

ТЕРПИЛЯК О.І.[✉], ЗАСТАВНА Д.В., ГЕЛЬНЕР Н.В., ОСІДАЧ С.В.

ДУ «Інститут спадкової патології НАМНУ»,

Україна, 079008, м. Львів, вул. М. Лисенка, 31а, e-mail: oresta.terp@gmail.com

[✉] oresta.terp@gmail.com

ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ ТА ЧАСТОТА *KIR*-ГЕНІВ У ЖІНОК ІЗ РЕГУЛЯРНИМИ РАННІМИ РЕПРОДУКТИВНИМИ ВТРАТАМИ

KIR – імуноглобуліноподібні рецептори клітин кіллерів (з англ. killer cell immunoglobulin-like receptor) – трансмембранні глікопротеїни з двома або трьома позаклітинними імуноглобуліноподібними доменами (*KIR2D* і *KIR3D* відповідно) і довгими (L) або короткими (S) цитоплазматичними ділянками. *KIR* з L-ділянками проводять інгібуючий сигнал, а з S-ділянками – активуючий сигнал [1–5]. Ці рецептори, взаємодіючи із своїми лігандами, а саме з антигенами HLA I класу, і проводячи активуючий або інгібуючий сигнал, беруть участь у регулюванні функціональної активності клітин, на поверхні яких вони знаходяться, та відіграють важливу роль у вродженій імунній відповіді. Для прикладу, зниження або відсутність інгібуючого сигналу на поверхні природних кіллерів (NK) призводить до переважання активуючого сигналу і, в підсумку, до лізису клітини-мішені. Таким чином, для нормального функціонування імунної системи необхідний генетично детермінований баланс між *KIR*-активуючими та *KIR*-інгібуючими рецепторами, а його порушення призводить до тих чи інших хвороб.

Опираючись на вище сказане, видається цікавим вивчення спектра *KIR*-генів у жінок із регулярними втратами вагітності (РВВ) (з англ. recurrent pregnancy loss – RPL), адже приблизно 45 % випадків ідіопатичних ранніх РВВ окреслюється як «імунонепліддя», оскільки в його механізмах задіяні порушення імунних шляхів передачі інформації між матір'ю та плодом [6]. До таких механізмів найчастіше відносять: накопичення аутоантитіл в організмі матері, порушення балансу Th1/Th2 – цитокінів, порушення показників клітинного імунітету, зокрема порушення кількісних показників NK-клітин [7–10].

Гени *KIR*-локусу, розташовані на короткому плечі хромосоми 19 (19q13.4), і займають ділянку протяжністю 100–200 Кб лейкоцитар-

ного рецепторного комплексу – LRC [11]. На сьогодні ідентифіковано 16 *KIR*-генів (13 експресуючих, 2 псевдогену), а також попередник *KIR3DL0*, картований за межами *KIR*-локусу [12]. Існують «структурні» або «рамкові» (framework) гени, які присутні у всіх гаплотипах. Структурний інгібаторний ген *KIR3DL3* розташований із центромерного кінця, *KIR3DL2* – з теломерного, а в центрі структурну функцію виконує псевдоген *KIR3DP1* і ген *KIR2DL4* [13]. Згідно з номенклатурою HUGO Genome Nomenclature Committee (HGNC), на сьогодні відомо біля 600 алелів *KIR*-генів [14, 15]. *KIR*-генотип складається з двох гаплотипів, один з яких успадковується від батька, а інший – від матері. Залежно від кількості і типу генів, виділяють дві групи гаплотипів: *A* і *B*. Вони розрізняються за кількістю активаційних та інгібаторних *KIR*-генів. Число генів, представлених в одному гаплотипі, може варіювати від 7 (в окремих випадках – 5) до 12. Цікаво зазначити, що частота *KIR*-генів і генотипів істотно відрізняються в різних етнічних групах. Зокрема, генотипи з *A*-гаплотипами домінують у жителів Східної Азії. Так, у японській популяції частота *AA*-генотипів (тобто гомозиготних за *A*-гаплотипом) становить 59,1 % [16], у китайців – 58,7 % [17], корейців – 55,2 % [18]. Переважання *B*-гаплотипів спостерігається в популяціях Південної Азії, Австралії та Південної Америки: у індіанців Амазонки, корінних народів Індії і аборигенів Австралії частота *AA*-генотипу становить лише 5,0 %, 2,9 % і 1,5 % відповідно [19–21]. У кавказоїдній расі біля 30 % індивідів мають *AA*-генотип [22].

