



УКРАЇНА

(19) UA (11) 43266 (13) A

(51) 7 G01N33/53

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ ЗАГРОЗИ ПЕРЕРИВАННЯ ВАГІТНОСТІ ПІСЛЯ ЕКСТРАКОРПО-
РАЛЬНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ

(21) 2001053249

(22) 15.05.2001

(24) 15.11.2001

(33) UA

(46) 15.11.2001, Бюл. № 10, 2001 р.

(72) Чайка Володимир Кирилович, Чернишова Лю-
дмила Євгенівна, Гюльмамедова Ірина Дмитрівна,
Айзятупова Ельміра Максутівна(73) Чайка Володимир Кирилович UA, Чернишова
Людмила Євгенівна UA, Гюльмамедова Ірина Дми-
трівна UA, Айзятупова Ельміра Максутівна UA

(57) Спосіб ранньої діагностики загрози перери-
вання вагітності після екстракорпорального заплі-
днення шляхом імунологічного тестування крові
вагітної, який **відрізняється** тим, що для імуноло-
гічного тестування на 6-7-й день після переносу
ембріона в порожнину матки проводять реакцію
пригнічення прилипання лімфоцитів крові вагітної
в присутності ембріональних антигенів і в разі, ко-
ли абсолютна кількість лімфоцитів в ній налічує
менше 10 клітин і перевищує контрольну кількість
клітин в 1,5-3 рази, діагностують загрозу перери-
вання вагітності.

Винахід належить до медицини, точніше, до
акушерства, і може бути використаний для ранньої
діагностики загрози переривання вагітності, що
розвинулась після екстракорпорального заплід-
нення (ЕКЗ).

Для зачаття, які настали в результаті ЕКЗ, є ха-
рактерним підвищення частоти втрат вагітності. Як
показує статистика світового досвіду в цій галузі,
при вагітностях, що розвинулись після ЕКЗ, підви-
щується частота виникнення кровотеч в першому
триместрі (15%), передчасних пологів (18-27%),
народження дитини з низькою масою тіла (36%),
перинатальної смертності (4,6-26,8%) (de Mouzon
та ін., 1988). Ці ускладнення пов'язані, головним
чином, з високою частотою багатоплідної вагітно-
сті після ЕКЗ (Лечение бесплодия. Препараты Се-
роно для лечения бесплодия. - М.: Арес-Сероно
Груп, 1995. - С. 53).

Як відомо, основною умовою реалізації гене-
ративної функції жіночого організму є овуляція. За
технологією ЕКЗ пунктацію фолікулів здійснюють
саме в день піку овуляції. Запліднені яйцеклітини
(ембріони) вносять в порожнину матки через 2-
3 дні після пунктації. Ембріони на стадії бластоци-
сти імплантуються в ендометрій протягом 3-4 днів.
Є повідомлення про те, що яйцеклітина ще до ім-
плантації виділяє гормони, зокрема, хоріонічний
гонадотропін (ХГ). За літературними даними най-
точнішим маркером ранньої діагностики вагітності
є β -ХГ, який визначають радіоімунологічним спо-
собом (Баграмян Э.Р. Оценка эндокринной функ-
ции плаценты и фето-плацентарного комплекса

(клиническая лекция) / Акушерство и гинеколо-
гия. - 1988. - № 7. - С. 11).

Відомий спосіб ранньої діагностики перери-
вання вагітності після ЕКЗ, який здійснюють за до-
помогою двократного визначення β -ХГ та додатко-
вого ультразвукового дослідження через 11 днів
після переносу ембріонів. Якщо рівень β -ХГ дорів-
нює 20-1000 ММО і відсутнє ультразвукове підтве-
рдження запліднення, діагностують преклінічний
викидень (Jones H.W. / Hum. Reprod. - № 10. -
Р. 1004-1008).

Недоліком відомого способу є недостатня точ-
ність діагностики. Тому за відомим способом мож-
на встановити факт відсутності вагітності і немож-
ливо діагностувати загрозу переривання вагітності
з метою проведення профілактичних заходів щодо
її збереження.

