

## Streszczenie w języku polskim

Niepowodzenia rozrodu, w tym poronienia i porody przedwczesne, są jednymi z częściej występujących powikłań położniczych, z którymi ginekolodzy stykają się w codziennej praktyce. Stany te mogą wynikać z niewłaściwej odpowiedzi immunologicznej, chorób podstawowych ciąży, nieprawidłowości genetycznych, zarówno dziedzicznych jak i ograniczonych do płodu. Mimo rozwoju metod diagnostycznych oraz wdrażania leczenia przyczynowego często nie udaje się uzyskać prawidłowo przebiegającej ciąży i w efekcie narodzin zdrowego dziecka. Uznaje się, że około 50% poronień ma etiologię niewyjaśnioną, przez co brak jest możliwości leczenia celowanego.

Coraz częściej, oprócz standardowej diagnostyki położniczej, stosuje się m.in. ocenę polimorfizmów i wariantów genetycznych, w tym próbuje się określić znaczenie ludzkich antygenów leukocytarnych (HLA – Human Leukocyte Antigens). Do analizy przeprowadzonej w ramach niniejszej pracy wybrano polimorfizm HLA-DQ2/DQ8, wykonywany w badaniach diagnostycznych przy podejrzeniu choroby trzewnej. Genetyczna podatność na rozwój choroby trzewnej jest determinowana poprzez układ HLA klasy II DQ2 i DQ8, odpowiedzialny za prezentowanie antygenów przez limfocyty T, które związane są z produkcją prozapalnego INF- $\gamma$  i limfocytów B, odpowiedzialnych za produkcję przeciwciał przeciw transglutaminazie tkankowej oraz przeciwciał endomizjalnych. Limfocyty T mają wpływ na uzyskanie immunotolerancji płodowej oraz utrzymanie, niezbędnej dla prawidłowego przebiegu ciąży, odpowiedniej równowagi między limfocytami Th1 oraz Th2. Mechanizmem, który łączy zaburzenia immunologiczne z występowaniem poronień nawracających są: obecność stanu zapalnego oraz zmiany zakrzepowozatorowe tętnicze lub żyłne powstające na skutek różnych mechanizmów w tym: aktywacji komórek śródbłonna, monocytów, płytek krwi i szlaków układu dopełniacza, a także hamowanie szlaków fibrynolitycznych i przeciwzakrzepowych.

Celem niniejszej pracy była analiza wybranych parametrów immunologicznych oraz przebiegu ciąży w odniesieniu do nosicielstwa polimorfizmu HLA-DQ2/DQ8 u kobiet z poronieniami nawykowymi. Został on zrealizowany przez następujące cele cząstkowe:

1. Ocenę różnic w parametrach biometrycznych płodu w badaniu przesiewowym w I trymestrze ciąży wraz z oceną testu podwójnego między kobietami z nawracającymi utratami ciąży posiadającymi polimorfizm HLA-DQ2/DQ8 oraz tymi, które go nie posiadały.
2. Analizę wpływu polimorfizmu HLA-DQ2/DQ8 na występowanie zaburzeń alloimmunologicznych poprzez ocenę immunofenotypu (procentowego udziału limfocytów B, limfocytów T, komórek NK; współczynnika limfocytów CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD4+/CD8+) u kobiet z nawracającymi utratami ciąży.
3. Analizę wpływu polimorfizmu HLA-DQ2/DQ8 na występowanie zaburzeń autoimmunologicznych wraz z oceną przeciwciał przeciwtarczycowych (aTPO oraz aTG), przeciwciał antyfosfolipidowych (przeciwciał antykardiolipinowych aCL w klasie IgG i IgM oraz antykoagulantu tocznia LA), oraz autoprzeciwciał przeciwjądrowych ANA u kobiet z nawracającymi utratami ciąży.

