



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **82649** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 03126	(72) Винахідник(и): Чернишов Віктор Павлович (UA), Донської Борис Владиславович (UA)
(22) Дата подання заявки: 14.03.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.08.2013	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПЕДІАТРІЇ, АКУШЕРСТВА І ГІНЕКОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", вул. Платона Майбороди, 8, м. Київ, 04050 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.08.2013, Бюл.№ 15	

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ІМУНОТРОПНОЇ ТЕРАПІЇ У ЖІНОК З ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНИМ ЗАПЛІДНЕННЯМ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування ефективності імунотропної терапії у жінок з екстракорпоральним заплідненням шляхом імунологічного дослідження венозної периферичної крові наступних показників з їх обчисленням: цитотоксичності природних кілерів, експресії активаційних маркерів на Т лімфоцитах, Т цитотоксичних лімфоцитах, Т хелперах, природних кілерах, експресії KIR (CD158a) та CD8 на природних кілерах. При цьому відхилення їх рівня від "меж успішного коридору ЕКЗ", які формуються в межах з персентилями P5-P95 (90 % даних), отриманими при дослідженні жінок з успішним екстракорпоральним заплідненням, та відхилення кожного показника за "межі успішного коридору ЕКЗ" оцінюють в балах, притаманних окремим показникам. Сума балів окремої пацієнтки 3 і більше є критерієм для призначення імунотропної терапії.

UA 82649 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема клінічної імунології, акушерства і гінекології, може бути використана для призначення імуноотропної терапії при невдачах екстракорпорального запліднення у жінок, зокрема у жінок, які багаторазово мали негативний результат екстракорпорального запліднення (ЕКЗ).

Протягом досить тривалого часу були виявлені окремі імунологічні ознаки негативного результату екстракорпорального запліднення. В розробках різних авторів при багаторазових невдачах екстракорпорального запліднення були зареєстровані підвищення активації Т лімфоцитів периферичної крові у вигляді підсилення експресії на них активаційних маркерів CD69 та HLA-DR, а також підвищення рівня TNF- α продукуючих Т хелперів [Coulam C.B., Roussev R.G. Increasing circulating T-cell activation markers are linked to subsequent implantation failure after transfer of in vitro fertilized embryos // *Am. J. Reprod. Immunol.*-2003. - P. 340-345]. Підсилення домінанти Th1 типу імунної відповіді відображає системний внесок Th1 цитокінів при багаторазових невдачах екстракорпорального запліднення [Kwak-Kim J.Y.H., Chung-Bang H.S., Ng S.C., Ntrivalas E.I., Mangubat C.P., Beaman K.D., Beer A.E., Gilman-Sachs A. Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with implantation failures after IVF // *Human Reproduction*-2003. - P. 767-773]. Цитокіни, хемокини та хемокинові рецептори, які асоційовані з Th1 і Th2 типами імунної відповіді, приймають участь у різних фізіологічних і патологічних процесах і в значній мірі відображають актуальний статус організму. Т хелпери, які відносяться до Th1, селективно експресують хемокиновий рецептор CXCR3, тоді як Th2 хелпери селективно експресують другий хемокиновий рецептор CCR4 [Kim C., Rott L., Kunkel E.J., Genovese M.C., Anrew D.P., Wu L., Butcher E.C. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo // *J. Clin. Invest.*-2001. - P. 1331-1339]. Раніше нами показано, що експресія CXCR3 та CCR4 на Т лімфоцитах хелперах відображає активність внутрішньоклітинних цитокінів - інтерферону-гамма (Th1) та інтерлейкіну 4 (Th2) при вагітності [Чернышов В.П., Туманова Л.Е., Судома И.А., Банников В.И. Особенности иммунной регуляции при беременности с аллогенным плодом // *Журн. АМН України*, 2008. - Т 14, № 3. - С. 541-549. Chernyshov V.P., Tumanova L.E., Sudoma I.A., Bannikov V.I. Th1 and Th2 in Human IVF Pregnancy with Allogenic Fetus // *Am. J. Reprod. Immunol.*-2008. - P. 352-358]. Особливу увагу у проблемі невдач екстракорпорального запліднення приділяється ролі природних кілерів [Coulam C.B., Roussev R.G. Correlation of NK cell activation and inhibition markers with NK cytotoxicity among women experiencing immunologic implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer // *J. Assist. Reprod. Genet.*-2003. - P. 58-62]. Рецептори природних кілерів контролюють активність природних кілерів шляхом балансу сигналіngu між активуючими і інгібуючими рецепторами, так званими KIR рецепторами. Цей баланс порушується при відторгненні плоду організмом матері, спонтанних абортах та неплідді [Ntrivals E.I., Bowser C.R., Kwak-Kim J., Beaman K.D., Gilman-Sachs A.: Expression of killer immunoglobulin-like receptors on peripheral blood NK cell subsets of women with recurrent spontaneous abortions or implantation failures // *Am. J. Reprod. Immunol.*-2005. - P. 215-221]. Підвищення цитотоксичності природних кілерів є незалежним фактором ризику при неплідді і не асоціюється з віком, тривалістю непліддя, депресією, лікуванням гіперпролактинемії або ендометріозу [Matsubayashi H., Hosaka T., Sugiyama Y., Suzuki T., Arai T., Kondo A., Sugi T., Izumi S., Makino T. Increased natural killer-cell activity is associated with infertile women // *Am. J. Reprod. Immunol.*-2001. - P. 318-322]. Надлишок продукції інтерферону-гамма (IFN- γ) природними кілерами периферичної крові відмічено у невагітних жінок зі спонтанними абортами та невдачами екстракорпорального запліднення [Fukui F., Kwak-Kim J., Ntrivalas E., Gilman-Sachs A., Lee S.K., Beaman K. Intracellular cytokine expression of peripheral blood natural killer cell subsets in women with recurrent spontaneous abortions and implantation failures // *Fertility and Sterility*-2008. - P. 157-165]. Серед KIR рецепторів CD158a є найбільш адекватним для оцінки стану природних кілерів, так як його експресія не асоціюється з індивідуальним HLA фенотипом. Тобто знайдено кілька факторів, включаючи активність природних кілерів і активацію Т лімфоцитів, які асоціюються з ЕКЗ невдачами. Відомий спосіб прогнозування результатів лікування непліддя методом екстракорпорального запліднення [RU 2357673 С1, 01.10.2007, Потехина Ю.П., Щербатюк Т.Г., Хрулева Н.В. "Способ прогнозирования результатов лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения"], при якому проводять трансвагінальну пункцію фолікулів під контролем УЗД з наступним дослідженням отриманої фолікулярної рідини. При цьому фолікулярна рідина підлягала хемілюмінесцентному аналізу для оцінки вільнорадикальної активності і по показникам загальної антиоксидантної активності дають прогноз настання вагітності. При показниках загальної антиоксидантної активності 0,05 та вище дають несприятливий прогноз, при показниках загальної антиоксидантної активності нижче 0,05 дають сприятливий прогноз - імовірність настання вагітності більше 50 %.

