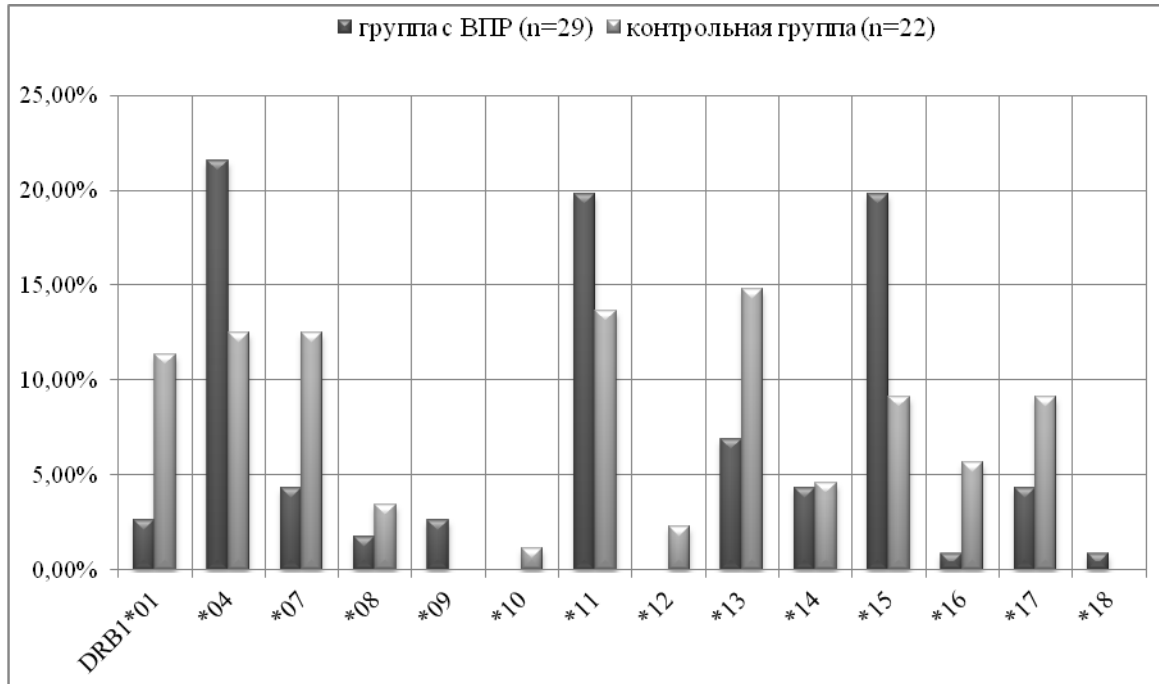


Рис.1. Частота встречаемости фенотипов HLADRB1 в супружеских парах (в %)

Эти антигены представлены на клетке в несравненно большем количестве и являются наиболее иммуногенно активными.

Результаты типирования по локусу HLA-DQA1 и DQB1 приведены в таблице 1. Как видно из данной таблицы, отмечалась более высокая частота встречаемости аллелей DQA1*0501 (18,96%) и DQA1*0301 (16,38%). При этом с ВПР ассоциировал вариант DQA1*0301 (RR=

1,37), а также DQA1*0103 (RR=1,29) и DQA1*0102 (RR=1,29). Типирование по локусу HLA-DQB1 выявило максимальную частоту и значительный относительный риск аллеля DQB1*0201 (17,24%, RR=1,32), а также высокую частоту аллеля DQB1*0301 (16,38%, RR=0,88). Однако ВПР плода ассоциировало с вариантом DQB1*0401/2, что выражалось высокой величиной относительного риска – 3,92 (p<0,001).

Таблица 1.