Do badania zakwalifikowano kobiety z 2 lub więcej poronieniami, będące pacjentkami poradni Patologii Ciąży w Centrum Ginekologii, Położnictwa i Neonatologii w Opolu w latach 2016-2018, u których ostatecznie uzyskano ciążę. Badanie skriningowe USG w I trymestrze ciąży wykonano zgodnie z zaleceniami PTG między 11+0 – 13+6 tygodniem ciąży. Ocena wyników badań prenatalnych została dokonana na podstawie następujących informacji: długości ciemieniowo-siedzeniowej płodu (CRL – *Crown Rump Length*), przezierności karku (NT - Nuchal Translucency), częstości rytmu serca płodu (FHR – *Fetal Heart Rate*) oraz indeksu pulsacji (PI – *Pulsality Index*) w przewodzie żylnym (DV - *Ductus Venosus*) DV[PI]. Pacjentki miały także wykonany test podwójny. Do określenia dobrostanu noworodka wykorzystano punktację Apgar oraz jego masę urodzeniową ciała.

Do badań zgłosiło się 105 pacjentek. Udział w dalszym badaniu wykluczały zaburzenia chromosomalne u płodu lub u rodziców oraz zdiagnozowane wady rozwojowe dziecka. Do dalszych badań zakwalifikowano 95 kobiet. Kobiety zostały przydzielone do grupy badanej i kontrolnej na podstawie obecności polimorfizmu HLA-DQ2/DQ8 (grupa badana N=49) lub jego braku (grupa kontrolna N=46). Oznaczenie obecności alleli HLA-DQ2/DQ8 wykonywane było przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Analizowano następujące allele: HLA-DQ2.2: DQA1\*02/DQB1\*02; HLA-DQ2.5: DQA1\*05/DQB1\*02; HLA-DQ8: DQA1\*03/DQB1\*03:02.

W celu określenia obecności zaburzeń alloimmunologicznych zlecono ocenę profilu limfocytów krwi i zbadano odsetek limfocytów oraz ich subpopulacji: limfocytów B (CD19+), limfocytów T (CD3+), współczynnika limfocytów CD3+/CD4+, współczynnika limfocytów CD3+/CD8+, współczynnika limfocytów CD4+/CD8+, odsetka komórek NK (CD3-/CD16+/56+) oraz zlecono test limfocytotoksyczny (LCT).

Aby ocenić obecność zaburzeń autoimmunologicznych wykonano badanie poziomu przeciwciał aTPO wraz z aTG oraz badania biochemiczne w kierunku zespołu antyfosfolipidowego.

Wykazałam, że grupa objęta badaniem była jednorodna pod kątem: wieku, BMI, liczby poronień, liczby ciąż ogółem i częstością zakażeń *Ureaplasma* ssp., *Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp. oraz HPV. Nie wykazałam różnic między czasem trwania ciąży, wagą urodzeniową oraz punktacją Apgar noworodków matek z grupy badanej i kontrolnej.

Wykazałam, że płody matek z grupy badanej miały istotnie statystycznie wyższy pomiar NT niż płody matek należących do grupy kontrolnej (1,85 mm vs 1,50 mm,  $p=0,0024$ ). Istotnie statystycznie szersze NT w stosunku do grupy kontrolnej występowało u kobiet posiadających polimorfizm HLA-DQ2.2 (1,95 mm vs 1,50 mm;  $p=0,0304$ ). Nie wykazałam różnic między grupą badaną a kontrolną w parametrach ultrasonograficznych: CRL, FHR i współczynnikiem DV[PI]. Jednocześnie nie jest wykluczone, że polimorfizm HLA-DQ2/DQ8 miał pośrednio wpływ na zwiększenie szerokości NT poprzez np. predyspozycję do wystąpienia zaburzeń immunologicznych, choć wymaga to dalszych badań. W grupie badanej, ale nie kontrolnej, przezierność karku płodu korelowała negatywnie z: punktacją Apgar, wagą urodzeniową dziecka, poziomem wolnej podjednostki  $\beta$ HCG oraz korelowała pozytywnie z: pomiarem CRL, odsetkiem limfocytów T (IMK T%) i stężeniem antykoagulantu toczenia.

Wykonane badania biochemiczne obejmujące: stężenie wolnej podjednostki  $\beta$ HCG, wskaźnika [MoM] wolnej podjednostki  $\beta$ HCG, stężenia PAPPa, wskaźnika [MoM] PAPPa były podobne dla grupy badanej i kontrolnej.

