



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 50696

(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) 2002075611

(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 активності ферменту супероксиддисмутази у фолікулярній рідині та прогнозування зниження

здатності ооцитів до запліднення при високій активності супероксиддисмутази в фолікулярній рідині і, навпаки, високої здатності ооцитів до запліднення in vitro при низькій активності супероксиддисмутази в фолікулярній рідині, який відрізняється тим, що при активності супероксиддисмутази 2,3 ум од та вище прогнозують 0 - 33,3% запліднення ооцитів, при активності супероксиддисмутази 1,2 - 2,29 ум од прогнозують 33,4 - 66,6%, а при активності супероксиддисмутази 1,19 ум од та нижче прогнозують 66,7 - 100% 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

Відома велика кількість патологічних станів, при яких єдиним ефективним методом лікування безплідності є програма запліднення in vitro. Ця технологія вже отримала широке розповсюдження в усьому світі. Ефективність лікування безплідності методом запліднення in vitro досягає в середньому 20 - 30% у розрахунку на одну спробу (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)

З огляду на високу медичну і соціальну вагомість проблеми безплідності, актуальним є пошук причин невдач метода запліднення in vitro із метою підвищення ефективності лікування.

Одним із найважливіших факторів для запліднення в програмі запліднення in vitro є морфологічний стан ооцитів. Фолікулярна рідина є середовищем, що бере участь в дозріванні яйцеклітини і має регулюючі функції. Склад фолікулярної рідини не є постійним. Динамічні біохімічні зміни, що відбуваються в

фолікулярній рідині, здійснюють регуляцію і синхронізацію процесів дозрівання ооциту, овуляції, активації моторики маткових труб.

Склад фолікулярної рідини може служити біохімічним дзеркалом і відображати не тільки морфологічний, але і функціональний стан ооциту, його здатність до запліднення і розвитку повноцінного ембріона, або служити інструментом для прогнозування ефективності лікування безплідності.

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

Відомо також, що процеси перекисного окислювання ліпідів потенційно небезпечні і відіграють ведучу роль у розвитку багатьох патологічних станів (Sadani G.R., Nadkarni G.D. Role of tissue antioxidant defence in thyroid cancers // Cancer Lett - 1996 - V 109 - P 231-235).

Встановлено, що реактивні кисневі сполуки безпосередньо або побічно беруть участь у процесі дозрівання ооцитів, і їх синтез є важливим регулюючим фактором. З іншого боку, неконтрольоване підвищення інтенсивності процесів перекисного окислювання ліпідів у

(13) A

(11) 50696

(19) UA

фолікулярній рідині негативно впливає на ооцит, зменшуючи його здатність до запліднення *in vitro*

В таких умовах великого значення набувають механізми антиоксидантного захисту

Одним з важливих антиоксидантних ферментів фолікулярної рідини є супероксиддисмутаза. Відомо, що ооцити в змозі синтезувати цей фермент (Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings // Hum Reprod Update - 2001 - № 7 - P 175-189). Дослідження останніх років показують, що ферментативні антиоксидантні системи присутні в фолікулярній рідині і мають велике значення в захисті клітин від продуктів перешеного окислення ліпідів та реактивних кисневих сполук

Так, наприклад, була імуногістохімічно визначена локалізація ферменту супероксиддисмутази в тканинах яєчника - його виявили в theca interna і в фолікулярній рідині (Shiotani M, Noda Y, Narimoto K, Imai K, Mori T, Fujimoto K, Ogawa K, Immunohistochemical localization of Superoxide dismutase in the human ovary // Hum Reprod - 1991 - Vol 6 - №10 - P 1349-1353)

Було також проведено порівняльне дослідження активності супероксиддисмутази в плазмі крові та в фолікулярній рідині (Sabatini L, Wilson C, Lower A, Al Shawaf T, Grudzinski J G. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization // Fertil Steril - 1999 - Vol 72 - № 6 - P 1027-1034). Автори виявили, що активність цього ферменту в фолікулярній рідині значно вище, чим в плазмі крові. Встановлено також, що в випадках з високою активністю супероксиддисмутази знижується здатність ооцитів до запліднення. Таким чином було встановлено взаємозв'язок між активністю супероксиддисмутази в фолікулярній рідині та заплідненням ооцитів *in vitro*

Даний спосіб оцінки здатності ооцитів до запліднення *in vitro*, у якому інструментом служить активність супероксиддисмутази 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 відмічають тільки тенденції та властивості змін активності супероксиддисмутази 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 активності супероксиддисмутази

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 активності супероксиддисмутази в фолікулярній рідині

Задача, яку покладено в основу винаходу, вирішується тим, що у відомому способі, що

включає визначення активності ферменту супероксиддисмутази у фолікулярній рідині, прогнозують зниження здатності ооцитів до запліднення при високій активності супероксиддисмутази і, навпаки, високу здатність ооцитів до запліднення *in vitro* при низькій активності супероксиддисмутази в фолікулярній рідині. Згідно з винаходом, при активності супероксиддисмутази - 2,3 ум од та вище прогнозують 0 - 33,3% запліднення ооцитів, при активності супероксиддисмутази - 1,2 - 2,29 ум од прогнозують 33,4 - 66,6%, при активності супероксиддисмутази - 1,19 ум од та нижче прогнозують 66,7 - 100% запліднення ооцитів

