

**Способ повышения эффективности программ ЭКО при трубно-перитонеальном бесплодии, осложненном хроническим эндометритом.**

Лихачева В.В., Зорина В.Н., Андропова Т.М., Зорин Н.А.

Изобретение относится к медицине, а именно к акушерству и гинекологии, а так же к репродуктологии.

Среди больных хроническим эндометритом (ХЭ), первичное бесплодие диагностируется в 25% случаев, вторичное - в 36%, неудачные попытки экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и переноса эмбриона - в 60% [Данусевич И.Н. Частота встречаемости хронического эндометрита у женщин с различными вариантами репродуктивных нарушений. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2013; 4(92): 18-20]. При этом данное заболевание отличается скудностью и неспецифичностью симптоматики (тазовые боли, маточные кровотечения, лейкоцитарная реакция крови), а также низкой чувствительностью и специфичностью клинических методов диагностики, что нередко приводит к учету ложноположительных и ложноотрицательных результатов при статистическом подсчете данных [Park H.J, Kim Y.S., Yoon T.K., Lee J.V.S. Chronic endometritis and infertility. Clin Exp Reprod Med. 2016; 43(4): 185-192]. Самой очевидной причиной хронизации воспаления при эндометрите является несостоятельность иммунной системы - недостаточно эффективный ответ, а также персистенция устойчивых к терапии штаммов бактерий и вирусов способствуют поддержанию «провоспалительного» фона, значительно снижающего рецептивность эндометрия.

Для коррекции иммунного статуса при гинекологических заболеваниях активно внедряются в практику иммуномодуляторы, иммуностимуляторы и иммуносупрессоры. В частности, таблетированный глюкозаминилмурамилдипептид (4-О-(2-ацетиламино-2-дезоксиглюкопиранозил)-Х-ацетилмурамил]-Е-аланил-Э-а-глутамиламид, выпускаемый под торговой маркой ЛИКОПИД) применяется для стимуляции бактерицидной и цитотоксической активности фагоцитов и естественных киллерных клеток, усиления пролиферации лимфоцитов, активизации синтеза специфических антител, а также цитокинов (интерлейкинов, факторов роста и некроза опухоли, интерферона-гамма).

Ликопид эффективно применяется для профилактики осложнений при острых воспалительных заболеваниях придатков матки - отмечается нормализация базальной и стимулированной активности нейтрофилов (по данным НСТ-теста) и снижение частоты гнойных осложнений на 24% при десятидневном приеме ликопида (Смирнова И.В. Профилактика гнойных воспалительных заболеваний придатков матки с помощью иммуномодулятора «Ликопид»// Иммунопатология, аллергология, инфектология - №2 — 2004 - с.25-28).

Установлено, что интравагинальное применение ликопида при хронических инфекционно-воспалительных и дисбиотических заболеваниях

нижнего отдела женской репродуктивной сферы в 40% приводит к клиническому выздоровлению и в 60% - к более выраженному иммунному ответу, способствующему выявлению не диагностируемых ранее инфекций (хламидиоз, микоплазма и уреоплазма, вирус простого герпеса). При анализе вагинального секрета обнаружено повышение концентрации ИЛ-6 и снижение G-GSF на фоне нормализации вагинального микробиоценоза, а также одновременное повышение ИЛ-6, G-GSF и ФНО-а при обострении на фоне лечения ликописом (*Аракелян М.А., Галкина О.В., Нестеров ИМ., Сысоев К.А., Айламазян Э.К., Толоян А.А. Дефекты местного иммунитета при хронических инфекционных заболеваниях нижних отделов женского репродуктивного тракта и возможности коррекции ликописом// Российский иммунологический журнал Т.1, №10, 2007, с.56-61*).