Відомий, обраний за прототип, спосіб ранньої
діагностики загрози переривання вагітності після
ЕКЗ, що є найближчим до способу, що пропону-
ється, за суттю та досягнутому технічному резуль-
тату, який включає перевірку тесту на рівень β -ХГ
на 9-й та на 17-й дні після переносу ембріонів (Ле-
чение бесплодия. Препараты Сероно для лечения
бесплодия. - М.: Арес-Сероно Груп, 1995. - С. 53).

Недоліками відомого способу (прототипу) є
недостатня точність діагностики через його неспе-
цифічність та недостатню чутливість. Причинами
неспецифічності діагностики за відомим способом
є накладання на результати виявлення ендогенно-
го β -ХГ деякої концентрації призначеного раніше
за технологією ЕКЗ екзогенного β -ХГ (Liu H.C.,
Lai J.M., Davis O. et. al. / J. Assist. Reprod. Genet. -

(19) UA (11) 43266 (13) A

1992. - № 9. - Р. 338-344). Тому результати тестування можуть бути завищеними. Наслідком недостатньої чутливості відомого способу є той факт, що остаточний діагноз виставляють лише на 17-й день, коли лікувальні заходи по збереженню вагітності проводити пізно.

В основу винаходу поставлено задачу в способі ранньої діагностики загрози переривання вагітності після ЕКЗ шляхом вивчення сенсibilізації лімфоцитів крові вагітної до ембріональних антигенів, через постановку реакції пригнічення прилипання лімфоцитів (РППЛ), забезпечити підвищення чутливості та специфічності діагностики. При цьому зростає точність способу, що пропонується, завдяки чому з'являється можливість встановлення діагнозу про загрозу переривання вагітності після ЕКЗ вже на 6-7-й день після переносу ембріона в порожнину матки пацієнтки (за прототипом - на 17-й) та провести лікування для збереження вагітності.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі ранньої діагностики загрози переривання вагітності після ЕКЗ шляхом імунологічного тестування крові пацієнтки, новим є те, що для імунологічного тестування на 6-7-й день після переносу ембріона в порожнину матки проводять реакцію пригнічення прилипання лімфоцитів крові вагітної в присутності ембріональних антигенів і в разі, коли сума лімфоцитів та ембріональних антигенів в ній налічує менше 10 клітин і перевищує контрольну кількість клітин в 1,5-3 рази, діагностують загрозу переривання вагітності.

Між сукупністю ознак винаходу і технічним результатом, якого можна досягти при його реалізації, існує причинно-наслідковий зв'язок.

За світовою статистикою 60-70% вагітностей, що розвинулись в результаті ЕКЗ, закінчуються невдачею. Більша частина цих невдач припадає на момент імплантації ембріонів, яка відбувається на 3-4 добу після переносу їх в порожнину матки. Успіх приживлення ембріонів залежить від багатьох факторів, зокрема, від стану імунологічної реактивності материнського організму.

Встановити за способом-прототипом загрозу переривання вагітності, що розвинулась після ЕКЗ, з найбільшою достовірністю за рівнем β -ХГ можна лише на 17-й день після переносу ембріонів, коли спроби врятувати вагітність медикаментозними засобами, як показує досвід роботи за програмою ЕКЗ, вже не мають успіху. Тільки приблизно на 14-17-й день після переносу ембріонів концентрація β -ХГ в крові пацієнтки досягає значень, які можна диференційовано оцінювати щодо настання чи ненастання вагітності. Окрім того, за програмою ЕКЗ при підготовці до запліднення пацієнтці призначають прийом ХГ, і на момент діагностики загрози переривання вагітності він може бути ще не повністю виведений з організму та негативно вплинути на результати тестування.

Як показує досвід роботи за програмою ЕКЗ, найнебезпечнішим періодом для вагітності після ЕКЗ щодо її переривання є 14-й день після переносу ембріонів у порожнину матки. Тому запроваджувати спроби медикаментозного (наприклад, імунологічного) збереження вагітності, для якої встановлено наявність загрози переривання, необхідно до цього строку - найкраще на 6-7-й день

після переносу ембріонів, адже момент імплантації ембріонів відбувається вже на 3-4 добу після переносу. Виявилось, що інформативним за тиждень до передбачуваного строку (14 днів) загрози переривання вагітності є імунологічний тест - вивчення РППЛ крові вагітної в присутності ембріональних антигенів. Цей тест відзначається специфічністю та достатньою чутливістю. Суть РППЛ - визначення важливої властивості лімфоцитів - здатності прилипати (адгезії) до поверхні. Ця властивість змінюється (посилюється чи послабляється) в залежності від зміни імунного статусу людини (Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. - Москва-Витебск, 1996. - С. 240). Імунний статус вагітної в разі виникнення загрози викидня різко змінюється, оскільки змінюється рівень сенсibilізації крові вагітної до ембріонального антигена та виробляються блокуючі антитіла, від достатньої кількості яких залежить нормальний розвиток вагітності.

