

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені М.І.ПИРОГОВА**

**МИХАЙЛИШИН ЛЮБОВ ОЛЕГІВНА**

УДК: 618.177-089.888.11-06:618.39]-02-084

**ПРИЧИНИ І ПРОФІЛАКТИКА ПОВТОРНИХ  
НЕГАТИВНИХ СПРОБ ЗАПЛІДНЕННЯ IN VITRO**

14.01.01 – акушерство та гінекологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Вінниця-2013

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького МОЗ України

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, професор

**Пирогова Віра Іванівна**, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, завідувач кафедри акушерства, гінекології та перинатології ФПДО

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, професор

**Булавенко Ольга Василівна**, Вінницький національний медичний університет ім. М.І.Пирогова МОЗ України, завідувач кафедри акушерства та гінекології № 2;

доктор медичних наук, професор

**Юзько Олександр Михайлович**, Буковинський державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри акушерства та гінекології факультету післядипломної освіти.

Захист відбудеться «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 р. о \_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 05.600.01 при Вінницькому національному медичному університеті імені М.І.Пирогова МОЗ України (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова МОЗ України (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56).

Автореферат розісланий “\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2013 року

**Вчений секретар**

**спеціалізованої вченої ради,**

**доктор медичних наук, професор**

**С.Д.Хіміч**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Сталий розвиток суспільства будь-якої країни значною мірою залежить від її демографічної перспективи. Скорочення чисельності населення в Україні внаслідок низького рівня народжуваності та високого рівня загальної смертності, ставить під загрозу її майбутнє і робить проблему репродуктивного здоров'я загальнонаціональною. Безпліддя є одним з вагомих факторів демографічної проблеми в Україні, адже частота безпліддя в шлюбі сягає 18–20 % (А. В. Мусієнко, 2007; О.В. Булавенко, 2008; О.М. Юзько, 2009). Запліднення *in vitro* (ЗІВ) розглядається як один з найбільш перспективних методів лікування безпліддя, однак, згідно з даними Європейського товариства репродукції людини і ембріології (ESHRE), частота настання вагітності в програмах ЗІВ з розрахунку на перенесення ембріона в порожнину матки становить близько 30% (А. N. Andersen, 2005). Останніми роками в літературі з'явився термін «звичні або повторні імплантаційні втрати» (В.К.Тан і співавт., 2005; Е. Margalioth і співавт., 2006). Існує декілька тлумачень самого поняття «багаторазові невдалі спроби ЗІВ»: наявність більше 2-х (В. Тан та співавт., 2005) або 3-х (Е.І. Margalioth і співавт., 2006) невдалих спроб застосування допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). Більшість авторів вважає, що відсутність вагітності після 3 спроб ЗІВ, за умови перенесення якісних ембріонів в порожнину матки, вимагає пошуку причин невдач імплантації, детального обстеження пацієнток та індивідуалізованої підготовки подружніх пар з урахуванням генезу невдалих спроб ЗІВ (В. Г. Мікаелян, 2005; М. Г. Грищенко, 2011; Н. Achache і співавт., 2006; І.А. Greer, 2007; S.M. Nelson, 2009). Виділяють два основних чинники невдач лікування методами ДРТ: ембріональний та імплантаційний. І саме імплантаційному чиннику останнім часом приділяється найбільше уваги. Серед факторів, що можуть завадити успішній імплантації, найбільш вірогідними є дефекти ендометрія та імунологічні зміни на загальному та місцевому рівнях. Припущення, що одна з комплексу причин невдалих спроб ЗІВ реалізується саме на етапах імплантації, багато в чому є емпіричним, а етіологія невдалих спроб ЗІВ залишається складною для верифікації з огляду на різнорідність когорт пацієнток, що вступають у програми ДРТ.

В останні роки проведена низка досліджень, які вивчали вплив ризику розвитку тромбофілії, системи HLA, антифосфоліпідного синдрому з позиції підвищення результативності методів ЗІВ (Э. В. Вартанян, 2011; Т. А. Охтырская, 2011). Однак, незважаючи на досягнення репродуктології останніх років, багато питань невдалих спроб ДРТ залишаються невирішеними.

Вказане визначає необхідність комплексного підходу до вивчення причин неуспішності програм ЗІВ, проведення аналізу імунологічних механізмів, які лежать в основі невдач методу, розробки діагностично-лікувальних алгоритмів ведення пацієнток з повторними негативними спробами ЗІВ на основі індивідуальних програм, що і зумовило мету нашої роботи.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана відповідно плану науково-дослідних робіт Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького і є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри акушерства, гінекології та перинатології ФПДО

Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Вивчення стану репродуктивного здоров'я жінок Львівсько-Волинського регіону і корекція виявлених порушень» (№ державної реєстрації: 011U 000125). Виконана робота відповідає основним положенням Державної Програми «Репродуктивне здоров'я нації на період до 2015 року», затвердженої постановою Кабінету Міністрів України № 1849 від 27 грудня 2006 р.

**Мета дослідження** - підвищити ефективність програм допоміжних репродуктивних технологій шляхом розробки і впровадження в практику діагностично-лікувальних алгоритмів ведення пацієнок з повторними негативними спробами запліднення *in vitro* на основі комплексного вивчення їх генезу.

**Задачі дослідження:**

1. Проаналізувати структуру безпліддя, поширеність ембріонального та імплантаційного чинників повторних негативних спроб запліднення *in vitro* (ЗІВ).

2. Дослідити характер імунологічних змін у пацієнок із повторними негативними спробами ЗІВ, визначити можливі імунологічні маркери повторних негативних спроб ЗІВ.

3. Вивчити особливості гормонального гомеостазу пацієнок з повторними негативними спробами ЗІВ.

4. Дослідити можливість застосування імунобіологічних препаратів у підготовці жінок до повторних спроб ЗІВ.

5. Розробити та оцінити клініко-лабораторну ефективність диференційованого діагностично-лікувального алгоритму ведення пацієнок з повторними негативними спробами ЗІВ.

*Об'єкт дослідження:* повторні негативні спроби ЗІВ.

*Предмет дослідження:* клінічна характеристика, чинники повторних негативних спроб ЗІВ, стан системного та гуморального імунітету, цитокінового профілю, гормональний баланс пацієнок із повторними негативними спробами ЗІВ і ПЕ.

*Методи дослідження:* клінічні, біохімічні, цитофлуориметричні, імунохемілюмінесцентні, імуноферментні, ехографічні, морфологічні, статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Розширено існуючі дані про фактори і частоту ембріонального і імплантаційного чинників повторних негативних спроб ЗІВ. Встановлено значимість дисбалансу цитокінів та субпопуляцій лімфоцитів, зокрема збільшення рівня і активності НК- і НКТ-клітин в генезі невдач спроб ЗІВ. Визначено маркери повторних негативних спроб ЗІВ. Доведено, що підвищення рівня ФНП- $\alpha$ , ІЛ-2 і зниження рівнів ІЛ-6, ІЛ-4 і ІЛ-10 у периферичній крові є прогностичними маркерами повторних невдач ЗІВ і ПЕ. Одержано нові дані щодо прогностичної цінності успішності програм ЗІВ комплексного дослідження маркерів автоімунних процесів, рівнів і активності НК- і НКТ-клітин в периферичній крові. Доповнено існуючі дані щодо особливостей гормонального балансу у жінок з повторними негативними спробами ЗІВ. Визначено показання до застосування імунокорекції у веденні жінок з повторними негативними спробами ЗІВ та доведено ефективність запропонованої імунокоригуючої терапії. Розроблено і доведено ефективність діагностично-лікувального алгоритму ведення пацієнок з повторними негативними спробами ЗІВ і ПЕ.