Известен способ повышения эффективности лечения бесплодия при эндометриозе, с применением Ликописа. После традиционного лечения (в данном случае хирургического) проводят анализ периферической крови у бесплодных женщин (как правило, выявляется повышенное содержание TLR2+ TNF $\alpha$ + клеток, усиленная экспрессия мРНК RAGE и сниженная внутриклеточная продукция ИЛ-1 $\beta$ ). Затем назначается Ликопис и через месяц повторно проводится анализ. При нормализации продукции ИЛ-1 $\beta$  и положительной реакции моноцитов на лечение (повышение уровня TLR2+ клеток, экспрессии мРНК NOD2 и снижение экспрессии мРНК RAGE) прогнозируется высокая вероятность наступления беременности (*Сотникова Н.Ю., Анциферова Ю.С., Малышкина А.И., Красильникова А.К. Нарушения системных реакций врожденного иммунитета у пациенток с бесплодием и эндометриозом I-II стадии и возможность их коррекции препаратом Ликопис// Иммунология, Т.37, №1, 2016, с. 17-21*). Однако методы работы с клетками дорогостоящи, трудоемки и на сегодняшний день малоприменимы в широкой врачебной практике.

Наиболее близким к заявленному является способ прогноза эффективности использования однократного курса ультразвукового кавитационного орошения полости матки у женщин с хроническим эндометритом (*Чистякова Г.Н., Башмакова Н.В., Погорелко Д.В., Ремизова И.И., Тарасова М.Н., Газиева И.А. патент RU 2506593 С*). Определяют в сыворотке крови концентрацию интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ) и интерлейкина 6 (IL-6) до проведения курса лечения. Вычисляют прогностический индекс (PI) по формуле:  $PI = -0,04X_1 + 0,40X_2 - 1,89$ , где  $X_1$  - концентрация IFN- $\gamma$ , пг/мл;  $X_2$  - концентрация IL-6, пг/мл. При значении PI более 0 делают заключение об эффективном лечении, а при значении PI менее 0 прогнозируют малоэффективное использование. Использование данного способа позволяет своевременно выявить группу женщин, у которых применение однократного курса ультразвукового кавитационного орошения полости матки малоэффективно, что дает возможность определить тактику ведения этих пациенток и за счет дифференцированного подхода повысить результативность лечения до

91%. Однако концентрации цитокинов в крови относительно нестабильны, в некоторых случаях могут меняться даже в течение суток, поэтому использование одних цитокинов без мониторинга связанных с их синтезом белков представляется недостаточно эффективным в случае приготовления к дорогостоящей и сложной программе ЭКО тем более, что с увеличением количества попыток, снижается вероятность развития беременности.

Задачей изобретения является разработка способа повышения эффективности программ ЭКО при трубно-перитонеальном бесплодии, осложненном хроническим эндометритом, позволяющего оценить эффективность применения иммунокорректирующего препарата в процессе подготовки женщины и, в зависимости от результатов, скорректировать тактику подготовки для увеличения количества положительных исходов программ ЭКО.

Поставленная задача достигается тем, что при подготовке женщины с проявлениями хронического эндометрита к программе ЭКО, включающей применение препарата Ликопид в дозе 10 мг течение 10 дней, а также получение и исследование образцов венозной крови методом твердофазного иммуноферментного анализа после назначения курса иммунокорректора, в сыворотке крови дополнительно определяют содержание лактоферрина (ЛФ) и ИЛ-8 методом твердофазного иммуноферментного анализа и, в зависимости от результатов исследования, решают вопрос об «отсроченном» переносе эмбрионов в полость матки для проведения курса соответствующего дополнительного лечения, устраняющего факторы, негативно влияющие на рецептивность эндометрия и, соответственно, эффективность программы ЭКО.

Новизна способа:

- У женщин с трубно-перитонеальным бесплодием, ассоциированным с хроническим эндометритом, после проведения курса иммунокорректирующей терапии препаратом Ликопид перед вступлением в программу ЭКО, в день пункции фолликулов получают образец сыворотки крови, в котором методом твердофазного иммуноферментного анализа определяют содержание ЛФ и ИЛ-8
- При концентрации ЛФ и ИЛ-8 в норме (до 1,8 мкг/мл и до 10 пкг/мл соответственно), либо повышении только ЛФ (не более 2,5 мг/л) прогнозируется высокая вероятность положительного исхода ЭКО;
- При одновременном повышении концентрации в крови ЛФ (более 2 мг/л) и ИЛ-8 (более 10 пкг/мл), прогнозируется высокий риск негативного исхода программы ЭКО, в таком случае рекомендуется криоконсервация эмбрионов, проведение дополнительного курса антибактериальной, противовоспалительной терапии и затем отсроченный перенос размороженных эмбрионов;
- При выявлении ЛФ в концентрации менее 1 мг/л при одновременном отсутствии в крови ИЛ-8, прогнозируется также высокий риск негативного исхода, рекомендуется отсроченный перенос эмбрионов

для проведения дополнительной противовирусной, а также иммунокорригирующей терапии;

Совокупность существенных признаков позволяет получить новый результат, заключающийся в повышении эффективности программ ЭКО при трубно-перитонеальном бесплодии, ассоциированным с хроническим эндометритом за счет дополнительного определения эффективности применяемого иммунокорректора и последующей индивидуализации подготовки к программе ЭКО.