Типирование по локусу HLA DQA1 и HLA DQB1 в супружеских парах с ВПР плода в анамнезе

HLA-DQ	Группа с ВПР (n=29)		Контрольная группа (n=22)		Относительный риск (RR)
	Число аллелей	Частота встречаемости, %	Число аллелей	Частота встречаемости, %	
A1*0101	7	6,03	14	6,82	0,34
*0101/4	4	3,45	3	3,41	1,01
*0102	10	8,62	6	6,82	1,29
*0103	10	8,62	14	15,91	1,29
*0201	5	4,31	9	10,93	0,39
*0301	19	16,38	11	12,5	1,37
*0501	22	18,96	28	31,82	0,50
B1					
*0201	20	17,24	12	6,82	1,32
*0301	19	16,38	16	18,18	0,88
*0302	9	7,76	10	11,36	0,66
*0303	4	3,45	4	4,54	0,75
*0401/2	5	4,31	1	1,14	3,92
*0501	4	3,45	13	14,77	0,21
*0502/4	2	1,72	7	7,96	0,20

Таким образом, частота регистрации локуса HLA-DRB1 в семейных парах с ВПР выражалась увеличением содержания DRB1*04, DRB1*11, DRB1*15, локуса HLA-DQA1 - *0501 и *0301 и DQB1 - *0201 и *0301. С наличием ВПР ассоциировали аллели DQB1*0201, *0301, а также ассоциации - DRB1*04/ DRQA1 *0301, DRB1*11/DRQA1*0501, DRB1*11/DQA1*0501/DQB1*0301, DRB1*04/ DQA1* 0301/DQB1*0302 и DRB1 * 15 /DQ A1* 01 03 /DQB1*0602-8. Следовательно, полученные данные позволяют нам заключить, что иммуногенетическими маркерами ВПР плода являются эти гены и особенно двух и трехлокусные гаплотипы.

Проведенные исследования показали, что у женщин чаще отмечалось сочетание DRB1*11/DQA1*0501/DQB1*0301 (20, 69%), у мужчин - DRB1*04/ DQA1 *0301 /DQB1*0302 (24,14%).

Сопоставление супружеских гаплотипов показало, что в 6 (20,7±6,5%, p≤0,001) парах была схожесть по 1 аллелю, из которых выявлены следующие аллели: DRB1*15, DQB1*0602-8, DQA1*0101, DQA1*0102, DQA1*0301, DQA1*0501.

Среди данных 6 супружеских пар у 2 пар были множественные ВПР, у 1 пары - косопалие, у 1 пары - гипоспадия, у 1 – расщелина нёба у 1 пары – врожденный порок сердца. Схожесть супругов по 2 аллелям выявлена в 4 (13,8±4,2%, p≤0,001) парах - DRB1*04|DQA1*0301 (дважды) DQA1*0102 / DQB1 *0602-8 и DRB1 * 09 / DQA1*0301, в частности это были пары со следующими ВПР: у 1 пары – врожденный порок сердца, у 1 пары – гипоспадия, у 1 пары – косопалие и у 1 пары – множественные пороки. Схожесть мужчин и женщин по 3 аллелям определялась в 4 (13,8±4,2%, p≤0,001%) парах - DRB1*11/DQA1*0501/DQB1*0301 (дважды), DR B1*04/DQA1 *0301/DQB1*0302, DRB1* 04/DQA1*0301/DQB1*0401/2. Ассоциации, состоящие из 3-х аллелей, чаще выявлялись у 1 пары с анэнцефалией, у 2 пар с множественными пороками и у 1 пары – с гидроцефалией.

Большое значение имеет общность супругов по определенным антигенам HLA – DR. Наличие совпадающих антигенов HLA у супругов приводит к тому, что зародыш не распознается организмом

матери как плод, а воспринимается как измененная клетка собственного организма, против которой начинает работать система уничтожения. Так, например, в семейных парах с привычным невынашиванием наиболее часто встречается HLA-DR2, который является основным, ассоциированным с привычным невынашиванием, антигеном [7,8]. В настоящее время выявлено, что общие HLA-DR у супругов, а также HLA-DR2 или HLA-DR6 у женщины, являются прогностически неблагоприятными критериями для развития будущих беременностей [8,11]. В наших исследованиях чаще встречались такие аллели DRB1 локуса как *04, *11 и *15.

Уточнение аллельного полиморфизма генов HLA способствует установлению их ассоциированности с заболеваниями. Например, еще в 1973 г. выявлено увеличение частоты встречаемости антигена HLA-B27 у больных анкилозирующим спондилитом. В дальнейшем было установлено, что целый ряд тяжелых заболеваний человека ассоциирован с наличием в его геноме тех или иных аллельных вариантов HLA-генов: аутоиммунные заболевания, хронический вирусный гепатит В, сахарный диабет I типа, лейкозы, рассеянный склероз и многие другие. Кроме того, был доказан высокий риск ВПР плода ассоциированный с HLA – DR5 [8,11].

