



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 48932

(13) A

(51) 6 G01N33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ЗАПЛІДНЕННЯ ООЦИТІВ ПРИ ЛІКУВАННІ БЕЗПЛІДНОСТІ В ПРОГРАМІ
ЗАПЛІДНЕННЯ IN VITRO

1

2

(21) 2002075610

(22) 08 07 2002

(24) 15 08 2002

(46) 15 08 2002, Бюл. № 8, 2002 р.

(72) Грищенко Микола Григорович, Петрушко Ма-
рина Павлівна, Піняєв Володимир Іванович, Ря-
занцев Володимир Васильович(73) ХАРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ(57) Спосіб прогнозування запліднення ооцитів при
лікуванні безплідності в програмі запліднення in
vitro, що включає реєстрацію підвищення інтенси-
вності процесів перекисного окислення ліпідів у

фолікулярній рідині, що знижує частоту запліднен-
ня ооцитів in vitro, який відрізняється тим, що
здатність ооцитів до запліднення прогнозують по
активності процесів перекисного окислення ліпідів,
оцінюючи концентрації малонового діальдегіду
(МДА) та дієнових кон'югатів (ДК), і при значеннях
МДА $3,14 \pm 0,12$ нМоль/л, а ДК $11,2 \pm 0,37$
мкМоль/л прогнозують 0 - 33,3% запліднення оо-
цитів, при значеннях концентрації МДА $2,04 \pm 0,12$
нМоль/л, а ДК $8,76 \pm 0,59$ мкМоль/л прогнозують
33,4 - 66,6%, при значеннях концентрації МДА $1,97$
 $\pm 0,09$ нМоль/л, а ДК $8,41 \pm 0,59$ мкМоль/л прогно-
зують 66,7 - 100% запліднення ооцитів

Винахід відноситься до медицини, а саме до
акушерства та гінекології і може бути використа-
ний в прогнозуванні ефективності запліднення
ооцитів при лікуванні безплідності в програмі за-
пліднення in vitro

Відома велика кількість патологічних станів,
при яких єдиним ефективним методом лікування
безплідності є програма запліднення in vitro. В да-
ний час ця технологія отримала широке розповсю-
дження в усьому світі. Ефективність лікування
безплідності методом запліднення in vitro досягає
в середньому 20 - 30% у розрахунок на одну спро-
бу (Лечение бесплодия методом экстракорпора-
льного оплодотворения / В.И. Грищенко, В.И. Пи-
няев, М.П. Петрушко, Л.И. Луцкая, И.В. Терпячая //
Актуальные вопросы репродуктологии и криоме-
дицины, — X, 1998. С. 135 - 138, Dale B., Elder K.,
In vitro fertilization // Cambridge university press —
1997 — P. 102 - 107)

З огляду на високу медичну і соціальну ваго-
мість проблеми безплідності, актуальним є пошук
причин невдач метода запліднення in vitro із ме-
тою підвищення ефективності лікування

Не викликає сумніву, що морфологічна і функ-
ціональна повноцінність ооцитів, отриманих у ре-
зультаті індукції овуляції і використаних для пода-
льшого запліднення in vitro, є чинником,
необхідним для успішного лікування безплідності в
програмі запліднення in vitro. Фолікулярна рідина є
природним середовищем, у якому відбувається
ріст і дозрівання ооциту. Склад фолікулярної ріди-

ни не є постійним. Динамічні біохімічні зміни, що
відбуваються в ФР, здійснюють регуляцію і син-
хронізацію процесів дозрівання ооциту, овуляції,
активації моторики маткових труб

Склад фолікулярної рідини може служити біо-
хімічним дзеркалом і відображати не тільки мор-
фологічний, але і функціональний стан ооциту,
його здатність до запліднення і розвитку повноцін-
ного ембріона, або служити інструментом для про-
гнозування ефективності лікування безплідності

Так, наприклад, відомий спосіб оцінки якості та
ефективності процесів овуляції, дозрівання ооци-
тів, взаємодії гамет по активності перекисного оки-
слювання ліпідів в фолікулярній рідині (Takami M.,
Preston S L., Toyloy V A., Behman H R. Antioxidants
reversibly inhibit the spontaneous resumption of
meiosis // Am J Physiol — 1999 — V 276 — P 84
- 88)

Відомо також, що процеси перекисного окис-
лювання ліпідів потенційно небезпечні і відіграють
ведучу роль у розвитку багатьох патологічних ста-
нів (Sadani G R., Nadkarni G D. Role of tissue
antioxidant defence in thyroid cancers // Cancer Lett
— 1996 — V 109 — P 231 - 235). Існують дані, що
оксидативний стрес негативно впливає на розви-
ток ембріонів людини in vitro (Guerin P., El
Mouatassim S., Menezo Y. Oxidative stress and
protection against reactive oxygen species in the
preimplantation embryo and its surroundings // Hum
Reprod Update — 2001 — №7 — P 175 - 189)

Встановлено, що реактивні кисневі сполуки

(13) A

(11) 48932

(19) UA

безпосередньо або побічно беруть участь у процесі дозрівання ооцитів, і їх синтез є важливим регулюючим фактором. Пригнічення процесів перекисного окислювання ліпідів у фолікулярній рідині блокує спонтанне поновлення мейотичного ділення ооцитів, а неконтрольоване підвищення інтенсивності процесів перекисного окислювання ліпідів у фолікулярній рідині негативно впливає на ооцит, зменшуючи його здатність до запліднення *in vitro*, і погіршує морфологію ембріонів у програмі запліднення *in vitro*.

