



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 50695

(13) A

(51) 6 G01N33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДВидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ЗДАТНОСТІ ООЦИТІВ ДО ЗАПЛІДНЕННЯ ПРИ ЛІКУВАННІ БЕЗПЛІДНОСТІ В ПРОГРАМІ ЗАПЛІДНЕННЯ IN VITRO

1

2

(21) 2002075609

(22) 08 07 2002

(24) 15 10 2002

(46) 15 10 2002, Бюл. № 10, 2002 р.

(72) Грищенко Микола Григорович

(73) ХАРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ(57) Спосіб прогнозування здатності ооцитів до запліднення при лікуванні безплідності в програмі запліднення in vitro, що включає визначення співвідношення простагландинів класів  $E_2$  і  $F_{2\alpha}$  в фолікулярній рідині та прогнозування зниженняздатності ооцитів до запліднення in vitro при зниженні значення коефіцієнту  $Pg \ E_2/F_{2\alpha}$  фолікулярній рідині і, навпаки, високої здатності ооцитів до запліднення in vitro при підвищенні значення коефіцієнту  $Pg \ E_2/F_{2\alpha}$ , який відрізняється тим, що при значенні коефіцієнту  $Pg \ E_2/F_{2\alpha}$  12 та вище прогнозують 66,7 - 100% запліднення ооцитів, при значеннях коефіцієнту  $Pg \ E_2/F_{2\alpha}$  11,9 - 8,6 прогнозують 33,4 - 66,6% запліднення, а при значенні коефіцієнту  $Pg \ E_2/F_{2\alpha}$  8,59 та нижче прогнозують 0 - 33,3% запліднення ооцитів

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

Незважаючи на значні успіхи в діагностиці і лікуванні безплідності, до наступного часу у цій проблемі залишається ще багато невирішених питань. Існує велика кількість патологічних станів, при яких традиційні методи відновлення природної фертильності неефективні або мають низьку ефективність, що сприяло розвитку методів допоміжної репродукції, у тому числі програми запліднення in vitro, яка вже отримала широке розповсюдження в усьому світі.

Ефективність лікування безплідності цим методом досягає в середньому 20 - 30% у розрахунку на один перенос ембріонів (Лечение бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения / В.И. Грищенко, В.И. Пиняев, М.П. Петрушко, Л.И. Луцкая, И.В. Терпячая // Актуальные вопросы репродуктологии и криомедицины, - X, 1998 С. 135-138, Dale B., Elder K., In vitro fertilization // Cambridge university press - 1997 - P. 102-107.)

Високу медичну і соціальну вагомість проблеми безплідності робить актуальним пошук причин невдач метода запліднення in vitro із метою підвищення ефективності лікування.

Одною з важливих умов успішного лікування

безплідності в програмі запліднення in vitro є морфологічна і функціональна повноцінність ооцитів, які одержують в результаті стимуляції суперовуляції. Фолікулярна рідина - середовище, що бере участь у дозріванні ооциту і має регулюючі функції. У фолікулярній рідині преовуляторного фолікула значно підвищується концентрація простагландинів  $E_2$  і  $F_{2\alpha}$  (Janson P O., Brannstrom M., Holmes P V., Sogn J. Studies on the mechanism of ovulation using the model of the isolated ovary // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 1988 - Vol. 541 - P. 22-29).

Синтез простагландинів є необхідною умовою для дозрівання ооцитів та взаємодії гамет (Calmels C., Dubost J. J., Jasmin-Lebrun C., Sauvezie B. A new case of NSAID-induced infertility // Rev. Rhum. Engl. Ed. - 1999 - Vol. 66 - № 3 - P. 167-168).

Склад фолікулярної рідини може відображати морфологічний і функціональний стан ооциту, його здатність до запліднення, або служити інструментом для прогнозування ефективності лікування безплідності.

