



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **72171**

(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 00803**

(22) Дата подання заявки: **26.01.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.08.2012**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.08.2012, Бюл.№ 15**

(72) Винахідник(и):

**Пирогова Віра Іванівна (UA),
Михайлишин Любов Олегівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА
ГАЛИЦЬКОГО,
вул. Пекарська, 69, м. Львів, 79010 (UA)**

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ НАСЛІДКІВ ЗАПЛІДНЕННЯ IN VITRO ТА ПЕРЕНОСУ ЕМБРІОНІВ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування наслідків запліднення in vitro та переносу ембріонів включає визначення антитіл до тиреоїдної пероксидази та тиреоглобуліну в периферійній крові пацієнток. До початку лікування безпліддя методом запліднення in vitro та переносу ембріонів додатково проводять визначення антифосфоліпідних антитіл, вмісту NK-клітин CD3-/CD56+/CD16+ та NKT-клітин CD3+/CD56+/CD16+.

UA 72171 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 прогнозування ненастання вагітності та невиношування вагітності після проведення запліднення *in vitro* і переносу ембріонів (ЗІВ і ПЕ).

Упродовж останніх десятиріч в Україні погіршується медико-демографічна ситуація через падіння народжуваності, зростання захворюваності та смертності. Безпліддя є одним з вагомих факторів демографічної проблеми в Україні, адже частота безпліддя в шлюбі досягає 18-20 % [1]. ЗІВ і ПЕ розглядається як один з найбільш перспективних методів лікування безпліддя. Однак протягом останніх років не відмічено суттєвого зростання частоти настання вагітностей у програмах допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ): лише приблизно одна з чотирьох програм ЗІВ і ПЕ закінчується народженням живих дітей [2], що пов'язано як з високою частотою ненастання вагітності, так і високою частотою мимовільних викиднів після програм ЗІВ та ПЕ [3]. Багаторазові невдалі програми ДРТ є однією із найактуальніших проблем сучасної репродуктивної медицини, що зумовлює пошук їх причин і шляхів подолання.

Однією з основних причин невдалих спроб ЗІВ і ПЕ вважають розлад імунологічних механізмів імплантації. Імплантація є складним, багатоетапним процесом, який реалізується за участі множинних клітинних і гуморальних факторів і каскаду різноманітних міжклітинних взаємодій. Особливої пошкоджуючої дії клітинам трофобласту можуть завдавати клітини - натуральні кілери (NK-клітини). Так, інтерлейкін - 2 (IL-2) перетворює NK-клітини в лімфокін-активовані кілери, подібні до тих, що вбивають пухлинні клітини; інтерферон - γ (IFN- γ) активує макрофаги, внаслідок чого продукуються фактор некрозу пухлин- α (ФНП- α) та інтерлейкін-12 (IL-12), які, в свою чергу, теж активують NK-клітини. Окрім того, цей тип NK-клітин (CD56+) може самостійно синтезувати ряд прозапальних цитокінів, в першу чергу, ФНП- α . Нещодавні дослідження на мишах показали, що основною точкою прикладання NK-клітин є не стільки трофобласт, скільки ендотелій судин: виникнення васкулітів через інфільтрацію судинної стінки лімфоцитами, порушене кровопостачання трофобласта - це пояснює як відсутність настання вагітності, так і низьку концентрацію хоріонічного гонадотропіну (ХГ) в крові або його падіння після перших позитивних результатів [4]. Серед інших імунологічних причин порушення імплантації розглядають аутоімунізацію, зміну кількості та активності певних імунних клітин під час вагітності [5]. Аутоімунізація як стан перманентної циркуляції аутоантитіл та аутореактивних лімфоцитів, дія яких спрямована проти власних антигенів організму, може бути причиною пошкодження як безпосередньо плода, так і плаценти, ендотеліоцитів, тромбоцитів тощо. Більшість спостережень свідчить, що жінки з класичними аутоімунними захворюваннями входять в безплідну популяцію ще перед клінічними проявами хвороби. До антитіл, які можуть порушувати фертильність, належать антифосфоліпідні (АФА) (фосфатидилсерінові, фосфатидилетаноламінові, фосфатидилхолінові, фосфатидилгліцеролові, фосфатидилінозитолові), антитіла до тиреоїдної пероксидази та тиреоглобуліну (АТА), антинуклеарні, антиспермальні, антиоваріальні антитіла, антитіла до гормонів та нейротрансмітерів [6] тощо.