**Практичне значення одержаних результатів.** Запропоновано новий спосіб прогнозування наслідків ЗІВ та ПЕ у жінок з повторними негативними спробами ЗІВ на основі комплексного визначення маркерів автоімунних процесів, рівнів та активності НК-клітин і НКТ-клітин в периферійній крові пацієнок (Патент №72171, Спосіб прогнозування наслідків запліднення *in vitro* та переносу ембріонів). Запропоновано комплекс прегравідарної підготовки жінок з негативними спробами ЗІВ в анамнезі (Патент №72172, Спосіб підвищення ефективності запліднення *in vitro* та переносу ембріонів), доведено його ефективність.

Результати дослідження та діагностично-лікувальні алгоритми впроваджені у роботу клініки репродуктивної медицини “Надія” (м. Київ), клініці генетики репродукції “Вікторія” (м. Київ). Теоретичні положення дисертаційної роботи використовуються у навчальному процесі кафедри акушерства, гінекології та перинатології факультету післядипломної освіти Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом особисто проведено аналіз даних літератури за темою дисертаційної роботи. Разом з науковим керівником здійснено планування роботи, визначені мета і завдання дослідження, методологія проведення дослідження. Дисертантом самостійно проведені клінічні, інструментальні обстеження пацієнок, контрольована стимуляція овуляції, ультразвуковий та гормональний моніторинг циклів, процедури аспірації ооцитів та переносу ембріонів. Автором самостійно проведена статистична обробка матеріалів, інтерпретація клініко-лабораторних даних, узагальнені та проаналізовані одержані результати, на основі яких сформульовані висновки і практичні рекомендації. У роботах, виконаних у співавторстві, дисертанту належить проведення клініко-лабораторного обстеження жінок, опрацювання та аналіз результатів, підготовка статей до друку.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи представлені та обговорені на науково-практичній конференції «Інтеграційні ініціативи в акушерстві та гінекології» (Львів, 2005), міжнародному симпозіумі «Нові напрямки допоміжних репродуктивних технологій в лікуванні безпліддя» (Київ, 2009), науково-практичній конференції «Сучасні технології в охороні репродуктивного здоров'я населення України» (Львів, 2010), міжнародному з'їзді за участі ESHRE та УАРМ «ESHRE CAMPUS 2010» (Київ, 2010), XIII Конгресі Світової Федерації Українських Лікарських Товариств (Львів, 2010), науково-практичній конференції «Медична генетика - сьогодні та майбутнє» (Львів, 2010), 5-ому конгресі Світової асоціації репродуктивної медицини (WARM) (Москва, 2010), 1-ій загальноуніверситетській науково-практичній конференції молодих вчених "Контроверсійні питання сучасної клінічної медицини" (Львів, 2011), 20-ому ювілейному з'їзді УАРМ (Харків, 2011), науково-практичній конференції «Актуальні питання акушерства та гінекології» (Львів, 2010), з'їзді УАРМ з міжнародною участю (Київ, 2012).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових праць, з них 4 статті опубліковано у фахових виданнях, 1 – у закордонному виданні та 4 роботи надруковано у збірниках наукових праць. Отримано 2 деклараційних патенти України.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертація викладена на 133 сторінках і складається з вступу, розділу матеріали та методи дослідження, 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаної літератури, що містить 254 джерела (36 кирилицею, 218 - латиницею) і займає 29 сторінок. Робота ілюстрована 25 таблицями та 10 рисунками.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**Матеріали і методи дослідження.** Для досягнення мети і вирішення завдань дослідження проводилось у декілька етапів. Під спостереженням перебувало 100 жінок репродуктивного віку, які проходили лікування з приводу безпліддя у шлюбі методом ЗІВ і ПЕ.

У дослідження не включались пацієнтки у віці більше 39 років, за наявності аномалій розвитку матки; міоматозних вузлів, які деформують порожнину матки; антифосфоліпідного синдрому; спадкових та набутих тромбофілій. Критерієм виключення з дослідження були зміни з боку каріотипу у подружжя, чоловічий фактор безпліддя. Пацієнтки були рандомізовані на групи після проведення циклу ЗІВ і ПЕ залежно настання або не настання вагітності та наявності в анамнезі двох і більше невдалих спроб ЗІВ.

На першому етапі дослідження проведена верифікація чинників негативних спроб ЗІВ і ПЕ, за якими жінки були розподілені на дві групи. Основну групу склали 80 жінок з двома і більше негативними спробами ЗІВ і ПЕ в анамнезі (програми ДРТ у 2009-2011 р.р.). У групу порівняння увійшли 20 жінок з першою вдалою спробою ЗІВ і ПЕ.

На основі визначення ембріонального та імплантаційного чинників повторних невдалих спроб ЗІВ пацієнток основної групи було розділено на дві підгрупи. У І-ЕФ підгрупу увійшли 19 (23,8 %) жінок із ембріональним фактором, підгрупу І-ІФ склали 61 (76,2%) пацієнтка із імплантаційним фактором повторних негативних спроб ЗІВ.

На другому етапі роботи на основі отриманих даних обґрунтовано і розроблено діагностично-лікувальний алгоритм ведення пацієнток із повторними негативними пробами ЗІВ.

На третьому етапі роботи проводили оцінку ефективності запропонованого діагностично-лікувального алгоритму. 42 пацієнтки з імунологічними маркерами негативних спроб ЗІВ отримували під час циклу стимуляції овуляції імунокоригуючу терапію імуноглобуліном людським (БІОВЕН МОНО® ПрАТ «БІОФАРМА») внутрішньовенно краплинно у дозі 150 мг/кг/добу трикратно (через добу) (підгрупа ІА). Пацієнтки ІВ підгрупи (19 жінок) отримували підготовку до програми ЗІВ згідно існуючих клінічних протоколів.

Контрольна група включала 15 жінок зі збереженою менструальною і репродуктивною функцією, які були добровільними донорами ооцитів у програмі ДРТ, обстеження яких здійснювалось відповідно до наказу МОЗ України №771 від 23.12.2008 р. Дослідження проводилось згідно принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та відповідних законів України, протокол засідання комісії з питань біоетіки ЛНМУ

імені Данила Галицького №2 від 21.02.2011 р. Обстеження пацієнток включало клінічні, інструментальні, біохімічні, імунологічні та інші методи.

Перед включенням у програму дослідження безплідні подружні пари і донори ооцитів обстежувались у обсязі, регламентованому клінічним протоколом МОЗ України (Наказ №582 від 15.12.2003 «Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги») та згідно розробленої методології дослідження.

Всім пацієнткам проводили трансабдомінальну та трансвагінальну ехографію органів малого таза (конвексні датчики 305 МГц та 5-9 МГц з використанням УЗ системи Sono ACE 9900) в динаміці МЦ, які передували стимуляції суперовуляції, в період стимуляції і після переносу ембріонів в порожнину матки. На 8-10-ий дні МЦ до проведення програми ЗІВ оцінювали оваріальний резерв шляхом підрахунку кількості антральних фолікулів та обчисленням об'єму яєчників. Оцінку стану ендометрію проводили шляхом визначення його товщини та структури при УЗ-дослідженні в динаміці МЦ, проведення гістероскопії, фракційного вишкрібання стінок порожнини матки за показаннями й аспіраційної пайпель-біопсії на 6-7 добу після овуляції з наступним гістологічним дослідженням матеріалу.