Вищезгаданий спосіб оцінки здатності ооцитів до запліднення *in vitro*, у якому інструментом слугує інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів, є найбільш близьким по технологічній суті і результату, який може бути досягнутим до того, що заявляється, тому його обрано в якості прототипу.

Основним недоліком відомих аналогів, в тому числі і прототипу, є те, що вони відмічають тенденції та властивості процесів перекисного окислення ліпідів, що протікають в фолікулярній рідині в програмі запліднення *in vitro*, даючи їм якісну оцінку, але неспроможні точно спрогнозувати здатність ооцитів до запліднення із-за відсутності кількісної оцінки активності процесів перекисного окислення ліпідів.

У зв'язку з вищевикладеним, в основу винаходу покладено задачу підвищення точності прогнозування запліднення ооцитів при лікуванні безплідності в програмі запліднення *in vitro* шляхом кількісної оцінки інтенсивності або активності процесів перекисного окислення ліпідів в фолікулярній рідині.

Задача, яку покладено в основу винаходу, вирішується тим, що у відомому способі, що включає реєстрацію підвищення інтенсивності процесів перекисного окислювання ліпідів у фолікулярній рідині, згідно з винаходом, запліднення ооцитів *in vitro* прогнозують по активності процесів перекисного окислювання ліпідів, оцінюючи концентрації малонового діальдегіду (МДА) та дієнових кон'югатів (ДК) і при значеннях МДА - $3,14 \pm 0,12$ нМоль/л, а ДК - $11,2 \pm 0,37$ мкМоль/л прогнозують 0 - 33,3% запліднення ооцитів, при значеннях концентрації МДА - $2,04 \pm 0,12$ нМоль/л, а ДК - $8,76 \pm 0,59$ мкМоль/л прогнозують 33,4 - 66,6%, при значеннях концентрації МДА - $1,97 \pm 0,09$ нМоль/л, а ДК $8,41 \pm 0,59$ мкМоль/л прогнозують 66,7 - 100% запліднення ооцитів.

Можливість підвищення точності прогнозу була одержана завдяки кількісній оцінці активності процесів перекисного окислення ліпідів у фолікулярній рідині.

МДА і ДК були обрані нами для оцінки інтенсивності процесів перекисного окислення ліпідів в зразках фолікулярної рідини, яку досліджували тому, що ДК є ранніми продуктами перекисного окислення ліпідів, тоді як МДА - кінцевий продукт, їхні виміри дозволяють комплексно оцінити перекисні процеси в матеріалі, що досліджується.

Спосіб виконують наступним чином.

Перед початком лікування всі безплідні подружні пари обстежують за загальноприйнятою методикою. Серед спеціальних методів дослідження в обов'язковому порядку здійснюють ди-

намичне ультразвукове сканування органів малого тазу. Дослідження проводять за допомогою вагінального секторального датчика з частотою сканування 7МГц.

При індукції овуляції використовують загальноприйняті протоколи з наборами препаратів ФСГ (Metrodin, "Serono") і аналогів гонадотропін - рилинг гормону (Suprefact, "Hoechst"). Через 34 - 35 годин після введення тригерної дози ЧХГ (Profasi, "Serono") під ультразвуковим контролем здійснюють пункцію фолікулів і аспірацію ооцитів.

Відразу ж після пункції виявлені ооцити переносять з фолікулярної рідини у чисте середовище для куптивування. У зразках фолікулярної рідини оцінюють процеси перекисного окислення ліпідів, та прогнозують здатність ооцитів до запліднення *in vitro*.

Для оцінки інтенсивності процесів перекисного окислення ліпідів у фолікулярній рідині використовують методи, що виявляють продукти перекисного окислення у досліджуваному середовищі, а саме, метод виміру концентрації продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою. Продуктом, взаємодіючим із тіобарбітуровою кислотою, є МДА або його похідні. Визначення МДА здійснюють за методом В.Б. Гаврилова та співавторів. Концентрацію МДА розраховують відповідно до методики М.С. Гончаренко та співавторів. Також використовують метод кількісного визначення ДК за методом В.Е. Каган.