Сенсibilізація крові вагітних до ембріональних антигенів пов'язана з наявністю антигенного стимулу з боку плода. Функція наявних у організмі вагітної аутореактивних лімфоцитів (блокуючих антитіл) не є досить ясною. Відомо, правда, такі лімфоцити можуть брати участь в регуляції деяких фізіологічних процесів, наприклад, репаративних (Шалахова О.В. та ін. / Акушерство и гинекология. - 1988. - № 7. - С. 15).

Після проведення РППЛ підраховують кількість лімфоцитів, що втратили здатність до прилипання, в дослідній (автосироватка+завись лімфоцитів+ембріональний антиген) та контрольній (завись лімфоцитів+ембріональний антиген) пробірках. Суттєвими ознаками винаходу є кількість нарахованих клітин (менше 10) та їх співвідношення з контрольними цифрами (більше в 1,5-3 рази). Дослідним шляхом встановлено: коли лімфоцитів в досліді налічується менше 10 клітин, і це число перевищує контрольну кількість клітин в 1,5-3 рази, діагностують загрозу переривання вагітності. І навпаки: вагітність завжди розвивається, коли абсолютна кількість лімфоцитів складає більше 10 клітин, і вона в 1,5-3 рази менша за контрольну.

Спосіб ранньої діагностики загрози переривання вагітності, що розвинулась після ЕКЗ, який пропонується, виконують таким чином.

Ранню діагностику застосовували для жінок, що мали в анамнезі декілька невдалих спроб ЕКЗ через зрив вагітності. На 6-7 день після переносу ембріона в порожнину матки у обстежуваної жінки з ліктьової вени забирали 5 мл крові та готували з неї автосироватку відомим способом (Шалахова О.В. та ін. / Акушерство и гинекология. - 1988. - № 7. - С. 15). В дослідну пробірку вносили 0,1 мл автосироватки крові, 0,1 мл препарату, що містить ембріональні антигени, 0,2 мл розчинника, 0,1 мл завись лімфоцитів. В контрольну пробірку вносили ті самі складові, окрім автосироватки. Для проведення РППЛ використовували ембріональні антигени у вигляді препарату "Римолан" виробництва SIA "Rigas Reprodukcijas Centrs" (Латвія). Як розчинник використовують препарат "Середовище 199", виробником якого є "Ассоциация "Эпидбиомед" (РФ). РППЛ здійснювали за відомою методикою в модифікації О.А. Куртенкова (Куртенков О.А. / Лабораторное дело. - 1979. - № 1. - С. 11-13). Після

ля закінчення реакції проводять в камері Горяєва підрахунок абсолютної кількості лімфоцитів, що втратили здатність до прилипання, в дослідній та контрольній пробірках.

Конкретні приклади виконання способу, що пропонується.

Приклад № 1

Пацієнтка С., 38 років, звернулась 07.02.98 до відділення діагностики та лікування безплідного шлюбу зі скаргами на безпліддя протягом 5 років регулярних статевих контактів без контрацепції.

