

Причини і профілактика повторних негативних спроб запліднення in vitro

Causes and prevention of repeated in vitro fertilization failure

Д. мед. н. проф. В.І. Пирогова¹,
к.м.н. Л.О. Михайлишин²

¹ Львівський національний медичний
університет ім. Данила Галицького
² ПП "Медичний центр Інтерсоно"

**European Journal
of Medical Technologies**
2013; 1(1): 6-16

Copyright © 2013 by ISASDMT
All rights reserved
www.medical-technologies.eu
Published online 14.10.2013

Конспект

В проведенном исследовании 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. 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 эмбриональный факторы, иммунология репродукции

Abstract

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

Адреса:
Medical centre Intersono
102 Antonovych street
79057 Lviv
Ukraine

diagnostic and therapeutic algorithms for patients with repeated IVF failures based on a comprehensive study of their genesis. Immunological prognostic markers of repeated IVF failure factors have been identified. 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 failure, implantation and embryological factors, reproductive immunology

За даними вітчизняних і закордонних учених частота безплідності становить на сьогодні від 15 до 20% [1,9]. Безплідний шлюб спричиняє погіршення демографічної ситуації, зниження соціальної активності, збільшення кількості розлучень, формування у пацієнок комплексу психологічної неповноцінності. Складні проблеми порушення репродуктивного здоров'я вирішуються застосуванням допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). Відповідно до даних ВООЗ, потреба проведення циклів ДРТ на 1 млн. населення становить від 800 до 1000 на рік [9]. Метод запліднення *in vitro* (ЗІВ) розглядається як один з найбільш перспективних методів лікування безпліддя [1]. Незважаючи на стрімкий розвиток програм ЗІВ з моменту першої позитивної програми в 1978, протягом останнього десятиріччя не відмічено суттєвого зростання частоти настання вагітностей і лише близько однієї з чотирьох програм ЗІВ закінчується народженням живих дітей [9].

Враховуючи значну потребу безплідних пар в застосуванні цього методу, недостатню ефективність методики, значна увага спеціалістів спрямована на підвищення ефективності програм ЗІВ. Питання обстеження та підготовки подружніх пар з безпліддям перед застосуванням ДРТ залишається надзвичайно актуальним, враховуючи складний акушерсько-гінекологічний статус пацієнтів програм ЗІВ, вік, стан їх соматичного та психологічного здоров'я, а також різноманіття етіологічних та патогенетических факторів безпліддя [1,3,6].

Протягом останніх років надзвичайно багато робіт присвячено вивченню імунологічних

аспектів розвитку вагітності, і все більше дослідників приходять до висновку про тісний взаємозв'язок та взаєморегуляцію між ендокринною та імунною системами, що реалізується на різних етапах репродуктивної функції [3,6,10]. Відомо, що імунна система приймає безпосередню участь в процесах гаметогенезу, імплантації, інвазії трофобласта, децидуалізації, розвитку плаценти та імунотолерантності під час вагітності, індукуючи зміни в експресії генів у клітинах мішенях і діючи як ростовий фактор та фактор диференціації [6,7].

Цілий ряд досліджень демонструє, що успіх вагітності залежить від співвідношення між прозапальними (Тх-1) та протизапальними (Тх-2) цитокіновими фенотипами [10,11].

В літературних джерелах описані механізми можливого впливу прозапальних та протизапальних цитокінів на розвиток вагітності. Цитокіни, що продукуються Тх-1 можуть як безпосередньо порушувати диференціацію та функцію трофобласта, так і здійснювати непрямий вплив через активацію макрофагів, які в свою чергу теж уражають трофобласт [10]. Крім того доведено, що цитокіни Тх-1-ряду активізують тромбоутворення та запальні зміни у судинах ендометрію, в той час як протизапальні цитокіни Тх-2-ряду пригнічують процеси тромбоутворення та запалення [11].