Найбільш близьким аналогом запропонованої корисної моделі є спосіб прогнозування невиношування вагітності аутоімунного ґенезу [7], що включає визначення концентрації антитіл до тиреоїдної пероксидази та тиреоглобуліну в периферійній крові.

Недоліком аналога є те, що визначення лише антитіл до тиреоїдної пероксидази та тиреоглобуліну є недостатнім для оцінки ступеня аутоімунних порушень та прогнозування ризику невиношування чи негативного результату після ЗІВ та ПЕ.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити спосіб, який дозволить спрогнозувати наслідки ЗІВ та ПЕ у пацієнток, що проходять лікування безпліддя шляхом ЗІВ та ПЕ.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі прогнозування наслідків ЗІВ та ПЕ, що включає визначення АТА в периферійній крові пацієнток, згідно з корисною моделлю, до початку лікування безпліддя методом ЗІВ та ПЕ додатково проводять визначення АФА та вмісту NK-клітин CD3-/CD56+/CD16+ і NKT-клітин CD3+/CD56+/CD16+ і при отриманих значеннях, які перевищують встановлені межі норми, прогнозують можливе ненастання або невиношування вагітності.

Перевагою заявленого способу є те, що проводять визначення не лише АТА, а й АФА. Додаткове визначення іншого виду аутоантитіл та певних імунних клітин дає змогу більш ефективно спрогнозувати ризики для вагітності. Ці дослідження проводять одночасно з визначенням NK-клітин CD3-/CD56+/CD16+, NKT-клітин CD3+/CD56+/CD16+ в периферійній крові, що дає можливість більш комплексно оцінити відповідь материнського організму і спрогнозувати можливі наслідки після проведення ЗІВ та ПЕ. Визначення NKT-клітин

CD3+/CD56+/CD16+ представляє на сьогоднішній день найбільший інтерес через свою особливу властивість зв'язувати антиген без участі головного комплексу гістосумісності [8].

На основі запропонованого способу проводять прогнозування не лише невиношування вагітності, але й можливого ненастання вагітності у жінок, що проходять лікування безпліддя методом ЗІВ та ПЕ, аналізуючи імунологічні порушення серед різних груп пацієнток з безпліддям: серед жінок з двома і більше негативними спробами ЗІВ та ПЕ, серед жінок з викиднем в анамнезі в терміні до 22 тижнів та з доношеною вагітністю, що наступила після першої спроби ЗІВ та ПЕ.

У пацієнток з повторними негативними спробами ЗІВ та ПЕ та у пацієнток з анамнезом невиношування вагітності та негативними спробами ЗІВ та ПЕ спостерігається висока частота аутоімунізації (підвищення АТА і АФА), що часто поєднується з підвищенням НКТ-клітин CD3+/CD56+/CD16+, НК-клітин CD3-/CD56+/16+. У жінок, в яких вагітність наступила з першої спроби ЗІВ та ПЕ, вищевказані зміни практично не виявляються. Пацієнтки з підвищенням АТА, АФА, що поєднуються з підвищенням НКТ CD3+/CD56+/CD16+, НК CD3-/CD56+/16+ в периферійній крові, є групою високого ризику повторних негативних спроб ЗІВ і ПЕ та невиношування вагітності.