За анамнезом у пацієнтки було 4 невдалих спроби ЕКЗ. Їй запропонували лікування безпліддя у відділенні діагностики та лікування безплідного шлюбу, яке включало: 5-у спробу ЕКЗ, проведення ранньої діагностики загрози переривання вагітності за способом, що пропонується, та, в разі необхідності, імунологічне лікування з метою збереження вагітності. На піку овуляції 11.03.98 за допомогою пунктації фолікулів пацієнтки одержано 6 яйцеклітин, які запліднили спермою її чоловіка. В порожнину матки 13.03.98 перенесено 5 запліднених яйцеклітин на стадії бластомерів (ембріонів). На 7-й день після переносу, тобто 20.03.98, для діагностики загрози переривання вагітності за способом, що пропонується, провели РППЛ. Підрахунок в камері Горяєва абсолютної кількості лімфоцитів, що втратили здатність до прилипання, показав: в дослідній пробірці 9 клітин, в контрольній - 3. Пацієнтці виставили діагноз - загроза переривання вагітності на 7-й день від запліднення, оскільки за способом, що пропонується, коли абсолютна кількість лімфоцитів в досліді налічує менше 10 клітин (у пацієнтки С. їх 9) і перевищує контрольну кількість клітин в 1,5-3 рази (у пацієнтки С. $9/3=3$ рази), діагностують загрозу переривання вагітності. В той же день пацієнтці С. почали імунотерапію. На 14-й день після переносу ембріонів, тобто 27.03.98, коли вже можна проводити гормональні дослідження з достатньою точністю, за стандартною схемою ЕКЗ проведено тестування на вміст у крові пацієнтки β -ХГ, за яким діагностовано вагітність. На 21-й день після переносу ембріонів УЗД підтвердило, що вагітність розвивається нормально, візуалізується 3 плідних яйця. 15.10.2000 провели кесарів розтин. Народились троє дітей: хлопчик з вагою тіла 2650 г, дівчатка - 2500 г та 2000 г, оцінені за шкалою Апгар 6-7 балів.

Приклад № 2

Пацієнтка Ш., 32 років, звернулась 08.11.99 до відділення діагностики та лікування безплідного шлюбу зі скаргами на безпліддя протягом 8 років регулярних статевих контактів без контрацепції.

За анамнезом у пацієнтки було 6 невдалих спроб ЕКЗ. Їй запропонували лікування безпліддя у відділенні діагностики та лікування безплідного шлюбу, яке включало: 7-у спробу ЕКЗ, проведення ранньої діагностики загрози переривання вагітності за способом, що пропонується, та, в разі необхідності, імунологічне лікування з метою збереження вагітності. На піку овуляції 25.11.2000 за допомогою пунктації фолікулів пацієнтки одержано 5 яйцеклітин, які запліднили спермою її чоловіка. В порожнину матки 27.11.2000 перенесено 4 запліднені яйцеклітини на стадії бластомерів (ембріонів). На 6-й день після переносу, тобто 03.12.2000, для діагностики загрози переривання вагітності за

способом, що пропонується, провели РППЛ. Підрахунок в камері Горяєва абсолютної кількості лімфоцитів, що втратили здатність до прилипання, показав: в дослідній пробірці 8 клітин, в контрольній - 4. Пацієнтці виставили діагноз - загроза переривання вагітності на 6-й день від запліднення, оскільки за способом, що пропонується, коли абсолютна кількість лімфоцитів в досліді налічує менше 10 клітин (у пацієнтки Ш. їх 8) і перевищує контрольну кількість клітин в 1,5-3 рази (у пацієнтки Ш. - $8/4=2$ рази), діагностують загрозу переривання вагітності. В той же день пацієнтці Ш. почали імунотерапію. На 14-й день після переносу ембріонів, коли вже можна проводити гормональні дослідження з достатньою точністю, за стандартною схемою ЕКЗ проведено тестування на вміст у крові пацієнтки β -ХГ, за яким діагностовано вагітність. На 21-й день після переносу ембріонів УЗД підтвердило, що вагітність розвивається нормально, візуалізується 1 плідне яйце. Вагітність продовжує успішно розвиватись.

Приклад № 3

Пацієнтка Р., 32 років, звернулась 17.02.2000 до відділення діагностики та лікування безплідного шлюбу зі скаргами на безпліддя протягом 5 років регулярних статевих контактів без контрацепції.