Способ отличается малоинвазивностью, обладает достаточной чувствительностью, специфичностью, и позволяет оценить готовность женщины до начала программы ЭКО, основываясь не только на субъективной оценке клинических проявлений ХЭ, но и на объективных данных клинико-лабораторных исследований и математических подсчетов. Данный прогноз эффективности ЭКО позволяет оптимизировать затраты, путем переноса сроков начала дорогостоящей программы вплоть до улучшения состояния эндометрия, что позволяет существенно повысить процент эффективных исходов программы ЭКО.

Используемые в предлагаемом методе ЛФ и ИЛ-8 выбраны нами после анализа данных опубликованных в открытой печати исследований, свидетельствующих о значительном влиянии Ликопида на функциональную активность нейтрофилов, являющихся продуцентами данных показателей. При этом синтез ЛФ и ИЛ-8 взаимозависим (Legrand D., Ellass E., Carpenter M., Mazurer J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell. Mol. Life Sei.* 2005; 62: 2549-2559.), и параллельное изучение их концентраций повышает достоверность получаемых прогностических данных.

Способ осуществляется следующим образом.

У женщин с трубно-перитонеальным бесплодием, ассоциированным с ХЭ обратившимся в клинику для участия в программе ЭКО после первичного клинико-лабораторного обследования, верификации диагноза ХЭ проводят антибактериальную, противовоспалительную терапию в сочетании с иммунокоррекцией препаратом Ликопид по схеме 10 мг в сутки на протяжении 10 дней. Затем в день пункции фолликулов в программе ЭКО получают образец венозной крови из локтевой вены, отделяют сыворотку крови и в ней определяют концентрации ЛФ и ИЛ-8 методом твердофазного иммуноферментного анализа. При благоприятных прогностических показателях (концентрации ЛФ и ИЛ-8 в до 1,8 мкг/мл и до 10 пкг/мл соответственно, либо повышении только ЛФ (не более 2,5 мг/л) рекомендуется перенос свежих эмбрионов в программе ЭКО. В случае одновременного повышения концентрации в сыворотке крови ЛФ (более 2 мг/л) и ИЛ-8 (более 10 пкг/мл), прогнозируется высокий риск негативного исхода, рекомендуется «отсроченный» эмбриотрансфер и дополнительная антибактериальная, противовоспалительная терапия. Также неблагоприятным в плане прогноза является выявление ЛФ в концентрации менее 1 мг/л при одновременном отсутствии в крови ИЛ-8, и для повышения эффективности ЭКО

рекомендуется «отсроченный» перенос эмбрионов после предварительной противовирусной и иммунокорректирующей терапии.

При предварительном анализе среднестатистических значений содержания ЛФ и ИЛ-8 после применения препарата Ликопид в зависимости от исхода программы ЭКО были получены следующие данные (Табл.1).

**ТАБЛИЦА 1**

| Концентрация белков | Успешное завершение программы |                             | Неуспешное завершение программы |                             |
|---------------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
|                     | Стандартное лечение           | Добавление ликопида в схему | Стандартное лечение             | Добавление ликопида в схему |
| n=                  | 29                            | 12                          | 34                              | 27                          |
| Лактоферрин (мг/л)  | 1,22±0,09                     | 1,56±0,20<br>p=0,0254       | 1,23±0,09                       | 1,76±0,16<br>p=0,0036       |
| ИЛ-8 (пкг/мл)       | <b>ЗЛИЛ</b>                   | 5,7±0,6                     | 4,7Н,4                          | 8,9И,7                      |

В целом, при последующем позитивном исходе ЭКО в **25%** случаев содержание ЛФ было выше 2 пкг/мл. При этом одновременное повышение ИЛ-8 зафиксировано только в 1 случае (**8%**). При негативном исходе программы ЭКО у **41%** женщин было повышено содержание ЛФ и у **22%** одновременно повышено содержание ЛФ и ИЛ-8 в крови. При этом еще у **11%** женщин, несмотря на применение Ликопида, не обнаруживался в крови ИЛ-8, содержание ЛФ также было ниже 1 мг/л.