Badając parametry zaburzeń autoimmunologicznych wykazałam, że pacjentki z grupy badanej w stosunku do grupy kontrolnej miały wyższy poziom przeciwciał aCL w klasie IgG (18,38 gpl vs 11,37 gpl;  $p=0,0039$ ). Stężenie aCL w klasie IgG korelowało z liczbą ciąż ( $r=0,3217$ ,  $p=0,0274$ ) w grupie kobiet badanych oraz ze

stężeniem aCL w klasie IgM w obu grupach ( $r=0,3656$ ,  $p=0,0115$  w badanej oraz  $r=0,5491$ ,  $p=0,001$  w kontrolnej). Po analizowaniu oddzielnie stężeń przeciwciał aCL w klasie IgG dla poszczególnych genotypów nie wykazano konkretnego polimorfizmu mającego wpływ na uzyskane wyniki. Nie wykazałam różnic między kobietami posiadającymi polimorfizm HLA-DQ2/DQ8 a grupą kobiet kontrolnych w zakresie obecności przeciwciał aCL w klasie IgM oraz ANA2. Jednocześnie stężenie przeciwciał aCL w klasie IgG oraz LA w obu grupach było wyższe w stosunku do wartości referencyjnych, sugerując potencjalny wpływ zespołu antyfosfolipidowego na zaburzenia rozrodu.

Wykazałam, że kobiety z polimorfizmem HLA-DQ2/DQ8, miały wyższy poziom przeciwciał aTPO niż kobiety bez tego polimorfizmu (87,67 IU/ml vs 11,87 IU/ml;  $p=0,0062$ ). Parametr ten dodatkowo korelował w grupie badanej z wagą urodzeniową noworodka i FHR. Analiza stężeń aTPO oddzielnie dla poszczególnych genotypów wykazała, że istotnie statystycznie podniesione stężenie aTPO w stosunku do grupy kontrolnej występowało u kobiet posiadających polimorfizm HLA-DQ2.2 (210,77 IU/ml vs 11,87 IU/ml;  $p=0,0131$ ). Jednocześnie nie wykazałam różnic w stężeniu przeciwciał aTG między grupą badaną a kontrolną.

Wykazałam, że zaburzenia alloimmunologiczne nie były wiodącym zaburzeniem wykrytym u pacjentek. Nie wykazałam różnic między grupą badaną a grupą kontrolną w profilu immunofenotypu oraz teście LCT co sugeruje brak wpływu polimorfizmu HLA-DQ2/DQ8 na badane wykładniki zaburzeń alloimmunologicznych u badanych kobiet z RPL.

Wyniki analizy wykazały, że w badanej grupie kobiet z poronieniami nawykowymi występowanie polimorfizmu HLA-DQ2/DQ8 jest 1,5-2x częstsze w stosunku do populacji ogólnej. Zaobserwowałam, że u płodów matek z obecnym polimorfizmem HLA-DQ2.2. występuje istotnie statystycznie większa szerokość NT w porównaniu do grupy kobiet kontrolnych. Wykazałam istotny statystycznie związek między polimorfizmem HLA-DQ2/DQ8, a podwyższonym stężeniem wykładników zaburzeń autoimmunologicznych, takich jak aTPO oraz aCL w klasie IgG a także istnienie związku między stężeniem aTPO a wyższą wagą urodzeniową dziecka. Nie wykazałam natomiast powiązania między polimorfizmem HLA-DQ2/DQ8 a zwiększonym ryzykiem zaburzeń alloimmunologicznych.

## Streszczenie w języku angielskim

Reproductive failures, including miscarriages and premature births, are one of the more common obstetric complications faced by gynecologists in their daily practice. These conditions can result from an inappropriate immune response, the other diseases of a pregnant woman, and also genetic abnormalities, including hereditary ones and those that concern only the fetus. Despite the development of diagnostic methods, and the implementation of causal treatment, it is often not possible to achieve a properly running pregnancy and the birth of a healthy child. Approximately 50% of miscarriages are considered to have an unexplained etiology, which means that there is no possibility of targeted treatment.