За анамнезом у пацієнтки було 2 невдалих спроби ЕКЗ. Їй запропонували лікування безпліддя у відділенні діагностики та лікування безплідного шлюбу, яке включало: 3-ю спробу ЕКЗ, проведення ранньої діагностики загрози переривання вагітності за способом, що пропонується, та, в разі необхідності, імунологічне лікування з метою збереження вагітності. На піку овуляції 22.11.2000 за допомогою пунктації фолікулів пацієнтки одержано 8 яйцеклітин, які запліднили спермою її чоловіка. В порожнину матки 24.11.2000 перенесено 7 запліднених яйцеклітин на стадії бластомерів (ембріонів). На 7-й день після переносу, тобто 01.12.2000, для діагностики загрози переривання вагітності за способом, що пропонується, провели РППЛ. Підрахунок в камері Горяєва абсолютної кількості лімфоцитів, що втратили здатність до прилипання, показав: в дослідній пробірці 6 клітин, в контрольній - 4. Пацієнтці виставили діагноз - загроза переривання вагітності на 7-й день від запліднення, оскільки за способом, що пропонується, коли абсолютна кількість лімфоцитів в досліді налічує менше 10 клітин (у пацієнтки Р. їх 6) і перевищує контрольну кількість клітин в 1,5-3 рази (у пацієнтки С. - $6/4=1,5$ рази), діагностують загрозу переривання вагітності. В той же день пацієнтці Р. почали імунотерапію. На 14-й день після переносу ембріонів, коли вже можна проводити гормональні дослідження з достатньою точністю, за стандартною схемою ЕКЗ проведено тестування на вміст у крові пацієнтки β -ХГ, за яким діагностовано вагітність. На 21-й день після переносу ембріонів УЗД підтвердило, що вагітність розвивається нормально, візуалізується 2 плідних яйця. Вагітність продовжує успішно розвиватись.

Приклад № 4

Пацієнтка В., 28 років, звернулась 03.01.2000 до відділення діагностики та лікування безплідного шлюбу зі скаргами на безпліддя протягом 8 років регулярних статевих контактів без контрацепції.

За анамнезом у пацієнтки було 3 невдалих спроби ЕКЗ. У відділенні діагностики та лікування безплідного шлюбу пацієнтці В. здійснили 4-у спробу ЕКЗ. Їй також було запропоноване проведення ранньої діагностики загрози переривання вагітності за способом-прототипом та, в разі необхідності, імунологічне лікування з метою збереження вагітності. На піку овуляції 25.10.2000 за допомогою пунктування фолікулів пацієнтки одержано 4 яйцеклітини, які запліднили спермою її чоловіка. В порожнину матки 27.10.2000 перенесено 3 запліднених яйцеклітини на стадії бластомерів (ембріонів). На 9-й та на 17 дні після переносу ембріонів для діагностики загрози переривання вагітності за способом-прототипом провели радіоімунологічний тест на вміст β -ХГ. Результати тесту: 2 мМО (9-й день), 95 мМО (17-й день). За прийнятими в програмі ЕКЗ нормами встановлений рівень β -ХГ відповідає "преклінічному викидню" (Jones та ін., 1983). Зразу ж на 17-й день пацієнтці В. почали імунотерапію з метою збереження вагітності. Після проведеного лікування на 21-й день після переносу ембріонів результати УЗД вказували на відсутність вагітності. Після діагностики загрози переривання вагітності за способом-прототипом збереження вагітності не мало успіху, бо починати імунотерапію на 17-й день було вже пізно.

Через 3 місяці у відділенні діагностики та лікування безплідного шлюбу пацієнтці В. запропонували лікування безпліддя у відділенні діагностики та лікування безплідного шлюбу, яке включало: 5-у спробу ЕКЗ, проведення ранньої діагностики загрози переривання вагітності за способом, що пропонується, та, в разі необхідності, імунологічне лікування з метою збереження вагітності. Технічно ЕКЗ та РППЛ виконали за прикладом № 1. Підрахунок в камері Горяєва абсолютної кількості лімфоцитів, що втратили здатність до прилипання, показав: в дослідній пробірці 12 клітин, в контрольній - 18. Пацієнтці виставили діагноз - вагітність, що нормально розвивається (7-й день), бо за способом, що пропонується, загроза переривання вагітності настає тільки тоді, коли абсолютна кількість лімфоцитів в досліді налічує менше 10 клітин (у пацієнтки В. їх 12) і перевищує контрольну кількість клітин в 1,5-3 рази (у пацієнтки В. - $12/18 = 0,66$ рази). На 14-й день після переносу ембріонів, коли вже можна проводити гормональні дослідження з достатньою точністю, за стандартною схемою ЕКЗ проведено тестування на вміст у крові пацієнтки β -ХГ. За результатами тесту діагностовано вагітність. На 21-й день після переносу ембріонів УЗД підтвердило, що вагітність розвивається нормально, візуалізуються 2 плідні яйця. Вагітність продовжує успішно розвиватись.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2002 р. Формат 60х84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