На особливу увагу заслуговують зміни активності певних імунних клітин під час вагітності [6,7]. Природні кілери НК-клітини, як популяція лімфоцитів з певними фенотипічними та функціональними особливостями, що здійснює широкий спектр біологічних впливів щодо регуляції

цитодиференціювання та елімінації генетично-дефектних клітин, а також клітин, уражених патогенами без попередньої імунізації, відіграють вирішальну роль в успішній імплантації [6]. На даний час відомо п'ять субпопуляцій NK-клітин: CD16+CD56- — NK-клітини, для яких клітинами-мішенями є клітини інфіковані вірусами, власні старіючі клітини організму, клітини трансплантанта, пухлинні клітини; K-клітини, які здійснюють антитілозалежну клітинну цитотоксичність; LAK-клітини (лімфокінактивовані кілери), які відіграють ключову роль в процесах апоптозу, елімінації пухлинних клітин виявляються в ендометрії; CD16-CD56+ — NK-клітини печінки, клітинами-мішенями для яких є T-лімфоцити, що сенсibiliзовані до харчових білків; NK-T-клітини – невелика субпопуляція T-лімфоцитів з фенотипом CD3+CD16+CD56+, що представляють на сьогоднішній день найбільший інтерес через свою особливу властивість зв'язувати антиген без участі комплексу гістосумісності. Прототипними поверхневими антигенами NK-клітин є CD16 і CD56. Антиген CD16 характеризується низькою спорідненістю (чутливістю) до IgG-комплексів (FcRIII) і розташований на поверхні більшості NK-клітин, нейтрофілів, макрофагів. CD16 відповідають за NK-зумовлену антитілозалежну клітинну цитотоксичність. Залежно від ступеня експресії CD56, NK-клітини поділяються на 2 популяції. Активність NK-клітин в кінцевому результаті регулюється активуючими та інгібуючими рецепторами [7].

Незважаючи на значний прогрес в розумінні значення та функції NK-клітин в репродуктивних процесах, їх роль в процесах настання вагітності залишається недокінця з'ясованою оскільки літературні дані, як правило, неоднозначні та суперечливі. Однак, визначення ролі окремих цитокінів та факторів клітинного імунітету, їх регуляторної активності має велике практичне та теоретичне значення, оскільки з однієї сторони дає можливість осмислити нові аспекти імунно-ендокринної регуляції ранніх етапів репродуктивного процесу і патогенезу безпліддя, а з другого – розробити прогностичні критерії ефективності і/або ускладнень при проведенні ДРТ.

Серед основних засобів імунотерапії при імунологічних факторах порушення імплантації ембріона в порожнині матки одне із чільних місць займає внутрішньовенне введення імуноглобуліну людини (ВВІГЛ) [2,4,5,12,13]. Імуномодуляція внутрішньовенним імуноглобуліном відбувається завдяки пасивно перенесеному блокуванню або антиідіотипними антитілами, блокадою Fc рецептора, підсиленням супресорної T-клітинної функції, зниженням B-клітинної функції та/або редукції активації компонентів комплементу, зниженням активності NK-клітин та прозапальних цитокінів [13]. Дослідження показали, що ефективність застосування ВВІГЛ при лікуванні самовільних викиднів є значно вищою, ніж аллогенна лейкоцитарна імунізація [8]. Аналіз 7 рандомізованих плацебо-контрольованих досліджень, виконаний в 2005 році також дає змогу припустити ефективність ВВІГЛ в певних підгруп пацієнтів з вторинним (після народження живої дитини) невиношуванням і з повторними випадками внутрішньоутробної смерті плода в II триместрі вагітності [2]. Схожі результати представлені у систематичному огляді, який включає всі рандомізовані контрольовані дослідження, в яких ВВІГЛ в різних дозах порівнювали з плацебо чи активним контролем (8 досліджень, 442 учасника дослідження). Співвідношення шансів народження живих дітей у жінок з вторинним невиношуванням вагітності, що отримували ВВІГЛ, склало 2,71 (95% ДІ 1,09-6,73) [13].