Оцінку імунного статусу проводили шляхом дослідження субпопуляцій лімфоцитів, НК-клітин методом проточної цитометрії з використанням відповідних моноклональних антитіл (Beckman Coulter, США) на апаратах CyAn™ ADP та Coulter FC500-MCL (Beckman Coulter, США). Визначали кількість та активність НК-клітин і НКТ-клітин з фенотипами  $CD3-16^{+}56^{+}$ ,  $CD3^{+}16^{+}56^{+}$ . Рівні НК  $CD3-16^{+}56^{+}$ , що перевищували 15%, та НКТ  $CD3^{+}16^{+}56^{+}$  - вище 7%, та активність їх вище 38% розцінювали як патологічні значення. Розраховували імунорегуляторний індекс (ІРІ), як відношення вмісту (%)  $CD4^{+}$  клітин (Т-хелпери) до  $CD8^{+}$  (Т-супресори-цитотоксичні).

Рівень про- та протизапальних інтерлейкінів (ІЛ) ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10, ФНП- $\alpha$ , ІФН- $\gamma$  визначали хемілюмінесцентним методом на апараті Evidence фірми RANDOX (Великобританія) з використанням відповідних тест-систем.

Забір венозної крові для дослідження здійснювали на 18-24-ий день МЦ при умові відсутності запальних захворювань та прийому антибактеріальних засобів.

Оцінку рівнів тропних гормонів гіпофізу – лютеїнізуючого (ЛГ), фолікулостимулюючого (ФСГ), тиреотропного (ТТГ), пролактину (Прл), стероїдних гормонів яєчника – естрадіолу ( $E_2$ ), прогестерону (П), тестостерону (Т), гормонів щитоподібної залози – вільного трийодтироніну (Т3), вільного тетраїодтироніну (Т4), антитіл до тиропероксидази (АТПО) у периферичній крові на 5-7 і 21-22 дні МЦ проводили імуноферментним методом з використанням відповідних тест-систем (ELISA KIT, DRG, USA) на стріповому імуноферментному аналізаторі „Stat Fax 303 Plus” (США).

Концентрацію антимюллерового гормону (АМГ) у периферичній крові визначали імуноферментним методом на автоматичному аналізаторі Euroimmun Analyzer 1 AG з використанням тест-систем Beckman Coulter (США). Напівкількісне визначення імуноглобулінів класу G (Ig G) до кардіоліпінів в сироватці крові проводили методом хемілюмінесцентного імуноаналізу (CLIA) на аналізаторі Liaison Diasorin (Італія) з автоматичним розрахунком концентрації антитіл. Визначення

рівня антитіл до тиреопероксидази проводили на аналізаторі Cobas 6000 (Roche Diagnostics, Швейцарія). Результат оцінювали як позитивний при рівні 35 МО/мл та більше.

Для індукції суперовуляції використовували стандартні протоколи з агоністами гонадотропін рилізінг гормону (а-ГнРГ) (диферелін, 0,1 мг) (довгий лютеїновий протокол) та протокол з антагоністом гонадотропін рилізінг гормону (ант-ГнРГ) (цетротид, 0,25 мг). Для верифікації ембріонального фактору проводили огляд ооцитів, ембріонів на інвертованому мікроскопі фірми «Olimpus», моделі IX51, IX71 при 200-кратному збільшенні. Через 18-20 годин після запліднення проводилась оцінка пронуклеусів, нормою вважали наявність 65% і більше ембріонів з двома пронуклеусами серед запліднених ооцитів. Сповільнений темп розвитку ембріонів: відсутність бластоцист на п'яту добу культивування ембріонів в умовах *in vitro*, низький відсоток бластоутворення ( $\leq 20\%$ ), відсутність бластоцист I-II ступеня якості визначали ембріональний чинник негативного результату ЗІВ. Перенос ембріонів з найбільш високою оцінкою якості проводили під УЗ-контролем на 5 день культивування.

Частоту імплантації у дослідних групах розраховували як співвідношення позитивних значень  $\beta$ -ХГЛ сироватки крові (більше 15 МО/л) визначених через 2 тижні після ембріопереносу до загального числа виконаних ПЕ (%). Клінічну вагітність діагностували за допомогою УЗД з встановленням локалізації ембріону через 5 тижнів після ПЕ. Частоту клінічних вагітностей розраховували як кількість підтверджених при УЗД вагітностей до загального числа виконаних ПЕ (%).

Математичну обробку отриманих результатів проводили методами описової, параметричної та непараметричної статистики з використанням стандартних програм статистичного аналізу Microsoft Excel 5.0 та Statistica 6.0.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Вік обстежених пацієнток коливався від 24 до 39 років і в середньому складав  $31,1 \pm 4,5$  р. (в основній групі  $33,9 \pm 4,3$  р., у групі порівняння –  $30,4 \pm 6,6$  р. і  $29,0 \pm 2,5$  р. у контрольній групі ( $p > 0,05$ )). Частота первинного та вторинного безпліддя у групах вірогідно не різнилась ( $p > 0,05$ ) і складала 52,5 % та 47,5 % у основній та 55 % та 45,0 % у групі порівняння відповідно. Тривалість безпліддя у шлюбі у обстежених жінок коливалась від 2 до 15 років, при цьому тривалість безпліддя понад 5 років пояснюється невідповідністю застосовного обстеження і лікування існуючим рекомендаціям та клінічним протоколам. У пацієнток, включених у дослідження, в анамнезі від 3 до 6 негативних спроб ЗІВ (в середньому  $4,32 \pm 0,98$  спроби).

У соматичному статусі жінок з найбільшою частотою зустрічалась патологія ЩЗ (дифузний еутиреоїдний зоб I – II ступеня), що є характерним для йододефіцитних територій, до яких належить Львівська область. Автоімунний тиреоїдит зі збереженою функцією ЩЗ був найбільш поширений серед жінок основної групи (33,8 %) і вдвічі рідше виявлявся у жінок групи порівняння (15,0 %) при відсутності у контрольній групі ( $p < 0,05$ ). Субклінічний гіпотиреоз на тлі автоімунного тиреоїдиту діагностовано у 17,5 % пацієнток основної групи та у 5,0 % групи порівняння.

У значної частини жінок основної групи при регулярному МЦ (78,8 %) частіше, ніж у пацієнток групи порівняння ( $p < 0,05$ ), мала місце гіперполіменорея,



що може бути наслідком перенесених запальних захворювань органів малого тазу (ЗЗОМТ). Регулярний МЦ був збережений у 70,0 % пацієток групи порівняння, оліго/опсоменорея зустрічалась в обох групах з однаковою частотою, альгодисменорея у два рази частіше ( $p < 0,05$ ) спостерігалась у основній групі.

Для пацієток основної групи характерною була значна частота ЗЗОМТ: сальпінгоофорит — у 56,3 %, гідросальпінкс — у 35,0 %, пельвіоперитоніт — у 5,0 %. Звертала на себе увагу у пацієток основної групи частота оперативних втручань на репродуктивних органах — реконструктивно-пластичні операції на маткових трубах (22,5 %), тубектомія (38,8 %), з них однобічна — 10,0 %, двобічна — 28,8 %, резекція яєчників (6,3 %). У жінок основної групи і групи порівняння спостерігалась значна частота несприятливих наслідків вагітності (самовільні викидні, замерла вагітність, передчасні пологи), позаматкова вагітність.

Дані анамнезу дозволяють стверджувати, що у жінок основної групи та групи порівняння мали місце трубно-перитонеальний, ендокринний фактори безпліддя, зі значною частотою виявлялась поєднана дія чинників, і в поодиноких випадках чинники безпліддя не були верифіковані.

