

## ЗНАЧЕНИЕ ГЕНОВ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ В ПРОГРАММЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

М. А. Липин<sup>1\*</sup>,  
А. И. Малышкина<sup>1</sup>, доктор медицинских наук,  
И. Н. Фетисова<sup>1,2</sup>, доктор медицинских наук,  
Ж. А. Дюжев<sup>1,2</sup>,  
С. Ю. Ратникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В. Н. Городкова» Минздравсоцразвития России, 153045, Россия, г. Иваново, ул. Победы, д. 20.

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, 153000, Россия, г. Иваново, пр. Фридриха Энгельса, д. 8.

**РЕЗЮМЕ** Обследовано 126 женщин, направленных на прохождение процедуры экстракорпорального оплодотворения по поводу трубно-перитонеального бесплодия. Анализ полиморфизма генов системы HLA II класса выявил ассоциацию между присутствием в генотипе аллели DQA1\*0201 и сниженным фолликулярным резервом; аллелей DQB1\*0301/4 и хорошей реакцией яичников на индукцию суперовуляции.

**Ключевые слова:** комплекс гистосовместимости, HLA, гены, аллели, бесплодие, овоцит, экстракорпоральное оплодотворение.

\* Ответственный за переписку (corresponding author): michael.lipin@rambler.ru

Возрастающий интерес к развитию вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) во всем мире обусловлен приоритетностью проблемы бесплодия в репродуктивной медицине [1]. Важнейшим этапом проведения любой программы вспомогательных репродуктивных технологий является индукция овуляции. Способность яичников в ответ на стимуляцию гонадотропинами продуцировать адекватное число фолликулов относится к ведущим прогностическим признакам при оценке их функционального состояния и является критерием успешного лечения бесплодия. Эта реакция со стороны яичника отражает так называемый «овариальный резерв», который в основном зависит от исходной величины пула примордиальных фолликулов. Однако почти у 15–22% пациенток не удается добиться созревания более трех фолликулов даже при использовании самых современных индукторов овуляции. Ослабление реакции яичников на индукторы фолликулогенеза называют «бедным ответом» [3, 4, 10, 15]. Процесс репродукции у человека,

включая гаметогенез, контролируется определенными генами [7, 16]. В этой связи большой интерес представляет изучение наследственных факторов, контролирующих процесс созревания половых клеток и таким образом причастных к формированию потенциала для последующего эмбрионального развития.

Целью настоящего исследования явилось определение частоты аллелей генов главного комплекса гистосовместимости HLA II класса (DRB1, DQA1, DQB1) у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием, проходивших процедуру экстракорпорального оплодотворения, и выявление возможной ассоциации указанных генетических маркеров с количеством овоцитов, полученных при индукции суперовуляции.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Основную группу составили 126 пациенток, проходивших процедуру экстракорпорального оплодотворения в связи с непроходимостью или

## THE SIGNIFICANCE OF THE GENES OF THE MAIN COMPLEX OF HISTOCOMPATIBILITY IN THE PROGRAM OF EXTRACORPOREAL FERTILIZATION

Lipin M. A., Malysheva A. I., Fetisova I. N., Diuzhev Zh. A., Ratnikova S. Yu.

**ABSTRACT** 126 women who were directed to the procedure of extracorporeal fertilization due to tuboperitoneal sterility were examined. The analysis of polymorphism of genes of HLA system, II class revealed the association between the presence of DQA1\* alleles in genotype and decreased follicular reserve; DQB1\*0301/4 alleles and positive reaction of ovaries to superovulation induction.

**Key words:** histocompatibility complex, HLA, genes, alleles, sterility, oocyte, extracorporeal fertilization.

отсутствием маточных труб; в контрольную группу вошли 57 женщин с указанием в анамнезе на рождение двух и более здоровых детей без использования вспомогательных репродуктивных технологий.

Индукцию суперовуляции, ультразвуковой мониторинг и аспирацию фолликулов осуществляли по общепринятым протоколам программы экстракорпорального оплодотворения [9, 12].

У всех пациенток основной группы для исключения численных и структурных аномалий хромосом было проведено кариотипирование с использованием дифференциальных методов окраски хромосомных препаратов.

Образцы ДНК получали из лимфоцитов периферической крови, применяя набор реагентов и протокол для выделения ДНК из различного биологического материала «DIAtom DNA Prep100» («Изоген», Россия). На полученных образцах ДНК проводили аллель-специфическую полимеразную цепную реакцию трех локусов HLA II класса: DRB1, DQA1, DQB1 с использованием набора реактивов НПО «ДНК-технология» (Россия). Продукты амплификации анализировали в 3%-ном агарозном геле с окраской амплификатов бромистым этидием и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете.