More and more often, in addition to standard obstetric diagnostics, the assessment of polymorphisms and genetic variants that include attempts to determine the importance of human leukocyte antigens (HLA) are used. HLA-DQ2/DQ8 polymorphism, which is performed in diagnostic tests when celiac disease is suspected, was selected for the analysis carried out in this study. Genetic susceptibility to the development of celiac disease is determined by the HLA class II DQ2 and DQ8 system, which is responsible for the presentation of antigens by lymphocytes T, associated with the production of pro-inflammatory INF- $\gamma$ , and also lymphocytes B, which are responsible for the production of antibodies against tissue transglutaminase and endomysial antibodies. Lymphocytes T influence the fetal immunotolerance and the maintenance of the appropriate balance between lymphocytes Th1 and Th2, which is necessary for the appropriate course of a pregnancy. The mechanism that links immunological disorders with the occurrence of recurrent miscarriages is the presence of inflammation and arterial or venous thromboembolic changes, which result from various mechanisms, including: the activation of endothelial tissues, monocytes, platelets, and pathways of the complement system, as well as the inhibition of fibrinolytic and anticoagulants pathways.

The aim of this study was to analyse selected immunological parameters and the course of pregnancy in relation to the carrier of HLA-DQ2/DQ8 polymorphism in women who have had recurrent miscarriages. The aim was achieved through the following sub-goals:

1. The evaluation of differences in the biometric parameters of the fetus during the screening test in the first trimester of pregnancy, and also the assessment of the double test in the case of women with recurrent pregnancy losses (RPL) who have HLA-DQ2/DQ8 polymorphism, as well as those who do not have it.
2. The analysis of the influence of HLA-DQ2/DQ8 polymorphism on the occurrence of alloimmunological disorders by assessing the immunophenotype [percentage of lymphocytes B, lymphocytes T, natural killer (NK) cells, and also lymphocyte coefficients: CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD4+/CD8+] in women with RPL.
3. The analysis of the impact of HLA-DQ2/DQ8 polymorphism on the occurrence of autoimmune disorders, including the assessment of anti-thyroid antibodies [anti-thyroid peroxidase antibodies (aTPO) and anti-thyroglobulin (aTG)], antiphospholipid antibodies [anticardiolipin antibodies (aCL) in class IgG and IgM, and lupus anticoagulants), and antinuclear antibodies (ANA) among women suffering from miscarriages.

The study included women who had had 2 or more miscarriages and who were patients of the Pregnancy Pathology Clinic at the Gynecology, Obstetrics and Neonatology Centre in Opole between 2016 and 2018, and who had also managed to become pregnant. A screening ultrasound in the first trimester of pregnancy was performed between weeks 11+0 – 13+6 of their pregnancy in accordance with the recommendations of the Polish Gynecological Society. The evaluation of prenatal test results was conducted on the basis of the following information: the crown rump length (CRL), nuchal translucency (NT), fetal heart rate (FHR), and the pulsatility index (PI) in ductus venosus (DV[PI]). The patients were also subjected to a double test. The Apgar score and the birth weight were used to determine the well-being of a newborn.

A total of 105 patients volunteered for the study. Participants were excluded from the study if there were chromosomal abnormalities in the fetus or in the parents, and also if malformations of the child were diagnosed. Therefore, 95 women were qualified for further research. Women were assigned to the study and control groups on the basis of the presence of HLA-DQ2/DQ8 polymorphism (the research group N=49), or its absence (the control group N=46). The determination of the presence of HLA-DQ2/DQ8 alleles was performed using the polymerase chain reaction (PCR).

The following alleles were analysed: HLA-DQ2.2: DQA1\*02/DQB1\*02; HLA-DQ2.5: DQA1\*05/DQB1\*02; HLA-DQ8: DQA1\*03/DQB1\*03:02.

In order to determine the presence of alloimmune disorders, an assessment of the blood lymphocyte profile and a lymphocytotoxic test (LCT) were performed, and the percentage of lymphocytes and their subpopulations: lymphocytes B (CD19+), lymphocytes T (CD3+), lymphocytes factor CD3+/CD4+, lymphocytes factor CD3+/CD8+, lymphocytes factor CD4+/CD8+, and also the percentages of NK cells (CD3-/CD16+/56+), were also evaluated.

The level of aTPO and aTG antibodies was determined, and biochemical tests for antiphospholipid syndrome were performed in order to assess the presence of autoimmune disorders.

