



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **72172** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 00804	(72) Винахідник(и): Пирогова Віра Іванівна (UA), Михайлишин Любов Олегівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 26.01.2012	(73) Власник(и): ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО, вул. Пекарська, 69, м. Львів, 79010 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.08.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2012, Бюл.№ 15	

(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАПЛІДНЕННЯ IN VITRO ТА ПЕРЕНОСУ ЕМБРІОНІВ

(57) Реферат:

Спосіб підвищення ефективності запліднення in vitro та переносу ембріонів (ЗІВ та ПЕ) включає імунологічне дослідження периферійної крові і визначення інтерлейкіну 4 (ІЛ-4), інтерлейкіну 10 (ІЛ-10), фактору некрозу пухлин альфа (ФНП- α) та внутрішньовенне введення імуноглобуліну. До початку лікування в периферійній крові пацієнток додатково проводять визначення абсолютного та відносного вмісту NK CD3-/CD56+/CD16+, NKT CD3+/CD56+/CD16+, інтерлейкіну 2 (ІЛ-2), інтерлейкіну 6 (ІЛ-6), інтерферону гамма (ІФН- γ) і здійснюють прегравідарну корекцію шляхом внутрішньовенного введення імуноглобуліну.

UA 72172 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до акушерства та гінекології (до репродуктивної медицини), і може бути використана в роботі лікарів-репродуктологів для підвищення ефективності лікування безпліддя за допомогою запліднення *in vitro* і переносу ембріонів (ЗІВ і ПЕ).

ЗІВ і ПЕ розглядається як один з найбільш ефективних та перспективних методів лікування безпліддя на сьогоднішній день. Метод пройшов тривалу еволюцію, з удосконаленням схем контрольованої стимуляції яєчників, лабораторного обладнання, покращенням культуральних середовищ для ембріонів. Однак, не дивлячись на велику кількість революційних досягнень в цій ділянці, результативність лікування безпліддя методом ЗІВ та ПЕ залишається невисокою: лише близько однієї з чотирьох програм ЗІВ та ПЕ закінчується народженням живих дітей [1]. Відомо, що 75 % вагітностей після ЗІВ перебігає із загрозою переривання, частота спонтанних викиднів в термінах до 28 тижнів вагітності сягає від 11 до 44 % [2]. Багаторазові невдалі програми допоміжних репродуктивних технологій є однією із найактуальніших проблем сучасної репродуктивної медицини.

Найближчим аналогом запропонованого способу є спосіб профілактики передчасних пологів у вагітних високого ризику, який полягає у внутрішньовенному введенні імуноглобуліну під час вагітності в терміні 8-10, 18-20 та 28-30 тижнів по 1,25 г (25 мл) 3 доби поспіль жінкам з невиношуванням і перинатальними втратами в анамнезі [3]. Спосіб включає проведення імунологічних досліджень периферійної крові та визначення вмісту Т-лімфоцитів, Т-хелперів/індукторів, Т-супресорів/кілерів, CD3+, CD22+, CD4+, CD8+, інтерлейкіну 4 (IL-4), інтерлейкіну 10 (IL-10), фактору некрозу пухлин альфа (ФНП- α). Однак внутрішньовенне введення імуноглобуліну під час вагітності може нести певні ризики для плода, оскільки будь-яке призначення медикаментів під час вагітності є небажаним. В той же час, прегравідарна корекція імунологічних порушень внутрішньовенним введенням імуноглобуліну може не лише попередити невиношування вагітності, але й сприяти настанню вагітності у жінок з безпліддям без негативного впливу на плід.

В основу корисної моделі поставлено задачу поліпшити спосіб лікування безпліддя за допомогою ЗІВ та ПЕ шляхом проведення відповідної прегравідарної корекції, що дозволить підвищити ефективність ЗІВ та ПЕ.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі підвищення ефективності ЗІВ та ПЕ, що включає імунологічне дослідження периферійної крові і визначення IL-4, IL-10, ФНП- α та внутрішньовенне введення імуноглобуліну, згідно з корисною моделлю, до початку лікування безпліддя методом ЗІВ та ПЕ в периферійній крові пацієнток додатково проводять визначення абсолютного та відносного вмісту NK CD3-/CD56+/CD16+, NKT CD3+/CD56+/CD16+, інтерлейкіну 2 (IL-2), інтерлейкіну 6 (IL-6), інтерферону гамма (IFN- γ) і здійснюють прегравідарну корекцію шляхом внутрішньовенного введення імуноглобуліну при значеннях NK CD3-/CD56+/CD16+, NKT CD3+/CD56+/CD16+, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , ФНП- α відмінних від норми.