Мы полагаем, что активация синтеза лактоферрина во многом обуславливает свойства ЛИКОПИДА - доказано, что данный белок способен активно подавлять патологическую пролиферацию, является важнейшим фактором мукозального иммунитета, препятствующего патогенной (бактериальной, вирусной) инвазии, модулирует воспалительные реакции.

Однако, учитывая 2 источника ЛФ в организме (постоянная физиологическая секреция эпителием, а также высвобождение депонированного при дегрануляции нейтрофилов во время воспалительной реакции), эффект данной стимуляции ЛИКОПИДОМ также может быть двойственным:

У одних подобная стимуляция иммунной системы приводит к нормализации физиологических функций и успешной имплантации.

У других — хроническое подострое воспаление переходит в более активную форму и сформированный провоспалительный фон с одной стороны способствует последующему выздоровлению, а с другой - снижает рецептивность эндометрия на период развития адекватного ответа на патогены и условно-патогенные агенты.

Необходимо учитывать и изменения уровня ИЛ-8, синтез которого взаимосвязан с ЛФ - если концентрация белка сама по себе может быть высокой (вследствие врожденных особенностей секреции), то одновременное выявление концентраций ЛФ более 2 мг/л и ИЛ-8 более 10 пкг/мл

свидетельствуют о воспалении, снижающем рецептивность эндометрия и высоком риске негативного исхода программы ЭКО.

Отсутствие ИЛ-8 в крови при уровне ЛФ менее 1 мг/л на фоне применения иммунокорректора также ассоциировано с негативным исходом и свидетельствует о наличии иммуносупрессии (частое явление при хронической рецидивирующей вирусной инфекции).

Таким образом, ЛИКОПИД при хроническом эндометрите, в рамках комплексной подготовки к программам экстракорпорального оплодотворения значительно влияет на содержание ЛФ и, в несколько меньшей степени на ИЛ-8 и их совместный мониторинг, с последующей индивидуализацией подхода к процессу заключительных мероприятий в подготовке к программе ЭКО позволяет повысить ее эффективность.

Пример 1. Больная Б. 36 лет, с трубно-перитонеальным бесплодием (отсутствие маточных труб). В анамнезе 3 неудачные попытки ЭКО и один криоперенос, все переносимые эмбрионы были высокого класса качества. При УЗИ органов малого таза выявлены признаки хронического эндометрита в виде неоднородности эхоструктуры и повышенной эхогенности базального слоя эндометрия. Диагноз ХЭ подтвержден данными гистероскопии и морфологического исследования эндометрия. При бактериологическом исследовании аспирата эндометрия выявлен рост хламидии трахоматис, проведен курс антибактериальной терапии с учетом чувствительности выделенной микрофлоры и контролем эрадикации возбудителя, а также лечение Ликопидом по схеме 10 мг в сутки в течение 10 дней. После чего пациентка взята в программу ЭКО. При анализе сыворотки крови в день пункции фолликулов выявлена концентрация ЛФ 1,49 мг/л, и ИЛ-8 3,3 пкг/мл. Соответственно прогноз благоприятный, выполнен перенос свежего эмбриона в полость матки на 5е сутки культивирования на стадии бластоцисты. Через 3 недели установлено наличие клинической беременности.

Пример 2. Больная К. 32 лет, с трубно-перитонеальным фактором бесплодия (непроходимость маточных труб, лечение по поводу генитального хламидиоза в анамнезе). 2 года назад была неудачная попытка ЭКО при переносе в полость матки эмбрионов высокого класса качества. По данным УЗИ, диагностической гистероскопии и морфологического исследования эндометрия диагностирован ХЭ. В посеве эндометрия патологической микрофлоры не выявлено, однако на основании активности ХЭ перед программой ЭКО проведена антибактериальная терапия препаратом широкого спектра действия и курс лечения Ликопидом по схеме 10 мг в сутки на протяжении 10 дней. После проведенного лечения пациентка взята в программу ЭКО. При анализе сыворотки крови в день пункции фолликулов концентрация ЛФ 2,46 мкг/мл ИЛ-8 25,8 пкг/мл. Соответственно прогноз неблагоприятный, эмбрионы витрифицированы, срок эмбриотрансфера перенесен. В повторном посеве эндометрия выявлен слабый рост хламидии трахоматис, проведен курс дополнительной антибактериальной терапии с