Так, наприклад, відомий спосіб оцінки якості та ефективності процесів овуляції, функціонального стану ооцитів та прогнозування розвитку вагітності по взаємовідношенню концентрації простагландинів  $Pg \ E_2/F_{2\alpha}$  в фолікулярній рідині (Smith E M., Anthony F., Masson G M. Follicular fluid prostaglandin  $E_2$  prostaglandin  $F_2$  alpha ratio in

(13) A

(11) 50695

(19) UA

relation to outcome of matched oocyte // Hum Reprod - 1991 - Vol 6 - № 4 - P 519 - 523)

Даний спосіб оцінки здатності ооцитів до запліднення *in vitro*, у якому інструментом слугує відношення класів простагландинів  $E_2/F_{2\alpha}$  в фолікулярній рідині, 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 тільки відмічають тенденції змін співвідношення класів простагландинів  $E_2$  та  $F_{2\alpha}$  в фолікулярній рідині при лікуванні безплідності методом запліднення *in vitro*, даючи якісну оцінку, але неспроможні точно спрогнозувати здатність ооцитів до запліднення із-за відсутності кількісної оцінки коефіцієнту  $Pg\ E_2/F_{2\alpha}$

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 співвідношення класів простагландинів  $E_2$  та  $F_{2\alpha}$  в фолікулярній рідині

Задача, яку покладено в основу винаходу, вирішується тим, що у відомому способі, що включає визначення співвідношення простагландинів класів  $E_2$  і  $F_{2\alpha}$ , прогнозують зниження здатності ооцитів до запліднення *in vitro* при зниженні значення коефіцієнту  $Pg\ E_2/F_{2\alpha}$  в фолікулярній рідині і, навпаки, високу здатність ооцитів до запліднення *in vitro* при підвищенні значення коефіцієнту  $Pg\ E_2/F_{2\alpha}$ . Згідно з винаходом, при значенні коефіцієнту  $Pg\ E_2/F_{2\alpha}$  12 та вище прогнозують 66,7 - 100% запліднення ооцитів. При значеннях коефіцієнту  $Pg\ E_2/F_{2\alpha}$  від 11,9 до 8,6 прогнозують 33,4 - 66,6% запліднення. При значенні коефіцієнту  $Pg\ E_2/F_{2\alpha}$  8,59 та нижче прогнозують 0 - 33,3% запліднення ооцитів.

Можливість підвищення точності прогнозу була одержана завдяки кількісній оцінці співвідношення простагландинів класів  $E_2$  і  $F_{2\alpha}$  у фолікулярній рідині

Спосіб виконують наступним чином

Перед початком лікування всі безплідні подружні пари обстежують за загальноприйнятою методикою. Серед спеціальних методів дослідження в обов'язковому порядку здійснюють динамічне ультразвукове сканування органів

малого тазу

При індукції овуляції використовують загальноприйняті протоколи з наборами препаратів і аналогів гонадотропін - рилізінг гормону. 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 культивування. У зразках фолікулярної рідини визначають концентрацію простагландинів  $E_2$  і  $F_{2\alpha}$  та їх співвідношення, та прогнозують здатність ооцитів до запліднення *in vitro*

Ідентифікацію і кількісне визначення  $Pg\ E_2$  і  $Pg\ F_{2\alpha}$  у зразках фолікулярної рідини здійснюють методом високоефективної рідинної хроматографії. Для екстракції простагландинів використовують метод Horton. Концентрацію простагландинів у стандартному розчині визначають методом спектрофотометрії за ЛД Бергельсоном. Обчислюють показник відношення концентрації  $Pg\ E_2$  до  $Pg\ F_{2\alpha}$

При значенні коефіцієнту  $Pg\ E_2/F_{2\alpha}$  12 та вище прогнозують 66,7 - 100% запліднення ооцитів, при значенні коефіцієнту  $Pg\ E_2/F_{2\alpha}$  від 11,9 до 8,6 прогнозують 33,4 - 66,6% запліднення, а при значенні коефіцієнту  $Pg\ E_2/F_{2\alpha}$  8,59 та нижче прогнозують 0 - 33,3% запліднення ооцитів *in vitro*