Мета роботи – вивчити спектр та частоту *KIR*-генів серед жінок із регулярними ранніми ідіопатичними репродуктивними втратами.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугувала ДНК, виділена з периферійної крові жінок, які звер-

нулися для медико-генетичного консультування у Львівський міжобласний медико-генетичний центр із приводу ідіопатичних регулярних ранніх втрат вагітності в терміні 5–11 тижнів. ДНК виділяли з лейкоцитів периферійної крові методом висоловання. Типування генів *KIR* проводили методом ПЛР-SSP. За основу була взята методика, описана С. S. Witt зі співавторами [23]. Принцип методу полягає в тому, що при повній комплементарності послідовностей праймерів із комплементарною матрицею алеля ампліфікується вибрана послідовність алеля, а при відсутності комплементарності двох і більше основ у нуклеотидній послідовності праймерів із комплементарною матрицею алеля специфічна реакція не проходить. Типування алелів базується на присутності або відсутності ПЛР-продукту, який реєструється за допомогою електрофорезу в 3 % агарозному гелі, забарвленому бромистим етидієм в УФ-світлі при довжині хвилі 302 нм. За наявності або відсутності специфічного фрагмента ампліфікації певного розміру відповідної алель-специфічної або групо-специфічної суміші праймерів проводять типування генів. Праймери синтезувала фірма «Neogen»(м. Київ, Україна).

Усього обстежено 38 бездітних жінок із ранніми РВВ, у яких було не менше двох мимовільних втрат вагітності. Контрольна група налічувала 31 жінку без втрат вагітності, без обтяженого акушерсько-гінекологічного анамнезу, у яких є двоє і більше здорових дітей.

Результати та обговорення

Результати генотипування *KIR*-генів представлені в таблиці 1.

Як видно із таблиці, у контрольній групі жінок із 12-ти досліджуваних *KIR*-генів не детектований один активаційний *2DS4*-ген у жодній із 31 обстежених осіб. Частіше траплялися інгібіторні гени, їх частота коливалася від 28,5 % до 100 %. Частота ж активаційних генів знаходилася в межах 12,9–25,8 %. Отож, дослідження репертуару *KIR*-генів серед репродуктивно здорових жінок із західноукраїнського регіону засвідчило суттєве домінування інгібіторних *KIR*-генів. Наші дані аналогічні із даними Carrington M., Norman P. [24], хоча результати, отримані різними дослідниками, є дуже суперечливими [25–27].

Таблиця 1. Частоти *KIR*-генів у дослідній та контрольній групах жінок

№ з/п	<i>KIR</i> -гени	Контрольна група, n=31		Дослідна група, n=38	
		Абс. знач.	%	Абс. знач.	%
	інгібіторні				
1	<i>2DL1</i>	14	45,2	6	15,8
2	<i>2DL2</i>	9	29,1	2	5,3
3	<i>2DL3</i>	23	74,2	32	84,2
4	<i>2DL4</i>	31	100	38	100
5	<i>2DL5</i>	18	58	31	81,6
6	<i>3DL1</i>	8	25,8	6	15,8
	активаційні				
7	<i>2DS1</i>	4	12,9	0	–
8	<i>2DS2</i>	8	25,8	0	–
9	<i>2DS3</i>	5	16	0	–
10	<i>2DS4</i>	0	–	0	–
11	<i>2DS5</i>	8	25,8	8	21
12	<i>3DS1</i>	4	12,9	1	2,6