Недоліком способу є те, що не враховуються імунологічні зміни, притаманні пацієнткам з ЕКЗ невдачами.

Відомо покращення результатів ЕКЗ після терапії внутрішньовенним імуноглобуліном жінок, у яких були підвищеними рівні циркулюючих CD56+ клітин [Coulam C.B., Goodman C. Increased pregnancy rates after IVF/ET with intravenous immunoglobulin treatment in women with intravenous immunoglobulin treatment in women with elevated circulating CD56+cells // Early Pregnancy-2000. - P. 90-98], також з підвищенням Th1/Th2 цитокінів [Winger E.E., Reed J.L., Ashoush S., Ahuja S., El-Toukhy T., Taranissi M. Treatment with adalimumab (Humira) and intravenous immunoglobulin improves pregnancy rates in women undergoing IVF // Am. J. Reprod. Immunol.-2009. - P. 113-120; Winger E.E., Reed J.L., Ashoush S., El-Toukhy T., Ahuja S., Taranissi M. Elevated preconception CD56+16+and/or Th1:Th2 levels predict benefit from IVIG therapy in subfertile women undergoing IVF // Am. J. Reprod. Immunol.-2011. - P. 394-403]. Однак для окремої пацієнтки, у якої можуть бути різні варіанти порушень, а також значення комплексу порушень у конкретному випадку ще не є сформульованими і доведеними до практичного використання для призначення імуноотропної терапії.