Для сравнения распределения частот аллелей генов HLA II класса был применен критерий  $\chi^2$  Пирсона и тест Фишера. Для выявления связи между степенью фолликулярного ответа при индукции суперовуляции и частотой носительства определенного аллеля использовался корреляционный анализ с оценкой непараметрического коэффициента ранговой корреляции  $\tau$  Кендалла. За достоверный принимали 95%-ный уровень значимости ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Возраст пациенток основной группы варьировал от 26 до 45 лет и составил в среднем  $33,7 \pm 4,8$  года, женщин группы сравнения –  $41,8 \pm 1,5$  года. Все пациентки основной группы имели нормальный кариотип.

В среднем у одной женщины основной группы было пунктировано  $9,8 \pm 3,2$  фолликула и при этом получено  $7,6 \pm 3,4$  овоцита. В зависимости от количества овоцитов, полученных при трансвагинальной пункции, все пациентки основной группы были разделены на четыре подгруппы.

В 1-ю подгруппу вошли 29 женщин (23,0%), у которых было получено 3 и менее овоцита, то есть имело место ослабление реакции яичников на индукторы фолликулогенеза – так называемый

«бедный ответ». У 46 пациенток (36,5%) количество овоцитов составило 4–7 (2-я подгруппа). От 8 до 11 овоцитов было получено у 27 женщин (21,3%, 3-я подгруппа). Двадцать четыре пациентки (19,0%) с максимальным фолликулярным ответом (12 и более овоцитов) объединены в 4-ю подгруппу.

Средний возраст женщин всех четырех подгрупп был сопоставим:  $32,6 \pm 2,4$  года – в 1-й,  $36,2 \pm 5,8$  года – во 2-й,  $31,4 \pm 4,3$  года – в 3-й,  $30,1 \pm 4,0$  года – в 4-й.

Анализ распространенности аллелей генов HLA II класса показал, что у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием достоверно чаще, чем у здоровых женщин, встречается аллель DQB1\*10 (4,0 и 0,0% соответственно,  $p < 0,05$ ). Вместе с тем, в основной группе по сравнению с контрольной отмечалась меньшая распространенность аллелей группы DQB1\*03 (21,1 и 36,7% соответственно,  $p < 0,05$ ), а именно DQB1\*0301/4 (15,1 и 21,9% соответственно), DQB1\*0302 (1,6 и 9,6% соответственно,  $p < 0,05$ ), DQB1\*0303 (4,4 и 5,3% соответственно). Полученные данные позволили высказать предположение о протективном значении аллелей группы DQB1\*03 для репродуктивного потенциала женского организма.

Результаты анализа полиморфизма генов главного комплекса гистосовместимости, проведенного в подгруппах женщин с различным фолликулярным ответом на индукцию суперовуляции, представлены в таблице.

Согласно результатам молекулярно-генетического обследования, у женщин со сниженным и умеренным фолликулярным ответом (1-я и 2-я подгруппы) достоверно чаще, чем у пациенток, у которых после применения индукторов фолликулогенеза было получено 12 и более овоцитов (4-я подгруппа), в генотипе присутствует аллель DQA1\*0201. Корреляционный анализ с оценкой коэффициента  $\tau$  Кендалла показал наличие обратной статистически достоверной сильной связи между частотой встречаемости в генотипе аллели DQA1\*0201 и количеством полученных при индукции суперовуляции овоцитов (коэффициент корреляции  $\tau = -0,95$ ,  $p < 0,05$ ).

Вместе с тем, у здоровых женщин и женщин основной группы с хорошим ответом на индукцию суперовуляции (4-я подгруппа) достоверно чаще, чем у пациенток 1-й и 2-й подгрупп, в генотипе имелась аллель DQB1\*03 ( $p < 0,05$ ). В результате проведенного корреляционного анализа с оценкой коэффициента  $\tau$  Кендалла выявлена прямая, близкая к достоверной корреляционная связь между распространенностью аллели DQB1\*03 и наличием ответа яичников на индукцию су-

**Таблица.** Распространенность аллелей HLA II класса в подгруппах основной группы и в контрольной группе

Аллели	Распространенность, %				
	в основной группе				в контрольной группе
	в 1-й подгруппе	во 2-й подгруппе	в 3-й подгруппе	в 4-й подгруппе	
DQA1*0201	12,1*	18,5**	7,4	2,1	11,0
DQB1*03	24,1***	23,9***	27,8	33,3	36,7
DQB1*0301/4	19,0	12,0**	13,0	29,2	21,9

*Примечание.* Статистическая значимость различий по сравнению с 4-й подгруппой: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ ; по сравнению с контрольной группой: \*\*\* –  $p < 0,05$ .