Подібно до контролю, дослідна група також характеризувалася переважанням інгібіторних *KIR*-генів. Як видно з таблиці 1, всі шість інгібіторних генів детектовані в обстежуваній дослідній групі, а їх частота коливалася від 5,3 % до 100 %. Щодо генів активаційних, то виявлено лише два з досліджуваних шести активаційних *KIR*-гени, а саме: *2DS5* та *3DS1*. При цьому ген *3DS1* виявлено лише в одній особі серед 38 обстежених. Характеризуючи досліджувану групу жінок із регулярними (від 2-х до

8-и) втратами вагітності у терміні 5–11 тижнів, можна констатувати зсув репертуару *KIR*-генів у цій групі у бік домінування інгібіторних генів. Зокрема, показано, що 70 % генотипів, встановлених у цій групі жінок, не містили жодного активаційного гена, тоді як в контрольній групі таких генотипів було 41,9 %. Статистичне опрацювання отриманих результатів із використанням критерію Пірсона (χ^2) та величини відношення шансів OR представлено у таблиці 2.

Таблиця 2. Результати статистичного опрацювання отриманих результатів

№ з/п	<i>KIR</i> -гени	OR (ДІ-95%)	χ^2
	інгібіторні		
1	<i>2DL1</i>	0,228	6,981*
2	<i>2DL2</i>	0,136	2,603
3	<i>2DL3</i>	1,855	0,839
4	<i>2DL4</i>	–	–
5	<i>2DL5</i>	3,198	1,527
6	<i>3DL1</i>	0,539	0,004
	активаційні		
7	<i>2DS1</i>	0	2,800
8	<i>2DS2</i>	0	6,122*
9	<i>2DS3</i>	0	3,576
10	<i>2DS4</i>	–	–
11	<i>2DS5</i>	0,767	0,107
12	<i>3DS1</i>	0,182	0,859

Примітки: $p=0,05$ при $\chi^2=3,8$; * – різниця достовірна ($p<0,05$).

Як видно з таблиці 2, серед досліджуваних 6-ти інгібіторних генів один, а саме *2DL1*, виявлений у дослідній групі жінок із частотою вірогідно значно нижчою у порівнянні до контрольної групи жінок при показниках критерію Пірсона $\chi^2=6,981$ ($p<0,05$). За частотою інших інгібіторних генів дослідна група вірогідно значно не відрізнялася від групи контрольної. Щодо активаційних генів, то, як уже зазначалося вище, серед шести детектованих генів чотири взагалі не виявлялися у жодній із обстежуваних жінок з репродуктивними втратами, а частота ще двох (*2DS5* та *3DS1*) не відрізнялася вірогідно значно від контрольних частот і χ^2 складала

0,107 ($p>0,05$) та 0,859 ($p>0,05$) відповідно.

Відношення частоти досліджуваного результату в дослідній групі до частоти результату в контрольній групі оцінювали за допомогою величини відношення шансів OR (Odds Ratio) при довірчому інтервалі 95 % (CI) [28]. За допомогою цього показника вираховується сила асоціації того чи іншого чинника (конкретного гена *KIR* в нашому випадку) з конкретним захворюванням (у нашому випадку – із РВВ). Отже, як видно з таблиці 2, присутність інгібіторного *KIR*-гена *2DL3* підвищує шанс ранніх репродуктивних втрат у жінки майже у 2 рази, а

присутність *2DL5*-гена підвищує ризик РВВ у 3 рази.

Висновки

1. Проведено типування *KIR* генів у 38-и зразках ДНК, виділених із клітин периферійної крові бездітних жінок з регулярними (від 2-х до 8-и) втратами вагітності на ранніх етапах вагітності (5–11 тижнів) та у 20-ти зразках ДНК, виділених із клітин периферійної

крові жінок контрольної групи, у яких є двоє і більше дітей.

2. У досліджуваній групі жінок із регулярними втратами вагітності встановлено зсув репертуару *KIR*-генів у бік домінування інгібіторних генів.

3. Присутність інгібіторного *KIR*-гена *2DL3* підвищує шанс ранніх репродуктивних втрат у жінки майже у 2 рази, а присутність *2DL5*-гена підвищує ризик раннього переривання вагітності у 3 рази.