Відомий спосіб прогнозування результатів екстракорпорального запліднення у пацієнток з аутоімунними захворюваннями (Пат. 2345715 C2, RU). У пацієнтки встановлюють присутність в анамнезі аднекситу, присутність в периферичній крові HLA-антигенів B18, Cw3, Cw4 та кількість тромбоцитів у коагулограмі. Підраховують прогностичний індекс F по формулі: $F = 1,4 \times X1 - 1,3 \times X2 - 2,4 \times X3 - 2,1 \times X4 + 0,019 \times X5 - 2,5$; де X1 - наявність (або відсутність) у фенотипі жінки HLA-антигену B18 (1 чи 0); X2 - наявність (або відсутність) у фенотипі жінки HLA-антигену Cw3 (1 або 0); X3 - наявність (або відсутність) у фенотипі жінки HLA-антигену Cw4 (1 або 0); X4 - наявність (або відсутність) в анамнезі аднекситу (1 або); X5 - кількість тромбоцитів у коагулограмі (10^9 /л). Якщо F більше 0, прогнозують вдалий наслідок проведення ЕКЗ та переносу ембріону; при значеннях F менше 0, прогнозують невдалий випадок ЕКЗ і не рекомендують проведення ЕКЗ на даному етапі у зв'язку з передбаченою відсутністю позитивного результату ЕКЗ. Недоліком способу є те, що даний спосіб можна використовувати тільки у пацієнток з системними аутоімунними захворюваннями, які складають дуже невеличку групу серед пацієнток, які потребують ЕКЗ. Основна більшість пацієнток, які потребують ЕКЗ, не мають виразних ознак аутоімунних захворювань. Крім цього даний спосіб не враховує суттєвих імунологічних змін, які притаманні жінкам з багаторазовими невдачами ЕКЗ - це і підвищення експресії активаційних маркерів на Т лімфоцитах, підвищення експресії KIR рецепторів на природних кілерах та їх цитотоксичності тощо. Тобто не враховує актуальний імунний статус пацієнтки.

Найбільш близьким до об'єкта, що заявляється, є спосіб (Пат. 54560, Україна) прогнозування результату екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) шляхом імунологічного дослідження венозної периферичної крові, в якому досліджуються показники цитотоксичності природних кілерів, активаційні маркери на Т лімфоцитах, Т цитотоксичних лімфоцитах, Т хелперах, природних кілерах, експресія KIR (CD158a) та CD8 на природних кілерах і реєструється в балах відхилення їх рівня від "меж ЕКЗ фертильності", які формуються в межах з персентілями P5-P95 (90 % даних), отриманими при дослідженні жінок з успішним екстракорпоральним заплідненням, при цьому відхилення кожного показника за "межі ЕКЗ фертильності" оцінюється в балах, притаманних окремим показникам, сума балів окремої пацієнтки виражається як прогностичний індекс; з підвищенням прогностичного індексу більше 1,5 вірогідність ЕКЗ успіху зменшується. Недоліком способу є те, що даний спосіб можливо використовувати тільки для прогнозу зменшення успіху ЕКЗ, але він не надає інформацію про можливість призначення імунотерапії, яка буде успішною.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено задачу створення способу призначення імуноотропної терапії для покращення результату екстракорпорального запліднення, в якому враховано основні імунологічні порушення, які притаманні жінкам з багаторазовими невдачами ЕКЗ, тобто жінкам, які найбільш потребують цього призначення, впровадження цього способу дасть змогу більш направлено призначати імуноотропну терапію жінкам на ЕКЗ та отримувати позитивний результат від допоміжних репродуктивних технологій, що призведе до настання успішної вагітності та збільшення народжуваності здорових дітей.

Поставлена задача вирішується у способі прогнозування та призначення імуноотропної терапії у жінок з екстракорпоральним заплідненням, у якому, згідно з корисною моделлю, при додатковому імунологічному дослідженні венозної периферичної крові визначаються наступні показники з їх обчисленням:

- цитотоксичність природних кілерів,
- експресія активаційних маркерів на Т лімфоцитах, Т цитотоксичних лімфоцитах, Т хелперах, природних кілерах,

- експресія KIR (CD 158a) та CD8 на природних кілерах;
причому відхилення їх рівня від "меж успішного коридору ЕКЗ", які формуються в межах з персентилями P5-P95 (90 % даних), отриманими при дослідженні жінок з успішним екстракорпоральним заплідненням, та відхилення кожного показника за "межі успішного коридору ЕКЗ" оцінюється в балах, притаманних окремим показникам, сума балів окремої пацієнтки 3 і більше є критерієм для призначення імунотропної терапії.