учетом чувствительности выделенной микрофлоры, а также противовоспалительная терапия в виде ректальных свечей индометацина 100 мг на протяжении 7 дней. Затем через 1 месяц после повторного лечения выполнен перенос в полость матки размороженного эмбриона. Через 3 недели установлено наличие клинической беременности.

Пример 3. Больная Х. 25 лет, причина бесплодия - отсутствие маточных труб после операций по поводу трубных беременностей. В анамнезе - 1 попытка ЭКО с переносом свежего и 2 попытки переноса размороженных эмбрионов высокого класса качества, все три эмбриопереноса неудачные. Рецидивы генитального герпеса 2-4 раза в год. Перед проведением программы ЭКО ремиссия данного заболевания составляла 3 месяца, по данным ИФА титр Ig M к Herpes simplex 1 и 2 типа не обнаруживался, титр высокоавидных Ig G - 1:5, что соответствовало отсутствию активности герпетической инфекции. По данным УЗИ органов малого таза, диагностической гистероскопии, а также морфологического исследования эндометрия верифицирован диагноз ХЭ. В посеве эндометрия выявлен рост микоплазмы гениталис, проведен курс антибактериальной терапии с учетом антибиотикограммы и контролем эрадикации возбудителя. После проведенного лечения пациентка взята в программу ЭКО. При анализе сыворотки крови в день пункции фолликулов концентрация ЛФ 0,77 мкг/мл, ИЛ-8 не обнаруживался данным методом. Соответственно прогноз неблагоприятный, принято решение об отсроченном переносе эмбрионов, эмбрионы витрифицированы. Повторный ИФА к Herpes simplex 1 и 2 типов выявил увеличение Ig G в титре до 1:3200, назначен курс противовирусной терапии ацикловиром (250 мг на 500 мл 0,9% физиологического раствора в/в капельно 1 раз в день в течение 5 дней), а также иммунокорректирующая терапия в виде ректальных свечей интерферона в дозе 1 млн. ед. на ночь в течение 10 дней. Затем через 1 месяц после окончания лечения выполнен перенос размороженного эмбриона. Через 3 недели установлен факт клинической беременности.

### **Формула изобретения.**

Способ повышения эффективности программ ЭКО при трубно-перитонеальном бесплодии, ассоциированным с хроническим эндометритом, включающий применение препарата Ликопид при подготовке женщины с проявлениями хронического эндометрита к программе ЭКО, а также получение и исследование образцов венозной крови методом твердофазного иммуноферментного анализа после проведения иммунокорректирующей терапии, отличающийся тем, что у женщин с трубно-перитонеальном бесплодием ассоциированным с хроническим эндометритом после проведения курса иммунокорректирующей терапии препаратом Ликопид в день пункции фолликулов в программе ЭКО получают образец сыворотки крови, в котором методом твердофазного иммуноферментного анализа определяют содержание ЛФ и ИЛ-8. При концентрации ЛФ и ИЛ-8 в норме (до 1,8 мкг/мл и до 10

пкг/мл соответственно), либо повышении только ЛФ (не более 2,5 мг/л) прогнозируется высокая вероятность положительного исхода ЭКО. При одновременном повышении концентрации в крови ЛФ (более 2 мг/л) и ИЛ-8 (более 10 пкг/мл), прогнозируется высокий риск негативного исхода, рекомендуется отсроченный перенос эмбрионов и дополнительная антибактериальная, а также противовоспалительная терапия. При выявлении ЛФ в концентрации менее 1 мг/л при одновременном отсутствии в крови ИЛ-8, прогнозируется высокий риск негативного исхода, рекомендуется отсроченный перенос эмбрионов и дополнительная противовирусная, а также иммунокорректирующая терапия.

Авторы:

Лихачева Виктория Васильевна

Зорина Вероника Николаевна

Андропова Татьяна Михайловна

Зорин Николай Алексеевич