перовуляции (коэффициент корреляции  $\tau = 0,74$ ,  $p = 0,071$ ). Установлена достоверно более высокая частота встречаемости аллели DQB1\*0301/4 у пациенток 4-й подгруппы по сравнению с женщинами 2-й подгруппы; показано наличие прямой, близкой к достоверной корреляционной связи между присутствием в генотипе женщины данной аллели и хорошим фолликулярным ответом (коэффициент корреляции  $\tau = 0,53$ ,  $p = 0,197$ ).

## ВЫВОДЫ

Таким образом, можно предположить, что полиморфные варианты генов системы HLA II класса причастны к формированию и сохранению овариального резерва. Роль антигенов HLA в нарушении репродукции человека остается спорным вопросом. В научной литературе есть данные о накоплении определенных полиморфных вариан-

тов генов главного комплекса гистосовместимости у лиц с различными нарушениями репродуктивной функции [2, 5–8, 11, 13, 14, 17].

Полученные нами результаты свидетельствуют о возможной ассоциации между выявленными особенностями полиморфизма генов системы HLA II класса и состоянием фолликулогенеза. Установленные особенности генотипа женщин с нормальным и сниженным фолликулярным резервом могут использоваться как генетические маркеры предрасположенности к формированию потенциала для последующего эмбрионального развития. Раннее генетическое тестирование пациенток, нуждающихся в лечении бесплодия с помощью вспомогательных репродуктивных технологий, позволит более взвешенно решать вопрос о возможности и целесообразности применения данных технологий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению / под ред. В. И. Кулакова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 616 с.
2. Габибуллаева З. Г. Клинико-генетическая характеристика больных с преждевременной недостаточностью яичников: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2008. – 28 с.
3. Локшин В. Н., Карибаева Ш. К., Полумисков В. Е. Бедный ответ в программе экстракорпорального оплодотворения // Материалы VIII Российского форума «Мать и дитя». – М., 2006. – С. 438.
4. Милютин М. А., Калинина Е. А., Кузьмичев Л. Н. Оценка овариального резерва у пациенток со сниженной реакцией яичников на стимуляторы овуляции в программе ЭКО и ПЭ // Материалы VIII Российского форума «Мать и дитя». – М., 2006. – С. 456.
5. Полиморфизм генов HLA II класса в семьях с нормальной и нарушенной репродукцией / И. Н. Фетисова [и др.] // Материалы VIII конгресса «Мать и дитя». – М., 2006. – С. 547–548.
6. Роль антигенов II класса главного комплекса гистосовместимости в привычном невынашивании беременности / Т. С. Бескоровайная [и др.] // Пробл. репродукции. – 2006. – № 2. – С. 46–54.
7. Фетисова И. Н. Наследственные факторы при различных формах нарушения репродуктивной функции супружеской пары: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2007. – 40 с.
8. Фетисова И. Н., Добрынина М. Л., Дюжев Ж. А. Полиморфизм генов HLA II класса в семьях с привычной потерей беременности // Медицинская иммунология. – 2006. – Т. 8, № 2–3. – С. 323–324.
9. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского бесплодия (теоретические и практические подходы): рук-во для врачей / под ред. В. И. Кулакова, Б. В. Леонова. – М., 2001. – 782 с.
10. Anti-Mullerian Hormone (AMH) levels in serum and follicular fluid as predictors of ovarian response in stimulated (IVF and ICSI) cycles / A. Tolikas [et al.] // Hum. Fertil. (Camb). – 2011. – Vol. 14 (4). – P. 246–253.
11. Bao X., Wang W. J., Dai N. Study of the correlation between 51 immune infertility patients of the Han nationality in Anhui and HLA-DQA1 gene and treatment

- of Mianbu III // *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* – 2011. – Vol. 31 (3). – P. 334–337.
12. Elder K. T. Avery S., Mills C. *IVF Laboratory Procedures.* – Bourn-Hallam Group. Broadwater Press Ltd., 1990. – P. 23.
  13. HLA class II and mannan-binding lectin gene polymorphism in recurrent miscarriage / O. B. Christiansen [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2004. – Vol. 51. – P. 459.
  14. Keramitsoglou T. HLA-DQA1 allele sharing between partners in different groups of subfertile couples // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2004. – Vol. 51. – P. 494–495.
  15. Sheikhha M. H., Eftekhar M., Kalantar S. M. Investigating the association between polymorphism of follicle-stimulating hormone receptor gene and ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation // *J. Hum. Reprod. Sci.* – 2011. – Vol. 4 (2). – P. 86–90.
  16. The genetics and cell biology of fertilization / B. D. Geldziler [et al.] // *Methods Cell Biol.* – 2011. – Vol. 106. – P. 343–375.
  17. Treatment of recurrent IVF failure and human leukocyte antigen similarity by intravenous immunoglobulin / T. Elram [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2005. – Vol. 11 (6). – P. 745–749.