Література

- Harel-Bellan A., Quillet A., Marchiol C., DeMars R., Tursz T., Fradelizi D. Natural killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1986. – V. 83, № 15. – P. 5688–5692.
- Vilches C., Parham P. *KIR*: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity // *Annual Reviews of Immunology*. – 2002. – V. 20. – P. 217–251.
- Lanier L.L. NK cell recognition // *Annual Reviews of Immunology*. – 2005. – V. 23. – P. 225–274.
- Patterson S., Chaidos A., Neville D.C.A., Poggi A., Butters T.D., Roberts I.A.G., Karadimitris A. Human Invariant NKT Cells Display Alloreactivity Instructed by Invariant TCR-CD1d Interaction and Killer Ig Receptors // *The Journal of Immunology*. – 2008. – V. 181, № 5. – P. 3268–3276.
- Mingari M.C., Ponte M., Vitale C., Bellomo R., Moretta L., Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function // *Human Immunology*. – 2000. – V. 61, № 1. – P. 44–50.
- Lee R.M., Silver R.M. Recurrent pregnancy loss: summary and clinical recommendations // *Semin Reprod Med*. – 2000. – V. 18. – P. 433–440.
- Rushworth F.N., Backos M., Rai R., Chilcott I.T., Baxter N., Regan L. Prospective pregnancy outcome in untreated recurrent miscarries with thyroid autoantibodies // *Hum Reprod*. – 2000. – V. 15. – P. 1637–1639.
- Lim K.I., Odukoya O.A., Ajjan R.A., Li T.C., Weetman A.P., Cooke I.D. The role of T-helper cytokines in human reproduction. – 2000. – V. 73. – P. 136–142
- National Coordinating Centre for Woman's Health (UK). Ectopic Pregnancy and Miscarriage: Diagnosis and Initial Management in Early Pregnancy of Ectopic Pregnancy and Miscarriage // *NICE Clinical Guidelines*. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. – 2013. – № 154.
- Raghupathy R., Makhseed M., Azizieh F., Omu A., Gupta M., Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion // *Hum Reprod*. – 2000. – V. 15. – P. 713–718.
- Trowsdale J., Barten R., Haude A., Stewart C.A., Beck S., Wilson M.J. The genomic context of natural killer receptor extended gene families // *Immunological Reviews*. – 2001. – V. 181. – P. 20–38.
- Sambrook J.G., Bashirova A., Andersen H., Piatak M., Vernikos G.S., Coggill P., Lifson J.D., Carrington M., Beek S. Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates // *BMC Genomics*. – 2006. – V. 7. – P. 209–216.
- Yawata M., Yawata N. NK cell *KIR* heterogeneity and evolution // *Natural Killer Cells: Basic Science and Clinical Application* / Edited by: Lotze M.T., Thomson A.W. – Elsevier, 2009. – Chapter 6. – P. 79–94.
- Marsh S.G.E., Parham P., Dupont B., Geraghty D.E., Trowsdale J., Middleton D., Vilches C., Carrington M., Witt C., Guethlein L.A., Shilling H., Garcia C.A., Hsu K.C., Wain H. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (*KIR*) nomenclature report // *Immunogenetics*. – 2003. – V. 55. – P. 220–226.
- Immuno Polymorphism Database (IPD-*KIR*) [Electronic resource] // *The Immuno Polymorphism Database*. – Mode of access: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>. – 01.03.2011.
- Yawata M., Yawata N., Draghi M., Little A.M., Partheniou F., Parham P. Roles for HLA and *KIR* polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2006. – V. 203. – P. 633–645.
- Jiang K., Zhu F.-M., Lv Q.-F., Yan L.-X. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population // *Tissue Antigens*. – 2005. – V. 65. – P. 556–563.
- Wang D.H., Park H., Yoon J.A., Park M.H. Haplotype Analysis of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genes in 77 Korean Families // *Human Immunology*. – 2005. – V. 66, № 2. – P. 146–154.
- Ewerton P.D., de Meira Leite M., Magalhães M., Sena L., Melo dos Santos E.J. Amazonian Amerindians exhibit high variability of *KIR* profiles // *Immunogenetics*. – 2007. – V. 59. – P. 625–630.
- Rajalingam R., Du Z., Meenagh A., Luo L., Kavitha V.J., Pavithra-Arulvani R., Vidhyalakshmi A., Sharma S.K., Balazs I., Reed E.F., Pitchappan R.M., Middleton D. Distinct diversity of *KIR* genes in three southern Indian populations: comparison with world populations revealed a link between *KIR* gene content and pre-historic human migrations // *Immunogenetics*. – 2008. – V. 60. – P. 207–217.