Рівень АМГ у сироватці периферичної крові є одним з прогностичних показників відповіді яєчників на контрольовану стимуляцію овуляції в програмах ЗІВ. Рівні АМГ, які не перевищують 1,5 нг/мл, можуть розглядатися як критерії можливої, однак не обов'язкової слабкої відповіді яєчників на стимуляцію. У 36,25 % жінок основної групи рівень АМГ не перевищував 2 нг/мл, у 12,5 % — коливався від 0,1 до 0,9 нг/мл (в середньому  $0,47 \pm 0,27$  нг/мл).

За середніми показниками об'єму яєчників та кількістю антральних фолікулів досліджувані групи достовірно не різнилися між собою. Візуалізація антральних фолікулів склала у всіх групах 100 %. При вивченні параметрів контрольованої стимуляції овуляції у обстежених пацієток не виявлено статистично значущих відмінностей між групами щодо перебігу стимуляції овуляції, параметрів фолікулогенезу, однак виявлені значні відмінності оогенезу і раннього ембріогенезу (табл.1).

Таблиця 1

## Верифікація гамето-ембріонального чинника невдалих спроб ЗІВ

Показники гамето-ембріонального фактора	Групи пацієток	
	Основна (n = 80)	Порівняння (n = 20)
Кількість преовуляторних фолікулів	14,0±0,7	11,1±0,6
Кількість отриманих ооцитів на пацієтку	12,7±0,5	9,9±0,7
Кількість зигот на пацієтку (2 рп)	11,0±0,5	10,1±0,3
Сповільнений темп дроблення ембріонів (n)	4 (5,0 %)	-
Низький відсоток бластоутворення ( $\leq 20$ %) (n)	15 (18,8%)	-
Середній відсоток бластоутворення ( $< 50$ %) (n)	43 (53,8%) $p < 0,001$	8 (40,0%)
Високий відсоток бластоутворення ( $\geq 50$ %) (n)	18 (22,5%) $p < 0,001$	12 (60,0%)
Кількість бластоцист I-II ступеня якості	28,7±1,3 $p < 0,001$	39,1±2,2

Сповільнений темп розвитку ембріонів: відсутність бластоцист на п'яту добу культивування ембріонів в умовах *in vitro*, низький відсоток бластоутворення ( $\leq 20\%$ ), відсутність бластоцист I-II ступеня якості свідчили про наявність ембріонального чинника негативного результату ЗІВ (табл.1).

Частота поширення гамето-ембріонального фактора при повторних негативних спробах ЗІВ склала 23,8%, а імплантаційного чинника – 76,2 %.

Серед факторів, що можуть завадити успішній імплантації, найбільш вірогідними є дефекти ендометрія та імунологічні зміни на загальному та місцевому рівнях. У переважній більшості жінок основної групи при гістероскопії та гістологічному дослідженні ендометрія виявлені проліферативні, запальні зміни ендометрія або невідповідність його фазі МЦ. За даними УЗД, гістероскопії та патоморфологічного дослідження ендометрія хронічний ендометрит (ХЕ) виявлено у 21,3 %, доброякісні проліферативні зміни – у 18,8 %, поліпи ендометрію – у 8,8 % пацієток основної групи. У I-ЕФ підгрупі частота ХЕ склала 5,3% при 26,2 % у I-ІФ підгрупі.

У жінок групи порівняння структурно-функціональні зміни ендометрія були переважно наслідком гормональних порушень і ановуляції. ХЕ зумовлює порушення репродуктивної функції та є причиною безпліддя, невдалих спроб ЗІВ, при цьому його поширеність є найвищою серед пацієток із трубно-перитонеальним безпліддям і невдалими спробами ЗІВ, що узгоджується з даними інших авторів. Хронічний перебіг запалення з персистенцією інфекції є джерелом постійного антигенного подразнення, підтримує запалення, поглиблює імунологічні зміни, і як наслідок, порушує гомеостаз і формує каскад вторинних ушкоджень, що зумовило наступний напрямок досліджень - вивчення особливостей гормонального гомеостазу, імунологічного статусу пацієток із повторними негативними спробами ЗІВ.

Аналіз рівнів Прл, ЛГ і ФСГ показав, що для пацієток всіх груп характерною була нормогонадотропна регуляція функції яєчників. Секреція Прл у основній групі ( $13,57 \pm 1,44$  нг/мл) не перевищувала показники контролю ( $13,25 \pm 1,15$  нг/мл). Незначне посилення Прл-синтезуючої функції гіпофіза у жінок групи порівняння ( $14,22 \pm 2,21$  нг/мл,  $p > 0,05$ ) розглядали як вторинне на ґрунті дисфункції яєчників і наслідком прийому комбінованих оральних контрацептивів, що призначались пацієткам даної групи на попередніх етапах лікування.

Рівень ФСГ є одним із маркерів оваріального резерву і прогностичним критерієм відповіді яєчників на контрольовану стимуляцію овуляції. У жінок основної групи базальний рівень ФСГ у сироватці крові на 5-7-й день МЦ складав в середньому  $11,76 \pm 1,86$  МО/л, що вірогідно перевищувало показники контрольної групи ( $6,18 \pm 0,26$  МО/л,  $p < 0,02$ ) і групи порівняння ( $7,24 \pm 0,98$  МО/л,  $p < 0,05$ ). Рівень ФСГ вище 10 МО/л є прогностично несприятливим щодо відповіді яєчників на стимуляцію у 26,3 % пацієток основної групи.

Рівень ЛГ у жінок групи порівняння в середньому складав  $14,80 \pm 1,67$  МО/л ( $p < 0,001$  по відношенню до контролю), а співвідношення ЛГ/ФСГ у 45,0 % перевищувало референтні показники і склало  $2,04 \pm 0,57$ . Рівень ФСГ починає підвищуватися при зменшенні запасу фолікулів в яєчниках або порушенні зв'язку гіпофіз-яєчники. У пацієток основної групи базальний рівень ЛГ складав  $7,97 \pm 0,53$

МО/л, що вірогідно різнилось від показників контролю ( $p < 0,05$ ) і групи порівняння ( $p < 0,001$ ). Підвищений рівень ЛГ призводить до надмірної стимуляції строми яєчника і теки, результатом чого є не тільки підвищення продукції андрогенів, але й порушення селекції і повноцінності доміантного фолікула. При зниженні оваріального резерву спостерігався підвищений рівень ФСГ і зниження ЛГ/ФСГ (23,8 % жінок основної групи) і могло бути чинником негативних спроб ЗІВ у пацієток із ЛГ/ФСГ від 0,43 до 0,80, оскільки від співвідношення ЛГ і ФСГ залежить адекватність стероїдогенезу в яєчниках. У жінок контрольної групи базальний рівень  $E_2$  відповідав нормоестрогенії ( $275,5 \pm 12,1$  пмоль/л). У 25,0 % жінок основної групи рівень  $E_2$  був підвищеним порівняно з контролем, у 48,8 % - навпаки мала місце гіпоестрогенія. Для пацієток групи порівняння характерною була наявність як гіпоестрогенних (25,0 %), так гіперестрогенних станів (35,0 %) при збереженні нормоестрогенії у 40,0 % жінок (табл. 3).