Можливість підвищення точності прогнозу була одержана завдяки кількісній оцінці активності антиоксидантного ферменту супероксиддисмутази у фолікулярній рідині

Спосіб виконують спідуючим 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. Дослідження проводять за допомогою вагінального секторального датчика з частотою сканування 7 МГц

При індукції овуляції використовують загальноприйняті протоколи з наборами препаратів ФCG (Metrodin, "Serono") і аналогів гонадотропін - рилізінг 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 культивування. У зразках фолікулярної рідини визначають активність супероксиддисмутази, та прогнозують здатність ооцитів до запліднення *in vitro*

Супероксиддисмутазну активність в зразках фолікулярної рідини оцінюють на підставі реакції гальмування автоокислення адреналіну за методом В.С. Гуревич і Е.Е. Дубіної

При активності супероксиддисмутази - 2,3 ум од та вище прогнозують 0 - 33,3% запліднення ооцитів, при активності супероксиддисмутази - 1,2 - 2,29 ум од прогнозують 33,4 - 66,6%, при активності супероксиддисмутази - 1,19 ум од та нижче прогнозують 66,7 - 100% запліднення ооцитів

Вищевказані значення активності супероксиддисмутази були одержані експериментальним шляхом. Були сформовані клінічні групи з різним відсотком запліднення ооцитів *in vitro*

Результати визначення активності супероксиддисмутази у виділених групах представлено в таблиці

Таблиця

Клінічні групи	Активність СОД ум од $M \pm m$
1 група 66,7 - 100% запліднення (n = 30)	$0,8 \pm 0,1$
2 група 33,4 - 66,6% запліднення (n = 30)	$1,6 \pm 0,2$
3 група 0 - 33,3% запліднення (n = 30)	$3,0 \pm 0,2$

Зазначені дані свідчили про значне підвищення активності ферменту супероксиддисмутази у фолікулярній рідині, одержаної в групах з низьким відсотком запліднення ооцитів *in vitro*. Достовірність розходжень оцінювали з використанням критеріїв Фішера-Ст'юдента. Також проводили кореляційний аналіз зв'язку між дослідженими показниками. Виділені групи статистично не відрізнялися за віком пацієнток, кількістю отриманих ооцитів і морфофункціональними властивостями еякуляту партнерів.

Максимальна активність супероксиддисмутази була зареєстрована в групі з найменшим відсотком запліднення (3-я група). Розходження в активності СОД між 1-ю групою та 2-ю і 3-ю групами були статистично достовірні ( $p < 0,01$ ).

При кореляційному аналізі було встановлено, що активність супероксиддисмутази тісно пов'язана з відсотком запліднення ооцитів *in vitro* ( $r = -0,732$ ).

Таким чином було встановлено, що при підвищенні активності супероксиддисмутази в фолікулярній рідині достовірно знижується здатність ооцитів до запліднення *in vitro*.

Присутність лінійного зв'язку дозволила встановити межі діапазонів активності супероксиддисмутази за допомогою розрахунку значення середнього арифметичного між значеннями суміжних груп. Для 1-ої групи була встановлена верхня межа -  $1,19 \text{ ум од}$ , для 3-ої групи - нижня межа -  $2,3 \text{ ум од}$ . Типова активність супероксиддисмутази для 2-ої групи була встановлена в інтервалі  $1,2 - 2,29 \text{ ум од}$ .

Даний спосіб ілюструють наступні приклади.

1. Хвора Р, 28 років, (історія хвороби № 110) звернулася для лікування безплідності. Термін хвороби - 3 роки.

Із анамнезу відомо, що 3 роки тому хвора була оперована з приводу позаматкової вагітності. Права маткова труба видалена. При рентгенологічному дослідженні було встановлено,

що ліва маткова труба блокована в інтрамуральному 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 аспирація ооцитів. Спремограма мужа - без відхилень від норми.

Було отримано 8 зрілих ооцитів. При біохімічному дослідженні в фолікулярній рідині активність супероксиддисмутази -  $0,67 \text{ ум од}$ .

Прогнозовано 66,7 - 100% запліднення.

*In vitro* запліднилось 6 ооцитів (75% запліднення), розвилось 6 ембріонів, 4 з яких були перенесені в порожнину матки.

Через 2 тижні біохімічно встановлена вагітність.

2. Хвора М, 29 років, (історія хвороби № 118) звернулася для лікування безплідності. Термін хвороби - 6 років. Із анамнезу відомо, що 6 років тому хвора була оперована з приводу позаматкової вагітності. Ліва маткова труба видалена. 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 аспирація ооцитів. Спремограма мужа - без відхилень від норми.

Було отримано 12 зрілих ооцитів та 6 ооцитів з ознаками дегенерації. При біохімічному дослідженні в фолікулярній рідині активність супероксиддисмутази -  $2,89 \text{ ум од}$ .

Прогнозовано 0 - 33,3% запліднення.

*In vitro* запліднилось 6 ооцитів (33,3% запліднення), розвилось 6 ембріонів - усі вони були перенесені в порожнину матки.

Вагітність не настала.

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