Незважаючи на те, що існує велика кількість досліджень присвячених лікувальному впливу ВВІГЛ при невиношуванні вагітності, в літературі є обмаль даних щодо його ефективності при повторних негативних спробах ЗІВ. В дослідженні за участі 29 жінок з безпліддям невизначеної етіології і негативною першою спробою ЗІВ після введення ВВІГЛ в дозі 500 мг/кг перед наступною процедурою переносу ембріонів відмічалось підвищення частоти настання вагітностей на 50% [12].

Таким чином, представлений аналіз проблеми повторних невдалих спроб ЗІВ підтверджує необхідність вивчення імунологічних механізмів, які лежать в основі порушень репродуктивної

функції у жінок із безпліддям, розробки діагностично-лікувальних алгоритмів ведення пацієнок з повторними негативними спробами ЗІВ на основі індивідуальних програм, що і зумовило мету нашої роботи.

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.

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.

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 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, 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 пацієнок основної групи було розділено на дві підгрупи. У I-ЕФ підгрупу увійшли 19 (23,8%) жінок із ембріональним фактором, підгрупу I-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 пацієнок із повторними негативними спробами 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.

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). Оцінку стану ендометрію проводили шляхом визначення його товщини та структури при УЗ-дослідженні в динаміці МЦ, проведення гістоскопії, 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 CyAnTM ADP та Coulter FC500-MCL (Beckman Coulter, США). Визначали кількість та активність НК-клітин і NKT-клітин з фенотипами CD3-16+56+, CD3+16+56+. Рівень про- та протизапальних інтерлейкінів (ІЛ) ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10, ФНП-α, ІФН-γ 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 (Е2), прогестерону (П), тестостерону (Т), гормонів щитоподібної залози – вільного трийодтироніну (Т3), вільного тетраіодтироніну (Т4), антитіл до тиропероксидази (АТПО), концентрацію антимюллерового гормону (АМГ) у периферичній крові на 2-4 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).

Результати досліджень та їх обговорення

Вік обстежених пацієнок 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. У пацієнок, 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% пацієнок основної групи та у 5,0% групи порівняння.

Для пацієнок основної групи характерною була значна частота ЗЗОМТ: сальпінгофорит – у 56,3%, гідросальпінкс – у 35,0%, пельвіоперитоніт – у 5,0%. Звертала на себе увагу у пацієнок 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.

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 досліджуваної групи достовірно не різнились між собою. Візуалізація антральних фолікулів склала у всіх групах 100%. При вивченні параметрів контрольованої стимуляції овуляції у обстежених пацієнок не виявлено статистично значущих відмінностей між групами щодо перебігу стимуляції овуляції, параметрів фолікулогенезу, однак виявлені значні відмінності оогенезу і раннього ембріогенезу (табл. 1).

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 ен-

Таблиця 1. Верифікація гамето-ембріонального чинника невдалих спроб ЗІВ

Показники гамето-ембріонального фактора	Групи пацієнток	
	Основна (n=80)	Порівняння (n=20)
Кількість преовуляторних фолікулів	14,0±0,7	11,1±0,6
Кількість отриманих ооцитів на пацієнтку	12,7±0,5	9,9±0,7
Кількість зигот на пацієнтку (2 рп)	11,0±0,5	10,1±0,3
Сповільнений темп дроблення ембріонів (n)	4 (5,0%)	–
Низький відсоток бластоутворення (≤20%) (n)	15 (18,8%)	–
Середній відсоток бласт-ння (>20 та <50%) (n)	43 (53,8%) p<0,001	8 (40,0%)
Високий відсоток бластоутворення (≥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

дометрія 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 фази 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% пацієнток основної групи. У I-ЕФ підгрупі частота ХЕ складала 5,3% при 26,2% у I-Ф 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 пацієнток із трубно-перитонеальним безпліддям і не-

вдалими 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 пацієнток із повторними негативними спробами ЗІВ.

Аналіз рівнів Прл, ЛГ і ФСГ показав, що для пацієнток всіх груп характерною була нормогонадотропна регуляція функції яєчників. Секреція Прл у основній групі (13,57±1,44 нг/мл) не перевищувала показники контролю (13,25±1,15 нг/мл). Незначне посилення Прл-синтезуючої функції гіпофіза у жінок групи порівняння (14,22±2,21 нг/мл, p>0,05) розглядали як вторинне на ґрунті дисфункції яєчників і наслідком при-

йому комбінованих оральних контрацептивів, що призначались пацієнткам даної групи на попередніх етапах лікування.