Таблиця 3

Показники гормонального гомеостазу пацієток ( $M \pm m$ )

Гормони	Групи жінок			
	Основна (n=80)		Порівняння (n=20)	Контроль (n=15)
	I-ЕФ підгрупа (n=19)	I-ІФ підгрупа (n=61)		
Прл, нг/мл	$14,43 \pm 0,77$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$12,78 \pm 0,68$ $p_1 > 0,05$	$14,22 \pm 2,21$ $p_1 > 0,05$	$13,25 \pm 1,15$
ФСГ, МО/л	$12,42 \pm 0,59$ $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	$11,94 \pm 0,32$ $p_1 < 0,001$	$7,24 \pm 0,98$ $p_1 < 0,01$	$6,18 \pm 0,26$
ЛГ, МО/л	$7,43 \pm 0,16$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$7,88 \pm 0,62$ $p_1 > 0,05$	$14,80 \pm 1,67$ $p_1 < 0,001$	$6,65 \pm 0,26$
ЛГ/ФСГ	$0,59 \pm 0,07$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$0,66 \pm 0,09$ $p_1 > 0,05$	$2,04 \pm 0,67$ $p_1 > 0,05$	$1,08 \pm 0,10$
$E_2$ пмоль/л	$198,6 \pm 19,6$ $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	$250,2 \pm 80,4$ $p_1 > 0,05$	$227,9 \pm 42,1$ $p_1 > 0,05$	$275,5 \pm 12,1$
П, нмоль/л	$18,90 \pm 0,21$ $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,02$	$19,95 \pm 0,37$ $p_1 < 0,001$	$15,80 \pm 0,39$ $p_1 < 0,001$	$28,50 \pm 0,23$

Примітка.  $p_1$  – достовірність відмінностей порівняно з контрольною групою;  $p_2$  – порівняно з підгрупою I-ЕФ;  $p_3$  – порівняно з групою порівняння.

Дифузний еутиреоїдний зоб I-II ступеня мав місце у 37,4 % всіх пацієток. Автоімунний тиреоїдит з еутиреоїдним станом діагностовано у 33,8 % жінок основної групи і вдвічі рідше – у групі порівняння (15,0 %) при відсутності у контролі ( $p < 0,05$ ). Субклінічний гіпотиреоз на тлі автоімунного тиреоїдиту діагностовано у 17,5 % пацієток основної групи та 5,0 % – групи порівняння, при цьому рівень ТТГ складав  $6,7 \pm 0,9$  мМО/л ( $p < 0,001$  порівняно з контролем), однак рівні  $T_{3в}$  і  $T_{4в}$  не виходили за межі референтних значень.

Виявлені зміни рівнів гонадотропних і стероїдних гормонів свідчать про розбалансування як центральної, так і периферичної ланок ендокринної регуляції у пацієток з повторними негативними спробами ЗІВ і вимагають проведення відповідної корекції.

Імунологічний генез виділяється зазвичай як окремий патофізіологічний механізм невдач ЗІВ. У пацієток основної групи виявлено дисбаланс відносного вмісту субпопуляцій лімфоцитів, відносні рівні регуляторних  $CD3^+ CD4^+$ ,  $CD8^+$  периферичної крові вірогідно різнилися від показників жінок групи порівняння та контрольної групи ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,025$ ). Імунорегуляторний індекс був нижче у жінок основної групи ( $1,22 \pm 0,03$ ) порівняно з групою порівняння ( $1,70 \pm 0,06$ ) і контролем ( $1,77 \pm 0,05$ ) ( $p < 0,001$ ). Зменшення співвідношення  $CD4^+/CD8^+$  відбувалось як за рахунок зниження популяції  $CD4^+$ , так і збільшення популяції  $CD8^+$ . Середні рівні  $CD3-16^+56^+$  НК-клітин у жінок основної групи ( $15,45 \pm 0,67$  %) були підвищеними відносно групи порівняння ( $10,04 \pm 0,67$  %) ( $p < 0,001$ ) і контролю ( $9,96 \pm 0,83$  %) ( $p < 0,001$ ). Рівень  $CD3^+16^+56^+$  НКТ-клітин периферичної крові в контролі складав  $4,85 \pm 0,29$  %, у пацієток основної групи він був у 1,8 разів вищим ( $8,81 \pm 0,43$  %) ( $p < 0,001$ ) і незначно підвищеним у жінок групи порівняння ( $5,84 \pm 0,36$  %) ( $p > 0,05$ ). Відсоток активованих НК-клітин ( $47,92 \pm 1,57$  %) у пацієток основної групи перевищував рівні груп порівняння і контролю ( $p < 0,001$ ). Кількість жінок з підвищенням кількості і/або активності НК, НКТ-клітин серед І-ЕФ та І-ІФ підгруп склала 5,3% та 81,97 % відповідно, що підтверджує вагому роль активації природних кілерів в порушенні імплантації.

У пацієток з негативними спробами ЗІВ виявлено дисбаланс регуляторних про- та протизапальних цитокінів. Рівень ІЛ-10 був зниженим у жінок з повторними негативними спробами ЗІВ, незалежно від верифікованого чинника:  $1,48 \pm 0,2$  пг/мл у І-ЕФ підгрупі ( $p < 0,01$  порівняно з групою порівняння) і  $1,27 \pm 0,41$  пг/мл у підгрупі І-ІФ ( $p < 0,02$  порівняно з групою порівняння), при цьому рівень ІЛ-10 у пацієток з першою вдалою спробою ЗІВ і ПЕ складав  $2,98 \pm 0,23$  пг/мл. Важливим є те, що у жінок підгрупи І-ЕФ мало місце підвищення рівня ФНП- $\alpha$  ( $5,08 \pm 0,66$  пг/мл,  $p < 0,01$  порівняно з групою порівняння і підгрупою І-ІФ), значно знижені рівні ІЛ-6 ( $1,67 \pm 0,23$  пг/мл) периферичної крові порівняно як з показниками жінок з імплантаційним чинником невдач ЗІВ ( $p < 0,05$ ), так і з пацієтками з успішною першою спробою ЗІВ і ПЕ ( $p < 0,001$ ). У той же час сироваткові рівні ІФН- $\gamma$  не відрізнялись між собою у пацієток всіх груп ( $p > 0,05$ ).

Рівень ІЛ-2, який виявляє активуючий вплив на НК і НКТ-клітин, позитивно корелював з підвищеною активністю НК, НКТ-клітин в обох підгрупах жінок з повторними негативними спробами ЗІВ і був вищим за показники жінок з першою вдалою спробою ЗІВ ( $p < 0,02$ ). Рівень ІЛ-4, якому притаманна протизапальна імуносупресорна активність і який, аналогічно ІЛ-10, має забезпечувати імплантацію ембріона, був зниженим у обох підгрупах основної групи ( $2,59 \pm 0,40$  пг/мл і  $3,50 \pm 0,86$  пг/мл при  $5,03 \pm 0,78$  пг/мл у жінок з позитивними наслідками ЗІВ), що є прогностично несприятливим для успішності програм ЗІВ. Таким чином, для жінок з множинними невдачами програм ЗІВ і ПЕ характерним є підвищення сироваткового рівня ФНП- $\alpha$ , ІЛ-2 і зниження рівня ІЛ-6 і ІЛ-4, в той час як у жінок з