Поставлена задача вирішується також тим, що імуноглобулін (препарат Біовен Моно) вводять внутрішньовенно жінкам з безпліддям до настання вагітності в процесі проведення ЗІВ та ПЕ в сумарній дозі 400 мг/кг маси тіла протягом 3-6 днів.

Однією з основних причин невдалих спроб ЗІВ та ПЕ вважають розлад імунологічних механізмів імплантації. Імплантація є складним, багатоетапним процесом, який реалізується за участі множинних клітинних і гуморальних факторів та каскаду різноманітних міжклітинних взаємодій. Особливої пошкоджуючої дії клітинам трофобласту можуть завдавати клітини-натуральні кілери (NK-клітини), особливо за умови їх активації. Так, IL-2 перетворює NK-клітини в лімфокін-активовані кілери, подібні до тих, що вбивають пухлинні клітини; IFN- γ активує макрофаги, внаслідок чого продукуються ФНП- α та інтерлейкін 12 (IL-12), які, в свою чергу, активують NK-клітини. Крім того, високі концентрації IFN- γ та ФНП- α активують тромбоутворення, обмежуючи цим кровопостачання трофобласта. Ці речовини також зумовлюють васкуліти через інфільтрацію лімфоцитами, що пояснює низьку концентрацію хоріонічного гонадотропіну (ХГ) в крові або його падіння після перших позитивних результатів [4].

При невиношуванні вагітності та порушенні імплантації діють спільні етіопатогенетичні фактори, і тому визначення та усунення імунологічних порушень є важливим перед початком процедури ЗІВ та ПЕ для проведення відповідної прегравідарної корекції і попередження можливого негативного результату.

Спосіб здійснюють таким чином. Жінки перед лікуванням безпліддя методом ЗІВ та ПЕ проходять розширене імунологічне дослідження периферійної крові, яке, окрім досліджень IL-4, IL-10 і ФНП- α , включає визначення абсолютного та відносного вмісту NK CD3-/CD56+/CD16+,

NK-T CD3+/CD56+/CD16+, визначення IL-2, IL-6, ІФН- γ . Прегравідарну корекцію здійснюють при значеннях NK CD3-/CD56+/CD16+, NKT CD3+/CD56+/CD16+, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, ІФН- γ , ФНП- α відмінних від норми (межі норми процентного вмісту NK-клітин CD3-/56+/16+ - 5-15 %; та NK-T-клітин CD3+/56+/16+ - 3-7 %, IL-2 - 35-190 пг/мл; IL-4 - 1,0-35 пг/мл; IL-6 - 5-50 пг/мл; IL-10 - 1,0-45 пг/мл; ІФН- γ 0,0-70 пг/мл; ФНП- α - 5-30 пг/мл (лабораторія "Свролаб", м. Київ).

Жінкам з первинним безпліддям, в яких було дві та більше негативних спроб ЗІВ, ПЕ, а також жінкам з вторинним безпліддям, у яких були викидні в терміні до 22 тижнів, одночасно із здійсненням ЗІВ та ПЕ проводять внутрішньовенне крапельне введення імуноглобуліну (препарат Біовен Моно - імуноглобулін людини нормальний рідкий для внутрішньовенного введення; виробник Біофарма, Україна) в сумарній дозі 400 мг/кг маси тіла протягом 3-6 днів.

Запропонований спосіб впроваджується на базі клініки репродуктивної медицини "МЦ Інтерсоно". При розробці цього способу було комплексно обстежено 80 жінок перед початком проведення програми ЗІВ, ПЕ (60 жінок з двома і більше негативними спробами ЗІВ, ПЕ - I група; 20 жінок з двома і більше спробами ЗІВ, ПЕ, що завершилися викиднем в терміні до 22 тижнів - II група). Визначення NK CD3-/CD56+/CD16+, NK-T CD3+/CD56+/CD16 периферійної крові проводилося методом проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл (фірма Beckman Coulter, США) на пристрої CyAn™ ADP тієї ж фірми. Цитокиновий профіль визначався за допомогою хемілюмінесцентної технології на пристрої Evidence (фірма RANDOX, Великобританія).