It was shown that the research group was homogeneous in terms of: age, BMI, number of miscarriages, total number of pregnancies, and the frequency of *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp. and human papillomavirus infection infections. No differences between the duration of pregnancy, birth weight and the Apgar score of the newborns were found in the case of the mothers from the study and control groups.

It was shown that the fetuses of the mothers from the study group had a statistically significantly higher NT measurement than those of the mothers from the control group (1.85 mm vs 1.50 mm,  $p=0.0024$ ). A statistically significantly higher NT in relation to the control group was observed in the women with HLA-DQ2.2 polymorphism (1.95 mm vs 1.50 mm;  $p=0.0304$ ). No differences between the study group and the control group regarding the CRL, FHR and DV[PI] ultrasound parameters were found. At the same time, it cannot be excluded that HLA-DQ2/DQ8 polymorphism indirectly influenced the increase in the width of NT by e.g. a predisposition to develop immune disorders. However, this fact requires further studies. In the study group, the nuchal scan negatively correlated with the Apgar score, the newborn's birth weight, and the free  $\beta$ HCG sublevel; and positively correlated with the CRL measurement, the percentage of lymphocytes T (IMK T%), and the lupus anticoagulant (LA) concentration.

The performed biochemical tests, which included: the free  $\beta$ -human chorionic gonadotropin (HCG) sublevel, the multiple of the median (MoM) index of the free  $\beta$ HCG sublevel, the PAPPa concentration, and the MoM index PAPPa, were similar in the case of the study and control groups.

When examining the parameters of autoimmune disorders, it was shown that the patients from the study group had a higher level of aCL in the IgG class when compared to the control group (18.38 GPL vs 11.37 GPL;  $p=0.0039$ ). The concentration of aCL in the IgG class correlated with the number of pregnancies ( $r=0.3217$ ,  $p=0.0274$ ) in the study group, and with the concentration of aCL in the IgM class in both groups ( $r=0.3656$ ,  $p=0.0115$  in the study group, and  $r=0.5491$ ,  $p=0.001$  in the control group). After separately analysing the concentrations of aCL in the IgG class for individual genotypes, no specific polymorphism that influenced the obtained results was demonstrated. No differences between women with HLA-DQ2/DQ8 polymorphism and the control group in the presence of aCL in the IgM and ANA2 class were found. At the same time, the concentration of aCL in the IgG and LA class in both groups was higher than the control values, which could suggest the potential influence of antiphospholipid syndrome on reproductive disorders.

It was indicated that the women with HLA-DQ2/DQ8 polymorphism had higher levels of aTPO when compared to the women without this polymorphism (87.67 IU/mL vs 11.87 IU/mL,  $p=0.0062$ ). This parameter positively correlated with the newborn's birth weight and the FHR in the study group. The analysis of aTPO concentrations, which was conducted separately for individual genotypes, showed that statistically significant elevated aTPO concentrations, when compared to the control group, occurred in the women with HLA-DQ2.2 polymorphism (210.77 IU/mL vs 11.87 IU/mL,  $p=0.0131$ ). At the same time, no differences in the concentrations of aTG between the study group and the control group were found.

It was shown that alloimmune disorders were not the leading disorder detected in the patients. No differences between the study group and the control group in the immunophenotype profile and the LCT test were found. This suggests no influence of HLA-DQ2/DQ8 polymorphism on the examined markers of alloimmunological disorders in the studied women with RPL.

The results of the analysis showed that in the studied group of women with habitual miscarriages, the occurrence of HLA-DQ2/DQ8 polymorphism is 1.5-2 times more frequent than in the general population. It was observed that there is a statistically significantly greater width of NT in the fetuses of the women with HLA-DQ2.2 polymorphism when compared to the control group. A statistically significant relationship between HLA-DQ2/DQ8 polymorphism and the increased concentrations of indicators of autoimmune disorders, such as aTPO and aCL in the



IgG class, was indicated. Moreover, the existence of a relationship between aTPO concentration and a higher birth weight of a newborn was also shown. However, no association between HLA-DQ2/DQ8 polymorphism and an increased risk of autoimmune disorders was found.