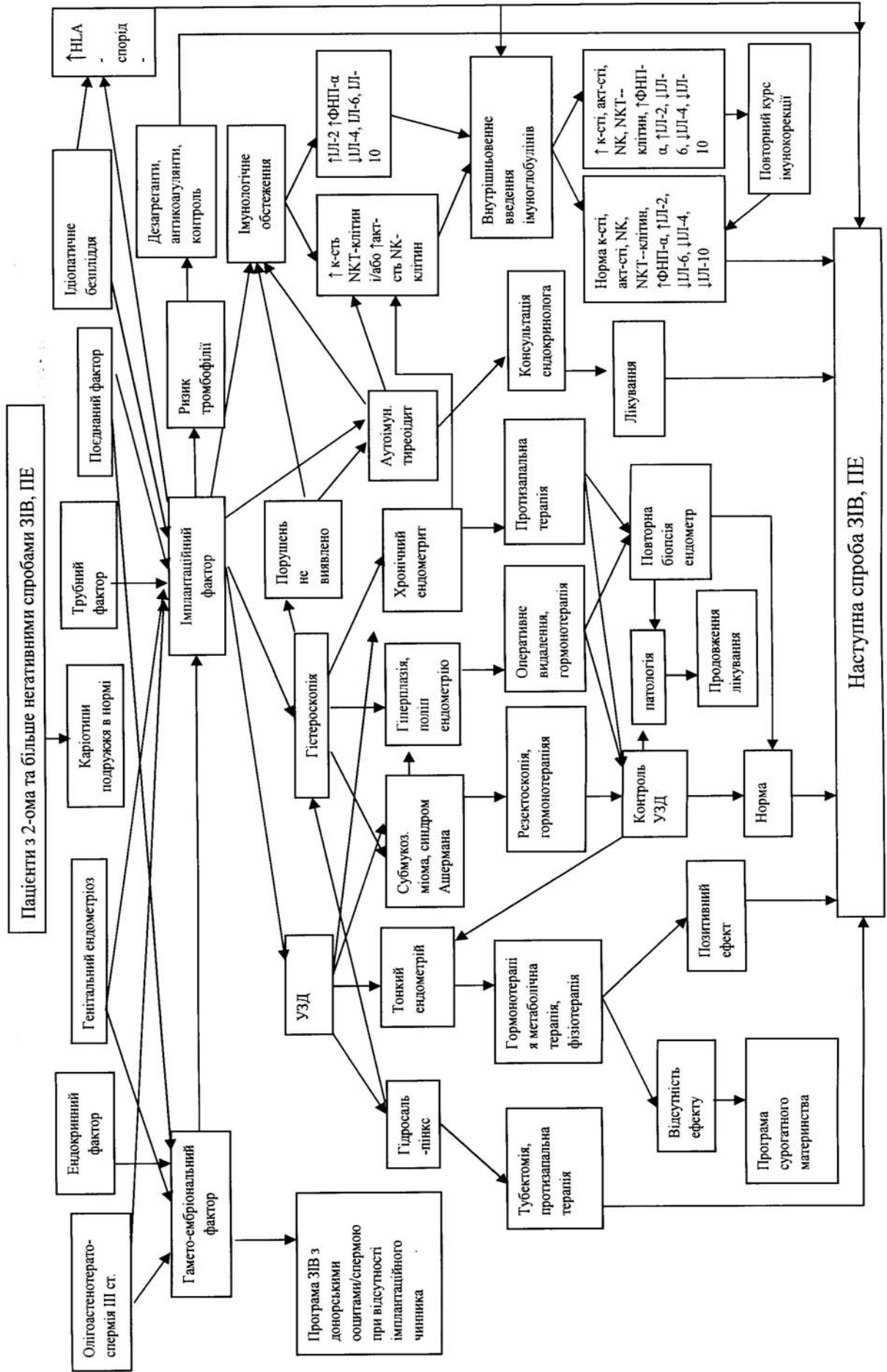


Рис. 1. Алгоритм ведення пацієнток з повторними негативними спробами ЗІВ, ПЕ.

успішною першою спробою ЗІВ і ПЕ визначається підвищений рівень ІЛ-10 у сироватці крові, що є прогностично сприятливою ознакою успішності програм ЗІВ.

Враховуючи вище зазначене, нами був запропонований діагностично-лікувальний алгоритм ведення пацієток з повторними негативними спробами ЗІВ, який ґрунтується на застосуванні розширеного спектру обстежень, підготовчого етапу до наступної спроби ЗІВ і ПЕ, що полягає в усуненні патології ендометрію, запальних процесів геніталій, нормалізації функції ЩЗ та проведенні імунокорекції у пацієток з імунологічними маркерами повторних невдач програм ЗІВ (збільшення вмісту і підвищення активності НК, НКТ-клітин, підвищення рівня ФНП- $\alpha$ , ІЛ-2 і зниження рівнів ІЛ-6, ІЛ-4 і ІЛ-10 у периферичній крові) в процесі проведення стимуляції овуляції (рис.1).

На основі запропонованого алгоритму, 42 пацієткам (підгрупа ІА) підгрупи І-ІФ основної групи з імунологічними маркерами негативних спроб ЗІВ була запропонована імунокоригуюча терапія. Під час циклу стимуляції овуляції проводилось введення внутрішньовенно краплинно людського імуноглобуліну (БІОВЕН МОНО® ПрАТ «БІОФАРМА») у дозі 150 мг/кг/добу трикратно (через добу). Пацієтки ІВ підгрупи (19 жінок) отримували підготовку до програми ЗІВ згідно існуючих клінічних протоколів.

У підгрупі ІА на 42 ембріотрансферах було отримано 30 (71,4%) клінічних вагітностей, які у 25 (83,3 %) випадках завершилися народженням доношених дітей з оцінкою за шкалою Апгар 7-9 балів з масою  $3250,0 \pm 250,0$  г. Передчасні пологи у підгрупі ІА мали місце у 3 (10,0 %) випадках, 2 (6,7 %) – вагітності завершилися самовільним викиднем у першому триместрі гестації. У пацієток, які не отримували імунокоригуючу терапію (підгрупа ІВ) було отримано 3 (15,8 %) вагітності, з яких 2 (66,7 %) завершилися раннім самовільним викиднем, а 1 (33,3 %) – пологами у 37 тижнів гестації.

Проведення імунокоригуючої терапії на етапі стимуляції овуляції у жінок з імплантаційним чинником і імунологічними маркерами повторних негативних спроб ЗІВ і ПЕ дає змогу підвищити результативність програм ЗІВ у 4,5 рази і зменшити втрати на етапі гестації у 9,96 разів.

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне обґрунтування і нове вирішення актуального завдання сучасної гінекології та репродуктивної медицині, а саме підвищення ефективності програм допоміжних репродуктивних технологій шляхом розробки і впровадження в практику діагностично-лікувального алгоритму ведення пацієток з повторними негативними спробами ЗІВ на основі комплексного вивчення їх генезу.

1. Встановлено, що серед жінок з повторними негативними спробами ЗІВ частота ембріонального фактора складає 23,8 %, а імплантаційного – 76,2%, при цьому при ембріональному чиннику переважає ендокринний (31,6 %) і поєднаний (52,6 %) чинник безпліддя, а при імплантаційному - трубно-перитонеальний фактор (56,3 %).

2. Встановлено, що у жінок з повторними негативними спробами ЗІВ, рівень  $CD3^+16^+56^+$ НКТ-клітин периферичної крові є у 1,8 разів вищим ( $8,81 \pm 0,43$  %), ніж у здорових жінок з необтяженим репродуктивним анамнезом ( $4,85 \pm 0,29$  %)

( $p < 0,001$ ), а кількість  $CD3-16^+56^+$  NK-клітин ( $15,45 \pm 0,67$  %) перевищувала показники жінок, які завагітніли після першої спроби ЗІВ ( $10,04 \pm 0,67$  %) ( $p < 0,001$ ).

3. У групі жінок з повторними негативними спробами ЗІВ частіше виявляється підвищена активність NK, NKT-клітин ( $47,92 \pm 1,57$  %) при  $29,72 \pm 0,87$  % у жінок без порушень репродуктивної функції, що особливо характерно при наявності імплантаційного чинника невдач ЗІВ ( $81,97$  %) у порівнянні з жінками з гамето-ембріональним чинником ( $5,3\%$ ), що підтверджує вагому роль активації природних кілерів в процесах порушення імплантації.