Рівень ФСГ є одним із маркерів оваріально-го 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% пацієнток 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 $2,04 \pm 0,57$. У пацієнток 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 стромы яєчника і теки, результатом чого є не тільки підвищення продукції андрогенів, але й порушення селекції і повноцінності домінуючого 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 пацієнток 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 E2 відповідав нормоестрогенії ($275,5 \pm 12,1$ пмоль/л). У 25,0% жінок основної групи рівень E2 був підвищеним порівняно з контролем, у 48,8% – навпаки мала місце гіпоестрогенія. Для пацієнток групи порівняння характерною була наявність як гіпоестрогенних (25,0%), так гіперестрогенних станів (35,0%) при збереженні нормоестрогенії у 40,0% жінок (табл. 2).

Таблиця 2. Показники гормонального гомеостазу пацієнток ($M \pm m$)

Ормони	Групи жінок			
	Основна (n=80)			Контроль (n=15)
	I-ЕФ підгрупа Г (n=19)	I-ІФ підгрупа (n=61)	Порівняння (n=20)	
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. p1 – достовірність відмінностей порівняно з контрольною групою; p2 – порівняно з підгрупою I-ІФ; p3 – порівняно з групою порівняння.

Дифузний еутиреоїдний зоб I-II ступеня мав місце у 37,4% всіх пацієнок. 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% пацієнок 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 Т3в і Т4в 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 пацієнок з повторними негативними спробами ЗІВ і вимагають проведення відповідної корекції.

Імунологічний генез виділяється зазвичай як окремий патофізіологічний механізм невдач ЗІВ. У пацієнок основної групи виявлено дисбаланс відносного вмісту субпопуляцій лімфоцитів, відносні рівні регуляторних CD3+ CD4+, CD8+ периферичної крові вірогідно різнились 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+NК-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+NК-клітин периферичної крові в контролі складав $4,85 \pm 0,29\%$, у пацієнок 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 пацієнок основної групи перевищував рівні груп порівняння і контролю (p<0,001). Кількість жінок з підвищен-

ням кількості і/або активності НК, НКТ-клітин серед I-ЕФ та I-ІФ підгруп склала 5,3% та 81,97% відповідно, що підтверджує вагому роль активації природних кілерів в порушенні імплантації.

У пацієнок з негативними спробами ЗІВ виявлено дисбаланс регуляторних про- та проти-запальних 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 I-ЕФ підгрупі (p<0,01 порівняно з групою порівняння) і $1,27 \pm 0,41$ пг/мл у підгрупі I-ІФ (p<0,02 порівняно з групою порівняння), при цьому рівень ІЛ-10 у пацієнок з першою вдалою спробою ЗІВ і ПЕ складав $2,98 \pm 0,23$ пг/мл. Важливим є те, що у жінок підгрупи I-ЕФ мало місце підвищення рівня ФНП-α ($5,08 \pm 0,66$ пг/мл, p<0,01 порівняно з групою порівняння і підгрупою I-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 пацієнтками з успішною першою спробою ЗІВ і ПЕ (p<0,001). У той же час сироваткові рівні ІФН-γ не відрізнялись між собою у пацієнок 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 імносупресорна 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-α, ІЛ-2 і зниження рівня 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 успішності програм ЗІВ.