Вищевказані значення коефіцієнту  $Pg\ E_2/F_{2\alpha}$  були одержані експериментальним шляхом. Були сформовані клінічні групи з різним відсотком запліднення ооцитів *in vitro*

Достовірність розходжень оцінювали з використанням критеріїв Фішера - Ст'юдента. Також проводили кореляційний аналіз зв'язку між досліджуваними показниками та дисперсійний аналіз. Виділені групи статистично не відрізнялися за віком пацієнток, кількістю отриманих ооцитів і морфологічними властивостями еякуляту партнерів

Результати визначення концентрації простагландинів  $E_2$  і  $F_{2\alpha}$  у виділених групах представлені в таблиці

Таблиця

Клінічні групи	$Pg\ E_2$ мкг/мл $M \pm m$	$Pg\ F_{2\alpha}$ мкг/мл $M \pm m$
1 група 66,7 - 100% запліднення (n = 30)	537,5 $\pm$ 73,6	71,2 $\pm$ 18,1
2 група 33,4 - 66,6% запліднення (n = 30)	471,8 $\pm$ 83,9	102,2 $\pm$ 24,9
3 група 0 - 33,3% запліднення (n = 30)	272,6 $\pm$ 26,6	103,6 $\pm$ 31,7

Середнє значення коефіцієнту  $Pg\ E_2/F_{2\alpha}$  склало 12,4  $\pm$  1,1 для першої групи, 11,5  $\pm$  0,9 - для другої, 5,7  $\pm$  1,2 - для третьої

Було встановлено, що морфологічні властивості, ступінь зрілості ооцитів і відсоток їх запліднення *in vitro* не зв'язані з концентрацією  $Pg\ F_{2\alpha}$  і концентрацією  $Pg\ E_2$ , але було виявлено зв'язок між здатністю ооцитів до запліднення і

відношенням  $Pg\ E_2/F_{2\alpha}$  ( $p < 0,05$ ), що свідчить про більше діагностичне значення вивчення співвідношення простагландинів у фолікулярній рідині, ніж абсолютних показників

Проведений кореляційний та дисперсійний аналіз дозволив встановити вищевказані прогностичні діапазони значень показників, що досліджували

Даний спосіб ілюструють наступні приклади  
 1 Хвора Б, 30 років, (історія хвороби № 155) звернулася для лікування безплідності Термін хвороби - 7 років

Із анамнезу відомо, що на протязі 7 років хвора страждає на первинне безпліддя При рентгенологічному дослідженні було встановлено, що обидві маткові труби блоковані в ампулярних відділах Повторні курси консервативної терапії були неефективні

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 Спремограма мужа - без відхилень від норми

Було отримано 5 зрілих ооцитів При біохімічному дослідженні фолікулярної рідини коефіцієнт  $Pg\ E_2/F_{2\alpha}$  склав -13,1

Прогнозовано 66,7 - 100% запліднення

*In vitro* запліднилось 5 ооцитів (100% запліднення), розвилось 4 ембріонів, 3 з яких були перенесені в порожнину матки

Через 2 тижні біохімічне встановлена вагітність

2 Хвора К, 29 років, (історія хвороби № 166) звернулася для лікування безплідності Термін

хвороби - 7 років Із анамнезу відомо, що 7 років тому хвора була оперована з приводу апоплексії яєчника В зв'язку з технічними складнощами були видалені правий яєчник та права маткова труба При рентгенологічному дослідженні було встановлено, що ліва маткова труба являє собою підросальпінкс 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 Спремограма мужа - без відхилень від норми

Було отримано 2 зрілих ооцити та 1 незрілий При біохімічному дослідженні фолікулярної рідини коефіцієнт  $Pg\ E_2/F_{2\alpha}$  склав - 1,8

Прогнозовано 0 - 33,3% запліднення

*In vitro* запліднився 1 ооцит (33,3% запліднення), розвився ембріон, який був перенесений до порожнини матки Вагітність не настала

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