4. Встановлено, що для жінок з множинними невдачами програм ЗІВ і ПЕ характерним є підвищення сироваткового рівня ФНП- $\alpha$ , ІЛ-2 і зниження рівнів ІЛ-6 і ІЛ-4, в той час як у жінок з успішною першою спробою ЗІВ і ПЕ визначається підвищений рівень ІЛ-10 у сироватці крові, що є прогностично сприятливою ознакою. Патогенетичним імунологічним чинником повторних невдалих спроб ЗІВ є дисбаланс регуляторних механізмів: зниження рівнів ІЛ-6, ІЛ-4, ІЛ-10 та підвищення рівнів ФНП- $\alpha$  та ІЛ-2 у периферичній крові справляють несприятливий вплив на процеси раннього ембріогенезу та імплантації.

5. Доведено, що у жінок з повторними негативними спробами ЗІВ переважають автоімунні захворювання ЩЗ. Автоімунний тиреоїдит на еутиреоїдній стадії виявляється у  $33,8$  % жінок при відсутності або незначній поширеності серед жінок з неускладненим репродуктивним анамнезом, тоді коли субклінічний гіпотиреоз на тлі автоімунного тиреоїдиту з рівнями ТТГ від  $5,2$  до  $7,6$  мМО/л, мав місце у  $17,5$  % пацієток з негативними спробами ЗІВ.

6. У  $67,5$  % пацієток з повторними негативними спробами ЗІВ з переважаючим трубно-перитонеальним та/або поєднаним чинником безпліддя має місце підвищення рівня ФСГ у I фазу МЦ, переважання гіпоестрогенних станів і гіпопрогестеронемія у II фазу МЦ, що свідчить про розбалансування як центральної, так і периферичної ланок ендокринної регуляції і є гормональним фоном повторних невдач ЗІВ.

7. Розроблений діагностично-лікувальний алгоритм ведення пацієток з повторними негативними спробами ЗІВ ґрунтується на розширеному спектрі обстежень, проведенні підготовчого етапу до наступної спроби ЗІВ і ПЕ ( усунення патології ендометрію, запальних процесів геніталій, нормалізації функції ЩЗ) та проведенні імунокорекції у пацієток з імунологічними маркерами повторних невдач програм ЗІВ (збільшення вмісту і підвищення активності NK, NKT-клітин, підвищення рівня ФНП- $\alpha$ , ІЛ-2 і зниження рівнів ІЛ-6, ІЛ-4 і ІЛ-10 у периферичній крові) в процесі проведення стимуляції овуляції.

8. Проведення імунокоригуючої терапії на етапі стимуляції овуляції у жінок з імплантаційним чинником і імунологічними маркерами повторних негативних спроб ЗІВ і ПЕ дає змогу підвищити результативність програм ЗІВ у  $4,5$  рази і зменшити втрати на етапі гестації у  $9,96$  рази.

### **ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

1. Жінки з трубно-перитонеальним фактором безпліддя є групою ризику щодо імплантаційних невдач ДРТ, що вимагає проведення комплексного обстеження

перед проведенням програм ЗІВ.

2. Жінки з критично зниженими показниками ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10 є групою ризику повторних негативних спроб ЗІВ.

3. Пацієнткам з підтвердженим імплантаційним фактором й імунологічними маркерами повторних негативних спроб ЗІВ (збільшення вмісту і підвищення активності НК, НКТ-клітин, підвищення рівня ФНП- $\alpha$ , ІЛ-2 і зниження рівнів ІЛ-6, ІЛ-4 і ІЛ-10 у периферичній крові) після проведення підготовчого етапу до наступної спроби ЗІВ і ПЕ (усунення патології ендометрію, запальних процесів геніталій, нормалізації функції ЦЗ) у підготовці до наступних спроб ЗІВ рекомендується проведення імунокоригуючої терапії під час циклу стимуляції овуляції шляхом введення внутрішньовенно краплинно людського імуноглобуліну у дозі 150 мг/кг/добу трикратно (через добу).

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Михайлишин Л. О. Перенос ембріонів на 3 чи на 5 добу? Переваги та недоліки / Л. О. Михайлишин // *Здоров'є жінчини*. – 2009. – № 10 (50). – С. 170-172.

2. Михайлишин Л. О. Ідіопатичне безпліддя та повторні імплантаційні втрати. Можливості діагностики та лікування / Л. О. Михайлишин // *Здоров'є жінчини*. – 2010. – №4 (50). – С. 179-180.

3. Гулеюк Н. А. Сімейний випадок збалансованої транслокації Т (1;7), асоційованої з азооспермією / Н. А. Гулеюк, Г. М. Безкоровайна, М. Я. Тиркус, І. А. Седнева, І. Р. Ткач, Л. О. Михайлишин, І. Я. Кожема // *Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики*. – Київ-Луганськ, 2010. – Випуск 18. – С. 258-263. (*Автор виконала обстеження пацієнтів, узагальнення отриманих результатів*).

4. Пирогова В. І. Аналіз факторів негативних спроб запліднення *in vitro* (огляд літератури) / В. І. Пирогова, Л. О. Михайлишин, О. С. Мороз // *Здоров'є жінчини*. – 2011. - №7 (63). – С. 66-72. (*Огляд вітчизняної та зарубіжної літератури, аналіз проблеми, висновки*).

5. Scott E.S. The long path to pregnancy: early experience with dual anonymous gamete donation in a European *in vitro* fertilisation referral centre / E. S. Scott, L.O. Mykhaylyshyn // *Reproductive Health*. – 2010. - Vol. 7, T. 20. — P. 1-15. (*Автору належить обстеження жінок, узагальнення результатів та висновків*).

6. Пат. № 72171 U, МПК G01N 33/48, G01N 33/53. Спосіб прогнозування наслідків запліднення *in vitro* та переносу ембріонів / В. І. Пирогова, Л. О. Михайлишин ; заявник та патентовласник ЛНМУ імені Данила Галицького. – заявл. 26.01.2012; опубл. 10.08.2012, Бюл. №15. (*Співавтор винаходу, здійснила клінічні спостереження, обґрунтування висновків*).

7. Пат. №72172 Україна, МПК G01N 33/48, G01N 33/53. Спосіб підвищення ефективності запліднення *in vitro* та переносу ембріонів / В. І. Пирогова, Л. О. Михайлишин ; заявник та патентовласник ЛНМУ імені Данила



Галицького. – заявл. 26.01.2012 ; опубл. 10.08.2012, Бюл. № 15. (*Співавтор винаходу, здійснила клінічні спостереження та їх аналіз*).

8. Mykhaylyshyn L.O. ET in Day 3 or day 5? Advantages and disadvantages / L.O. Mykhaylyshyn // Здоровье женщины. – 2009. – № 3 (39). – С. 220.

9. Михайлишин Л. О. Ефективність застосування ліпофундину та людського імуноглобуліну в разі підвищення НК-клітинної активності / Л. О. Михайлишин, І. Я. Кожема // Здоровье женщины. – 2010. – № 4 (50). – С. 180. (*Автор провела обстеження жінок, узагальнення результатів, формулювання висновків*).

10. Mykhaylyshyn L.O. Day 3 or day 5? Advantages and disadvantages / L.O. Mykhaylyshyn // Reproductive BioMedicine Online. – 2010. – Vol. 20, Suppl. 3. – P. S61.