При значеннях МДА - $3,14 \pm 0,12$ нМоль/л, а ДК - $11,2 \pm 0,37$ мкМоль/л прогнозують 0 - 33,3% запліднення ооцитів, при значеннях концентрації МДА - $2,04 \pm 0,12$ нМоль/л, а ДК - $8,76 \pm 0,59$ мкМоль/л прогнозують 33,4 - 66,6%, при значеннях концентрації МДА - $1,97 \pm 0,09$ нМоль/л, а ДК $8,41 \pm 0,59$ мкМоль/л прогнозують 66,7 - 100% запліднення ооцитів.

Вищевказані значення концентрації МДА та ДК були одержані експериментальним шляхом. Були сформовані клінічні групи з різним відсотком запліднення ооцитів *in vitro*.

Результати визначення МДА і ДК у виділених групах представлено в таблиці.

Таблиця

Клінічні групи	МДА нМоль/л М ± м	ДК мкМоль/л М ± м
1 група 66,7 - 100% запліднення (n = 30)	$1,97 \pm 0,09$	$8,41 \pm 0,59$
2 група 33,4 - 66,6% запліднення (n = 30)	$2,04 \pm 0,12$	$8,76 \pm 0,59$
3 група 0 - 33,3% запліднення (n = 30)	$3,14 \pm 0,12$	$11,2 \pm 0,37$

Зазначені дані свідчили про значне підвищення маркерів оксидативного стресу у фолікулярній

рідині, одержаної в групах з низьким відсотком запліднення ооцитів *in vitro*. Достовірність розходжень оцінювали з використанням критеріїв Фішера-Ст'юдента. Досліджені групи статистично не відрізнялися за віком пацієнток, кількістю отриманих ооцитів і морфофункціональними властивостями еякуляту партнерів.

Статистичне достовірних розходжень між 1-й і 2-й групою за концентрацією МДА не було виявлено ($P > 0,05$). Розходження за рівнем ДК між першою і другою групами були достовірними ($P < 0,05$). Між першою і третьою групами розходження були достовірними як за рівнем ДК ($P < 0,05$), так і МДА ($P < 0,01$).

Таким чином було встановлено, що концентрація продуктів перекисного окислення ліпідів у фолікулярній рідині впливає на функціональні властивості ооцитів, що виражається в зниженні їх здатності до запліднення.

Даний спосіб ілюструють наступні приклади.

1. Хвора Л., 27 років, (історія хвороби № 79) звернулася для лікування безплідності. Термін хвороби - 5 років. Із анамнезу відомо, що 7 та 5 років тому хвора була оперована з приводу позаматкової вагітності. Обидві маткові труби видалені. В результаті обстеження протипоказань до лікування безплідності із застосуванням програми запліднення *in vitro* не було виявлено. При індукції овуляції був використаний загальноприйнятий протокол з використанням препаратів Metrodin, "Serono" і Suprefact, "Hoechst". Через 35 годин після введення тригерної дози Profasi, "Serono", під ультразвуковим контролем була зроблена пункція фолікулів і аспірація ооцитів. Спермограма мужа - без відхилень від норми.

Було отримано 8 зрілих ооцитів. При біохімічному дослідженні в фолікулярній рідині рівень

МДА - 1,8 нМоль/л, ДК - 8,0 мкМоль/л.

Прогнозовано 66,7 - 100% запліднення.

In vitro запліднилось 6 ооцитів (100% запліднення), розвилось 6 ембріонів, 4 з яких були перенесені в порожнину матки.

Через 2 тижні біохімічно встановлена вагітність.

2. Хвора А., 28 років, (історія хвороби № 27) звернулася для лікування безплідності. Термін хвороби - 4 роки. Із анамнезу відомо, що 4 роки тому хвора була оперована з приводу позаматкової вагітності. Права маткова труба видалена. При рентгенологічному дослідженні було встановлено, що ліва маткова труба блокована в ампулярному відділі. В результаті обстеження протипоказань до лікування безплідності із застосуванням програми запліднення *in vitro* не було виявлено. При індукції овуляції був використаний загальноприйнятий протокол з використанням препаратів Metrodin, "Serono" і Suprefact, "Hoechst". Через 35 годин після введення тригерної дози Profasi, "Serono", під ультразвуковим контролем була зроблена пункція фолікулів і аспірація ооцитів. Спермограма мужа - без відхилень від норми.

Було отримано 14 зрілих ооцитів та 2 ооцити з ознаками дегенерації. При біохімічному дослідженні в фолікулярній рідині рівень МДА - 2,9 нМоль/л, ДК - 11,0 мкМоль/л.

Прогнозовано 0 - 33,3% запліднення.

In vitro запліднилось 5 ооцитів (31,3% запліднення), розвилось 5 ембріонів, 3 з яких були перенесені в порожнину матки.

Вагітність не настала.

Таким чином, спосіб, що заявляється з високою достовірністю дозволяє прогнозувати здатність ооцитів до запліднення *in vitro*.