Спосіб здійснюють таким чином. До початку лікування безпліддя методом ЗІВ та ПЕ виконують забір периферійної крові пацієнток шляхом венепункції в кількості 10 мл в систему з ЕДТА (гепаринові кульки). Визначення НК-клітин CD3-/CD56+/CD16+ та НК-Т-клітин CD3+/CD56+/CD16+ в периферійній крові проводять методом проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл (фірма Beckman Coulter, США) на пристрої CyAn™ ADP (фірма Beckman Coulter, США). Підраховують показники відносного (%) та абсолютного вмісту НК-клітин CD3-/56+/16+, НКТ-клітин CD3+/56+/16+. Відносну кількість НК-клітин CD3-/56+/16+ та НКТ-клітин CD3+/56+/16+, яка перевищує встановлені межі норми, розцінюють як патологічну (межі норми відносної кількості НК-клітин CD3-/56+/16+ - 5-15 %; та НК-Т-клітин CD3+/56+/16+ - 3-7 % (лабораторія "Євролаб", м. Київ). Визначення АТА проводять електрохромолюмінесцентним методом на аналізаторі Cobas 6000 (фірма Roche Diagnostics, Швейцарія). Результат оцінюють як позитивний при рівні антитіл до тиреопероксидази більше 34 МО/мл та більше 115 МО/мл для антитіл до тиреоглобуліну (лабораторія "Синево", м. Київ). Визначення АФА проводять імунолюмінесцентним методом на аналізаторі Liaison Diasorin (Італія). АФА класу IgM and IgG більше, ніж 10 МО/мл, розцінюють як позитивний тест (лабораторія "Синево", м. Київ).

Запропонований спосіб впроваджується на базі клініки репродуктивної медицини "МЦ Інтерсоно" (м. Львів, Україна). За запропонованим способом комплексно обстежено 100 жінок перед початком проведення програми ЗІВ та ПЕ (60 жінок з двома і більше негативними спробами ЗІВ - I група; 20 жінок з викиднем в анамнезі в терміні до 22 тижнів і проходили лікування безпліддя шляхом ЗІВ та ПЕ - II група; 20 жінок з доношеною вагітністю, що наступила після першої спроби ЗІВ - III група). Всі жінки були віком до 35 років, проведені спроби ЗІВ та ПЕ характеризувались переносом якісних бластоцист 5-ої доби культивування; у всіх жінок було виключено маткову патологію та зміни каріотипу у подружжя.

У 40 % жінок I групи виявлено підвищення НК-клітин CD3-/CD56+/CD16+, НК-Т-клітин CD3+/CD56+/CD16+ в периферійній крові, у 56,7 % жінок відносна кількість НК-клітин CD3-/CD56+/CD16+, НК-Т-клітин CD3+/CD56+/CD16+ була в межах норми, а у 3,3 % - спостерігалось зниження цих показників. У II групі жінок з наявністю викидня в анамнезі частота виявлення підвищеного вмісту НК-клітин CD3-/CD56+/CD16+, НК-Т-клітин CD3+/CD56+/CD16+ була найвищою і склала 65 %, у 35 % - змін не виявлено. У жінок з доношеною вагітністю (III група), яка наступила з першої спроби ЗІВ та ПЕ, підвищені рівні НК-клітин CD3-/CD56+/CD16+, НКТ-клітини CD3+/CD56+/CD16+ виявлялись найрідше - в 20 % випадків, у 80 % - змін не було виявлено ($p < 0,05$).

АТА виявлено у 23,3 % пацієнток I групи, у 30 % пацієнток II групи та у 10 % - III групи, АФА - у 6,6 % I групи, 8 % II групи та у 3 % пацієнток III групи. При цьому у деяких пацієнток I та II груп виявлено одночасно АТА та АФА - 5 (8,35 %) і 3 (15 %) відповідно. Цікавою знахідкою було і те, що у пацієнток I та II груп підвищення АТА і АФА часто асоціювалось з підвищенням кількості НК-клітин, тоді, коли такої асоціації не виявлено серед пацієнток III групи.

Клінічний приклад 1. Пацієнтка Р.Т., 30 років, первинне безпліддя 6 років, чоловічий 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 проведено імунологічне дослідження, результат: НК-клітини CD3-/CD56+/CD16+ - 21,43 %, НКТ-клітини CD3+/CD56+/CD16+ - 5 %. Виявлено підвищення антитіл до тиреоїдної пероксидази - 235 МО/мл та тиреоглобуліну - 340 МО/мл, АФА класу IgM, IgG не виявлено. Проведена 4-а спроба ЗІВ та ПЕ з переносом 3-х

бластоцист хорошої якості 5-ої доби культивування, але без корекції вищевказаних змін. В результаті - вагітність не наступила, β -ХГ менше 5 МО/л.