11. Pyrohova V. I. Repeated implantation failure. Diagnostics and treatment options / V. I. Pyrohova, L. O. Mykhaylyshyn // Reproductive BioMedicine Online. – 2010. – Vol. 20, Suppl. 3. – P. S77. (*Автор виконала обстеження жінок, аналіз результатів, сформулювала висновки*).

## АНОТАЦІЯ

**Михайлишин Любов Олегівна. Причини і профілактика повторних негативних спроб запліднення *in vitro*.** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.01 – акушерство та гінекологія. – Вінницький національний медичний університет ім. М.І.Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2013.

У дисертації наведено теоретичне обґрунтування і нове вирішення актуального завдання сучасної гінекології та репродуктивної медицині, а саме підвищення ефективності програм допоміжних репродуктивних технологій шляхом розробки і впровадження в практику діагностично-лікувальних алгоритмів ведення пацієнток з повторними негативними спробами ЗІВ на основі комплексного вивчення їх генезу.

Розширено дані про фактори та частоту ембріонального та імплантаційного чинників повторних негативних спроб ЗІВ. Встановлено значимість дисбалансу цитокінів та субпопуляцій лімфоцитів, зокрема збільшення рівня і активності НК- і НКТ-клітин в генезі невдач ЗІВ. Доведено, що підвищення рівня ФНП- $\alpha$ , ІЛ-2 і зниження рівнів ІЛ-6, ІЛ-4 і ІЛ-10 у периферичній крові є прогностичними маркерами повторних невдач ЗІВ і ПЕ. Одержано нові дані щодо прогностичної цінності комплексного дослідження маркерів автоімунних процесів, рівнів і активності НК- і НКТ-клітин в периферичній крові в успішності програм ЗІВ. Доповнено існуючі дані щодо особливостей гормонального балансу у жінок з повторними негативними спробами ЗІВ. Визначено показання до застосування імунокорекції у веденні жінок з повторними негативними спробами ЗІВ та доведено ефективність запропонованої імунокоригуючої терапії. Розроблено і доведено ефективність діагностично-лікувального алгоритму ведення пацієнток з повторними негативними спробами ЗІВ і ПЕ.

**Ключові слова:** негативні спроби ЗІВ, імплантаційний і ембріональний чинники, імунологія репродукції.

## АННОТАЦИЯ

**Михайлишин Л. О. Причины и профилактика повторных отрицательных попыток оплодотворения in vitro.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.01 - акушерство и гинекология. - Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И.Пирогова МЗ Украины, Винница, 2013.

В диссертации приведено теоретическое обоснование и новое решение актуальной задачи современной гинекологии и репродуктивной медицине, а именно повышение эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий.

Установлено, что у женщин с повторными негативными попытками ЭКО частота эмбрионального фактора составляет 23,8%, а имплантационного - 76,2%. У пациенток с повторными негативными попытками ЭКО, уровень CD3 +16 +56 + NKT-клеток периферической крови у 1,8 раза выше, чем у здоровых женщин с неотягощенным репродуктивным анамнезом, а содержание CD3-16 +56+NK-клеток превышает показатели женщин, забеременевших после первой попытки ЭКО. У женщин с повторными негативными попытками ЭКО чаще выявляется повышенная активность NK, NKT-клеток, что особенно характерно для имплантационного фактора неудач ЭКО (81,97%) по сравнению с гамето-эмбриональным фактором (5,3%). Для женщин с множественными неудачами программ ЭКО и ПЭ характерно повышение уровня ФНО- $\alpha$ , ИЛ-2 и снижение уровней ИЛ-6 и ИЛ-4, в то время как у женщин с успешной первой попыткой ЭКО и ПЭ определяется повышенный уровень ИЛ-10 в сыворотке крови, что является прогностически благоприятным признаком. У 67,5% пациенток с повторными негативными попытками ЭКО и преобладающим трубно-перитонеальным фактором бесплодия определяется повышение уровня ФСГ в I фазу МЦ, преобладание гипоэстрогенных состояний и гипопрогестеронемия во II фазу МЦ, что свидетельствует о разбалансировке как центрального, так и периферического звеньев эндокринной регуляции и является гормональным фоном повторных неудач ЭКО. Разработан диагностически-лечебный алгоритм ведения пациенток с повторными негативными попытками ЭКО, который основывается на расширенном спектре обследований, проведении подготовительного этапа к следующей попытке ЭКО и ПЭ и иммунокоррекции у пациенток с иммунологическими маркерами повторных неудач программ ЭКО (увеличение содержания и повышение активности NK, NKT-клеток, повышение уровня ФНО- $\alpha$ , ИЛ-2 и снижение сывороточных уровней ИЛ-6, ИЛ-4 и ИЛ-10) в процессе цикла стимуляции овуляции. Проведение иммунокоррекции на этапе стимуляции овуляции у женщин с имплантационным фактором и иммунологическими маркерами повторных отрицательных попыток ЭКО и ПЭ позволяет повысить результативность программ ЭКО в 4,5 раза и уменьшить потери на этапе гестации в 9,96 раза.

**Ключевые слова:** повторные неудачи ЭКО, имплантационный и эмбриональные факторы, иммунология репродукции.

## SUMMURY

**Mykhaylyshyn L. O. Causes and prevention of repeated in vitro fertilization failure.** – As Manuscript.

The dissertation for the degree of candidate of medical sciences in speciality 14.01.01 - Obstetrics and Gynecology. - Vinnitsa National Medical University named after N.I.Pirogov, Ministry of Health Care of Ukraine, Vinnitsa, 2013.

The thesis presents the theoretical basis and a new solution of an actual problem of modern gynecology and reproductive medicine, namely increasing efficiency of ART through the development and practical implementation of diagnostic and therapeutic algorithms for patients with repeated IVF failures based on a comprehensive study of their genesis.

Extended the existing data on the causes and frequency of implantation and embryological factor of repeated IVF failure. The significance of cytokine profile and lymphocyte subsets imbalance, in particular increased NK and NKT level and activity in the genesis of repeated IVF failure have been established.

The elevation of TNF- $\alpha$ , IL-2 levels and decrease of IL-6, IL-4 and IL-10 in the peripheral blood have been identified as prognostic marker of repeated IVF failure. New data was obtained on the prognostic value of a comprehensive study of autoimmune markers, of NK-, NKT-cells levels and activity in the peripheral blood. Supplemented existing data on the characteristics of the hormonal balance in women with repeated IVF failures. Indications for the use immune modulation therapy in preparing women with repeated IVF failure and proven effectiveness of the proposed immune adjustment therapy. The efficiency of diagnostic-medical algorithm of supervising patients with repeated IVF failure was developed and demonstrated.

**Key words:** repeated IVF failures, implantation and embryological factors, reproductive immunology.

## СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

АМГ	-	антимюллерівський гормон
ДРТ	-	допоміжні репродуктивні технології
E <sub>2</sub>	-	естрадіол
ЕФ	-	ембріональний фактор
ЗЗОМТ	-	запальні захворювання органів малого тазу
ЗПСШ	-	захворювання, які передаються статевим шляхом
ЗІВ	-	запліднення in vitro
ІІ	-	інтерлейкін
ІФ	-	імплантаційний фактор
ПЕ	-	перенос ембріонів
ТТГ	-	тиреотропний гормон
ХЕ	-	хронічний ендометрит
ЩЗ	-	щитоподібна залоза
НК	-	природні кілери







---

Підписано до друку 15.02.2013 р. Замовл. № 048.  
Формат 60x90 1/16 Ум. друк. арк. 0,8 Друк офсетний.  
Тираж 100 примірників.

---

Вінниця. Друкарня ВНМУ ім. М.І.Пирогова, Пирогова, 56.