Всі жінки були віком до 35 років, проведені спроби ЗІВ, ПЕ характеризувались переносом якісних бластоцист 5-ої доби культивування; у всіх жінок було виключено маткову патологію та зміни каріотипу в подружжя.

У 40 жінок I групи та у 15 жінок II групи було виявлено імунологічні порушення, які потребували корекції шляхом внутрішньовенного введення імуноглобуліну. 20 жінок I групи (надалі - група Ia) та 5 жінок II групи (надалі - група IIa) відмовились від імунологічної корекції запропонованим способом, їм було проведено ЗІВ та ПЕ за стандартною методикою. Решту 20 жінок I групи (надалі - група Ib) та 10 жінок II групи (надалі - група IIб) пройшли лікування за запропонованим способом одночасно з ЗІВ та ПЕ.

Проведені спостереження дозволили встановити, що використання запропонованого способу підвищення ефективності ЗІВ та ПЕ сприяло збільшенню частоти клінічних вагітностей, зменшувало частоту невиношування вагітності (Таблиця)

Таблиця

Вплив внутрішньовенного введення імуноглобуліну на ефективність ЗІВ та ПЕ

Показники	Група Ia	Група Ib	Група IIa	Група IIб
Клінічні вагітності	1 (5 %)	14 (70 %)	0	8 (80 %)
Невиношування	1 (5 %)	3 (15 %)	0	1 (10 %)
Термінові пологи	0	11 (55 %)	0	7 (70 %)

Клінічний приклад 1. Пацієнтка Р.І., 33 роки, вторинне безпліддя 7 років, трубний, чоловічий фактор. В анамнезі 1 самостійна вагітність у природному циклі, що завершилась викиднем в терміні 18-19 тижнів, відтак безпліддя 7 років. Проведено 3 спроби ЗІВ та ПЕ, які характеризувались перенесенням у порожнину матки ембріонів 5-ої доби культивування (бластоцист) хорошої якості. Одна спроба завершилась самовільним викиднем в терміні 12-13 тижнів, в результаті двох наступних спроб результат негативний, β -ХГ - менше 5 МО/л. При проведенні гістероскопі та біопсії ендометрію виключено маткову патологію, каріотипи у подружжя в нормі. Перед початком 4-ої спроби ЗІВ та ПЕ проведено імунологічне дослідження, результат: NK CD3-/CD56+/CD16+ - 17,73 %, NKT CD3+/CD56+/CD16+ - 10,8 %, +, IL-2 - 195 пг/мл; IL-4 - 0,8 пг/мл; IL-6 - 25 пг/мл; IL-10 - 22 пг/мл; ІФН- γ 12 пг/мл; ФНП- α - 15 пг/мл. Запропоновано імунокорекцію (внутрішньовенне введення імуноглобуліну - препарату Біовен Моно, пацієнтка погодилась. Проведено наступну, 4-у спробу ЗІВ з перенесенням двох бластоцист хорошої якості в порожнину матки, в результаті чого отримано позитивний результат - β -ХГ 375 МО/л на 13-ий день після переносу ембріонів. За даними УЗД в терміні 6-7 тижнів виявлено 2 плідних яйця в порожнині матки, 2 плоди. Вагітність перебігала з явищами загрози самовільного викидня і завершилась передчасними пологамі в терміні 34-35 тижнів.