Клінічний приклад 2. Пацієнтка К.І., 34 роки, вторинне безпліддя 7 років, трубного ґенезу. В анамнезі 1 спонтанна вагітність, що завершилась викиднем в терміні 18 тижнів та 2 негативні спроби ЗІВ і 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 негативний результат, 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-клітини CD3-/CD56+/CD16+ - 31 %, NKT-клітини CD3+/CD56+/CD16+ - 16,47 %. Виявлено підвищення антитіл до тиреоїдної пероксидази - 235 МО/мл та тиреоглобуліну - 340 МО/мл, антифосфоліпідних антитіл класу IgM-25 МО/л, IgG-18 МО/л. Проведено наступну, 5-у спробу ЗІВ з перенесенням якісних ембріонів у порожнину матки, в результаті чого отримано вагітність, β -ХГ - 205 МО/л на 12-ий день після переносу ембріонів. За даними УЗД в терміні 6-7 тижнів виявлено 1 плідне яйця в порожнині матки, 1 плід із серцебиттям. Пацієнтка отримувала лікування антикоагулянтами, антиагрегантами з початку контрольованої стимуляції в програмі ЗІВ, ПЕ і впродовж всієї вагітності. Вагітність завершилась самовільним викиднем в терміні 14-15 тижнів.

Клінічний приклад 3. Пацієнтка Ч.О., 28 років, первинне безпліддя 6 років, чоловічий фактор. Каріотиби подружжя в нормі, під час проведення гістероскопії патології матки не виявлено. Програми допоміжних репродуктивних технологій не застосовувались. Проведено імунологічне дослідження, результат: NK-Т-клітини CD3+/CD56+/CD16+ - 5,8; NK-клітини CD3-/CD56+/16+ - 10,73 %; АТА, АФА не виявлено. Проведено ЗІВ та ПЕ з перенесенням двох бластоцист хорошої якості в порожнину матки на 5-у добу після аспірації ооцитів, в результаті чого отримано позитивний результат - β -ХГ 275 МО/л на 13-ий день після переносу ембріонів. За даними УЗД в терміні 6-7 тижнів виявлено 1 плідне яйця в порожнині матки, 1 плід. Вагітність перебігала без ускладнень і завершилась терміновими пологамі в терміні 39-40 тижнів, народжено живу, здорову дитину.

Джерела інформації:

1. Мусієнко А.В. Сучасні репродуктивні технології: досягнення та перспективи розвитку в лікуванні безпліддя / А.В. Мусієнко, Ф.В. Дахно // Здоров'я України.-2007. - № 18/1 - С. 81-82.

2. 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.

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

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.

5. Carp H.J.A. Autoantibodies as predictors of pregnancy complications / P.L. Meroni, Y. Shoenfeld / H.J.A. Carp // Elsevier.-2007. - P. 809-814.

6. Shoenfeld Y. Autoantibodies and prediction of reproductive failure / Y. Shoenfeld, H.J.A. Carp, V. Molina // Am J Reprod Immunol.-2006. - № 56. - P. 337-344.

7. Деклараційний патент України на винахід № 52545А, МПК G 01 N 33/49, А61Р15/00; опубл. 16.12.2002, Бюл. № 12.

8. Brandes M. Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity / M. Brandes, K. Willmann, A.B. Lang et al // Blood-2003.- Vol. 102. - № 10. - P. 3693-3701.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування наслідків запліднення in vitro та переносу ембріонів, що включає визначення антитіл до тиреоїдної пероксидази та тиреоглобуліну в периферійній крові пацієнток, який **відрізняється** тим, що до початку лікування безпліддя методом запліднення in vitro та переносу ембріонів додатково проводять визначення антифосфоліпідних антитіл, вмісту NK-клітин CD3-/CD56+/CD16+ та NKT-клітин CD3+/CD56+/CD16+ і при отриманих значеннях, які перевищують встановлені межі норми, прогнозують можливе ненастання або невиношування вагітності.

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

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