HLA-система является самым полимор-

фным комплексом из всех известных в настоящее время. Это разнообразие позволяет изучить индивидуальные особенности течения плода. Изучение роли антигенов системы HLA в развитии ВПР представляет определенный интерес, поскольку указывает на участие генетических факторов в формировании данной патологии. Направление подобных исследований оправдано, так как в литературе уже имеются упоминания об ассоциативной связи HLA-антигенов с церебральной патологией у новорожденных, в частности, с врожденными пороками ЦНС [8,9,11]. Это дает возможность прогнозировать возникновение, особенности течения, формирования осложнений и неблагоприятных исходов данного заболевания, решать вопросы его своевременной профилактики и проводить адекватную терапию. Кроме того, полученные сведения о взаимосвязи антигенов гистосовместимости с различными врожденными пороками позволят глубже изучить механизмы развития изучаемой патологии и понять причины ее клинического полиморфизма. Знание иммуногенетических особенностей такого сложного осложнения беременности как ВПР, окажет помощь в решении вопроса о своевременной профилактике данного заболевания (в первую очередь лицам с высоким риском его развития).

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов О.В. Клинико-эпидемиологическое изучение врожденных пороков развития у детей в Омске // Педиатрия, 2006, №5, с.108-110
2. Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Иващенко Т.Э., и др. Современные алгоритмы пренатальной диагностики наследственных болезней / Метод, пособие. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009, 130 с.
3. Бахарев В.А., Фанченко Н.Д. Социальные и медицинские аспекты врожденных и наследственных патологий // Здоровье и мед. техника, 2005, №9, с.54-57.
4. Боровкова Л.В., Воскресенская С. В., Удалова О.В. Медико-генетическое кон-

сультирование и пренатальная диагностика врожденных и наследственных заболеваний. Н.Новгород: НГМА, 2007, 56 с.

5. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. Москва: Практика, 1999, 460 с.

6. Aruna M.P.S., Sudheer S., Andal S., Tarakeswari A. et al. HLAG polymorphism patterns show lack of detectable association with recurrent spontaneous abortion // Tissue Antigens, 2010, vol.76, No3, p.216–222.

7. Aruna M.P.S., Sudheer S., Andal S., Tarakeswari A. et al. Novel alleles of HLA-DQ and -DR loci show association with recurrent miscarriages among South Indian women // Human Reproduction, 2011, 0(0), p.1–10.

8. 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, vol. 19, p.1215-1221.

9. Mallia J.V., Das D.K., Maitra A. Role of HLA in Human Pregnancy // Int J Hum

Genet, 2012, vol.12(1), p. 33-36.

10. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // Nucleic Acids Res., 1988, vol.16, p. 1215–1218.

11. Muller R.F., Yong I.D. Emery's Elements of Medical genetics. Livingtone, 2001, p.225-237.

SUMMARY

THE ASSOCIATION OF IMMUNOGENETIC MARKERS FROM THE HLA SYSTEM IN COUPLES WITH CONGENITAL MALFORMATIONS OF THE FETUS IN THE ANAMNESIS.

Mammadzade G.T.

Scientific Research Institute of Obstetrics and Gynecology.

Key words: newborns, congenital malformations, married couples, HLA (human leukocyte antigen)

Congenital malformations can cause miscarriages and stillbirths. They can be life-threatening, cause disability. A key role in the immune interactions between mother and hemialleogennym embryo genes play a major histocompatibility complex (HLA).

29 married couples with a history of children with congenital malformations were examined. Parents were typed at the locus HLA-DR and HLA-DQ. Comparison of matrimonial haplotypes showed that in 20.7% of cases, the similarity of the 1 allele was noted and the clubfoot, hypospadias, cleft palate were determined. Similarity in the 2 alleles was found in 13.8% - hypospadias, congenital heart disease, multiple malformations. The similarity in the 3 alleles was also noted in 13.8% of pairs. In these cases, anencephaly, multiple malformations, hydrocephalus were detected.