Враховуючи вище зазначене, нами був запропонований діагностично-лікувальний алгоритм

ведення пацієнок 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 пацієнок з імунологічними маркерами повторних невдач програм ЗІВ (збільшення вмісту і підвищення активності НК, НКТ-клітин, підвищення рівня ФНП- α , 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 пацієнткам (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). Пацієнтки 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 пацієнок, 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 імплантацийним 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

1. Серед жінок з повторними негативними спробами ЗІВ частота ембріонального фактора складає 23,8%, а імплантацийного – 76,2%, при цьому при ембріональному чиннику переважає ендокринний (31,6%) і поєднаний (52,6%) чинник безпліддя, а при імплантацийному – трубно-перитонеальний фактор (56,3%).
2. 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, має місце у 17,5% пацієнок з негативними спробами ЗІВ.
3. У групі жінок з повторними негативними спробами виявлено характерні імунологічні зміни: підвищена активність НК, НКТ-клітин при імплантацийному чиннику невдач ЗІВ (81,97%) та дисбаланс протапротизапальних цитокінів: зниження рівнів ІЛ-6, ІЛ-4, ІЛ-10 та підвищення рівнів ФНП- α та ІЛ-2 у периферичній крові, що справляє несприятливий вплив на процеси раннього ембріогенезу та імплантациї.
4. Проведення імунокоригуючої терапії на етапі стимуляції овуляції у жінок з імплантацийним 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.

Список використаних джерел

1. Юзько О.М. Подолання безпліддя за допомогою репродуктивних технологій. О.М. Юзько, Т.А. Юзько. Медицинские аспекты здоровья женщины: издание для врача-практика 2009, N 3, С. 50-54.
2. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intravenous immunoglobulin in the prevention of recurrent miscarriage: evidence for the therapeutic effect in women with secondary recurrent miscarriage. O.B. Christiansen, B. Pedersen, A. Rosgaard [et al.]. Hum. Reprod. 2005. Vol. 17. №3. P. 809-901.
3. Christiansen O.B. Future directions of failed implantation and recurrent miscarriage research. O.B. Christiansen, H.S. Nielsen, A.M. Kotle. Reprod Biomed Online 2006. №13. - P.71-83.
4. Christiansen O.B. Intravenous immunoglobulin in the prevention of recurrent miscarriage: does it work? O.B. Christiansen, H.S. Nielsen. Chem. Immunol Allergy. 2005. Vol. 88. P.117-127.
5. Clark D.A. Is intravenous immunoglobulin (IVIg) efficacious in early pregnancy failure? A critical review and meta-analysis for patients who fail in vitro fertilization and embryo transfer (IVF). D.A. Clark, C.B. Coulam, R.B. Striker. J. Assist. Reprod. Genet. 2006. Vol.23. №1. P. 1-13.
6. Cooper M.A. The biology of human natural killer-cell subsets / M.A. Cooper, T.A. Fehniger, M.A. Caligiuri. Trends Immunol. 2001. №22. P.633-640.
7. Detailed analysis of peripheral blood natural killer (NK) cells in women with recurrent miscarriage. K. King, S. Smith, M. Chapman [et al.]. Human Reproduction. 2010. №25(1). P.52-58.
8. Elram T. Treatment of recurrent IVF failure and human leukocyte antigen similiary by intravenous immunoglobulin. T. Elarm, A. Simon, S. Israel. Reprod. Biomed. Online. – 2005. Vol.11. P. 745-749.
9. Nyboe Andersen A. European IVF-monitoring (EIM) Consortium, for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE. A. Nyboe Andersen. Hum. Reprod. 2009. Vol.24. P. 1267-1287.
10. Serial estimation of Th1:Th2 cytokines profile in woman undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. E. Kalu, S. Bhaskaran, M.Y. Thum [et al.]. Am J reprod Immunol. 2008. №59. P.206-211.
11. T-helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. J.Y.Kwak-Kim, A.Gilman-Sachs, C.E.Kim [et al.]. Chem Immunol.Allergy. 2005. №88. P. 64-79.
12. Treatment with adalimumab (Humira) and intravenous immunoglobulin improves pregnancy rates in woman undergoing IVF. E.E. Winger, J.L. Reed, S. Ashoush [et al.]. Am J Reprod Immunol. 2009. №61. P.113-120.
13. Use of intravenous immunoglobulin for treatment of recurrent miscarriage: a systematic review/B. Hutton, R. Sharma, D. Fergusson [et al.]. Br. J. Obstet. Gynaecol. 2007. Vol.114. №2. P.134-142.