21. Toneva M., Lepage V., Lafay G., Dulphy N., Busson M., Lester S., Vu-Trien A., Michaylova A., Naumova E., McCluskey J., Charron D. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations // *Tissue Antigens*. – 2001. – V. 57, № 4. – P. 358–362.
22. Middleton D., Gonzalez F. The extensive polymorphism of *KIR* genes // *Immunology*. – 2009. – V. 129. – P. 8–19.
23. Witt C.S., Goodridge J., Gerbase-DeLima M.G., Daher S., Christiansen F.T. Maternal *KIR* repertoire is not associated with recurrent spontaneous abortion // *Human Reproduction*. – 2004. – V. 19, № 11. – P. 2653–2657.
24. Carrington M., Norman P. The *KIR* Gene Cluster [Electronic resource] // National Center for Biotechnology Information (US) 2003. – Mode of access: <http://www.ncbi.nih.gov/books/NBK10134>.
25. Male V., Sharkey A., Masters L., Kewdney P.R., Farrell L.E., Farrell L.E., Moffett A.J. The effect of pregnancy on the uterine NK cell *KIR* repertoire // *Eur J Immunol*. – 2011. – V. 41, № 10. – P. 3017–3027.
26. Chazara O., Xiong S., Moffett A. Maternal *KIR* and fetal HLA-C: a fine balance // *J Leukoc Biol*. – 2011. – V. 90, № 4. – P. 703–716.
27. Béziat V., Traherne J.A., Liu L.L., Jayaraman J., Enqvist M., Larsson S., Trowsdale J., Malmberg K.J. Influence of *KIR* gene copy number on natural killer cell education // *Blood*. – 2013. – V. 121, № 23. – P. 4703–4707.
28. Szumila M. Explaining Odds Ratios // *J. Can. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry*. – 2010. – V. 19, № 3. – P. 227–229.

TERPYLYAK O., ZASTAVNA D., HELNER N., OSIDACH S.

Institute of Hereditary Pathology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Ukraine, 79008, Lviv, Lysenka str., 31-a, e-mail: oresta.terp@gmail.com

ALLOCATION FEATURES AND FREQUENCY OF *KIR*-GENES IN WOMEN WITH REGULAR EARLY REPRODUCTIVE LOSSES

Aim. *KIR* (killer cell immunoglobulin-like receptors) are the transmembranous glycoprotein receptors, role of which is to activate or inhibit the functional activity of cells, the surfaces of which they are located on. Genetically determined balance between *KIR*-activating and *KIR*-inhibiting receptors can contribute to some diseases predisposition. In this work we have studied the spectrum and frequency of *KIR*-genes among women with regular early idiopathic reproductive failures. **Methods.** Gene typing was conducted by PCR-SSP method. **Results.** Typing of *KIR*-genes was conducted in 31 DNA samples, extracted from peripheral blood cells from women without reproductive losses and in 38 DNA samples, extracted from peripheral blood cells from women with early reproductive losses of idiopathic nature. We found, that in women with reproductive failures genotypes of *KIR*-genes were characterized by decreased amount of activating genes. The presence of *2DL3* and *2DL5* genes increases the risk of early reproductive failures in 2 and 3 times, respectively. **Conclusions.** The shift of repertoire of *KIR*-genes into the domination of inhibitory genes and the spectrum features of *KIR*-genes can increase the risk of early reproductive failures.

Keywords: *KIR*-genes, recurrent pregnancy loss, PCR-SSP.