Для клінічного опробування способу було проведено подвійне сліпе дослідження на 244 пацієнтках у трьох ЕКЗ клініках міста Києва (табл. 1).

Таблица 1

Відсоток успіху екстракорпорального запліднення в залежності від сумарного індексу без призначення імунотропної терапії

№ п/п	Число пацієнток	Сумарний індекс	% вагітності	% народження дитини
1	53	0-1	50,9	33,9
2	28	2	42,8	28,5
3	42	≥3	21,4	9,5

Проведені дослідження показали, що без призначення імунотропної терапії з підвищенням сумарного індексу знижується відсоток успіху екстракорпорального запліднення і народження дитини. Відсоток успіху штучного ЕКЗ в залежності від сумарного індексу після проведення імунотропної терапії наведено в табл. 2.

Таблица 2

Відсоток успіху екстракорпорального запліднення в залежності від сумарного індексу після імунотропної терапії внутрішньовенним імуноглобуліном

№ п/п	Число пацієнток	Сумарний індекс	% вагітності	% народження дитини
1	41	0-1	45,7	37,1
2	34	2	44,0	32,0
3	46	≥3	43,0	30,4

Результати, наведені в табл. 2, свідчать про високу ефективність внутрішньовенного імуноглобуліну лише в тих випадках, коли сумарний індекс був 3 та більше. Призначати імунотропну терапію у випадках, коли сумарний індекс був 0-1 або 2 недоцільно, тому що покращення результатів штучного ЕКЗ в таких випадках було не суттєвим.

Спосіб виконується наступним чином. Зразки периферичної крові пацієнток з багаторазовими невдачами ЕКЗ отримували на 17-23 дні менструального циклу перед стимуляцією гонадотропіном в ЕКЗ процедурі.

Субпопуляції лімфоцитів вивчали за допомогою триколіорової проточної цитометрії в цільній крові і після обробки моноклональними антитілами, які кон'юговані з флуорохромами FITC, PE, PE-Cy5, еритроцити підлягали лізису за допомогою лізуючого розчину фірми BD Biosciences, США. Використовували наступні комбінації моноклональних антитіл (BD Biosciences): CD3/CD4/CD8, HLA DR/CD56/CD3, CD8/CD56/CD3, CD158a/CD56/CD3, HLA DR/CD8/CD3, HLA DR/CD4/CD3. Зразки аналізували за допомогою проточного цитометра FACScan (BD Biosciences). Для підрахування та відокремлення лімфоцитів від гранулоцитів, моноцитів та побічних частинок зразки цільної крові інкубували з моноклональними антитілами набору LeucoGATE (CD45-FITC/CD14-PE, BD Biosciences). Для контролю використовували IgG1-FITC-IgG2-PE тієї ж фірми. Оцінку внутрішньоклітинних цитокінів проводили за допомогою проточної цитометрії моноуларних клітин периферичної крові. Зразки периферичної крові інкубували 4 години з іономіцином, брэфелдином і форболом 12-міристан 13 ацетат (PMA) згідно з рекомендаціями та використанням реагентів Sigma, St Louis, MO, USA. Клітини лізували за допомогою лізуючого розчину, пермеаблізували за допомогою пермеабілізуючого розчину (інструкція та реагенти BD Biosciences, San Jose, CA, USA) та фарбували флуорохром-кон'югованими моноклональними антитілами до цитокінів. Використовували наступні моноклональні антитіла: IFN-γ/IL-4/CD4, IL-10/TNF/CD4 (BD Biosciences). Цитотоксичність

природних кілерів (ПКц) оцінювали за допомогою проточної цитометрії, використовували проточний цитометр FACSCan (Becton Dickinson). Клітини мішені лінії K562 мітили флуоресцентною міткою CFDA (карбокси-2,7-дихлорофлуоресцеїн діацетат) Mol Probes (США). Ефектори (моноклеарні клітини периферичної крові) виділяли на градієнті щільності Histopaque1077 ("Sigma", США). Клітини мішені інкубували з ефекторами у співвідношеннях 1/5 1/10 1/20 4 години в RPMI-1640 с 10 % бичачою сироваткою в інкубаторі при 37 °С з 5 % CO₂ ("Revco", Швейцарія). Після цього мертві (пермеабілізовані) клітини мітили пропідієм йодистим PI ("Sigma", США), в результаті підраховували лізис для кожного співвідношення ефектор/мішень. % цитотоксичності = % мічених PI (червона флуоресценція) / на кількість мішеней, мічених CFDA (зелена флуоресценція).