Приклад 2. Пацієнтка Н.Т., 34 роки, вторинне безпліддя 11 років, трубного генезу; в анамнезі 4 негативних спроби ЗІВ та ПЕ, які характеризувались перенесенням у порожнину матки ембріонів 5-ої доби культивування (бластоцист) хорошої якості. Одна спроба завершилась

самовільним викиднем в терміні 7-8 тижнів, після другої спроби отримано анембріонію, в результаті двох наступних спроб результат негативний, β -ХГ - менше 5 МО/л. При проведенні гістероскопі та біопсії ендометрію виключено маткову патологію, каріотиби у подружжя в нормі. Перед початком 4-ої спроби ЗІВ проведено імунологічне дослідження, результат: NK CD3+/CD56+/CD16+ - 5,7 %, NKT CD3-/CD56+/CD16+ - 35,1 %, IL-2 - 135 пг/мл; IL - 4-1,9 пг/мл; IL-6 - 15 пг/мл; IL-10 - 0,9 пг/мл; ІФН- γ - 72 пг/мл; ФНП- α - 25 пг/мл. Пацієнтці запропоновано імунокорекцію (внутрішньовенне введення імуноглобуліну - препарату Біовен Моно), пацієнтка відмовилась. Проведено наступну, 5-у спробу ЗІВ з перенесенням якісних ембріонів у порожнину матки, в результаті чого отримано негативний результат - β -ХГ менше 5 МО/л.

Приклад 3. Пацієнтка К.С., 29 років, первинне безпліддя 6 років, чоловічий, трубний фактор, в анамнезі 3 негативних спроби ЗІВ та ПЕ (2 цикли зі стимуляцією овуляції, 1 кріоцикл) з переносом бластоцист. Перед початком 4-ої спроби ЗІВ та ПЕ проведено імунологічне дослідження, результат: NK CD3-/CD56+/CD16+ - 24,3 %, NKT CD3+/CD56+/CD16+ - 5 %, IL-2 - 35 пг/мл; IL-4 - 2,0 пг/мл; IL-6 - 7 пг/мл; IL-10 - 0,95 пг/мл; ІФН- γ - 26 пг/мл; ФНП- α - 45 пг/мл. Перед процедурою переносу ембріонів в процесі програми ЗІВ проведено внутрішньовенне введення імуноглобуліну (препарат Біовен Моно). Через 14 днів після переносу ембріонів β -ХГ становив 240 МО/л. В терміні 6 тижнів проведено УЗД - виявлено 1 плід, вагітність перебігала з явищами загрози самовільного викидня, завершилась терміновими пологами.

Запропонований спосіб дає змогу підвищити ефективність програм ЗІВ та ПЕ шляхом внутрішньовенного введення імуноглобуліну при імунологічних порушеннях.

Джерела інформації:

1. Andersen A.N. Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE / A.N. Andersen, Gianaroli L., Felberbaum R. et al. // Human Reprod. - 2005. - V. 20. - P. 1158-1176.

2. Коломнина Е.А. Особенности течения беременности после экстракорпорального оплодотворения // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. - 2002. - Т.1. - № 1. - С. 8-11.

3. Патент України на корисну модель № 33106, МПК А 61 К 35/14; опубл. 10.06.2008, Бюл. № 11.

4. Dey S.K. Molecular cues to implantation / S.K. Dey, H. Lim, S.K. Das // Endocrinol Rev. - 2004. - Vol. 25 - № 3. - P. 341-373.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб підвищення ефективності запліднення *in vitro* та переносу ембріонів (ЗІВ та ПЕ), що включає імунологічне дослідження периферійної крові і визначення інтерлейкіну 4 (IL-4), інтерлейкіну 10 (IL-10), фактору некрозу пухлин альфа (ФНП- α) та внутрішньовенне введення імуноглобуліну, який **відрізняється** тим, що до початку лікування безпліддя методом ЗІВ та ПЕ в периферійній крові пацієнток додатково проводять визначення абсолютного та відносного вмісту NK CD3-/CD56+/CD16+, NKT CD3+/CD56+/CD16+, інтерлейкіну 2 (IL-2), інтерлейкіну 6 (IL-6), інтерферону гамма (ІФН- γ) і здійснюють прегравідарну корекцію шляхом внутрішньовенного введення імуноглобуліну при значеннях NK CD3-/CD56+/CD16+, NKT CD3+/CD56+/CD16+, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, ІФН- γ , ФНП- α відмінних від норми.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що імуноглобулін (препарат Біовен Моно) вводять внутрішньовенно жінкам з безпліддям до настання вагітності під час проведення запліднення *in vitro* та переносу ембріонів в сумарній дозі 400 мг/кг маси тіла протягом 3-6 днів.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601