Для підрахунку сумарного індексу було вибрано 10 субпопуляційних маркерів та два показники цитотоксичності природних кілерів (ПК) у співвідношенні клітина мішень - клітина ефектор 1:10 та 1:20. Показники, зміни, по яким оцінювались як 1 бал: CD56+CD3+ >20 %; CD158a+CD3+ >5,5 %; CD4+ <40 %; CD3+CD8+ >30 %; HLA DR+CD8+CD3+ >30 %; CD3-CD56+ (природні кілери) >18 %; HLA DR+CD56+CD3- >25 %; CD8+CD56+CD3- >60 %; CD8+CD56+CD3- <40 %; CD158a+CD56+CD3- <20 %; ПК лізис 1:10 >30 %; ПК лізис 1:20 >40 %.

Приклади підрахунку прогностичного індексу у пацієток з багаторазовими невдачами ЕКЗ наведено у табл. 3.

Таблиця 3

Підрахунок сумарного індексу (CI) у пацієток з багаторазовими невдачами ЕКЗ

Параметри	Негативні значення	Пацієнтка Л., 20.10.2009	Бали	Пацієнтка П., 20.10.2009	Бали	Пацієнтка П. після корекції 7.12.2009	Бали
CD158a+CD3+	>5,5 %	1,65	0	0,48	0	0,45	0
CD4+CD3+	<40 %	45,5	0	38,5	1	37,2	0
HLADR+CD8+CD3+	>30 %	33	1	43,2	1	44,5	0
CD56+CD3+	>20 %	6	0	19,4	0	21,3	1
CD3-CD56+	>18 %	13	0	15,9	0	15,4	0
HLADR+CD56+CD3-	>25 %	11	0	33,9	1	34,5	0
CD158a+CD56+CD3-	>56 % <20 %	13	0	26,1	0	26,5	0
CD8+CD56+CD3-	>60 % <40 %	41	0	46,6	0	47,3	0
ПК лізис 1:10	>30 %	17		37		34	
ПК лізис 1:20	>40 %	28	0	55	1	57	0
CI			1		4		4

Клінічні приклади.

Приклад 1.

Пацієнтка Л., 31 рік. Трубний фактор непліддя. В анамнезі 3 невдалих ЕКЗ процедури. Результати імунологічного дослідження наведено в табл. 3. Прогностичний індекс 1. В результаті ЕКЗ циклу була успішна вагітність.

Приклад 2.

Пацієнтка П., 29 років. Непліддя нез'ясованого походження. В анамнезі чотири невдачі в ЕКЗ циклі. Результати двох імунологічних обстежень пацієнтки наведено в табл. 3. При першому обстеженні прогностичний індекс був 4 і результат в ЕКЗ циклі - чергова невдача. При другому обстеженні прогностичний індекс був також 4, проте було проведено імунотропне лікування і в результаті клінічний результат - успішна вагітність.

Описаний підхід дозволяє виявити пацієток з низькими шансами імплантації ембріона ще до проведення циклу ЕКЗ, що дає змогу на проведення додаткового імунотропного лікування і відповідно підвищення успішності подальшого лікування. Подібна діагностична схема та своєчасна патогенетична терапія підвищує ефективність лікування непліддя та знижує частоту ускладнень вагітності. Це в цілому має значний вплив на репродуктивне здоров'я нації та може покращити демографічні процеси.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб прогнозування ефективності імунотропної терапії у жінок з екстракорпоральним заплідненням, що здійснюють шляхом дослідження венозної периферичної крові, який **відрізняється** тим, що проводять імунологічне дослідження венозної крові наступних показників з їх обчисленням:
- цитотоксичності природних кілерів,
 - експресії активаційних маркерів на Т лімфоцитах, Т цитотоксичних лімфоцитах, Т хелперах,
 - природних кілерах,
 - експресії KIR (CD158a) та CD8 на природних кілерах,
- причому відхилення їх рівня від "меж успішного коридору ЕКЗ", які формуються в межах з персентилями P5-P95 (90 % даних), отриманими при дослідженні жінок з успішним екстракорпоральним заплідненням, та відхилення кожного показника за "межі успішного коридору ЕКЗ" оцінюють в балах, притаманних окремим показникам, сума балів окремої пацієнтки 3 і більше є критерієм для призначення імунотропної терапії.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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